

Univerzita Karlova
2. lékařská fakulta

Doktorský studijní program: Fyziologie a patofyziologie člověka



Mgr. Martin Bezdíčka

Patogeneze nefrotického syndromu u dětí a prediktory odpovědi na léčbu
kortikoidy

Pathogenesis of nephrotic syndrome in children and predictors of corticosteroid
treatment response

Disertační práce

Školitel: doc. MUDr. Ondřej Souček, Ph.D.

Konzultant: doc. MUDr. Jakub Zieg, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení:

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

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

V Praze, 29.6.2022

Martin Bezdíčka

Poděkování: Na tomto místě bych chtěl poděkovat především svému školiteli doc. MUDr. Ondřejovi Součkovi, Ph.D. za veškerou pomoc, motivaci a trpělivost při realizaci mé práce. Jeho vedení, konzultace i přínosné rady mi byly klíčovou pomocí k dokončení projektu a k osvojení si mnoha laboratorních metod. Dále bych chtěl také poděkovat doc. MUDr. Jakubovi Ziegovi, Ph.D. za vstřícnost a podporu v klinické oblasti výzkumu kdykoliv jí bylo potřeba. Za pomoc při finalizaci laboratorních analýz patří poděkování Mgr. Kateřině Poláčkové z naší Laboratoře Věry Vávrové. Neméně chci poděkovat celému týmu z Laboratoře molekulární genetiky Pediatrické kliniky 2. LF UK a FN Motol pod vedením prof. MUDr. Ondřeje Cinka, Ph.D., díky jimž jsem se poprvé dostal k výzkumu a mnohokrát mi pomohli svými zkušenostmi z analýz. Za zaškolení v mnoha zásadních laboratorních metodách patří také poděkování prof. Dr. Ing. Michaele Rumlové a celému jejímu týmu z Ústavu Biotechnologie VŠCHT Praha. Nakonec bych také rád poděkoval celé své rodině za podporu od počátku mého studia.

ABSTRAKT

Nefrotický syndrom je onemocnění ledvin, jehož podstatou je porucha podocytů. Může vzniknout sekundárně následkem infekce, systémového onemocnění či některých léků, nebo se vyskytne jako náhlá izolovaná primární porucha ledvin. Současný standardní léčebný postup zatěžuje pacienty četnými závažnými nežádoucími účinky. U části nemocných, kteří jsou k úvodní několikátýdenní glukokortikoidní léčbě rezistentní, se daří identifikovat kauzální genetický podklad, u ostatních zůstává příčina neznámá. U pacientů reagujících na úvodní glukokortikoidní léčbu remisí později může dojít k opakovaným relapsům s nutností dlouhodobé glukokortikoidní terapie. Tato práce popisuje vlastní originální výzkumné studie, které se zabývaly možnostmi zlepšení diagnostiky genetických příčin nefrotického syndromu, objevováním molekulární podstaty druhé nejčastější genetické příčiny steroid-rezistentní formy onemocnění (způsobené mutacemi transkripčního faktoru WT1) a hledáním klinických a laboratorních faktorů predikujících rezistenci ke glukokortikoidní léčbě.

Kombinací klasického Sangerova sekvenování a moderního sekvenování nové generace (NGS) jsme jako první v kohortě 18 let sbíraných vzorků českých a slovenských dětí s nefrotickým syndromem identifikovali monogenní příčinu u 38 % z nich. Nejprevalentnější byly kauzální varianty v genech *NPHS2* (15 %), *WT1* (9,5 %) a *NUP93* (5,4 %). Funkční studie odhalila významné změny v afinitě 6/8 mutantních forem transkripčního faktoru WT1 k cílové sekvenci DNA a luciferázová esej v buněčné linii HEK293 pak i zvýšenou expresi jednoho z cílových genů *ACTN1* u dvou mutantů WT1 s největší změnou vazebné afinity. Z dostupných klinických a laboratorních dat pacientů se nám nepodařilo nalézt parametr, který by predikoval terapeutickou odpověď na glukokortikoidy. Metoda NGS významně urychluje a zlevňuje diagnostiku monogenních příčin glukokortikoid-rezistentního nefrotického syndromu. Výsledek genetické analýzy nám již dnes umožňuje navrhnout efektivní individualizovanou léčbu u některých jedinců. U ostatních a to i u těch, u kterých je kauzální gen známý, se čeká na objasnění nebo upřesnění molekulární podstaty onemocnění. To je předpokladem úspěšné, efektivní, cílené a nežádoucími účinky nezatížené léčby, která je však bohužel dnes pro většinu těchto pacientů nedostupná.

Klíčová slova: funkční studie, genetická analýza, glukokortikoidy, ledviny, luciferázová esej, mutagenese, NGS, nefrotický syndrom, vazebná afinita, WT1

ABSTRACT

Nephrotic syndrome is a kidney disease caused by injury of the podocytes. It can be secondary due to infection, systemic disease or certain drugs, but it may also present as sudden primary nephrotic syndrome without obvious inducer. Current standard treatment has many severe adverse effects. In some patients that are resistant to the initial several-week-long glucocorticoid treatment it is possible to reveal the causative genetic aetiology of the disease, whereas in the rest of them aetiology remains unknown. Those who respond well to initial glucocorticoid treatment and achieve remission may later on develop repeated relapses requiring long-term glucocorticoid therapy. This work describes our original research studies focusing on the improvement of genetic diagnostics of nephrotic syndrome, on the exploration of molecular mechanisms of the second most common genetic cause of the steroid-resistant nephrotic syndrome (transcription factor WT1 mutants) and on the search of clinical and laboratory factors that could predict the resistance to glucocorticoid treatment.

By combining Sanger and next-generation sequencing (NGS) we were the first to identify monogenic cause in 38 % of Czech and Slovak children with steroid-resistant nephrotic syndrome whose samples had been collected for 18 years. The most prevalent causative variants were in genes *NPHS2* (15 %), *WT1* (9,5 %) and *NUP93* (5,4 %). A functional study revealed that in 6/8 mutant forms of WT1 transcription factor the DNA-binding affinity was significantly changed. Subsequent luciferase assay in HEK293 cells showed that two WT1 mutant forms presenting with the largest change of the DNA-binding affinity induced the expression of one of the target genes *ACTN1*. The available clinical and laboratory data of the patients did not prove to be predictive of the response to the initial glucocorticoid treatment. The NGS significantly accelerates and reduces the costs of the genetic diagnostics of the monogenic causes of steroid-resistant nephrotic syndrome. The result of the genetic analysis already now allows for effective individualized treatment in some patients. However, in the majority of them including those with know monogenic cause of the disease, we are still waiting for clarification of the the molecular mechanism of the disease. This is an important prerequisite for successful, effective, targeted and side-effects-free treatment, which is nowadays unavailable to most patients.

Key words: functional study, genetic analysis, glucocorticoids, kidney, luciferase assay, mutagenesis, NGS, nephrotic syndrome, binding affinity, WT1

Seznam zkratk

Angptl4 – angiopoetinu podobný faktor 4

ESRD – Konečné stádium onemocnění ledvin

FPLC – rychlá proteinová kapalinová chromatografie

FSGS – fokální segmentální glomeruloskleróza

GF – glomerulární filtrace

MCD – nemoc minimálních změn

MST – mikroškálová termoforéza

NGS – sekvenování nové generace

NS – nefrotický syndrom

PCR – polymerázová řetězová reakce

SPRi – Zobrazení rezonance povrchových plazmonů

SRNS – glukokortikoid-rezistentní nefrotický syndrom

SSNS – glukokortikoid-senzitivní nefrotický syndrom

suPAR – solubilní receptor pro aktivátor plazminogenu urokinázového typu

Obsah

1.	Definice a diagnostika nefrotického syndromu	9
2.	Klasifikace nefrotického syndromu	10
2.1	Dělení podle etiologie	10
2.2	Dělení podle věku vzniku	10
2.3	Dělení podle histologického nálezu	11
2.4	Dělení podle odpovědi na terapii	12
3.	Patogeneze nefrotického syndromu – „onemocnění podocytů“	14
4.	Genetika nefrotického syndromu	15
4.1	Historicky první nalezené geny	15
4.2	Další geny odhalené moderními genetickými metodami	16
4.3	Funkce genů asociovaných se SRNS	17
4.3.1	Proteiny glomerulární filtrační membrány	18
4.3.2	Cytoskeletální proteiny	18
4.3.3	Proteiny účastníci se metabolismu podocytů	18
4.3.4	Jaderné proteiny	19
4.3.5	Mitochondriální proteiny	20
4.3.6	Syndromický SRNS	21
5.	Jiné možné příčiny nefrotického syndromu	22
6.	Léčba nefrotického syndromu	24
6.1	Cíle léčby	24
6.2	Protokol standardní úvodní terapie glukokortikoidy a jejich nežádoucí účinky	24
6.3	Mechanismus působení glukokortikoidů	24
6.4	Léčba steroid-senzitivního nefrotického syndromu	25
6.5	Léčba steroid-rezistentního nefrotického syndromu	26
6.6	Shrnutí léčby NS	27
7.	Metody výzkumu mechanismu postižení podocytů	28
7.1	Modely podocytů ex vivo	28
7.2	Verifikace monogenní příčiny SRNS	29
7.3	Transkriptom podocytů	30
7.4	Funkční studie podocytů - analýza molekulárních interakcí	31
7.4.1	Mikroškalová termoforéza (MST)	31
7.4.2	Zobrazení rezonance povrchových plazmonů (SPRi)	32
8.	Hypotézy a cíle disertační práce	35
9.	Metodika	36
9.1	Metodika studie 1 - Molekulárně genetické vyšetření jedinců se SRNS	36
9.1.1	Kritéria zařazení pacientů do studie	36
9.1.2	Genetická analýza	36
9.2	Metodika studie 2 – Analýza vazebné afinity mutantů WT1 k cílové DNA sekvenci	44

9.2.1	Původ <i>WT1</i> variant.....	44
9.2.2	Příprava WT1 proteinů	44
9.2.3	Expres proteinů WT1	45
9.2.4	Izolace a purifikace proteinů WT1.....	46
9.2.5	Vazebná analýza	47
9.2.6	Luciferázová esej	49
9.2.7	Statistika	50
9.3	Klinické a laboratorní prediktory odpovědi na glukokortikoidní léčbu.....	51
10.	Výsledky	52
10.1	Studie 1 – Molekulárně genetické vyšetření jedinců se SRNS	52
10.1.1	Výsledky genetické analýzy	52
10.1.2	Výsledky klinických a laboratorních nálezů	59
10.2	Studie 2 - Analýza vazebné afinity mutantů WT1 k cílové DNA sekvenci.....	67
10.2.1	Vazba WT1 proteinů k EGR1 DNA sekvenci	67
10.2.2	Klinická data pacientů s <i>WT1</i> variantami.....	69
10.3	Klinické a laboratorní prediktory odpovědi na glukokortikoidní léčbu.....	72
11.	Diskuze	73
11.1	Diskuze ke studii 1	73
11.1.1	Význam NGS a nejčastěji mutované geny u českých a slovenských dětí se SRNS.....	73
11.1.2	Lze klinicky odlišit genetický a negenetický SRNS?	75
11.1.3	Význam genetického vyšetření SRNS v praxi vycházející ze studie 1	75
11.1.4	Závěry studie 1.....	76
11.2	Diskuze ke studii 2	76
11.2.1	Analýza vazebné afinity mutantů WT1 k cílové DNA sekvenci	76
11.2.2	Lze odlišit SRNS způsobený mutacemi <i>WT1</i> od ostatních monogenních forem?	79
11.2.3	Závěry studie 2.....	81
11.3	Lze odlišit SRNS a SSNS pomocí příznaků při manifestaci onemocnění?	82
12.	Závěr	83
13.	Souhrn	84
14.	Summary	85
15.	Seznam literatury	86
16.	Přehled publikační činnosti autora	99

1. Definice a diagnostika nefrotického syndromu

Nefrotický syndrom (NS) je onemocnění ledvin charakterizované ztrátou sérových bílkovin močí (**proteinurie**), jejich sníženým množstvím v séru (**hypoalbuminémie**), z toho vyplývajícím zmnožením extracelulární tekutiny projevujícím se nejčastěji otoky kotníků a obličeje a laboratorně je doprovázeno významným zvýšením sérového cholesterolu a triglyceridů (**hyperlipidémii**) (Varner et al., 2018; Skálová and Zieg, 2017). Jedná se o jedno z nejčastějších dětských ledvinových onemocnění s incidencí v Evropě cca 1/25 000 dětí (Dossier et al., 2016). Neléčený NS může dospět až k selhání ledvin a úmrtí. Zatímco příčinu onemocnění se většinou nepodaří jednoznačně objasnit, jeho patogeneze je do jisté míry prozkoumaná a spočívá ve zvýšené propustnosti glomerulární filtrační bariéry v ledvinách způsobené vrozeným nebo získaným poškozením specializovaných ledvinových buněk - podocytů (Varner et al., 2018; Torban et al., 2019).

NS se u menších dětí diagnostikuje pomocí kvantitativního zhodnocení proteinurie z ranního jednorázového vzorku moči. Stanoví se poměr bílkoviny a kreatininu, přičemž nefrotická proteinurie je definována hodnotou $> 200 \text{ mg/mmol}$ (Skálová and Zieg, 2017; KDIGO., 2012). Především u starších spolupracujících dětí lze proteinurii také vyšetřit 24hodinovým sběrem moči, kdy nefrotickou proteinurii charakterizuje hodnota bílkoviny $> 960 \text{ mg/m}^2/\text{den}$ (Skálová and Zieg, 2017). Hypoalbuminémie je pak definována hodnotou sérového albuminu $< 25 \text{ g/l}$ (KDIGO., 2012). Hyperlipidémii ve většině laboratoří odpovídá vzestup sérového cholesterolu $> 4,2\text{-}5,0 \text{ mmol/l}$ (podle věku) a sérové koncentrace triglyceridů $> 1,6\text{-}2,2 \text{ mmol/l}$ (podle věku) (Geier, 2001; Skálová and Zieg, 2017).

Chronické onemocnění ledvin se diagnostikuje a klasifikuje podle míry snížení glomerulární filtrace (GF) vypočtené dle Schwartzovy rovnice. GF vypovídá o schopnosti ledvin očistit plazmu od kreatininu za jednotku času (tzv. clearance kreatininu). Pro její výpočet je třeba znát koncentraci sérového kreatininu, výšku pacienta a pohlavně a věkově specifickou proporční konstantu. Normální renální funkce je definována hodnotou $> 90 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ (Staples et al., 2010). Podle míry poklesu pod tuto hranici, pokud pokles trvá déle než 3 měsíce, je definováno 5 kategorií chronického onemocnění ledvin. Nejzávažnější, pátý stupeň ($\text{GF} < 15 \text{ ml/min/1,73 m}^2$) charakterizuje renální selhání. Pro upřesnění rizika rozvoje selhání

ledvin se ke klasifikaci podle GF přidávají ještě 3 podkategorie podle míry zvýšení poměru albuminu ke kreatininu v moči (KDIGO., 2012).

2. Klasifikace nefrotického syndromu

2.1 Dělení podle etiologie

Nejčastěji u dětí NS vzniká v důsledku přímého poškození filtrační bariéry ledvin, pak se klasifikuje jako **primární forma NS**, která může být **monogenní** (způsobená patogenní variantou ve známém genu) nebo **idiopatická** (genetické vyšetření je negativní a jsou vyloučeny sekundární příčiny). Vzácně se u dětí vyskytuje **sekundární NS** jako komplikace primárně neledvinového chronického onemocnění (např. diabetes, systémový lupus, chronická hepatitida B a C, HIV, atp.) nebo v důsledku expozice některým lékům (např. penicilamin, lithium, ampicilin) nebo nefrotoxickým těžkým kovům (např. rtuť, kadmium) (Varner et al., 2018; Kodner, 2009). Konkrétní příčina onemocnění v dětském věku a adolescenci zůstává díky velmi frekventním idiopatickým případům u většiny jedinců neobjasněna a je předmětem dlouhodobého výzkumu.

2.2 Dělení podle věku vzniku

Sekundární formy NS jsou častější u dospělých, ale monogenní primární NS je naopak nejčastěji zastoupenou formou NS v novorozeneckém věku, a proto lze i věk aplikovat jako parametr pro rozdělení NS (Santín et al., 2011). **Kongenitální NS** se projevuje u novorozenců a kojenců do 3 měsíců od narození a je převážně způsoben patogenními variantami v genech pro strukturní proteiny glomerulární filtrační bariéry (Bérody et al., 2019). Nejznámější forma kongenitálního NS je zapříčiněna mutovaným nefrinem, resp. patogenními variantami *NPHS1* genu, které jsou majoritně nacházeny ve finské populaci (tzv. finský typ). Je typický, podobně jako jiné typy kongenitálního NS, špatnou odpovědí na léčbu glukokortikoidy a nástupem renálního selhání často již v předškolním věku (Bérody et al., 2019). Zcela raritně může mít kongenitální NS infekční etiologii, např.: syfilis, toxoplazmóza nebo cytomegalovirová infekce (Downie et al., 2017; Skálová and Zieg, 2017), které jsou dobře léčitelné. Primární monogenní NS má tedy u dětí zpravidla mnohem horší prognózu než NS sekundární. Pokud se NS manifestuje mezi 4. a 12. měsícem života, jedná se o **infantilní NS**. NS projevující se po 1. roce života pak klasifikujeme jako **dětský NS** (Skálová and Zieg, 2017). Proporce

molekulárně geneticky pozitivních nálezů klesá s rostoucím věkem; u kongenitálního NS je to 85 % všech případů, u infantilního NS 40 % a u adolescentů s NS pouze 11 % případů (Skálová and Zieg, 2017; Trautmann et al., 2015; Bérody et al., 2019; Sadowski et al., 2015). Z toho vyplývá, že s věkem roste podíl primárních idiopatických případů. Dělení dle věku vzniku je však čistě popisné a kromě odhadu pravděpodobnosti monogenní etiologie nijak dále nezpřesňuje budoucí průběh onemocnění ani neumožňuje individualizovanou cílenou terapii.

2.3 Dělení podle histologického nálezu

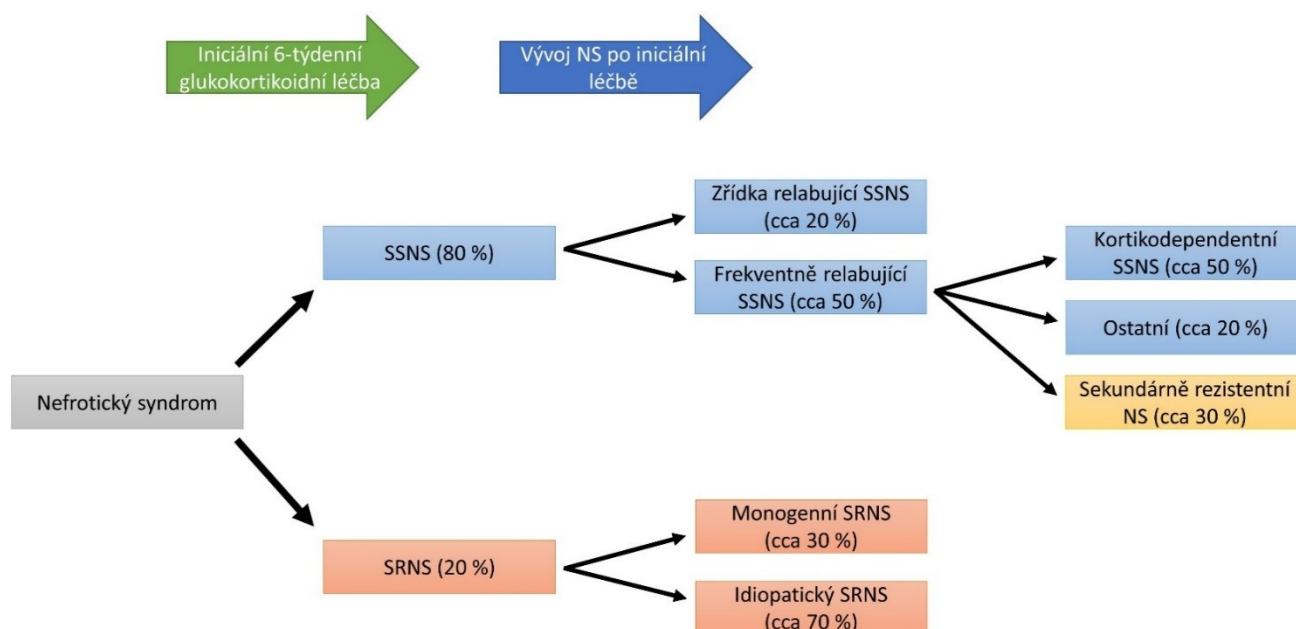
NS lze také dělit dle histologického nálezu z diagnostických renálních biopsií. U dětí s NS indikovaných k renální biopsii se v 80 - 90 % případů objevuje „**nemoc minimálních změn glomerulů**“ (MCD) a v cca 10 - 20 % je histologickým nálezem **fokální segmentální glomeruloskleróza (FSGS)** (Vivarelli et al., 2017; D'Agati et al., 2011). Projevy MCD jsou světelným mikroskopem nediferencovatelné, proto se pro analýzu histologického vzorku využívá elektronový mikroskop, který zobrazí splývání pedicel (buněčných výběžků) podocytů (Andolino and Reid-Adam, 2015). Oproti tomu projevy FSGS jsou identifikovatelné běžnou světelnou mikroskopií, v obraze dominují lokální částečné sklerotické změny glomerulů. Sklerotizované části glomerulů jsou nefunkční a zachovalé části bývají zvětšené až hypertrofické. U FSGS (50 – 60 % dětí se steroid-rezistentním NS, tj. SRNS (Trautmann et al., 2015; Bierzynska et al., 2017)) je v porovnání s MCD (pouze 10 – 20 % dětí se SRNS (Dogra and Kaskel, 2017; Bierzynska et al., 2017; Trautmann et al., 2015)) vyšší riziko rezistence k terapii glukokortikoidy, ztráty glomerulární funkce a horšího průběhu NS, naopak u MCD je po podání glukokortikoidů vyšší pravděpodobnost dosažení remise onemocnění (Vivarelli et al., 2017; Trautmann et al., 2015). Spekuluje se o tom, že oba histologické obrazy jsou vlastně odrazem různé míry postižení ledvin způsobené tímž onemocněním, neboť opakované biopsie u dětí s MCD při glukokortikoidní rezistenci ukazují progresi MCD do FSGS u více než poloviny z nich (Trautmann et al., 2015; D'Agati et al., 2011; Vivarelli et al., 2017). Ostatní histologické typy glomerulopatií asociovaných s NS, jako je například membranoproliferativní glomerulonefritida, IgA a IgM nefropatie či membránozní nefropatie jsou u dětí méně časté a mohou být navíc asociované s hematurií, která do obrazu NS nepatří (Andolino and Reid-Adam, 2015; Tullus et al., 2018; Skálová and Zieg, 2017). Speciálním histologickým typem u dětí s NS je difúzní mezangiální skleróza,

kteřá se objevuje převážně v asociaci s exonovými mutacemi v genu *WT1* a s Denys-Drashovým syndromem (Lipska et al., 2014). Typickým znakem difúzní mezangiální sklerózy je zvýšená tvorba kolagenu v mezangiálních oblastech se zmenšenými kondenzovanými glomeruly (Fogo et al., 2015). Limitací histologické klasifikace NS jsou vlastní indikační kritéria k renální biopsii. Ta je indikována pouze u pacientů rezistentních k úvodní terapii glukokortikoidy, histologický obraz a jeho vývoj u steroid-senzitivní formy onemocnění tak zůstává nepoznán. Kromě toho je pro věrohodné histologické hodnocení vzorku potřeba zachytit alespoň 25 reprezentativních glomerulů (Tullus et al., 2018), což snižuje výtěžnost vyšetření u nevalidních vzorků. Dle recentní studie může být až 54 % pacientů s MCD rezistentní k léčbě a naopak 9 % jedinců s FSGS může být ke glukokortikoidům senzitivní (Narla and Swiatecka-Urban, 2020). I vzhledem ke své invazivitě tak není renální biopsie a následné histologické hodnocení optimálním přístupem k určení prognózy onemocnění ani k určení cílené a efektivní terapie.

2.4 Dělení podle odpovědi na terapii

Standardní úvodní léčba primárního NS spočívá v šestitýdenním podávání vysokých dávek glukokortikoidů a je jednotná pro všechny pacienty. Podle vymizení proteinurie na konci tohoto intervalu se onemocnění dělí na **steroid-senzitivní (SSNS, 80 % dětí)** nebo **steroid-rezistentní NS (SRNS, 20 % dětí)** (McKinney et al., 2001). Iniciální odpověď na léčbu glukokortikoidy je v současné době hlavním prognostickým ukazatelem NS (Narla and Swiatecka-Urban, 2020). U jedinců se SSNS může být navozena dlouhodobá remise, ale u 80 – 90 % dětí se vyskytne nejméně jeden relaps (Lombel, Gipson, et al., 2013). Z toho až u 50 % pacientů dochází k opakujícím se relapsům onemocnění reagujících na standardní glukokortikoidní léčbu nebo je u nich remise dosaženo pouze dlouhodobým podáváním glukokortikoidů (tzv. **kortikodependence**) (Lombel, Gipson, et al., 2013; Downie et al., 2017). Může však také dojít ke vzniku **sekundární rezistence** ke glukokortikoidům, dle recentní studie je tomu tak až u 30 % jedinců původně k terapii senzitivních (viz Obrázek 1) (Bierzynska et al., 2017). V tom případě je nutné pokračovat v terapii jinými imunosupresivy či chemoterapeutiky (Lombel, Gipson, et al., 2013). Jedinci se SRNS, u kterých jsou glukokortikoidy již od samého počátku terapie neefektivní (ale přijde se na to z důvodu nastavení diagnostických kritérií až po šesti týdnech léčby), mohou mít **monogenní etiologii** a profitovat z cílené terapie (např. substituce koenzymem Q10 u jedinců s patogenními

variantami v genech pro enzymy biosyntézy přirozeného koenzymu Q10 (Stańczyk et al., 2018)). Proto je u dětí se SRNS indikováno molekulárně genetické vyšetření. Jedinci se SRNS, u kterých genetické vyšetření monogenní příčinu onemocnění neodhalí, mohou mít patogenní variantu v doposud neznámém genu nebo je jejich etiologie jiná. U těch tak zatím cílená terapie není možná. Všechny děti s NS, které nedosáhnou dlouhodobé remise nebo jen omezeného počtu relapsů, jsou vystaveny chronické vysoko-dávkované glukokortikoidní léčbě s četnými vážnými nežádoucími účinky a mají vysoké riziko vzniku renálního selhání s nutností chronického dialyzačního programu nebo transplantace ledvin (Tullus et al., 2018).



Obr. 1 Vývoj NS dle odpovědi na úvodní glukokortikoidní léčbu.

3. Patogeneze nefrotického syndromu – „onemocnění podocytů“

Základní funkční jednotkou ledvin je nefron, který kromě dlouhých tubulů sestává z klubka kapilár - glomerulu obaleného Bowmanovým váčkem. Jednotlivé kapiláry mají ve své stěně póry a zevně je obepínají pedicely (výběžky) podocytů. **Podocyty jsou terminálně diferencované buňky** s velmi omezenou schopností regenerace. Pedicely spolu s endotelem kapilár a vmezeřenou glomerulární bazální membránou tvoří **glomerulární filtrační membránu**. Filtraci krve přes tuto membránu vzniká primární moč. Selekcce prostoupivších molekul je dána jednak jejich velikostí (rozměr štěrbin membrány je 30-40 nm) a dále jejich elektrickým nábojem (kladně nabitě molekuly procházejí lépe) (Noone et al., 2018; McMahon, 2016). Důvodem vzniku proteinurie vedoucí k NS je především poškození podocytů. Při jejich poškození dochází ke ztrátě buněčné struktury a porušení funkce podocytárních pedicel. To umožňuje vstup větších molekul (jako albumin a dalších proteinů) přes glomerulární filtrační membránu do primární moči a tím vznik proteinurie (Garg, 2018).

Mezi pedicelami podocytů existuje speciální typ mezibuněčného spojení tvořeného proteiny zajišťujícími selektivní filtraci molekul, ukotvení podocytů k bazální membráně a mezi sebou, propojení s aktinovým cytoskeletem podocytů a dále signalizaci regulující plasticitu pedicel (Noone et al., 2018). Mezibuněčné spojení podocytů je velmi pevné a umožňuje odolávat vysokému kapilárnímu hydrostatickému tlaku (Grahammer et al., 2013). Hlavními extracelulárními strukturními proteiny mezibuněčných spojů podocytů jsou **nefrin, podocin** a dále např. NEPH1, které jsou funkčně propojeny s intracelulárními cytoskeletálními proteiny podocytů (např. CD2AP a ACTN4) (Nagata, 2016). Laboratorní myši s knockoutovaným podocinem vykazovaly normálně vyvinuté ledviny, avšak masivní proteinurii již první den po porodu, přičemž do 5 týdnů všechny vyvinuly renální selhání (Roselli et al., 2004). Histologické vyšetření jejich ledvin odhalilo difúzní mezangiální sklerózu a hypertrofii glomerulů, splynutí podocytárních pedicel a deformaci celé glomerulární filtrační membrány. Navíc analýza transkriptomu ledvin odhalila sníženou expresi nefrinu oproti zdravým kontrolám, což naznačuje funkční propojení mezi podocinem a nefrinem (Roselli et al., 2004). Lze předpokládat, že mutace nejen dalších strukturních a cytoskeletálních podocytárních proteinů ale i proteinů jaderných či mitochondriálních způsobují poruchu funkce glomerulární filtrační membrány, resp. nefrotickou proteinurii a renální selhání.

4. Genetika nefrotického syndromu

4.1 Historicky první nalezené geny

Již před více než 20 lety se podařilo odhalit první gen asociovaný s kongenitálním NS. Jednalo se o gen *NPHS1* (kóduje **nefrin**, nezbytnou strukturní komponentu extracelulární části glomerulární filtrační membrány), jehož patogenní varianty byly zodpovědné za většinu tehdejších případů kongenitálního NS ve finské populaci (Kestilä et al., 1998). Později došlo k nálezům dalšího významného markeru podocytů, genu *NPHS2* (kóduje **podocin**, tvořící transmembránový spoj mezi extracelulárními komponenty glomerulární filtrační membrány a cytoskeletem buňky). Podocin reguluje glomerulární permeabilitu a patogenní varianty *NPHS2* jsou asociovány se SRNS (Boute et al., 2000). Výzkum postupně odhalil, že proteiny podocin i nefrin se nacházejí specificky v podocytech, kde společně interagují s cytoskeletálními proteiny (CD2AP) (Koziell et al., 2002) a jsou hlavními komponentami podílejícími se na stavbě mezibuněčného spojení podocytů (Schwarz et al., 2001; Huber et al., 2001). Paralelně s nálezem patogenních variant genu *NPHS1* asociovaných s NS byly objeveny kauzální varianty genu *WT1*, které byly identifikovány u jedinců se SRNS asociovaného s dalšími neledvinovými projevy a poruchami (například Denys-Drashův a Frasierův syndrom) (Barboux, Niaudet, Gubler, Grünfeld, et al., 1997; Klamt et al., 1998; Mueller, 1994). Patogenní varianty třech zmíněných genů (*NPHS1*, *NPHS2* a *WT1*) byly posléze v populačních studiích shledány jako nejčastější příčiny kongenitálního a infantilního NS (Trautmann et al., 2015; Hinkes et al., 2007). Geneticky podmíněný NS tedy vede k brzkému postižení ledvin a projeví se spíše již v raném dětství, i proto je genetické vyšetření smysluplné především v nejnižších věkových kategoriích.

U části dětí se SSNS byla odhalena dysregulace signální dráhy „Rho – like small GTPase“, způsobená patogenními variantami v genech pro regulátory této dráhy (Ashraf et al., 2018). Význam dráhy v patogenezi onemocnění podpořilo pozorování, že glukokortikoidy ovlivňují funkci několika regulátorů této dráhy. Na základě těchto dat se zdá, že i někteří pacienti se SSNS mohou mít genetickou predispozici k onemocnění (Ashraf et al., 2018). Existují také případy SSNS pacientů nesoucích konkrétní polymorfizmy (varianty objevující se i ve zdravé populaci) v genech rodiny *HLA* (kódují antigeny T lymfocytů regulujících imunitní odpověď; např. *HLA-DQA1*) (Lane et al., 2019). Hypotézou je, že antigeny kódované *HLA* geny se specifickými polymorfizmy mohou vykazovat pozměněnou funkci, kdy při infektu dochází

k abnormální imunitní odpovědi T lymfocytů vedoucí k podocytárnímu poškození (Gbadegesin et al., 2015). Jak přesně tyto „rizikové“ polymorfizmy vyvolávají SSNS však nebylo zatím odhaleno (Lane et al., 2019).

4.2 Další geny odhalené moderními genetickými metodami

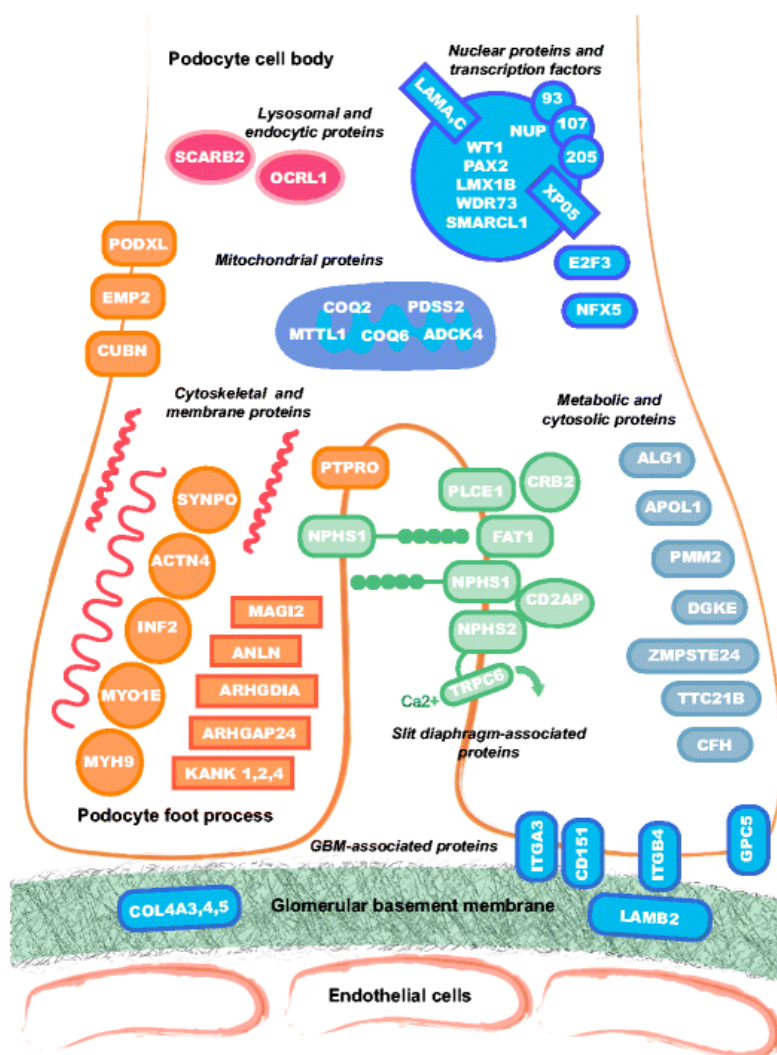
Rozvoj metod masivního paralelního genetického sekvenování (**next generation sequencing, NGS**) umožnil cílené a efektivní vyhledávání genetické příčiny NS. Rozsáhlá multicentrická studie (1783 rodin), která se zaměřila na vyšetření 27 v té době známých genů u dětí i dospělých s manifestací SRNS před 25. rokem života, identifikovala patogenní variantu u 30 % jedinců (Sadowski et al., 2015). Další studie, jejichž cílem bylo molekulárně genetické vyšetření celonárodních kohort dětí se SRNS, ukázaly také cca 20 – 30 % pozitivních nálezů (Bierzynska et al., 2017; Wang et al., 2017; Siji et al., 2018). Monocentrická studie z Dětské nemocnice v Bostonu však genetickou příčinu SRNS identifikovala pouze u 11 % případů ze 77 dětí se SRNS (z celkem 72 rodin) (Tan et al., 2018). V bostonské studii byl analyzován obdobný počet genů (24) jako ve výše uvedené multicentrické studii (Sadowski et al., 2015). Porovnání těchto dvou studií ukazuje, že proporce pozitivních nálezů může být ovlivněna velikostí sledované kohorty. Další podstatný vliv mohou mít příbuzenské vztahy ve zkoumané populaci, kdy ve výše zmíněné multicentrické studii byl vyšší podíl pozitivních nálezů v rodinách s příbuzenskými vztahy (50 %) než v rodinách s nepříbuzenskými vztahy (25 %) (Sadowski et al., 2015). Na proporcii pozitivních nálezů má také vliv s rostoucím poznáním v čase přibývající počet nově identifikovaných genů. Nedávná britská studie analyzující genetickou příčinu SRNS odhalila 26 % pozitivních případů při vyšetření 53 genů (Bierzynska et al., 2017). Avšak i přes neustále narůstající množství genů (dnes již téměř 70) si majoritní podíl drží patogenní varianty v genech *NPHS1*, *NPHS2* a *WT1*, bez ohledu na velikost nebo etnikum studované populace (Trautmann et al., 2015; Bierzynska et al., 2017; Sadowski et al., 2015).

NGS umožňuje nacházet stále nové geny či patogenní varianty genů asociovaných s NS. Nevýhodou tohoto poměrně rychlého odhalování dalších možných genetických příčin NS je, že u mnoha genů není dosud objasněna jejich funkce, resp. role v patogenezi onemocnění a mnoho nalezených variant je klasifikováno jako varianty nejasného klinického významu. Nelze u nich tedy spolehlivě určit, zda existuje kauzální vztah k onemocnění. Jediným

způsobem, jak objasnit kauzalitu nových kandidátních genů či nových variant již známých genů, je provedení časově náročných a finančně nákladných funkčních studií in vitro.

4.3 Funkce genů asociovaných se SRNS

Existuje několik dalších genů, které se uplatňují v podocytech, ale nejsou zcela výhradními markery těchto buněk. I přesto byla jejich asociace s NS v průběhu let ověřena (Nagata, 2016). Jejich produkty se uplatňují ve skladbě **glomerulární filtrační membrány či bazální laminy, cytoskeletu, podílejí se na endocytóze či metabolismu buňky, regulaci buněčného jádra nebo na funkci mitochondrií** (vybrané proteiny viz Obrázek 2) (Preston et al., 2019).



Obr. 2 Ilustrace části podocytu s označením lokalizace vybraných proteinů, jejichž mutované formy jsou asociovány se SRNS. Převzato z (Preston et al., 2019).

4.3.1 Proteiny glomerulární filtrační membrány

Vedle *NPHS1* a *NPHS2* se na správné funkci glomerulární filtrační membrány podílí např. produkt genu *TRPC6*. Ten kóduje **neselektivní iontový kanál** (Schlöndorff et al., 2009; Preston et al., 2019), který je aktivován proteinkinázou C a řídí transport vápenatých iontů dovnitř podocytů. Fyziologická funkce podocytů je částečně závislá na vstupu vápenatých iontů do buňky, neboť tyto kanály udržují iontovou homeostázi podocytů a stabilitu glomerulární filtrační membrány (Ilatovskaya and Staruschenko, 2015). U myši s hyperaktivací TRPC6 nebo s mutovaným TRPC6 nalezeným u pacientů s FSGS byla pozorována albuminurie a destabilizace podocytů a vzorky z renální biopsie vykazovaly znaky FSGS (Krall et al., 2010). Studie tedy potvrdila, že zvýšená aktivita TRPC6 kanálů a následný nadměrný influx vápenatých iontů do podocytů vedou k poškození glomerulární filtrační membrány (Ilatovskaya and Staruschenko, 2015). Transgenní myší modely s hyperaktivovaným TRPC6 kanálem jsou dnes komerčně dostupné a využívají se pro studium FSGS (Ilatovskaya and Staruschenko, 2015).

4.3.2 Cytoskeletální proteiny

Cytoskelet určuje tvar podocytů a umožňuje intracelulární transport. Je tedy zřejmé, že patogenní varianty genů produkujících cytoskeletální proteiny se mohou zásadním způsobem podílet na patogenezi NS. Jedinci s kauzálními variantami v cytoskeletálních genech mohou mít různě závažný průběh a variabilní penetranci onemocnění (Barua et al., 2013). Příkladem jsou kauzální varianty genu *INF2* nalezené v části kódující funkční doménu, která váže aktin. NS se může manifestovat již v dětství, ale také až ve 4. dekádě, přičemž existují členové postižených rodin, u kterých se zjevné znaky onemocnění nemusí vůbec projevit (Barua et al., 2013). Možným vysvětlením může být náhrada funkce INF2 jiným, příbuzným cytoskeletálním proteinem, který se u různých členů jedné rodiny může zapojit v různé míře. Svou roli může hrát také **pozitivní anamnéza léčby glukokortikoidy**, které pravděpodobně **stabilizují cytoskelet podocytů** (Hahn et al., 2015) indukcí polymerizace aktinu a inhibicí rozpadu aktinových filament (Zhao et al., 2018).

4.3.3 Proteiny účastníci se metabolismu podocytů

Metabolické dráhy, které ovlivňují homeostázu podocytů (ale jsou součástí i jiných tkání), mohou při alteraci svých důležitých enzymů vyvolat NS. Příkladem je diacylglycerol – kináza

epsilon kódovaná genem **DGKE**. Tato kináza reguluje signalizační dráhu komplexu diacylglycerolu s kyselinou arachidonovou a přes tyto posly nepřímo reguluje aktivaci protrombotických faktorů, aktivaci krevních destiček nebo **aktivitu kalciového kanálu TRPC6 na membráně podocytů** (Ozaltin et al., 2013; Noris et al., 2015). Ztráta regulační funkce DGKE vede k aktivaci dráhy, která přes proteinkinázu C indukuje hyperkoagulační stav s rizikem vzniku trombotického stavu (Noris et al., 2015). U podocytů je ztráta funkce DGKE pravděpodobně asociována se zvýšenou aktivací TRPC6 kanálů skrze neregulovaný diacylglycerol, která může vést k rozpadům podocytárního cytoskeletu podobně jako u aktivačních mutací v genu *TRPC6* (Noris et al., 2015). Patogenní varianty *DGKE* byly nejprve popsány ve spojení s atypickým hemolyticko - uremickým syndromem, který není přímo asociován s defektem alternativní cesty aktivace komplementu, ale se ztrátou regulace protrombotických faktorů skrze nefunkční DGKE, která vede k trombotickým stavům (Lemaire et al., 2013). Později byly ovšem popsány patogenní varianty DGKE i u jedinců se SRNS, resp. v klinickém obraze byly přítomny projevy atypického hemolytického uremického syndromu i SRNS (Bierzynska et al., 2017). To dokládá, že NS může být způsoben i mutací proteinu, jehož exprese není specifická pouze pro podocyty, neboť DGKE se objevuje také v endotelových buňkách a krevních destičkách (Noris et al., 2015).

4.3.4 Jaderné proteiny

Jedním z recentně objevených genů asociovaných se SRNS je **NUP93**. Tento gen kóduje podjednotku póru jaderné membrány (Braun et al., 2016). Mutované formy NUP93 způsobují abnormální strukturu pórů, což vede ke snížení transportu molekul přes jadernou membránu. Bylo prokázáno, že BMP7 protein regulující translokaci SMAD4 do jádra inhibuje apoptózu a stimuluje proliferaci podocytů, čímž se stává důležitým faktorem přežití podocytů při akutním i chronickém ledvinovém onemocnění (Braun et al., 2016). Dalším příkladem jaderných genů uplatňujících se v patogenezi NS jsou mutace transkripčních faktorů. Nejznámějším je gen **WT1**, který je důležitý pro správný vývoj a homeostázu nefronů, podocytů a urogenitálního traktu. Původní označení genu je **Wilms tumor 1**, neboť se jedná o klasický tumor-supresor, který může být při inaktivaci predispozicí pro vznik Wilmsova tumoru (Ullmark et al., 2018; Gebeshuber et al., 2013). Lze předpokládat, že patogenní varianty *WT1* vedou k produkci mutovaných WT1 proteinů, které mají změněnou vazebnou afinitu k cílové DNA doméně. Avšak cílené funkční studie WT1 u NS nebyly dosud publikovány. Existují dvě hlavní izoformy WT1 v těle, jedna s inzercí lysinu, threoninu a serinu, což je faktor pravděpodobně

ovlivňující sestřih a stabilitu mRNA (Ullmark et al., 2018), a pak izoforma bez inserce, která je klasickým transkripčním faktorem vázajícím se na specifickou DNA doménu (Laity et al., 2000). Obě izoformy WT1 jsou v lidském těle v konstantním poměru 2:1. Změna tohoto poměru v důsledku intronových mutací *WT1* byla popsána u **Frasierova syndromu**, který je charakterizován SRNS, mužským pseudohermafroditismem s rizikem vzniku Wilmsova tumoru a malignitami gonád. Typickým histologickým nálezem u Frasierova syndromu je FSGS (Barboux, Niaudet, Gubler, Grünfeld, et al., 1997; Klamt et al., 1998). Naopak exonové mutace postihující vazebnou doménu WT1 faktoru byly popsány u **Denys-Drashova syndromu**, charakterizovaného u chlapců SRNS, mužským pseudohermafroditismem, vysokým rizikem vzniku Wilmsova tumoru a histologií ve formě difúzní mezangiální sklerózy (Pelletier et al., 1991b). Nesyndromický SRNS se vyskytuje pouze asi u 28 % dětí s mutovaným WT1 proteinem (Lipska et al., 2014).

4.3.5 Mitochondriální proteiny

Mezi zvláštní příčiny monogenního NS lze zařadit mutace mitochondriálních enzymů a regulátorů **biosyntézy koenzymu Q10** (např. *COQ2*, *COQ6*, *COQ7*, *COQ9*, *ADCK4*). Biosyntéza koenzymu Q10 je komplexní metabolická dráha, která může být narušena hned na několika místech, některé oblasti regulace nejsou dosud u člověka detailněji popsány (Acosta et al., 2016). Onemocnění asociované s defektem enzymů této dráhy se nazývá **primární deficiencie koenzymu Q10** a může postihovat široké spektrum orgánových soustav ve věku od narození až po stáří. Může se projevit například encefalopatií, multisystémovou atrofií nebo různými typy nefropatie včetně obrazu SRNS (Acosta et al., 2016). Odhalení příčiny SRNS pomocí molekulárně genetického vyšetření má v tomto případě významný klinický přínos pro pacienta, neboť umožňuje individualizovanou terapii pomocí syntetického koenzymu Q10. Bylo prokázáno, že jedinci se SRNS s mutacemi v některých genech pro enzymy biosyntézy koenzymu Q10 (*COQ2*, *COQ6*, *ADCK4*) dosáhli parciální či úplné remise onemocnění po zahájení terapie syntetickým koenzymem Q10, a to bez potřeby terapie jinak běžně indikovanými imunosupresivy (Starr et al., 2018; Ashraf et al., 2013; Acosta et al., 2016).

4.3.6 Syndromický SRNS

V současné době je známo téměř 70 genů asociovaných s NS. Podle recentní studie, ve které se u jedinců se SRNS vyšetřovalo celkem 53 genů, bylo 22 genů (42 %) asociováno se syndromickým SRNS (Bierzynska et al., 2017). Jednalo se například o asociaci NS s mentální retardací (gen *E2F3*), mikrocefalií (gen *WDR73*), epidermolysis bullosa (geny *ITGB4*, *ITGA3*), Alportovým syndromem (geny *COL4A3*, *COL4A4* a *COL4A5*), hereditární osteoonychodysplázií („nail-patella“ syndrom, gen *LMX1B*) nebo se Schimkeho imunooseální dysplázií (gen *SMARCAL1*) (Preston et al., 2019; Bierzynska et al., 2017). Tato skupina onemocnění je poměrně specifická. U mnoha výše jmenovaných syndromů jsou dominantní projevy neledvinového charakteru a i prognóza může být významně ovlivněna postižením jiných orgánových systémů.

5. Jiné možné příčiny nefrotického syndromu

Dvě třetiny dětí se SRNS mají negativní genetický nálezn (Obrázek 1) a příčina poškození glomerulů u nich zůstává neobjasněna (Bierzynska et al., 2017). U části těchto dětí může být NS způsoben patogenní variantou v dosud nepopsaném genu, v literatuře se však také spekuluje o doposud nepotvrzených imunogenních sérových faktorech (Colucci et al., 2018).

Vliv imunitních procesů v patogenezi NS se nabízí proto, že většina používaných léků moduluje aktivitu T anebo B lymfocytů (Colucci et al., 2018). Příkladem je podávání monoklonální protilátky rituximab, která cílí na specifický lymfocytární antigen CD20. Rituximab se však váže také na lipidovou fosfodiesterázu SMPDL-3b, která je přítomna v membráně podocytů (Ravani et al., 2016). Tato vazba vede k interakci sfingomyelinázy se synaptopodinem, čímž dochází ke stabilizaci cytoskeletu a inhibici apoptózy podocytů u pacientů s idiopatickým NS (Fornoni et al., 2011). Vliv modulace imunitního systému na rozvoj NS byl sledován u laboratorních myší s adriamycinem indukovaným NS (histologicky připomínající FSGS), kdy u části zvířat bylo injikováním protilátky proti CD4⁺ molekule docíleno vymizení CD4⁺ lymfocytů (Wang et al., 2001). Absence CD4⁺ lymfocytů vedla ke zhoršení glomerulární sklerózy a také ke zvýšené koncentraci makrofágů a cytotoxických CD8⁺ lymfocytů v ledvinovém intersticiu oproti myším s NS bez absence CD4⁺ buněk (Wang et al., 2001). Uvedené studie podporují hypotézu o významném vlivu imunitního systému v patogenezi NS.

Efektorem imunitně indukovaného poškození podocytů a potažmo glomerulární filtrační membrány u dětí s idiopatickým NS může být **solubilní faktor cirkulující v séru**. Důkazem existence takového sérového faktoru jsou některé publikované studie. Například v jedné z nich bylo u pacientů s idiopatickým NS po transplantaci ledvin popsáno vysoké riziko rekurence onemocnění (Bierzynska and Saleem, 2018). Rekurenci NS po transplantaci ledviny bylo zabráněno výměnou krevní plazmy (Fine, 2007). V další práci byl zjištěn „přenos“ NS z matky na novorozence, přičemž příznaky onemocnění u dítěte během prvního týdne života spontánně vymizely (Kemper et al., 2001).

Jedním z potencionálních kandidátů na hledaný sérový cirkulující faktor je **kardiotropinu podobný cytokinový faktor 1 (CLC-1)**, který byl nalezen v plazmě pacientů s FSGS (McCarthy et al., 2010). Inkubace potkaních glomerulů v séru jedinců s FSGS vedla ke zmenšení objemu glomerulů a ke zvýšení glomerulární propustnosti pro albumin (Savin et al., 2015). Při inkubaci potkaních glomerulů s izolovaným CLC-1 docházelo ke stejným důsledkům jako při inkubaci se sérem jedinců s FSGS (Savin et al., 2015). Dalším kandidátním působkem je **hemopexin**, jehož sérová koncentrace je zvýšena při systémových zánětech a infekcích (Bakker et al., 2005). Aktivovaný hemopexin je vyšší i u dětí s relabujícím NS histologicky vykazujícím obraz MCD (Bakker et al., 2005). U laboratorních potkanů hemopexin indukuje proteinurii a v ex vivo experimentech způsobuje deformaci cytoskeletu podocytů (Lennon et al., 2008). Mezi další kandidáty se řadí **solubilní receptor pro aktivátor plazminogenu urokinázového typu (suPAR)**, který ovlivňuje migraci imunitních buněk při zánětu. Zvýšená sérová koncentrace suPAR byla popsána u malignit (Maas et al., 2013). V kultivovaných podocytech suPAR zvyšuje konstituční aktivitu β 3-integrinu, který je součástí podocytárního cytoskeletu, což vede k aktivaci malých GTPáz Cdc42 a Rac1 a následně k reorganizaci podocytárního cytoskeletu a u myši také k proteinurii (Wei et al., 2008). Aktivace β 3-integrinu v podocytech byla také popsána po přidání séra od pacientů s FSGS (Maas et al., 2013). Po plazmaferéze došlo u pacientů s FSGS k vymizení proteinurie a ke snížení sérové koncentrace suPAR, jeho koncentrace v séru jsou však velmi variabilní a vysoké koncentrace byly zjištěny i u pacientů s genetickým SRNS (Maas et al., 2013). V neposlední řadě se mezi potencionální nefropatogenní cirkulující sérové faktory řadí **angiopoetinu podobný faktor 4 (Angptl4)**, který ovlivňuje lipidový metabolismus (Li et al., 2015). Zvýšená exprese Angptl4 byla zjištěna u laboratorních potkanů s MCD ještě před vznikem proteinurie, což vedlo k hypotéze, že by zvýšená exprese Angptl4 mohla predikovat glomerulární poškození (Li et al., 2015). Po podání glukokortikoidů se u laboratorních potkanů snížila proteinurie i exprese Angptl4 (Clement et al., 2011). Exprese Angptl4 je však u lidí s NS velmi variabilní, a proto je jeho prediktivní hodnota pro rozlišení etiologie NS nízká (Li et al., 2015; Clement et al., 2011).

6. Léčba nefrotického syndromu

6.1 Cíle léčby

Cílem léčby NS je **dosažení remise onemocnění a zabránění jeho relapsu**. Dlouhodobým klinickým cílem je pak udržení normálních ledvinových funkcí (Trautmann et al., 2017). S ohledem na cíle léčby se rozlišuje kompletní remise onemocnění, která je definována jako poměr sérových koncentrací celkové bílkoviny a kreatininu < 20 mg/mmol, a částečná remise, definována redukcí proteinurie o více než 50 % a poměrem sérových koncentrací celkové bílkoviny a kreatininu 20 – 200 mg/mmol (KDIGO., 2012). I dosažení částečné remise je spojeno s lepší funkcí ledvin v porovnání s jedinci, kteří na léčbu nezareagují vůbec. Dle dat z celosvětového registru případů s NS (PoDoNet) je pravděpodobnost zachování renálních funkcí po 10 letech sledování 94 % u dětí s úplnou remisí, 72 % u dětí s částečnou remisí a pouze 43 % u dětí s rezistencí k léčbě (Trautmann et al., 2017).

6.2 Protokol standardní úvodní terapie glukokortikoidy a jejich nežádoucí účinky

Základní standardní úvodní léčbou všech pacientů s NS je **podávání prednisonu v dávce 60 mg/m²/den** (nebo 2 mg/kg/den, max. 60 mg/den) **po dobu 4 - 6 týdnů**, kdy se vyhodnotí jejich efekt (Skálová and Zieg, 2017). Poprvé byla terapie glukokortikoidy u dětí s NS použita v roce 1960, kdy jich 80 % (94/114) příznivě zareagovalo po 8 týdnech léčby (Koskimies et al., 1982). Od té doby bylo publikováno několik studií, které se zabývaly efektem různé délky podávání glukokortikoidů na dosažení remise a počet relapsů onemocnění a které určily nové postupy u obou typů NS definovaných na základě odpovědi na úvodní léčbu, tj. SRNS a SSNS (KDIGO., 2012). Glukokortikoidy však stále zůstávají hlavním lékem NS (KDIGO., 2012), a to i přes své závažné **vedlejší účinky jako jsou katarakta, obezita nebo zhoršená obranyschopnost proti infekcím** (Hahn et al., 2015). Dlouhodobé užívání glukokortikoidů je dále zpravidla asociováno s poruchou růstu, osteoporózou, opožděnou pubertou, horší kvalitou a funkcí kůže v důsledku jejího ztenčení, myopatií (Hahn et al., 2015), psychickou depresí, emoční nestabilitou anebo agresivním chováním (Mishra et al., 2010).

6.3 Mechanismus působení glukokortikoidů

Glukokortikoidy působí skrze glukokortikoidní receptory lokalizované v jádru buněk, které fungují jako transkripční faktory a zvyšují expresi protizánětlivých cytokinů a současně

snižují expresi cytokinů prozánětlivých. Jedním z možných mechanismů účinku glukokortikoidů je tak jejich ovlivnění imunitních procesů, přičemž léčebný efekt by mohl být modifikován specifickým imunitním profilem léčeného pacienta (Guimarães et al., 2019). Glukokortikoidy však také regulují přímo funkci podocytů stabilizací jejich cytoskeletu a to indukováním polymerizace aktinu a inhibicí rozpadu aktinových filament (Hahn et al., 2015; Zhao et al., 2018). Ve studii ex vivo na podocytárních kulturách bylo prokázáno, že dexamethason zrychluje diferenciaci podocytů, prodlužuje jejich životnost, stimuluje jejich proliferaci a zvyšuje expresi specifických podocytárních proteinů jako např. nefrinu (Xing et al., 2006).

6.4 Léčba steroid-senzitivního nefrotického syndromu

Po 4 - 6 týdnech univerzální úvodní léčby glukokortikoidy **je u více než 80 % dětí s NS dosaženo kompletní či částečné remise**, onemocnění pak označujeme jako **steroid-senzitivní NS (SSNS)**. U těchto jedinců se dále pokračuje v podávání snížené dávky prednisonu (obden 40 mg/m² nebo 1,5 mg/kg, max. 40 mg) po dobu 2 – 5 měsíců, s postupným snižováním dávky glukokortikoidů (Lombel, Gipson, et al., 2013; KDIGO., 2012). **Přibližně 80 – 90 % dětí se SSNS má alespoň jeden relaps** po dosažení první remise onemocnění (Lombel, Gipson, et al., 2013). Podle počtu relapsů během prvních 6 měsíců od dosažení první remise nebo kdykoliv během 12 měsíců sledování se jedinci se SSNS rozdělují do několika skupin. První skupinou je **SSNS s málo častými relapsy (viz Obrázek 1: zřídka relabující SSNS)**, tj. 1x během prvních 6 měsíců od první remise nebo maximálně 3x kdykoliv během 12 sledovaných měsíců. Pokud je relapsů více, jedná se o druhou skupinu, tj. **SSNS s častými relapsy (viz Obrázek 1: frekventně relabující SSNS)**. Poslední, třetí skupinou je **kortikodependentní NS**, definovaný dvěma navazujícími relapsy ještě během glukokortikoidní terapie nebo do 14 dnů od jejího vysazení (Lombel, Gipson, et al., 2013; KDIGO., 2012). SSNS s málo častými relapsy se léčí stejnou denní dávkou prednisonu jako při úvodní terapii (tj. 60 mg/m²/den), dokud není dosaženo kompletní remise po dobu 3 dnů, poté se pokračuje v dávce 40 mg/m² obden po dobu alespoň 4 týdnů (KDIGO., 2012). U SSNS s častými relapsy a u glukokortikoid-dependentního SSNS se doporučuje po dosažení remise pomocí denní dávky prednisonu 60 mg/m²/den pokračovat obden v podávání co nejnižší dávky, která udrží remisi, a to po dobu 3 měsíců. Podle současných doporučení (KDIGO., 2012) je u dětí se SSNS s častými relapsy a glukokortikoid-

dependentní formou možné použít alternativní imunosupresivní léky (např: cyklofosfamid, chlorambucil, levamisol, kalcineurinové inhibitory, mykofenolát mofetil nebo anti-CD20 monoklonální protilátku rituximab) až při výskytu nežádoucích účinků glukokortikoidní terapie (Lombel, Gipson, et al., 2013; Tullus et al., 2018). Z uvedeného vyplývá, že přes vysoké procento úspěšnosti úvodní standardní terapie glukokortikoidy je velká část dětí s NS zatížena opakovaným a někdy letitým podáváním glukokortikoidů, což vede k závažným nežádoucím účinkům léčby, zvyšuje morbiditu pacientů a snižuje jejich kvalitu života (Hahn et al., 2015).

6.5 Léčba steroid-rezistentního nefrotického syndromu

Univerzální úvodní terapie glukokortikoidy není efektivní u zhruba **20 % dětí s NS (nedosáhnou remise)**, onemocnění v takovém případě označujeme jako **steroid-rezistentní NS (SRNS)**. Jedinci se SRNS mají přibližně **50 % riziko vzniku konečného stádia onemocnění ledvin** během 5 - 10 let od diagnózy (Gipson et al., 2006; Abrantes et al., 2006; Trautmann et al., 2017). Geneticky podmíněný SRNS má prognózu ještě horší, kdy dle studií dojde až v 85 % případů k selhání ledvin do 15 let od diagnózy v porovnání s 35 % případů u SRNS s negativním genetickým nálezem (Trautmann et al., 2017). U jedinců se SRNS je tak nezbytné změnit léčebnou strategii (McKinney et al., 2001), často **vyžadují péči v centrech**, kde jsou dostupné komplexní komplementární vyšetření a multioborový přístup (KDIGO., 2012; Lombel, Hodson, et al., 2013). Pro upřesnění charakteru onemocnění se mimo jiné využívá biopsie ledvin a molekulárně genetické vyšetření (Dogra and Kaskel, 2017).

Lékem první volby u geneticky nepodmíněných forem SRNS jsou kalcineurinové inhibitory (tj. cyklosporin A nebo takrolimus) podávané po dobu 6 měsíců (KDIGO., 2012). Pokud je léčbou dosaženo alespoň parciální remise, tak se v léčbě pokračuje minimálně jeden rok. V případě nedostatečného efektu mohou být kalcineurinové inhibitory kombinované s malými dávkami glukokortikoidů. Tato terapie pomůže až u 70 – 80 % dětí dosáhnout částečné nebo úplné remise (Skálová and Zieg, 2017; Lombel, Hodson, et al., 2013; Dogra and Kaskel, 2017). Alternativní léčbou je pak kombinace mykofenolát mofetilu s dexamethasonem, která má dle porovnávací studie obdobný účinek jako cyklosporin A (Gipson et al., 2011). Kalcineurinové inhibitory používané k léčbě idiopatického NS mají **po dlouhodobém užívání mnoho různých vedlejších účinků** jako je vznik nefrotoxicity,

poškození jater, hypertenze, hyperlipidémie, hyperkalémie, třes, hirsutismus a další (Safarini and Patel, 2020). Dlouhodobá imunosupresivní terapie tedy zásadně snižuje kvalitu života těchto pacientů a zvyšuje riziko závažného poškození jater i ledvin.

Pozitivní výsledek genetického vyšetření u jedinců se SRNS má pro pacienta dva důležité přínosy. Jednak lze u těchto pacientů očekávat nedostatečný efekt léčby kalcineurinovými inhibitory a včasná genetická diagnostika **umožňuje tuto jinak běžně indikovanou léčbu kontraindikovat** a vyvarovat se tak jejich nežádoucích účinků (Dogra and Kaskel, 2017; Trautmann et al., 2017). Dále je již dnes **možné u některých genů léčbu individualizovat** - např. monoterapie koenzymem Q10 u pacientů s patogenními variantami v genech pro podocytární mitochondriální enzymy (viz kapitola 4.3). Lze předpokládat, že s postupujícím poznáním molekulárních mechanismů jednotlivých geneticky podmíněných forem SRNS bude v budoucnu možné nabídnout individualizovanou terapii stále většímu počtu pacientů. **Léčba genetického SRNS je v současné době symptomatická**, podávají se především antihypertenziva a pro svůj antiproteinurický efekt pak ACE-inhibitory a blokátory angiotenzinového receptoru (Skálová and Zieg, 2017). **Pozitivní genetický výsledek má také prognostický význam pro plánování transplantace ledviny**, neboť je u těchto jedinců po úspěšně provedené transplantaci **velmi nepravděpodobný relaps NS**. Oproti tomu jedinci s negativním genetickým nálezem mají 50% riziko vzniku rekurence po transplantaci (Bierzynska and Saleem, 2018). Mechanismus rekurence není zcela jasný, ale studie poukazují na možnost existence imunitní aktivace skrze dosud neznámý cirkulující faktor u těchto jedinců (viz kapitola 5) (Bierzynska and Saleem, 2018; Bierzynska et al., 2017).

6.6 Shrnutí léčby NS

Vzhledem k chybějícímu prognostickému ukazateli odpovědi na terapii glukokortikoidy je velká část dětí s NS vystavena úvodní nešetrné a v případě SRNS neefektivní léčbě. Omezené znalosti patofyziologie NS jsou pak u často relabujícího průběhu onemocnění příčinou dlouhodobého užívání dalších imunosupresiv, která mohou být paradoxně dokonce nefrotoxická. Nalezení kauzálního genu u jedinců se SRNS může vést k úpravě terapie a u dobře popsanych genů identifikovat šetrnější individualizovanou léčbu. Určuje také lepší prognózu u jedinců, kteří vyžadují transplantaci ledviny.

7. Metody výzkumu mechanismu postižení podocytů

7.1 Modely podocytů ex vivo

K bazálnímu a translačnímu výzkumu glomerulopatií se používají **buněčné modely podocytů kultivovaných ex vivo**. Nejjednodušším modelem jsou takzvané **primární kultury podocytů** (Ni et al., 2012). Jedná se o nativní izoláty podocytů z ledvin laboratorních potkanů či myši nebo i z biotických vzorků dobrovolných dárců. Podocyty nejsou dále nijak upravovány a po izolaci se rovnou použijí k plánovaným experimentům. Limitací primárních podocytárních kultur je jejich postupná dediferenciace, ztráta jejich typické struktury a jen velmi malá schopnost proliferace in vitro. Primární kultury dále nemají typické znaky podocytů jako je například nefrin, podocin, atd. (Mundel et al., 1997; Ni et al., 2012).

K zajištění trvalé proliferace primárních kultur a tím přístupu k buňkám jednotného genotypu a fenotypu je třeba zastavit přirozenou replikační senescenci buněk. U **myších immortalizovaných podocytů** (Mundel et al., 1997) a později také u **lidských immortalizovaných podocytů** (Saleem et al., 2002) toho bylo dosaženo vložением termosenzitivního genu *SV40-T*, jehož produkt má schopnost ve 33,0 °C indukovat neomezenou proliferaci buněk inhibicí tumor supresorových genů p53 a Rb (Zhu et al., 1991; Saleem et al., 2002; Mundel et al., 1997). Vložением kombinovaného konstruktů SV40-T a MHC I promotoru, který je aktivován interferonem gama (IFN γ) bylo (při inkubaci ve 33,0 °C) dosaženo ještě vyšší proliferace buněk (Mundel et al., 1997). Při kultivaci ve 33,0 °C zároveň dochází k blokování spontánní diferenciaci podocytů. Po zvýšení teploty v inkubátoru na 37,0 °C je proliferační proces inhibován a dochází ke stimulaci diferenciaci podocytů (Mundel et al., 1997; Saleem et al., 2002). Kompletní diferenciaci lidských immortalizovaných podocytů je dosaženo po 14 dnech ve 37,0 °C, 5 % CO₂, v kultivačním médiu obsahujícím 10 % fetální bovinní sérum a 1 % roztok insulin-transferin-selenium (Saleem et al., 2002), kdy tyto podocytární kultury vykazují **charakteristické znaky podocytů (tj. exprimují nefrin, podocin, CD2AP, synaptopodin atp.)** (Saleem et al., 2002). Opakovaným pasážováním již jednou diferencovaných (původně podmíněně immortalizovaných) podocytárních kultur dochází, podobně jako u kultur primárních, k postupné ztrátě charakteristických podocytárních markerů. Proto je při kontrolovaných experimentech třeba používat kultury ze stejné šarže a pasáže [95]. Immortalizované linie podocytů jsou dnes jedním z nejvíce používaných funkčních modelů [96, 97].

Nadějným modelem glomerulů se zdají být **ledvinové organoidy** vykultivované z lidských embryonálních kmenových buněk (Yoshimura and Nishinakamura, 2019; Takasato et al., 2014). Jedná se o tvorbu lidské tkáně in vitro, která obsahuje podocyty, tubulární epiteliální buňky a další ledvinové buňky. Podocyty ledvinových organoidů vznikají v podobném prostředí jako podocyty in vivo, a proto by se jim měly podobat více než imortalizované podocytární kultury (Yoshimura and Nishinakamura, 2019). I přes vyšší expresi nefrinu a podocinu v porovnání s imortalizovanými kulturami jsou podocyty v ledvinových organoidech často nedostatečně anebo nerovnoměrně diferencované. Pro přítomnost dalších ledvinových buněk v organoidech jsou také experimenty složitější na manipulaci podocytů či interpretaci výsledků (Yoshimura and Nishinakamura, 2019).

7.2 Verifikace monogenní příčiny SRNS

Základní metodou genetických analýz je **Sangerovo sekvenování** založené na amplifikaci vybraného úseku DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) se zařazováním fluorescenčně značených nukleotidů. Každý nukleotid má jinou fluorescenční značku, což umožňuje analyzačnímu přístroji přečíst zkoumanou DNA sekvenci. Metoda vyžaduje navržení vhodného páru primerů (komplementární úseky DNA pro označení začátku syntézy DNA řetězce) zvláště pro každou kódující oblast zkoumaného genu. Sangerovo sekvenování spolehlivě syntetizuje úseky o délce až 1000 párů bází a je považováno za zlatý standard sekvenování (sekvenační přesnost je 99,9 %) (Kolísko, 2017). Metoda je vhodná k rutinnímu genetickému vyšetření chorob, které se dají vysvětlit nálezem patogenních variant v omezeném množství genů či jejich exonů (cca 1 – 5). Je-li genů nebo exonů více, narůstají náklady na provedení metody. Nevýhodou je dále její časová náročnost (Kolísko, 2017).

Jiným přístupem je použití **sekvenování nové generace (NGS)**, které umožňuje sekvenování velkého počtu vybraných genů (panel až několika set genů) nebo celého exomu (soubor všech exonů všech genů v analyzované DNA) či genomu (prakticky celá DNA včetně nekódujících oblastí). V lidské DNA zahrnují kódující oblasti přibližně 1 – 2 % genomu (Carter and He, 2016; Illumina, 2017). Principiálně se NGS neliší od Sangerova sekvenování, jedná se také o syntézu řetězce DNA pomocí fluorescenčně značených nukleotidů. Zásadním rozdílem je masivní paralelní amplifikace milionů úseků DNA v jednom kroku u NGS v porovnání se Sangerovým sekvenováním, kde v jednom kroku PCR reakce dochází vždy k amplifikaci

pouze jediného úseku DNA. Nevýhodou NGS z hlediska metodologie je pouze nižší přesnost, a proto se doporučuje jednotlivé nalezené varianty ověřovat Sangerovým sekvenováním. Výhodou NGS je nižší cena (v porovnání s cenou Sangerova sekvenování v případě sekvenování stejného počtu genů) a menší časová náročnost. Díky metodě NGS je možné u dětí se SRNS paralelně analyzovat všechny dosud známé geny (cca 70) asociované s NS a případně identifikovat geny nové (Bierzynska et al., 2017; Sadowski et al., 2015). Metoda NGS umožňuje vyhledávání genetických variant v dosud nepopsaných genech a významně tak rozšiřuje výzkumné možnosti při objevování nových etiologií neobjasněných onemocnění (Kolísko, 2017).

7.3 Transkriptom podocytů

Mezi metody NGS patří také **RNA sekvenace**. Zatímco sekvenace genů poskytuje informaci o genetickém podkladu studovaného organismu (Illumina, 2017), sekvenací RNA lze získat informaci o míře přepisu jednotlivých genových úseků, tj. o transkriptomu analyzovaného vzorku. Porovnáním transkriptomu mezi dvěma skupinami buněk lze odhalit změny v expresi celých skupin funkčně spřízněných genů, což může vést k odhalení patogeneze zkoumaného onemocnění (Illumina, 2017) nebo mechanismu působení různých léků (Illumina, 2017).

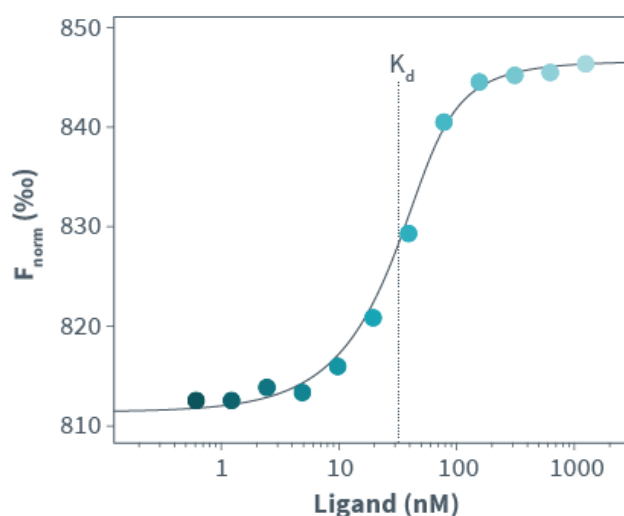
Pomocí RNA sekvenace bylo v myších immortalizovaných podocytech odhaleno 92 nových buněčně specifických genů, které naopak nebyly téměř exprimovány v mezangiálních ani endoteliálních ledvinových buňkách (Lu et al., 2017). Následnou analýzou transkriptomu lidských immortalizovaných podocytů pak bylo zjištěno, že z těchto 92 genů jich je 30 esenciálních pro správnou strukturu buňky, neboť při jejich vyřazení dochází k cytoskeletálnímu poškození a snížení exprese charakteristických podocytárních markerů (Lu et al., 2017). Jiná recentní studie provedla RNA sekvenaci lidských immortalizovaných podocytů po kultivaci s dexamethasonem a odhalila, že dexamethason zvyšuje expresi genů důležitých pro cytoskeletální procesy a naopak snižuje expresi prozánětlivých cytokinů, což podtrhuje možnou roli glukokortikoidů ve stabilizaci cytoskeletu u SSNS (Jiang et al., 2016). Spojení manipulace podocytárních kultur ex vivo a analýzy jejich transkriptomu se tak zdá být vhodným přístupem pro hledání patogeneze NS.

7.4 Funkční studie podocytů - analýza molekulárních interakcí

Změna sekvence DNA, potažmo struktura výsledného proteinu, nemusí nutně znamenat změnu funkce proteinu. Ověřit funkci mutovaného proteinu lze pomocí funkčních studií. Jednou z možností je **analýza vazebné interakce proteinu** s cílovým receptorem (jedná-li se o ligand), ligandem (jedná-li se o receptor), jiným proteinem (jedná-li se o proteinový komplex) nebo specifickou DNA sekvencí (jedná-li se o transkripční faktor).

7.4.1 Mikroškálová termoforéza (MST)

Mikroškálová termoforéza (MST) detekuje změnu rychlosti pohybu fluorescenčně označené molekuly při jejím navázání na svého vazebného partnera. Laserem indukované teplo v ohraničeném bodě směsi vazebných partnerů vyvolá pohyb molekul – termoforézu. Ta se mění s měnící se koncentrací fluorescenčně neoznačeného vazebného partnera zkoumané molekuly. Za ideálních podmínek eseje tak lze stanovit disociační konstantu (K_d) vazebné interakce (Obrázek 3) (Jerabek-Willemsen et al., 2011; Jerabek-Willemsen et al., 2014).



Obr. 3 Křivka znázorňuje vztah mezi vzrůstající koncentrací ligandu (osa x) a normalizovanou změnou fluorescence navázané cílové molekuly (osa y) ve vybraném čase od zapnutí laseru. V pravé části grafu je vazba plně nasycená (relativní pokles fluorescence je malý), v levé části je tak nízké množství ligandu, že již termoforézu nemění (pravděpodobně se neváže nebo váže v nedetekovatelném množství; pokles fluorescence je mnohem větší). K_d znázorňuje disociační konstantu, resp. vazebnou afinitu (střední hodnotu nasyceného stavu) (Jerabek-Willemsen et al., 2014).

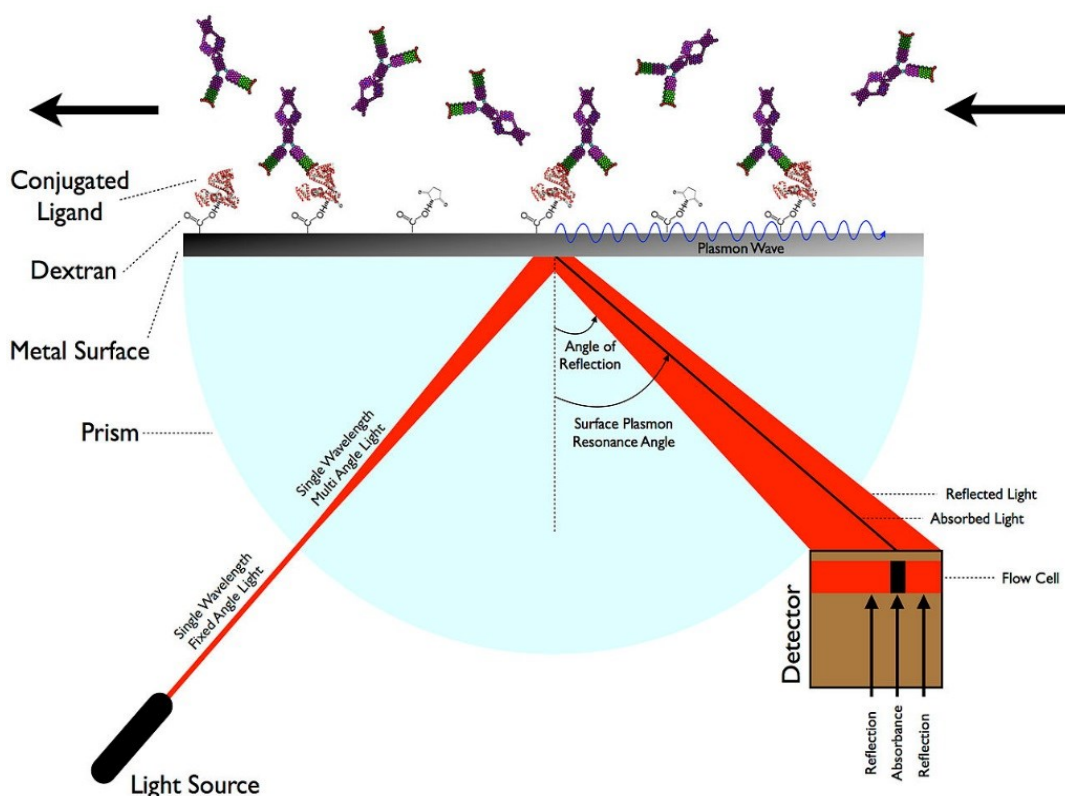
Metoda MST byla použita například ve studii regulace membránových sodných kanálů „ENaC“, které se hojně vyskytují v epiteliálních buňkách ledvin, kdy mutovaný kanál je

asociován se vznikem hypertenze (Archer et al., 2020). Za regulátora je již delší dobu považován fosfatidylinositol - 4,5 - bisfosfát (PIP₂), ale dosud nebylo ověřeno, zda reguluje kanál přímou vazbou nebo nepřímo přes další působky. Díky MST bylo dokázáno, že PIP₂ přímo interaguje se třemi doménami sodných kanálů (β N1, γ N2 a γ C) bez účasti dalšího proteinu (Archer et al., 2020).

Výhodou metody MST je potřeba jen malého objemu vzorku, senzitivita v nanomolech, rychlá příprava i analýza, není nutná imobilizace proteinů a je možné využít proteiny s již předem konjugovanou fluorescenční značkou (Jerabek-Willemsen et al., 2014). Detekce pomocí klasických interakčních esejí jako je fluorescenční spektroskopie nebo anizotropie jsou často limitované velikostí zkoumaných molekul, změnou velikosti při vytvoření vazby a pozicí fluoroforů. Často také vyžadují větší množství vzorku a složitější analýzu získaných dat (Jerabek-Willemsen et al., 2014). Naopak nevýhodou MST jsou omezení ve složení analytických pufrů, kdy například merkaptoethanol nebo vysoké koncentrace solí mohou negativně ovlivňovat fluorescenci a tedy i výsledek měření.

7.4.2 Zobrazení rezonance povrchových plazmonů (SPRi)

Zobrazení rezonance povrchových plazmonů (SPRi) je optická detekce vazby. Při této metodě je využit odraz světla o určité vlnové délce od rozhraní skleněného hranolu a velmi tenké vrstvy zlata (biočip), na jehož povrchu je imobilizován zkoumaný protein (Zeidan et al., 2016). Volné elektrony na povrchu biočipu absorbují dopadající fotony a mění je na povrchové plazmonové vlny. Odrážené světlo dopadá na detektor, přičemž úhel odrazu je závislý na vzniklém plazmonovém vlnění. Plazmonové vlnění se mění v přítomnosti ligandu navázaného na zkoumaný protein na povrchu biočipu (princip viz Obrázek 4). SPRi umožňuje celou reakci sledovat v reálném čase díky záznamu procesů na detektoru digitální kamerou (Zeidan et al., 2016).



Obr. 4 Znárodnění výše uvedeného principu SPRi. Světlo konkrétní vlnové délky se odráží od rozhraní skleněného hranolu a tenké vrstvy zlata („metal surface“), na které jsou imobilizovány zkoumané molekuly = („conjugated ligand“). Úhel odraženého světla je závislý na vzniklém plazmonovém vlnění na povrchu vrstvy zlata, které se mění podle míry navázání vazebného partnera zkoumané imobilizované molekuly (Sabban et al., 2013).

Pomocí metody SPRi bylo například prokázáno, že protein Gal-1, který se účastní stavby glomerulární filtrační membrány (Shimizu et al., 2009) a byl detekován v bioptických vzorcích dětí s NS, které vykazovaly histologický obraz FSGS (nikoliv však u dětí s NS s obrazem MCD) (Ostalska-Nowicka et al., 2007), se váže přímo na nefrin a je jeho extracelulárním ligandem (Shimizu et al., 2009). Mutace nebo změny v expresi Gal-1 se tak mohou uplatňovat v patogenezi NS u pacientů s FSGS (Shimizu et al., 2009).

Hlavní výhodou SPRi je oproti metodám jako je ELISA možnost zobrazení vazebné kinetiky v reálném čase a díky tomu získání podrobnější informace o sledované interakci (např. afinita, stechiometrie, termodynamika) (Helmerhorst et al., 2012). Další výhodou SPRi je, že není třeba zkoumané proteiny jakkoliv manipulovat (např. je fluorescenčně barvit), čímž je možné zkoumat přirozené nativní formy proteinů a vyvarovat se potenciálního ovlivnění vazby

navázaným fluoroforem (Helmerhorst et al., 2012). U SPRi je navíc na rozdíl od jiných metod možné zkoumat vazbu přímo v nepurifikovaných biologických vzorcích (jako je sérum, plazma nebo moč) (Helmerhorst et al., 2012). Nevýhodami jsou vysoká cena a funkční nestálost biočipů, dále na nečistoty citlivý mikrofluidní systém a časově náročná optimalizace regenerace biočipů (uvolnění ligandu z vazby na imobilizovaný protein), aby mohl být čip použit pro vícero injekcí analytů různých typů či koncentrací (Helmerhorst et al., 2012).

Obě metody MST i SPRi vnášejí nový pohled do studia molekulárních interakcí, mají v porovnání s předchozími běžně používanými metodami vyšší citlivost a přesnost měření a lze je využít v širokém spektru oblastí výzkumu od interakcí mezi ionty, nukleovými kyselinami, proteiny až po viry.

8. Hypotézy a cíle disertační práce

Hypotézy:

- 1) Cílené molekulárně genetické vyšetření dětí se SRNS odhalí příčinu jejich onemocnění a pomůže pochopit jeho podstatu.
- 2) Jedním z možných mechanismů vzniku onemocnění je změna exprese cílových genů v podocytech indukovaná mutovanými formami transkripčních faktorů (např. WT1).
- 3) Objasnění genetické příčiny a mechanismu vzniku SRNS pomůže otevřít cestu k terapii „šité na míru“ a zabráni tím rozvoji závažných nežádoucích účinků doposud standardně a uniformně používaných vysokých dávek glukokortikoidů.
- 4) Vybrané klinické a laboratorní parametry zaznamenané v době manifestace nefrotického syndromu by mohly predikovat odpověď na úvodní terapii glukokortikoidy.

Cíle:

Cílem této práce bylo pomocí metod molekulárně genetických (celoexomové a RNA sekvenování), analytických (mikroškalová termoforéza, luciferázová esej), kultivačních (příprava transfekovaných buněčných linií) a metod genového inženýrství (cílená mutagenese, příprava mutantních proteinů) poodhalit mechanismy vzniku SRNS u dětí.

- 1) Kombinací Sangerova a celoexomového sekvenování cíleného na všechny známé geny asociované se SRNS zjistit prevalenci jednotlivých monogenních příčin onemocnění u dlouhodobě sbírané kohorty českých a slovenských dětí.
- 2) In vitro připravit v populaci dětí se SRNS nalezené mutované formy transkripčního faktoru WT1, analyzovat jejich vazebnou afinitu k cílové DNA sekvenci za použití mikroškalové termoforézy (MST) a popsat expresi cílových genů.
- 3) Otestovat vztah vybraných klinických a laboratorních parametrů zaznamenaných v době manifestace (otoky, výše proteinurie, hypertenze) k odpovědi na úvodní glukokortikoidní terapii.

9. Metodika

9.1 Metodika studie 1 - Molekulárně genetické vyšetření jedinců se SRNS

9.1.1 Kritéria zařazení pacientů do studie

Zařazení dětských pacientů společně se sběrem vzorků DNA probíhalo 18 let mezi roky 2000 – 2017. Na sběru vzorků se podílelo sedm největších pediatrických nefrologických center v České republice a část pacientů byla zařazena také z větších center Slovenské republiky. Do studie byly zařazeny všechny děti splňující kritérium pro SRNS (přetrvávající proteinurie, tj. albumin/kreatinin v moči > 200 mg/mol, i po 6 týdnech terapie glukokortikoidy) a zároveň u nich byl vyloučen sekundární NS (např. infekční onemocnění jako syfilis, hepatitida B, hepatitida C nebo systémová onemocnění). Kritéria renálního poškození byla použita na základě mezinárodního konsenzu KDIGO (KDIGO., 2012). Celkově bylo do studie zařazeno 74 pacientů (38 chlapců a 36 dívek) ze 70 rodin.

9.1.2 Genetická analýza

9.1.2.1 Sangerovo sekvenování

Genetické testování mělo dvě fáze. V první fázi byly u všech dětí testovány pomocí Sangerovy metody (princip metody viz kapitola 7) dva nejčastěji mutované geny: *NPHS2* (celý gen) a *WT1* (pouze nejčastěji mutované exony 8 a 9, které kódují dva ze čtyř zinkových prstů transkripčního faktoru WT1 (Mucha et al., 2006)) a u dětí s kongenitálním NS byl navíc sekvenován celý gen *NPHS1* (nejčastější příčina kongenitálního NS). Sekvence použitých primerů jsou pro jednotlivé geny v tabulkách 1a, 1b a 1c.

Tab. 1a Primery *NPHSI*

Oblast	5' primer	3' primer	Reference
Promotor	GCTGACTCTGCCAGTGCCTG	CAGGGCCATCACAGGTCCCC	(Lenkkeri et al., 1999)
Exon 1+2	GAGAAARCCAGACAGACGCAG	AGCTTCCGCTGGTGGCT	(Lenkkeri et al., 1999)
Exon 3+4	AGCCACCAGCGGAAGCT	CTCCCTTCCCACTCCAGAGG	(Lenkkeri et al., 1999)
Exon 5	CAGAATCTATCTTGCGGGGAG	CATGGGGAAAATTAGGGGTCAAG	(Lenkkeri et al., 1999)
Exon 6+7	CTTCTNCCTGACTCCCCAAATTC	CTCAGGACTGGCTCCCAGAC	(Lenkkeri et al., 1999)
Exon 8+9	CCCTATCCACGAGTCATGCC	AAACGCGGGCATGGGGAATG	Vlastní návrh
Exon 10+11	CACGATGGATAGGGGTGCTG	CCTGGTCCTTCCCCACATT	(Lenkkeri et al., 1999)
Exon 12	AGCGAGACTCAGAGGTTAGG	TGCTGATGAGAGTGCTTCTCCTT	Vlastní návrh
Exon 13	TCGCGGGATGACACTTGCAG	GTGCAGTGTGAGGGCTCGCA	Vlastní návrh
Exon 14	CCTAGTGCCTCTCCAGCC	GAGTAGTTTAGGGTCAAGAAGG	(Lenkkeri et al., 1999)
Exon 15+16	CCTGATCTCCAATCTGTCCTTG	CCACAATGGGCAAGGTTCTTG	(Lenkkeri et al., 1999)
Exon 17	CACCCAGACCTGTCTGGGCC	GTCCCCACTCCCAAGGAACTC	(Lenkkeri et al., 1999)
Exon 18+19	GAGGCTACAGAAGGGACAATTTG	GCTGGAGGTCCAGACCTGGG	(Lenkkeri et al., 1999)
Exon 20	GGATGGATGCATAGATGATTCC	CAATCAGGGATGTGGGAATG	(Lenkkeri et al., 1999)
Exon 21+22	CCTGGACAGAATCTTCTGGAATT	CCTACACATCCTCTGAGGAATAC	(Lenkkeri et al., 1999)
Exon 23	GAGGCTGAGAAATATTTAAAGCTTAT	GAGACCAGGAGGTTCCATTCT	(Lenkkeri et al., 1999)

Exon 24+26	CTCGGGGAGACCCACCCC	CCTGATGCTAACGGCAGGGC	(Lenkkeri et al., 1999)
Exon 27+28	TGCCCTTCCGGGCACAGTGG	TACAAGCAATAGGAGGTAGGC	(Lenkkeri et al., 1999)
Exon 29	CAGATCTTCAATGAAGACCTACA	GGCCCAGGCTGTAATGAGA	(Lenkkeri et al., 1999)

Tab. 1b Primery *NPHS2*

Oblast	5' primer	3' primer	Reference
Promoter	GTAGGGAGGAGAGAAAGGCATC	TGCCCTCTTGTTCCTTG TG	(Guaragna et al., 2015)
Exon 1	GCAGCGACTCCACAGGGACT	GGCCCCGAGACCAGTATATAGTG	(Guaragna et al., 2015) (3' primer, (Karle et al., 2002b) (5' primer)
Exon 2	GCCCTGTGAACTCTGACTACTCTG	GGAGCACCAGGAAGGGAATG	(Guaragna et al., 2015)
Exon 3	TTATGCCAAGGCCTTTTGAAGAC	TGGCATGTGGGCTCTCTG	(Guaragna et al., 2015)
Exon 4	CCATGACTAAAAGGACCACACAG	CATCCCTAGATTGCCTTGC	(Guaragna et al., 2015)
Exon 5	TTAAATAAAGGGTAGGCCAACTCC	CCTAAGGGATGGAAGCTGGCC	(Guaragna et al., 2015)
Exon 6	CCTCTTGGGGTAACATTCACAG	TGCGCCTGGCCTAAAATG	(Guaragna et al., 2015)
Exon 7	CAAAACCTGCTGTGCTGATAATG	GAGGGATTGATGTGTGTGGAGG	(Guaragna et al., 2015)
Exon 8	TTCTATGCTTAACCGTGCTTGC	GCTGTTTCCATAATTGCTCTG	(Guaragna et al., 2015)

Tab. 1c Primery *WT1*

Oblast	5' primer	3' primer	Reference
Exon 8	AGCTCCAGCGAAGTGCCTTA	CCTAGCCCAAGGGAACACAG	Vlastní návrh
Exon 9	CCTCACTGTGCCACATTGT	TCCCTCTCATCACAATTTTCATTC	Vlastní návrh

PCR reakce pro geny *NPHS1* a *NPHS2* byly připraveny v objemu 10 µl pomocí AmpliTaq Gold reakční chemie; tj. 1x PCR pufr, 2,5 mmol/l MgCl₂, 0,2 mmol/l dNTP, 0,25 U AmpliTaq Gold polymeráza (vše od ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), 0,8x Q-solution (Qiagen, Hilden, Německo), 625 nmol/l 5' a 3' primeru. U *WT1* genu byl použit celkový objem reakce 16 µl pomocí Qiagen Tag core kit (Qiagen, Hilden, Německo); tj. 1x PCR pufr, 1x Q-solution, 0,1 mmol/l každého dNTP, 0,5 U Taq DNA polymerázy a 310 nmol/l 5' a 3' primeru.

PCR produkty byly poté přečištěny pomocí magnetických kuliček AmPure (Beckman Coulter, Brea, CA) a oboustranně sekvenovány v BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kitu (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). Přečištění sekvenační reakce bylo provedeno s magnetickými kuličkami CleanSeq (Beckman Coulter, Brea, CA). Kapilární elektroforéza přečištěných vzorků byla provedena na přístroji ABI 3130xl (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). Sekvenační data byla analyzována v programu Mutation Surveyor verze 3.23 (SoftGenetics, State College, PA).

9.1.2.2 Sekvenování nové generace

Všechny vzorky s negativním výsledkem z první části genetické analýzy byly podrobeny sekvenování nové generace pomocí navrženého panelu 48 genů v té době se známou asociací se SRNS z kitu Haloplex od Agilent Technologies (seznam genů viz Tabulka 2). Parametry panelu byly následující: 12 169 amplikonů, každý exon byl sekvenován s přesahem 50 párů bází do přilehlých intronů, celkové pokrytí činilo 99,43 %. DNA knihovny byly připraveny dle návodu výrobce a následně sekvenovány pomocí MiSeq Reagent kit v2 na přístroji Illumina MiSeq.

Tab. 2 Panel testovaných genů

Gen	Základní název proteinu	Dědičnost
<i>NPHS1</i>	Nefrin	AR
<i>NPHS2</i>	Podocin	AR

<i>WT1</i>	Wilms tumour protein	AD
<i>NUP93</i>	Nuclear pore complex protein Nup93	AR
<i>ACTN4</i>	Alpha-actinin-4	AD
<i>ADCK4</i>	Atypical kinase COQ8B	AR
<i>ALG1</i>	Chitobiosyldiphosphodolichol beta-mannosyltransferase, CDG1K	AR
<i>ANLN</i>	Anillin	AD
<i>APOL1</i>	Apolipoprotein L1	AR?
<i>ARHGAP24</i>	Rho GTPase-activating protein 24	AD?
<i>ARHGDI1</i>	Rho GDP-dissociation inhibitor1	AR
<i>CD151</i>	GP27	AR?
<i>CD2AP</i>	CD2-associated protein	AR
<i>CFH</i>	Complement factor H	AR, AD
<i>COL4A3</i>	Collagen alpha-3 (IV) chain	AR, AD?
<i>COQ2</i>	4-hydroxybenzoate polyprenyltransferase	AR, AD?
<i>COQ6</i>	Ubiquinone biosynthesis monooxygenase 6	AR?
<i>COQ7</i>	5-demethoxyubiquinone hydroxylase	AR?
<i>COQ9</i>	Ubiquinone biosynthesis protein 9	AR?
<i>CRB2</i>	Protein crumbs homologue 2	AR
<i>CUBN</i>	Cubilin	AR?
<i>DGKE</i>	Diacylglycerol kinase epsilon	AR
<i>EMP2</i>	Epithelial membrane protein 2	AR
<i>FAT1</i>	Protocadherin Fat 1	AR?
<i>INF2</i>	Inverted formin-2	AD
<i>ITGA3</i>	Integrin alpha-3	AR
<i>ITGB4</i>	Integrin beta-4	AR, AD?
<i>KANK1</i>	KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 1	AR?

<i>KANK2</i>	KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 2	AR?
<i>KANK4</i>	KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 4	AR?
<i>LAMB2</i>	Laminin subunit beta-2	AR?
<i>LMNA</i>	Prelamin-A/C	AR, AD?
<i>LMX1B</i>	LIM homeobox transcription factor 1-beta	AD?
<i>MYO1E</i>	Unconventional myosin-Ie	AR
<i>NEIL1</i>	Endonuclease 8-like 1	?
<i>NPHP1</i>	Nephrocystin-1	AR?
<i>NUP107</i>	Nuclear pore complex protein Nup107	AR
<i>NUP205</i>	Nuclear pore complex protein Nup205	AR?
<i>PAX2</i>	Paired box protein Pax-2	AD
<i>PDSS2</i>	Decaprenyl-diphosphate synthase subunit 2	AR?
<i>PLCE1</i>	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase epsilon-1	AR
<i>PMM2</i>	Phosphomannomutase 2	AR?
<i>PTPRO</i>	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase O	AR
<i>SCARB2</i>	Lysosome membrane protein 2	AR?
<i>SMARCA1</i>	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A-like protein 1	AR?
<i>TRPC6</i>	Short transient receptor potential channel 6	AD
<i>WDR73</i>	WD repeat-containing protein 73	AR?
<i>XPO5</i>	Exportin 5	AR?

Panel testovaných genů z kitu Haloplex a jejich dědičnost (autosomálně dominantní = AD, autosomálně recesivní = AR; otazník popisuje pravděpodobný nebo neznámý typ dědičnosti).

Data byla analyzována pomocí softwaru SureCall (Agilent Technologies) a Ingenuity variant analyser (Qiagen, Hilden, Německo). Pro filtrování kauzálních variant byla použita následující kritéria: byly vyloučeny běžné varianty s frekvencí ve zdravé populaci více než 1 % (na základě databází 1000 Genomes, ExAC, NHLBI ESP Genomes), naopak byly ponechány varianty predikované jako patogenní, pravděpodobně patogenní a varianty

nejasného klinického významu na základě výpočetních programů Sift, Polyphen-2 a CADD. Po hrubém filtrování variant byla použita databáze Human Gene Mutation Database (Stenson et al., 2017), která obsahuje podrobné informace o již dříve popsaných variantách. Na základě obecně přijímaných genetických standardů (ACMG) s využitím online softwaru založeným na těchto standardech byly varianty vyhodnoceny jako patogenní, pravděpodobně patogenní, pravděpodobně benigní, benigní nebo varianty nejasného klinického významu (Kleinberger et al., 2016; Richards et al., 2015). Varianty nejasného klinického významu nebyly považovány za příčinu onemocnění. Nalezené kauzální varianty (patogenní nebo pravděpodobně patogenní) byly verifikovány Sangerovým sekvenováním a jejich segregace v rodině byla ověřena u 20/28 (71 %) pacientů nesoucích tyto varianty. U zbylých pacientů nebylo možné vzhledem k nedostupnosti rodičů zajistit vzorky DNA a to hlavně kvůli stáří pacientů (dospělost v době analýzy) a změny bydliště oproti době, kdy pacienti ještě docházeli do ambulance. Varianty u těchto pacientů byly již v minulosti v literatuře popsány jako patogenní, a proto byly při hodnocení zcela dodrženy veškeré zásady standardů ACMG pro určení kauzality variant. U vybraných variant (nově nalezené varianty v *NUP93*) byla ověřena absence ve zdravé populaci sekvenováním 380 vzorků DNA z naší databáze zdravých kontrol.

9.2 Metodika studie 2 – Analýza vazebné afinity mutantů WT1 k cílové DNA sekvenci

9.2.1 Původ *WT1* variant

Metodika dvoustupňové genetické analýzy (kombinace Sangerova sekvenování a sekvenování nové generace) popsaná výše ve „studii 1“ byla použita i u dalších pacientů se SRNS získaných po zpracování původního léta sbíraného souboru. Vzhledem k relativně vysoké prevalenci *NUP93* variant jsme však v prvním kroku Sangerovým sekvenováním vyšetřovali i tento gen. Celkem jsme ve „studii 2“ zařadili devět dětí s identifikovanými *WT1* variantami, 7/9 pacientů bylo součástí kohorty ve „studii 1“ a další dva pacienty jsme detekovali rozšířeným Sangerovým sekvenováním (čtyř nejčastějších kauzálních genů: *NPHS1*, *NPHS2*, *WT1* a *NUP93*). Vyhodnocení nalezených genetických variant bylo provedeno stejně jako u studie 1.

9.2.2 Příprava *WT1* proteinů

9.2.2.1 Syntéza DNA plazmidů

Z linie buněk lidského adenokarcinomu s označením A549 byla získána wt KTS mínus izoforma *WT1* (kóduje transkripční faktor WT1) pomocí reverzní transkripce z celkové RNA s využitím RNeasy mini kitu od firmy Qiagene. Reverzní transkripce byla provedena komerčním kitem RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit s Oligo (dT)18 primerem (Thermo Scientific). Amplifikace získané cDNA *WT1* genu byla provedena pomocí specifických 5' (AAAGAATTCATGGGCTCCGACGTGCGGGACCTG) a 3' (TTTAAGCTTTCAAAGCGCCAGCTGGAGTTTGGTC) primerů. Primery obsahovaly EcoRI a HindIII restrikční místa. Amplifikovaný EcoRI-HindIII fragment s KTS mínus *WT1* byl poté vložen do plazmidového klonového vektoru pUC19 pomocí metody EMILI (Efficient Mutagenesis Independent of Ligation (Füzik et al., 2014; Dostálková et al., 2020); primery použité pro mutagenézi jsou uvedeny v Tabulce 3). Po verifikaci úspěšné mutagenéze pomocí sekvenace byla amplifikována oblast 999 – 1270 nukleotidů (pro wild type i všechny mutantní formy *WT1*) kódujících zinkové prsty 2 – 4 WT1 proteinu pomocí 5' (AAAGCTAGCGAGAAACCATAACCAG) a 3' (TTTCTCGAGTTATCTCTGATGCATG) primerů s NheI a XhoI restrikčními místy. Fragmenty byly po amplifikaci vloženy do plazmidového vektoru pET22b a ověřeny pomocí sekvenace.

Tab. 3 Primery pro mutagenezi (EMILI) genu *WT1*

5' WT1 ZF2 C11Y	CTTCAAGGACTATGAACGAAGGTTTTCTCGTTC
3' WT1 ZF2 C11Y	CCTTCGTTTCATAGTCCTTGAAGTCACACTGG
5' WT1 ZF2 R17P	GGTTTTCTCCTTCAGACCAGCTCAAAAGAC
3' WT1 ZF2 R17P	GGTCTGAAGGAGAAAACCTTCGTTTAC
5' WT1 ZF2 Q25P	CAAAAGACACCCAAGGAGACATACAGGTGTG
3' WT1 ZF2 Q25P	ATGTCTCCTTGGGTGTCTTTTGAGCTGGTCTG
5' WT1 ZF3 R10W	AACTTGTCAGTGGAAGTTCTCCCGGTCCGACC
3' WT1 ZF3 R10W	GGGAGAACTTCCACTGACAAGTTTTACTGGA
5' WT1 ZF3 R14W	GAAAGTTCTCCTGGTCCGACCACCTGAAGACC
3' WT1 ZF3 R14W	GGTCGGACCAGGAGAACTTTCGCTGACAAG
5' WT1 ZF3 D16N	CTCCCGGTCCAACCACCTGAAGACCCACACC
3' WT1 ZF3 D16N	CTTCAGGTGGTTGGACCGGAGAAGTTTCGC
5' WT1 ZF3 H21R	CTGAAGACCCGCACCAGGACTCATACAGGTG
3' WT1 ZF3 H21R	GAGTCCTGGTGC GG GTCTTCAGGTGGTCCGAC
5' WT1 ZF3 R10stop	AACTTGTCAGTGAAAGTTCTCCCGGTCCGACC
3' WT1 ZF3 R10stop	GGGAGAACTTTCACTGACAAGTTTTACTGGA
5' WT1 ZF2 H28R	CCAAAGGAGACGTACAGGTGTGAAACCATTCC
3' WT1 ZF2 H28R	CACACCTGTACGTCCTTTGGTGTCTTTGAG

9.2.3 Expres proteinů WT1

Bakteriální kmen *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 (DE3) CodonPlus RIL byl transformován plazmidem s wild type anebo jedním z mutantních *WT1* pomocí tepelného šoku po dobu 1 minuty při 42 °C. Transformované bakterie byly inkubovány po dobu jedné hodiny v tekutém LB Broth médiu a poté byly přeneseny na Petriho misky s pevným selekčním agarovým médiem obsahujícím 100 µg/ml ampicilinu. Petriho misky byly inkubovány při 37 °C přes noc. Narostlé kolonie byly poté přesunuty do tekutého selekčního LB Broth média se 100 µg/ml ampicilinu a inkubovány minimálně 2 hodiny při 37 °C na třepače (220 RPM) dokud nebylo dosaženo hodnoty optické denzity mezi 0,6 – 0,8. Poté byl do suspenze přidán IPTG (aktivátor lac operonu) a inkubace s třepáním prodloužena o další 4 hodiny. Buněčná suspenze byla centrifugována (10 minut, 10 000 x g) a vzniklá peleta byla zmrazena v -20 °C. Expres proteinů byla ověřena standardní metodou SDS-PAGE pomocí 18 % akrylamidového gelu a 1X Tris-Glycinového pufru.

9.2.4 Izolace a purifikace proteinů WT1

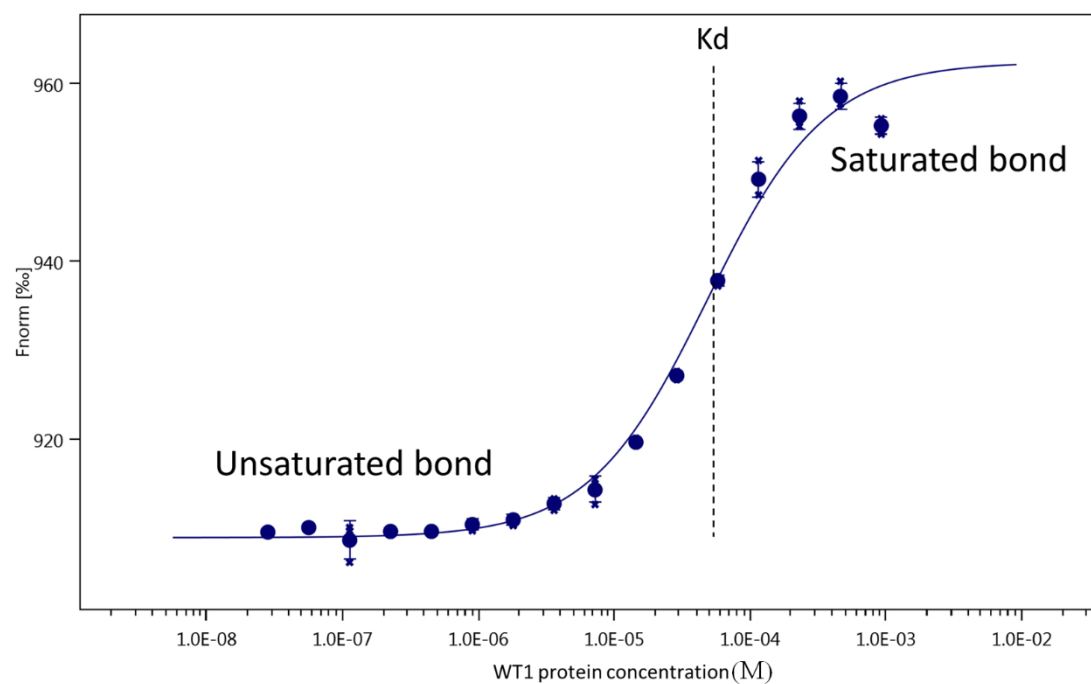
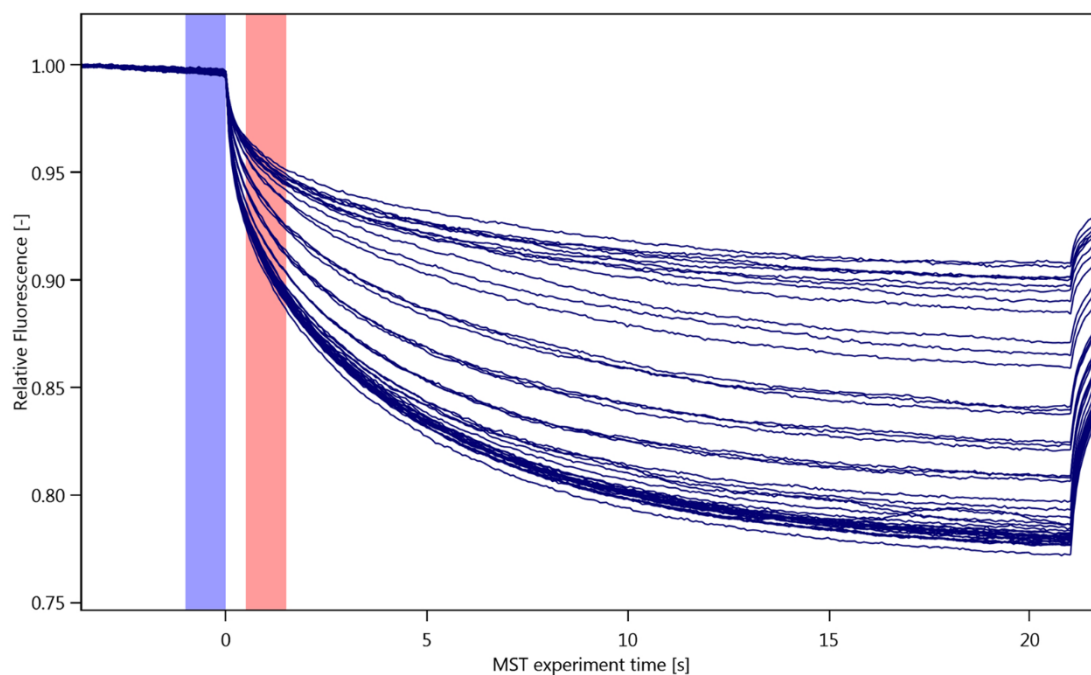
Izolace WT1 proteinů z bakteriálních pelet byla provedena pomocí pufrů se zvyšující se koncentrací chloridu sodného. Všechny použité pufrы měly pH 8 a obsahovaly 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 0,1 % 2-Merkaptoethanol a chlorid sodný o různé koncentraci (pufr A – 50 mM, pufr B – 0,5 M, pufr C – 1,0 M, pufr D – 2,0 M). Zmražené pelety byly nejprve resuspendovány v pufru A obsahujícím 1 mM lyzozym, Thermo Halt Protease Inhibitor Cocktail 100X (1000x ředěný) a DNázu I (5000x ředěnou). Suspenze byla 20 minut míchána na ledu a poté byl přidán 10 % deoxycholát sodný o finální koncentraci 0,15 % v roztoku. Suspenze byla sonikována (3x 45 sekund, 40 % amplituda, sonda KE76, 3,75 kJ) a centrifugována (15 minut, 4 °C, 30 000 x g). Supernatant byl přesunut do čisté nádoby a uchován na ledu. Zbylá peleta byla resuspendována v pufru B a celý proces byl stejně zopakován také pro pufrы C a D, poté byla peleta zlikvidována. Přítomnost WT1 proteinu byla ověřena pomocí SDS-PAGE (18 % akrylamidový gel a 1X Tris-Glycinový pufr). Supernatanty obsahující protein WT1 byly vysráženy pomocí 70 % saturace v síranu amonném na ledu. Saturované suspenze byly centrifugovány (30 minut, 4 °C, 30 000 x g) a vzniklé pelety byly společně resuspendovány v pufru A. Suspenze byla poté dialyzována (dialyzační membrána Spectra/Por 3 Standard RC Tubing 3,5 kDa) přes noc v pufru A při 4 °C. Další den byl dialyzát centrifugován (30 minut, 4 °C, 30 000 x g) a supernatant byl uchován na ledu (peleta byla zlikvidována).

Pro separaci proteinů ze supernatantu byla využita rychlá proteinová kapalinová chromatografie (FPLC, purifikační systém ÄKTA pure se softwarem Unicorn) nejprve na základě jejich iontového náboje (HiPrep SP FF 16/10 Cytiva, kolona se silným kationtovým nábojem). K separaci byl využit protokol výrobce. Jako vazebný pufr byl použit pufr A (všechny pufrы použité u této metody byly nejprve přefiltrovány a odvzdušněny). Eluce proteinů bylo dosaženo zvyšujícím se gradientem pufru D do systému. Vzorkeы po frakčním jímání byly vybrány dle UV signálu v softwaru Unicorn a přítomnost WT1 proteinů byla ověřena pomocí SDS-PAGE. Ověřené frakce byly poté zkoncentrovány (kolony Amicon Ultra 15 ml 3000 kDa) opakovanou centrifugací (15 minut, 4 °C, 4000 x g) dokud nebyl objem vzorku 8 ml. Protein byl poté separován dle velikosti pomocí kolony HiLoad 26/600 Superdex 200 pg Cytiva dle návodu výrobce s elučním pufrem (50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1 M NaCl, 10 μM ZnCl_2 ; 0,1 % 2-Merkaptoethanol, pH 8). Frakce byly vybrány dle UV signálu v softwaru Unicorn a přítomnost WT1 proteinu byla ověřena pomocí SDS-PAGE. Ověřené

frakce byly poté zkoncentrovány (kolony Amicon Ultra 15 ml 3000 kDa) opakovanou centrifugací (15 minut, 4 °C, 4000 x g) dokud nebyl objem vzorku 6 ml. Koncentrace purifikovaných WT1 proteinů byla změřena a před analýzou MST byly vzorky koncentrovány 60x na objem 100 µl. Eluční pufr byl pomocí kolon vyměněn za MST vazebný pufr a byla změřena finální koncentrace proteinů.

9.2.5 Vazebná analýza

Mikroškálová termoforéza (MST) byla provedena na přístroji Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies) s vlastním softwarem poskytujícím interaktivní protokol (MO.Control, NanoTemper Technologies). K detekci termoforézy byla použita cyaninem 5 značená cílová EGR1 DNA sekvence ([Cyanine5]GTGGAGGCGGCGGGGGCGGCAGCAACAG). Koncentrace DNA v reakci byla 80 nM a nejvyšší koncentrace proteinu byla v rozsahu mezi 1 – 4 mM. Vazebná analýza byla provedena pomocí standardních MST kapilár, o 20 % excitační síle (nastavení Nano – RED) a střední síle MST při pokojové teplotě. Po optimalizaci byl použit MST vazebný pufr (50 mM Na₂HPO₄.12H₂O, 150 mM NaCl a 0,005 % Tween), se kterým byly získány přijatelné MST křivky (Obrázek 5). Křivky vazebné afinity pro každý mutantní WT1 protein (každý měřen 3x za sebou) byly zkalkulovány pomocí MO.Affinity Analysis softwaru (NanoTemper Technologies).



Obr. 5 Optimalizace metody MST. Horní obrázek ukazuje křivky poklesu fluorescence v čase při působení laseru. Fialový pruh ukazuje „baseline“ a červený pruh cílovou oblast měření. Obrázek níže ukazuje normalizovanou změnu fluorescence vzorků DNA a sériově řaděného proteinu. Při přítomnosti vazby vzniká křivka ve tvaru „S“.

9.2.6 Luciferázová esej

Vektor pGL4.32 (Promega) nesoucí gen pro luciferázu byl štěpen pomocí restričních enzymů *NheI* a *HindIII* dle výrobce (New England Biolabs). Do vektoru byla vložena sekvence promotoru genu *ACTN1* nesoucí vazebnou sekvenci pro WT1 (GCGGGGGCG) (Tabulka 4).

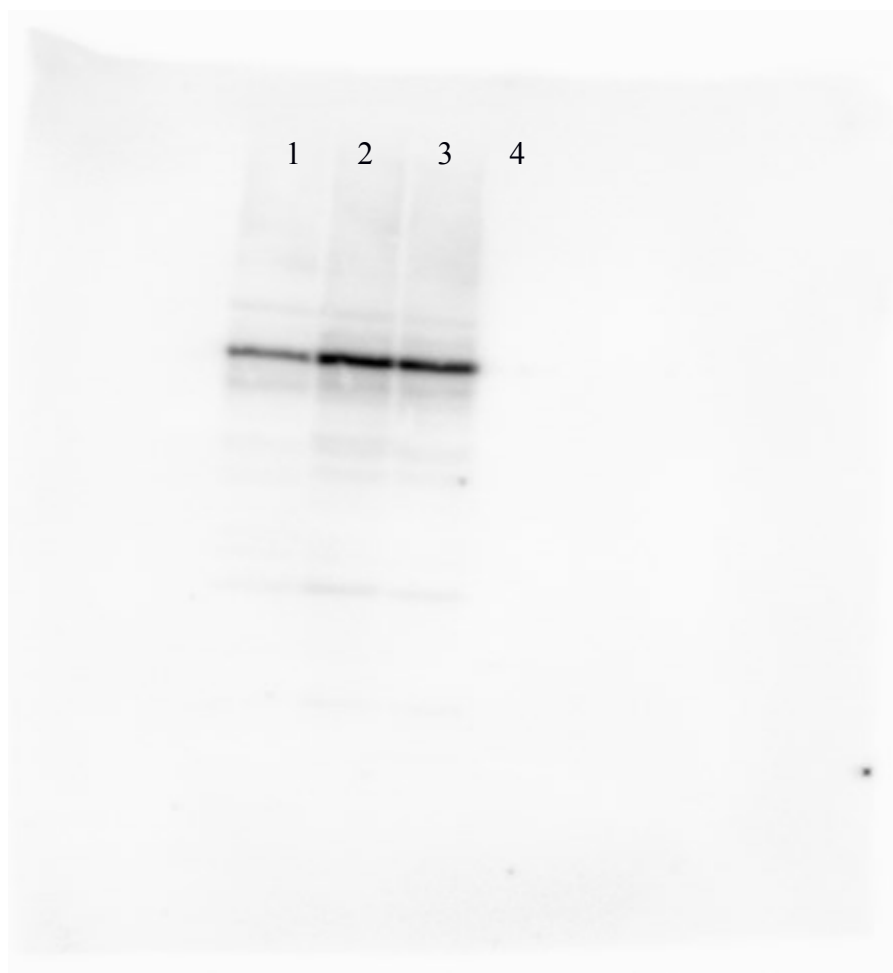
Tab. 4

Sekvence promotoru <i>ACTN1</i>	5': CTAGCCAGCCCAGCCCAGCCCTAG GCGGGGGCG CACGCCAGGGCAGCAGCCGTTGCTCAG AGAGAAGGTGGAGGAAGAAATCCAGACCCTAGCACGCGCGCACCATCATGGACCATA
	3': AGCTTATGGTCCATGATGGTGC GCGCGTGCTAGGGTCTGGATTTCTTCCTCCACCTTCTCT CTGAGCAACGGCTGCTGCCCTGGCGTG GCGCCCCG CTAGGGCTGGGCTGGGCTGG
Primery p.Gln447Pro	5': GCTCAAAAGACACCCAAGGAGACATACA
	3': TGTATGTCTCCTTGGGTGTCTTTTGAGC
Primery p.His450Arg	5': CACCAAAGGAGACGTACAGGTGTGAAA
	3': TTTCACACCTGTACGTCTCCTTTGGTG

Sekvence použité pro výrobu vektorů (u sekvencí *ACTN1* je tučně vyznačena vazebná sekvence pro WT1)

Inzert byl poté ověřen Sangerovým sekvenováním. Sekvence kódující dvě mutované formy WT1 vybrané na základě nejnižší a nejvyšší afinity zjištěné pomocí MST (p.His450Arg, p.Gln447Pro) byly pomocí cílené mutagenese (protokol dle Platinum™ SuperFi II DNA Polymerase od ThermoFisher, primery pro mutagenezi jsou v Tabulce 4 výše) připraveny v expresním vektoru s celým genem *WT1* (Origene, RG221271). Transformace vektoru byla provedena v kompetentních buňkách *DH5α* (ThermoFisher). Úspěšné zařazení mutací bylo ověřeno pomocí Sangerova sekvenování. Transfekce lidských buněk HEK293 (Sigma-Aldrich) byla provedena ve 12-jamkových deskách (150 000 buněk na jamku) dle firemního protokolu FuGENE 6 (Promega) v poměru FuGENE:DNA = 3:1. Koncentrace transfekovaných plazmidů byly následovné: 0,9 µg plazmidu *WT1* (wild type, p.His450Arg, p.Gln447Pro), 1 µg reportérového vektoru pGL4.32 s promotorem *ACTN1* a 0,1 µg kontrolního reportérového vektoru (Renilla, Promega). Všechny reakce byly připraveny v triplicátech (wild type WT1, WT1 p.His450Arg, p.Gln447Pro, HEK293 bez vektorů jako negativní kontrola) a šesti nezávislých 12-jamkových deskách. Po dvou dnech inkubace byla provedena luciferázová esej dle firemního protokolu Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega). Analýza byla spuštěna na čtečce FLUOstar omega (BMG Labtech) s

doporučeným nastavením pro luciferázovou esej. Přítomnost WT1 proteinů v buňkách HEK293 byla ověřena pomocí metody Western blot (Obrázek 6).



Obr. 6 Ověření WT1 proteinů v buňkách HEK293 metodou Western blot. PVDF membrána s proteiny WT1 (1 = WT1 wild type, 2 = WT1 p.His450Arg, 3 = WT1 p.Gln447Pro, 4 = HEK293 bez vektoru). Finální velikost 80 – 90 kDa odpovídá velikosti WT1 (56 kDa) a fluorescenční kotvy turbo GFP (26 kDa). Signál byl zobrazen pomocí přístroje Uvitec Alliance 4.7.

9.2.7 Statistika

Průměrná disociační konstanta (K_d) byla vypočítána z triplikátů každého měřeného mutantního WT1 a statistická významnost rozdílů průměrných K_d s byla ověřena pomocí dvouvýběrového oboustranného t-testu v softwaru R (Team, 2014). Průměrná hodnota luminiscence („relative light units“) u luciferázové esej byla vypočítána z triplikátů u každého z šesti měření a statistická významnost rozdílů průměrných hodnot byla také ověřena pomocí dvouvýběrového oboustranného t-testu v softwaru R.

9.3 Klinické a laboratorní prediktory odpovědi na glukokortikoidní léčbu

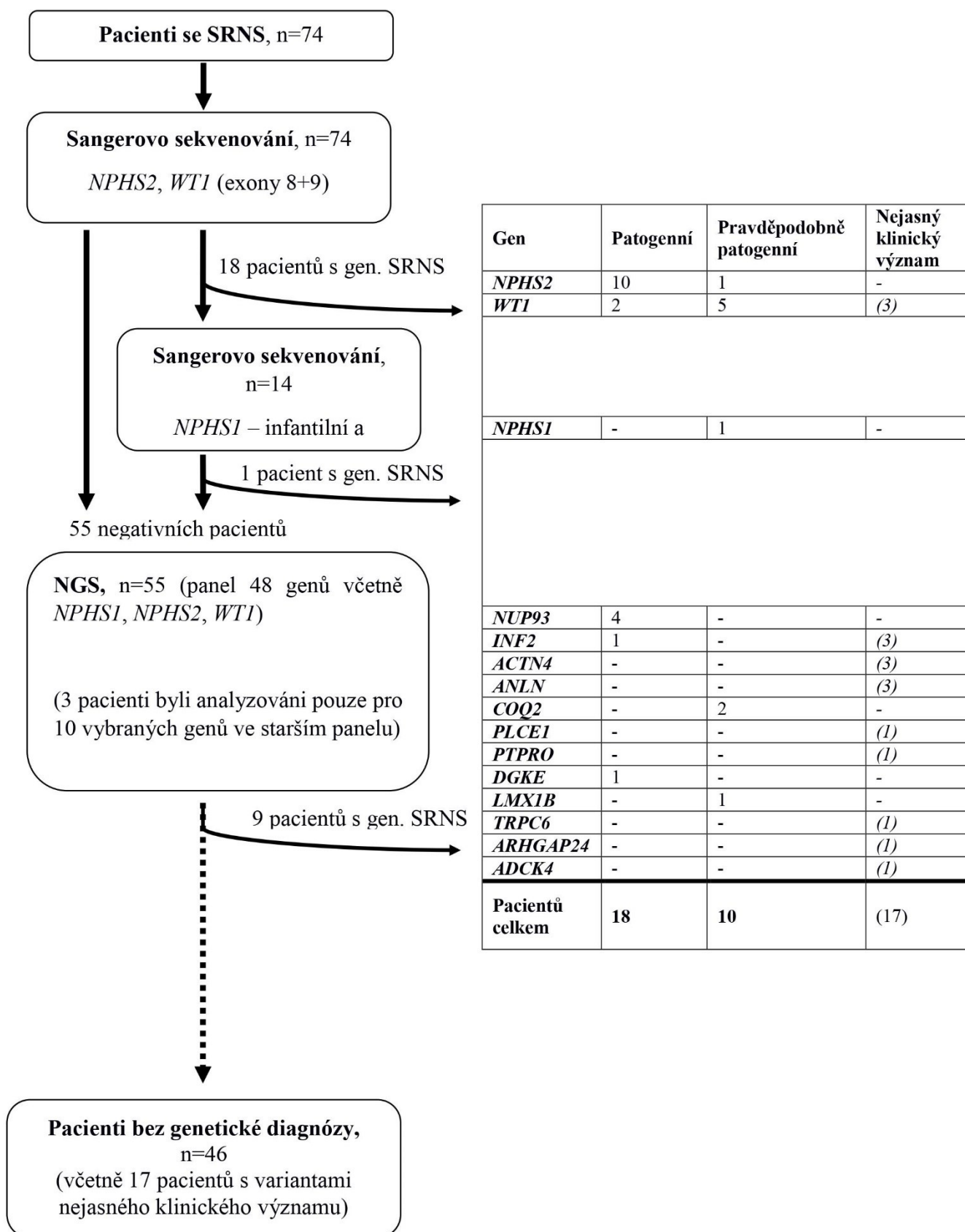
Pro tuto analýzu byli vybráni všichni pacienti se SRNS ze studie 1 a 2 s dostupnou informací o míře proteinurie a přítomnosti hypertenze a otoků při manifestaci onemocnění. Celkem se jednalo o 40 pacientů. Data byla porovnána s daty dětí se SSNS, které se nově manifestovali po roce 2017 a jejichž data a vzorky byly prospektivně systematicky sbírány v rámci dlouhodobého výzkumného záměru našeho pracoviště. Jednalo se o 12 pacientů.

10. Výsledky

10.1 Studie 1 – Molekulárně genetické vyšetření jedinců se SRNS

10.1.1 Výsledky genetické analýzy

Kombinace Sangerova sekvenování a panelu vybraných genů (sekvenování nové generace) odhalilo kauzální (patogenní nebo pravděpodobně patogenní) varianty u 28/74 (38 %) dětí se SRNS (Obrázek 7). Sangerovo sekvenování odhalilo 26 % pozitivních pacientů a sekvenování nové generace poté doplnilo množství pozitivních pacientů o dalších 9/74 pacientů (12 %). Nejčastěji mutovanými geny byly *NPHS2* u 11/74 (15 %) pacientů, *WT1* u 7/74 (9,5 %) pacientů, *NUP93* u 4/74 (5,4 %) pacientů, *COQ2* u 2/74 (2,7 %) pacientů a *NPHS1*, *INF2*, *DGKE* a *LMX1B* vždy u 1/74 (1,4 %) pacientů.



Obr. 7 Schéma a výsledky genetické analýzy pacientů se SRNS.

Celkem bylo identifikováno 23 různých kauzálních variant. Zatímco 18 z nich bylo již dříve popsáno jako příčina SRNS, zbylých 5 variant bylo originálních a dle standardů ACMG byly vyhodnoceny jako pravděpodobně patogenní či patogenní. Nejčastěji zastoupenou konkrétní patogenní variantou, ať již v homozygotním nebo ve složeném heterozygotním stavu s jinou variantou, byla c.413G>A (p.Arg138Gln) v genu *NPHS2* (u 10 jedinců). Druhá nejvíce zastoupená varianta c.1772G>T (p.Gly591Val) v genu *NUP93* byla nalezena u 4 jedinců. U variant *NUP93* byla ověřena jejich absence ve 380 zdravých kontrolách, neboť podíl pacientů s kauzálními variantami v tomto genu byl oproti podobným zahraničním studiím relativně vysoký. Podrobnosti o všech kauzálních variantách (patogenních i pravděpodobně patogenních) u testovaných pacientů jsou v Tabulce 5a, 5b.

U dalších 17 pacientů (23 %) byly identifikovány varianty nejasného klinického významu, u kterých nelze potvrdit ani vyloučit možnou asociaci se SRNS. Tyto varianty byly nalezeny v genech *WT1*, *ACTN4*, *INF2*, *ANLN*, *PLCE1*, *PTPRO*, *TRPC6*, *ARHGAP24*, *ADCK4*. Příčina onemocnění u těchto pacientů byla prozatím stanovena jako negenetická.

Tab. 5a Patogenní varianty (nebo složené s pravděpodobně patogenními variantami) nalezené u pacientů se SRNS

ID pacienta	Gen Exon/Intron	Varianta	Dědičnost	Genotyp	Frekvence (MAF) ¹	Primární reference	Typ varianty	Dříve popsané onemocnění	Zařazení varianty dle ACMG
1975 1985 1991 2014 2030a,b	<i>NPHS2</i> Ex3	c.413G>A p.Arg138Gln	AR	Homozygot	T=0.0007/82 (ExAC)	(Boute et al., 2000)	Substituce	SRNS, FSGS	Patogenní PS3, PS4, PM2, PM3, PP3
2028a,b	<i>NPHS2</i> Ex3	c.413G>A p.Arg138Gln	AR	Složený heterozygot	T=0.0007/82 (ExAC)	(Boute et al., 2000)	Substituce	SRNS, FSGS	Patogenní PS3, PS4, PM2, PM3, PP3
	<i>NPHS2</i> Ex3	c.419delG p.G140Dfs*41	AR		Není v databázích	(Boute et al., 2000)	Delece	SRNS	Patogenní PVS1, PM2, PM3, PP3
1992	<i>NPHS2</i> Ex3	c.413G>A p.Arg138Gln	AR	Složený heterozygot	T=0.0007/82 (ExAC)	(Boute et al., 2000)	Substituce	SRNS, FSGS	Patogenní PS3, PS4, PM2, PM3, PP3
	<i>NPHS2</i> Ex7	c.868G>A p.Val290Met	AR		T=0.00008/9 (ExAC)	(Karle et al., 2002a)	Substituce	SRNS	Pravděpodobně patogenní PM2, PM3, PP3, PP5
1973	<i>NPHS2</i> Ex3	c.413G>A p.Arg138Gln	AR	Složený heterozygot	T=0.0007/82 (ExAC)	(Boute et al., 2000)	Substituce	SRNS, FSGS	Patogenní PS3, PS4, PM2, PM3, PP3
	<i>NPHS2</i> Ex8	c.1150T>C p.Term384Gln	AR		Není v databázích	(Bouchireb et al., 2014)	Terminální varianta	SRNS	Pravděpodobně patogenní PM2, PM3, PM4, PP3, PP5

2002	<i>NUP93 Ex16</i>	c.1772G>T p.Gly591Val	AR	Složený heterozygot	T=0.0001/14 (ExAC)	(Braun et al., 2016)	Substituce	SRNS	Patogenní PS3, PS4, PM2, PM3, PP3
	<i>NUP93 Int13</i>	c.1537+1G>A	AR		A=0.000009/1 (ExAC)	(Braun et al., 2016)	Sestřihová varianta	SRNS	Patogenní PVS1, PS3, PM3, PP3
2015	<i>NUP93 Ex16</i>	c.1772G>T p.Gly591Val	AR	Složený heterozygot	T=0.0001/14 (ExAC)	(Braun et al., 2016)	Substituce	SRNS	Patogenní PS3, PS4, PM2, PM3, PP3
	<i>NUP93 Ex12</i>	c.1298delA p.D433Afs*23	AR		Není v databázích	Nová varianta	Delece	-	Patogenní PVS1, PM2, PM3, PP3
1996	<i>NUP93 Ex16</i>	c.1772G>T p.Gly591Val	AR	Složený heterozygot	T=0.0001/14 (ExAC)	(Braun et al., 2016)	Substituce	SRNS	Patogenní PS3, PS4, PM2, PM3, PP3
	<i>NUP93 Ex18</i>	c.1916T>C p.Leu639Pro	AR		Není v databázích	Nová varianta	Substituce	-	Pravděpodobně patogenní² PM1, PM2, PM3, PP3
2151	<i>NUP93 Ex16</i>	c.1772G>T p.Gly591Val	AR	Homozygot	T=0.0001/14 (ExAC)	(Braun et al., 2016)	Substituce	SRNS	Patogenní PS3, PS4, PM2, PM3, PP3
2008	<i>WT1 Ex9</i>	c.1372C>T p.Arg458Term	AD	Heterozygot	Není v databázích	(Schumacher et al., 1997a)	Terminální mutace	Nefroblastom, FSGS	Patogenní PVS1, PM1, PM2, PP3, PP4, PP5
2048	<i>WT1 Ex8</i>	c.1325A>C p.Gln442Pro	AD	Heterozygot	Není v databázích	Nová varianta	Substituce	-	Patogenní PS2, PM1, PM2, PM5, PP3
1963	<i>INF2 Ex4</i>	c.653G>A p.Arg218Gln	AD	Heterozygot	Není v databázích	(Brown et al., 2010)	Substituce	FSGS, SRNS	Patogenní PS3, PM1, PM2, PP1, PP3
2182	<i>DGKE Ex6</i>	c.966G>A p.Trp322Term	AR	Homozygot	A=0.00006/7 (ExAC)	(Lemaire et al., 2013)	Terminální mutace	Atypický hemolyticko-uremický syndrom	Patogenní PVS1, PM2, PP3, PP5

Tab. 5b Pravděpodobně patogenní varianty nalezené u pacientů se SRNS

ID pacienta	Gen Exon/Intron	Varianta	Dědičnost	Genotyp	Frekvence (MAF) ¹	Primární reference	Typ varianty	Dříve popsané onemocnění	Zařazení varianty dle ACMG
1988	<i>NPHS2</i> <i>Ex8</i>	c.952G>A p.Ala318Thr	AR	Složený heterozygot	Není v databázích	Nová varianta	Substituce	-	Pravděpodobně patogenní PM1, PM2, PP1, PP3
	<i>NPHS2</i> <i>Ex5</i>	c.686G>A p.Arg229Gln	AR		T=0.0146/73 (1000 Genomes)	(Tsukaguchi et al., 2002)	Substituce	FSGS, funkční asociace s variantami v exonech 7, 8 (Tory et al., 2014)	Benigní BP2, BP4, BP6, BS1, BS2
1755	<i>NPHS1</i> <i>Int3</i>	c.397+3A>G	AR	Složený heterozygot	Není v databázích	Nová varianta	Intronová varianta	-	Pravděpodobně patogenní PM2, PM3, PP3
	<i>NPHS1</i> <i>Ex9</i>	c.1103C>T p.Pro368Leu	AR		Není v databázích	(Beltcheva et al., 2001; Buscher et al., 2012)	Substituce	Kongenitální NS	Pravděpodobně patogenní PM2, PM3, PP3, PP5
1993	<i>WT1</i> <i>Ex9</i>	c.1406A>G p.His469Arg	AD	Heterozygot	Není v databázích	(Mucha et al., 2006)	Substituce	SRNS	Pravděpodobně patogenní PM1, PM2, PP3, PP4, PP5
2010	<i>WT1</i> <i>Ex8</i>	c.1283G>A p.Cys428Tyr	AD	Heterozygot	Není v databázích	(Clarkson et al., 1993a)	Substituce	Denys-Drashův syndrom	Pravděpodobně patogenní PM1, PM2, PP3, PP5

1681	<i>WT1</i> <i>Int9</i>	c.1432+4C>T	AD	Heterozygot	Není v databázích	(Barbaux, Niaudet, Gubler, Grunfeld, et al., 1997)	Intronová varianta	SRNS, Frasierův syndrom	Pravděpodobně patogenní PM1, PM2, PP3, PP5
2025	<i>WT1</i> <i>Ex9</i>	c.1384C>T p.Arg462Trp	AD	Heterozygot	Není v databázích	(Pelletier et al., 1991a)	Substituce	SRNS, Denys-Drashův syndrom	Pravděpodobně patogenní PM1, PM2, PP3, PP4, PP5
2185	<i>WT1</i> <i>Ex9</i>	c.1390G>A p.Asp464Asn	AD	Heterozygot	Není v databázích	(Pelletier et al., 1991a)	Substituce	FSGS, Denys-Drashův syndrom	Pravděpodobně patogenní PM1, PM2, PP3, PP5
2184a,b	<i>COQ2</i> <i>Ex3</i>	c.683A>G p.Asn228Ser	AR	Homozygot	C=0.0002/20 (ExAC)	(Diomedici-Camassei et al., 2007)	Substituce	SRNS, deficiencie CoQ10	Pravděpodobně patogenní PM2, PM3, PP3, PP5
2231	<i>LMX1B</i> <i>Ex4</i>	c.668G>A p.Arg223Gln	AD	Heterozygot	Není v databázích	(McIntosh et al., 1998)	Substituce	Nail-patella syndrom	Pravděpodobně patogenní PS2, PM2, PP3, PP5

Legenda pro Tabulku 5a, 5b: AD = autosomálně dominantní dědičnost, AR = autosomálně recesivní dědičnost

¹ Čísla označují relativní a absolutní výskyt příslušného SNP v databázi.

² Nejbližší známá patogenní varianta s funkční studií je c.1886A>G (p.Tyr629Cys) (Braun et al., 2016). Klasifikace je založena na předpokladu, že tato varianta může mít podobnou patogenní funkci, protože se nachází v těsné blízkosti.

10.1.2 Výsledky klinických a laboratorních nálezů

Rozdělení pacientů dle věku manifestace bylo následující: 11 pacientů s kongenitálním NS, 10 pacientů s infantilním NS a 52 pacientů s NS v dětském věku. Výskyt kauzálních variant je častější při manifestaci onemocnění do 12 měsíců věku v porovnání s manifestací později během dětství (13/21 vs. 15/52, $p = 0,02$ dle dvou-populačního proporčního testu). Pacient 1974 nebyl zařazen do tabulky kvůli chybějící informaci o věku při manifestaci NS. Podíl identifikovaných variant dle věku manifestace je v Tabulce 6.

Tab. 6 Nefrotický syndrom dle věku manifestace

Typ NS dle věku Kauzální gen	Kongenitální (0-3 měsíce) n = 11	Infantilní (4-12 měsíců) n = 10	Dětský (1-17 let) n = 52	Pacientů celkem n = 73
<i>NPHS1</i>	1	-	-	1
<i>NPHS2</i>	5	2	4	11
<i>WT1</i>	-	4	3	7
<i>NUP93</i>	-	-	4	4
<i>DGKE</i>	-	1	-	1
<i>COQ2</i>	-	-	2	2
<i>LMX1B</i>	-	-	1	1
<i>INF2</i>	-	-	1	1
Počet pacientů s kauzálními variantami	6 (55 %)	7 (70 %)	15 (29 %)	28 (38 %)

Otoky mělo při manifestaci SRNS v naší studii 26/41 dětí (63 %) a hypertenzi 10/39 dětí (26 %), u ostatních nebyly tyto údaje k dohledání. Nebyl nalezen významný rozdíl v proporcích pacientů s otoky a hypertenzí a ve výši proteinurie při manifestaci onemocnění mezi pacienty s genetickou a negenetickou formou onemocnění (Tabulka 7).

Tab. 7

	Genetický SRNS	Negenetický SRNS	p
Otoky	11/20	15/21	0,44
Hypertenze	6/21	4/18	0,93
Proteinurie	3351 ± 6000 (n = 26)	1406 ± 1893 (n = 25)	0,13

Statistický rozdíl tří nejčastějších příznaků SRNS mezi genetickou a negenetickou formou onemocnění při manifestaci. Informace o příznacích nebyly dostupné u všech pacientů. Hodnota proteinurie je v mg/mmol, Pro testování proporcí jedinců s otoky a hypertenzí byl použit dvou-populační proporční test a pro testování proteinurie dvouvýběrový oboustranný t-test.

U 56/74 pacientů (76 %) byla provedena biopsie ledvin, která odhalila MCD u 10/56 pacientů (18 %) a FSGS u 42/56 pacientů (75 %). U 4/56 pacientů (7 %) byla odhalena difúzní mezangiální skleróza. Nefroblastom byl odhalen při manifestaci onemocnění u jednoho pacienta a u dalších dvou byl diagnostikován později během pravidelného ambulantního sledování. Všichni tito tři pacienti byli klasifikováni jako případy Denys-Drashova syndromu. Extrarenální symptomy byly odhaleny u 23/74 pacientů (31 %): vrozené srdeční vady (2 pacienti), stenóza plicní tepny (2 pacienti), psychomotorická retardace (5 pacientů), hypotyreóza (3 pacienti), porucha růstu (4 pacienti), katarakta (2 pacienti), kryptorchismus (2 pacienti), pontocerebelární hypoplazie (1 pacient), patelární dysplázie, svalové kontraktury, svalová hypotonie a hypermobilita kloubů (1 pacient) či anorektální atrézie (1 pacient). Další relevantní klinická data jsou uvedena v Tabulce 8.

Tab. 8 Klinická charakteristika pacientů

ID pacienta	Genetický SRNS	Pohlaví	Věk při manifestaci	Výsledek renální biopsie	Reakce na cyklosporin A	Extrarenální manifestace/nefroblastom	Míra postižení vlastních ledvin při poslední kontrole	Progrese do ESRD (v letech)	Transplantace/dialýza	Rekurence NS	Naživu k prosinci 2017	Délka sledování v letech	Iničiální proteinurie (bílkovina:kreatinin; mg/mmol)
1755	Ano	F	7 týdnů	FSGS	CsA-RESI	Ne	CKD1	-	Ne	-	Ano	2,2	2123
2030a	Ano	F	10 dní	Nejsou data	Neléčen	Kongenitální onemocnění srdce	ESRD	4,7	Ano	Ne	Ano	15,2	2000
2030b	Ano	F	5 dní	Nejsou data	Neléčen	Kongenitální onemocnění srdce	ESRD	4,2	Ano	Ne	Ano	18,9	2350
2028a	Ano	F	11 dní	Nejsou data	CsA-RESI	Ne	ESRD	13,6	Ano	Ne	Ano	18,9	1950
2028b	Ano	M	8 dní	Nejsou data	CsA-RESI	Ne	ESRD	6,7	Ano	Ne	Ano	18,8	1485
1992	Ano	M	3 měsíce	FSGS	CsA-RESI	Psychomotorická retardace	ESRD	Nesjou data	Ano	Ne	Ano	18,6	Nejsou data
1975	Ano	M	5 měsíců	FSGS	CsA-RESI	Ne	ESRD	8,4	Ano	Ne	Ano	14	437
1973	Ano	F	1 rok	MCD	CsA-PR	Ne	CKD1	-	Ne	-	Ano	14,8	250
1991	Ano	M	1,5 roku	MCD	CsA-RESI	Ne	CKD3	-	Ne	-	Ano	11,8	290
2014	Ano	F	2 roky	FSGS	CsA-RESI	Ne	ESRD	6,9	Ano	Ne	Ano	13,5	3180
1988	Ano	M	2,3 roku	FSGS	CsA-RESI	Ne	CKD4	-	Ne	-	Ano	12,6	420
1985	Ano	M	2,5 roku	MCD	CsA-RESI	Ne	CKD1	-	Ne	-	Ano	7,3	Nejsou data

2008	Ano	M	5 měsíců	Nejsou data	CsA-RESI	Nefroblastom, kryptorchismus, Denys-Drashův syndrom	ESRD	7,8	Ano	Ne	Ano	13,8	720
1993	Ano	F	8 měsíců	FSGS	Neléčen	Nefroblastom, Denys-Drashův syndrom	ESRD	1,1	Ano (2x)	Ne	Ano	18,3	Anurie
2010	Ano	F	8 měsíců	DMS	Neléčen	Ne	ESRD	1,9	Ano	Ne	Ano	14,8	515
2185	Ano	M	10 měsíců	Nejsou data	Neléčen	Ne	CKD2	-	Ne	-	Ano	8 měsíců	Nejsou data
2048	Ano	F	1,6 roku	FSGS	CsA-RESI	Ne	ESRD	0	PD	-	Ne	8 měsíců	2121
2025	Ano	M	4,2 roku	Nejsou data	Neléčen	Nefroblastom, kryptorchismus, Denys-Drashův syndrom	ESRD	0	HD	-	Ne	1	1374
1681	Ano	F	11,1 roku	FSGS	CsA-RESI	Ne	CKD1	-	Ne	-	Ano	5,5	3270
1996	Ano	M	1,8 roku	FSGS	CsA-RESI	Ne	ESRD	1,1	Ano	Ano	Ano	8,3	400
2002	Ano	F	3 roky	MCD	Nejsou data	Ne	ESRD	5 měsíců	Ano	Ne	Ano	13,9	20000
2015	Ano	F	3,9 roku	FSGS	CsA-RESI	Ne	ESRD	1,2	Ano	Ne	Ano	8,6	6200
2151	Ano	M	7 let	FSGS	CsA-PR	Ne	CKD3	-	Ne	-	Ano	1,3	514
2184a	Ano	F	3 roky	FSGS	Nejsou data	Nízký vzrůst	ESRD	5 měsíců	HD	-	Ano	3	1900
2184b	Ano	F	3 roky	FSGS	Nejsou data	Nízký vzrůst	CKD2	N	Ne	-	Ano	4,5 měsíců	400
1963	Ano	M	14 let	FSGS	Neléčen	Nejsou data	CKD2	-	Ne	-	Ano	1,5	120
2182	Ano	F	8 měsíců	FSGS	Neléčen	Ne	ESRD	3 týdny	PD	-	Ano	8 měsíců	2850
2231	Ano	M	5 let	FSGS	CsA-RESI	patelární dysplázie, svalové kontraktury, svalová hypotonie,	ESRD	12,7	HD	-	Ano	12,9	680

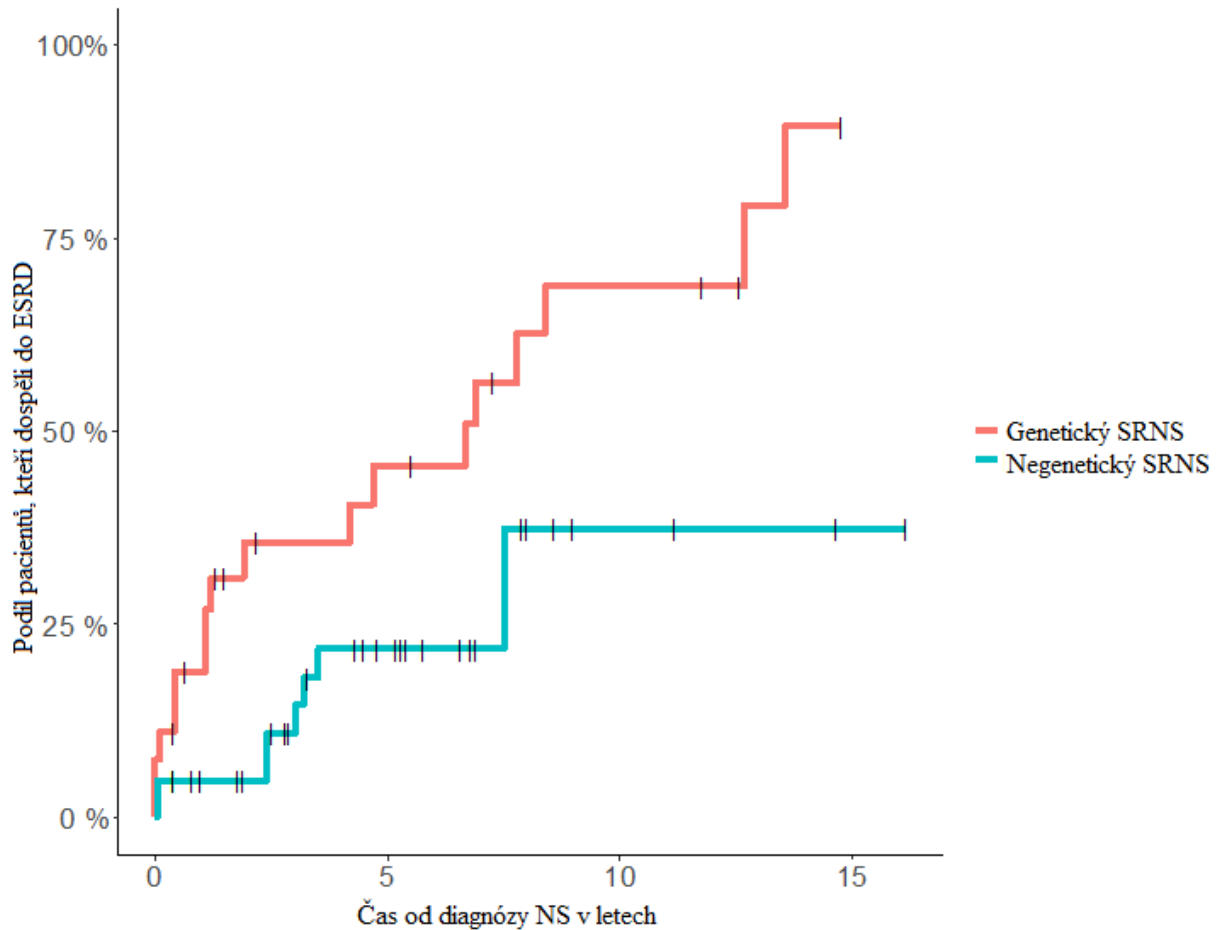
						hypermobilita kloubů								
2026	Ne, VUS	F	8 měsíců	FSGS	CsA-RESI	Ne	ESRD	7,5	PD	-	Ano	8,6	1990	
2110	Ne, VUS	M	1,7 roku	FSGS	CsA-PR	Ne	CKD2	-	Ne	-	Ano	1	1050	
2206	Ne, VUS	F	15,1 let	Nejsou data	CsA-RESI	Ne	CKD2	-	Ne	-	Ano	4,5 měsíc ů	Nejsou data	
1736	Ne, VUS	F	5,7 let	Nejsou data	CsA-PR	Ne	CKD1	-	Ne	-	Ano	1,8	210	
1999	Ne, VUS	M	1 rok	MCD	CsA-CR	Ne	CKD1	-	Ne	-	Ano	5,4	1200	
2196	Ne, VUS	M	10,7 let	FSGS	CsA-PR	Ne	CKD1	-	Ne	-	Ano	1,9	250	
2024	Ne, VUS	F	6 let	FSGS	Neléčen	Ne	CKD3	-	Ne	-	Ne	6,6	200	
1490	Ne, VUS	M	13,5 let	FSGS	CsA-PR	Nízký vzrůst, hypotyreóza	ESRD	3,2	PD	-	Ano	5,4	Nejsou data	
2033	Ne, VUS	F	4,7 roku	Nejsou data	Neléčen	Ne	CKD1	Nejsou data	Ne	-	Ano	6,8	Nejsou data	
2019	Ne, VUS	M	16,2 let	FSGS	CsA-CR	Hypotyreóza	CKD1	-	Ne	-	Ano	2,8	230	
2017	Ne, VUS	M	17 let	FSGS	CsA-CR	Katarakta	CKD3	-	Ne	-	Ano	1,9	Nejsou data	
2012	Ne, VUS	M	3,1 roku	FSGS	CsA-PR	Psychomotorická retardace	No data	-	Ne	-	Ano	2	Nejsou data	
1754	Ne, VUS	M	6 týdnů	Neprovedeno	Neléčen	Pontocerebelární hypoplazie	CKD1	-	Ne	-	Ne	5 měsíc ů	4055	
2021	Ne, VUS	M	8,3 let	MCD	Neléčen	Ne	CKD1	-	Ne	-	Ano	8,6	917	

2004a	Ne, VUS	F	8 dní	DMS	Neléčen	Stenóza plicní tepny	ESRD	8 dní	HD	-	Ne	5 měsíců	Anurie
2004b	Ne, VUS	F	3 týdny	DMS	Neléčen	Stenóza plicní tepny	ESRD	2 týdny	HD	-	Ne	11 měsíců	25000
2016	Ne, VUS	M	16 let	Nejsou data	CsA-RESI	Ne	CKD2	-	Ne	-	Ano	2,8	200
2027	Ne	F	3 měsíce	DMS	CsA-RESI	Ne	ESRD	2,4	Ano	Ne	Ano	5,2	463
1638	Ne	M	4 měsíce	Neprov edeno	CsA-CR	Anorektální atrézie, solitární ledvina	CKD1	-	Ne	-	Ano	2,9	6800
1603	Ne	F	7 měsíců	MCD	CsA-PR	Nejsou data	CKD2	-	Ne	-	Ano	4,3	> 300
1986	Ne	M	1,4 roku	MCD	CsA-CR	Ne	CKD2	-	Ne	-	Ano	14,7	Nejsou data
1982	Ne	M	1,8 roků	MCD	CsA-CR	Nizký vzrůst	CKD1	-	Ne	-	Ano	5,3	6423
1976	Ne	M	2 roky	FSGS	CsA-CR	Ne	Nejsou data	Nejsou data	Ne	-	Ne	16,7	Nejsou data
1987	Ne	M	2,2 roku	FSGS	CsA-PR	Ne	ESRD	Nejsou data	Ano	Ne	Ano	7,8	Nejsou data
1497	Ne	F	2,3 roku	FSGS	CsA-PR	Nizký vzrůst	CKD1	-	Ne	-	Ano	11,2	Nejsou data
1978	Ne	F	2,5 roku	FSGS	CsA-RESI	Ne	ESRD	3	Ano	Ano	Ano	10,5	720
1602	Ne	M	2,5 roku	Nejsou data	Nejsou data	Nejsou data	Nejsou data	Nejsou data	Ne	-	Nejsou data	3,4	Nejsou data
1998	Ne	F	2,7 roku	FSGS	CsA-CR	Ne	CKD1	-	Ne	-	Ano	8	680
1635	Ne	M	3,1 roku	Nejsou data	CsA-RESI	Ne	CKD1	-	Ne	-	Ano	3,3	Nejsou data
2018	Ne	M	4,5 roku	FSGS	CsA-RESI	Ne	ESRD	7,5	HD	-	Ano	12	4011
1705	Ne	M	4,5 roku	FSGS	CsA-RESI	Ne	CKD1	-	Ne	-	Ano	2,5	1263

1984	Ne	M	5,2 let	MCD	CsA-PR	Ne	CKD1	Nejsou data	Ne	-	Ano	7,9	Nejsou data
1997	Ne	F	7,8 let	FSGS	CsA-CR	Ne	CKD1	-	Ne	-	Ano	1,9	306
1981	Ne	F	8 let	Nejsou data	CsA-PR	Ne	CKD2	-	Ne	-	Ano	9	Nejsou data
1994	Ne	F	8,3 let	FSGS	CsA-RESI	Ne	ESRD	2,4	Ano	Ne	Ano	6,6	2000
1965	Ne	F	9 let	FSGS	CsA-RESI	Ne	ESRD	3,5	Ano	Ano	Ano	8	500
1972	Ne	M	10 let	FSGS	Nejsou data	Nízký vzrůst, katarakta	CKD1	-	Ne	-	Ano	9	Nejsou data
2000	Ne	M	11,1 let	FSGS	CsA-CR	Ne	CKD1	-	Ne	-	Ano	4,8	210
1979	Ne	M	11,2 let	Nejsou data	Neléčen	Hypotyreóza	CKD1	Nejsou data	Ne	-	Nejsou data	5,8	Nejsou data
2013	Ne	F	13,8 let	FSGS	CsA-RESI	Psychomotorická retardace	CKD2	Nejsou data	Ne	-	Ano	5,2	Nejsou data
2034	Ne	F	14 let	FSGS	CsA-RESI	Psychomotorická retardace	CKD1	Nejsou data	HD	-	Ano	4,8	270
2023	Ne	F	14 let	FSGS	CsA-RESI	Psychomotorická retardace	CKD1	-	Ne	-	Ano	6,9	670
1720	Ne	M	14,5 let	FSGS	CsA-PR	Ne	CKD1	-	Ne	-	Ano	4,5	230
2186	Ne	F	15,4 let	FSGS	Nejsou data	Ne	CKD3	-	Ne	-	Ano	10 měsíců	Nejsou data
2091	Ne	M	16 let	FSGS	Neléčen	Ne	CKD1	-	Ne	-	Ano	1	Nejsou data
1974	Ne	F	Nejsou data	Nejsou data	Nejsou data	Nejsou data	CKD1	Nejsou data	Nejsou data	-	Ano	16,2	Nejsou data

Legenda: VUS = varianta nejasného klinického významu; F = dívka; M = chlapec; CsA-RESI = rezistence k cyklosporinu A; CsA-PR = částečná remise po cyklosporinu A; CsA-CR = úplná remise po cyklosporinu A; CKD = stádium chronického onemocnění ledvin; DMS = difúzní mezangiální skleróza; ESRD = konečné stádium onemocnění ledvin; PD = peritoneální dialýza; HD = hemodialýza

Konečné stádium onemocnění ledvin bylo zaznamenáno u 28/74 pacientů (38 %; 18 z nich s genetickým SRNS). Výrazně častěji dospěli do tohoto stadia jedinci s genetickým SRNS nežli ti s geneticky negativním nálezem (Obrázek 8).

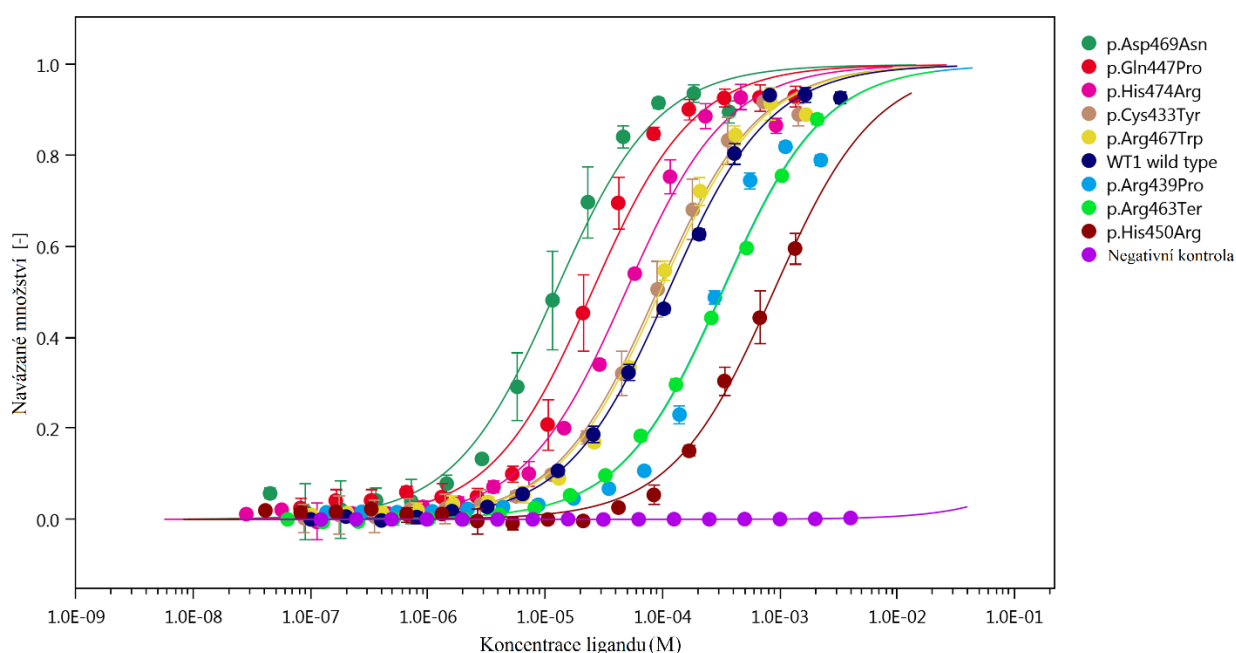


Obr. 8 Vývoj proporce jedinců, kteří dospěli do konečného stádia onemocnění ledvin (ESRD), zvlášť pro genetickou a negenetickou formu SRNS. Poměr rizik (HR) = 2,2; Interval spolehlivosti = CI 95% 1,2 – 3,8; p = 0,0063

10.2 Studie 2 - Analýza vazebné afinity mutantů WT1 k cílové DNA sekvenci

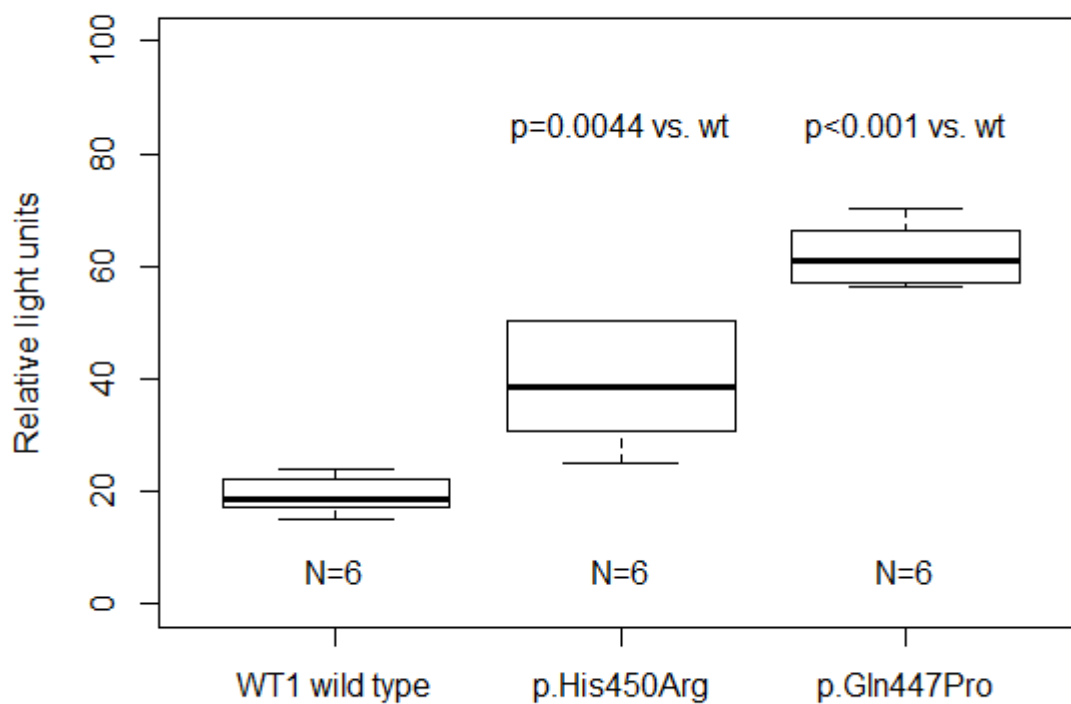
10.2.1 Vazba WT1 proteinů k EGR1 DNA sekvenci

Disociační konstanty (K_d) měřené pomocí mikroškalové termoforézy pro každý z testovaných WT1 proteinů byly automaticky vypočítány z křivek závislosti proporce DNA-vázaných molekul a jejich koncentrace (Obrázek 9). Zatímco 3/8 WT1 mutantů (p.Arg439Pro, p.His450Arg, p.Arg463Ter) měly nižší vazebnou afinitu oproti wild type WT1 proteinu ($p < 0,01$ pro všechny), další 3/8 WT1 mutanty (p.Gln447Pro, p.Asp469Asn, p.His474Arg) vykazovaly zvýšenou vazebnou afinitu ($p < 0,01$ pro všechny) a u zbylých 2/8 WT1 mutantů (p.Cys433Tyr, p.Arg467Trp) byla afinita podobná jako pro wild type WT1 protein. Fenotyp pacientů nebyl s těmito změnami DNA-vazebné afinity nikterak asociován.



Obr. 9 Křivky vazebné afinity pro každý testovaný WT1 protein. Relativní množství navázaných WT1 proteinů na cílovou EGR1 DNA doménu (osa y) měřené metodou MST. Se zvyšující se koncentrací proteinu (osa x) dochází k saturaci vazby. Křivky posunuté vlevo od wild type proteinu (tmavě modrá křivka) značí zvýšenou vazebnou afinitu a naopak křivky více vpravo značí sníženou vazebnou afinitu.

Luciferázová esej ukázala, že varianta p.His450Arg s nejnižší vazebnou afinitou i varianta p.Gln447Pro s nejvyšší vazebnou afinitou významně zvyšují expresi cílového proteinu *ACTN1* v porovnání s expresí stimulovanou wild type WT1 proteinem (Obrázek 10).



Obr. 10 Změna genové exprese promotoru *ACTN1* změřená pomocí luciferázové esej.

10.2.2 Klinická data pacientů s *WT1* variantami

Onemocnění se u pacientů s *WT1* variantami typicky manifestovalo v prvním roce života (78 %, infantilní NS). Pouze u 2/9 pacientů (22 %) se onemocnění projevilo až v předškolním věku. Medián manifestace byl 5 měsíců (min: 8 dní, max: 4,2 let). Nejčastějšími symptomy při manifestaci byly otoky obličeje a končetin (56 %), hypertenze (44 %) a hematurie (44 %). Šest pacientů (67 %) mělo navíc k SRNS další ledvinové nebo jiné přidružené projevy: Denys-Drashův syndrom (SRNS s nefroblastomem a případně u chlapců navíc s poruchou pohlavního vývoje - kryptorchismem) byl přítomen u 3/9 pacientů (33 %). Další pacient měl kromě SRNS hypospadii a rozštěp skrota. U biamniálních monochorionických dvojčat se vedle SRNS projevila stenóza plicní tepny. Konečné stádium onemocnění ledvin bylo zaznamenáno u všech pacientů s *WT1* variantami s nástupem ve věku od narození do 7,8 let (medián: 8 měsíců). Mortalita těchto pacientů byla vysoká: pouze 3 jedinci, kteří se dožili transplantace, doposud žijí, ostatních 6 zemřelo (příčiny úmrtí a další relevantní klinická data jsou uvedena v Tabulce 9). Molekulárně genetické vyšetření odhalilo u těchto 9 pacientů 8 různých heterozygotních exonových variant v genu *WT1*. Všechny tyto varianty byly v literatuře již dříve popsány jako kauzální dle in silico metod (Tabulka 10), avšak bez ověření funkčními studii. V této studii nebyl nalezen statisticky významný klinický či laboratorní prediktor, který by odlišoval jedince se SRNS způsobeným kauzální variantou ve *WT1* od ostatních případů SRNS způsobených kauzální variantou v jiném genu (otoky p = 1,00; hypertenze p = 0,55; proteinurie p = 0,29).

Tab. 9 Klinická data pacientů s variantami v genu *WT1*

ID pacienta	Pohlaví	Věk při manifestaci	Gestační věk při narození (v týdnech)	Iničiální GF (ml/min/1.73 m ²)	Bílkovina:Kreatinin (mg/mmol)	Iničiální sérový albumin (g/L)	Hypertenze při manifestaci	Hematurie při manifestaci	Otoky při manifestaci	Nefroblastom	Extrarenální komplikace	Výsledek biopsie ledvin	Léčba (chronologicky)	Progrese do ESRD	Transplantace	Aktuální zdravotní stav pacienta
1	F	8 měsíců	40	43	515	21,9	Ne	Ne	Ano	Ne	Ne	DMS	Prednison/Cyklofosamid	1,9 let	Ano	Naživu (nyní ve věku 20 let)
2	F	8 dní	32	13	8 750	22,4	Ne	Ne	Ano	Ne	Stenóza plicní tepny	DMS	Methylprednisolon/Konzervativní léčba/Kontinuální venovenózní hemodialýza	8 dní	Ne	Zemřel z důvodu sepse, multiorgánového selhání 5 měsíců po diagnóze
3	F	3 týdny	32	90	25 000	19,0	Ne	Ano	Ano	Ne	Stenóza plicní tepny	DMS	Methylprednisolon/Konzervativní léčba/PD/Kontinuální venovenózní hemodialýza	2 týdny	Ne	Zemřel z důvodu sepse, multiorgánového selhání 11 měsíců po diagnóze
4	F	1,6 let	39	7,5	2 121	25,5	Ano	Ne	Ne	Ne	Ne	FSGS	Kontinuální venovenózní hemodialýza	1,8 let	Ne	Zemřel z důvodu sepse, multiorgánového selhání 8 měsíců po diagnóze
5	F	5 měsíců	39	90	3 211	29,0	Ne	Ano	Ne	Ne	Ne	Neindikováno	Prednison/Konzervativní léčba/PD	8 měsíců	Ne	Zemřel z důvodu hypertenzní krize 15 měsíců po diagnóze
6	M	5 měsíců	42	90	1 076	28,0	Ne	Ne	Ne	Ano	Denys-Drashův syndrom, kryptorchismus	Neindikováno	HD	7,8 let	Ano	Naživu (nyní ve věku 18 let)
7	M	4,2 let	32	5	1 374	27,5	Ano	Ano	Ano	Ano	Denys-Drashův syndrom, kryptorchismus	Neindikováno	Kontinuální venovenózní hemodialýza	Při manifestaci	Ne	Zemřel z důvodu generalizovaného nádoru 1 rok po diagnóze
8	M	1 týden	37	9	7 961	26,0	Ano	Ano	Ne	Ne	Hypospadiie, rozštěp šourku	Neindikováno	Konzervativní léčba	Při manifestaci	Ne	Zemřel z důvodu konzervativní léčby schválené rodiči 2 týdny po diagnóze
9	F	8 měsíců	40	90	736	24,0	Ano	Ne	Ano	Ano	Denys-Drashův syndrom	FSGS	Konzervativní léčba/HD	1,1 let	Ano (2x)	Naživu (nyní ve věku 23 let)

Tab. 10 Přehled nalezených variant v genu *WT1*

ID pacienta	Nukleotidová záměna (NM_024426.5)	Aminokyselinová záměna (NP_077744.4)	<i>WT1</i> exon	Zinkový prst	ACMG hodnocení	Referenční číslo dbSNP (rs)	HGMD číslo	Primární publikace dle HGMD	Předchozí funkční studie	Predikce změny vazebné afinity dle MST	Kd ± sd; μM (MST)	Změna vazebné afinity vůči wild type	p - hodnota
1	c.1298G>A	p.Cys433Tyr	8	2	LP (PM1, PM2, PP2, PP3, PP5)	Bez rs čísla	CM930740	(Clarkson et al., 1993b)	Ne	Beze změny	89,4 (7,0)	Nesignifikantní	3,482161e-01
2, 3	c.1316G>C	p.Arg439Pro	8	2	VUS (PM1, PM2, PP2, PP3, PP5, BS2 – pozitivní otec)	Bez rs čísla	CM114500	(Fencel et al., 2012)	Ne	Snížená vazebná afinita	319,0 (72,7)	2,9x	1,248711e-03
4	c.1340A>C	p.Gln447Pro	8	2	P (PS2, PM1, PM2, PM5, PP2, PP3)	Bez rs čísla	CM188109	(Bezdička et al., 2018)	Ne	Zvýšená vazebná afinita	24,9 (4,2)	4,4x	3,686159e-04
5	c.1349A>G	p.His450Arg	8	2	P (PS2, PM1, PM2, PM5, PP2, PP3)	Bez rs čísla	CM941408	(Nordenskjöld et al., 1994)	Ne	Snížená vazebná afinita	878,5 (164,2)	7,9x	6,735329e-03
6	c.1387C>T	p.Arg463Ter	9	3	P (PVS1, PM1, PM2, PP2, PP3, PP5)	rs121907909	CM971596	(Schumacher et al., 1997b)	Predikovaný vliv na sestřih (Xiong et al., 2015)	Snížená vazebná afinita	323,5 (13,3)	2,9x	8,565044e-05
7	c.1399C>T	p.Arg467Trp	9	3	LP (PM1, PM2, PP2, PP3, PP5)	rs121907900	CM910411	(Pelletier et al., 1991b)	Snížená vazebná afinita (Barrera et al., 2016)	Beze změny	94,6 (9,8)	Nesignifikantní	8,497590e-02
8	c.1405G>A	p.Asp469Asn	9	3	P (PS2, PM1, PM2, PP2, PP3, PP5)	rs28941778	CM910413	(Pelletier et al., 1991b)	Ne	Zvýšená vazebná afinita	12,1 (1,7)	9,3x	9,340891e-03
9	c.1421A>G	p.His474Arg	9	3	LP (PM1, PM2, PP2, PP3, PP5)	Bez rs čísla	CM061235	(Mucha et al., 2006)	Ne	Zvýšená vazebná afinita	48,4 (6,0)	2,3x	7,263909e-03

Legenda: *WT1* wild type Kd = 110.9 μM (± sd = 7.4 μM) LP = pravděpodobně patogenní varianta; P = patogenní varianta; HGMD = oficiální databáze lidských genových variant.

10.3 Klinické a laboratorní prediktory odpovědi na glukokortikoidní léčbu

Mezi dětmi s glukokortikoid-rezistentní a glukokortikoid-senzitivní formou nefrotického syndromu nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v proporcí dětí s otoky, hypertenzí ani rozdíl v míře proteinurie (Tabulka 11).

Tab. 11

	SRNS	SSNS	p
Otoky	23/40	11/12	0,07
Hypertenze	11/40	7/12	0,10
Proteinurie	2905 ± 5086 (n = 40)	1388 ± 918 (n=12)	0,08

Rozdíly ve vybraných parametrech mezi jedinci s glukokortikoid-rezistentní a glukokortikoid-senzitivní formou nefrotického syndromu. Hodnota proteinurie je v mg/mmol, Pro testování proporcí jedinců s otoky a hypertenzí byl použit dvou-populační proporční test a pro testování proteinurie dvouvýběrový oboustranný t-test.

11. Diskuze

Tato práce pomocí kombinace Sangerova přímého sekvenování a NGS panelu zaměřeného na 48 známých kauzálních genů odhalila příčinu onemocnění u 38 % jedinců téměř 20 let sbírané unikátní kohorty českých a slovenských dětí se SRNS. (Bezdíčka et al., 2018). Mezi nejčastěji zastoupenými kauzálními geny byly kromě i v jiných populacích zaznamenaných *NPHS2* (kóduje podocin – stavební kámen mezibuněčných spojů podocytů) a *WT1* (kóduje transkripční faktor WT1 - zásadní regulátor urogenitálního vývoje) také *NUP93*, který kóduje podjednotku transportního póru jaderné membrány (Braun et al., 2016), a naši kohortu tak od předchozích do jisté míry odlišuje. V dalším kroku jsme se zaměřili na odhalení molekulární podstaty asociace mezi nalezenými variantami transkripčního faktoru *WT1* a SRNS. Zjistili jsme, že proteinové produkty jednotlivých variant *WT1* se k cílové DNA sekvenci vážou s různou (vyšší i nižší) afinitou v porovnání s wild type WT1 proteinem. U dvou mutantních forem WT1 s opačným vlivem na DNA-vazebnou afinitu jsme pak pomocí luciferázové eseje v buňkách HEK293 ověřili, že obě významně zvyšovaly expresi cílového genu *ACTN1*. Míra proteinurie, přítomnost otoků ani hypertenze při manifestaci onemocnění se nelišily mezi jedinci se SRNS a SSNS.

11.1 Diskuze ke studii 1

11.1.1 Význam NGS a nejčastěji mutované geny u českých a slovenských dětí se SRNS

Přestože je NGS poměrně finančně nákladná metoda, v naší studii (panel 48 genů) vycházela cena za vyšetření jednoho vzorku (pacienta) na cca 6500,-Kč. Ten samý počet genů by v případě využití Sangerovy metody přišel u jednoho vzorku (pacienta) na cca 81600,-Kč. Kromě toho by vyšetření a analýza jednoho pacienta Sangerovou metodou trvala cca 192 dní, zatímco u NGS to bylo jen cca 21 dní. NGS je tak jednoznačně rychlejší a levnější alternativou. Vzhledem k vyšší chybovosti metody NGS je však stále vhodné významné nálezy NGS ověřovat Sangerovou metodou (Bezdíčka et al., 2018). Naše kombinace Sangerova a NGS sekvenování tak představuje snahu o časově i finančně optimální vyšetřovací postup.

Nejčastěji mutovanými geny v naší populaci byly *NPHS2* (15 %) a *WT1* (12 %). Mutace těchto dvou genů byly nejčastější také v dalších evropských studiích zaměřených na výzkum

genetických příčin SRNS u dětí. Data z národního registru Španělska (Santín et al., 2011), Velké Británie (Bierzynska et al., 2017) či Německa (Büscher et al., 2010) ukázala prevalenci *NPHS2* u 6 – 20 % případů a prevalenci *WT1* u 2 – 12 % jedinců. Naopak gen *NPHS1*, který byl v těchto studiích většinou třetím nejčastěji mutovaným genem (zastoupen v 7 – 17,5 % případů), byl v naší studii nalezen pouze u jednoho pacienta (1,4 %). V práci ze Saudské Arábie byla genetická příčina SRNS odhalena u 51 % případů (Al-Hamed et al., 2013), tedy významně více než v evropských studiích, ale u všech případů byl potvrzen příbuzenský vztah rodičů. V jiné práci mělo pozitivní výsledek genetického vyšetření SRNS dokonce 62 % pacientů, jednalo se však o mezinárodní studii kongenitálního NS (Heeringa et al., 2008), tedy pouze jedinců, kteří se manifestovali nejpozději do 3 měsíců věku. Z nich 55 % neslo kauzální varianty v genu *NPHS1*. Podobně tomu bylo u studie pacientů s manifestací SRNS do 1 roku života, ve které se genetická příčina potvrdila v 66 % (Hinkes et al., 2007). Je tedy zřejmé, že podíl geneticky potvrzených případů SRNS klesá s rostoucím věkem při manifestaci onemocnění a poměrné (nebo výhradní) zastoupení nejmladších dětí v konkrétní studii může významně ovlivnit nejen procento pozitivních nálezů ale také poměrné zastoupení jednotlivých kauzálních genů. V evropských poměrech zanedbatelným faktorem vysvětlujícím rozdílné procento geneticky podmíněných případů mezi jednotlivými studii je pak konsangvinita.

Významným nálezem naší studie je poměrně vysoký výskyt mutací v genu *NUP93* (třetí nejčastěji mutovaný gen), který byl v jiných evropských studiích raritní příčinou SRNS (5,4 % vs. 0,4 – 0,5 %) (Bierzynska et al., 2017; Braun et al., 2016). Role selektivních transportních pórů jaderné membrány (proteinového produktu *NUP93*) v patogenezi onemocnění byla poprvé popsána u 6 rodin srbského, německého a tureckého původu, kdy bylo pomocí funkční studie prokázáno, že genetickým vyšetřením detekované varianty *NUP93* vedou k abnormální struktuře pórů a způsobují snížení průchodnosti jaderné membrány pro transkripční faktor SMAD4, mediátor signální transdukce TGF- β . SMAD4 podporuje přežívání podocyťů za nepříznivých podmínek extracelulárního prostředí (Braun et al., 2016). Snížená koncentrace SMAD4 v jádře tak může usnadnit poškození podocyťů (Braun et al., 2016; Meng et al., 2012). V době realizace naší studie byl kromě výše zmíněných 6 rodin popsán již jen jeden další pacient (Bierzynska et al., 2017) s mutovaným *NUP93* v asociaci se SRNS. U všech našich čtyř pacientů byla nalezena patogenní varianta c.1772G>T (p.Gly591Val), a to buď v homozygotním (1/4 případů) nebo ve složeném

heterozygotním stavu s další kauzální variantou *NUP93* (3/4 případů). Zajímavostí je, že tato varianta byla v heterozygotní formě nalezena u jednoho dalšího pacienta, u kterého se tím však vzhledem k autozomálně recesivní dědičnosti onemocnění příčina nevysvětlila. Naše nálezy tak podporují hypotézu o efektu zakladatele v Evropě, tedy rozšíření původně raritní genové varianty v populaci (Braun et al., 2016).

11.1.2 Lze klinicky odlišit genetický a negenetický SRNS?

Během prvních pěti let po manifestaci SRNS dospělo do konečného stádia onemocnění ledvin téměř 50 % dětí s genetickou formou ale jen necelých 25 % dětí s negativním genetickým nálezem. Podobně tomu bylo i v britské studii, kde se jednalo zhruba o 60 %, resp. 20 % dětí (Bierzynska et al., 2017), nebo ve studii německé (72 % resp. 29 %) (Büscher et al., 2010). Z těchto výsledků vyplývá, že genetická forma SRNS je spojena s významně vyšším rizikem vzniku selhání ledvin než je tomu u případů SRNS s negativním genetickým nálezem. Jistým klinickým prediktorem, který může předpovědět monogenní formu onemocnění, je věk při manifestaci. V naší studii byl genetický SRNS diagnostikován statisticky významně více u dětí do jednoho roku věku než u dětí starších (62 % vs. 29 % případů, $p = 0,02$). Věková závislost byla popsána i v mezinárodní studii SRNS, kdy nejvyšší záchyt genetických případů byl při manifestaci onemocnění do 3 měsíců věku (69,4 %) a mezi 3 a 12 měsíci života (49,7 %), u později manifestovaných proporce geneticky pozitivních jedinců významně klesla (21 %) (Sadowski et al., 2015). Z dostupných dat se nám nepodařilo nalézt vhodný prediktor, který by odlišil genetickou a negenetickou formu SRNS již při manifestaci onemocnění.

11.1.3 Význam genetického vyšetření SRNS v praxi vycházející ze studie 1

U dvou sourozenců byla identifikována již dříve popsaná homozygotní patogenní varianta c.683A>G (p.Asn228Ser) v genu *COQ2* (McCarthy et al., 2013). Gen *COQ2* kóduje enzym parahydroxybenzoid-polyprenyl-transferázu, která katalyzuje úvodní kroky biosyntézy koenzymu Q10 (Acosta et al., 2016). Mutace *COQ2* se mohou kromě SRNS projevit jako encefalomyelopatie, oční atrofie, selhání jater nebo laktátová acidóza (Acosta et al., 2016). U obou sourozenců byl z bioptického vzorku ledvin histologicky popsán obraz FSGS a u starší sestry došlo k úmrtí z důvodu selhání ledvin ještě před genetickou diagnózou. Mladší sestra zprvu částečně zareagovala na podání léku první volby u SRNS, tj. cyklosporinu A, ale její proteinurie zůstávala stále kolem 500 mg/m²/den (Bezdička et al., 2020). Na základě výsledku

genetické analýzy a literárních údajů byl vysazen cyklosporin a zahájena léčba syntetickým koenzymem Q10, po čemž došlo cca do 2 měsíců k remisi onemocnění (Bezdička et al., 2020). V současné době je dívka již přes dva roky v remisi, což dokazuje dlouhodobý příznivý vliv terapie syntetickým koenzymem Q10 u jedinců s mutací *COQ2* a podtrhuje klinický význam vyšetřování genetické příčiny SRNS umožňující indikovat cílenou individualizovanou léčbu.

11.1.4 Závěry studie 1

Studie 1 zkoumající přínos dvoustupňového cíleného molekulárně genetického vyšetření longitudinálně sbírané kohorty českých a slovenských dětí se SRNS ukázala podobný záchyt kauzálních variant jako v předchozích evropských studiích, tj. cca u 40 % případů. Nejčastěji mutovanými geny byly *NPHS2* kódující podocin a *WT1* kódující transkripční faktor WT1. Třetím nejčastěji mutovaným genem v naší populaci byl gen *NUP93*, jehož produkt reguluje transport biomolekul přes jadernou membránu a je důležitý pro přežívání podocytů za nepříznivých extracelulárních podmínek. Kombinace Sangerova přímého sekvenování a cíleného NGS panelu genů se jeví jako časově i finančně optimální vyšetřovací postup, který pomáhá objasnit genetickou příčinu SRNS u 4/10 nemocných dětí, předurčit jejich prognózu a potencionálně též otevírá možnosti k budoucí individualizované léčbě „šité na míru“ konkrétního pacienta.

11.2 Diskuze ke studii 2

11.2.1 Analýza vazebné afinity mutantů WT1 k cílové DNA sekvenci

Patogenní varianty genu *WT1* byly druhou nejčastější příčinou genetického SRNS u českých a slovenských dětí. Gen *WT1* kóduje transkripční faktor WT1, který je klíčový pro vývoj urogenitálního traktu (Stark et al., 1994; Essafi et al., 2011; Lipska et al., 2014). Přestože je jedním z nejčastějších příčin SRNS, není doposud známa molekulární podstata onemocnění a neexistuje práce, která by se zabývala tím, jak přesně jednotlivé kauzální varianty ovlivňují aktivitu přepisovaného transkripčního faktoru. Vazba transkripčního faktoru WT1 skrze 4 jeho zinkové prsty a hledání cílové DNA sekvence bylo zkoumáno již před lety, kdy byla objevena sekvence EGR1 (GCGGGGGCG) (Stoll et al., 2007; Rauscher et al., 1990). Tato sekvence je pojmenovaná po jiném transkripčním faktoru, který má 3 homologní zinkové prsty s WT1 proteinem a lze ji nalézt v regulačních oblastech mnoha genů, jejichž expresi tak

WT1 řídí (Ullmark et al., 2018; Dong et al., 2015; Kann et al., 2015). Pomocí originální funkční studie jsme zjistili, že mutace v oblasti kódující druhý a třetí „zinkový prst“ proteinu WT1, tedy domény umožňující vazbu na DNA, měly oproti našemu očekávání velmi variabilní vliv na vazebnou afinitu k cílové DNA doméně EGR1.

Tři mutantní formy WT1 (p.Arg439Pro, p.His450Arg, p.Arg463Ter) v naší studii vykazovaly snížení vazebné afinity k cílové DNA. Bylo prokázáno, že snížená vazebná afinita WT1 proteinu k cílové DNA vede k redukci faktoru WNT4, který se během vývoje ledvin účastní přeměny mezenchymální tkáně na tkáň epiteliální (Stark et al., 1994; Essafi et al., 2011). Během tohoto procesu dochází ke vzniku ledvinového epitelu a později nefronů z metanefrického mezenchymu a ureterického pupene (Stark et al., 1994). Exprese WT1 v metanefrickém mezenchymu vývojově předchází expresi WNT4 a gen *WNT4* obsahuje specifické vazebné místo pro WT1 (Essafi et al., 2011). Při vyřazení genu *WT1* v myších embryonálních ledvinových mezenchymálních buňkách dochází ke ztrátě exprese WNT4 (Essafi et al., 2011). V jiné studii se u myších embryí s vyřazeným *WT1* nevyvinuly ledviny, gonády a slezina, a plody odumřely v polovině březosti v důsledku selhání koronárního oběhu (Kreidberg et al., 1993). U modelu transgenní dospělé myši se specificky indukovaným vyřazením *WT1* v podocytech skrze doxycyklin se objevila albuminurie, FSGS a rozpad podocytárních buněk spojený se ztrátou nefrinu a podocalyxinu, proteinů glomerulární filtrační membrány (Gebeshuber et al., 2013; Chau et al., 2011). Zmenšené ledviny s poškozením podocytů, porušeným vývojem glomerulární filtrační membrány a s edémem perikardia byly pozorovány u embrya dávia pruhovaného, u kterého byl vyřazen ortolog genu *WT1*. Při současné injekci *WT1* mRNA došlo u těchto embryí k fyziologickému vývoji ledvin, naopak při současné injekci *WT1* mRNA obsahující patogenní variantu bylo postižení podobné jako u embryí s vyřazeným *WT1* ortologem (Hall et al., 2015). Studie dále potvrdila, že linie buněk HEK293 s patogenní exonovou variantou ve *WT1* má sníženou expresi strukturních podocytárních proteinů nefrinu a synaptopodinu (Hall et al., 2015). Všechny tyto studie podporují hypotézu, že naše WT1 mutantní formy se sníženou vazebnou afinitou k DNA mají velmi pravděpodobně negativní vliv na vývoj ledvin a jsou tak příčinou onemocnění.

U tří dalších mutovaných WT1 proteinů (p.Gln447Pro, p.Asp469Asn a p.His474Arg) byla zjištěna zvýšená vazebná afinita k cílové DNA oproti wild type proteinu. Ze studií je známo, že injekce myších myeloblastických leukemických buněk s vloženým genem *WT1* do myši ukázala sníženou onkogenezi oproti leukemickým buňkám bez vloženého *WT1* (Smith et al., 2000). Transkripční faktor WT1 navíc indukoval apoptózu buněk primárního osteosarkomu skrze aktivaci proapoptotického genu *Bak* (Loeb, 2006). Na druhou stranu zvýšená exprese WT1 byla pozorována u nefroblastomu, rakoviny prsu či tlustého střeva nebo u akutní myeloidní leukémie (Ullmark et al., 2018; Koesters et al., 2004). Tyto studie ukazují, že WT1 může být tumor supresorem nebo onkogenem podle koncentrace, v jaké se v organismu vyskytuje, nebo podle vlivu okolního prostředí. Za normálních okolností je WT1 stěžejním diferenciačním působkem ledvinových podocytů, zatímco aktivační mutací způsobená zvýšená transkripční aktivita může naopak vyvolat podocytární poškození. Bohužel neexistuje jediná studie, která by zkoumala vliv zvýšené exprese WT1 na vývoj ledvin a podpořila tak tuto hypotézu.

Luciferázová esej ukázala, že mutovaná forma WT1 s nejnižší (p.His450Arg) i nejvyšší (p.Gln447Pro) vazebnou afinitou obě zvyšují genovou expresi *ACTN1* v porovnání s wild type WT1 proteinem. Genová transkripce v eukaryotických organismech je zprostředkována komplexním RNA polymerázovým mechanismem, který je řízen kombinatorem navázáním vícero (stimulačních i inhibičních) transkripčních faktorů, přičemž se navíc uplatňují i jejich konformační změny (Reményi et al., 2004; He et al., 2014). Snížení ani zvýšení vazebné afinity mutantního proteinu WT1 tak nemusí jednoznačně predikovat konkrétní změnu v expresi jednotlivých cílových genů. Vazebná analýza je tak sice zajímavým poznatkem z oblasti bazálního výzkumu, efekt variant *WT1* na změnu buněčné funkce bude však nutné testovat pokročilejšími masivními paralelními metodami jako je např. analýza transkriptomu pomocí sekvenace RNA.

Dva poslední studované mutované proteiny WT1 (p.Cys433Tyr and p.Arg467Trp) nevykazovaly žádnou signifikantní změnu vazebné afinity oproti wild type proteinu. Obě tyto varianty byly již dříve popsány v asociaci se syndromickým (Denys-Drashův syndrom) i izolovaným SRNS (Pelletier et al., 1991b; Clarkson et al., 1993b). Existují dvě hlavní izoformy proteinu WT1. První z nich je izoforma „KTS minus“, která je transkripčním

faktorem testovaným v této práci (Ullmark et al., 2018). Druhá izoforma „KTS plus“ obsahuje inzerci lyzinu (K), threoninu (T) a serinu (S) mezi třetím a čtvrtým zinkovým prstem proteinu WT1. Tato inzerce způsobuje flexibilnější konformaci zinkových prstů, kdy čtvrtý zinkový prst se hůře váže k cílové DNA a tím je také snížena vazebná afinita oproti „KTS minus“ izoformě (Ullmark et al., 2018). Předpokládá se, že WT1 „KTS plus“ interaguje s RNA vazebnými proteiny a ovlivňuje sestřih mRNA nebo její stabilitu (Ullmark et al., 2018; Bharathavikru et al., 2017). Vzhledem k tomu, že jsme testovali pouze WT1 „KTS minus“ protein, nemůžeme vyloučit, že stejné mutace WT1 v „KTS plus“ izoformě nepůsobí epigenetickým či jiným mechanismem, který jsme našimi analýzami nemohli zachytit. Dalším možným vysvětlením může být interakce transkripčního faktoru WT1 s kofaktory (např. p53, STAT3, BASP1), které modulují jeho aktivitu (Ullmark et al., 2018; Toska and Roberts, 2014). Pokud by výše uvedené *WT1* varianty ovlivňovaly vazebné místo pro kofaktory (a nikoliv vazebné místo pro DNA), mohlo by dojít ke změně transkripční aktivity bez odezvy v afinitě k cílové DNA. Přestože je SRNS považován za monogenní onemocnění, mohou existovat varianty nebo polymorfismy WT1 kofaktorů, které regulují transkripční aktivitu WT1 proteinu, obdobně jako tomu je u polygenních onemocnění, například u atypického hemolyticko - uremického syndromu (Štolbová et al., 2020).

11.2.2 Lze odlišit SRNS způsobený mutacemi *WT1* od ostatních monogenních forem?

Izolovaná forma SRNS u pacientů s mutovaným *WT1* byla v naší studii zjištěna pouze u 3/9 pacientů (33 %) a jednalo se výhradně o dívky. Podobně tomu bylo i v doposud nejrozsáhlejší studii jedinců se SRNS způsobeným patogenními variantami *WT1* genu (17/61 případů, tedy 28 %, se prezentovalo jako izolovaný SRNS a jednalo se pouze o dívky) (Lipska et al., 2014). Častěji mají jedinci se SRNS způsobeným mutacemi ve *WT1* další přidružené projevy, např. nefroblastom, tumor varlat či vaječnicků a poruchy pohlavního vývoje. Jedná se o Denys-Drashův syndrom (Roca et al., 2019). Úplná absence funkčního WT1 byla sledována u několika typů nefroblastomů, v nichž vzájemně docházelo buď ke zvýšení nebo snížení aktivity faktorů podílejících se na raném vzniku ledvin (např. IGF2, Wnt signalizace). Patogenní varianty genu *WT1* způsobující nefunkčnost transkripčního faktoru by tedy pravděpodobně mohly být jednou ze specifických příčin vzniku tohoto typu tumorů u pacientů se SRNS. Proti této hypotéze však hovoří existence více než 40 genů, jejichž defekty mohou být dle literatury asociovány se vznikem nefroblastomů či gonadálních tumorů (Treger et al., 2019). Změny funkce proteinu WT1 nebo jeho ztráta tedy nelze považovat za jediný

specifický mechanismus vedoucí ke vzniku těchto tumorů. Pokud se ale zaměříme na geny asociované se SRNS, tak urogenitální tumory nebyly identifikovány u žádných jiných monogenních příčin SRNS a jsou výhradně asociovány s variantami v genu *WT1* (Bierzynska et al., 2017). Transkripční faktor WT1 reguluje vývojové faktory DAX1 a SF1 uplatňující se při vzniku varlat a vaječníků (Kim et al., 1999; Wilhelm and Englert, 2002). Významná role WT1 byla experimentálně potvrzena u transgenních myších embryí s homozygotní patogenní variantou v genu *WT1*, u nichž byla pozorována porucha gonadálního vývoje (Kreidberg et al., 1993). Snížená transkripční aktivita WT1 tedy může vést k poruchám vývoje varlat i vaječníků skrze regulaci faktorů DAX1 a SF1. Naše výsledky a výše uvedené práce potvrzují, že patogenní varianty *WT1* genu jsou kromě SRNS často asociovány i s dalšími zdravotními projevy a podtrhují důležitou roli WT1 ve vývoji urogenitální soustavy.

Zbylí tři pacienti měli kromě SRNS ještě postižení dalších tkání (mimo ledviny), konkrétně dva pacienti měli stenózu plicní tepny a zbývající jedinec měl rozštěp skrota s hypospadií. Stenóza plicnice je u pacientů s *WT1* nefropatií unikátním nálezem. Během vývoje srdce dochází k vycestování buněk epikardu do myokardu a k jejich přeměně na kardiovaskulární progenitorové buňky, které jsou schopny se diferencovat v buňky hladkého svalstva koronární stěny, endoteliální buňky, perivaskulární a srdeční intersticiální fibroblasty nebo kardiomyocyty (Martínez-Estrada et al., 2010; Thiery et al., 2009). Snail faktor, který aktivuje proces přeměny epiteliální tkáně v tkáň mezenchymální, je regulován transkripčním faktorem WT1 (Martínez-Estrada et al., 2010). Množství snail faktoru je v epikardiálních buňkách s vyřazeným *WT1* sníženo (Martínez-Estrada et al., 2010). Další studie ukázala, že WT1 společně s korepresorem BASP1 brání spuštění opačného procesu (přeměna mezenchymální tkáně ve tkáň epiteliální – proces typický pro vývoj ledvin) inhibicí aktivátoru WNT4 v epikardiálních buňkách (Essafi et al., 2011; Costantini and Kopan, 2010). Na základě těchto studií se dá říci, že patogenní varianty ve *WT1* mohou v určité fázi embryonálního vývoje způsobit vrozené srdeční vady kvůli sníženému počtu kardiovaskulárních progenitorových buněk. Třetí pacient, u kterého byla diagnostikována hypospadiie a rozštěp skrota, zemřel 2 týdny po manifestaci onemocnění ve věku pouhých 3 týdnů. Lze spekulovat, zda se nejednalo o další případ Denys-Drashova syndromu, neboť nefroblastom (důležitý znak tohoto syndromu) se může vyvinout i měsíce po manifestaci SRNS (Roca et al., 2019). Při porovnání SRNS asociovaného s mutacemi ve *WT1* s ostatními monogenními příčinami SRNS jsme nenašli statisticky významný rozdíl v míře proteinurie, výskytu otoků či hypertenze v době

manifestace onemocnění. Hypertenze se naproti tomu vyskytovala častěji u pacientů s patogenními variantami *WT1* genu v porovnání s ostatními pacienty se SRNS způsobeným jinými geny ve studii autorů Lipska et al. (39 % vs. 15,5 %, $p < 0,001$) (Lipska et al., 2014). Náš odlišný výsledek může být důsledkem značně menší skupiny pacientů s *WT1* variantami a omezením na studium variant v exonech 8 a 9 (Lipska et al. vyšetřovali všechny exony a introny *WT1*).

11.2.3 Závěry studie 2

Funkční studie ukázala, že patogenní varianty v exonech 8 a 9 transkripčního faktoru WT1 mají variabilní vliv na vazebnou afinitu k cílové DNA doméně EGR1. Zároveň jsme zjistili, že zvýšená i snížená vazebná afinita vede ke zvýšené expresi cílového genu *ACTN1*, tedy že směr změny nemusí přímo korelovat se změnou exprese cílových genů. Vazebná analýza je tak sice zajímavým poznatkem z oblasti bazálního výzkumu, efekt variant *WT1* na změnu buněčné funkce bude však nutné testovat pokročilejšími masivními paralelními metodami jako je např. analýza transkriptomu pomocí sekvenace RNA. Pacienti s *WT1* variantami se dle naší studie neliší v základních klinických znacích oproti jiným monogenním příčinám SRNS, avšak častěji je u nich SRNS asociován s dalšími ledvinnými i neledvinnými projevy. Kombinace výsledků experimentální, klinické části a poznatků z literatury značí, že WT1 má komplexní vliv na urogenitální vývoj a pro pochopení mechanismu patogeneze vzniku onemocnění je třeba pokračovat ve výzkumu, který by pomohl odhalit signální dráhy ovlivněné mutantními formami WT1 proteinu.

11.3 Lze odlišit SRNS a SSNS pomocí příznaků při manifestaci onemocnění?

Původním cílem bylo analyzovat rozdíly v transkriptomu podocytů kultivovaných se séry nově manifestovaných pacientů se SRNS a SSNS, ale z důvodu neočekávaně malého počtu vzorků dětí se SRNS nebylo možné tento projekt včas dokončit. Proto jsme se rozhodli otestovat vybraná dostupná klinická data sesbíraná z naší historické kohorty pacientů. Míra proteinurie, přítomnost otoků ani výskyt hypertenze se mezi pacienty se SRNS a SSNS nelišil. Výskyt hypertenze se mezi pacienty se SRNS a SSNS statisticky významně nelišil ani v americké studii porovávající klinické rozdíly těchto dvou skupin (1/7 SSNS x 6/9 SRNS, $p = 0,06$) (Shatat et al., 2007). Z dalších studií vyplývá, že nejsilnějším rizikovým faktorem pro výskyt hypertenze u jedinců s NS je pozitivní rodinná anamnéza (73 – 88 % SSNS pacientů s historií hypertenze v rodině) (Keshri et al., 2018; Kontchou et al., 2009). Hypertenzi tak nelze pokládat za specifický znak NS a nemá smysl ho zvažovat jako prediktivní faktor terapeutické odpovědi na glukokortikoidy. Problematika výskytu otoků a míry nefrotické proteinurie u pacientů se SRNS a SSNS a případné rozdíly mezi nimi nejsou v literatuře diskutovány. Limitací naší studie je nedostupnost porovnávaných znaků u části pacientů, především kvůli nejednotnému sběru dat a absenci záznamů u nejstarších pacientů. První zařazení pacienti mají často neúplná a již nedohledatelná klinická či laboratorní data, což snižuje význam statistických analýz.

12. Závěr

Kombinací klasického sekvenování a následně cíleného NGS panelu genů jsme objasnili genetickou příčinu u 4/10 českých a slovenských dětí se SRNS, jejichž vzorky byly sbírány po dobu 18 let. Zvolený dvoukrokový vyšetřovací postup je časově i finančně efektivnější než použití pouze jedné z metod. Podíl geneticky potvrzených případů SRNS klesá s rostoucím věkem při manifestaci onemocnění a poměrné (nebo výhradní) zastoupení nejmladších dětí v konkrétní studii může významně ovlivnit nejen procento pozitivních nálezů ale také poměrné zastoupení jednotlivých kauzálních genů. Překvapivým výsledkem byl nález v jiných evropských studiích raritní *NUP93*, který byl třetím nejčastěji mutovaným genem a ukazuje na možnost efektu zakladatele. Genetické vyšetření pomáhá mimo jiné předurčit prognózu onemocnění a zatím výjimečně lze na jeho základě indikovat cílenou léčbu. Z dostupných dat se nám nepodařilo nalézt vhodný prediktor, který by odlišil genetickou a negenetickou formu SRNS již při manifestaci onemocnění.

V naší originální funkční studii jsme pozorovali významné změny v afinitě mutantních forem *WT1* k cílové DNA. Změna vazebné afinity však nekorelovala se změnou exprese v cílovém genu. Vazebná analýza je tedy zajímavým poznatkem z oblasti bazálního výzkumu, efekt variant *WT1* na změnu buněčné funkce bude však nutné testovat komplexněji (v porovnání se zjišťováním exprese jednoho či několika vybraných cílových genů), např. pokročilejšími masivními paralelními metodami jako je analýza transkriptomu pomocí sekvenace RNA. Naše výsledky nás tak směřují k novému cíli, kterým je objasnění patogeneze SRNS u pacientů s *WT1* variantami pomocí zkoumání jejich vlivu na změny exprese celých funkčních signálních drah. U pacientů s *WT1* variantami sice nebyl odhalen rozdílný klinický nebo laboratorní ukazatel oproti jiným genetickým příčinám SRNS, avšak přidružené urogenitální a extrarenální projevy tyto pacienty odlišuje a dělá z nich velmi zajímavé kandidáty navazujícího výzkumu.

Nepodařilo se nám nalézt klinický či laboratorní ukazatel, který by již při manifestaci onemocnění předpověděl odpověď na terapii glukokortikoidy. Odhalení takového ukazatele by pomohlo volit efektivnější léčbu v podobě imunosupresiv „druhé volby“ a naopak ušetřit významnou část pacientů závažných nežádoucích účinků terapie glukokortikoidy. Cíli dalšího výzkumu jsou odhalení molekulární podstaty onemocnění, které by otevřelo dveře k cílené individualizované léčbě šité pacientovi na míru. Jen tak lze dosáhnout zlepšení prognózy a kvality života těchto dětí.

13. Souhrn

Molekulárně genetické vyšetření jedinců se SRNS nám pomohlo odhalit prevalenci genetického SRNS u českých a slovenských dětí. Z výsledků vyplývá, že prvním krokem genetické analýzy příčin SRNS u českých a slovenských dětí by mělo být klasické sekvenování nejčastěji mutovaných genů *NPHS2*, *WT1* a *NUP93*. Druhým krokem je pak NGS cílený na všechny ostatní geny asociované se SRNS. Analýza vyžaduje expertní tým se zkušenostmi v genetice SRNS. Bohužel u 6/10 pacientů zůstává příčina SRNS neznámá. Kromě věku nelze z běžných klinických a laboratorních parametrů zatím určit, kdo bude mít genetický nález a tedy horší prognózu onemocnění.

Analýza vazebné afinity mutovaných forem *WT1* k cílové DNA doméně *EGR1* ukázala, že změny neasociují se změnou exprese cílového genu. Masivní paralelní sekvenační a další metody budou třeba k in vitro analýze funkčních změn podocytů s indukovanými genovými variantami nalezenými u jedinců se SRNS. Pacienti se SRNS způsobeným patogenními variantami *WT1* genu mají kromě SRNS často i další zdravotní projevy a dokazují tak význam *WT1* pro vývoj vícero orgánových systémů.

V současné době není k dispozici ukazatel, který by u dětí s NS předpověděl odpověď na terapii glukokortikoidy a ušetřil by tak významnou část z nich nežádoucích účinků této léčby. Pro zlepšení péče, prognózy a kvality života dětí s NS je třeba další výzkum cílit právě na odhalení časných prediktorů rezistence ke glukokortikoidům a na objasnění molekulární podstaty onemocnění. To může pootevřít dveře k vývoji nové specifické léčby šité pacientovi na míru.

14. Summary

Molecular genetic analysis of patients with SRNS revealed the prevalence of genetic SRNS in Czech and Slovak children. Our results showed that the standard genetic examination of monogenic SRNS should start with the Sanger sequencing of the most causative genes *NPHS2*, *WT1* and *NUP93*. The second step shall be NGS targeted to all known genes associated with SRNS. Despite this effort, unfortunately, 6/10 patients remain unelucidated. Besides the known association between age and decreasing probability to identify monogenic cause of SRNS, there is probably no single clinical or laboratory parameter that could predict whether the patient will have positive genetic testing.

The change in binding affinity of mutated WT1 proteins to the target EGR1 DNA domain doesn't necessarily predict the change in selected target gene expression. Other methods such as massive parallel RNA sequencing may be needed to elucidate the effect of WT1 mutants on the function of the podocytes. Patients with SRNS caused by pathogenic variants of *WT1* often suffer from other renal and extrarenal health issues, which proves the significance of WT1 in the development of multiple organs.

There is currently no validated measure or parameter that could predict the response to standard initial few-weeks-long glucocorticoid treatment in children with nephrotic syndrome and prevent them from serious adverse effects of the treatment. It is necessary to continue to search for a predictor of glucocorticoid treatment resistance and to reveal the molecular mechanism of the disease to improve patient care, prognosis and their quality of life. If successful, it may potentially open up for a new strategies allowing for disease-specific individualised treatment.

15. Seznam literatury

- Abrantes, M. M., L. S. Cardoso, E. M. Lima, J. M. Penido Silva, J. S. Diniz, E. A. Bambirra, and E. A. Oliveira. 2006. 'Predictive factors of chronic kidney disease in primary focal segmental glomerulosclerosis', *Pediatr Nephrol*, 21: 1003-12. doi:10.1007/s00467-006-0138-y
- Acosta, M. J., L. Vazquez Fonseca, M. A. Desbats, C. Cerqua, R. Zordan, E. Trevisson, and L. Salviati. 2016. 'Coenzyme Q biosynthesis in health and disease', *Biochim Biophys Acta*, 1857: 1079-85. doi:10.1016/j.bbabi.2016.03.036
- Al-Hamed, M. H., E. Al-Sabban, H. Al-Mojalli, N. Al-Harbi, E. Faqeih, H. Al Shaya, K. Alhasan, S. Al-Hissi, M. Rajab, N. Edwards, A. Al-Abbad, I. Al-Hassoun, J. A. Sayer, and B. F. Meyer. 2013. 'A molecular genetic analysis of childhood nephrotic syndrome in a cohort of Saudi Arabian families', *J Hum Genet*, 58: 480-9. doi:10.1038/jhg.2013.27
- Andolino, T. P., and J. Reid-Adam. 2015. 'Nephrotic syndrome', *Pediatr Rev*, 36: 117-25; quiz 26, 29. doi:10.1542/pir.36-3-117
- Archer, C. R., B. T. Enslow, C. M. Carver, and J. D. Stockand. 2020. 'Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate directly interacts with the β and γ subunits of the sodium channel ENaC', *J Biol Chem*, 295: 7958-69. doi:10.1074/jbc.RA120.012606
- Ashraf, S., H. Y. Gee, S. Woerner, L. X. Xie, V. Vega-Warner, S. Lovric, H. Fang, X. Song, D. C. Cattran, C. Avila-Casado, A. D. Paterson, P. Nitschké, C. Bole-Feysot, P. Cochat, J. Esteve-Rudd, B. Haberberger, S. J. Allen, W. Zhou, R. Airik, E. A. Otto, M. Barua, M. H. Al-Hamed, J. A. Kari, J. Evans, A. Bierzynska, M. A. Saleem, D. Böckenhauer, R. Kleta, S. El Desoky, D. O. Hacıhamdioglu, F. Gok, J. Washburn, R. C. Wiggins, M. Choi, R. P. Lifton, S. Levy, Z. Han, L. Salviati, H. Prokisch, D. S. Williams, M. Pollak, C. F. Clarke, Y. Pei, C. Antignac, and F. Hildebrandt. 2013. 'ADCK4 mutations promote steroid-resistant nephrotic syndrome through CoQ10 biosynthesis disruption', *J Clin Invest*, 123: 5179-89. doi:10.1172/jci69000
- Ashraf, S., H. Kudo, J. Rao, A. Kikuchi, E. Widmeier, J. A. Lawson, W. Tan, T. Hermle, J. K. Warejko, S. Shril, M. Airik, T. Jobst-Schwan, S. Lovric, D. A. Braun, H. Y. Gee, D. Schapiro, A. J. Majmundar, C. E. Sadowski, W. L. Pabst, A. Daga, A. T. van der Ven, J. M. Schmidt, B. C. Low, A. B. Gupta, B. K. Tripathi, J. Wong, K. Campbell, K. Metcalfe, D. Schanze, T. Niihori, H. Kaito, K. Nozu, H. Tsukaguchi, R. Tanaka, K. Hamahira, Y. Kobayashi, T. Takizawa, R. Funayama, K. Nakayama, Y. Aoki, N. Kumagai, K. Iijima, H. Fehrenbach, J. A. Kari, S. El Desoky, S. Jalalah, R. Bogdanovic, N. Stajić, H. Zappel, A. Rakhmetova, S. R. Wassmer, T. Jungraithmayr, J. Strehlau, A. S. Kumar, A. Bagga, N. A. Soliman, S. M. Mane, L. Kaufman, D. R. Lowy, M. A. Jairajpuri, R. P. Lifton, Y. Pei, M. Zenker, S. Kure, and F. Hildebrandt. 2018. 'Mutations in six nephrosis genes delineate a pathogenic pathway amenable to treatment', *Nat Commun*, 9: 1960. doi:10.1038/s41467-018-04193-w
- Bakker, W. W., C. M. van Dael, L. J. Pierik, J. A. van Wijk, J. Nauta, T. Borghuis, and J. J. Kapoos. 2005. 'Altered activity of plasma hemopexin in patients with minimal change disease in relapse', *Pediatr Nephrol*, 20: 1410-5. doi:10.1007/s00467-005-1936-3
- Barboux, S., P. Niaudet, M. C. Gubler, J. P. Grünfeld, F. Jaubert, F. Kuttenn, C. N. Fekete, N. Souleyreau-Therville, E. Thibaud, M. Fellous, and K. McElreavey. 1997. 'Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome', *Nat Genet*. 1997 Dec;17(4):467-70.
- Barboux, S., P. Niaudet, M. C. Gubler, J. P. Grünfeld, F. Jaubert, F. Kuttenn, C. N. Fékété, N. Souleyreau-Therville, E. Thibaud, M. Fellous, and K. McElreavey. 1997. 'Donor

- splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome', *Nat Genet*, 17: 467-70. doi:10.1038/ng1297-467
- Barrera, L. A., A. Vedenko, J. V. Kurland, J. M. Rogers, S. S. Gisselbrecht, E. J. Rossin, J. Woodard, L. Mariani, K. H. Kock, S. Inukai, T. Siggers, L. Shokri, R. Gordân, N. Sahni, C. Cotsapas, T. Hao, S. Yi, M. Kellis, M. J. Daly, M. Vidal, D. E. Hill, and M. L. Bulyk. 2016. 'Survey of variation in human transcription factors reveals prevalent DNA binding changes', *Science*, 351: 1450-54. doi:10.1126/science.aad2257
- Barua, M., E. J. Brown, V. T. Charoonratana, G. Genovese, H. Sun, and M. R. Pollak. 2013. 'Mutations in the INF2 gene account for a significant proportion of familial but not sporadic focal and segmental glomerulosclerosis', *Kidney Int*, 83: 316-22. doi:10.1038/ki.2012.349
- Beltcheva, O., P. Martin, U. Lenkkeri, and K. Tryggvason. 2001. 'Mutation spectrum in the nephrin gene (NPHS1) in congenital nephrotic syndrome', *Hum Mutat*. 2001 May;17(5):368-73.
- Bérody, S., L. Heidet, O. Gribouval, J. Harambat, P. Niaudet, V. Baudouin, J. Bacchetta, B. Boudaille, M. Dehennault, L. de Parscau, O. Dunand, H. Flodrops, M. Fila, A. Garnier, F. Louillet, M. A. Macher, A. May, E. Merieau, F. Monceaux, C. Pietrement, C. Rousset-Rouvière, G. Roussey, S. Taque, J. Tenenbaum, T. Ulinski, R. Vieux, A. Zaloszczyk, V. Morinière, R. Salomon, and O. Boyer. 2019. 'Treatment and outcome of congenital nephrotic syndrome', *Nephrol Dial Transplant*, 34: 458-67. doi:10.1093/ndt/gfy015
- Bezdíčka, M., M. Dluholucký, O. Cinek, and J. Zieg. 2020. 'Successful maintenance of partial remission in a child with COQ2 nephropathy by coenzyme Q10 treatment', *Nephrology (Carlton)*, 25: 187-88. doi:10.1111/nep.13600
- Bezdíčka, M., Š Štolbová, T. Seeman, O. Cinek, M. Malina, N. Šimánková, Š Průhová, and J. Zieg. 2018. 'Genetic diagnosis of steroid-resistant nephrotic syndrome in a longitudinal collection of Czech and Slovak patients: a high proportion of causative variants in NUP93', *Pediatr Nephrol*, 33: 1347-63. doi:10.1007/s00467-018-3950-2
- Bharathavikru, R., T. Dudnakova, S. Aitken, J. Slight, M. Artibani, P. Hohenstein, D. Tollervey, and N. Hastie. 2017. 'Transcription factor Wilms' tumor 1 regulates developmental RNAs through 3' UTR interaction', *Genes Dev*, 31: 347-52. doi:10.1101/gad.291500.116
- Bierzynska, A., H. J. McCarthy, K. Soderquest, E. S. Sen, E. Colby, W. Y. Ding, M. M. Nabhan, L. Kerecuk, S. Hegde, D. Hughes, S. Marks, S. Feather, C. Jones, N. J. Webb, M. Ognjanovic, M. Christian, R. D. Gilbert, M. D. Sinha, G. M. Lord, M. Simpson, A. B. Koziell, G. I. Welsh, and M. A. Saleem. 2017. 'Genomic and clinical profiling of a national nephrotic syndrome cohort advocates a precision medicine approach to disease management', *Kidney Int*, 91: 937-47. doi:10.1016/j.kint.2016.10.013
- Bierzynska, A., and M. A. Saleem. 2018. 'Deriving and understanding the risk of post-transplant recurrence of nephrotic syndrome in the light of current molecular and genetic advances', *Pediatr Nephrol*, 33: 2027-35. doi:10.1007/s00467-017-3793-2
- Bouchireb, K., O. Boyer, O. Gribouval, F. Nevo, E. Huynh-Cong, V. Moriniere, R. Campait, E. Ars, D. Brackman, J. Dantal, P. Eckart, M. Gigante, B. S. Lipska, A. Liutkus, A. Megarbane, N. Mohsin, F. Ozaltin, M. A. Saleem, F. Schaefer, K. Soulami, R. Torra, N. Garcelon, G. Mollet, K. Dahan, and C. Antignac. 2014. 'NPHS2 mutations in steroid-resistant nephrotic syndrome: a mutation update and the associated phenotypic spectrum', *Hum Mutat*. 2014 Feb;35(2):178-86. doi: 10.1002/humu.22485. Epub 2013 Dec 9.

- Boute, N., O. Gribouval, S. Roselli, F. Benessy, H. Lee, A. Fuchshuber, K. Dahan, M. C. Gubler, P. Niaudet, and C. Antignac. 2000. 'NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome', *Nat Genet*, 24: 349-54. doi:10.1038/74166
- Braun, D. A., C. E. Sadowski, S. Kohl, S. Lovric, S. A. Astrinidis, W. L. Pabst, H. Y. Gee, S. Ashraf, J. A. Lawson, S. Shril, M. Airik, W. Tan, D. Schapiro, J. Rao, W. I. Choi, T. Hermle, M. J. Kemper, M. Pohl, F. Ozaltin, M. Konrad, R. Bogdanovic, R. Büscher, U. Helmchen, E. Serdaroglu, R. P. Lifton, W. Antonin, and F. Hildebrandt. 2016. 'Mutations in nuclear pore genes NUP93, NUP205 and XPO5 cause steroid-resistant nephrotic syndrome', *Nat Genet*, 48: 457-65. doi:10.1038/ng.3512
- Brown, E. J., J. S. Schlöndorff, D. J. Becker, H. Tsukaguchi, S. J. Tonna, A. L. Uscinski, H. N. Higgs, J. M. Henderson, and M. R. Pollak. 2010. 'Mutations in the formin gene INF2 cause focal segmental glomerulosclerosis', *Nat Genet*, 42: 72-6. doi:10.1038/ng.505
- Buscher, A. K., M. Konrad, M. Nagel, O. Witzke, A. Kribben, P. F. Hoyer, and S. Weber. 2012. 'Mutations in podocyte genes are a rare cause of primary FSGS associated with ESRD in adult patients', *Clin Nephrol*. 2012 Jul;78(1):47-53.
- Büscher, A. K., B. Kranz, R. Büscher, F. Hildebrandt, B. Dworniczak, P. Pennekamp, E. Kuwertz-Bröking, A. M. Wingen, U. John, M. Kemper, L. Monnens, P. F. Hoyer, S. Weber, and M. Konrad. 2010. 'Immunosuppression and renal outcome in congenital and pediatric steroid-resistant nephrotic syndrome', *Clin J Am Soc Nephrol*, 5: 2075-84. doi:10.2215/cjn.01190210
- Carter, T. C., and M. M. He. 2016. 'Challenges of Identifying Clinically Actionable Genetic Variants for Precision Medicine', *J Healthc Eng*, 2016. doi:10.1155/2016/3617572
- Clarkson, P. A., H. R. Davies, D. M. Williams, R. Chaudhary, I. A. Hughes, and M. N. Patterson. 1993a. 'Mutational screening of the Wilms's tumour gene, WT1, in males with genital abnormalities', *J Med Genet*. 1993 Sep;30(9):767-72.
- . 1993b. 'Mutational screening of the Wilms's tumour gene, WT1, in males with genital abnormalities', *J Med Genet*, 30: 767-72. doi:10.1136/jmg.30.9.767
- Clement, L. C., C. Avila-Casado, C. Macé, E. Soria, W. W. Bakker, S. Kersten, and S. S. Chugh. 2011. 'Podocyte-secreted angiopoietin-like-4 mediates proteinuria in glucocorticoid-sensitive nephrotic syndrome', *Nat Med*, 17: 117-22. doi:10.1038/nm.2261
- Colucci, M., G. Corpetti, F. Emma, and M. Vivarelli. 2018. 'Immunology of idiopathic nephrotic syndrome', *Pediatr Nephrol*, 33: 573-84. doi:10.1007/s00467-017-3677-5
- Costantini, F., and R. Kopan. 2010. 'Patterning a complex organ: branching morphogenesis and nephron segmentation in kidney development', *Dev Cell*, 18: 698-712. doi:10.1016/j.devcel.2010.04.008
- D'Agati, V. D., F. J. Kaskel, and R. J. Falk. 2011. 'Focal segmental glomerulosclerosis', *N Engl J Med*, 365: 2398-411. doi:10.1056/NEJMra1106556
- Diomedes-Camassei, F., S. Di Giandomenico, F. M. Santorelli, G. Caridi, F. Piemonte, G. Montini, G. M. Ghiggeri, L. Murer, L. Barisoni, A. Pastore, A. O. Muda, M. L. Valente, E. Bertini, and F. Emma. 2007. 'COQ2 nephropathy: a newly described inherited mitochondriopathy with primary renal involvement', *J Am Soc Nephrol*, 18: 2773-80. doi:10.1681/asn.2006080833
- Dogra, S., and F. Kaskel. 2017. 'Steroid-resistant nephrotic syndrome: a persistent challenge for pediatric nephrology', *Pediatr Nephrol*, 32: 965-74. doi:10.1007/s00467-016-3459-5
- Dong, L., S. Pietsch, Z. Tan, B. Perner, R. Sierig, D. Kruspe, M. Groth, R. Witzgall, H. J. Gröne, M. Platzer, and C. Englert. 2015. 'Integration of Cistromic and Transcriptomic

- Analyses Identifies Nphs2, Mafb, and Magi2 as Wilms' Tumor 1 Target Genes in Podocyte Differentiation and Maintenance', *J Am Soc Nephrol*, 26: 2118-28. doi:10.1681/asn.2014080819
- Dossier, C., N. Lapidus, F. Bayer, A. L. Sellier-Leclerc, O. Boyer, L. de Pontual, A. May, S. Nathanson, C. Orzechowski, T. Simon, F. Carrat, and G. Deschênes. 2016. 'Epidemiology of idiopathic nephrotic syndrome in children: endemic or epidemic?', *Pediatr Nephrol*, 31: 2299-308. doi:10.1007/s00467-016-3509-z
- Dostálková, A., F. Kaufman, I. Křížová, B. Vokatá, T. Ruml, and M. Rumlová. 2020. 'In Vitro Quantification of the Effects of IP6 and Other Small Polyanions on Immature HIV-1 Particle Assembly and Core Stability', *J Virol*, 94. doi:10.1128/jvi.00991-20
- Downie, M. L., C. Gallibois, R. S. Parekh, and D. G. Noone. 2017. 'Nephrotic syndrome in infants and children: pathophysiology and management', *Paediatr Int Child Health*, 37: 248-58. doi:10.1080/20469047.2017.1374003
- Essafi, A., A. Webb, R. L. Berry, J. Slight, S. F. Burn, L. Spraggon, V. Velecela, O. M. Martinez-Estrada, J. H. Wiltshire, S. G. Roberts, D. Brownstein, J. A. Davies, N. D. Hastie, and P. Hohenstein. 2011. 'A wt1-controlled chromatin switching mechanism underpins tissue-specific wnt4 activation and repression', *Dev Cell*, 21: 559-74. doi:10.1016/j.devcel.2011.07.014
- Fencl, F., M. Malina, V. Stará, J. Zieg, D. Mixová, T. Seeman, and K. Bláhová. 2012. 'Discordant expression of a new WT1 gene mutation in a family with monozygotic twins presenting with congenital nephrotic syndrome', *Eur J Pediatr*, 171: 121-4. doi:10.1007/s00431-011-1497-3
- Fine, R. N. 2007. 'Recurrence of nephrotic syndrome/focal segmental glomerulosclerosis following renal transplantation in children', *Pediatr Nephrol*, 22: 496-502. doi:10.1007/s00467-006-0361-6
- Fogo, A. B., M. A. Lusco, B. Najafian, and C. E. Alpers. 2015. 'AJKD Atlas of Renal Pathology: Diffuse Mesangial Sclerosis', *Am J Kidney Dis*, 66: e23-4. doi:10.1053/j.ajkd.2015.08.007
- Fornoni, A., J. Sageshima, C. Wei, S. Merscher-Gomez, R. Aguillon-Prada, A. N. Jauregui, J. Li, A. Mattiazzi, G. Ciancio, L. Chen, G. Zilleruelo, C. Abitbol, J. Chandar, W. Seeherunvong, C. Ricordi, M. Ikehata, M. P. Rastaldi, J. Reiser, and G. W. Burke, 3rd. 2011. 'Rituximab targets podocytes in recurrent focal segmental glomerulosclerosis', *Sci Transl Med*, 3: 85ra46. doi:10.1126/scitranslmed.3002231
- Füzik, T., P. Ulbrich, and T. Ruml. 2014. 'Efficient Mutagenesis Independent of Ligation (EMILI)', *J Microbiol Methods*, 106: 67-71. doi:10.1016/j.mimet.2014.08.003
- Garg, P. 2018. 'A Review of Podocyte Biology', *Am J Nephrol*, 47 Suppl 1: 3-13. doi:10.1159/000481633
- Gbadegesin, R. A., A. Adeyemo, N. J. Webb, L. A. Greenbaum, A. Abeyagunawardena, S. Thalagahagoda, A. Kale, D. Gipson, T. Srivastava, J. J. Lin, D. Chand, T. E. Hunley, P. D. Brophy, A. Bagga, A. Sinha, M. N. Rheault, J. Ghali, K. Nicholls, E. Abraham, H. S. Janjua, A. Omoloja, G. M. Barletta, Y. Cai, D. D. Milford, C. O'Brien, A. Awan, V. Belostotsky, W. E. Smoyer, A. Homstad, G. Hall, G. Wu, S. Nagaraj, D. Wigfall, J. Foreman, and M. P. Winn. 2015. 'HLA-DQA1 and PLCG2 Are Candidate Risk Loci for Childhood-Onset Steroid-Sensitive Nephrotic Syndrome', *J Am Soc Nephrol*, 26: 1701-10. doi:10.1681/asn.2014030247
- Gebeshuber, C. A., C. Kornauth, L. Dong, R. Sierig, J. Seibler, M. Reiss, S. Tauber, M. Bilban, S. Wang, R. Kain, G. A. Böhmig, M. J. Moeller, H. J. Gröne, C. Englert, J. Martinez, and D. Kerjaschki. 2013. 'Focal segmental glomerulosclerosis is induced by microRNA-193a and its downregulation of WT1', *Nat Med*, 19: 481-7. doi:10.1038/nm.3142

- Geier, Pavel. 2001. 'Nefrotický syndrom', *Pediatrics for Practice*, 2: 120-23
- Gipson, D. S., H. Chin, T. P. Presler, C. Jennette, M. E. Ferris, S. Massengill, K. Gibson, and D. B. Thomas. 2006. 'Differential risk of remission and ESRD in childhood FSGS', *Pediatr Nephrol*, 21: 344-9. doi:10.1007/s00467-005-2097-0
- Gipson, D. S., H. Trachtman, F. J. Kaskel, T. H. Greene, M. K. Radeva, J. J. Gassman, M. M. Moxey-Mims, R. J. Hogg, S. L. Watkins, R. N. Fine, S. L. Hogan, J. P. Middleton, V. M. Vehaskari, P. A. Flynn, L. M. Powell, S. M. Vento, J. L. McMahan, N. Siegel, V. D. D'Agati, and A. L. Friedman. 2011. 'Clinical trial of focal segmental glomerulosclerosis in children and young adults', *Kidney Int*, 80: 868-78. doi:10.1038/ki.2011.195
- Grahammer, F., C. Schell, and T. B. Huber. 2013. 'The podocyte slit diaphragm--from a thin grey line to a complex signalling hub', *Nat Rev Nephrol*, 9: 587-98. doi:10.1038/nrneph.2013.169
- Guaragna, M. S., A. C. Lutaif, C. S. Piveta, M. L. Souza, S. R. de Souza, T. B. Henriques, A. T. Maciel-Guerra, V. M. Belangero, G. Guerra-Junior, and M. P. De Mello. 2015. 'NPHS2 mutations account for only 15% of nephrotic syndrome cases', *BMC Med Genet*, 16: 88. doi:10.1186/s12881-015-0231-9
- Guimarães, F. T. L., R. N. Ferreira, G. E. A. Brito-Melo, E. Rocha-Vieira, W. F. Pereira, S. V. B. Pinheiro, A. S. Miranda, and E. Silva A. C. Simões. 2019. 'Pediatric Patients With Steroid-Sensitive Nephrotic Syndrome Have Higher Expression of T Regulatory Lymphocytes in Comparison to Steroid-Resistant Disease', *Front Pediatr*, 7: 114. doi:10.3389/fped.2019.00114
- Hahn, D., E. M. Hodson, N. S. Willis, and J. C. Craig. 2015. 'Corticosteroid therapy for nephrotic syndrome in children', *Cochrane Database Syst Rev*, 2015: Cd001533. doi:10.1002/14651858.CD001533.pub5
- Hall, G., R. A. Gbadegesin, P. Lavin, G. Wu, Y. Liu, E. C. Oh, L. Wang, R. F. Spurney, J. Eckel, T. Lindsey, A. Homstad, A. F. Malone, P. J. Phelan, A. Shaw, D. N. Howell, P. J. Conlon, N. Katsanis, and M. P. Winn. 2015. 'A novel missense mutation of Wilms' Tumor 1 causes autosomal dominant FSGS', *J Am Soc Nephrol*, 26: 831-43. doi:10.1681/asn.2013101053
- He, B., L. Ebarasi, Z. Zhao, J. Guo, J. R. Ojala, K. Hultenby, S. De Val, C. Betsholtz, and K. Tryggvason. 2014. 'Lmx1b and FoxC combinatorially regulate podocin expression in podocytes', *J Am Soc Nephrol*, 25: 2764-77. doi:10.1681/asn.2012080823
- Heeringa, S. F., C. N. Vlangos, G. Chernin, B. Hinkes, R. Gbadegesin, J. Liu, B. E. Hoskins, F. Ozaltin, and F. Hildebrandt. 2008. 'Thirteen novel NPHS1 mutations in a large cohort of children with congenital nephrotic syndrome', *Nephrol Dial Transplant*, 23: 3527-33. doi:10.1093/ndt/gfn271
- Helmerhorst, E., D. J. Chandler, M. Nussio, and C. D. Mamotte. 2012. 'Real-time and Label-free Bio-sensing of Molecular Interactions by Surface Plasmon Resonance: A Laboratory Medicine Perspective', *Clin Biochem Rev*, 33: 161-73
- Hinkes, B. G., B. Mucha, C. N. Vlangos, R. Gbadegesin, J. Liu, K. Hasselbacher, D. Hangan, F. Ozaltin, M. Zenker, and F. Hildebrandt. 2007. 'Nephrotic syndrome in the first year of life: two thirds of cases are caused by mutations in 4 genes (NPHS1, NPHS2, WT1, and LAMB2)', *Pediatrics*, 119: e907-19. doi:10.1542/peds.2006-2164
- Huber, T. B., M. Kottgen, B. Schilling, G. Walz, and T. Benzing. 2001. 'Interaction with podocin facilitates nephrin signaling', *J Biol Chem*, 276: 41543-6. doi:10.1074/jbc.C100452200
- Chau, Y. Y., D. Brownstein, H. Mjoseng, W. C. Lee, N. Buza-Vidas, C. Nerlov, S. E. Jacobsen, P. Perry, R. Berry, A. Thornburn, D. Sexton, N. Morton, P. Hohenstein, E. Freyer, K. Samuel, R. van't Hof, and N. Hastie. 2011. 'Acute multiple organ failure in

- adult mice deleted for the developmental regulator Wt1', *PLoS Genet*, 7: e1002404. doi:10.1371/journal.pgen.1002404
- Ilatovskaya, D. V., and A. Staruschenko. 2015. 'TRPC6 channel as an emerging determinant of the podocyte injury susceptibility in kidney diseases', *Am J Physiol Renal Physiol*, 309: F393-7. doi:10.1152/ajprenal.00186.2015
- Illumina. 2017. 'An introduction to Next-Generation Sequencing Technology', *Illumina, Inc.*
- Jerabek-Willemsen, M., C. J. Wienken, D. Braun, P. Baaske, and S. Duhr. 2011. 'Molecular interaction studies using microscale thermophoresis', *Assay Drug Dev Technol*, 9: 342-53. doi:10.1089/adt.2011.0380
- Jerabek-Willemsen, Moran, Timon André, Randy Wanner, Heide Marie Roth, Stefan Duhr, Philipp Baaske, and Dennis Breitsprecher. 2014. 'MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond', *Journal of Molecular Structure*, 1077: 101-13. doi:<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.03.009>
- Jiang, L., C. C. Hindmarch, M. Rogers, C. Campbell, C. Waterfall, J. Coghill, P. W. Mathieson, and G. I. Welsh. 2016. 'RNA sequencing analysis of human podocytes reveals glucocorticoid regulated gene networks targeting non-immune pathways', *Sci Rep*, 6: 35671. doi:10.1038/srep35671
- Kann, M., S. Ettou, Y. L. Jung, M. O. Lenz, M. E. Taglienti, P. J. Park, B. Schermer, T. Benzing, and J. A. Kreidberg. 2015. 'Genome-Wide Analysis of Wilms' Tumor 1-Controlled Gene Expression in Podocytes Reveals Key Regulatory Mechanisms', *J Am Soc Nephrol*, 26: 2097-104. doi:10.1681/asn.2014090940
- Karle, S. M., B. Uetz, V. Ronner, L. Glaeser, F. Hildebrandt, and A. Fuchshuber. 2002a. 'Novel mutations in NPHS2 detected in both familial and sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome', *J Am Soc Nephrol*. 2002 Feb;13(2):388-93.
- . 2002b. 'Novel mutations in NPHS2 detected in both familial and sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome', *J Am Soc Nephrol*, 13: 388-93. doi:10.1681/asn.V132388
- KDIGO., Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. 2012. 'Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease.', *Kidney inter.*, Suppl. 2013; 3: 1–150.
- Kemper, M. J., G. Wolf, and D. E. Müller-Wiefel. 2001. 'Transmission of glomerular permeability factor from a mother to her child', *N Engl J Med*, 344: 386-7. doi:10.1056/nejm200102013440517
- Keshri, S., S. Sharma, N. Agrawal, S. Bansal, B. P. Guillian, and K. C. Aggrawal. 2018. 'Hypertension and its severity in children with steroid sensitive nephrotic syndrome during remission', *Clin Exp Nephrol*, 22: 1157-62. doi:10.1007/s10157-018-1565-3
- Kestilä, M., U. Lenkkeri, M. Männikkö, J. Lamerdin, P. McCready, H. Putaala, V. Ruotsalainen, T. Morita, M. Nissinen, R. Herva, C. E. Kashtan, L. Peltonen, C. Holmberg, A. Olsen, and K. Tryggvason. 1998. 'Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome', *Mol Cell*, 1: 575-82. doi:10.1016/s1097-2765(00)80057-x
- Kim, J., D. Prawitt, N. Bardeesy, E. Torban, C. Vicaner, P. Goodyer, B. Zabel, and J. Pelletier. 1999. 'The Wilms' tumor suppressor gene (wt1) product regulates Dax-1 gene expression during gonadal differentiation', *Mol Cell Biol*, 19: 2289-99. doi:10.1128/mcb.19.3.2289
- Klamt, B., A. Koziell, F. Poulat, P. Wieacker, P. Scambler, P. Berta, and M. Gessler. 1998. 'Frasier syndrome is caused by defective alternative splicing of WT1 leading to an altered ratio of WT1 +/-KTS splice isoforms', *Hum Mol Genet*, 7: 709-14. doi:10.1093/hmg/7.4.709

- Kleinberger, J., K. A. Maloney, T. I. Pollin, and L. J. Jeng. 2016. 'An openly available online tool for implementing the ACMG/AMP standards and guidelines for the interpretation of sequence variants', *Genet Med*, 18: 1165. doi:10.1038/gim.2016.13
- Kodner, C. 2009. 'Nephrotic syndrome in adults: diagnosis and management', *Am Fam Physician*, 80: 1129-34
- Koesters, R., M. Linnebacher, J. F. Coy, A. Germann, Y. Schwitalle, P. Findeisen, and M. von Knebel Doeberitz. 2004. 'WT1 is a tumor-associated antigen in colon cancer that can be recognized by in vitro stimulated cytotoxic T cells', *Int J Cancer*, 109: 385-92. doi:10.1002/ijc.11721
- Kolíško, M. 2017. 'Moderní metody sekvenování DNA', *Nakladatelství Academia, SSČ AV ČR*
- Kontchou, L. M., G. Liccioli, and I. Pela. 2009. 'Blood pressure in children with minimal change nephrotic syndrome during oedema and after steroid therapy: the influence of familial essential hypertension', *Kidney Blood Press Res*, 32: 258-62. doi:10.1159/000238823
- Koskimies, O., J. Vilska, J. Rapola, and N. Hallman. 1982. 'Long-term outcome of primary nephrotic syndrome', *Arch Dis Child*, 57: 544-8. doi:10.1136/adc.57.7.544
- Koziell, A., V. Grech, S. Hussain, G. Lee, U. Lenkkeri, K. Tryggvason, and P. Scambler. 2002. 'Genotype/phenotype correlations of NPHS1 and NPHS2 mutations in nephrotic syndrome advocate a functional inter-relationship in glomerular filtration', *Hum Mol Genet*, 11: 379-88. doi:10.1093/hmg/11.4.379
- Krall, P., C. P. Canales, P. Kairath, P. Carmona-Mora, J. Molina, J. D. Carpio, P. Ruiz, S. A. Mezzano, J. Li, C. Wei, J. Reiser, J. I. Young, and K. Walz. 2010. 'Podocyte-specific overexpression of wild type or mutant *trpc6* in mice is sufficient to cause glomerular disease', *PLoS One*, 5: e12859. doi:10.1371/journal.pone.0012859
- Kreidberg, J. A., H. Sariola, J. M. Loring, M. Maeda, J. Pelletier, D. Housman, and R. Jaenisch. 1993. 'WT-1 is required for early kidney development', *Cell*, 74: 679-91. doi:10.1016/0092-8674(93)90515-r
- Laity, J. H., J. Chung, H. J. Dyson, and P. E. Wright. 2000. 'Alternative splicing of Wilms' tumor suppressor protein modulates DNA binding activity through isoform-specific DNA-induced conformational changes', *Biochemistry*, 39: 5341-8. doi:10.1021/bi9926678
- Lane, B. M., R. Cason, C. I. Esezobor, and R. A. Gbadegesin. 2019. 'Genetics of Childhood Steroid Sensitive Nephrotic Syndrome: An Update', *Front Pediatr*, 7: 8. doi:10.3389/fped.2019.00008
- Lemaire, M., V. Frémeaux-Bacchi, F. Schaefer, M. Choi, W. H. Tang, M. Le Quintrec, F. Fakhouri, S. Taque, F. Nobili, F. Martinez, W. Ji, J. D. Overton, S. M. Mane, G. Nürnberg, J. Altmüller, H. Thiele, D. Morin, G. Deschenes, V. Baudouin, B. Llanas, L. Collard, M. A. Majid, E. Simkova, P. Nürnberg, N. Rioux-Leclerc, G. W. Moeckel, M. C. Gubler, J. Hwa, C. Loirat, and R. P. Lifton. 2013. 'Recessive mutations in DGKE cause atypical hemolytic-uremic syndrome', *Nat Genet*, 45: 531-6. doi:10.1038/ng.2590
- Lenkkeri, U., M. Männikkö, P. McCready, J. Lamerdin, O. Gribouval, P. M. Niaudet, C. K. Antignac, C. E. Kashtan, C. Homberg, A. Olsen, M. Kestilä, and K. Tryggvason. 1999. 'Structure of the gene for congenital nephrotic syndrome of the finnish type (NPHS1) and characterization of mutations', *Am J Hum Genet*, 64: 51-61. doi:10.1086/302182
- Lennon, R., A. Singh, G. I. Welsh, R. J. Coward, S. Satchell, L. Ni, P. W. Mathieson, W. W. Bakker, and M. A. Saleem. 2008. 'Hemopexin induces nephrin-dependent

- reorganization of the actin cytoskeleton in podocytes', *J Am Soc Nephrol*, 19: 2140-9. doi:10.1681/asn.2007080940
- Li, J. S., X. Chen, L. Peng, S. Y. Wei, S. L. Zhao, T. T. Diao, Y. X. He, F. Liu, Q. J. Wei, Q. F. Zhang, and B. Li. 2015. 'Angiopoietin-Like-4, a Potential Target of Tacrolimus, Predicts Earlier Podocyte Injury in Minimal Change Disease', *PLoS One*, 10: e0137049. doi:10.1371/journal.pone.0137049
- Lipska, B. S., B. Ranchin, P. Iatropoulos, J. Gellermann, A. Melk, F. Ozaltin, G. Caridi, T. Seeman, K. Tory, A. Jankauskiene, A. Zurowska, M. Szczepanska, A. Wasilewska, J. Harambat, A. Trautmann, A. Peco-Antic, H. Borzecka, A. Moczulska, B. Saeed, R. Bogdanovic, M. Kalyoncu, E. Simkova, O. Erdogan, K. Vrljicak, A. Teixeira, M. Azocar, and F. Schaefer. 2014. 'Genotype-phenotype associations in WT1 glomerulopathy', *Kidney Int*, 85: 1169-78. doi:10.1038/ki.2013.519
- Loeb, D. M. 2006. 'WT1 influences apoptosis through transcriptional regulation of Bcl-2 family members', *Cell Cycle*, 5: 1249-53. doi:10.4161/cc.5.12.2807
- Lombel, R. M., D. S. Gipson, and E. M. Hodson. 2013. 'Treatment of steroid-sensitive nephrotic syndrome: new guidelines from KDIGO', *Pediatr Nephrol*, 28: 415-26. doi:10.1007/s00467-012-2310-x
- Lombel, R. M., E. M. Hodson, and D. S. Gipson. 2013. 'Treatment of steroid-resistant nephrotic syndrome in children: new guidelines from KDIGO', *Pediatr Nephrol*, 28: 409-14. doi:10.1007/s00467-012-2304-8
- Lu, Y., Y. Ye, W. Bao, Q. Yang, J. Wang, Z. Liu, and S. Shi. 2017. 'Genome-wide identification of genes essential for podocyte cytoskeletons based on single-cell RNA sequencing', *Kidney Int*, 92: 1119-29. doi:10.1016/j.kint.2017.04.022
- Maas, R. J., J. K. Deegens, and J. F. Wetzels. 2013. 'Serum suPAR in patients with FSGS: trash or treasure?', *Pediatr Nephrol*, 28: 1041-8. doi:10.1007/s00467-013-2452-5
- Martínez-Estrada, O. M., L. A. Lettice, A. Essafi, J. A. Guadix, J. Slight, V. Velecela, E. Hall, J. Reichmann, P. S. Devenney, P. Hohenstein, N. Hosen, R. E. Hill, R. Muñoz-Chapuli, and N. D. Hastie. 2010. 'Wt1 is required for cardiovascular progenitor cell formation through transcriptional control of Snail and E-cadherin', *Nat Genet*, 42: 89-93. doi:10.1038/ng.494
- McCarthy, E. T., M. Sharma, and V. J. Savin. 2010. 'Circulating permeability factors in idiopathic nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis', *Clin J Am Soc Nephrol*, 5: 2115-21. doi:10.2215/cjn.03800609
- McCarthy, H. J., A. Bierzynska, M. Wherlock, M. Ognjanovic, L. Kerecuk, S. Hegde, S. Feather, R. D. Gilbert, L. Krischock, C. Jones, M. D. Sinha, N. J. Webb, M. Christian, M. M. Williams, S. Marks, A. Koziell, G. I. Welsh, and M. A. Saleem. 2013. 'Simultaneous sequencing of 24 genes associated with steroid-resistant nephrotic syndrome', *Clin J Am Soc Nephrol*, 8: 637-48. doi:10.2215/cjn.07200712
- McIntosh, I., S. D. Dreyer, M. V. Clough, J. A. Dunston, W. Eyaid, C. M. Roig, T. Montgomery, S. Ala-Mello, I. Kaitila, A. Winterpacht, B. Zabel, M. Frydman, W. G. Cole, C. A. Francomano, and B. Lee. 1998. 'Mutation analysis of LMX1B gene in nail-patella syndrome patients', *Am J Hum Genet*, 63: 1651-8. doi:10.1086/302165
- McKinney, P. A., R. G. Feltbower, J. T. Brocklebank, and M. M. Fitzpatrick. 2001. 'Time trends and ethnic patterns of childhood nephrotic syndrome in Yorkshire, UK', *Pediatr Nephrol*, 16: 1040-4. doi:10.1007/s004670100021
- McMahon, A. P. 2016. 'Development of the Mammalian Kidney', *Curr Top Dev Biol*, 117: 31-64. doi:10.1016/bs.ctdb.2015.10.010
- Meng, X. M., X. R. Huang, J. Xiao, A. C. Chung, W. Qin, H. Y. Chen, and H. Y. Lan. 2012. 'Disruption of Smad4 impairs TGF- β /Smad3 and Smad7 transcriptional regulation

- during renal inflammation and fibrosis in vivo and in vitro', *Kidney Int*, 81: 266-79. doi:10.1038/ki.2011.327
- Mishra, O. P., B. Basu, S. K. Upadhyay, R. Prasad, and F. Schaefer. 2010. 'Behavioural abnormalities in children with nephrotic syndrome', *Nephrol Dial Transplant*, 25: 2537-41. doi:10.1093/ndt/gfq097
- Mueller, R. F. 1994. 'The Denys-Drash syndrome', *J Med Genet*, 31: 471-7. doi:10.1136/jmg.31.6.471
- Mucha, B., F. Ozaltin, B. G. Hinkes, K. Hasselbacher, R. G. Ruf, M. Schultheiss, D. Hangan, B. E. Hoskins, A. S. Everding, R. Bogdanovic, T. Seeman, B. Hoppe, and F. Hildebrandt. 2006. 'Mutations in the Wilms' tumor 1 gene cause isolated steroid resistant nephrotic syndrome and occur in exons 8 and 9', *Pediatr Res*, 59: 325-31. doi:10.1203/01.pdr.0000196717.94518.f0
- Mundel, P., J. Reiser, A. Zúñiga Mejía Borja, H. Pavenstädt, G. R. Davidson, W. Kriz, and R. Zeller. 1997. 'Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines', *Exp Cell Res*, 236: 248-58. doi:10.1006/excr.1997.3739
- Nagata, M. 2016. 'Podocyte injury and its consequences', *Kidney Int*, 89: 1221-30. doi:10.1016/j.kint.2016.01.012
- Narla, D., and A. Swiatecka-Urban. 2020. 'Therapeutic Response to Corticosteroids Remains a Valid Approach to Initial Management of Children With Idiopathic Nephrotic Syndrome', *Front Pediatr*, 8: 533. doi:10.3389/fped.2020.00533
- Ni, L., M. Saleem, and P. W. Mathieson. 2012. 'Podocyte culture: tricks of the trade', *Nephrology (Carlton)*, 17: 525-31. doi:10.1111/j.1440-1797.2012.01619.x
- Noone, D. G., K. Iijima, and R. Parekh. 2018. 'Idiopathic nephrotic syndrome in children', *Lancet*, 392: 61-74. doi:10.1016/s0140-6736(18)30536-1
- Nordenskjöld, A., E. Friedman, and M. Anvret. 1994. 'WT1 mutations in patients with Denys-Drash syndrome: a novel mutation in exon 8 and paternal allele origin', *Hum Genet*, 93: 115-20. doi:10.1007/bf00210593
- Noris, M., C. Mele, and G. Remuzzi. 2015. 'Podocyte dysfunction in atypical haemolytic uraemic syndrome', *Nat Rev Nephrol*, 11: 245-52. doi:10.1038/nrneph.2014.250
- Ostalska-Nowicka, D., J. Zachwieja, M. Nowicki, E. Kaczmarek, A. Siwińska, and M. Witt. 2007. 'Immunohistochemical detection of galectin-1 in renal biopsy specimens of children and its possible role in proteinuric glomerulopathies', *Histopathology*, 51: 468-76. doi:10.1111/j.1365-2559.2007.02818.x
- Ozaltin, F., B. Li, A. Rauhauser, S. W. An, O. Soylemezoglu, Gonul, II, E. Z. Taskiran, T. Ibsirlioglu, E. Korkmaz, Y. Bilginer, A. Duzova, S. Ozen, R. Topaloglu, N. Besbas, S. Ashraf, Y. Du, C. Liang, P. Chen, D. Lu, K. Vadnagara, S. Arbuckle, D. Lewis, B. Wakeland, R. J. Quigg, R. F. Ransom, E. K. Wakeland, M. K. Topham, N. G. Bazan, C. Mohan, F. Hildebrandt, A. Bakkaloglu, C. L. Huang, and M. Attanasio. 2013. 'DGKE variants cause a glomerular microangiopathy that mimics membranoproliferative GN', *J Am Soc Nephrol*, 24: 377-84. doi:10.1681/asn.2012090903
- Pelletier, J., W. Bruening, C. E. Kashtan, S. M. Mauer, J. C. Manivel, J. E. Striegel, D. C. Houghton, C. Junien, R. Habib, L. Fouser, and et al. 1991a. 'Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome', *Cell*. 1991 Oct 18;67(2):437-47.
- . 1991b. 'Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome', *Cell*, 67: 437-47. doi:10.1016/0092-8674(91)90194-4

- Preston, R., H. M. Stuart, and R. Lennon. 2019. 'Genetic testing in steroid-resistant nephrotic syndrome: why, who, when and how?', *Pediatr Nephrol*, 34: 195-210. doi:10.1007/s00467-017-3838-6
- Rauscher, F. J., 3rd, J. F. Morris, O. E. Tournay, D. M. Cook, and T. Curran. 1990. 'Binding of the Wilms' tumor locus zinc finger protein to the EGR-1 consensus sequence', *Science*, 250: 1259-62. doi:10.1126/science.2244209
- Ravani, P., A. Bonanni, R. Rossi, G. Caridi, and G. M. Ghiggeri. 2016. 'Anti-CD20 Antibodies for Idiopathic Nephrotic Syndrome in Children', *Clin J Am Soc Nephrol*, 11: 710-20. doi:10.2215/cjn.08500815
- Reményi, A., H. R. Schöler, and M. Wilmanns. 2004. 'Combinatorial control of gene expression', *Nat Struct Mol Biol*, 11: 812-5. doi:10.1038/nsmb820
- Richards, S., N. Aziz, S. Bale, D. Bick, S. Das, J. Gastier-Foster, W. W. Grody, M. Hegde, E. Lyon, E. Spector, K. Voelkerding, and H. L. Rehm. 2015. 'Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology', *Genet Med*, 17: 405-24. doi:10.1038/gim.2015.30
- Roca, N., M. Muñoz, A. Cruz, R. Vilalta, E. Lara, and G. Ariceta. 2019. 'Long-term outcome in a case series of Denys-Drash syndrome', *Clin Kidney J*, 12: 836-39. doi:10.1093/ckj/sfz022
- Roselli, S., L. Heidet, M. Sich, A. Henger, M. Kretzler, M. C. Gubler, and C. Antignac. 2004. 'Early glomerular filtration defect and severe renal disease in podocin-deficient mice', *Mol Cell Biol*, 24: 550-60. doi:10.1128/mcb.24.2.550-560.2004
- Sabban, S., H. Ye, and B. Helm. 2013. 'Development of an in vitro model system for studying the interaction of Equus caballus IgE with its high-affinity receptor FcεRI', *Vet Immunol Immunopathol*, 153: 10-6. doi:10.1016/j.vetimm.2013.01.008
- Sadowski, C. E., S. Lovric, S. Ashraf, W. L. Pabst, H. Y. Gee, S. Kohl, S. Engelmann, V. Vega-Warner, H. Fang, J. Halbritter, M. J. Somers, W. Tan, S. Shril, I. Fessi, R. P. Lifton, D. Bockenhauer, S. El-Desoky, J. A. Kari, M. Zenker, M. J. Kemper, D. Mueller, H. M. Fathy, N. A. Soliman, and F. Hildebrandt. 2015. 'A single-gene cause in 29.5% of cases of steroid-resistant nephrotic syndrome', *J Am Soc Nephrol*, 26: 1279-89. doi:10.1681/asn.2014050489
- Safarini, O. A., and J. Patel. 2020. 'Calcineurin Inhibitors.' in, *StatPearls* (StatPearls Publishing Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL))
- Saleem, M. A., M. J. O'Hare, J. Reiser, R. J. Coward, C. D. Inward, T. Farren, C. Y. Xing, L. Ni, P. W. Mathieson, and P. Mundel. 2002. 'A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression', *J Am Soc Nephrol*, 13: 630-8
- Santín, S., G. Bullich, B. Tazón-Vega, R. García-Maset, I. Giménez, I. Silva, P. Ruíz, J. Ballarín, R. Torra, and E. Ars. 2011. 'Clinical utility of genetic testing in children and adults with steroid-resistant nephrotic syndrome', *Clin J Am Soc Nephrol*, 6: 1139-48. doi:10.2215/cjn.05260610
- Savin, V. J., M. Sharma, J. Zhou, D. Gennoch, T. Fields, R. Sharma, E. T. McCarthy, T. Srivastava, J. Domen, A. Tormo, and J. F. Gauchat. 2015. 'Renal and Hematological Effects of CLCF-1, a B-Cell-Stimulating Cytokine of the IL-6 Family', *J Immunol Res*, 2015: 714964. doi:10.1155/2015/714964
- Shatat, I. F., M. Schoeneman, J. T. Flynn, and R. P. Woroniecki. 2007. 'Association of steroid and cyclosporin resistance in focal segmental glomerulosclerosis', *Pediatr Nephrol*, 22: 834-9. doi:10.1007/s00467-006-0413-y
- Shimizu, M., J. Khoshnoodi, Y. Akimoto, H. Kawakami, H. Hirano, E. Higashihara, M. Hosoyamada, Y. Sekine, R. Kurayama, H. Kurayama, K. Joh, J. Hirabayashi, K.

- Kasai, K., Tryggvason, N., Ito, and K. Yan. 2009. 'Expression of galectin-1, a new component of slit diaphragm, is altered in minimal change nephrotic syndrome', *Lab Invest*, 89: 178-95. doi:10.1038/labinvest.2008.125
- Schlöndorff, J., D. Del Camino, R. Carrasquillo, V. Lacey, and M. R. Pollak. 2009. 'TRPC6 mutations associated with focal segmental glomerulosclerosis cause constitutive activation of NFAT-dependent transcription', *Am J Physiol Cell Physiol*, 296: C558-69. doi:10.1152/ajpcell.00077.2008
- Schumacher, V., S. Schneider, A. Figge, G. Wildhardt, D. Harms, D. Schmidt, A. Weirich, R. Ludwig, and B. Royer-Pokora. 1997a. 'Correlation of germ-line mutations and two-hit inactivation of the WT1 gene with Wilms tumors of stromal-predominant histology', *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 15;94(8):3972-7.
- . 1997b. 'Correlation of germ-line mutations and two-hit inactivation of the WT1 gene with Wilms tumors of stromal-predominant histology', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 3972-7. doi:10.1073/pnas.94.8.3972
- Schwarz, K., M. Simons, J. Reiser, M. A. Saleem, C. Faul, W. Kriz, A. S. Shaw, L. B. Holzman, and P. Mundel. 2001. 'Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin', *J Clin Invest*, 108: 1621-9. doi:10.1172/jci12849
- Siji, A., K. N. Karthik, V. C. Pardeshi, P. S. Hari, and A. Vasudevan. 2018. 'Targeted gene panel for genetic testing of south Indian children with steroid resistant nephrotic syndrome', *BMC Med Genet*, 19: 200. doi:10.1186/s12881-018-0714-6
- Skálová, Sylva, and Jakub Zieg. 2017. 'Diagnostika a léčba nefrotického syndromu u dětí', *Urology for Practice*, 18: 105-08
- Smith, S. I., M. Down, A. W. Boyd, and C. L. Li. 2000. 'Expression of the Wilms' tumor suppressor gene, WT1, reduces the tumorigenicity of the leukemic cell line M1 in C.B-17 scid/scid mice', *Cancer Res*, 60: 808-14
- Stańczyk, M., I. Bałasz-Chmielewska, B. Lipska-Ziętkiewicz, and M. Tkaczyk. 2018. 'CoQ10-related sustained remission of proteinuria in a child with COQ6 glomerulopathy—a case report', *Pediatr Nephrol*, 33: 2383-87. doi:10.1007/s00467-018-4083-3
- Staples, A., R. LeBlond, S. Watkins, C. Wong, and J. Brandt. 2010. 'Validation of the revised Schwartz estimating equation in a predominantly non-CKD population', *Pediatr Nephrol*, 25: 2321-6. doi:10.1007/s00467-010-1598-7
- Stark, K., S. Vainio, G. Vassileva, and A. P. McMahon. 1994. 'Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4', *Nature*, 372: 679-83. doi:10.1038/372679a0
- Starr, M. C., I. J. Chang, L. S. Finn, A. Sun, A. A. Larson, J. Goebel, C. Hanevold, J. Thies, J. L. K. Van Hove, S. R. Hingorani, and C. Lam. 2018. 'COQ2 nephropathy: a treatable cause of nephrotic syndrome in children', *Pediatr Nephrol*, 33: 1257-61. doi:10.1007/s00467-018-3937-z
- Stenson, P. D., M. Mort, E. V. Ball, K. Evans, M. Hayden, S. Heywood, M. Hussain, A. D. Phillips, and D. N. Cooper. 2017. 'The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies', *Hum Genet*, 136: 665-77. doi:10.1007/s00439-017-1779-6
- Stoll, R., B. M. Lee, E. W. Debler, J. H. Laity, I. A. Wilson, H. J. Dyson, and P. E. Wright. 2007. 'Structure of the Wilms tumor suppressor protein zinc finger domain bound to DNA', *J Mol Biol*, 372: 1227-45. doi:10.1016/j.jmb.2007.07.017
- Štolbová, Š., M. Bezdíčka, Z. Prohászka, D. Csuka, I. Hrachovinová, J. Burkert, N. Šimánková, Š. Průhová, and J. Zieg. 2020. 'Molecular basis and outcomes of atypical

- haemolytic uraemic syndrome in Czech children', *Eur J Pediatr*, 179: 1739-50. doi:10.1007/s00431-020-03666-9
- Takasato, M., P. X. Er, M. Becroft, J. M. Vanslambrouck, E. G. Stanley, A. G. Elefanty, and M. H. Little. 2014. 'Directing human embryonic stem cell differentiation towards a renal lineage generates a self-organizing kidney', *Nat Cell Biol*, 16: 118-26. doi:10.1038/ncb2894
- Tan, W., S. Lovric, S. Ashraf, J. Rao, D. Schapiro, M. Airik, S. Shril, H. Y. Gee, M. Baum, G. Daouk, M. A. Ferguson, N. Rodig, M. J. G. Somers, D. R. Stein, A. Vivante, J. K. Warejko, E. Widmeier, and F. Hildebrandt. 2018. 'Analysis of 24 genes reveals a monogenic cause in 11.1% of cases with steroid-resistant nephrotic syndrome at a single center', *Pediatr Nephrol*, 33: 305-14. doi:10.1007/s00467-017-3801-6
- Team, R Core. 2014. 'R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>
- Thiery, J. P., H. Acloque, R. Y. Huang, and M. A. Nieto. 2009. 'Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease', *Cell*, 139: 871-90. doi:10.1016/j.cell.2009.11.007
- Torban, E., F. Braun, N. Wanner, T. Takano, P. R. Goodyer, R. Lennon, P. Ronco, A. V. Cybulsky, and T. B. Huber. 2019. 'From podocyte biology to novel cures for glomerular disease', *Kidney Int*, 96: 850-61. doi:10.1016/j.kint.2019.05.015
- Tory, K., D. K. Menyhárd, S. Woerner, F. Nevo, O. Gribouval, A. Kerti, P. Stráner, C. Arrondel, E. Huynh Cong, T. Tulassay, G. Mollet, A. Perczel, and C. Antignac. 2014. 'Mutation-dependent recessive inheritance of NPHS2-associated steroid-resistant nephrotic syndrome', *Nat Genet*, 46: 299-304. doi:10.1038/ng.2898
- Toska, E., and S. G. Roberts. 2014. 'Mechanisms of transcriptional regulation by WT1 (Wilms' tumour 1)', *Biochem J*, 461: 15-32. doi:10.1042/bj20131587
- Trautmann, A., M. Bodria, F. Ozaltin, A. Gheisari, A. Melk, M. Azocar, A. Anarat, S. Caliskan, F. Emma, J. Gellermann, J. Oh, E. Baskin, J. Ksiazek, G. Remuzzi, O. Erdogan, S. Akman, J. Dusek, T. Davitaia, O. Özkaya, F. Papachristou, A. Firszt-Adamczyk, T. Urasinski, S. Testa, R. T. Krmar, L. Hyla-Klekot, A. Pasini, Z. B. Özcarar, P. Sallay, N. Cakar, M. Galanti, J. Terzic, B. Aoun, A. Caldas Afonso, H. Szymanik-Grzelak, B. S. Lipska, S. Schnaidt, and F. Schaefer. 2015. 'Spectrum of steroid-resistant and congenital nephrotic syndrome in children: the PodoNet registry cohort', *Clin J Am Soc Nephrol*, 10: 592-600. doi:10.2215/cjn.06260614
- Trautmann, A., S. Schnaidt, B. S. Lipska-Ziętkiewicz, M. Bodria, F. Ozaltin, F. Emma, A. Anarat, A. Melk, M. Azocar, J. Oh, B. Saeed, A. Gheisari, S. Caliskan, J. Gellermann, L. M. S. Higuaita, A. Jankauskiene, D. Drozd, S. Mir, A. Balat, M. Szczepanska, D. Paripovic, A. Zurowska, R. Bogdanovic, A. Yilmaz, B. Ranchin, E. Baskin, O. Erdogan, G. Remuzzi, A. Firszt-Adamczyk, E. Kuzma-Mroczkowska, M. Litwin, L. Murer, M. Tkaczyk, H. Jardim, A. Wasilewska, N. Printza, K. Fidan, E. Simkova, H. Borzecka, H. Staude, K. Hees, and F. Schaefer. 2017. 'Long-Term Outcome of Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome in Children', *J Am Soc Nephrol*, 28: 3055-65. doi:10.1681/asn.2016101121
- Treger, T. D., T. Chowdhury, K. Pritchard-Jones, and S. Behjati. 2019. 'The genetic changes of Wilms tumour', *Nat Rev Nephrol*, 15: 240-51. doi:10.1038/s41581-019-0112-0
- Tsukaguchi, H., A. Sudhakar, T. C. Le, T. Nguyen, J. Yao, J. A. Schwimmer, A. D. Schachter, E. Poch, P. F. Abreu, G. B. Appel, A. B. Pereira, R. Kalluri, and M. R. Pollak. 2002. 'NPHS2 mutations in late-onset focal segmental glomerulosclerosis: R229Q is a common disease-associated allele', *J Clin Invest*. 2002 Dec;110(11):1659-66.

- Tullus, K., H. Webb, and A. Bagga. 2018. 'Management of steroid-resistant nephrotic syndrome in children and adolescents', *Lancet Child Adolesc Health*, 2: 880-90. doi:10.1016/s2352-4642(18)30283-9
- Ullmark, T., G. Montano, and U. Gullberg. 2018. 'DNA and RNA binding by the Wilms' tumour gene 1 (WT1) protein +KTS and -KTS isoforms-From initial observations to recent global genomic analyses', *Eur J Haematol*, 100: 229-40. doi:10.1111/ejh.13010
- Varner, J. D., A. Matory, and R. A. Gbadegesin. 2018. 'Genetic Basis of Health Disparity in Childhood Nephrotic Syndrome', *Am J Kidney Dis*, 72: S22-s25. doi:10.1053/j.ajkd.2018.06.022
- Vivarelli, M., L. Massella, B. Ruggiero, and F. Emma. 2017. 'Minimal Change Disease', *Clin J Am Soc Nephrol*, 12: 332-45. doi:10.2215/cjn.05000516
- Wang, Y., X. Dang, Q. He, Y. Zhen, X. He, Z. Yi, and K. Zhu. 2017. 'Mutation spectrum of genes associated with steroid-resistant nephrotic syndrome in Chinese children', *Gene*, 625: 15-20. doi:10.1016/j.gene.2017.04.050
- Wang, Y., Y. Wang, X. Feng, S. Bao, S. Yi, L. Kairaitis, Y. C. Tay, G. K. Rangan, and D. C. Harris. 2001. 'Depletion of CD4(+) T cells aggravates glomerular and interstitial injury in murine adriamycin nephropathy', *Kidney Int*, 59: 975-84. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.059003975.x
- Wei, C., C. C. Möller, M. M. Altintas, J. Li, K. Schwarz, S. Zacchigna, L. Xie, A. Henger, H. Schmid, M. P. Rastaldi, P. Cowan, M. Kretzler, R. Parrilla, M. Bendayan, V. Gupta, B. Nikolic, R. Kalluri, P. Carmeliet, P. Mundel, and J. Reiser. 2008. 'Modification of kidney barrier function by the urokinase receptor', *Nat Med*, 14: 55-63. doi:10.1038/nm1696
- Wilhelm, D., and C. Englert. 2002. 'The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sfl', *Genes Dev*, 16: 1839-51. doi:10.1101/gad.220102
- Xing, C. Y., M. A. Saleem, R. J. Coward, L. Ni, I. R. Witherden, and P. W. Mathieson. 2006. 'Direct effects of dexamethasone on human podocytes', *Kidney Int*, 70: 1038-45. doi:10.1038/sj.ki.5001655
- Xiong, H. Y., B. Alipanahi, L. J. Lee, H. Bretschneider, D. Merico, R. K. Yuen, Y. Hua, S. Gueroussov, H. S. Najafabadi, T. R. Hughes, Q. Morris, Y. Barash, A. R. Krainer, N. Jojic, S. W. Scherer, B. J. Blencowe, and B. J. Frey. 2015. 'RNA splicing. The human splicing code reveals new insights into the genetic determinants of disease', *Science*, 347: 1254806. doi:10.1126/science.1254806
- Yoshimura, Y., and R. Nishinakamura. 2019. 'Podocyte development, disease, and stem cell research', *Kidney Int*, 96: 1077-82. doi:10.1016/j.kint.2019.04.044
- Zeidan, E., S. Li, Z. Zhou, J. Miller, and M. G. Sandros. 2016. 'Single-Multiplex Detection of Organ Injury Biomarkers using SPRi based Nano-Immunesensor', *Sci Rep*, 6: 36348. doi:10.1038/srep36348
- Zhao, X., D. Y. Hwang, and H. Y. Kao. 2018. 'The Role of Glucocorticoid Receptors in Podocytes and Nephrotic Syndrome', *Nucl Receptor Res*, 5. doi:10.11131/2018/101323
- Zhu, J. Y., M. Abate, P. W. Rice, and C. N. Cole. 1991. 'The ability of simian virus 40 large T antigen to immortalize primary mouse embryo fibroblasts cosegregates with its ability to bind to p53', *J Virol*, 65: 6872-80. doi:10.1128/jvi.65.12.6872-6880.1991

16. Přehled publikační činnosti autora

Původní vědecké práce in extenso, které jsou podkladem disertace (s impakt faktorem):

Bezdíčka, M., Štolbová, Š., Seeman, T., Cinek, O., Malina, M., Šimánková, N., Průhová, Š., Zieg, J. Genetic diagnosis of steroid-resistant nephrotic syndrome in a longitudinal collection of Czech and Slovak patients: a high proportion of causative variants in *NUP93*. *Pediatric Nephrology*, 2018. 33(8): p. 1347-1363. *IF (2020): 3,714*

Bezdíčka, M., Dluholucký, M., Cinek, O., Zieg, J. Successful maintenance of partial remission in a child with *COQ2* nephropathy by coenzyme Q10 treatment. *Nephrology (Carlton)*, 2020. 25(2): p. 187-188. *IF (2020): 2,506*

Bezdíčka, M., Kaufman, F., Křížová, I., Dostálková, A., Rumlová, M., Seeman, T., Vondrák, K., Fencl, F., Zieg, J., Souček, O. Alteration in DNA-binding affinity of Wilms tumor 1 protein due to *WT1* genetic variants associated with steroid - resistant nephrotic syndrome in children. *Scientific reports*, 2022. 12(1), 8704. *IF (2020): 4,380*

Původní vědecké práce s impakt faktorem, které nejsou podkladem disertační práce:

Štolbová, Š., **Bezdíčka, M.**, Seeman, T., Prohászka, Z., Csuka, D., Hrachovinová, I., Burkert, J., Šimánková, N., Průhová, Š., Zieg, J. Molecular basis and outcomes of atypical haemolytic uraemic syndrome in Czech children. *Eur Journal of Pediatrics*. 2020. 179(11): p. 1739-1750. Epub 2020 May 18. Erratum in: *Eur J Pediatr*. 2022 Apr;181(4):1781. *IF (2020): 3,183*

Bezdíčka, M., Pavlíček, P., Bláhová, K., Háček, J., Zieg, J. Various phenotypes of disease associated with mutated *DGKE* gene. *European Journal of Medical Genetics*. 2020. 63(8): 103953. *IF (2020): 2,708*

Bezdíčka, M., Langer, J., Háček, J., Zieg, J. Dent Disease Type 2 as a Cause of Focal Segmental Glomerulosclerosis in a 6-Year-Old Boy: A Case Report. *Frontiers in pediatrics*, 2020. 8: 583230. *IF (2020): 3,418*

Bezdíčka, M., Kleiblová, P., Souček, J., Borecká, M., El-Lababidi, E., Smrž, D., Rataj, M., Šumník, Z., Malíková, J., Souček, O. Novel presentation of the c.1856A > G (p.Asp619Gly) *TSHR* gene-activating variant: relapsing hyperthyroidism in three subsequent generations manifesting in early childhood and an in vitro functional study. *Hormones (Athens, Greece)*, 2021. 20(4): p. 803–812. *IF (2020): 2,885*

Bezdíčka, M., Zemková, D., Skálová, S., Hovorková, E., Podhola, M., Burkert, J., & Zieg, J. Tubuloglomerular Disease With Cone-Shaped Epiphyses Associated With Hypomorphic Variant and a Novel p.Cys14Arg in the *TTC21B* Gene: A Case Report. *Frontiers in pediatrics*, 2021. 9: 752878. *IF (2020): 3.418*

Přednášky a plakátová sdělení na odborných setkáních:

- 10/2021 ES-PCR – mezinárodní kongres v Mariboru
Název přednášky: In vitro characterization of the DNA-binding affinity of the WT1 transcription factor mutants found in children with steroid-resistant nephrotic syndrome
- 10/2021 42. pracovní dny dětské nefrologie v Jindřichově Hradci
Název přednášky: Afinita mutantů transkripčního faktoru WT1 k cílové DNA: Na cestě k podhalení příčiny steroid-rezistentního nefrotického syndromu způsobeného patogenními variantami WT1 genu
- 09/2021 ESPN Amsterdam 2021 (mezinárodní kongres)
Online přednáška
Název přednášky: In vitro characterization of the DNA-binding affinity of the WT1 transcription factor mutants found in children with steroid-resistant nephrotic syndrome
- 10/2020 Vědecká konference 2. LF UK
Název přednášky: Funkční ověření aktivační mutace v TSHR genu u rodiny s familiární neautoimunitní hypertyreózou ve třech generacích
- 09/2020 41. pracovní dny dětské nefrologie v Luhačovicích
Název přednášky: Úspěšná terapie koenzymem Q10 u dítěte s COQ2 nefropatií
- 06/2020 „Malé“ dny dětské nefrologie 2020
Název přednášky: Klinický přínos genetického vyšetření u pacientů s nefropatiemi
- 06/2018 ES-PCR – mezinárodní kongres v Bratislavě
Název přednášky: The change in the therapeutic approach based on genetic analysis in children with steroid-resistant nephrotic syndrome
- 05/2018 39. pracovní dny dětské nefrologie v Kroměříži
Cena za nejlepší abstrakt konference
Název přednášky: Změna léčebného přístupu na základě genetické analýzy u dětí se steroid-rezistentním nefrotickým syndromem
- 04/2018 Vědecká konference 2. LF UK

Název přednášky: Změna léčebného přístupu na základě genetické analýzy u dětí se steroid-rezistentním nefrotickým syndromem

02/2018 GPN Hannover 2018 (mezinárodní kongres)

Název: Genetic findings in atypical haemolytic-uraemic syndrome in Czech paediatric patients

06/2017 38. pracovní dny dětské nefrologie v Českém Krumlově

Název: Genetické příčiny atypického HUS u českých pacientů