

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE



## FOKÁLNÍ SEGMENTÁLNÍ GLOMERULOSKLERÓZA A GEN *NPHS2*

Bakalářská práce

Lena Obeidová

Školitel: Ing. Jitka Štekrová

Praha 2008

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a s použitím uvedené literatury.

V Praze dne 15. 8. 2008

*Lena Obeidová*  
Lena Obeidová

## OBSAH

1. SEZNAM ZKRATEK	2
2. ABSTRAKT	4
3. ÚVOD	5
4. NEFROTICKÝ SYNDROM A FOKÁLNÍ SEGMENTÁLNÍ GLOMERULOSKLERÓSA	6
4.1. Nefrotický syndrom	7
4.2. Fokální segmentální glomeruloskleróza	7
4.2.1. Rozdělení FSGS podle vzniku	7
4.2.2. Rozdělení FSGS podle histologických nálezů	8
4.2.3. Vývoj FSGS	11
4.2.4. Od FSGS ke ztrátě nefronu	12
5. GEN <i>NPHS2</i>	13
5.1. Mutace/polymorfismus p. Arg229Gln	14
5.2. Rekurence po transplantaci	15
5.3. Typ mutace a věk progresu	16
6. PODOCIN	16
6.1. Interakce podocin – nephrin – CD2AP	17
6.2. Interakce podocin – TRPC6	20
6.3. Interakce podocin – Neph1	20
6.4. Mutační změna podocinu	21
6.5. Podocin a srdeční poruchy	21
7. ZÁVĚR	23
8. PODĚKOVÁNÍ	24
9. SEZNAM LITERATURY	25

## **1. SEZNAM ZKRATEK**

**ACTN4** – gen pro  $\alpha$ -actinin 4

**AP-1** – aktivátorový protein 1

**Arp2/3 komplex** – komplex actin-related proteinu 2 a actin-related proteinu 3

**BAD** – B-cell lymphoma 2-associated death promoter

**CD2AP** – CD2- asociovaný protein

**CELL** – buněčná (cellular) varianta fokální segmentální glomerulosklerózy

**COLL** – kolabující (collapsing) varianta fokální segmentální glomerulosklerózy

**ER** – endoplazmatické retikulum

**ERK** – extracellular signal-regulated kinase

**FSGS** – fokální segmentální glomeruloskleróza

**GA** – Golgiho aparát

**GBM** – glomerulární basální membrána

**GLEPP-1** – glomerulární epitheliální protein 1

**Grb2** – growth factor receptor-bound protein 2

**HEK** – human embryonic kidney

**JNK** – c-Jun-N-terminální kináza

**MAPK** – mitogenem-aktivovaná protein kináza

**MCP-1** – monocyte chemoattractant protein 1

**N-WASP** – Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein

**Nck** – non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1

**NOS** – not otherwise specified varianta fokální segmentální glomerulosklerózy

**NPHS1** – gen kódující protein nephrin

**NPHS2** – gen kódující protein podocin

**NS** – nefrotický syndrom

**PDGF** – platelet-derived growth factor

**PEC** – parietální epiteliální buňky

**PH** – perihilární varianta fokální segmentální glomerulosklerózy

**PHB** – prohibitin homology doména

**PI3K** – fosfoinositid 3-kináza

**PLC** – fosfolipáza C

**SH2** – Src homology 2 doména

**SH3** – Src homology 3 doména

**SRNS** – steroid rezistentní nefrotický syndrom

**TGF** – transforming growth factor, transformující růstový faktor

**TRP** – transient receptor potential

**TRPC6** – transient receptor potential, skupiny C, člen 6

**WT-1** – Wilms tumor 1

## 2. ABSTRAKT

Fokální segmentální glomeruloskleróza (FSGS) je jedna z nejčastějších příčin nefrotického syndromu u dospělých pacientů. Jedná se o poškození glomerulů charakterizované silnou proteinurií, které se může vyvinout do akutního selhání ledvin. Rozdělujeme ji na primární (idiopatickou, tj. vznikající z neznámých příčin) a sekundární, kde jsou příčiny vzniku velmi rozmanité. Zahrnují mutace v genech proteinů ovlivňujících funkci filtrační bariéry glomerulů, dále FSGS vznikající z důvodu požívání léčiv či drog, s viry asociovanou FSGS a FSGS, která vzniká jako reakce na glomerulární hypertrofii a hyperfiltraci. Stejně tak, jako se liší příčiny jejího vzniku, liší se i její histologické nálezy a klinické projevy u různých pacientů. Mutace v genu *NPHS2* kódujícím podocytární protein podocin způsobují vznik autosomálně recesivní FSGS, rezistentní na léčbu steroidy, která se ovšem vyznačuje nízkou rekurencí po transplantaci ledvin. Mutační analýzou tohoto genu by se tedy mohlo u pacientů předcházet neúčelné imunosupresivní léčbě a doporučit je k transplantaci. Je ovšem potřeba ještě dalších výzkumů této poruchy, neboť se zdá, že je způsobena více faktory.

*Focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) is one of the most important causes of the nephrotic syndrome in adult patients. It is a damage of glomerulus characterized by heavy proteinuria which can develop into the end-stage renal disease. We divide this disease into two main groups: primary (idiopathic, i.e. arising from unknown causes) and secondary, with various underlying causes. It includes the mutations in genes of proteins affecting the function of glomerular filtration barrier, further FSGS caused by using drugs, virus-associated FSGS and FSGS which results from glomerular hypertrophy and hyperfiltration. Just as differ the causes of its' origin so differ its' histological findings and clinical manifestations in various patients. Mutations in gene *NPHS2* coding protein podocin cause emergence of autosomal recessive FSGS resistant to steroid treatment that is specific by low recurrence after the kidney transplatation. By mutational analysis of this gene it might be therefore possible to preclude purposeless immunosuppressive treatment and suggest transplantation. Nevertheless there is further survey needed since it seems this disease is induced by many factors.*

### 3. ÚVOD

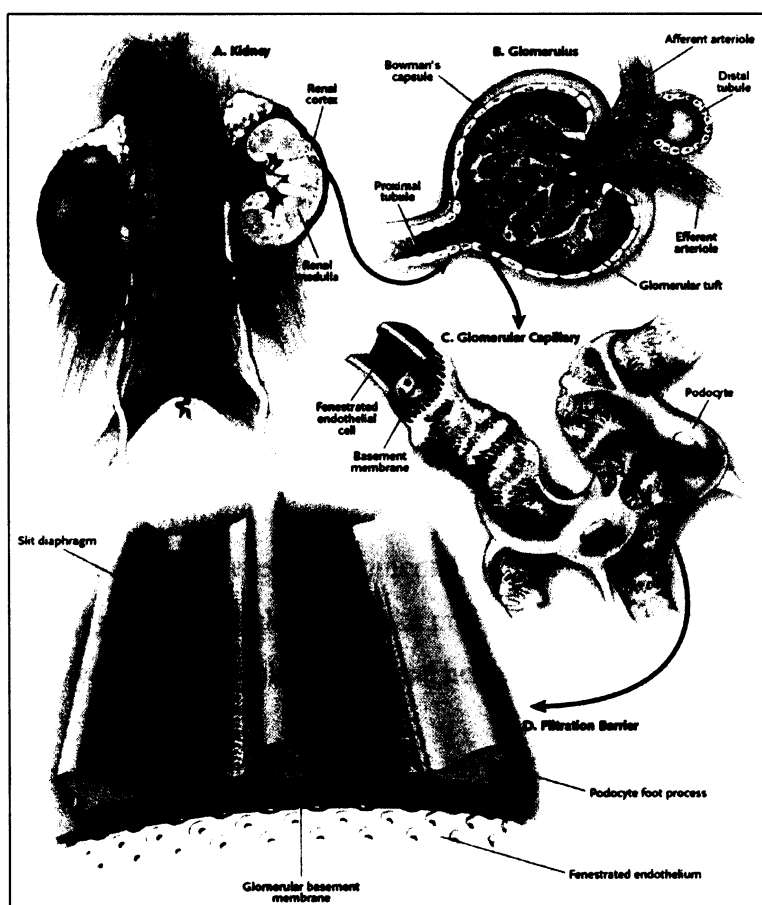
Fokální segmentální glomeruloskleróza je histologická diagnóza vyznačující se na řezu bioptovaných ledvin částečným ucpáním glomerulárních kapilár extracelulární matrix či hyalinním materiálem a místy srůstu glomerulárního klubička s Bowmanovým pouzdrem. Zprvu postihuje převážně juxtamedulární glomeruly, a tak je nutno při renálním vyšetření brát v úvahu, že bioptovaný vzorek může pokrývat pouze povrchovou část kůry ledviny. S postupující progresí onemocnění segmentální glomeruloskleróza postihuje globálně celý glomerulus, je doprovázena degradací tubulů a intersticiální fibrósou a šíří se i na další glomeruly, pravděpodobně z důvodu jejich přetížení. Přibližně u poloviny pacientů se tak do 10 let vyvine do konečného selhání ledvin.

V roce 2000 byl objeven gen *NPHS2* nacházející se na 1. chromosomu a kódující integrální protein podocin, který je exprimován výhradně v glomerulárních podocytech. Je to protein hrající důležitou roli v udržování správné funkce glomerulární filtrační bariéry, a to díky interakcím s dalšími podocytárními proteiny. Jeho mutace způsobuje autosomálně recesivní FSGS rezistentní na léčbu steroidy. Přesto bylo zjištěno, že u některých pacientů pouze s jednou mutovanou alelou tohoto genu dochází k progresi onemocnění. Toto překvapivé zjištění by mohlo být vysvětleno přítomností cirkulujícího permeabilního faktoru popř. ztrátou jeho inhibitoru. Lze tedy doufat, že se v budoucnu podaří molekulární identifikace cirkulujícího permeabilního faktoru, neboť by měl tento objev zásadní význam pro diagnostiku a léčbu FSGS.

Cílem této práce je zmapovat dosavadní poznatky o vzniku, vývoji a klinických projevech FSGS. Dále se podrobněji zabývá genem *NPHS2*, zejména pak vlivem jeho mutací na charakter FSGS, a nakonec také proteinovým produktem *NPHS2* podocinem a jeho interakcemi s dalšími podocytárními proteiny.

#### 4. NEFROTICKÝ SYNDROM A FOKÁLNÍ SEGMENTÁLNÍ GLOMERULOSKLERÓSA

Filtrace krve a vznik primární moči jsou v ledvinovém glomerulu zajištěny filtrační bariérou složenou ze tří důležitých složek. Je to fenestrované endotelium kapilár, glomerulární basální membrána (GBM) a epiteliální buňky glomerulů (podocyty). Podocyty jsou vysoce diferencované buňky vyskytující se pouze v glomerulech (viz obr.1). Mají objemné tělo, které vystupuje do urinárního prostoru, a ke glomerulární basální membráně jsou fixovány mnoha výběžky (pedicelami, „foot processes“) (Kriz, Kobayashi, Elger, 1998). Mezi pedicelami podocytů se rozprostírá tenká membrána („slit diaphragm“) složená z proteinů tvořících strukturu podobnou zipu, která má délku přibližně 40 nm (Tryggvason, Patrakka, Wartiovaara, 2006). Tato bariéra umožňuje filtraci molekul na základě jejich velikosti a náboje. Tak je tedy téměř zabráněno průchodu proteinům s molekulovou hmotností kolem 50 kDa (přibližně velikost albuminu). Zvýšená permeabilita této bariéry pak způsobuje nefrotický syndrom (NS).



Obr.1: Znázorněno umístění podocytů v glomerulu (B) a na kapiláře (C). Detail propojení pedicel díky „slit diaphragm“ (D). Převzato z Tryggvason et al. (2006).



#### **4.1. Nefrotický syndrom**

Nefrotický syndrom je charakterizován nefrotickou proteinurií (> 3,5 g/den), hypoproteinémií (sérový albumin <35g/l), hyperlipidémií a periferními otoky (Ryšavá, Tesař, Merta, 2005). Nefrotický syndrom může být způsoben systémovými poruchami jako je diabetes mellitus, amyloidóza ledvin či lupusová nefritida, nebo vzniká v důsledku primárních glomerulonefritid, tedy fokální segmentální glomerulosklerózy (FSGS), minimálních změn glomerulů, membranózní glomerulonefritidy a membranoproliferativní glomerulonefritidy (Monhart, 2001). Příčiny vzniku NS se mění s věkem i s etnickou příslušností. U dětí mladších 10 let jsou ve více než 80% případů za NS zodpovědné minimální změny glomerulů, zatímco u dospělých pacientů je nejčastější příčinou NS membranózní glomerulonefritida a FSGS (Ryšavá, Tesař, Merta, 2005; Haas et al., 1997). Pokud jde o etnické rozdíly, osoby s africkým původem mají až čtyřnásobně větší riziko vzniku NS z důvodu FSGS oproti osobám evropského či amerického původu (Franceschini et al., 2006; Haas et al., 1997).

Navíc dochází ke změnám i v průběhu času. Haas et al. (1997) se zabývali otázkou, zda se změnily příčiny vzniku NS u dospělých pacientů v letech 1995-1997 oproti roků 1976-1979. Porovnáním 1000 vzorků biopsií odebraných z obou období zjistili, že mezi roky 1976 až 1979 byla důvodem ke vzniku NS ve 36% membranózní nefropatie, ve 23% minimální změny glomerulů a v 15% FSGS. Naproti tomu v letech 1995 až 1997 je FSGS zodpovědná za 35%, membranózní nefropatie za 33% a minimální změny glomerulů za 15% případů NS.

#### **4.2. Fokální segmentální glomeruloskleróza**

Jak je zřetelné z pozorování Haase a spolupracovníků (1997), fokální segmentální glomeruloskleróza je v poslední době nejčastější příčinou vzniku nefrotického syndromu. Jak její název napovídá, jedná se o částečné (segmental) poškození některých (focal) glomerulů. Příčiny vzniku FSGS i její histologické a klinické projevy se mohou u různých pacientů velmi lišit, nemůžeme o ní tedy uvažovat jako o jednotné nemoci, ale spíše jako o popisné diagnóze.

##### **4.2.1. Rozdělení FSGS podle vzniku**

Podle vzniku rozdělujeme FSGS na idiopatickou (primární, vznikající z neznámých příčin) a sekundární – zde mohou být důvody pro vznik velmi rozmanité:

1. dědičná (familiální) FSGS (vznikající díky mutacím například v genech pro  $\alpha$ -aktinin 4, nephrin, podocin, Wilms tumor 1(WT-I), CD2-associated protein

(CD2AP) a mutačním změnám v mitochondriální DNA)

2. s viry asociovaná FSGS (HIV-asociovaná nefropatie a parvovirus B19)
3. FSGS vznikající z důvodu přítomnosti léčiv/drog (např. heroinu, interferonu- $\alpha$ , lithia, pamidronátu/alendronátu)
4. FSGS jako adaptivní strukturně-funkční reakce vznikající jako odpověď na glomerulární hypertrofii nebo hyperfiltraci  
(tj. při redukci objemu ledvinové tkáně: ageneze ledviny, ledvinová dysplázie, kortikální nekroza, po nefrektomii pro nádor; při zachování ledvinové masy při hyperfiltraci: diabetes mellitus, hypertenze, obesita atd.)  
(D'Agati et al., 2004; D'Agati, 1994)

Přestože jsou důvody vzniku idiopatické FSGS stále neznámé, v posledních letech se ukazuje, že by zde mohla hrát roli nadprodukce cirkulujícího permeabilního faktoru, či ztráta jeho inhibitoru. (Deegens, Steenbergen, Wetzels, 2008)

#### **4.2.2 Rozdělení FSGS podle histologických nálezů**

Morfologické rozdělení fokální segmentální glomerulosklerózy se v posledních letech ustálilo na 4 či 5 variantách, které jsou rozlišitelné na histologických preparátech pomocí světelného mikroskopu. Tesař et al. (2006) se přiklání k rozdělení FSGS na 4 varianty důležité hlavně v klinické praxi. Jsou to:

1. Klasická FSGS. Na histologickém nálezu lze rozeznat úseky postižených glomerulů s kolabujícími kapilárními kličkami se zmnožením mezangia a část kapiláry je uzavřena depozicí amorfní matrix a hyalinu. V těchto částech glomerulu jsou také zřetelné úseky „holé“ GBM a potažmo její srůsty s Bowmanovým pouzdem.
2. Kolabující FSGS. U této varianty jsou dominantní rozsáhlé kolapsy glomerulárních trsů. Tato varianta typicky vzniká u FSGS, která je vyvolaná virem HIV.
3. Periferní FSGS (tip lesion). Na rozdíl od „klasické“ formy FSGS, kde je postižena hlavně oblast kolem glomerulárního hilu (tj. v oblasti vstupu aferentní a výstupu eferentní arterioly), zde se zprvu segmentální skleróza objevuje v oblasti napojení proximálního tubulu (tzv. tip doména).
4. Buněčná FSGS. Tato variantaje je charakterizována vyšší mezangiální buněčností, a často také mírným zmnožením mezangiální matrix. Jak bylo zjištěno, vyskytuje se jen asi ve 3% případů FSGS (Stokes et al., 2006).

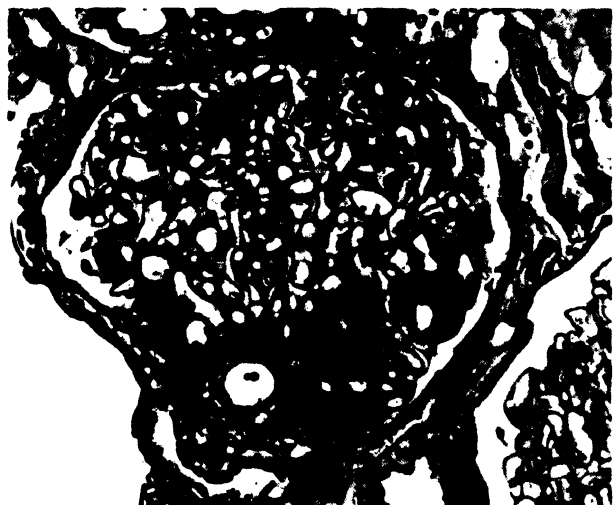
Někteří se přiklánějí k mírně rozdílnému dělení FSGS, a to na 5 variant :

1. Blíže nespecifikovaná FSGS (not otherwise specified, NOS) (viz obr.2). Vyznačuje se segmentálním vzestupem objemu extracelulární matrix v části glomerulu, což vede ke zničení lumen kapiláry. V mnoha případech dochází k mírné podocytární hypertrofii (zvětšování jejich velikosti) či hyperplázii (stoupá počet podocytů). Častá je také hyalinóza a vyplnění prostoru mezi glomerulárním klubičkem a Bowmanovým pouzdem kolagenní matrix.
2. Perihilární FSGS (PH) (viz obr.3). Ta je charakterizována tím, že je glomerulus postižen hyalinózou a/nebo sklerózou (tedy zvětšováním objemu extracelulární matrix glomerulu a tím i ucpáním kapiláry) hlavně v perihilární oblasti. Běžné je také zvětšování glomerulárního klubička. Tato varianta se může vyskytnout u primární FSGS, ale i u sekundární FSGS způsobené adaptivní odpovědí na ztrátu nefronů či glomerulární hypertenzi.
3. Kolabující FSGS (COLL) (viz obr.4)
4. Periferní FSGS (viz obr.5)
5. Buněčná FSGS (CELL) (viz obr.6)

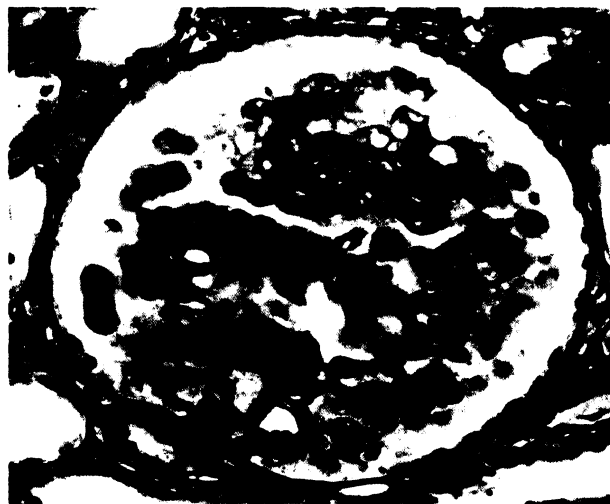
(rozdělení a charakteristika dle: Nair, 2006, D'Agati et al., 1994; D'Agati et al., 2004; Stokes et al., 2006; Deegens, Steenbergen, Wetzels, 2008)



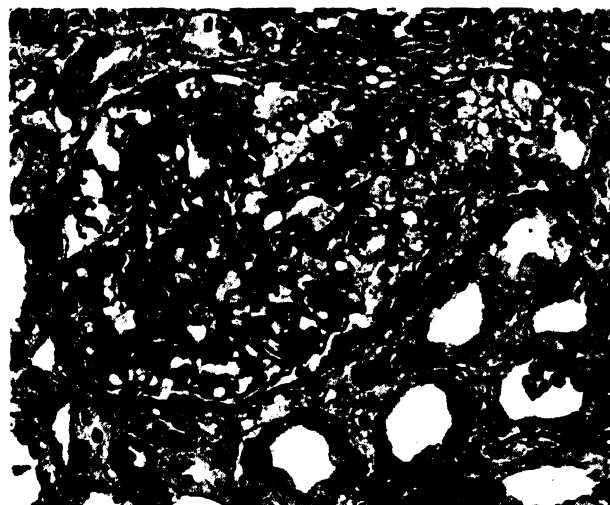
Obr. 2: NOS FSGS. Lze rozeznat zničení kapilární lumen hromaděním extracelulární matrix a hyalinního materiálu (zvětšeno 400krát).



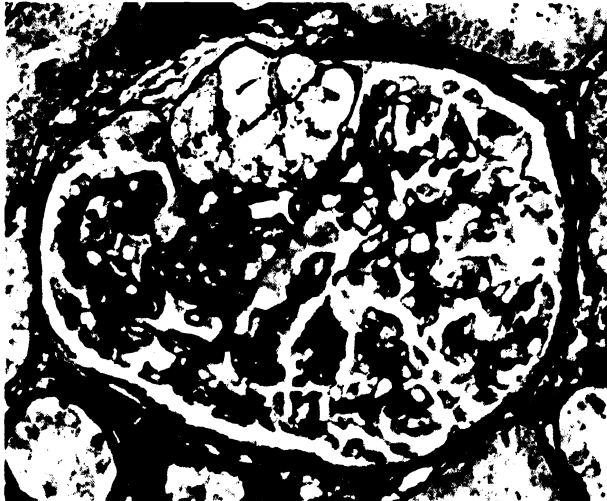
Obr.3: **PH FSGS**. Zde je částečné ucpání glomerulárních kapilár akumulací matrix a hyalinního materiálu v místě glomerulárního hilu (zvětšeno 250krát).



Obr. 4: **COLL FSGS**. Na tomto obrázku je jasně vidět globální ucpání kapilár. Podocyty jsou hypertrofní a některé jsou uvolněné z GBM (zvětšeno 400krát).



Obr. 5: **Periferní FSGS**. Zde dochází k částečné akumulaci pěnových buněk v místě tubulárního pólu glomerulu. Podocyty se v místě poškození shlukují s epiteliálními buňkami proximálního tubulu (zvětšeno 250krát).



Obr. 6: **CELL FSGS**. Tuto variantu provází částečné zahlcení kapilární lumen pěnovými buňkami (zvětšeno 400krát).

Obr. 2 až 6 převzaty ze Stokes et al., 2006

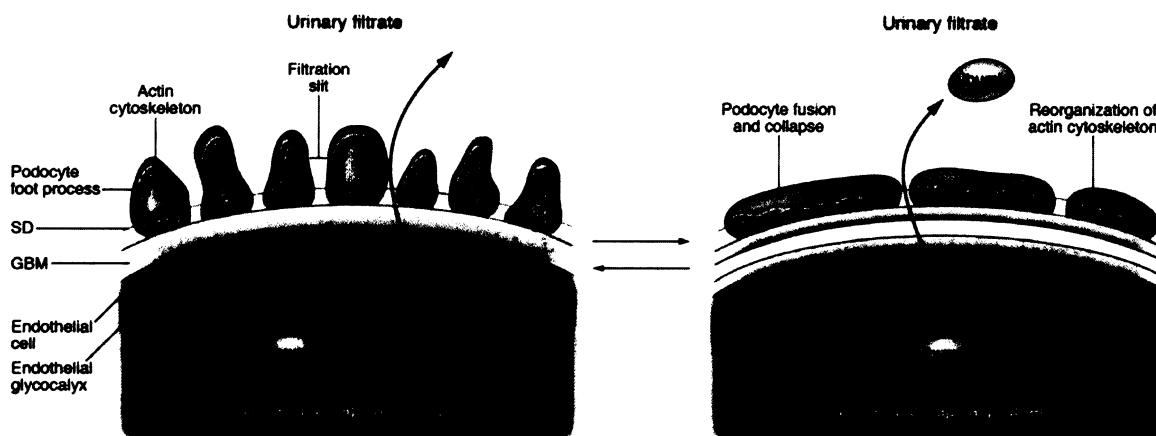
Jak se zdá, mohlo by rozlišení těchto morfologických variant pomoci při předpovědi dalšího vývoje FSGS u postižených pacientů, neboť bylo zjištěno, že COLL varianta se vyznačuje tím, že dochází k jejímu ústupu pouze u přibližně 13% pacientů, naopak u 65% se vyvine do konečného selhání ledvin. Jedná se tedy o nejagresivnější formu FSGS. Naproti tomu u glomerular tip lesion dochází k ústupu nemoci u 75,8% pacientů a k ledvinovému selhání u přibližně 6% pacientů. Navíc se tato varianta FSGS objevuje u pacientů až v pozdějším věku a většinou odpovídá na léčbu steroidy. U CELL FSGS dochází k ústupu nemoci u 44,5% pacientů a k selhání ledvin dochází přibližně u 30% pacientů (Stokes et al., 2006).

#### 4.2.3. Vývoj FSGS

Přestože jsou histologické nálezy u různých variant FSGS mírně rozdílné, je u vývoje FSGS předpokládán vcelku stereotypní mechanismus, který se ovšem s velkou pravděpodobností liší u FSGS vznikající z primárních či sekundárních příčin.

U primární FSGS pravděpodobně poškození glomerulů probíhá takto: po poškození viscerálních podocytů (tedy podocytů přiléhajících ke glomerulární basální membráně) dochází k fúzi pedicel podocytů (“foot process effacement“) způsobené (reverzibilní) reorganizací aktinového cytoskeletu, ke které dochází v rámci minut (viz obrázek 7) (Ronco, 2007). Poškozené parietální epitheliální buňky (PEC), které se vyskytují podél Bowmanova pouzdra a kterým se také může říkat parietální podocyty (neboť bylo zjištěno, že exprimují proteiny specifické pro podocyty, například podocalyxin, glomerulární epitheliální protein-1 (GLEPP-1), nephrin, podocin, CD2AP, synaptopodin,  $\alpha$ -aktinin-4 a další (Bariety et al., 2006)), se aktivují a začnou se množit. Dochází k jejich oddělování od Bowmanova pouzdra

a místo toho pokrývají části glomerulárního klubička postiženého kolapsem kapilární stěny (Smeets et al., 2004; Asano et al, 2005; Deegens, Steenbergen, Wetzels, 2008).



Obr. 7: Znárodnění změny výběžků podocytů díky jejich fúzi a přeorganizování aktinových filament. Tato změna pak vede k proteinurii. Převezato a upraveno dle Ronco, 2007.

Naproti tomu u sekundární FSGS vypadá mechanismus jejího vývoje jinak. Po poškození podocytů dochází k jejich oddělení od GBM. Počty podocytů se snižují, neboť se mohou dělit jen za velmi specifických podmínek (podocyty mohou podstoupit DNA syntézu, ale většinou se zastaví v G2/M fázi, takže vznikají vícejaderné buňky (Kriz, Gretz, Lemley, 1998; Kriz, 1996)), a tak dochází ke vzniku míst na glomerulární basální membráně, která jsou „holá“. Tato holá místa pak začnou pokrývat parietální epitheliální buňky, a tím dojde k adhezi mezi glomerulárním klubičkem a Bowmanovým pouzdem. V místech adheze pak dochází k nesprávně řízené filtraci, neboť nyní filtrovaná tekutina směřuje do periglomerulárního a peritubulárního prostoru. Pokud ztráta podocytů, a tím i adheze PEC ke stěně kapilár pokračuje, může dojít ke kolapsu těchto kapilár nebo k jejich ucpání díky hromadícímu se hyalinnímu materiálu, či z důvodu mikrotrombózy (Kritz, Kobayashi, Elger, 1998; D'Agati, 2008; Deegens, Steenbergen, Wetzels, 2008).

#### 4.2.4. Od FSGS ke ztrátě nefronu

Jak je vidět, počáteční fáze FSGS se vyznačují podobným nálezem. Dochází ke kolapsu kapilár a jejich ucpání, mezi glomerulárním klubičkem a Bowmanovým pouzdem vznikají srůsty, a tím dochází k filtraci tekutiny do paraglomerulárního prostoru, který se postupně šíří po celém glomerulu a je oddělen od intersticia díky nově vznikající bariéře z fibroblastů. Otázkou ovšem zůstává, jak se poškození šíří dál po nefronu. Bylo nastíněno více mechanismů, které by zde mohly hrát roli, a já bych je v této části ráda stručně zmínila.

Všechny tyto mechanismy stojí na společných základech, neboť všechny charakterizují zničení celého nefronu jako rozšíření fokální glomerulosklerózy globálně po celém glomerulu, dále jako tubulární degeneraci a intersticiální hyalinózu. V čem se ovšem rozcházejí je to, jak k těmto poškozením dochází.

Za prvé, díky opakovanému glomerulárnímu poškození dochází v glomerulárních ale i tubulárních a intersticiálních buňkách k produkci chemokinů a růstových faktorů (platelet-derived growth factor (PDGF), transformující růstový faktor (TGF), osteopontin, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)), které stimulují proliferaci fibroblastů a produkci extracelulární matrix (Tang et al., 1996; Kriz et al., 1998).

Za druhé, následky glomerulárního poškození, jako kapilární hypertenze a neustálá produkce vasoaktivních hormonů (angiotensin II, endothelin) způsobí, že dojde k lokální hypoxii a tubulární atrofii, což je doprovázeno zvýšenou expresí růstových faktorů, které podporují intersticiální fibrózu (Egido, 1996; Kriz et al., 1998).

Za třetí, neustálé unikání proteinů během filtrace poškozeného glomerulu nutí proximální tubulus k nadměrné absorpci, která v jeho buňkách způsobí expresi zánětlivých a vasoaktivních proteinů (MCP-1, endothelin). Tyto proteiny pak způsobují zánětlivou reakci končící intersticiální fibrózou a tubulární degenerací (Remuzzi, Ruggenenti, Benigni, 1997; Kriz et al., 1998).

Poslední mechanismus spočívá v tom, že díky špatně řízené filtraci se poškození glomerulu z části glomerulu rozšíří postupně do celého glomerulu a také do proximálního tubulu (Kriz et al., 1998).

Předpokládá se, že všechny tyto mechanismy se neobjevují striktně odděleně, ale mají spíše společný aditivní účinek. Pokud jde o otázku, jak se poškození šíří k dalším nefronům, je zde nejpravděpodobnější vysvětlení, že neustálá ztráta funkčních nefronů nutí ostatní nefrony k většímu objemu filtrace, což způsobí v těchto nefronech glomerulární hypertenzi a hypertrofii. Ty se pak stávají velmi náchylné k dalšímu poškození (overload hypothesis) (Kriz, LeHir, 2005).

## **5. GEN *NPHS2***

Gen *NPHS2* kódující protein podocin byl identifikován v roce 2000 skupinou Boute et al. Leží na dlouhém raménku 1. chromosomu, konkrétně v pozici 1q25-31. Je to gen o přibližné délce 25 kbp, složený z osmi exonů a sedmi intronů (McKenzie et al., 2007). Do této doby bylo na tomto genu objeveno přes 90 mutací (The Human Gene Mutations Database at the

Institute of Medical Genetics in Cardiff) s různou mírou vlivu na vznik a závažnost nefrotického syndromu. Obecně lze ale říci, že patogenní mutace genu *NPHS2* způsobují sekundární FSGS, která je charakteristická resistencí na imunosupresivní léčbu (Fuchshuber et al., 2001) a svou progresí převážně u pacientů v dětském či adolescentním věku.

Mnoho skupin vědců se již zabývalo rozložením mutací *NPHS2* a jejich patogenitou napříč věkovými skupinami, etniky či pohlavími. Výsledky ale v mnoha případech nebyly významné a často se u různých skupin významně lišily. Přesto ale tyto studie ukázaly směry, kterými se může další výzkum vydat.

V této části bych ráda nastínila hlavní problémy, kterými se výzkum v této oblasti zabývá, a stručně uvedla, co již bylo k těmto tématům řečeno.

### **5.1. Mutace/polymorfismus p. Arg229Gln**

Již v první studii (Tsukaguchi et al., 2002) se jak u dospělých pacientů, tak v kontrolních skupinách objevila vysoká frekvence mutace/polymorfismu p. Arg229Gln. Konkrétně to bylo 6% pacientů se sporadickou FSGS, kteří měli jednu mutovanou alelu p. Arg229Gln. Dva z nich byli složení heterozygoti s další *NPHS2* mutací a u dalších 9 nebyla žádná jiná mutace nalezena. Dále bylo nalezeno 6 rodin (z 9, s histologicky verifikovanou diagnózou primární FSGS), ve kterých byli složení heterozygoti s p. Arg229Gln. Větším překvapením ovšem byla frekvence této mutace/polymorfismu u normální populace. Ta je u africké populace 1,6%, u brazilské 3,1% a u populace ze severní Ameriky a západní Evropy až 3,6%. Takto vysoký výskyt mutace v populaci naznačuje, že se jedná o mutaci existující v populaci již velmi dlouho. Dále nastínili, že pouze p. Arg229Gln mutace/polymorfismus není dostačující pro vznik onemocnění, ale může napomáhat vzniku nefrotického poškození spolu s další mutací a to jak genu *NPHS2*, tak i jiného.

Frekvencí p. Arg229Gln se zabývaly i další skupiny, např. Caridi et al., 2003. Ti zjistili tuto mutaci/polymorfismus u 4,2% dětských pacientů se sporadickým NS a u 2,5% kontrol. Aucella et al., 2005 vyšetřovali dospělé pacienty a u 4,5% našli p. Arg229Gln, ale již žádnou jinou mutaci na genu *NPHS2*.

Mírou patogenity této mutace/polymorfismu se zabývala skupina Pereira et al. (2004), která provedla mutační analýzu u skupiny 1577 lidí vybraných z normální populace a zjišťovala, zda se v přítomnosti takto mutované alely častěji objevuje mikroalbuminurie, která je spojována s větší pravděpodobností vzniku selhání ledvin a kardiovaskulárních onemocnění. Zjistili, že mutace/polymorfismus p. Arg229Gln na jedné alele (heterozygotní) se vyskytuje u 85 vyšetřovaných osob (+ 1 homozygotní, tento případ byl ovšem z dalších



vyšetření vynechán). Po porovnání výsledků vyšetření (jako mikroalbuminurie byla definována koncentrace albuminu v moči větší než 2 mg/dL) opravdu zjistili, že u osob s jednou mutací p. Arg229Gln se mikroalbuminurie objevuje ve 14,8% případů, narozdíl od 6,1% u osob bez této mutace. Dalšími vyšetřeními navíc objevili vztah mezi přítomností mikroalbuminurie a obezitou (definována jako body mass index (BMI) kolem 30 kg/m<sup>2</sup>). Ze svých pozorování vyvodili závěr, že přítomnost jedné p. Arg229Gln alely nemá u neobézních osob na vznik mikroalbuminurie podstatný vliv, ovšem u obézních osob je riziko jejího vzniku v přítomnosti této mutace mnohem vyšší.

Nejasné je ale až do dnešní doby, zda opravdu mutace/polymorfismus p. Arg229Gln může být příčinou vzniku NS v pozdějším věku, jak to nastínila ve své práci skupina Tsukaguchi et al. (2002). Proti této hypotéze se totiž postavily některé další skupiny (Hinkes, 2007; McKenzie, 2007).

## 5.2. Rekurence po transplantaci

Další problém se týká rekurence proteinurie po transplantaci ledvin u pacientů s mutacemi v genu *NPHS2*. Bertelli et al. v roce 2003 studovali skupinu 53 dětských pacientů s FSGS. U 12 byla nalezena mutace podocinu a z nich 5 mělo po transplantaci návrat proteinurie a 2 rekurenci FSGS. Překvapivé ovšem bylo, že k rekurenci došlo u více pacientů s jednou mutací *NPHS2* oproti pacientům s dvěma *NPHS2* mutacemi. Navíc se předpokládalo, že rekurence po transplantaci by měla být u pacientů s *NPHS2* mutací mnohem nižší než u pacientů s jinou mutací. Z těchto výsledků tato skupina vyvodila, že se na vzniku onemocnění musí podílet další faktor, čímž se ukázal být cirkulující permeabilní faktor. Již v roce 2002 totiž bylo zjištěno, že u Buffalo/Minnesota potkanů, které mají proteinurii z důvodu 2 autosomálně recesivních mutací, po transplantaci ledvin ze zdravých potkanů proteinurie zůstává. Naopak u transplantace postižených ledvin do zdravých potkanů proteinurie mizí. Tento experiment tedy podporuje názor, že NS je způsoben multifaktoriálním systémem, kde hrají roli jak genetické faktory, tak i permeabilní faktor (Le Berre et al., 2002).

Nemůžeme ovšem opominout ani další studie, ve kterých se snížená rekurence u pacientů s mutací v genu *NPHS2* potvrdila. Je to například studie z roku 2008 (Furue et al.), kdy se rekurence po transplantaci objevila u 30% pacientů s mutací v jiném genu než *NPHS2*, oproti pacientům s homozygótní a složenou heterozygótní mutací v *NPHS2*, kde byla rekurence menší než 10%. Ovšem ukázal se podobný výsledek jako v předchozí studii, že u pacientů s *NPHS2* mutací pouze na jedné alele je pravděpodobnost rekurence mnohem větší než u homozygotů či složených heterozygotů (zde 65%). Není ovšem možné vyvozovat z

těchto pozorování nějaké výsledky, neboť zde byla sledována pouze malá skupina pacientů (11).

Větší váhu má studie z roku 2004 (Weber et al.), kde byla provedena mutační analýza u 338 pacientů z 272 rodin s nefrotickým syndromem rezistentním na steroidy (SRNS). U 32 pacientů s 2 patogenickými mutacemi (hlavně mutace způsobující posun čtecího rámce, zkrácení proteinu či missense p. Arg138Gln) byla rekurence pozorována pouze u jednoho pacienta, narozdíl od 3 (z 25) pacientů s rekurencí s *NPHS2* mutací pouze na jedné alele.

Z těchto výsledků lze tedy vyvodit, že rekurence onemocnění po transplantaci ledvin je u homozygotní a složené heterozygotní *NPHS2* mutace mnohem méně častá než u heterozygotní mutace, kde pravděpodobně velkou roli ve vypuknutí autosomálně recesivní nemoci hraje porucha exprese cirkulujícího permeabilního faktoru či ztráta jeho inhibitoru.

### 5.3. Typ mutace a věk progresu

Další řešená otázka je, zda typ mutace ovlivňuje věk progresu onemocnění, což naznačili ve své práci již Tsukaguchi et al. (2002). Zde se výzkumy vcelku shodují, že 2 mutace (a to hlavně mutace způsobující zkrácení proteinu, posun čtecího rámce či p. Arg138Gln missense) ve většině případů vedou ke vzniku NS již v dětském věku (kolem 1 roku, s rozptylem od narození do 5,5 roku života). Takto vzniklý NS má mnohem závažnější příznaky, ovšem rekurence po transplantaci ledvin je mnohem méně pravděpodobnější než u pacientů s heterozygotní či složenou heterozygotní mutací v genu *NPHS2* (Weber et al., 2004; McKenzie et al., 2007; Hinkes et al., 2008).

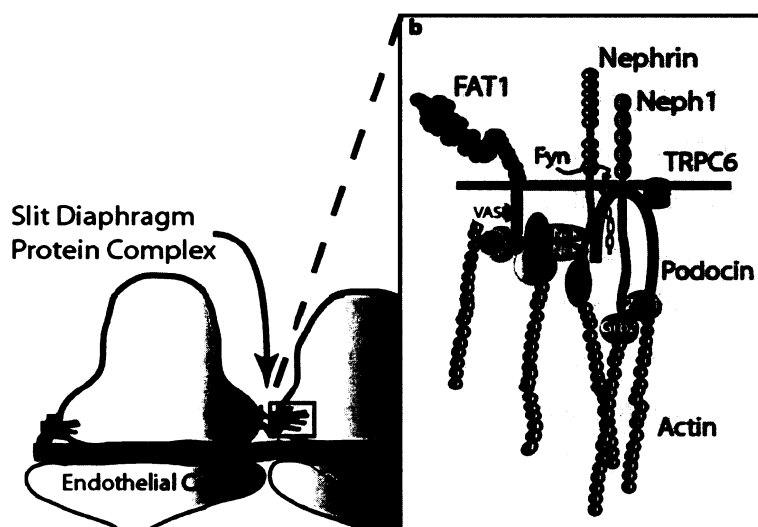
## 6. PODOCIN

Protein kódovaný genem *NPHS2* se nazývá podocin a je to protein dlouhý 383 aminokyselin s přibližnou molekulovou hmotností 42 kDa. Byl objeven v roce 2000 a pojmenován podocin podle jeho exprese v glomerulárních podocytech (Boute et al., 2000). Díky porovnávání aminokyselinové sekvence podocinu se sekvencemi v proteinové databázi Prosite bylo také zjištěno, že má podocin 47% identitu a 67% podobnost s lidským stomatinem. Je tedy zařazen do rodiny stomatinů.

Podocin se začíná v podocytech exprimovat kolem 12. týdne stáří plodu (v této době jsou ještě podocyty ve stádiu diferenciaci, kdy mají typický S-tvar) a je zde exprimován až do konce života. Navíc bylo zjištěno, že v embryonální fázi vývoje je podocin exprimován i

v buňkách srdce. Mutace *NPHS2* by tedy mohla mít vliv na vznik srdečních poruch (Frishberg et al., 2005) (viz dále).

Podocin je membránový protein, který se v podocytech vyskytuje výhradně v pedicelách v místě úchyty „slit diaphragm“ a tvoří, stejně jako stomatin, vlásečkovitou strukturu. Díky hydrofóbní doméně umístěné přibližně mezi aminokyselinami 103-125 (SMART, Simple Modular Architecture Research Tool) je orientován do vnitřního listu lipidové dvojvrstvy s N a C koncem směřujícími do cytoplasmy. Jak bylo v posledních letech zjištěno, podocin tvoří homooligomerní komplexy, které obsahují přibližně 20-50 molekul a váže se k proteinům nephrinu, Neph1, CD2AP a TRPC6 (viz obr. 8). Mutace v některém z těchto proteinů pak mohou způsobit poruchu ve funkci „slit diaphragm“ jako filtrační bariéry, což je doprovázeno silnou proteinurií.



Obr.8: Detail podocytárního proteinového komplexu v místě úchyty „slit diaphragm“. Převzato a upraveno z Garg, Verma, Holzman, 2007.

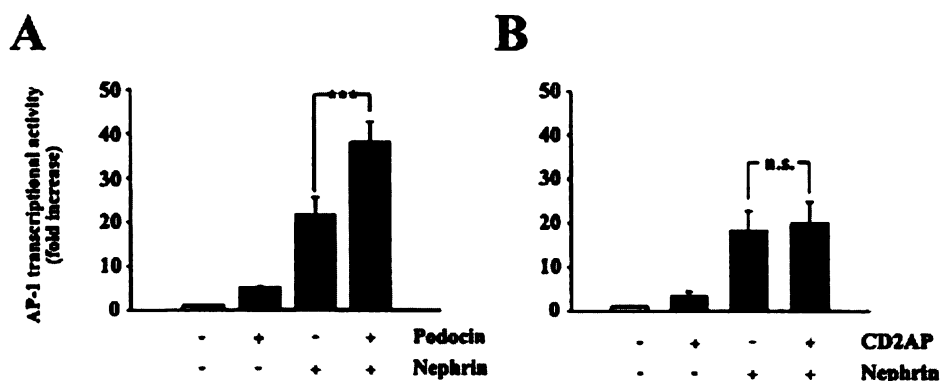
### 6.1. Interakce podocin – nephrin – CD2AP

Nephrin je protein kódovaný genem *NPHS1* nacházejícím se na chromosomu 19 (19q13.1) a jeho mutace, kterých bylo zatím nalezeno více než 70, způsobují kongenitální nefrotický syndrom finského typu (CNF) s autosomálně recesivní dědičností (Tesař, Zima, 2008). Jeho molekulární hmotnost je přibližně 135 kDa a jedná se o transmembránový protein, který se nachází ve „slit diaphragm“ podocytů. Je tvořen extracelulární N koncovou částí obsahující 8 imunoglobulinům podobných domén a jednou doménou podobnou fibronektinu typu III, dále transmembránovou a krátkou cytosolovou C doménou (Kestilä et al., 1998). Cytosolovou

doménou se váže k C terminální doméně podocinu, zatímco jeho extracelulární doména interaguje s doménami nephrinu a Neph1 sousední pedicely, čímž se vytváří základ „slit diaphragm“ (Garg, Verma, Holzman, 2007).

Nephrin ovšem není jen adhezní molekula propojující podocyty, ale má význam také jako molekula účastnící se regulačních procesů. Bylo totiž zjištěno, že nephrin, Neph1 a podocin vytvářejí receptorový komplex hrající roli ve strukturní dynamice pedicel (Huber et al., 2001; Schwarz et al., 2001; Garg, Verma, Holzman, 2007). Reorganizace cytoskeletu se pedicel týká hlavně během vývoje kuboidálních podocytů, které se diferencují v dospělé rozvětvené buňky. Dále ovšem reorganizace cytoskeletu hraje roli při poškození podocytů v procesu splývání pedicel („foot process effacement“). Signální dráha umožňující tyto změny je zprostředkována protein kinázami (např. Fyn, Yes, Tec), které interagují s komplexem nephrin-Neph1-podocin a fosforylují nephrin na tyrosinových zbytcích. Konkrétně bylo zjištěno, že protein kinázy pravděpodobně fosforylují nephrin na jeho třech cytosolických motivech 1176-YDEV, 1193-YDEV, 1217-YDQV (Jones et al., 2006). Na tyto fosfotyrosinové zbytky se poté mohou vázat SH2 domény adaptorových proteinů (např. rodiny Nck). Tyto adaptory pak zprostředkovávají vazbu dalších proteinů (N-WASP, Arp2/3 komplex) nezbytných k nukleaci a řízení aktinové polymerace (Jones et al., 2006; Garg, Verma, Holzman, 2007). U této dráhy bylo také zjištěno, že i protein Neph1 je schopen vázat adaptorový protein (Gbr2) a koordinovat tak aktinovou polymeraci. Navíc se díky pokusům Li et al. (2004) ukázalo, že fosforylace nephrinu díky kinásám Src rodiny usnadňuje jeho vazbu k podocinu. Neboť podocin neobsahuje žádné fosfotyrosin-vazebné domény, je pravděpodobné, že fosforylace způsobí konformační změnu nephrinu, který má pak větší afinitu k podocinu.

Navíc je nephrin molekula účastnící se signální dráhy stimulující mitogen-aktivovanou protein kinasu (MAPK, a to konkrétně p38 a JNK (Huber et al., 2001), ale i ERK (Ohashi et al., 2003)), čímž ovlivňuje aktivaci AP-1 transkripčního faktoru. Takto vyvolaná signalizace je značně podporovaná podocinem, který se váže k cytoplasmatickému konci nephrinu (Huber et al., 2001). To bylo dokázáno v pokusu, kdy byly vzaty HEK (human embryonic kidney) 293T buňky, které postrádají expresi nephrinu, podocinu a CD2AP. Tyto buňky pak byly transfekovány AP-1-dependentním luciferásovým konstruktem a expresním plazmidem. Jak je vidět, podocin způsobil zvýšení AP-1-dependentní luciferásové aktivity (obr. 9A). Lze tedy předpokládat, že porucha exprese podocinu či nephrinu, nebo jejich abnormální struktura způsobená mutacemi může ovlivnit MAP kinásovou kaskádu, a tím potažmo aktivaci AP-1, což způsobí dysfunkci podocytů a ovlivní strukturní integritu „slit diaphragm“.



**Obr.9: Podocin zvyšuje nephrinem zprostředkovanou AP-1 aktivaci.**

**A**, HEK 293T buňky exprimující pouze podocin zvyšují luciferásovou aktivitu jen velmi mírně, ovšem v přítomnosti nephrinu dochází k 20násobnému zvýšení a pokud je exprimován jak nephrin tak podocin, je nárůst aktivity až 40násobný.

**B**, zde je jasně vidět, že přítomnost CD2AP ovlivňuje luciferásovou aktivitu jen velmi málo. Lze tedy říci, že CD2AP nemá na aktivaci AP-1 téměř žádný vliv. Převzato z Huber et al., 2001.

CD2AP (CD2-associated protein) je cytosolický protein s molekulární hmotností 80 kDa, který se váže k COOH konci podocinu a k nephrinu. Navíc obsahuje aktin-vazebné místo a díky třem SH3 doménám ukotvuje CD2 a další vazebné partnery (Welsch et al., 2005; Wolf, Stahl, 2003). Slouží tedy jako protein ukotvující intercelulární spoje s cytoskeletární kostrou podocyty, čímž udržuje jeho strukturu.

Spolu s nephrinem se tento protein účastní signalizační dráhy, která začíná vazbou a stimulací PI3K oběma proteiny a končí aktivací AKT (Ser/Thr kináza) fosforylující Bad (Bcl-2-associated death promoter), což je proapoptotický protein, který se tak stává inaktivním (Wolf, Stahl, 2003). To znamená, že poškození „slit diaphragm“ by mohlo snížit aktivitu této dráhy, což by vedlo k apoptóze podocytárních buněk.

Studie Huber a spolupracovníků (2001), která dokázala, že podocin hraje pozitivní roli v signalizační dráze nephrinu, se také zaměřila na význam proteinu CD2AP, a to podobným pokusem jako u podocinu. Bylo ovšem zjištěno, že po expresi CD2AP se signál aktivovaného AP-1 téměř nezměnil (obr. 9B). Z toho lze tedy odvodit, že CD2AP nemá v této signalizační dráze podstatnou roli.

## 6.2. Interakce podocin – TRPC6

Další protein, který je podocinem vázán, je TRPC6. Tento protein patří do rodiny neselektivních TRP (transient receptor potential) iontových kanálů (Walz, 2005) a skládá se ze 6 transmembránových domén a N a C terminálních domén směřujících do cytoplasmy. TRPC6 může být aktivován diacylglycerolem vzniklým působením fosfolipázy C (PLC), avšak je také možné, že dokáže reagovat na mechanický stimul, neboť příslušník stejné skupiny iontových kanálů, TRPC1, je součástí mechanosensorického komplexu (Huber et al., 2007). Tyto kanály jsou tedy pravděpodobně důležité pro mechanickou sensitivitu „slit diaphragm“ a jejich mutace způsobuje fokální segmentální glomerulosklerózu s autosomálně dominantní dědičností, která se objevuje hlavně ve třetí a čtvrté dekádě života.

V roce 2006 byl podocin zařazen do skupiny proteinů s PHB (prohibitin homology) doménou (Huber et al., 2006). Tato skupina obsahuje přibližně 1800 proteinů, které sdílí asi 150 aa dlouhou PHB doménu podobnou mitochondriálnímu proteinu prohibitinu. Všechny tyto proteiny mají funkci regulátorů buněčné signalizace, osmotické homeostázy, vnímání mechanických podnětů atd. Podocin ovlivňuje aktivitu TRPC6 iontového kanálu, a to díky interakci cholesterol-podocin-TRPC6. Podocin je k cholesterolu vázán díky PHB doméně (v rámci níž jsou i 2 kovalentně navázané palmitoylové zbytky), což bylo dokázáno pokusem, kdy byla tato doména z proteinu odstraněna a ten se již nemohl k cholesterolu vázat. Navíc efektivitu této vazby zvyšuje sousední hydrofóbní doména. Podocin je tedy s rafty asociovaný protein, který se vyskytuje hlavně v oblastech plazmatické membrány podocytů bohatých na cholesterol. Není ještě přesně jasné, jakým mechanismem cholesterol ovlivňuje podocin a potažmo aktivitu iontového kanálu, ale předpokládá se, že cholesterol změní vlastnosti lipidické dvojvrstvy (ztuhnutí, rozšíření), tím se změní okolí proteinů, což má dopad na jejich strukturu a následně i funkci (Huber et al., 2006).

Zajímavé je, že TRPC6 obsahuje AKT-fosforylační místo, na které se po fosforylaci Ser94 mohou vázat 14-3-3 proteiny ovlivňující rozmístění iontových kanálů. Nephriem zprostředkovaná aktivace AKT by mohla ovlivnit subcelulární lokalizaci TRPC6 (Walz, 2005).

## 6.3 Interakce podocin – Neph1

Neph1 je protein exprimovaný převážně v ledvinách a patří (stejně jako nephrin) do imunoglobulinové rodiny proteinů. V extracelulární části má 5 imunoglobulinům podobných domén, dále transmembránovou doménu a intracelulární doménu, která obsahuje Grb2 (tedy SH2) vazebné místo. Vazba podocinu k Neph1 je umožněna vazebným místem na C konci

Neph1, které je složeno z 9 konzervovaných aminokyselin (KDPTNGYYxV) (Sellin et al., 2003). Sellin et al. také zjistili, že vazba podocin-Neph1 je regulována protein kinásou (Src rodina). To proto, že Neph1 obsahuje vazebné místo pro tuto kinázu a navíc obsahuje i motiv PxxxY, který tyto kinázy rozlišují.

#### 6.4. Mutační změna podocinu

Jak již bylo řečeno, vyskytuje se podocin převážně v plazmatické membráně v místě úchyty „slit diaphragm“. Jaký účinek bude mít na toto umístění mutace *NPHS2* zjišťovala skupina Ohashi et al. (2003). Analyzovali subcelulární lokalizaci podocinu s missense mutací p. Arg138Gln oproti wild-type a zjistili, že mutovaný podocin se shromažďuje v endoplazmatickém retikulu (ER). Dále ovšem zjistili, že takto mutovaný protein může být vhodnými chemickými chaperony správně sbalen a přesměrován do plasmatické membrány. Tento závěr by tedy mohl mít velký vliv na vývoj léčiv.

Jiná skupina (Roselli et al., 2004) do svého experimentu zahrnula dokonce 12 *NPHS2* mutací (11 missense a 1 delece bez posunu čtecího rámce), jejichž rozložení bylo po celé délce genu. Tři mutace (p. Gly92Cys, p. Val180Met a p. Arg238Ser) neměly význam na umístění podocinu, který byl správně směřován do plasmatické membrány. Osm mutací (p. Pro118Leu, p. Asp160Gly, p. Arg138Gln, p. Arg168Ser, p. Arg168Cys, p. Arg168His, p. Val260Glu a p. Leu236delGlu237Arg238Lys239) způsobilo hromadění podocinu v endoplasmatickém retikulu. Poslední p. Arg291Trp mutace způsobila umístění podocinu v pozdním endosomu. Vzhledem k tomu, že putování podocinu z místa jeho vzniku do plazmatické membrány je zajištěno klasickou sekreční dráhou (ER-GA), je možné, že nesprávně sbalený (mutovaný) podocin je zadržován v ER. Jiný mechanismus je předpokládán u podocinu vyskytujícího se v pozdním endosomu. Zde hypotéza zní, že by mohlo u takto mutovaného podocinu docházet k silnější vazbě s CD2AP, který se účastní procesu endocytózy a vyskytuje se tak v endosomech (Roselli et al., 2003). Navíc tato skupina porovnávala typ mutací s dobou vzniku onemocnění a zjistila, že mutace směřující podocin do ER způsobují vznik onemocnění v nižším věku, než mutace, kdy je podocin správně směřován do plasmatické membrány. Zde je průměrný věk vzniku onemocnění přibližně 21 let.

#### 6.5. Podocin a srdeční poruchy

V roce 2006 Frishberg et al. provedli měření srdečních parametrů u dětí s nefrotickým syndromem resistantním na steroidy (SRNS), neboť si povšimli časté společné incidence

nefrotického syndromu a srdečních poruch. Vzali skupinu 22 dětí se SRNS (z 6 nepříbuzných rodin arabského původu) a provedli mutační analýzu genu *NPHS2*. U všech dětí zjistili homozygotní nonsense mutaci p. Arg138X. 18 těchto dětí prošlo vyšetřením srdečních parametrů (fyzikální vyšetření, rentgen hrudníku, ekg a echokardiografie) a u 16 (89%) byly zjištěny srdeční abnormality. Nejčastější nalezená porucha byla hypertrofie levé komory u 8 dětí, dále stenóza plicnice u 6 dětí a po jednom Ebsteinova anomálie trikuspidální chlopně a defekt síňového septa. Pouze 2 děti měly normální srdeční nález. Aby se vyloučila role jiné mutace způsobující nefrotický syndrom, byla provedena měření srdečních parametrů u kontrolní skupiny pacientů (22) s persistentním NS, který nebyl způsoben mutací *NPHS2*. U těchto pacientů nebyla nalezena ani jediná výchylka v srdeční funkci.

Jak už bylo zmíněno, předpokládá se, že vztah mezi mutací *NPHS2* a srdečními poruchami by mohl spočívat v tom, že podocin je v embryonálním vývoji exprimován nejen v glomerulech, ale i v buňkách srdce. Ovšem potvrzení či vyvrácení této hypotézy je otázkou dalšího výzkumu.



## 7. ZÁVĚR

Zásadním krokem v odhalování příčin vzniku FSGS byl objev geneticky podmíněné FSGS. Postupem doby tak byly určeny geny, jejichž mutace mají vliv na vznik tohoto onemocnění, a jejich proteinové produkty. Zkoumání interakcí těchto proteinů, ale také odhalení jejich působení v signálních drahách, otevřelo široké pole pro další výzkum. Je totiž zřejmé, že objasnění jejich funkcí a mutačních změn by mělo podstatný vliv na klinickou praxi. Jak se ukazuje, je FSGS diagnóza zapříčiněná od genetických mutací až po mechanická poškození, s různou odpovědí na imunosupresivní léčbu a s rozdílnou rekurencí po transplantaci ledvin. Je tedy důležité, aby se další výzkum orientoval na vymezení a charakterizaci FSGS vznikající z různých příčin, neboť by toto odlišení mělo význam v efektivní léčbě pacientů.

## **8. PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych ráda poděkovala Ing. Jitce Štekové za její ochotnou pomoc a rady při psaní bakalářské práce, MUDr. Haně Šafránkové za odborné konzultace a poskytnutí některých článků a dále MUDr. Janě Reiterové, Ph.D. za důkladné pročtení mé práce a řadu konstruktivních připomínek.

## 9. SEZNAM LITERATURY

Asano, T., Niimura, F., Pastan, I., Fogo, A.B., Ichikawa, I. and Taiji Matsusaka (2005): Permanent Genetic Tagging of Podocytes: Fate of Injured Podocytes in a Mouse Model of Glomerular Sclerosis. *J Am Soc Nephrol* 16: 2257- 2262

Aucella, F., De Bonis P., Gatta, G., Muscarella, L.A., Vigilante, M., di Giorgio, G., D'Errico, M., Zelante, L., Stallone, C., Bisceglia, L. (2005): Molecular Analysis of *NPHS2* and *ACTN4* Genes in a Series of 33 Italian Patients Affected by Adult-Onset Nonfamilial Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Nephron Clin Pract* 99: c31-c36

Bariety, J., Mandet, CH., Hill, G.S., Bruneval, P. (2006): Parietal Podocytes in Normal Human Glomeruli. *J Am Soc Nephrol* 17: 2770–2780

Bertelli, R., Ginevri, F., Caridi, G., Dagnino, M., Sandrini, S., Di Duca, M., Emma, F., Sanna-Cherchi, S., Scolari, F., Neri, T.M., Murer, L., Massella, L., Basile, G., Rizzoni, G., Perfumo, F. and Ghiggeri, G.M. (2003): Recurrence of Focal Segmental Glomerulosclerosis After Renal Transplantation in Patients With Mutations of Podocin. *Am J Kidney Dis* 41: 1314-1321

Boute, N., Gribouval, O., Roselli, S., Benessy, F., Lee, H., Fuchshuber, A., Dahan, K., Gubler, M.C., Niaudet, P., Antignac, C. (2000): *NPHS2*, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nature Genetics* 24: 349- 354

Caridi, G., Bertelli, R., di Duca, M., Dagnino, M., Emma, F., Muda, A.O., Scolari, F., Miglietti, N., Mazzucco, G., Murer, L., Carrea, A., Massella, L., Rizzoni, G., Perfumo, F., Ghiggeri, G.M. (2003): Broadening the Spectrum of Diseases Related to Podocin Mutations. *J Am Soc Nephrol* 14: 1278–1286

D'Agati, V. (1994): The many masks of focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney International* 46: 1223- 1241

D'Agati, V.D. (2008): Podocyte injury in focal segmental glomerulosclerosis: Lessons from animal models (a play in five acts). *Kidney International* 73: 399–406

D'Agati, V.D., Fogo, A.B., Bruijn J.A., Jennette J.CH. (2004): Pathologic Classification of Focal Segmental Glomerulosclerosis: A Working Proposal. *American Journal of Kidney Diseases* 43: 368-382

Deegens, J.K.J., Steenbergen, E.J., Wetzels, J.F.M. (2008): Review on diagnosis and treatment of focal segmental glomerulosclerosis. *The Netherlands Journal of Medicine* 66: 3- 12

Egido, J. (1996): Vasoactive hormones and renal sclerosis. *Kidney International* 49: 578—597

Franceschini, N., North, K.E., Kopp, J.B., Mckenzie, L., Winkler, CH. (2006): *NPHS2* gene, nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis: A HuGE review. *Genet Med* 8: 63–75

Frishberg, Y., Feinstein, S., Rinat, CH., Becker-Cohen, R., Lerer, I., Raas-Rothschild, A., Ferber, B., Nir, A. (2006): The Heart of Children with Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome: Is It All Podocin? *J Am Soc Nephrol* 17: 227–231

Fuchshuber, A., Gribouval, O., Ronner, V., Kroiss, S., Karle, S., Brandis, M., Hildebrandt, F. and members of the APN Study Group (2001): Clinical and Genetic Evaluation of Familial Steroid-Responsive Nephrotic Syndrome in Childhood. *J Am Soc Nephrol* 12: 374–378

Furue, T., Hattori, M., Tsukaguchi, H., Kitamura, A., Oomori, T., Ogino, D., Nakakura, H., Ashida, A., Miura, K., Hisano, M., Takahashi, K., Chikamoto, H., Akioka, Y., Sakano, T. (2008): Clinical features and mutational survey of *NPHS2* (podocin) in Japanese children with focal segmental glomerulosclerosis who underwent renal transplantation. *Pediatr Transplantation* 12(3): 341- 346

Garg, P., Verma, R., Holzman, L.B. (2007): Slit Diaphragm Junctional Complex and Regulation of the Cytoskeleton. *Nephron Exp Nephrol* 106: e67–e72

Haas, M., Meehan, S.M., Karrison, T.G., Spargo, B.H. (1997): Changing etiologies of unexplained adult nephrotic syndrome: a comparison of renal biopsy findings from 1976-1979 and 1995-1997. *Am J Kidney Dis.* 30(5): 621-631

Hinkes, B., Vlangos, CH., Heeringa, S., Mucha, B., Gbadegesin, R., Liu, J., Hasselbacher, K., Ozaltin, F., Hildebrandt, F., and Members of the APN Study Group (2008): Specific Podocin Mutations Correlate with Age of Onset in Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome. *J Am Soc Nephrol* 19: 365–371

Huber, T.B., Köttgen, M., Schilling, B., Walz, G., Benzing, T. (2001): Interaction with Podocin Facilitates Nephrin Signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 41543 – 41546

Huber, T.B., Schermer, B., Benzing, T. (2007): Podocin Organizes Ion Channel-Lipid Supercomplexes: Implications for Mechanosensation at the Slit Diaphragm. *Nephron Exp Nephrol* 106: e27–e31

Huber, T.B., Schermer, B., Müller, R.U., Höhne, M., Bartram, M., Calixto, A., Hagmann, H., Reinhardt, CH., Koos, F., Kunzelmann, K., Shirokova, E., Krautwurst, D., Harteneck, CH., Simons, M., Pavensta, H., Kerjaschki, D., Thiele, CH., Walz, G., Chalfie, M., Benzing, T. (2006): Podocin and MEC-2 bind cholesterol to regulate the activity of associated ion channels. *PNAS* 103: 17079–17086

Jones, N., Blasutig, I.M., Eremina, V., Ruston, J.M., Bladt, F., Li, H., Huang, H., Larose, L., Li, S.S.C, Takano, T., Quaggin, S.E., Pawson, T. (2006): Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes. *Nature* 440: 818-823

- Kestilä, M., Lenkkeri, U., Männikko, M., Lamerdin, J., McCready, P., Putaala, H., Ruotsalainen, V., Morita, T., Nissinen, M., Herva, R., Kashtan, C.E., Peltonen, L., Holmberg, CH., Olsen, A., Tryggvason, K. (1998): Positionally Cloned Gene for a Novel Glomerular Protein—Nephrin—Is Mutated in Congenital Nephrotic Syndrome. *Molecular Cell* 1: 575–582
- Kriz, W. (1996): Progressive renal failure—inability of podocytes to replicate and the consequences for development of glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 11: 1738-1742
- Kriz, W., Gretz, N., Lemley, K.V. (1998): Progression of glomerular diseases: Is the podocyte the culprit? *Kidney International* 54: 687–697
- Kriz, W., Hosser, H., Hähnel, B., Gretz, N., Provoost, A.P. (1998): From segmental glomerulosclerosis to total nephron degeneration and interstitial fibrosis: a histopathological study in rat models and human glomerulopathies. *Nephrol Dial Transplant* 13: 2781-2798
- Kriz, W., Kobayashi, N., Elger, M. (1998): New Aspects of Podocyte Structure, Function, and Pathology. *Clin Exper Nephrol* 2: 85-99
- Kriz, W., LeHir, M. (2005): Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases—Insights from animal models. *Kidney International* 67: 404–419
- Le Berre, L., Godfrin, Y., Günther, E., Buzelin, F., Perretto, S., Smit, H., Kerjaschki, D., Usal, C., Cuturi, C., Souillou, J-P and Jacques Dantal (2002): Extrarenal effects on the pathogenesis and relapse of idiopathic nephrotic syndrome in Buffalo/Mna rats. *J. Clin. Invest.* 109: 491–498
- Li, H., Lemay, S., Aoudjit, L., Kawachi, H., Takano, T. (2004): Src-Family Kinase Fyn Phosphorylates the Cytoplasmic Domain of Nephrin and Modulates Its Interaction with Podocin. *J Am Soc Nephrol* 15: 3006–3015
- McKenzie, L.M., Hendrickson, S.H., Briggs, W.A., Dart R.A., Korbet, S.M., Mokrzycki, M.H., Kimmel, P.L., Ahuja, T.S., Berns, J.S., Simon, E.E., Smith, M.C., Trachtman, H., Michel, D.M., Schelling J.R., Cho M., Zhou Y.C., Binns-Roemer E., Kirk G.D., Kopp J.B. and Winkler CH.A. (2007): *NPHS2* Variation in Sporadic Focal Segmental Glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 18: 2987–2995
- Monhart, V. (2001): Nefrotický syndrom. *Interní medicína pro praxi* 5: 231-232
- Nair, R. (2006): Focal segmental glomerulosclerosis: Cellular variant and beyond. *Kidney International* 70: 1676–1678
- Ohashi, T., Uchida, K., Uchida, S., Sasaki, S., Nihei, H. (2003): Intracellular mislocalization of mutant podocin and correction by chemical chaperones. *Histochem Cell Biol* 119: 257–264
- Pereira, A.C., Pereira, A.B., Mota, G.F., Cunha, R.S., Herkenhoff, F.L., Pollak, M.R., Mill, J.G., Krieger, J.E. (2004): *NPHS2* R229Q functional variant is associated with microalbuminuria in the general population. *Kidney International* 65: 1026 – 1030

Remuzzi, G., Ruggenenti, P., Benigni, A. (1997): Understanding the nature of renal disease progression. *Kidney International* 51: 2 – 15

Ronco, P. (2007): Proteinuria: is it all in the foot? *J. Clin. Invest.* 117: 2079–2082

Roselli, S., Moutkine, I., Gribouval, O., Benmerah, A. and Antignac, C. (2004): Plasma Membrane Targeting of Podocin Through the Classical Exocytic Pathway: Effect of NPHS2 Mutations. *Traffic* 5: 37–44

Ryšavá, R., Tesař, V., Merta, M. (2005): Nefrotický syndrom. *Interní medicína pro praxi* 3: 131- 134

Sellin, L., Huber, T.B., Gerke, P., Quack, I., Pavenstädt, H., and Walz, G. (2003): NEPH1 defines a novel family of podocin-interacting proteins. *The FASEB Journal* 17:115-117

Schwarz, K., Simons, M., Reiser, J., Saleem, M.A., Faul, CH., Kriz, W., Shaw, A.S., Holzman, L.B., Mundel, P. (2001): Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J. Clin. Invest.* 108:1621–1629

Smeets, B., Te Loeke, N.A.J.M., Dijkman, H.B.P.M., Steenbergen, M.L.M., Lensen, J.F.M., Begieneman, M.P.V., Van Kuppevelt, T.H., Wetzels, J.F.M., Steenbergen, E.J. (2004): The parietal epithelial cell: A key player in the pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis in Thy-1.1 transgenic mice. *J Am Soc Nephrol* 15: 928 – 939

Stokes, M.B., Valeri, A.M., Markowitz, G.S., D'Agati, V.D. (2006): Cellular focal segmental glomerulosclerosis: Clinical and pathologic features. *Kidney International* 70: 1783–1792

Tang, W.W., Ulich, T.R., Lacey, D.L., Hill, D.C., Qi, M., Kaufman, S.A., Van, G.Y., Tarpley, J.E. and Yeet, J.S. (1996): Platelet-derived growth factor-BB induces renal tubulointerstitial myofibroblast formation and tubulointerstitial fibrosis. *American journal of Pathology* 148: 1169- 1180

Tesař, V., Schüch, O., Bartoničková, K., Čertíková-Chábová, V., Červenka, L., Engliš, M., Honsová, E., Horáčková, M., Jančová, E., Lácha, J., Lukáč, M., Merta, M., Opatrná, S., Opatrný, K., Reiterová, J., Ryšavá, R., Teplan, V., Viklický, O., Vítko, Š. *Klinická nefrologie*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., 2006. 652 s.

Tesař, V., Zima, T. (2008): Recent Progress in the Pathogenesis of Nephrotic Proteinuria. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 45:2 139 – 220

Tryggvason, K., Patrakka, J., Wartiovaara, J. (2006): Hereditary Proteinuria Syndromes and Mechanisms of Proteinuria. *N Engl J Med* 354: 1387-401

Tsukaguchi, H., Sudhakar, A., Le, T.C., Nguyen, T., Yao, J., Schwimmer, J.A., Schachter, A.D., Poch, E., Abreu, P.F., Appel, G.B., Pereira, A.B., Kalluri, R. and Pollak, M.R. (2002): NPHS2 mutations in late-onset focal segmental glomerulosclerosis: R229Q is a common disease-associated allele. *J. Clin. Invest.* 110:1659–1666

Walz, G. (2005): Slit or pore? A mutation of the ion channel TRPC6 causes FSGS. *Nephrol Dial Transplant* 20: 1777–1779

Weber, S., Gribouval, O., Esquivel, E.L., Morinière, V., Tête, M.J., Legendre, CH., Niaudet, P., Antignac, C. (2004): NPHS2 mutation analysis shows genetic heterogeneity of steroid-resistant nephrotic syndrome and low post-transplant recurrence. *Kidney International* 66: 571–579

Wolf, G., Stahl, R.A.K. (2003): CD2-associated protein and glomerular disease. *Lancet* 362: 1746–48

*The Human Gene Mutations Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff* [online]. 2008 [cit. 2008-08-11]. Dostupný z WWW: <<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=NPHS2>>.

*SMART : a Simple Modular Architecture Research Tool* [online]. 2006 [cit. 2008-08-02]. Dostupný z WWW: <[http://smart.embl.de/smart/show\\_motifs.pl?ID=Q9NP85](http://smart.embl.de/smart/show_motifs.pl?ID=Q9NP85)>.