

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

**Autoreferát disertační práce**



**Genetický podklad vybraných chronických nefropatií**

MUDr. Hana Šafránková

2013

Doktorské studijní programy v biomedicíně

***Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky***

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

Školící pracoviště: 1.LF UK

Školitel: Prof. MUDr. Miroslav Merta, CSc.

Konzultant: Doc. MUDr. Jana Reiterová, Ph.D.

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

## OBSAH

|  |    |
|--|----|
| ABSTRAKT (česky).....  | 4  |
| ABSTRAKT (anglicky) .....  | 5  |
| 1. ÚVOD.....   | 6  |
| 1.1. Ledviny a filtrace krve .....   | 6  |
| 1.2. Podocin .....   | 7  |
| 1.3. Nefrotický syndrom .....  | 7  |
| 1.4. Minimální změny glomerulů.....  | 9  |
| 1.5. Fokální segmentální glomeruloskleróza.....                                      | 9  |
| 1.6. Vaskulární endotelový růstový faktor .....                                      | 9  |
| 2. CÍLE PRÁCE.....   | 10 |
| 3. MATERIÁL A METODIKA .....   | 10 |
| 3.1. Pacienti.....   | 10 |
| 3.2. Metody.....   | 11 |
| 3.2.1. Izolace genomové DNA.....   | 11 |
| 3.2.2. Mutační analýza <i>NPHS2</i> genu.....  | 11 |
| 3.2.3. PCR.....  | 11 |
| 3.2.4. Metoda high resolution melting.....   | 11 |
| 3.2.5. Sekvence.....   | 12 |
| 3.2.6. Analýza polymorfismů p.R229Q a p.P20L <i>NPHS2</i> genu.....                  | 12 |
| 3.2.7. Mutační analýza polymorfismů -2578(A/C) a -1154(A/G) v genu <i>VEGF</i> ..... | 13 |
| 3.3. Statistika.....   | 13 |
| 4. VÝSLEDKY.....   | 13 |
| 4.1. Mutační analýza <i>NPHS2</i> genu.....  | 13 |
| 4.2. Analýza polymorfismů p.P20L a p.R229Q <i>NPHS2</i> genu.....                    | 14 |
| 4.3. Analýza polymorfismů <i>VEGF</i> .....  | 15 |
| 5. DISKUSE.....  | 15 |
| 5.1. Mutace v genu <i>NPHS2</i> .....  | 15 |
| 5.2. Rekurence FSGS ve štěpu po transplantaci ledviny .....                          | 16 |
| 5.3. Polymorfismy v <i>NPHS2</i> genu: p.R229Q, p.P20L .....                         | 17 |
| 5.4. Vaskulární endotelový růstový faktor .....                                      | 17 |
| 6. ZÁVĚRY .....  | 18 |
| 7. POUŽITÁ LITERATURA.....   | 19 |
| 8. SEZNAM PUBLIKACÍ.....   | 22 |

## ABSTRAKT

**Klíčová slova:** nefrotický syndrom, FSGS, MCD, podocin, *NPHS2*, polymorfismy *VEGF*

Nefrotický syndrom (NS), způsobený nemocí minimálních změn glomerulů (MCD) nebo fokální segmentální glomerulosklerózou (FSGS), má asi ve 20% případů genetický podklad způsobený mutacemi v genu *NPHS2* kódujícím protein podocin, který hraje důležitou roli ve filtrační bariéře ledvin. Cílem této práce bylo zavedení mutační analýzy genu *NPHS2* a vyšetření souboru pacientů s NS. Bylo vyšetřeno 71 pacientů s FSGS/MCD a na základě výsledků byly testovány 2 časté polymorfismy v *NPHS2* (p.R229Q a p.P20L) i v souboru pacientů s dalšími glomerulonefritidami (GN): IgA nefropatie (IGAN) (n=169), membranozní GN (MGN) (n=46), a v kontrolní skupině (n=300). Dále byly vyšetřeny 2 polymorfismy nacházející se v promotoru genu vaskulárního endotelového růstového faktoru (*VEGF*) (-2578 A/C a -1154 A/G) a ovlivňující hladinu jeho exprese. VEGF je produkován specializovanými ledvinovými buňkami, tzv. podocyty a má funkci v tvorbě cév a fenestraci kapilár. Vyšetřovaný soubor obsahoval 56 pacientů s FSGS/MCD, 113 s IGAN, 44 s MGN a 311 kontrol. U pacientů s FSGS/MCD vzniklým v dospělosti nebyla nalezena mutace v *NPHS2*. Byla nalezena 1 homozygotní mutace p.V290M u pacientky s FSGS vzniklou ve 3 letech a dále nepopsaná heterozygotní varianta v nekonzervované oblasti genu *NPHS2* p.G97S s nejasným významem u pacienta s FSGS od dětství. U 1 pacientky byla nalezena kombinace polymorfismů. Frekvence polymorfismu p.R229Q byla u pacientů i kontrol kolem 10%. Aní u jednoho z polymorfismů *VEGF* jsme nepotvrdili signifikantní vliv na progresi onemocnění. Byl naznačen negativní efekt CC genotypu -2578 C/A polymorfismu na klinický průběh MCD/FSGS.

## ABSTRACT

Keywords: nephrotic syndrome, FSGS, MCD, podocin, *NPHS2*, *VEGF* polymorphisms

Nephrotic syndrome (NS), caused by minimal change disease (MCD) and focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) has about 20% of the genetic background caused by mutations in the *NPHS2* gene encoding protein podocin that plays an important role in the kidney filtration barrier. The aim of this work is to introduce mutation analysis of the *NPHS2* gene and to examine the sample of Czech patients with NS. We examined 71 patients with FSGS/MCD and subsequently, on the basis of these data we tested two common polymorphisms in *NPHS2* (p.R229Q and p.P20L) in the group of patients with different glomerulonephritides (GN): IgA nephropathy (IGAN) (n = 169), membranous GN (MGN) (n = 46) and control group (n = 300). We also examined two polymorphisms located in the promoter of vascular endothelial growth factor (VEGF) (-2578 A/C, -1154 A/G) and influencing the level of its expression. VEGF is produced by specialized kidney cells called podocytes and has a function in the formation of blood vessels and capillary fenestration. The sample included 56 patients (pts) with FSGS/MCD, 113 pts with IGAN, 44 pts with MGN and 311 controls. No mutation in *NPHS2* gene was found in patients with FSGS/MCD arising in adulthood. We detected one homozygous mutation p.V290M in patient with FSGS which occurred in the third year of life and a previously undescribed heterozygous variant p.G97S in non-conserved region of the *NPHS2* gene with an unclear significance in patient with FSGS since childhood. In one patient the combination of polymorphisms was found. The frequency of p.R229Q polymorphism in patients and controls has been around 10%. Regarding polymorphisms of *VEGF*, no significant impact on disease progression was confirmed. We suggested slightly negative effect of the CC genotype -2578 C/A polymorphism on the clinical course of MCD/FSGS.

## 1. ÚVOD

Chronická nefropatie, nebo-li vleklé onemocnění ledvin, je obecný termín popisující nemoci ledvin, které se projevují sníženou funkcí ledvin, nálezem bílkoviny či krve v moči, změnou množství moči a v neposlední řadě zánětem ledvin vedoucím k postupnému zhoršování ledvinných funkcí, které vede až k nezvratnému selhání ledvin s nutností náhrady funkce. Zjišťování příčin těchto obtíží je důležité pro pochopení patogeneze jednotlivých onemocnění a možnost účinně terapeuticky vstoupit do stávajících dějů se snahou selhání ledvin oddálit či odvrátit. V posledních letech stoupá zájem o studium genetického podkladu jednotlivých onemocnění a vlivu určitých polymorfismů ve sledovaných genech na onemocnění ledvin.

### 1.1. Ledviny a filtrace krve

K filtraci krve a vzniku primární moči dochází v ledvinových glomerulech, z nichž je odváděna proximálním tubulem do distálních částí nefronu. Glomerulus je tvořen klubičkem vlásečnic, které je obklopeno Bowmanovým pouzdrem. Filtrační bariéra je tvořena 3 vrstvami. Jsou to: fenestrované endotelium kapilár, glomerulární bazální membrána (GBM) a viscerální epiteliální buňky tzv. podocyty, mezi nimiž se rozprostírá nejdůležitější složka filtrační bariéry, membrána zvaná slit diaphragm (SD, český překlad neexistuje). *Endotelové buňky* mají v časných stádiích vývoje glomerulu kuboidální tvar a nejsou fenestrované (1). Během vývoje kapilár dochází nejprve k tvorbě překrytých otvorů, ty se postupně přemění na otvory velikosti 60-80nm postrádající membránu (2). Zjištění, že podocytní buňky, které k endotelovým buňkám kapilár přiléhají z druhé strany GBM, produkují vysokou hladinu vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF) vedl k hypotéze, že by VEGF mohl ovlivňovat fenestraci endotelu (3). VEGF představuje rodinu růstových faktorů, které hrají roli v signálních drahách zapojených v migraci, proliferaci či permeabilitě buněk (4). Účastní se signálních drah aktivovaných jak ve vaskulogenezi, tak v angiogenezi (5). Aktivačním faktorem tvorby cév je hypoxie (6). Produkce VEGF začíná v podocytních buňkách před fenestrací endotelia kapilár a je udržována celý život. VEGF receptory jsou v glomerulech umístěny právě v endotelových buňkách kapilár, a tak mohou podocyty regulovanou produkcí VEGF ovlivňovat filtrační vlastnosti fenestrovaných kapilár. Ztráta produkce VEGF během vývoje vede ke zúžení glomerulárního endotelia a ztrátě fenestrace. Naopak zvýšená exprese způsobuje kolaps kapilárních klíček. VEGF hraje roli i v regeneraci poškozených kapilár, která je zásadní v léčbě glomerulonefritid (GN). Další složkou filtrační bariéry ledvin je **glomerulární bazální membrána** tvořená vláknitou sítí fibrilárních proteinů (převážně kolagen IV)

spolu s negativně nabitými proteoglykany (7). Svrchní vrstvu filtrační bariéry glomerulu tvoří specializované endotelové buňky zvané **podocyty**, hrající důležitou roli v udržování funkční a neporušené filtrační bariéry. Podocyty syntetizují většinu složek GBM (8). Strukturně mají podocyty objemné tělo vystupující do prostoru Bowmanova pouzdra a dlouhé, prolínající se, rozvětvené výběžky (pedicely, „foot processes“), které pokrývají celý povrch kapilár. Výběžky podocytů jsou vyztuženy aktinovými filamenti a dokážou tak dynamicky – změnou svého tvaru – regulovat míru filtrace. Mezi pedicelami podocytů se rozprostírá tenká proteinová membrána, tzv. „slit diaphragm“ (SD)(9). Hlavní součástí této membrány je protein nefrin (10), (11), (12), (13). Postupně došlo k objevení dalších proteinů, jež tvoří „slit diaphragm“, a začaly se objasňovat i jejich funkce a vzájemné interakce. Ukázalo se tedy, že SD je vlastně složitý komplex adhezních a signálních molekul, které hrají roli nejen jako mechanické síto, ale také jako receptory a přenašeče signálů vedoucích do podocytů.

### 1.2. Podocin

Jedním z proteinů tvořících „slit diaphragm“ je i protein zvaný podocin. Je kódován na dlouhém raménku 1. chromozomu (1q25-31) a je tvořen 8 exony. Začíná se exprimovat v podocytech kolem 12. týdne vývoje plodu a je zde exprimován po celý život. Tvoří homooligomerní komplexy, obsahující přibližně 20-50 molekul a vážící se k proteinům nefrinu, Neph1, CD2AP a TRPC6 (14), (15), (16). Proteiny nefrin, podocin a Neph1 tvoří komplex, který funguje jako transmembránový receptor, který hraje roli ve strukturní dynamice pedicel. Některé mutace podocinu pak mohou způsobovat poruchy připojení komplexu nefrin-Neph1 k lipidovým můstkům, a dochází tak k narušení signalizačních drah vedoucích do pocytu a poruše filtrační funkce podocytů (17). Protein CD2AP kotví nefrin a podocin k aktinovému cytoskeletu (18), slouží k udržení struktury podocyty ukotvením mezibuněčných spojů k jeho cytoskeletu (18).

### 1.3. Nefrotický syndrom

Nefrotický syndrom (NS) je jedním z nejčastějších příznakových souborů objevujících se v nefrologii. Je charakterizován nefrotickou proteinurií (PU), hypercholesterolémií, hypoalbuminémií a přítomností otoků. Patofyziologicky dochází vlivem poškození podocytů k poškození GBM, které vede k proteinurii (bez přítomnosti leukocytů a erytrocytů v moči). Nízká hladina bílkovin v krvi způsobí snížení onkotického tlaku plasmu, což vede ke snížení cirkulujícího objemu a aktivaci regulačních systémů – hlavně renin-angiotensin-aldosteronového systému (RAAS), vedoucí k retenci sodíku a následnému vzniku otoků („underfill theory“). Podle novější teorie vznikají otoky jako

následek poškození GBM při NS, při kterém dojde k průniku proteolytických enzymů nebo jejich prekurzorů do intersticia a aktivaci epiteliálního sodíkového kanálu (ENaC), v důsledku čehož dochází k retenci sodíku a následně ke vzniku otoků („overflow theory“) (20).

Často se u pacientů s nefrotickým syndromem objevují závažné komplikace, jako jsou zvýšená srážlivost krve, imunodeficience, hyperlipidemie. Nefrotický syndrom se vyskytuje u různých typů glomerulonefritid (GN). Z primárních GN (onemocnění postihující pouze ledviny) se nejčastěji nachází u pacientů s minimálními změnami glomerulů (MCD), s fokální segmentální glomerulosklerózou (FSGS) a membranozní glomerulonefritidou (MGN). U sekundárních glomerulonefritid (vznikají jako součást systémového onemocnění) jsou to nejčastěji diabetická nefropatie, amyloidóza ledvin a lupusová nefritida (21). V posledních letech byla potvrzena stoupající incidence FSGS napříč etniky (22), což je i v souladu s daty z českého registru renálních biopsií. Průběh NS se může výrazně lišit u jednotlivých pacientů. Dle odpovědi na terapii kortikosteroidy dělíme NS na steroid-senzitivní (SSNS) a steroid-rezistentní (SRNS). SRNS je popsán asi u 10% dětských a 50% dospělých pacientů s idiopatickým NS, histologicky je u těchto pacientů ve většině případů zjištěna buď FSGS nebo MCD. Pacienti se selháním ledvin jsou většinou indikováni k zařazení do transplantčního programu. Případy s SRNS patří pravděpodobně mezi geneticky podmíněné formy NS, dochází u nich méně často k návratu proteinurie po transplantaci. Zatím bylo identifikováno 7 genů podocyárních proteinů, jejichž mutace vedou ke vzniku NS (tab č.1).

| Gen          | Lokalizace | Protein                  | Dědičnost | Věk nástupu                    | Reference |
|--------------|------------|--------------------------|-----------|--------------------------------|-----------|
| <i>NPHS1</i> | 19q13.1    | Nefrin                   | AR        | Prenatálně                     | (23)      |
| <i>NPHS2</i> | 1q25-31    | Podocin                  | AR        | Dětství až časná dospělost     | (24)      |
| <i>ACTN4</i> | 19q13      | $\alpha$ 4-aktinin       | AD        | Dětství až časná dospělost     | (25)      |
| <i>TRPC6</i> | 11q21-22   | TRPC6                    | AD        | Dětství až časná dospělost     | (26)      |
| <i>CD2AP</i> | 6p12       | CD2AP                    | AD        | Dětství až časná dospělost     | (27)      |
| <i>PLCE1</i> | 10q23-24   | Fosfolipáza C $\epsilon$ | AR        | Časně dětství                  | (28)      |
| <i>IFN2</i>  | 14q32      | Formin                   | AD        | Adolescence až časná dospělost | (29)      |

Tab.č. 1 – geny, jejichž mutace způsobují nefrotický syndrom. AR – autozomálně recesivní dědičnost, AD – autozomálně dominantní dědičnost. Převzato z (29).

V roce 2011 byly popsány 3 nové geny, na kterých byly zachyceny mutace u jednotlivých pacientů. Jedná se o Rac1 (actin regulatory protein) (30), MYO1E



(membrane-associated class I myosin) (32) a PTPRO (protein tyrosine phosphatase receptor type O) (33).

#### 1.4. Minimální změny glomerulů

NS s MCD (minimal change disease) je onemocněním jak dětského, tak dospělého věku. Jedná se o podocytopatii, kdy je histologický nále z ve světelné mikroskopii v glomerulech normální, ale v elektronovém mikroskopu je patrné zřetelné splývání pedicel podocytů „foot proces effacement“, čímž dochází k poruše glomerulární permselectivity. Toto onemocnění má relativně dobrou klinickou odpověď na terapii glukokortikosteroidy. Klinicky většinou začíná rychlým rozvojem NS, někdy s rozvojem renální insuficience (spíše u dospělých).

#### 1.5. Fokální segmentální glomeruloskleróza

FSGS je souhrnnou diagnózou popisující částečné (segmental) poškození některých (focal) glomerulů, které se klinicky projevuje NS. O FSGS nemůžeme uvažovat jako o jednotné nemoci, jedná se spíše o popisnou diagnózu poškození glomerulů, která se ale liší jak v etiologických, tak morfoloických charakteristikách. V závislosti na příčinách vzniku FSGS se liší i její projevy, průběh a reakce na léčbu. Etiologicky FSGS může vzniknout při glomerulární hyperfiltraci či hypertrofii, při přímém poškození glomerulu v rámci virové infekce nebo poškozením léčivy/drogami a v neposlední řadě existují i familiární formy FSGS způsobené mutacemi v genech kódujících podocytární proteiny. Prevalence FSGS stoupá a stává se nyní nejčastější příčinou nefrotického syndromu u dospělých pacientů (34). FSGS velmi špatně odpovídá na terapii kortikosteroidy a často progreduje v renální selhání. Poškození podocytů se projevuje mizením pedicel, hypertrofií podocytů a formací pseudocyst. Uvolnění podocytů od GBM a jejich apoptóza vedou k redukci jejich počtu a tím ke ztrátě mechanické podpory kapilárního klubička. Kapilární klíčky bez podpory mohou propouštět filtrát spíše do intersticia než do Bowmanova prostoru a nakonec kolabují s trombózou a hyalinózou.

#### 1.6. Vaskulární endotelový růstový faktor

Vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF) je důležitým signalizačním proteinem zapojeným ve vaskulogenezi a angiogenezi. Role VEGF při poškození ledvin byla studována v různých experimentálních modelech a klinických studiích a není ještě zcela jasná. Produkce VEGF má vliv na fenestraci endotelií v průběhu vývoje ledvin (3), v dospělých ledvinách potom stimuluje růst kapilárních endotelií a proliferaci. Některé

výzkumy ukazují, že zvýšení produkce VEGF v glomerulech by mohla být spojena nebo mohla být přímo příčinou renální dysfunkce. U pacientů s diabetickou nefropatií vede zřejmě zvýšená produkce VEGF ke glomerulární hypertrofii a hyperfiltraci (jako odpověď na snížené množství funkcí nefronů). Důvody zvýšené produkce VEGF zatím nejsou známy (35). Existují strategie inhibovat nebo podporovat tvorbu VEGF, které měly slibné výsledky u různých zvířecích modelů renálního poškození. U lidí se začínají používat přípravky s inhibičním efektem na VEGF (anti-VEGF protilátky, které se naváží na VEGF receptor – například bevacizumab). Zatím se používají v terapii metastatických tumorů plic, tlustého střeva a konečníku, prsu a ledviny (36). Gen *VEGF* je lokalizován na krátkém raménku 6. chromozomu (6p21.3) (37), skládá se z 8 exonů, které mají alternativní sestřih a tvoří rodinu proteinů (38). Produkce VEGF je indukována hypoxií, ale i dalšími faktory (estrogeny, jinými růstovými faktory, cytokiny)(39). Tento gen je vysoce polymorfní, zvláště oblast promotoru genu (5'-3' nepřepisovaná oblast) (40). Polymorfismy mají vliv na hladiny serového VEGF (41). Jejich asociace byla prokázána u některých onemocnění, jako je akutní renální rejecké allotransplantátu (42), diabetická retinopatie (43), preeclampsie (44). K vyšetřování u našich pacientů jsme vybrali polymorfismus na pozici -2578 (A/C) a -1154 (A/G) *VEGF* promotoru. V předchozích studiích byl prokázán jejich vliv na hladinu sérového VEGF (40), (42). Navíc byly tyto polymorfismy vybrány pro své alelové frekvence a koeficienty vazebné nerovnováhy.

## 2. CÍLE PRÁCE

Cílem projektu bylo zavedení mutační analýzy *NPHS2* genu a snaha pokusit se tak přispět k objasnění genetického podkladu nejčastějších dědičných forem NS v České republice u dospělých pacientů. Dalším cílem bylo stanovení/vyloučení vlivu některých polymorfismů genů *NPHS2* a *VEGF*, uplatňujících se v patogenezi NS na průběh vybraných glomerulonefritid (FSGS/MCD, MGN, IGAN).

## 3. MATERIÁL A METODIKA

### 3.1. Pacienti

Všichni vyšetřeni pacienti měli histologicky potvrzenou diagnózu (stanovenou ze vzorku renální biopsie), dali písemný poučený souhlas s vyšetřením DNA, byl odebrán vzorek krve a z periferních lymfocytů byla vyzolovaná DNA. DNA testovaných osob byla pak uložena v DNA bance na Ústavu biologie a lékařské genetiky. V našem souboru se jedná o pacienty s biopsií provedenou v letech 2004-2008 na Nefrologické klinice VFN a I.LF UK.

Pro vyšetřování genu *NPHS2* byla celkem získána DNA od 71 pacientů s FSGS/MCD (průměrný věk v době renální biopsie 42,2±16 let). Průměrný věk v době nástupu NS byl 33,2±18,6 let. U 10 pacientů byly první projevy NS zachyceny již v dětství (3-17 let). U 4 pacientů byla zjištěna pozitivní rodinná anamnéza. Pacienti byli rozděleni dle klinické odpovědi na

kortikosteroidy. Kortikorezistentní pacient byl ten, u kterého do 6 měsíců při podávání 1mg/kg tělesné hmotnosti prednisonu nedošlo k významnému poklesu PU. 34 pacientů bylo na kortikosteroidy rezistentních, u 37 pacientů byla zjištěna remise onemocnění při terapii kortikosteroidy. Dále bylo vyšetřeno 169 pacientů s diagnózou IgA nefropatie (IGAN), jejich průměrný věk byl  $45,2 \pm 14,8$  let. Pacienti s IGAN byly rozděleny do 2 skupin: 1. pacienti s normální renální funkcí (63 pacientů) a 2. skupina s negativním průběhem onemocnění (106 pacientů, u kterých se během 4 let sledování zdvojnásobil sérový kreatinin a/nebo došlo k selhání renálních funkcí). Dále bylo vyšetřeno 46 pacientů s MGN, průměrný věk byl  $56,8 \pm 13,9$  let. Kontrolní soubor byl tvořen 300 dobrovolníky (150 mužů, 150 žen, průměrný věk  $64,5 \pm 17,5$  let), kteří byli náhodně vybráni z dárců krve. U všech byl přítomen normální močový nálezh (bez PU).

Do souboru pacientů, u kterých bylo provedeno vyšetření polymorfismů genu *VEGF*, bylo zařazeno 213 pacientů s biopicky verifikovanou chronickou GN (126 mužů, 87 žen, věk v době diagnózy  $46,7 \pm 17,1$  let.). Jednalo se o 56 pacientů s MCD/FSGS (průměrný věk  $45,7 \pm 20,5$ ), 44 pacientů s MGN (průměrný věk  $56,8 \pm 13,9$ ) a 113 pacientů s IGAN (průměrný věk  $43,2 \pm 14,8$ ). Doba sledování byla v průměru 2 roky ( $23,9 \pm 28,7$  měsíců). Kontrolní skupina byla tvořena 311 pacienty (153 mužů, 158 žen, průměrný věk  $44,6 \pm 9,2$  let).

### 3.2. Metody

#### 3.2.1. Izolace genomové DNA

Izolace genomové DNA byla prováděna zpočátku vysolovací metodou, poté na lince QIAcube (Qiagen) pomocí kitu QIAamp DNA mini kit, a to z lymfocytů získaných ze vzorků periferní krve.

#### 3.2.2. Mutační analýza *NPHS2* genu

Analýza genu *NPHS2* byla prováděna metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) všech exonů s následnou přímou sekvenací a u některých pacientů metodou high resolution melting (HRM). Vyšetření polymorfismu p.R229Q v kontrolní populaci bylo provedeno restriční analýzou s následnou sekvenací a později metodou high resolution melting a přímou sekvenací. Sekvence primerů s anelačními teplotami (at) používanými při PCR jsou uvedeny dále. Exon 1 (F: GCA GCG ACT CCA CAG GGA CT, R: TCC ACC TTA TCT GAC GCC CC, at  $62^\circ\text{C}$ ), Exon 2 (F: AGT CAG TGA ATA CAG TGA AG, R: GGC CTC AGG AAA TTA CCT A, at  $56^\circ\text{C}$ ), Exon 3 (F: TTC TGG GAG TGA TTT GAA AG, R: TGA AGA AAT TGG CAA GTC AG, at  $56^\circ\text{C}$ ), Exon 4 (F: AAG GTG AAA CCC AAA CAG C, R: CGG TAG GTA GAC CAT GGA AA, at  $56^\circ\text{C}$ ), Exon 5 (F: CAT AGG AAA GGA GCC CAA GA, R: TTT CAG CAT ATT GGC CAT TA, at  $56^\circ\text{C}$ ), Exon 6 (F: GGG TTT AGG CAT GCT CTC CT, R: TTT TCC TTT ATC ATA CAG TTC TTG C, at  $55^\circ\text{C}$ ), Exon 7 (F: CTA AAT CAT GGC TGC ACA CC, R: CTT CCT AAA GGG CAG TCT GG, at  $62^\circ\text{C}$ ), Exon 8 (F: GGT GAA GCC TTC AGG GAA TG, R: TTC TAT GGC AGG CCC CTT TA, at  $56^\circ\text{C}$ ).

#### 3.2.3. PCR

Reakční směs pro přípravu PCR reakce se skládala z 5 $\mu\text{l}$  Taq pufru, 1,2  $\mu\text{l}$  Taq polymerázy a 4 $\mu\text{l}$  25 mM MgCl<sub>2</sub> (vše firma Fermentas) spolu s 36  $\mu\text{l}$  vody (Braun Medical), 1 $\mu\text{l}$  dNTP (Bio-Rad Laboratories) a 1 $\mu\text{l}$  primerů (2 $\times$ 1 $\mu\text{l}$ ) (GENERI BIOTECH). V úseku 1 bylo navíc do reakční směsi přidáno 5 $\mu\text{l}$  dimethylsulfoxidu (DMSO) na úkor vody. Do směsi byl přidán 1 $\mu\text{l}$  DNA. PCR amplifikace probíhala na přístroji MyCycler (Bio-Rad Laboratories) při použití programu: denaturace:  $95^\circ\text{C} / 4$  min; amplifikace: 35 cyklů:  $95^\circ\text{C} / 30$  sec, anelační teplota / 1 min,  $72^\circ\text{C} / 1$  min; závěrečná extenze:  $72^\circ\text{C} / 7$  min. Kontrolní elektroforéza produktů amplifikace byla prováděna na 2,0 % agarózovém gelu za použití bromfenolové modři a při konstantním napětí 150V. Produkty PCR byly detekovány na UV transiluminátoru (LKB 2011 MacroVue Transilluminator).

#### 3.2.4. Metoda high resolution melting

Metoda high resolution melting (HRM) umožňuje odhalit genetické variace v dvouvláknových úsecích DNA. Je založena na porovnávání křivek teplot tání DNA úseků a můžeme díky ní v sekvenci identifikovat i jednonukleotidovou záměnu v homozygotním a heterozygotním stavu. Metoda probíhá v přístroji pro real-time PCR. Nejdříve dochází k namnožení požadovaného úseku DNA (PCR) v přítomnosti interkalační barvy. Díky této barvě je po každém PCR cyklu měřena koncentrace DNA. Poté jsou vzorky ohřáty na teplotu, kdy dochází k tání dvojřetězců na

jednořetězčové úseky, načež jsou rychle zchlazeny, tím pak dochází k párování řetězců, které jsou nejbližší u sebe a mohou tak vzniknout heteroduplexy. Dále pokračuje fáze pomalého ohřívání vzorků, kdy je konstantně měřena fluorescenční aktivita ve vzorcích díky interkalační barvě. V této fázi dochází k tání duplexů, z jejichž vygenerovaných křivek teplot tání jsme schopni rozlišit genetické variace ve vzorcích. Poté jsou vzorky ochlazeny na teplotu kolem 40°C a mohou být vyjmuty z přístroje. Analýza HRM byla prováděna na přístroji LightCycler 480 (Roche Diagnostics) s využitím kitu LightCycler 480 HRM Master (Roche Diagnostics). Reakční směs se skládala z 2,31 $\mu$ l vody, 5,6 $\mu$ l master mixu, 1  $\mu$ MgCl<sub>2</sub> (vše bylo součástí dodaného kitu) spolu s 0,045 $\mu$ l po každém přímeru s koncentrací 50pmol/ $\mu$ l. U úseků 1 a 3 byla reakční směs navíc doplněna o 0,45 $\mu$ l DMSO (MP Biomedicals) na úkor vody, který napomáhá větší specifitě reakce. Reakce probíhala v celkovém objemu 10 $\mu$ l (9 $\mu$ l reakční směsi + 1 $\mu$ l genomové DNA o koncentraci 10 $\mu$ g/ $\mu$ l). K pipetování bylo často použito automatické pipetovací linky epMotion® 5075 (Eppendorf). Základní program HRM metody včetně amplifikační fáze následuje. Aktivace polymerázy: 95°C/2min, Amplifikace 1 (10x): teplota 95°C/0,30min, 60°C/0,30min, 72°C/1min, Amplifikace 2 (50x): 95°C/0,30min, 55°C/0,30min, 72°C/1min, Finální elongace: 72°C/7min, HRM: 95°C 10min, 40°C/1min, 60→98 (0,02°C/sec), Chlazení: 40°C/0,10min.

### 3.2.5. Sekvenace

Sekvenační reakce byla prováděna na přístroji MyCycler (Bio-Rad Laboratories) při programu: denaturace 96°C / 3 min; následována 25 cykly 96°C / 20 sec, 50°C / 10 sec, 60°C / 4 min; závěrečná extenze 60°C / 1 min. Reakce byla prováděna v objemu 5  $\mu$ l (4,7 $\mu$ l reakční směsi, 0,3 $\mu$ l produktu z PCR či HRM analýzy). Reakční směs byla připravována z 2 $\mu$ l kitu BigDye® Terminator v1.1 (Applied Biosystems), 2,15 $\mu$ l vody (Braun Medical), 0,25 $\mu$ l DMSO (MP Biomedicals) a 0,3 $\mu$ l přímeru (o koncentraci 10 pmol/ $\mu$ l). Po sekvenační reakci bylo vždy provedeno čištění produktu. Podle použitého sekvenačního stroje se lišilo i použité čištění. Při sekvenaci na stroji ABI Prism™ 310 (Applied Biosystems) bylo použito tzv. ethanolové čištění. Při něm se do 5  $\mu$ l produktu ze sekvenační reakce přidalo 20 $\mu$ l 60% ethanolu. Zkumavky se poté nechaly stát 15 minut při laboratorní teplotě, či 10 minut v mrazicím boxu. Poté se nechaly centrifugovat 20 minut při 13 543g. Ihned po skončení centrifugace se neusazený produkt odstříknu. Dále se přidalo 60 $\mu$ l 70% ethanolu a stočilo 10 minut při 13 543g. Opět se ze zkumavek odstříknu neusazený produkt a zkumavky se nechaly otevřené 1 minutu sušit při 90°C. Nakonec bylo přidáno 30  $\mu$ l formamidu a zkumavky pak byly dány na 5 minut do 95°C, aby došlo k denaturaci produktu. Po důkladném denaturaci se zkumavky rychle přemístily na chladicí stojánek a až do sekvenační analýzy udržovaly v mrazicím boxu.

Později byl zakoupen nový sekvenační stroj Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems). Pro něj bylo nutné používat mírně odlišné čištění pro získání optimálních výsledků. K 5 $\mu$ l produktu se přidalo 13 $\mu$ l čerstvě připravené směsi 96% ethanolu s octanem sodným (ethanoát sodný) a výsledná směs se nechala odstát 10 až 15 minut při laboratorní teplotě. Směs se dala stočit 30 minut při 13 543g do centrifugy. Neusazený zbytek se odstříknu a bylo přidáno 60 $\mu$ l 70% ethanolu, opět se nechalo centrifugovat 10 minut při 13 543g a neusazený obsah zkumavky se odstříknu. Poslední krok byl zopakován ještě jednou a následně se zkumavky nechaly otevřené vysušit 10 minut při 40°C. Po důkladném vysušení bylo do zkumavek přidáno 30 $\mu$ l formamidu a nechaly se 5 minut při 95°C pro denaturaci DNA. Ihned po denaturaci byly přeneseny do chladicího stojánu a uchovávány do sekvenace v mrazicím boxu. Sekvenace byla prováděna nejdříve na sekvenátoru ABI Prism™ 310 (Applied Biosystems), poté na sekvenátoru Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems) metodou Dye-terminator sequencing.

### 3.2.6. Analýza polymorfismů p.R229Q (c.686G>A) a p.P20L (c.59C>T) *NPFS2* genu

Restrikční analýza záměny c.686G>A (p.R229Q) v 5. exonu genu *NPFS2* byla provedena pomocí restrikční endonukleázy BSU15I (ClaI, AT/CGAT, BioLabs). Nejdříve byla provedena polymerázová řetězová reakce exonu 5. Dále následovala restrikce, přičemž reakční směs obsahovala: 11 $\mu$ l vody (Braun Medical), 1,5 $\mu$ l pufru a 0,8 $\mu$ l endonukleázy (BioLabs). Tato směs byla inkubována 3 hodiny při 37°C a poté byla obarvena bromfenolovou modří a nanášena na 2% agarózový gel, kde došlo při 150V napětí k rozdělení rozštěpených úseků. V přítomnosti

polymorfismu došlo ke ztrátě restriční místa. Produkty byly poté detekovány na UV transluminátoru (LKB 2011 MacroVue Transilluminator).

Výskyt polymorfismu P20L v 1. exonu genu *NPHS2* byl u pacientů zjišťován pomocí metody high resolution melting a v některých případech ověřován následnou přímou sekvenací.

### 3.2.7. Mutační analýza polymorfismů -2578 (C/A) a -1154 (G/A) v genu *VEGF*

Analýza byla provedena metodou PCR s primery (Forward (5'-3') / Reverse (5'-3')) a anelačními teplotami uvedenými dále. *VEGF* -2578 A/C: F: CAT GAT CCC AAG CTG AAA GGC ATG, R: GAT GCT CCT GCT CTG ATC C, anelační teplota 56°C. *VEGF* -1154 A/G: F: TTT CCC AGC ATG TGT GTT GT, R: ATT TTT GTT TGT TCT CCA CCG A, anelační teplota 58°C. *VEGF* -2578 (C/A): Reakční směs pro přípravu PCR reakce se skládala opět z 5μl Taq pufru, 1,2μl Taq polymerázy a 4μl 25 mM MgCl<sub>2</sub> (vše firma Fermentas) spolu s 36μl vody (Braun Medical), 1μl dNTP (Bio-Rad Laboratories) a 1μl primery (2x1μl) (GENERI BIOTECH). Do směsi přidán 1μl DNA. PCR amplifikace probíhala na přístroji MyCycler (Bio-Rad Laboratories) při použití programu: denaturace: 95°C / 4 min; amplifikace: 35 cyklů: 95°C / 30 sec, 56 °C / 1 min, 72°C / 1 min; závěrečná extenze: 72°C / 7 min. Kontrolní elektroforéza produktů amplifikace byla provedena na 2,0 % agarózovém gelu za použití bromfenolové modři a při konstantním napětí 150V. Produkty PCR byly detekovány na UV transluminátoru (LKB 2011 MacroVue Transilluminator). Inzerce 18 bazí na pozici -2549 je asociována s přítomností A alely. Kratší alela (bez inzerce) je asociována s přítomností C alely.

*VEGF* -1154 (G/A): Reakční směs pro přípravu PCR reakce se skládala z 2,5μl Taq pufru, 0,5μl Taq polymerázy a 1,5μl 25 mM MgCl<sub>2</sub> (vše firma Fermentas) spolu s 16μl vody (Braun Medical), 0,5μl dNTP (Bio-Rad Laboratories) , 1μl primerů (2x1μl) (GENERI BIOTECH) a 1,6μl dimethylsulfoxidu. Do směsi přidáno 0,5μl DNA. PCR amplifikace probíhala na přístroji MyCycler (Bio-Rad Laboratories) při použití programu: denaturace: 94°C / 4 min; amplifikace: 32 cyklů: 94°C / 0,45 s, 58°C / 45 s, 72°C / 45 s; závěrečná extenze: 72°C / 7 min. Kontrolní elektroforéza produktů amplifikace byla provedena na 2,0 % agarózovém gelu za použití bromfenolové modři a při konstantním napětí 150V. Produkty PCR byly detekovány na UV transluminátoru (LKB 2011 MacroVue Transilluminator). Poté proběhla sekvenční reakce opět na přístroji MyCycler (Bio-Rad Laboratories) při programu: denaturace 96°C / 3 min; následována 25 cyklů 96°C / 20 sec, 50°C / 10sec, 60°C / 4 min; závěrečná extenze 60°C / 1 min. Reakce byla prováděna v objemu 4,8μl (4,3 μl reakční směsi, 0,5 μl produktu z PCR či HRM analýzy). Reakční směs byla připravována z 2 μl kitu BigDye® Terminator v.1.1 (Applied Biosystems), 1,7 μl vody (Braun Medical), 0,3 μl DMSO (MP Biomedicals) a 0,3 μl primeru (o koncentraci 10pmol/μl). Čištění produktu v tomto případě bylo prováděno metodou „etanolového čištění“ viz výše.

### 3.3. Statistika

Pro každý polymorfismus byly vypočítány alelové frekvence z genotypu. Hardy-Weinbergova rovnováha byla testována v kontrolní skupině Pearsonovým  $\chi^2$  testem. K porovnání distribuce genotypů mezi různými GN navzájem a mezi GN a kontrolní skupinou byl použit  $\chi^2$ -test. Věk renálního selhání se zřetelem k různým genotypům byl porovnán analýzou rozptylu (ANOVA test). Byla provedena vícečetná porovnání s použitím Bonferroniho korekce. Pro porovnání 2 skupin v podtypech a testování změn v průběhu doby sledování byl použit párový t-test. Logaritmická transformace dat byla použita v situacích negaussovského rozložení hodnot. Hodnota  $P < 0.05$  byla považována za statisticky signifikantní.

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Mutační analýza *NPHS2* genu

Z pacientů s FSGS/MCD byla jednoznačně patogenní mutace nalezena pouze u jedné pacientky. Jedná se o homozygotní *NPHS2* mutaci c.G868A (p.V290M) v 7. exonu, která způsobuje záměnu konzervativní aminokyseliny valinu (GTG) za metionin (ATG)

v cytoplasmatické oblasti podocinu. Tato mutace byla již popsána jako příčina FSGS, ale v heterozygotním stavu (45). Klinicky se onemocnění projevilo u pacientky ve 3 letech. Po imunosupresivní terapii došlo jen k parciální a dočasné odpovědi na terapii. Pacientka (nyní 24 letá) čeká na transplantaci ledviny.

Dále byla nalezena nová, ještě nepopsaná záměna c.G291A (p.G97S) ve 2. exonu vedoucí k substituci glycinu (GGC) za serin (AGC). Tato záměna byla nalezena v heterozygotní formě u pacienta se SRNS. Stejná záměna nebyla nalezena u žádného z 300 kontrolních vzorků. Substituce hydrofobního glycinu za hydrofilní serin se ovšem nenachází v konzervované oblasti genu, neboť byla po porovnání s dalšími savci nalezena i u divokého prasete. Na základě těchto zjištění předpokládáme, že se nejedná o kauzální mutaci. Mutaci na druhé alele nebo v dalších genech (později vyšetřovaných *TRPC6* a *ACTN4*) jsme u tohoto pacienta nenašli. K rozvoji NS došlo u pacienta v 9 letech, biopticky byla prokázána FSGS. Dlouhodobé léčení imunosupresí bylo neúspěšné s četnými infekčními komplikacemi. Ve 25 letech došlo k renálnímu selhání a pacient zahájil hemodialyzační terapii. U další pacientky s nástupem nefrotického syndromu ve 33 letech byly nalezeny 2 polymorfismy v trans-heterozygotním stavu (na různých alelách) p.P20L (exon 1) a p.R229Q (exon 5). U pacientky byla přítomna částečná odpověď na léčbu kortikosteroidy. Ve 45 letech pacientka trpí pokročilou renální insuficiencí. Obě její děti zdědily pouze alelu s p.R229Q záměnou a není u nich přítomna proteinurie. Lze spekulovat, že přítomnost 2 funkčních polymorfismů na různých alelách by mohla mít vliv na rozvoj SRNS u této pacientky.

#### 4.2. Analýza polymorfismů p.P20L (c.59C>T) a p.R229Q (c.686G>A) *NPHS2* genu

Při analýze *NPHS2* genu u pacientů s FSGS/MCD byly nalezeny 2 polymorfismy, které byly následně vyšetřeny i u všech ostatních pacientů (IGAN, MGN, kontroly) – polymorfismus p.R229Q a polymorfismus p.P20L. p.P20L polymorfismus byl nalezen u 3 pacientů se SRNS (8,8%). Dále byl identifikován u 3 pacientů s IGAN s negativním průběhem onemocnění (2,8%). U IGAN pacientů se stabilní renální funkcí přítomen nebyl. U MGN pacientů p.P20L polymorfismus nebyl nalezen. V kontrolním souboru byl nalezen u 3 pacientů (1%). Nejčastější p.R229Q polymorfismus byl v heterozygotním stavu nalezen u 6 pacientů (8,4%) s FSGS, u 4 pacientů se SRNS a u 2 SSNS pacientů. U pacientů s IGAN byl výskyt obdobný, 13,6%. Mírně vyšší výskyt polymorfismu byl u IGAN pacientů s negativní prognózou než u pacientů se stabilní renální funkcí (16 % versus 9,5%). p.R229Q polymorfismus byl identifikován u 2 pacientů s MGN (4,3%). V kontrolním souboru byl popsán ovšem u 10% vyšetřovaných.

### 4.3. Analýza polymorfismů *VEGF*

Polymorfismy *VEGF* -2578 (C/A) a -1154 (G/A) jsme vyšetřili u 213 pacientů s chronickou GN. Polymorfismus -2578 *VEGF* (C/A) byl nalezen s vyšší prevalencí genotypu CC u pacientů s MCD/FSGS v porovnání s ostatními. U polymorfismu -1154 *VEGF* C/G jsme prokázali rovnoměrnou distribuci G a A alel v naší vyšetřované skupině. Korelace mezi -2578 (C/A) polymorfismem *VEGF* a klinicko-laboratorními nálezy na počátku sledování ukázala u pacientů s MCD/FSGS signifikantní rozdíl mezi glomerulární filtrací u pacientů s alelou CC vůči AA a AC alelám (recesivní model) ve prospěch A alely (CC alela:  $1,24 \pm 0,64$  ml/s versus AA a AC alela:  $1,7 \pm 1,1$  ml/s,  $P < 0,05$ ). Pro polymorfismus -1154 *VEGF* byl nalezen hraniční rozdíl mezi GG homozygoty versus alely AA a AG (recesivní model) v hladině sérového kreatininu v době diagnózy (GG alela:  $150 \pm 170,5$  ml/s versus CC a CG alela:  $102,4 \pm 46,8$   $\mu$ mol/l,  $P = 0,07$ ) a analogická korelace mezi -1154 G/A polymorfismu *VEGF* a klinicko-laboratorním nálezem u pacientů s MCD/FSGS. Ostatní data (arteriální hypertenze, proteinurie, sérový albumin, GFR a sérový kreatinin na konci sledování) nebyla signifikantně rozdílná.

## 5. DISKUSE

### 5.1. Mutace v genu *NPHS2*

Homozygotní záměna p.V290M ležící v 7. exonu genu *NPHS2*, která již byla v literatuře popsána v pozici trans s jinou missence mutací (p.R196P) u pacientky s FSGS (46) byla nalezena u naší pacientky se SRNS od dětství. Dále, nepopsaná varianta ne zcela jasného významu p.G97S nacházející se v heterozygotním stavu v nekonzervované oblasti genu *NPHS2*, byla nalezena také u pacienta se SRNS opět vzniklým v dětství. U pacientů s nástupem NS v dospělosti jsme nenašli žádnou kauzální mutaci v genu *NPHS*. Proto předpokládáme, že mutace v genu *NPHS2* nejsou častou příčinou FSGS/MCD s nástupem NS v dospělosti. Naše výsledky jsou v souladu s výsledky italské studie, která prokázala pouze 3 heterozygotní *NPHS2* mutace (v 1 alele) ve skupině 64 dospělých pacientů se SRNS (47). Kanadská studie z roku 2007 našla heterozygotní mutaci v *NPHS2* genu pouze u 1 z 87 dospělých pacientů (48). Naopak 4 heterozygotní mutace v kombinaci s nálezem polymorfismu p.R229Q byly nalezeny u 47 pacientů s FSGS vzniklým v dospělosti ve španělské studii (49). V této studii byla doba vzniku NS a progresse renálních funkcí směrem k renálnímu selhání delší a pomalejší u pacientů s kombinací polymorfismu p.R229Q a ještě jednu patogenetickou mutací *NPHS2* než u pacientů s 2 patogenetickými *NPHS2* mutacemi.

Podle studie z roku 2009 u 40 pacientů se SRNS a nalezenou pouze jednou mutací v *NPHS2* genu (33 pacientů), ev. v *NPHS1* genu (7 pacientů) mají tito pacienti stejnou prognózu a procento pozitivních odpovědí na imunosupresivní léčbu jako pacienti bez mutací v těchto genech (47). Lze říci, že NS způsobený mutacemi v genu *NPHS2* se nejčastěji projevuje v dětství (od narození do 6 let). Mutace v *NPHS2* genu jsou zodpovědné asi za 20-30% sporadických forem SRNS (46), 50). Obecně jsou pacienti s mutacemi v genu *NPHS2* kortikorezistentní a i odpověď na další imunosupresi je velmi špatná. Mutační analýza *NPHS2* genu by proto měla být prováděna u všech dětských pacientů se SRNS. Pokud bude nalezena homozygotní nebo heterozygotní mutace na obou alelách, měla by být dobře zváženo další pokračování imunosupresivní terapie.

## 5.2. Rekurence FSGS ve štěpu po transplantaci ledviny

Přibližně u 30% pacientů s FSGS dojde po transplantaci ledviny k rekurenci onemocnění ve štěpu (51). Zdá se, že pacienti s 2 patogenními mutacemi *NPHS2* mají velmi nízké riziko rekurence onemocnění. Heterozygotní varianty zřejmě hrají roli v pozdějším nástupu onemocnění, snad i mírnějšímu průběhu, ale častější rekurenci onemocnění ve štěpu (52), 53). Z nové retrospektivní studie z roku 2013 u 93 transplantovaných pacientů vyplývá, že rekurence ve skupině 66 pacientů s „idiopatickou“ FSGS (bez prokázané mutace) je 42%, ve skupině 18 pacientů s genetickou/familiární formou FSGS (prokázaná mutace či pozitivní rodinná anamnéza u příbuzného 1. stupně) a u 10 pacientů se sekundární FSGS (přetížení ledviny, po traumatu, působení léčiv) k rekurenci onemocnění nedošlo (54). S výjimkou pacientů s kongenitálním nefrotickým syndromem způsobeným mutacemi v genu *NPHS1*, kdy dochází k vytvoření anti-nefrinových protilátek (55), u pacientů s FSGS s genetickým podkladem (2 homozygotní mutace) po transplantaci ledviny prakticky nedochází k rekurenci, jak bylo pospáno výše. (56). Protilátky proti podocinu se po transplantaci nevyskytují, protože podocin nemá extracelulární doménu. Nižší rekurence FSGS zaznamenaná ve starších studiích by mohla souviset s předpokladem, že určitá část pacientů, dříve zařazená do skupiny „idiopatické“ FSGS má ve skutečnosti nějakou formu genetické FSGS (57). Rozvíjející se možnosti diagnostiky, DNA testování a také stále se rozšiřující portfolio vyšetřovaných genů mohou v budoucnu objasnit vztah mezi etiologií FSGS a rizikem rekurence tohoto onemocnění po transplantaci ledviny. Pro náš soubor pacientů bude jistě velmi zajímavý vývoj klinického stavu pacientky s mutací V290M po transplantaci ledviny.



### 5.3. Polymorfismy v *NPHS2* genu: p.R229Q, p.P20L

Polymorfismus p.R229Q je nečastějším polymorfismem v *NPHS2* genu u Evropanů. Tato záměna způsobuje slabší vazbu nefrinu na podocin. V roce 2004 byla publikována studie MONICA na 1577 jedincích, kde byla nalezena asociace p.R229Q alely polymorfismu s mikroalbuminurií (58). V pozdější studii byla však tato asociace vyloučena (59). V naší skupině pacientů byl tento polymorfismus identifikován celkově u 8,4% pacientů s FSGS, u 11,8% se SRNS a u 10% pacientů z kontrolního souboru (v 1 případě byl nalezen tento polymorfismus v homozygotním stavu), což je relativně vysoké číslo, jehož význam není zcela jasný. Může se v naší populaci jednat již o starou záměnu. Zdá se, že přítomnost heterozygotní formy p.R229Q samotné nedokáže vyvolat FSGS, ale je možné, že usnadňuje vznik onemocnění v kombinaci s další heterozygotní mutací *NPHS2*. Při relativně vysoké frekvenci polymorfismu v kontrolní populaci by ovšem musel být velmi častý nález homozygotní formy p.R229Q u pacientů s FSGS, pokud bychom přepokládali její patogenetický vliv, což se ovšem v žádné studii nepotvrdilo (60).

Polymorfismus p.P20L nacházející se v genu *NPHS2* v 1. exonu byl nalezen jak v našem souboru, tak i ve studiích v nízké incidenci (0-1%) (52), (61). Záměna se nachází v nekonzervované oblasti genu. Naše výsledky naznačují vyšší výskyt u pacientů se SRNS oproti kontrolám, ovšem bez statistické významnosti.

### 5.4. Vaskulární endotelový růstový faktor

U skupiny pacientů s FSGS/MCD, IGAN a MGN byly vyšetřeny 2 polymorfismy v promotoru genu pro *VEGF*. Byl zjišťován vztah mezi jednotlivými alelami a klinickými údaji. Výběr glomerulonefritid byl proveden s ohledem na různý typ vzniku chorob. U MCD/FSGS a MGN je histologicky nízká aktivita zánětlivých a proliferativních změn a nefrotická proteinurie. Naproti tomu je IGAN choroba s charakteristickým nálezem výrazných zánětlivých a proliferativních změn v renální biopsii a klinicky s nefritickým syndromem (kombinace proteinurie a erytrocyturie). Nalezli jsme vyšší frekvenci -2578 CC genotypu ve skupině pacientů MCD/FSGS (42,9%) v porovnání s pacienty s MGN (22,7%) a IGAN (26,5%). Navíc u pacientů s MCD/FSGS byla u pacientů s A alelou (genotyp AA a AC) v porovnání s CC homozygoty zjištěna vyšší glomerulární filtrace v době diagnózy. Tyto nálezy ukazují na negativní efekt CC genotypu -2578 C/A polymorfismu v promotou genu *VEGF* na klinický průběh MCD/FSGS, protože GFR v době diagnózy je důležitým prognostickým faktorem MCD/FSGS. Nenašli jsme ovšem žádný další vliv obou

VEGF polymorfismů na další sledované parametry (proteinurie, hladina albuminu, hladina sérového kreatininu).

V čínské studii u 195 pacientů byl popsán vliv CC genotypu na pozici -2578 *VEGF* promotoru na progresi IGAN (62). V našem vzorku toto potvrzeno nebylo. Ve studii, která byla provedena již dříve v naší laboratoři u 283 pacientů s autosomálně dominantní polycystickou chorobou ledvin (ADPKD) jsme pozorovali, že AA genotyp -2578 C/A polymorfismu byl asociován s lepší prognózou onemocnění určité skupiny pacientů, ovšem obecně nebyl nalezen vliv jednotlivých VEGF polymorfismů na progresi ADPKD. CG haplotyp byl asociován s dřívějším nástupem renálního selhání u pacientů s ADPKD (63).

Naše znalosti o vlivu VEGF na rozvoj a progresi renálních onemocnění jsou ovšem stále omezené. Některé studie zdůrazňují asociaci určitých VEGF polymorfismů s rozvojem primárních glomerulonefritid (64), s poškozením glomerulárních funkcí (65) a s progresí renální nedostatečnosti k renálnímu selhání (66). Jiné studie ovšem spíše zdůrazňují vliv VEGF na reparaci kapilár glomerulů u proliferativních GN (67). Vlivy změněné exprese polymorfismů VEGF jsou nyní zkoumány v mnoha oborech medicíny.

## 6.ZÁVĚRY

Cílem projektu bylo zavedení mutační analýzy *NPHS2* genu, která by se tak mohla stát součástí rutinní diagnostiky. Mutace a polymorfismy, které jsme našli, byly již dříve popsány v literatuře. U pacientů se vznikem FSGS/MCD v dospělém věku jsme nenašli žádnou kauzální mutaci v genu *NPHS2*. Přepokládáme tedy, že tyto mutace nejsou častou příčinou FSGS/MCD v naší populaci, což je v souladu se studii z poslední doby. Vyšetření jsou prováděna s určitým klinickým cílem. Obecně se zdá, že pacienti s mutacemi v genu *NPHS2* jsou většinou kortikorezistentní a i odpověď na další imunosupresi je velmi špatná. Mutační analýza *NPHS2* genu by proto měla být prováděna u všech dětských pacientů se SRNS. Pokud bude nalezena homozygotní nebo heterozygotní mutace na obou alelách, mělo by být zváženo ukončení imunosupresivní terapie. Vyšetření by měla být prováděna i u pacientů před transplantací ledviny. Množství genetických forem FSGS oproti dříve diagnostikovaným idiopatickým formám onemocnění bude jistě dále narůstat s naší detailnější znalostí možných genetických příčin (mutace v dalších genech souvisejících s funkcí podocyty). Již nyní se v naší laboratoři běžně vyšetřují také geny *ACTN4*, *TRPC6*, zavádí se mutační analýza *IFN2* a další budou jistě následovat. Význam polymorfismu p.R229Q není zcela jasný. Původní asociace s mikroalbuminurií nebyla

potvrzena. Obecně je v evropské populaci přítomen u 3-4%. U našich pacientů byl ovšem nalezen ve vyšším procentu (8-11%) a překvapivě také u 10% pacientů z kontrolního souboru. Relativně vysoká frekvence v kontrolním souboru spíše naznačuje, že se nejedná o významnou záměnu. Zdá se, že přítomnost p.R229Q polymorfismu spíše usnadňuje vznik postižení v kombinaci s další heterozygotní mutací *NPHS2*. Polymorfismus p.P20L se objevuje méně často (0-1%). V naší práci jsme našli polymorfismus p.P20L v heterozygotním stavu u 8,8% pacientů se SRNS. Vzhledem k malému počtu pacientů výsledky nemají statistickou významnost.

Co se týče vlivu polymorfismů -1154 A/G a -2578 A/C v promotoru genu VEGF, nenalezli jsme v našem souboru pacientů signifikantní souvislost s progresí FSGS/MCD, MGN ani IGAN. Byl pouze naznačen negativní efekt CC genotypu -2578 C/A polymorfismu VEGF na klinický průběh FSGS/MCD. Vlivy různých VEGF polymorfismů jsou zkoumány napříč prakticky všemi obory medicíny a přinášejí zatím spíše rozporuplné výsledky.

## 7. POUŽITÁ LITERATURA

- 1) Ichimura K, Stan RV, Kurihara H, Sakai T: Glomerular endothelial cells form diaphragm during development and pathologic conditions. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19(8): 1463-1471.
- 2) Bearer EL, Orci L: Endothelial fenestral diaphragm: a quick-freeze, deep-etch study. *J Cell Biol*, 1985, 100(2): 418-428.
- 3) Breier G, Albrecht U, Sterrer S, Risau W: Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development*, 1992, 114(2): 521-532.
- 4) Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L: VEGF receptor signalling: in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(5): 359-371.
- 5) Kitamoto Y, Tokunaga H, Miyamoto K, Tomita K: VEGF is an essential molecule for glomerular structuring. *Nephrol Dial Transplant*, 2002, 17(9): 25-27.
- 6) Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E: Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, 1992, 359: 843-845.
- 7) Kanwar YS, Farquhar MG: Presence of heparan sulfate in the glomerular basement membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76(3): 1303-1307.
- 8) Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M: Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev*, 2003, 83(1): 253-307.
- 9) Rodewald R, Karnovsky MJ: Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J Cell Biol*, 1974, 60(2): 423-433.
- 10) Holzman LB, St John PL, Kovari IA, Verma R, Holthofer H, Abrahamson DR: Nephrin localizes to the slit pore of the glomerular epithelial cell. *Kidney Int*, 1999, 56(4): 1481-1491.
- 11) Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J, Lenkkeri U, Kestilä M, Jalanko H, Holmberg C, Tryggvason K: Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(14): 7962-7967.
- 12) Holthöfer H, Ahola H, Solin ML, Wang S, Palmén T, Luimula P, Miettinen A, Kerjaschki D: Nephrin localizes at the podocyte filtration slit area and is characteristically spliced in the human kidney. *Am J Pathol*, 1999, 155(5): 1681-1687.
- 13) Tryggvason K: Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephrin, a key component of the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol*, 1999, 10(11): 2440-2445.
- 14) Pollak MR, Alexander MP, Henderson JM: A case of familial kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2007, 2(6): 1367-1374.
- 15) Sellin L, Huber TB, Gerke P, Quack I, Pavenstädt H, Walz G: NEPH1 defines a novel family of podocin interacting proteins. *FASEB J*, 2003, 17(1): 115-117.
- 16) Reiser J, Polu KR, Möller CC, Kenlan P, Altintas MM, Wei C, Faul C, Herbert S, Villegas I, Avila-Casado C, McGee M, Sugimoto H, Brown D, Kalluri R, Mundel P, Smith PL, Clapham DE, Pollak MR: TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet*, 2005, 37(7): 739-744.
- 17) Garg P, Verma R, Nihalani D, Johnstone DB, Holzman LB: Nephrin cooperates with nephrin to transduce a signal that induces actin polymerization. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(4): 8698-8712.
- 18) Shih NY, Li J, Karpitskii V, Nguyen A, Dustin ML, Kanagawa O, Miner JH, Shaw AS: Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science*, 1999, 286: 312-315.
- 19) Shih NY, Li J, Cotran R, Mundel P, Miner JH, Shaw A: CD2AP localizes to the slit diaphragm and binds to nephrin via a novel C-terminal domain. *Am J Pathol*, 2001, 159(6): 2303-2308.

- 20) Siddall EJ, Radhakrishnan J: The pathophysiology of edema formation in the nephrotic syndrome. *Kidney Int*, 2012, 82(6): 635-642.
- 21) Ryšavá R, Tesáň V, Merta M: Nefrotický syndrom. *Intermi medicina pro praxi*, 2005, 3: 131 - 134.
- 22) Haas M, Meehan SM, Karrison TG, Spargo BH: Changing etiologies of unexplained adult nephrotic syndrome: a comparison of renal biopsy findings from 1976-1979 and 1995-1997. *Am J Kidney Dis*, 1997, 30(5): 621-631.
- 23) Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, Ruotsalainen V, Morita T, Nissinen M, Herva R, Kashtan CE, Peltonen L, Holmberg C, Olsen A, Tryggvason K: Positionally cloned gene for a novel glomerular protein nephrin is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell*, 1998, 1(4): 575-582.
- 24) Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F, Lee H, Fuchshuber A, Dahhan K, Gubler MC, Niaudet P, Antignac C: NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet*, 2000, 24(4): 349-354.
- 25) Kaplan JM, Kim SH, North KN, Renneke H, Correia LA, Tong HQ, Mathis BJ, Rodríguez-Pérez JC, Allen PG, Beggs AH, Pollak MR: Mutations in ACTN4, encoding  $\alpha$ -actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet*, 2000, 24: 251-256.
- 26) Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, Farrington MK, Creazzo T, Hawkins AF, Daskalakis N, Kwan SY, Ebersviller S, Burchette JL, Pericak-Vance MA, Howell DN, Vance JM, Rosenberg, PB: A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science*, 2005, 308: 1801-1804.
- 27) Kim JM, Wu H, Green G, Winkler CA, Kopp JB, Miner JH, Unanue ER, Shaw AS: CD2-associated protein haploinsufficiency is linked to glomerular disease susceptibility. *Science*, 2003, 300: 1298-1300.
- 28) Hinkes B, Wiggins RC, Gbadegesin R, Vlangos CN, Seelow D, Nürnberg G, Garg P, Verma R, Chaib H, Hoskins BE, Ashraf S, Becker C, Hennies HC, Goyal M, Wharram BL, Schachter AD, Mudumana S, Drummond I, Kerjaschki D, Waldherr R, Dietrich A, Ozaltin F, Bakalloglu A, Cleper R, Basel-Vanagaite L, Pohl M, Griebel M, Tsygin AN, Soylu A, Müller D, Sorli CS, Bunney TD, Katan M, Liu J, Attanasio M, O'toole JF, Hasselbacher K, Mucha B, Otto EA, Airik R, Kispert A, Kelley GG, Smrcka AV, Gudermann T, Holzmann LB, Nürnberg P, Hildebrandt. Positional cloning uncovers mutations in PLCE1 responsible for a nephrotic syndrome variant that may be reversible. *Nat Genet.*, 2006, 38(12): 1397-1405.
- 29) Brown EJ, Schlöndorff JS, Becker DJ, Uscinski AL, Higgs HN, Henderson JM, Martin R: Mutations in the formin gene INF2 cause focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet*, 2010, 42(1): 72-76.
- 30) Reiterova J, Safankova H: Geneticky podmiňené formy nefrotického syndromu. *Aktuality v nefrologii*, 2010, 16(3): 96-100.
- 31) Akilesh S, Suleiman H, Yu H, Stander MC, Lavin P: Arhgap24 inactivates Rac1 in mouse podocytes, and a mutant form is associated with familial focal segmental glomerulosclerosis. *J. Clin. Invest.*, 2011, 121: 4127-4137.
- 32) Mele C, Iatropoulos P, Donadelli R, Calabria A, Maranta R, Cassis P, Buelli S, Tomasoni S, Piras R, Krendel M, Bettoni S, Morigi M, Delledonne M, Pecoraro C, Abbate I, Capobianchi, MR, Hildebrandt F, Otto E, Schaefer F, Macciardi F, Ozaltin F, Emre S, Ibsirlioglu T, Benigni A, Remuzzi G, Noris M, PodoNet Consortium: MYO1E mutations and childhood familial focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med*, 2011, 365: 295-306.
- 33) Ozaltin F, Ibsirlioglu T, Taskiran EZ, Baydar DE, Kaymaz F, Buyukcelik M, Kilic BD, Balat A, Iatropoulos P, Asan E, Akarsu NA, Schaefer F, Yilmaz E, Bakalloglu A, PodoNet Consortium10: Disruption of PTPRO causes childhood-onset nephrotic syndrome. *Am J Hum Genet*, 2011, 89: 139-147.
- 34) Jefferson JA, Nelson PJ, Najafian B, Shankland S: Podocyte Disorders : Core Curriculum 2011. *Am J Kidney Dis*, 2011, 58(4): 666-677.
- 35) Schrijvers BF, Flyvbjerg A, De Zeeuw A: The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal pathophysiology. *Kidney Int*, 2004, 65(6): 2003-2017.
- 36) Duda DG, Batchelor TT, Willett CG, Jain RK: VEGF-targeted cancer therapy strategies: current progress, hurdles and future prospects. *Trends Mol Med*, 2007, 13: 223-230.
- 37) Vincenti V, Cassano C, Rochci M: Assignment of the vascular endothelial growth gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation*, 1996; 93: 1493-1495.
- 38) Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham J. The Human Gene for Vascular Endothelial Growth Factor. *J Biol Chem*, 1991, 266 (18): 11947-11954.
- 39) Klagsbrun M, D'Amore PA: Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, 1996, 7(3): 259-270.
- 40) Brogan IJ, Khan N, Isaac K, Hutchinson JA: Novel polymorphisms in the promoter and 5'UTR regions of the human vascular endothelial growth factor gene. *Hum Immunol*, 1996; 60: 1245-1249.
- 41) Watson CJ, Webb NJ, Bottomley MJ, Brenchley PE: Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine*, 2000, 12: 1232-1235.
- 42) Shahbazi M, Fryer AA, Pravica V, Brogan IJ, Ramsay HM, Hutchinson IV, Harden P: Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(1): 260-264.
- 43) Awata T, Inoue K, Kurihara S, Ohkubo T, Watanabe M, Inukai K, Inoue I, Katayama S: A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes*, 2002, 51(5): 1635-1639.
- 44) Brenchley PE, Ralph SA, Summers A: VEGF polymorphisms and renal pathologies. *Adv Nephrol Necker Hosp*, 2002, 32: 17-23.
- 45) Levey AS, Coresh J, Greene T, Stevens LA, Zhang YL, Hendriksen S, Kusek JW, Van Lente F: Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration. Using standardized serum creatinine values in the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*, 2006, 145: 247-254.
- 46) Karle SM, Uetz B, Ronner V, Glaeser L, Hildebrandt F, Fuchshuber A: Novel mutations in NPHS2 detected in both familial and sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(2): 388-393.
- 47) Caridi G, Gigante M, Ravani P, Trivelli A, Barbano G, Scolari F, Dagnino M, Murer L, Murtas C, Edefonti A, Allegri L, Amore AL, Coppo R, Emma F, De Palo T, Penza R, Gesualdo L, Ghiggeri GM: Clinical features and long-term outcome of nephrotic syndrome associated with heterozygous NPHS1 and NPHS2 mutations. *Clinic J Am Soc Nephrol*, 2009, 4(6): 1065-1072.

- 48) He N, Zahirieh A, Mei Y, Lee B, Senthilnathan S, Wong B, Mucha B, Hildebrandt F, Cole DE, Cattran D, Pei Y: Recessive NPHS2 (Podocin) mutations are rare in adult-onset idiopathic focal segmental glomerulosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2007, 2(1): 31–37.
- 49) Santín S, Tazón-Vega B, Silva I, Cobo MÁ, Giménez I, Ruiz P, García-Maset R, Ballarín J, Torra R, Ars E: Clinical value of NPHS2 analysis in early- and adult-onset steroid-resistant nephrotic syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2011, 6(2): 344–354.
- 50) Hinkes B, Vlangos C, Heeringa S, Mucha B, Gbadegesin R, Liu J, Hasselbacher K, Ozaltin F, Hildebrandt F: Specific podocin mutations correlate with age of onset in steroid-resistant nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19(2): 365–371.
- 51) Couser W: Recurrent glomerulonephritis in the renal allograft: An update of selected areas. *Exp Clin Transplant*, 2005, 3:283–288.
- 52) Weber S, Gribouval O, Esquivel EL, Morinière V, Tête MJ, Legendre C, Niaudet P, Antignac C: NPHS2 mutation analysis shows genetic heterogeneity of steroid-resistant nephrotic syndrome and low post-transplant recurrence. *Kidney Int*, 2004, 66(2): 571–579.
- 53) Vincenti F, Ghiggeri GM: New insights into the pathogenesis and the therapy of recurrent focal glomerulosclerosis. *Am J Transplant*, 2005, 5(6): 1179–1185.
- 54) Maas R, Deegens J, van den Brand JA, Cornelissen EA, Wetzels J: A retrospective study of focal segmental glomerulosclerosis: clinical criteria can identify patients at high risk for recurrent disease after first renal transplantation. *BMC nephrol*, 2013, 14(1): 47.
- 55) Patrakka J, Ruotsalainen V, Reponen P, Qvist E, Laine J, Holmberg C, Tryggvason K, Jalanko H: Recurrence of nephrotic syndrome in kidney grafts of patients with congenital nephrotic syndrome of the Finnish type: role of nephrin. *Transplantation*, 2002, 73(3): 394–403.
- 56) Rood IM, Deegens J, Wetzels J: Genetic causes of focal segmental glomerulosclerosis: implications for clinical practice. *Nephrol Dial Transplant*, 2012, 27(3), 882–890.
- 57) Yang HC, Fogo A: “Idiopathic” FSGS: an increasingly obsolete diagnosis? *Nephrol Dial Transplant*, 2010, 25(3): 654–656.
- 58) Pereira AC, Pereira AB, Mota GF, Cunha RS, Herkenhoff FL, Pollak MR, Mill JG, Krieger J: NPHS2 R229Q functional variant is associated with microalbuminuria in the general population. *Kidney Int*, 2001, 65(3): 1026–1030.
- 59) Tonna SJ, Needham A, Polu K, Uscinski A, Appel GB, Falk RJ, Katz A, Al-Waheeb S, Kaplan BS, Jerums G, Savage J, Harmon J, Zhang K, Curhan GC, Pollak M: NPHS2 variation in focal and segmental glomerulosclerosis. *BMC nephrol*, 2008, 9:13.
- 60) Tsukaguchi H, Sudhakar A, Le TC, Nguyen T, Yao J, Schwimmer JA, Schachter AD, Poch E, Abreu PF, Appel GB, Pereira AB, Kalluri R, Pollak M: NPHS2 mutations in late-onset focal segmental glomerulosclerosis: R229Q is a common disease-associated allele. *J Clin Invest*, 2002, 110(11): 1659–1666.
- 61) McKenzie LM, Hendrickson SL, Briggs WA, Dart RA, Korbet SM, Mokrzycki MH, Kimmel PL, Ahuja TS, Berns JS, Simon EE, Smith MC, Trachtman H, Michel DM, Schelling JR, Cho M, Zhou YC, Binns-Roemer E, Kirk GD, Kopp JB, Wink C: NPHS2 variation in sporadic focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18(11): 2987–2995.
- 62) Chow KM, Szeto CC, Lai FMM, Poon P, Wong TYH, Li P: Genetic Polymorphism of Vascular Endothelial Growth Factor: Impact on Progression of IgA Nephropathy. *Ren Fail*, 2006, 28(1): 15–20.
- 63) Reiterová J, Obeidová H, Lenick M, Stekrová J, Merta M, Maixnerová D, Vítek L, Viklický O, Tesar V: Influence of VEGF polymorphism on progression of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Blood Press Res*, 2008, 31(6): 398–403.
- 64) Choi HJ, Cho JH, Kim JC, Seo HJ, Hyun SH, Kim GH, Choi JY, Ryu HM, Cho JH, Park SH, Kim YL, Han S, Kim CD: Interleukin-18, transforming growth factor- $\beta$ , and vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and susceptibility to primary glomerulonephritis. *Tissue Antigens*, 2010, 76(4): 289–296.
- 65) Liu E, Morimoto M, Kitajima S, Koike T, Yu Y, Shiiki H, Nagata M, Watanabe T, Fan J: Increased expression of vascular endothelial growth factor in kidney leads to progressive impairment of glomerular functions. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18(7): 2094–2104.
- 66) Summers AM, Coupes BM, Brennan MF, Ralph SA, Short CD, Brenchley P: VEGF -460 genotype plays an important role in progression to chronic kidney disease stage 5. *Nephrol Dial Transplant*, 2005, 20(11): 2427–2432.
- 67) Masuda Y, Shimizu A, Kataoka M, Arai T, Ishikawa A, Du X, Saito SK, Aki K, Nagasaka S, Mii A, Fujita E, Fukuda Y: Inhibition of capillary repair in proliferative glomerulonephritis results in persistent glomerular inflammation with glomerular sclerosis. *Lab Invest*, 2010, 90(10): 1468–1481.

## 8. SEZNAM PUBLIKACÍ

### 8.1. publikace, které jsou podkladem disertace

#### a) s IF

1) Safránková H, Merta M, Reiterová J, Stekrová J, Maixnerová D, Ryšavá R, Skibová J, Tesař V: The influence of vascular endothelial growth factor (VEGF) polymorphism on the progression of chronic glomerulonephritides. *Folia Biol (Praha)*, 2011, 57(4): 145-150. (IF 1,151)

2) Reiterová J, Safránková H, Obeidová L, Stekrová J, Maixnerová D, Merta M, Tesař V: Mutational analysis of the NPHS2 gene in Czech patients with idiopathic nephrotic syndrome. *Folia Biol (Praha)*, 2012, 58(2): 64-68. (IF ? )

3) Obeidová L, Reiterová J, Lněnička P, Safránková H, Kohoutová M, Tesař V: TRPC6 Gene Variants in Czech Adult Patients with Focal Segmental Glomerulosclerosis and Minimal Change Disease. *Folia Biol (Praha)*, 2012, 58(4): 173-176. (IF ? )

#### b) bez IF

4) Obeidová H, Merta M, Reiterová J, Maixnerová D, Stekrová J, Rysavá R, Tesař V: Genetic basis of nephrotic syndrome--review. *Prague Med Rep*, 2006, 107(1): 5-16.

5) Reiterová J, Šafránková H: Geneticky podmíněné formy nefrotického syndromu. *Aktuality v nefrologii*, 2010, 16(3): 96-100.

### 8.2. publikace bez vztahu k tématu disertace

#### a) s IF

6) Maixnerová D, Merta M, Reiterová J, Stekrová J, Rysavá R, Obeidová H, Viklický O, Potměšil P, Tesař V: The influence of three endothelin-1 polymorphisms on the progression of IgA nephropathy. *Folia Biol (Praha)*, 2007, 53(1): 27-32. (IF 0,596)

7) Reiterová J, Merta M, Stekrová J, Maixnerová D, Obeidová H, Kebrdlová V, Viklický O, Tesař V: The influence of endothelin-A receptor gene polymorphism on the progression of autosomal dominant polycystic kidney disease and IgA nephropathy. *Folia Biol (Praha)*, 2007, 53(4): 134-137. (IF 0,596)

8) Maixnerová D, Merta M, Reiterová J, Stekrová J, Rysavá R, Viklický O, Obeidová H, Tesař V: The influence of two megsin polymorphisms on the progression of IgA nephropathy. *Folia Biol (Praha)*, 2008, 54(2): 40-45. (IF 1,14)

9) Reiterová J, Obeidová H, Leníček M, Stekrová J, Merta M, Maixnerová D, Vitek L, Viklický O, Tesař V: Influence of VEGF polymorphism on progression of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Blood Press Res*, 2008, 31(6): 398-403. (IF 1,268)

#### b) bez IF

10) Maixnerová D, Honsová E, Merta M, Reiterová J, Rysavá R, Tesař V, Obeidová H, Motan J: Does electron microscopy change the view of the diagnosis of IgA nephropathy? *Prague Med Rep*, 2005, 106(3): 283-290.

11) Maixnerová D, Merta M, Reiterová J, Stekrová J, Rysavá R, Obeidová H, Tesař V: The pathogenetic aspects and gene polymorphisms of IgA nephropathy. *Prague Med Rep*, 2006, 107(2): 171-188.