

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Biomedicína

Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Hana Šafránková (Obeidová)

***GENETICKÝ PODKLAD VYBRANÝCH CHRONICKÝCH
NEFROPATIÍ***

GENETIC BASIS OF SELECTED CHRONIC NEPHROPATHIES

Disertační práce

Školitel: Prof. MUDr. Miroslav Merta, CSc.

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

Praha, 2013

Prohlášení:

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

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

V Praze, 27. 5. 2013

Hana Šafránková

Identifikační záznam:

ŠAFRÁNKOVÁ, Hana. *Genetický podklad vybraných chronických nefropatií. [Genetic basis of selected chronic nephropathies]*. Praha, 2013. 69s., 5 příl. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Klinika nefrologie. Školitel Merta, Miroslav.

Poděkování:

Tato práce by nevznikla bez pomoci a cenných rad mé školitelky konzultantky Doc. MUDr. Jany Reiterové, Ph.D., Ing. Jitky Štekrové a Mgr. Leny Obeidové. Tímto bych jim všem ráda poděkovala.

OBSAH

ABSTRAKT	7
ABSTRACT	8
SEZNAM ZKRATEK	9
1. ÚVOD	11
1.1. Ledviny a filtrace krve	11
1.2. Podocin	14
1.2.1. Zapojení podocinu ve funkci SD	14
1.2.1.1. Interakce podocin-nefrin-Neph1	14
1.2.1.2. Interakce podocin-nefrin-CD2AP	15
1.2.1.3. Interakce podocin-TRPC6	15
1.3. Nefrotický syndrom	16
1.4. Geny podmiňující vznik NS	18
1.5. Minimální změny glomerulů	18
1.6. Fokální segmentální glomeruloskleróza	20
1.7. Český registr renálních biopsií	24
1.8. Vaskulární endotelový růstový faktor	24
2. CÍLE PRÁCE	26
3. METODIKA	27
3.1. Pacienti	27
3.2. Metody	31
3.2.1. Izolace genomové DNA	31
3.2.2. Mutační analýza genu <i>NPHS2</i>	31
3.2.3. PCR	33
3.2.4. Metoda high resolution melting	33

3.2.5. Sekvenace	35
3.2.6. Analýza polymorfismů p.R229Q (c.686G>A) a p.P20L (c.59C>T) genu <i>NPHS2</i>	37
3.2.7. Mutační analýza polymorfismů -2578 (C/A) a -1154 (G/A) v genu <i>VEGF</i> ...	37
3.3. Statistika.....	38
4. VÝSLEDKY	40
4.1. Mutační analýza genu <i>NPHS2</i>	40
4.2. Analýza polymorfismů p.P20L (c.59C>T) a p.R229Q (c.686G>A) genu <i>NPHS2</i>	42
4.3. Analýza polymorfismů <i>VEGF</i>	44
5. DISKUZE	47
5.1. Mutace v genu <i>NPHS2</i>	47
5.2. Rekurence FSGS ve štěpu po transplantaci ledviny	50
5.3. Polymorfismy v <i>NPHS2</i> genu: p.R229Q, p.P20L.....	52
5.4. Vaskulární endotelový růstový faktor.....	54
6. ZÁVĚR	56
7. SEZNAM LITERAURY	57
8. PUBLIKACE	68

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%. Ani 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.

SEZNAM ZKRATEK

ACTN4 – alfa-4 aktinin	GBM – glomerulární bazální membrána
AD – autosomálně dominantní	GFR – glomerulární filtrace
ADPKD – autosomálně dominantní polycystická choroba ledvin	GN – glomerulonefritida
AKT – serin-threonin kináza	GTL – „glomerular tip lesion“
ANGPT4 – „angiotensin – like protein 4	HRM – „high resolution melting“
AR – autosomálně recesivní	IFN2 – formin
Bad – „Bcl-2-associated death promoter“	IGAN – IgA nefropatie
CD2AP – CD2 asociovaný protein	MCD – nemoc minimálních změn
CELL – buněčná varianta	MDRD – „modification of diet in renal disease formula“
CLC1 - „cardiotrophin-like cytokine 1“	MGN – membranozní glomerulonefritida
COLL – kolabující varianta	MYO1E - myosin 1E
DMS – difuzní mesangiální skleróza	NOS - „Not otherwise specified“
DMSO - dimethylsulfoxid	NPHS1 – gen kódující protein nefrin
DNA – deoxyribonukleová kyselina	NPHS2 - gen kódující protein podocin
ENaC - epiteliální sodíkový kanál	NS – nefrotický syndrom
ESRD – renální selhání	n.s. - nesignifikantní
FSGS – fokální segmentální glomeruloskleróza	PAS – „periodic acid Schiff“ barvení
	PCR – polymerázová řetězová reakce

PI3K – fosfatidylinositol-3-kináza

PHB – „prohibitin homology“
doména

PK – proteinkináza

PLCE1 - Fosfolipáza C ϵ

PU – proteinurie

RAAS – renin-angiotensin-
aldosteronový systém

SD – „slit diaphragm“

SLE – systémový lupus
erythemtodes

SSNS – steroid-senzitivní nefrotický
syndrom

SRNS – steroid-rezistentní
nefrotický syndrom

Su-PAR - serum solubilní
urokinasový receptor

TRPC6 – „transient receptor
potential cation channel, subfamily
C, member 6“

UTR - nepřepisovaná oblast genu

VEGF – vaskulární endotelový
růstový faktor

VEGFR1/2 – receptory pro
vaskulární endotelový růstový faktor

VLDL – lipoproteiny o velmi nízké
hustotě

WT1 – gen Wilmsova tumoru

1. ÚVOD

Chronická nefropatie, neboli 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. Tyto příznaky se mohou různě kombinovat. Postupně dochází ke zhoršování ledvinných funkcí, tedy jejich očišťovací a koncentrační schopnosti, které vede 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 klubíčkem vlásečnic, které je obklopeno Bowmanovým pouzdrem. Vlastní 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) (obr.1).

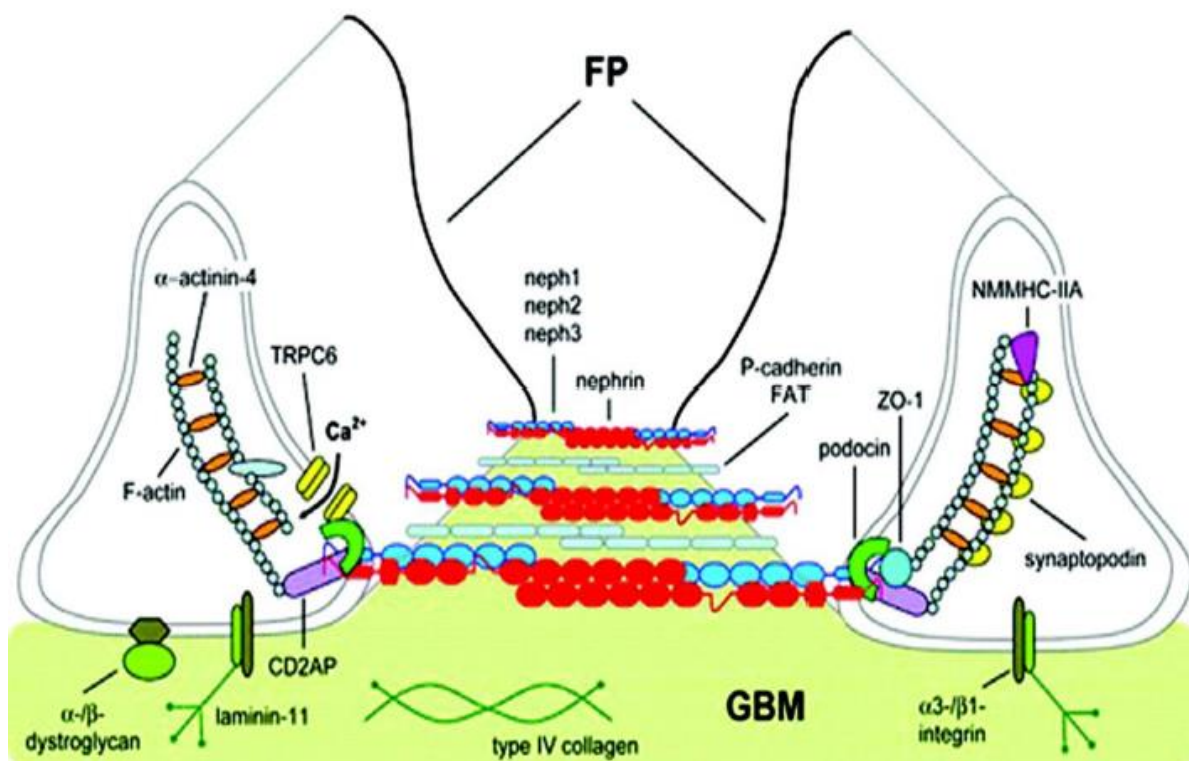


Obr.1: Znázornění filtrační bariéry ledviny krysy v elektronovém mikroskopu, EK – endotelium kapilár, GBM – glomerulární bazální membrána, P – výběžky podocytů, SD – „slit diaphragm“. Zvětšení ~ 48000x. Převzato a upraveno z (1).

Endotelové buňky kapilár vznikají z mezenchymálních buněk, v časných stádiích vývoje glomerulu mají kuboidální tvar a nejsou fenestrované (2). Během vývoje kapilár dochází postupně nejprve k tvorbě překrytých otvorů, které se postupně přemění na otvory velikosti 60-80nm postrádající membránu (3). Těmito otvory dochází k odstraňování malých odpadních molekul z krevního oběhu a je umožněna vysoká výměna vody mezi intra a extravaskulárním prostorem. 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 endotelovou fenestraci (4). Tato hypotéza byla posléze ověřována a potvrzena v mnoha in vivo a in vitro studiích. VEGF představuje rodinu růstových faktorů (VEGF-A až VEGF-E), které hrají roli v signálních drahách zapojených v migraci, proliferaci či permeabilitě buněk (5). Účastní se signálních drah aktivovaných jak ve vaskulogenezi (tvorba cév in situ diferenciací endotelových buněk ze zárodečných hemangioblastů), tak v angiogenezi (vznik cév „pučením“ již existujících cév) (6). VEGF je zapojen v tvorbě nových cév během embryogeneze, po insultu i při tvorbě kolaterál při uzavření stávající cirkulace. Aktivačním faktorem tvorby cév je hypoxie, což se uplatňuje i během tvorby cév v hypoxických oblastech solidních tumorů (7). Produkce VEGF začíná v podocytních buňkách před fenestrací endotelia kapilár a je poté udržována celý život (8). VEGF působí jako ligandy, které svým navázáním na odpovídající membránové receptory (VEGFR1/2) (9) způsobují jejich dimerizaci a aktivaci jejich tyrosin-kinázové aktivity, což spouští signalizační kaskádu v buňce. VEGF receptory jsou v glomerulech umístěny právě v endotelových buňkách kapilár, a tak mohou podocyty regulovanou produkcí VEGF ovlivňovat filtrační vlastnosti fenestrovaných kapilár. Ostatně to potvrdil i výzkum, kdy byla změněna míra produkce VEGF v podocytech a poté sledován fenotyp glomerulárních endotelových buněk (10). Ukázalo se, že ztráta produkce VEGF během vývoje vede ke zúžení glomerulárního endotelia a ztrátě fenestrace. Naopak zvýšená exprese způsobuje kolaps kapilárních klíček. Také po zablokování receptorů VEGF protilátkami bylo pozorováno zužování endotelia kapilár, jeho uvolňování z GBM a mizení jeho fenestrace (11), (12). VEGF ovšem hraje roli i v regeneraci poškozených kapilár, která je zásadní v léčbě glomerulonefritid (GN). Analýza glomerulární mRNA a exprese VEGF prokázala zvýšenou produkci tohoto faktoru během hojení Habu Snake Venom modelu mesangioproliferativní GN, což podporuje význam VEGF v reparačních mechanismech mesangiolytických glomerulárních poškození (13).

Další složkou filtrační bariéry ledvin je **glomerulární bazální membrána** tvořená vláknitou sítí fibrilárních proteinů (převážně kolagen IV) spolu s negativně nabitými proteoglykany (14). Tyto molekuly propůjčují GBM negativní náboj, jenž vedl k hypotéze, že by mohla fungovat jako aniontové síto filtrující molekuly na základě náboje (15), (16). Ovšem v poslední době byla existence aniontového síta zpochybňována (17), (18). Přesto je GBM významnou složkou filtrační bariéry, což dokazuje vznik Alportova syndromu (dědičné GN), pokud dojde k mutaci v genu kódujícím kolagenové řetězce tvořící GBM (19), (20).

Svrchní vrstvu filtrační bariéry glomerulu tvoří specializované endotelové buňky zvané **podocyty** hrající důležitou roli v udržování funkční a neporušené filtrační bariéry. Podocyty mají rozvinuté endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, hojné mitochondrie a lysosomy, což svědčí o vysoké katabolické i anabolické aktivitě a není tedy divu, že většina složek GBM je syntetizována právě podocyty (1). 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), jež byla poprvé konkrétněji popsána v 70. letech na základě mikroskopických pozorování (21). Na konci 90. let byl pak identifikován první protein, jež je součástí této membrány, tzv. nefrin (22), (23), (24) a v roce 1999 byl na základě analýzy jeho struktury navrhnout pravděpodobný model uspořádání jeho molekul ve SD (25). Ten spočívá v homofilických interakcích nefrinových molekul napříč šterbinou mezi pedicelami podocytů. 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. Schematický nákres podocytů a „slit diaphragm“ na obrázku č. 2.



Obr. 2: Schematický nákres výběžků podocytů, SD a glomerulární bazální membrány s některými proteiny hrajícími roli ve funkci podocytů a SD. Převzato z (26).

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. Podocin je membránový protein velikosti 42kDa, který má vlásenkovitou strukturu. V buňce se nachází ve vnitřním listu lipidové dvojvrstvy s N a C koncem směřujícím do cytoplasmy. Začíná se exprimovat v podocytech kolem 12. týdne vývoje plodu a je zde exprimován po celý život. Během embryogeneze je přechodně exprimován i v buňkách srdce (27). Bylo zjištěno, že podocin tvoří homo oligomerní komplexy, které obsahují přibližně 20-50 molekul a váže se k proteinům nefrinu, Neph1, CD2AP a TRPC6 (26), (29), (30). Zapojení podocinu ve funkci SD je popsáno dále.

1.2.1. Zapojení podocinu ve funkci SD

1.2.1.1. Interakce podocin-nefrin-Neph1

Proteiny nefrin, podocin a Neph1 tvoří komplex, který funguje jako transmembránový receptor hrající roli ve strukturní dynamice pedicel. Reorganizace cytoskeletu se pedicel týká hlavně během vývoje podocytů, kdy se diferencují v dospělé buňky, a dále při

poškození podocytů, kdy dochází k procesu splývání pedicel („foot processes effacement“) a následnému vzniku proteinurie (31), (32). Nefrin a Neph1 jsou transmembránové proteiny z rodiny imunoglobulinů IgG, které společně tvoří hetero-oligomerní receptorový komplex v membráně mezi pedicelami (33). Podocin, jakožto protein z rodiny stomatinů, váže komplex nefrin-Neph1 k lipidovým mikrodoménám membrány a správně lokalizovaný komplex pak hraje roli při přenosu signálu do buňky. Součástí těchto signalizačních drah je i aktivace některých proteinkináz (PK) (např. Fyn, Yes, PI3K a Tec) (34). Fyn kináza (ze Src rodiny PK) se přímo váže k nefrinu a katalyzuje fosforylaci jeho tyrosinových zbytků, která navozuje interakci mezi nefrinem a Nck adaptačním proteinem, který dále reguluje funkci aktinového cytoskeletu, a tím ovlivňuje morfologickou stavbu podocytů a oblast inzerce SD. Tato fosforylace probíhá převážně při tvorbě výběžků podocytů, ale byla popsána i ve fázi poškození podocytu (35). 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 (36).

1.2.1.2. Interakce podocin-nefrin-CD2AP

Bylo zjištěno, že protein CD2AP kotví nefrin a podocin k aktinovému cytoskeletu (37). Slouží k udržení struktury podocytu ukotvením mezibuněčných spojů k jeho cytoskeletu. (38). Komplex nefrin-podocin-CD2AP stimuluje signalizační kaskádu, která začíná vazbou a stimulací fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K) oběma proteiny (nefrinem a CD2AP) a končí aktivací AKT (Ser/Thr kináza) fosforylující Bad (Bcl-2-associated death promoter), což je apoptotický protein, který se tak stává inaktivním (39). Poškození SD by tedy mohlo snížit aktivitu této dráhy, což by vedlo k apoptóze podocytárních buněk.

1.2.1.3. Interakce podocin-TRPC6

TRPC6 je gen kódující neselektivní kanál, který umožňuje vstup do buňky převážně pro Ca^{2+} a Na^+ ionty (v poměru 5:1) (40). Váže se k proteinům nefrinu a podocinu ve SD (30). Vazba podocinu na *TRPC6* se ukázala jako velmi důležitá pro jeho stimulaci. Podocin obsahuje tzv. PHB („prohibitin homology“) doménu, která zprostředkovává jeho vazbu k membránovému cholesterolu. Vazba podocinu na *TRPC6* zvyšuje aktivitu tohoto kanálu, ovšem pouze v přítomnosti cholesterolu. Mechanismus ovlivnění aktivity kanálu podocinem není zcela jasný, ale předpokládá se, že by cholesterol, který se díky vazbě s podocinem dostane do blízkosti *TRPC6*, ovlivňoval vlastnosti lipidické

dvojvrstvy, jako jsou její ztuhnutí, rozšíření a tak dále a tím i strukturu a funkci kanálu (41). Vazba TRPC6 s nefrinem reguluje (inhibuje), opět po fosforylaci tyrozinových zbytků, translokaci TRPC6 do plazmatické membrány (42).

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 glomerulární bazální membrány (GBM), které vede k proteinurii (bez přítomnosti leukocytů a erytrocytů v moči). Jiným případem je poškození mesangiálních nebo endotelových buněk, které jsou v přímém kontaktu s krví (obsahující leukocyty, komplement a zánětlivé proteiny). Toto poškození vede typicky k zánětlivé reakci ledvin (nefritidě) s aktivním močovým sedimentem (43). Nízká hladina bílkovin v krvi způsobí snížení onkotického tlaku plasmy, 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“) (44).

Často se u pacientů s nefrotickým syndromem objevují závažné komplikace, jako jsou zvýšená srážlivost krve (koreluje s nízkou hladinou regulačních faktorů jako jsou antitrombin III, protein C a protein S a naopak s vyšší syntézou prokoagulačních faktorů jako je fibrinogen), imunodeficience (pravděpodobně způsobena únikem imunoglobulinů a komplementu do moči, jejich sníženou syntézou a zvýšeným katabolismem, toto vede k vyššímu sklonu k infekci převážně G⁺ bakteriemi), hyperlipidemie (způsobena zvýšenou syntézou převážně lipoproteinů s velmi nízkou hustotou – VLDL a sníženým katabolismem těchto lipoproteinů, hlavním rizikem je ischemická choroba srdeční) (44). 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 (46). Příčiny vzniku NS jsou různé a mění se s věkem a etnickou příslušností. U nejmladších dětí (do 2 let) je nejpravděpodobnější příčinou NS některé dědičné onemocnění (kongenitální nefrotický syndrom finského typu, Denys-Drashův syndrom), u dětí do 4 let je to NS s minimálními změnami glomerulů. U adolescentů a dospělých pacientů jsou hlavními příčinami NS MCD, FSGS a lupusová nefritida. U pacientů starších 40 let se zvyšuje zastoupení membranózní nefropatie, diabetické nefropatie a amyloidózy ledvin (47). V souvislosti s etnickými rozdíly potvrdila studie Haase a spolupracovníků, že NS je u afroameričanů způsoben nejčastěji FSGS, a to u dospělých všech věkových kategorií. Dále byla potvrzena stoupající incidence FSGS napříč etniky (48). Tato situace je ve shodě s daty zjištěnými v našem českém registru renálních biopsií (viz dále).

Průběh nefrotického syndromu 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. Tito pacienti nereagují na standardní terapii kortikosteroidy a do sedmi let u nich dochází ke konečnému selhání ledvin (ESRD) (49). Histologicky je u těchto pacientů ve většině případů zjištěna buď FSGS nebo MCD. Pacienti se selháním ledvin jsou většinou indikováni k zařazení do transplantačního programu. Případy s kortikorezistentním NS patří pravděpodobně mezi geneticky podmíněné formy NS, dochází u nich méně často k návratu proteinurie po transplantaci. U geneticky podmíněných onemocnění dochází k mutacím některých genů kódujícím proteiny působící v oblasti filtrační bariéry ledvin (převážně podocytární proteiny) a tím ovlivňující její funkčnost. Zatím bylo identifikováno 7 genů podocytárních proteinů, jejichž mutace vedou ke vzniku NS. Řada výzkumů se věnuje vlivům mutací podocytárních genů na funkci jimi kódovaných proteinů ve filtrační bariéře ledvin, potažmo principu, jak tyto změny ovlivňují fungování ledvin. Tyto znalosti tedy v praxi ovlivní nejen klinický přístup k pacientovi, ale při zjištění geneticky podmíněné formy onemocnění budeme moci testovat, a tím pádem i předcházet či zmírňovat, přítomnost nemoci u rodinných příslušníků postižených pacientů.

1.4. Geny podmiňující vznik NS

Geny, u nichž bylo zjištěno, že jsou jejich mutace zodpovědné za vznik nefrotického syndromu jsou seřazeny v následující tabulce č.1.

Gen	Lokalizace	Protein	Dědičnost	Věk nástupu	Reference
<i>NPHS1</i>	19q13.1	Nefrin	AR	Prenatálně	(50)
<i>NPHS2</i>	1q25-31	Podocin	AR	Dětství až časná dospělost	(32)
<i>ACTN4</i>	19q13	α 4-aktinin	AD	Dětství až časná dospělost	(51)
<i>TRPC6</i>	11q21-22	TRPC6	AD	Dětství až časná dospělost	(52)
<i>CD2AP</i>	6p12	CD2AP	AD	Dětství až časná dospělost	(53)
<i>PLCE1</i>	10q23-24	Fosfolipáza C ϵ	AR	Časně dětství	(54)
<i>IFN2</i>	14q32	Formin	AD	Adolescence až časná dospělost	(55)

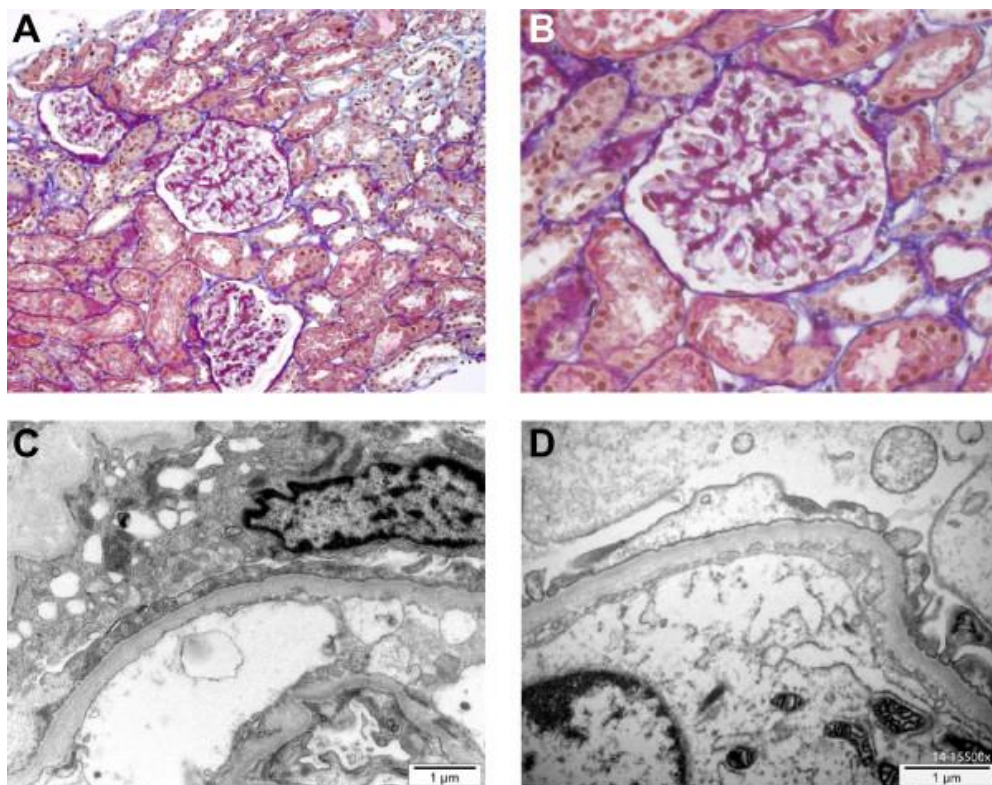
Tab.č. 1 – geny, jejichž mutace způsobují nefrotický syndrom . AR – autozomálně recesivní dědičnost, AD – autozomálně dominantní dědičnost. Převzato z (56).

V roce 2011 byly popsány 3 nové geny, na kterých byly zachyceny mutace u jednotlivých pacientů. Jedná se o Rac1 (actin regulatory protein) (57), MYO1E (membrane-associated class I myosin) (58) a PTPRO (protein tyrosine phosphatase receptor type O) (59).

1.5. Minimální změny glomerulů

Nefrotický syndrom s minimálními změnami glomerulů (MCD – minimal change disease) je onemocněním jak dětského tak dospělého věku. Jedná se o podocytopatii, kdy je histologický nález 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 (histologický nález obr. č. 4). Toto onemocnění má relativně dobrou klinickou odpověď na terapii

glukokortikosteroidy. Stupeň poškození pedicel není přímo úměrný k závažnosti onemocnění. Příčina poškození není zcela jasná. Již v roce 1974 Shalhboub popisoval vznik MCD jako důsledek působení solubilních faktorů produkovaných T lymfocyty na vznik glomerulárních abnormit (60). Ovšem tato teorie je nyní překonaná. Byl objeven vliv změn exprese angiopoietin – like proteinu 4 (ANGPLT4) na podocyty. Glomerulární exprese tohoto glykoproteinu produkovaného podocyty je ovlivněna glukokortikoidy a je vysoce up-regulovaná v podocytech u experimentálního modelu MCD u myši, kde dochází k vymazání pedicel podocytů. (61). MCD a FSGS jsou často uvažovány jako společná jednotka pro shodné klinické projevy a primární poškození podocytů. U obou chorob dochází k poškození podocytů, absenci imunodeposit a rozvoji těžkého defektu glomerulární polopropustnosti. Klinická odpověď na terapii kortikosteroidy je lepší u MCD než FSGS. MCD může být primární či sekundární etiologie (způsobené léky, tumory, infekcí, asociován s alergií). Klinicky většinou začíná rychlým rozvojem nefrotického syndromu, někdy s rozvojem renální insuficience (spíše u dospělých).



Obr.3: Renální biopsie ukazuje normální morfologický nález ve světelné mikroskopii. (Hematoxilin-eosin barvení, A: zvětšení 100×, B: zvětšení 400×). Elektronová mikroskopie ukazuje vymizení pedicel podocytů bez dalších strukturálních změn. (C: zvětšení 11500× a D: zvětšení 15500×). Převzato z (61).

1.6. Fokální segmentální glomeruloskleróza

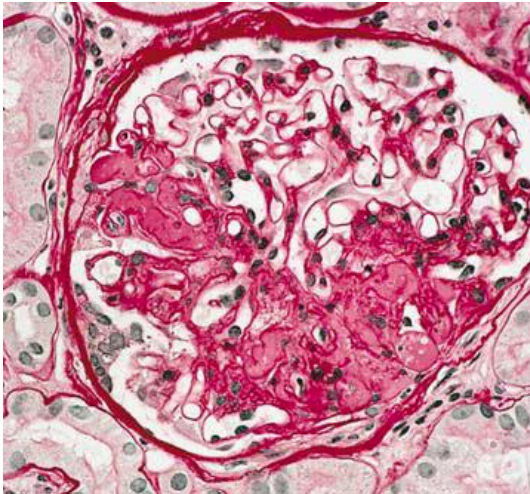
Fokální segmentální glomeruloskleróza je souhrnnou diagnózou popisující částečné (segmental) poškození některých (focal) glomerulů, které se klinicky projevuje nefrotickým syndromem. O FSGS nemůžeme uvažovat jako o jednotné nemoci, jedná se spíše o popisnou diagnózu poškození glomerulů, která se ale liší jak v etiologických, tak morfologických 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 (objevující se jako adaptivní mechanismus např. při zmenšeném renálním objemu, hypertenzi či diabetu), při přímém poškození glomerulu v rámci virové infekce (HIV, parvovirus B19) nebo poškozením léčivý/drogami (heroin, interferon- α , lithium, palmidronát/alendronát) a v neposlední řadě existují i familiární formy FSGS způsobené mutacemi v genech kódujících podocytární proteiny. Zvláštní místo ještě zaujímá primární (idiopatická) FSGS, jejíž příčiny jsou nejasné, pravděpodobně imunologické (63). Přesný mechanismus poškození podocyty není znám, ovšem rychlá rekurence primární FSGS ve štěpu v několika prvních týdnech po transplantaci ledviny předpokládá účast cirkulujícího faktoru vedoucího k poškození podocytů (64). Nelze vyloučit jak roli cirkulujícího faktoru na zhoršování glomerulární filtrace, ovšem ani vliv protektivní substance nalezené v plazmě. Identifikace a charakteristika cirkulujícího faktoru a protektivního faktoru je zatím neznámá (65). V roce 2010 byl popsán jako aktivní faktor ve FSGS „cardiotrophin-like cytokine 1“ (CLC1) (65). V roce 2011 byl v jiné americké studii nalezen serum solubilní urokinasový receptor (suPAR), který je zvýšen u 2/3 pacientů s FSGS, u pacientů s ostatními ledvinnými chorobami nalezen nebyl (66). Bylo také potvrzeno, že vyšší koncentrace suPAR před transplantací vede k vyššímu riziku rekurence FSGS po transplantaci. Na myších modelech byl zkoumán efekt suPAR na ledvinnou funkci a morfologii ledvin. Cirkulující suPAR aktivuje β_3 integrin podocytů v nativních i transplantovaných ledvinách a způsobuje vymazání pedicel podocytů, vznik proteinurie a tím vznik FSGS. Terapie využívá snížení serové hladiny suPAR plazmaferézami nebo protilátkami proti suPAR nebo β_3 integrinu. Tato studie identifikuje serový suPAR jako cirkulující faktor, který může být příčinou FSGS.

Prevalence FSGS stoupá a stává se nyní nejčastější příčinou nefrotického syndromu u dospělých pacientů (66). FSGS velmi špatně odpovídá na terapii kortikosteroidy a často progreduje v renální selhání. Jedno z možných rozdělení FSGS ke klasifikace

histologická – aktuálně se používá Kolumbijská klasifikace dělící FSGS na 5 podskupin, každá s rozdílnou předpokládanou prognózou a specifickým histologickým obrazem (obr.4).

Kolumbijská klasifikace FSGS

1) „Not otherwise specified (NOS)“ - klasická varianta, nejčastější



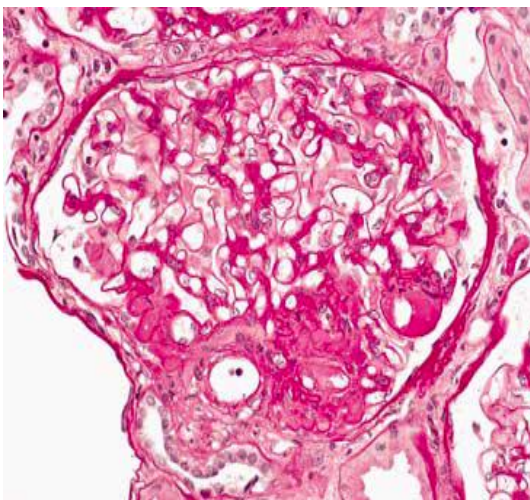
Akumulace matrix a hyalinního materiálu v lumen kapiláry s možnou parciální okluzí. Nenacházíme okrsky kolapsu, poškození tubulárního pólu ani endokapilárního zmnožení buněk.

barvení: PAS reakce

(Periodic Acid Schiff)

zvětšeno 400x

2) „Perihilar“ - nejčastější varianta při hyperfiltraci (tlak v glomerulu je nejvyšší v oblasti nejbliže arteriole – tedy perihilárně)

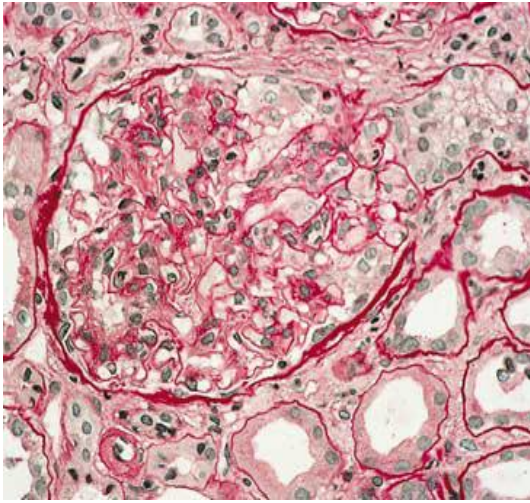


Ucpání některých kapilár glomerulu akumulací hyalinního materiálu v místě glomerulárního hilu (místo vstupu přívodné tepénky do glomerulu). Nejsou zde znaky kolapsu, poškození tip domény ani zmnožení buněk v kapiláře.

barvení: PAS reakce

zvětšeno 250x

3) „Glomerular tip lesion“ (GTL) varianta – často idiopatická, většinou dobře odpovídá na kortikosteroidy

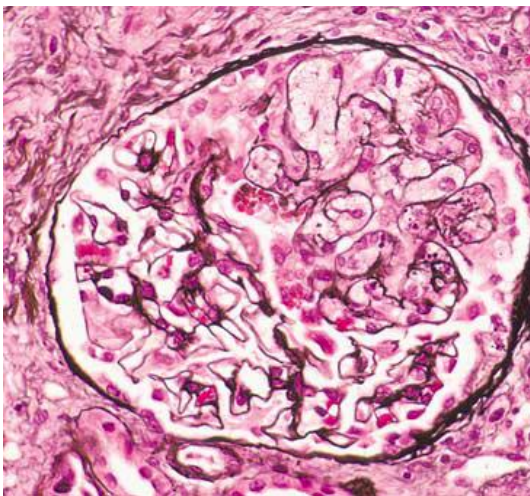


Akumulace pěnových buněk v místě tubulárního pólu. Podocyty se v místě poškození shlukují s epitelálními buňkami proximálního tubulu (tip doména).

barvení: PAS reakce

zvětšeno 250x

4) „Cellular“ (CELL) – buněčná varianta, prognóza středně závažná (mezi NOS a COLL)

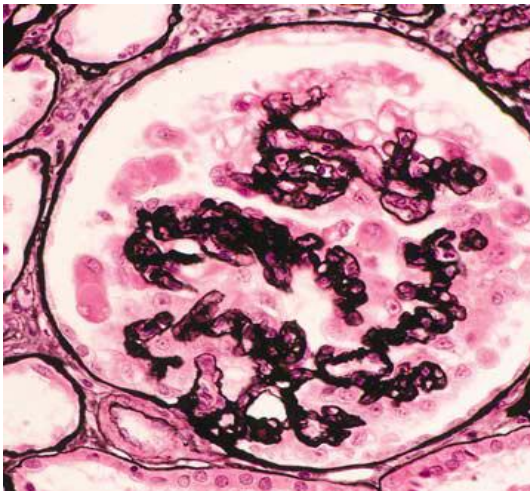


Tuto variantu provází částečné zvětšení a ucpání kapilár pěnovými buňkami. Dále dochází k malé adhezi na Bowmanovo pouzdro. Nedochozí ke kolapsu.

barvení: Jones silver methenamine stain (PAS + stříbření bazálních membrán)

zvětšeno 400x

5) „Collapsing“ (COLL) – kolabující varianta s nejhorší prognózou průběhu. Shluky kolabujících glomerulů s proliferací epitelových buněk



U kolabující varianty vidíme globální zničení kapilár glomerulu kolapsem GBM. Podocyty jsou hypertrofované a zmnožené a některé jsou uvolněné z glomerulárního klubička.

barvení: Jones silver methenamine stain

zvětšeno 400x

Obr.4 (1-5): histologická klasifikace FSGS - převzato z (68).

Poškození podocytů se projevuje mizením pedicel („foot proces effacement“), 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. Obnažená GBM má tendenci přichytit se k parietálním epitelovým buňkám GBM a tak vytvářet synechie. Kapilární kličky bez podpory mohou propouštět filtrát spíše do intersticia než do Bowmanova prostoru a nakonec kolabují s trombózou a hyalinózou.

Glomerulární hyperfiltrace – ztráta nefronů (snížení počtu) nebo dilatace aferentní arterioly (při obezitě) vedou k hypertenzi v rámci glomerulu a hyperfiltraci. Při dlouhodobém působení těchto faktorů dochází k poškození podocytů a rozšíření glomerulárních kapilár. Osoby afrického původu mají méně, ovšem větších glomerulů než Kavkazané, což může vysvětlovat vyšší prevalenci FSGS u černošského etnika (48). Vliv na počet nefronů má i donošenost novorozenců. Rozvoj nefronů probíhá ve 3. trimestru těhotenství, proto u předčasně narozených dětí nacházíme menší počet nefronů než u donošených dětí. Tyto faktory mohou ovlivňovat rozvoj hyperfiltrace glomerulů a zvýšené riziko ledvinného postižení v dalším životě (69).

1.7. Český registr renálních biopsií

Data o pacientech bioptovaných v celé České republice jsou shromážděna v Českém registru renálních biopsií. Celkově bylo mezi lety 1995-2010 biopticky vyšetřeno 9500 pacientů, tj. cca 600 bioptovaných ročně, z toho 60% mužů a 40% žen. Počet bioptovaných dětí klesá od cca 25% (1995) k 11% (2010). Ze všech vyšetřených pacientů byla fokální segmentální glomeruloskleróza diagnostikována u cca 50 vyšetřených ročně (lehce stoupající tendence v posledních 15 letech, asi z 30 případů/rok), což činí asi 8% ze všech bioptovaných, obdobný počet jako u MGN. Minimální změny glomerulů jsou popsány u cca 30 pacientů ročně (naopak klesající tendence v posledních 15ti letech, cca z 50ti případů ročně). Důvod těchto změn není zřejmý (70).

1.8. Vaskulární endotelový růstový faktor

Vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF) je, jak je již zmíněno výše, je důležitým signalizačním proteinem zapojeným ve vaskulogenezi a angiogenezi. Má mitogenetickou aktivitu vzhledem k endotelovým buňkám, ale působí i na jiné typy buněk (stimulace monocyto/makrofágového systému migrace). 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 (4), 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 funkčních nefronů). Důvody zvýšené produkce VEGF zatím nejsou známy (71). V případě trombotické mikroangiopatie bylo experimentálně ověřeno naopak pozitivní působení podání VEGF na glomerulární a tubulointersticiální reparaci (72). Pozitivní efekt má i v tubulárních buňkách, které odpovídají na hypoxii nebo poškození produkcí VEGF, která následně stimuluje proliferaci peritubulárních kapilár (71). Korelace mezi plazmatickými a močovými hladinami VEGF a proteinurií u různých glomerulonefritid nebyla potvrzena. Pozitivní korelace mezi hladinami VEGF v moči a proteinurií by mohla mít vztah ke ztrátám podocytů do moči (73) spíše než přímému vlivu VEGF na vznik poškození ledvin. Vysoká exprese VEGF podocyty způsobila spíše kolabující glomerulopatii než pouhou proteinurii (74). Existují strategie inhibovat nebo

podporovat tvorbu VEGF, které měly slibné výsledky u zvířecích různých druhů 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, kolorektálních, prsu a ledviny (75).

Gen *VEGF* je lokalizován na krátkém raménku 6. chromozomu (6p21.3) (76), skládá se z 8 exonů, které mají alternativní sestřih a tvoří rodinu proteinů (77). Produkce VEGF je indukována hypoxií, ale i dalšími faktory (estrogeny, jinými růstovými faktory, cytokiny) (78). Tento gen je vysoce polymorfní, zvláště oblast promotoru genu (5'-3' nepřepisovaná oblast UTR) (79). Polymorfismy mají vliv na hladiny serového VEGF (80). Jejich asociace byla prokázána u některých onemocnění, jako je akutní renální rejekce allotransplantátu (81), diabetická retinopatie (82), preeclampsie (83).

K vyšetřování u našich pacientů jsme vybrali VEGF polymorfismus na pozici -2578 (A/C) a -1154 (A/G) *VEGF* promotoru. V předchozích studiích byl prokázán jejich vliv na hladinu serového VEGF (79), (81). 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. METODIKA

3.1. Pacienti

Pacientům s histologicky potvrzenou diagnózou FSGS/MCD (stanovenou ze vzorku renální biopsie), kteří dali písemný poučený souhlas s vyšetřením DNA, byl odebrán vzorek krve a z periferních lymfocytů byla vyizolovaná 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 $42,2 \pm 16$ let). Průměrný věk pacientů v době nástupu nefrotického syndromu byl $33,2 \pm 18,6$ let. U 10 pacientů byly první projevy nefrotického syndromu zachyceny již v dětství (3-17 let). U 4 pacientů byla zjištěna pozitivní rodinná anamnéza, kdy byl nefrotický syndrom přítomen i u dalších členů rodiny. Ve všech případech se pravděpodobně jednalo o autozomálně dominantní typ dědičnosti. Pacienti byli rozděleni dle klinické odpovědi na kortikosteroidy. Jako kortikorezistentní pacient byl definován ten, u kterého do 6 měsíců při podávání plné dávky kortikoidů (1mg/kg tělesné hmotnosti prednisonu) nedošlo k významnému poklesu proteinurie. 34 pacientů bylo na kortikosteroidy rezistentních, u 37 pacientů byla zjištěna remise onemocnění při terapii kortikosteroidy.

Po podepsání informovaného souhlasu byla odebrána krev a následně vyizolována DNA od 169 pacientů s histologicky potvrzenou diagnózou IgA nefropatie (IGAN). Průměrný věk pacientů s IGAN byl v době renální biopsie $45,2 \pm 14,8$ 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 byla po podepsání informovaného souhlasu vyizolována DNA od 46 pacientů s histologicky potvrzenou diagnózou membranózní nefropatie (MGN). Průměrný věk souboru pacientů s MGN v době renální biopsie 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). Dobrovolníci byli náhodně vybráni z dárců krve. U všech byl přítomen normální močový sediment bez proteinurie.

Do souboru pacientů, u kterých bylo provedeno vyšetření polymorfismů genu *VEGF*, bylo zařazeno 213 pacientů s biopticky verifikovanou chronickou glomerulonefritidou (126 mužů, 87 žen, věk v době diagnózy $46,7 \pm 17,1$ let.). Jednalo se o 56 pacientů s MCD/FSGS (průměrný věk v době diagnózy $45,7 \pm 20,5$), 44 pacientů s MGN (věk v době diagnózy $56,8 \pm 13,9$) a 113 pacientů s IGAN (průměrný věk diagnózy $43,2 \pm 14,8$). Bližší klinické údaje o pacientech jsou uvedeny v tabulce č.2 – jedná se o informace v době diagnózy a po skončení doby sledování, která byla v průměru 2 roky ($23,9 \pm 28,7$ měsíců). Kontrolní skupina zde byla tvořena 311 pacienty (153 mužů, 158 žen, průměrný věk $44,6 \pm 9,2$ let).

Chronická GN	MCD/FSGPPr	MGN	IGAN	Všechny GN
	Průměr±SD	Průměr±SD	Průměr±SD	Průměr±SD
N	56	44	113	213
Pohlaví muži + ženy	23+33	28+16	75+38	126+87
n.s.				
Věk v době dg. (roky)	45,7±20,5	56,8±13,9	43,2±14,8	46,7±17,1
MGN:MCD/FSGS, IGAN				
p<0,001				
Doba sledování (měsíce)	23,7±32,8	31,4±14,9	18,5±28,6	23,9±28,7
n.s.				
Údaje v době diagnózy				
Arteriální hypertenze	67,9%	54,5%	77%	69,9%
MGN:MCD/FSGS, IGAN				
p<0,01				
S-kreatinin (μmol/l)	128,4±131,9	85,2±28,2	169,1±125,3	141,1±118,7
MGN:MCD/FSGS, IGAN				
p<0,001				
GFR (ml/s/1,73m ²)	1,50±0,95	1,87±0,91	1,10±0,61	1,37±0,95
IGAN:MCD/FSGS, MGN				
p<0,001				
Proteinurie(g/24hod)	5,7±4,7	5,2±4,5	2,4±2,4	3,9±3,9
IGAN:MCD/FSGS, MGN				
p<0,001				
S-albumin (g/l)	27,4±9,9	24,8±6,9	36,3±6,7	31,6±9,2
IGAN:MCD/FSGS, MGN				
p<0,001				
Údaje na konci sledování				
S-kreatinin (μmol/l)	126,9±108,5	102,3±51,3	181,7±147,7	151,1±127,7
IGAN:MCD/FSGS, MGN				
p<0,001				
GFR (ml/s/1,73m ²)	1,41±0,85	1,53±0,76	1,15±0,67	1,30±0,75
IGAN:MGN p<0,01				
IGAN:MCD/FSGS n.s.				
Proteinurie(g/24hod)	1,77±2,85	1,77±2,86	1,18±1,80	1,46±2,20
n.s.				
S-albumin (g/l)	39,6±6,5	35,5±6,8	42,6±4,9	40,37±6,39
IGAN:MCD/FSGS, MGN				
p<0,001				

Tab.2 – popis souboru pacientů vyšetřovaných na polymorfismy *VEGF*.

GN – glomerulonefritida, FSGS/MCD – fokální segmentální glomeruloskleróza/minimální změny glomerulů, IGAN – IgA nefropatie, MGN – membranozní glomerulonefritida, N - počet pacientů, n.s. – nesignifikantní, dg. – diagnóza, S-kreatinin: serový kreatinin, S-albumin: serový albumin, GFR (glomerular filtration rate): glomerulární filtrace - vypočteno s pomocí MDRD (modification of diet in renal disease formula) (84).

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 genu *NPHS2*

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. Primery pro PCR a HRM analýzu byly navrženy tak, že amplifikované úseky obsahovaly exonové a také hraniční oblasti mezi exony a introny. Sekvence primerů spolu s délkami amplifikovaných úseků a anelačními teplotami používanými při PCR jsou uvedeny v tabulce č.3.

Exon	Primer: Forward (5'-3') / Reverse (5'-3')	Rozsah [pb]	Anelační teplota [°C]
1	F: GCAGCGACTCCACAGGGACT R: TCCACCTTATCTGACGCCCC	420	62
2	F: AGTCAGTGAATACAGTGAAG R: GGCCTCAGGAAATTACCTA	203	56
3	F: TTCTGGGAGTGATTTGAAAG R: TGAAGAAATTGGCAAGTCAG	168	56
4	F: AAGGTGAAACCCAAACAGC R: CGGTAGGTAGACCATGGAAA	204	56
5	F: CATAGGAAAGGAGCCCAAGA R: TTTCAGCATATTGGCCATTA	293	56
6	F: GGGTTTAGGCATGCTCTCCT R: TTTCCTTTATCATACAGTTCTTGC	165	55
7	F: CTAAATCATGGCTGCACACC R: CTCCTAAAGGGCAGTCTGG	167	62
8	F: GGTGAAGCCTTCAGGGAATG R: TTCTATGGCAGGCCCTTTA	380	56

Tab.3: Seznam primerů navržených pro gen *NPHS2* spolu s rozsahy amplifikovaných úseků a anelačními teplotami.

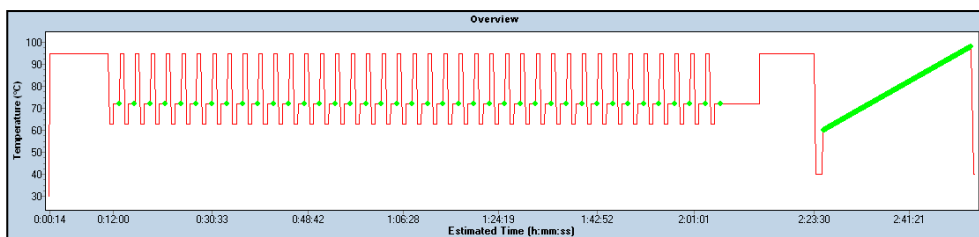
3.2.3. PCR

Reakční směs pro přípravu PCR reakce se skládala z 5 μ l Taq pufru, 1,2 μ l Taq polymerázy a 4 μ l 25 mM MgCl₂ (vše firma Fermentas) spolu s 36 μ l vody (Braun Medical), 1 μ l dNTP (Bio-Rad Laboratories) a 1 μ l primerů (2x1 μ l) (GENERI BIOTECH). V úseku 1 bylo navíc do reakční směsi přidáno 5 μ l dimethylsulfoxidu (DMSO) na úkor vody. Do směsi byl přidán 1 μ l 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, anelační teplota / 1 min, 72°C / 1 min; závěrečná extenze: 72°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 transluminátoru (LKB 2011 MacroVue Transilluminator).

3.2.4. Metoda high resolution melting

Metoda high resolution melting (HRM) je poměrně nová analytická metoda, která 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 a skládá se z několika fází. Obecný protokol vypadá takto:

- 1) Nejdříve dochází k namnožení požadovaného úseku DNA (PCR) v přítomnosti interkalační barvy. Díky této barvě je po každém PCR cyklu měřena koncentrace DNA.
 - 2) Poté jsou vzorky ohřáty na teplotu, kdy dochází k tání dvojřetězců na jednořetězcové úseky.
 - 3) Načež jsou rychle zchlazeny. Rychlým zchlazením pak dochází k párování řetězců, které jsou nejbližší u sebe a mohou tak vzniknout heteroduplexy.
 - 4) Dále pokračuje fáze pomalého ohřívání vzorků, kdy je konstantně měřena fluorescenční aktivita ve vzorcích díky interkalační barvě. Tato fáze experimentu je velmi důležitá, neboť při ní dochází k tání duplexů, z jejichž vygenerovaných křivek teplot tání jsme schopni rozlišit genetické variace ve vzorcích.
 - 5) Poté jsou vzorky ochlazeny na teplotu kolem 40°C a mohou být vyndány z přístroje.
- Vše shrnuto na obrázku 5.



Obr.5. Na tomto schématu je znázorněn obecný protokol metody HRM. Zeleně je znázorněno fluorescenční měření. V první fázi vidíme krátké cykly PCR. Dále jsou vzorky ohřáty na teplotu, ve které vznikají jednovláčkové úseky, a následně jsou rychle zchlazeny (vznik heteroduplexů). Poté jsou vzorky pomalu ohřívány a současně dochází po celou dobu k měření fluorescence.

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 μ l vody, 5,6 μ l master mixu, 1 μ l MgCl₂ (vše bylo součástí dodaného kitu) spolu s 0,045 μ l po každém primeru s koncentrací 50pmol/ μ l. U úseků 1 a 3 byla reakční směs navíc doplněna o 0,45 μ l DMSO (MP Biomedicals) na úkor vody, který napomáhá větší specifitě reakce. Reakce probíhala v celkovém objemu 10 μ l (9 μ l reakční směsi + 1 μ l genomové DNA o koncentraci 10 μ g/ μ l). K pipetování bylo často použito automatické pipetovací linky epMotion® 5075 (Eppendorf). Základní program HRM metody včetně amplifikační fáze je shrnut v tabulce č.4.

Fáze	Teplota [°C]	Čas [min]
Aktivace polymerázy	95	02:00
Amplifikace 1 (10x)	95	00:30
	60	00:30
	72	01:00
Amplifikace 2 (50x)	95	00:30
	55	00:30
	72	01:00
Finální elongace	72	07:00
HRM	95	10:00
	40	01:00
	60 → 98 (0,02°C/sec)	
Chlazení	40	00:10

Tab.4. Shrnutí programu HRM analýzy včetně její amplifikační fáze u všech analyzovaných úseků *NPHS2* genu.

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 μ l (4,7 μ l reakční směsi, 0,3 μ l produktu z PCR či HRM analýzy). Reakční směs byla připravována z 2 μ l kitu BigDye® Terminator v1.1 (Applied Biosystems), 2,15 μ l vody (Braun Medical), 0,25 μ l DMSO (MP Biomedicals) a 0,3 μ l primeru (o koncentraci 10 pmol/ μ l).

Po sekvenační reakci bylo vždy provedeno čištění produktu pro lepší výsledky při samotné sekvenaci. 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 μ l produktu ze sekvenační reakce přidalo 20 μ 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 odstříknul. Dále se přidalo 60 μ l 70% ethanolu a stočilo 10 minut při 13 543g. Opět se ze zkumavek odstříknul neusazený produkt a zkumavky se nechaly otevřené 1 minutu sušit při 90°C. Nakonec bylo přidáno 30 μ l

formamidu a zkumavky pak byly dány na 5 minut do 95°C, aby došlo k denaturaci produktu. Po skončení denaturace se zkumavky rychle přemístily na chladicí stojánek a až do sekvenační analýzy udržovaly v mrazícím 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 μ l produktu se přidalo 13 μ 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 odstříknul a bylo přidáno 60 μ l 70% ethanolu, opět se nechalo centrifugovat 10 minut při 13 543g a neusazený obsah zkumavky se odstříknul. 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 μ l formamidu a nechaly se 5 minut při 95°C pro denaturaci DNA. Ihned po denaturaci byly přeneseny do chladícího stojánku a uchovávány do sekvenace v mrazícím boxu. Sekvenace byla prováděna nejdříve na sekvenátoru ABI PrismTM 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) genu *NPHS2*

Restrikční analýza záměny c.686G>A (p.R229Q) v 5. exonu genu *NPHS2* 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: 11μl vody (Braun Medical), 1,5μl pufru a 0,8μl endonukleázy (BioLabs). Tato směs byla inkubována 3 hodiny při 37°C a poté byla obarvena bromfenolovou modří a nanesena na 2% agarózový gel, kde došlo při 150V napětí k rozdělení rozštěpených úseků. V přítomnosti polymorfismu došlo ke ztrátě restrikčního 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 (viz výše) 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 (viz výše) s primery a anelačními teplotami uvedenými v tabulce č.5.

	Primer: Forward (5'-3') / Reverse (5'-3')	Anelační teplota [°C]
VEGF -2578 C/A	F: CATGATCCCAAGCTGAAAGGCATG R: GATGCTCCTGCTCTGATCC	56
VEGF -1154 G/A	F: TTTCCCAGCATGTGTGTTGT R: ATTTTGTGTTGTTCTCCACCGA	58

Tab.5: Seznam primerů navržených pro polymorfismy VEGF -2578 C/A a VEGF -1154 G/A spolu s anelačními teplotami.

VEGF -2578 (C/A): Reakční směs pro přípravu PCR reakce se skládala opět z 5 μ l Taq pufru, 1,2 μ l Taq polymerázy a 4 μ l 25 mM MgCl₂ (vše firma Fermentas) spolu s 36 μ l vody (Braun Medical), 1 μ l dNTP (Bio-Rad Laboratories) a 1 μ l primery (2x1 μ l) (GENERI BIOTECH). Do směsi přidán 1 μ l 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 bází 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 2,5 μ l Taq pufru, 0,5 μ l Taq polymerázy a 1,5 μ l 25 mM MgCl₂ (vše firma Fermentas) spolu s 16 μ l vody (Braun Medical), 0,5 μ l dNTP (Bio-Rad Laboratories) , 1 μ l primerů (2x1 μ l) (GENERI BIOTECH) a 1,6 μ l dimethylsulfoxidu. Do směsi přidáno 0,5 μ l 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 sekvenační reakce opět na přístroji MyCycler (Bio-Rad Laboratories) při programu: denaturace 96°C / 3 min; následována 25 cykly 96°C / 20 sec, 50°C / 10sec, 60°C / 4 min; závěrečná extenze 60°C / 1 min. Reakce byla prováděna v objemu 4,8 μ l (4,3 μ l reakční směsi, 0,5 μ l produktu z PCR či HRM analýzy). Reakční směs byla připravována z 2 μ l kitu BigDye® Terminator v1.1 (Applied Biosystems), 1,7 μ l vody (Braun Medical), 0,3 μ l DMSO (MP Biomedicals) a 0,3 μ l primeru (o koncentraci 10pmol/ μ l). Čištění produktu v tomto případě bylo prováděno metodou „etanolového čištění“ viz výše.

3.3. Statistika

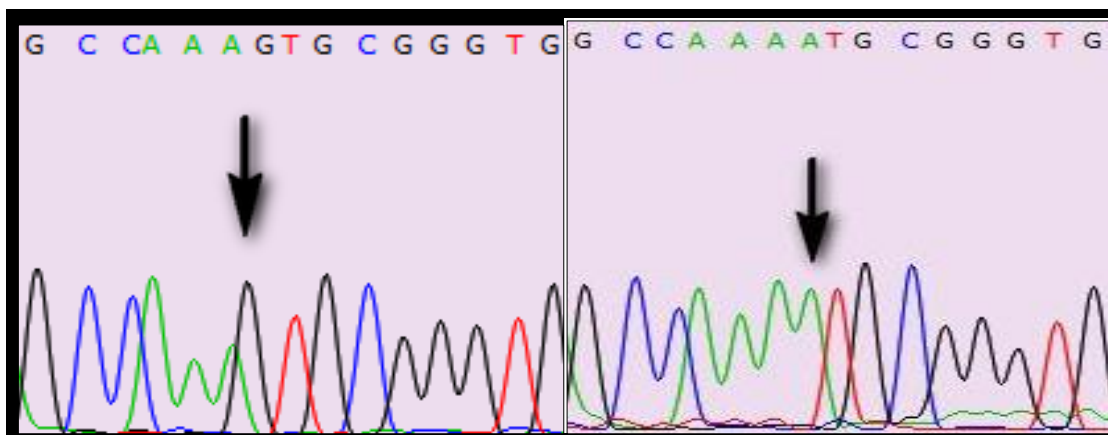
Pro každý polymorfismus byly vypočítány alelové frekvence z genotypu. Hardy-Weinbergova rovnováha byla testována v kontrolní skupině Pearsonovým χ^2 testem. K porovnání distribuce genotypů mezi různými GN navzájem a mezi GN a kontrolní skupinou byl použit χ^2 -test. Věk renálního selhání se zřetelem k různým genotypům byl

porován 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 genu *NPHS2*

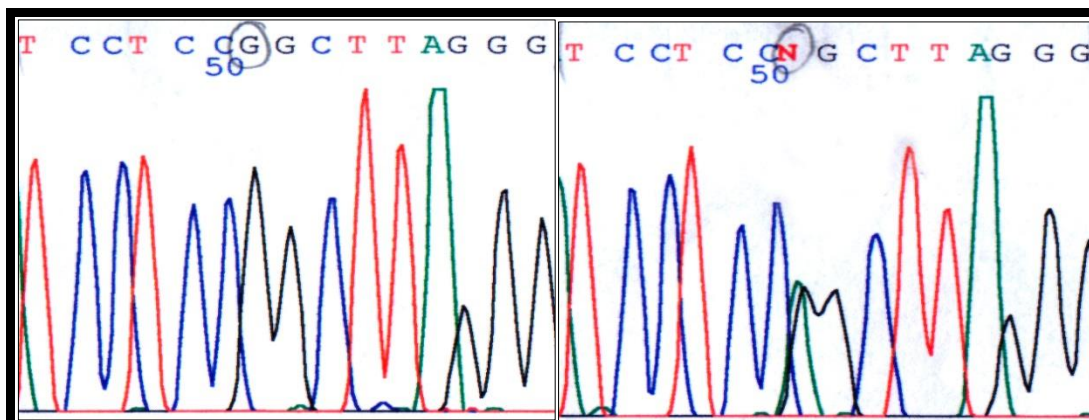
Ze 71 vyšetřených pacientů s biopticky verifikovanou FSGS/MCD byla jednoznačně patogenní mutace nalezena pouze u jedné pacientky. Jedná se o homozygotní *NPHS2* mutaci c.G868A (p.V290M) v 7. exonu, která způsobuje záměnu konzervativní aminokyseliny v cytoplazmatické oblasti podocinu. Obr.6.



Obr. 6: Homozygotní záměna G-A v 868. nukleotidu, v kodonu 290, exonu 7, genu *NPHS2* – **p.V290M**. Vede k substituci valinu (GTG) za metionin (ATG).

Tato mutace byla již popsána jako příčina FSGS, ale v heterozygotním stavu (84). Klinicky se onemocnění projevilo u pacientky ve 3 letech. Po imunosupresivní terapii (kortikosteroidy a další imunosupresiva včetně cyklofosfamidu, cyklosporinu a mykofenolátu mofetilu) došlo jen k parciální a dočasné odpovědi na terapii, kdy se pouze přechodně snížila protienurie. Pacientka (nyní 24 letá) čeká na transplantaci ledviny. Na základě zjištěného genetického podkladu onemocnění se domníváme, že nedojde k relapsu FSGS ve štěpu, pokud transplantovaná ledvina bude od nepříbuzného dárce.

Dále byla nalezena nová, ještě nepopsaná záměna c.G291A (p.G97S) ve 2. exonu (obr. 7).



Obr.7 Heterozygotní záměna G-A v 291. nukleotidu, v kodonu 97, exonu 2 genu *NPHS2* – **p.G97S**. Vede k substituci glycinu (GGC) za serin (AGC).

Tato záměna byla nalezena v heterozygotní formě u pacienta s kortikorezistentním nefrotickým syndromem. Stejná záměna nebyla nalezena u žádného z 300 zdravých jedinců. Substituce hydrofobní aminokyseliny glycin za hydrofilní aminokyselinu serin se ovšem nenachází v konzervované oblasti genu, neboť byla po porovnání s dalšími savci nalezena i u divokého prasete (Tab. 6).

↓ **p.G97S**

Homo sapiens podocin /ref. P_055444.1/		KSS <u>G</u> LGACEWLL
Oryctolagus cuniculus /ref.XP_002715053.1/	„králík divoký“	KSS <u>G</u> LGACEWLL
Sus scrofa /ref. XP_003130389.1/	„divoké prase“	KSS <u>S</u> LGACEWLL
Mus musculus /ref.NP_269723.1/	„myš domácí“	KPS <u>G</u> LGACEWLL
Monodelphis domestica /ref.XP_001374197.1/	„vačice domácí“	KSS <u>H</u> LGMC EWLL
Gallus gallus /ref.XP_422265.2/	„kur bankivský“	KSP <u>G</u> LNICEWLL

Tab 6. Uspořádání p.G97S substituce v genu *NPHS2* u některých savců

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. Je možné, že může být mutace v dalším genu zodpovědném za vznik nefrotického syndromu, eventuálně nelze vyloučit ani změnu v intronu, která by mohla způsobit abnormální střih. K rozvoji nefrotického syndromu došlo u pacienta v 9 letech, a byla biopticky prokázána FSGS. Dlouhodobé léčení imunosupresí bylo neúspěšné (kortikosteroidy, cyklosporin, chlorambucil, mykofenolát mofetil) a pacient prodělal četné infekční komplikace spojené s terapií. Ve 25 letech došlo k renálnímu selhání a pacient zahájil hemodialyzační terapii. Vyjádřit se k eventuálnímu relapsu onemocnění ve štěpu ledviny po transplantaci není možné. Pravděpodobně je riziko stejně vysoké jako u pacientů, u kterých nebyla mutace zjištěna (nebo byla nalezena pouze na jedné alele *NPHS2* genu).

U jedné 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 a následně cyklofosfamid. 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 kortikorezistentní FSGS u této pacientky.

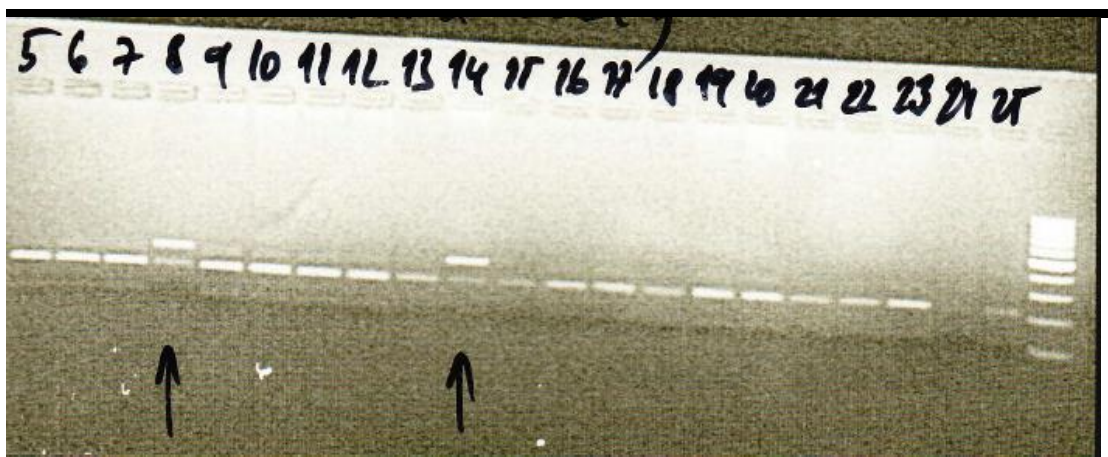
4.2. Analýza polymorfismů p.P20L (c.59C>T) a p.R229Q (c.686G>A) genu *NPHS2*

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 (obr. 8, 9) a polymorfismus p.P20L (obr. 10). Polymorfismus p.P20L byl nalezen u 3 pacientů s kortikorezistentní formou FSGS (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 nebyl polymorfismus p.P20L zjištěn u žádného pacienta. V kontrolním souboru byl zjištěn u 3 pacientů (1%). Nejčastější polymorfismus p.R229Q byl v heterozygotním stavu nalezen u 6 pacientů (8,4%) s FSGS, u 4 kortikorezistentních pacientů a u 2 kortikosenzitivních 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%). Polymorfismus p.R229Q byl identifikován u 2

pacientů s MGN (4,3%). V kontrolním souboru byl popsán u 10% vyšetřovaných (tab.7).

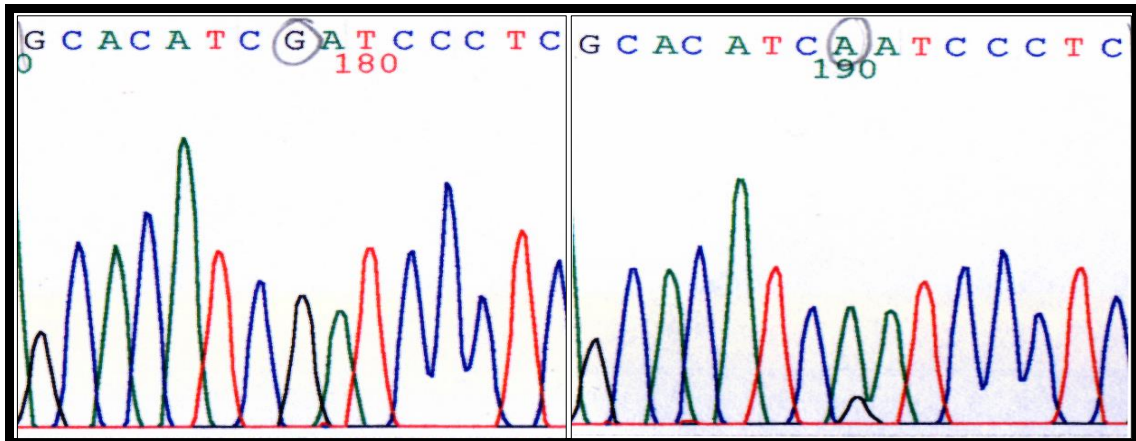
Diagnóza	FSGS	FSGS	IGAN	IGAN	MGN	Kontrolní soubor
Odpověď na terapii	SSNS	SRNS	stabil	progres		
Počet pacientů	37	34	63	106	46	300
p.P20L	0	8,8%	0	2,8%	0	1%
p.R229Q	5,4%	11,8%	9,5%	16%	4,3%	10%

Tab.7. Výskyt p.P20L a p.R229Q polymorfismů v genu *NPHS2*.

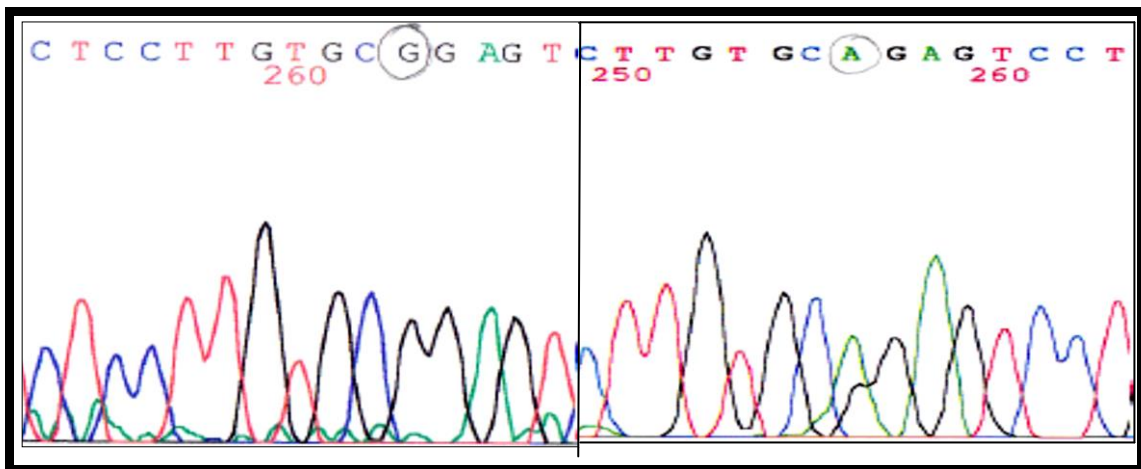


Obr.8. Elektroforéza vzorků exonu 5 genu *NPHS2* po restrikci endonukleázou BSU15I.

Vzorky s rozdělenými úseky následně sekvenovány. U vzorků s polymorfismem p.R229Q došlo ke ztrátě restrikčního místa endonukleázy a nedochází tak ke štěpení úseku DNA.



Obr.9: Záměna G-A v 686.nukleotidu, v kodonu 229, exonu 5 genu NPHS2 - p.R229Q. Vede k substituci argininu (CGA) za glutamin (CAA).



Obr.10: Záměna C-T (v reversu G-A) v 59. nukleotidu, v kodonu 20, exonu 1 genu NPHS2 – p.P20L . Vede k substituci prolinu (CCG) za leucin (CTG).

4.3. Analýza polymorfismů VEGF

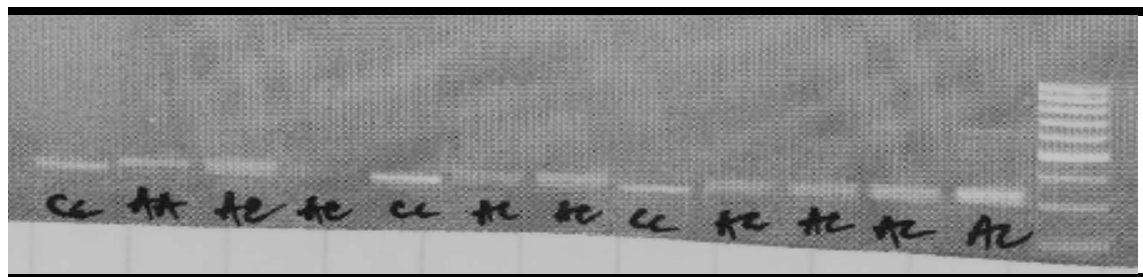
Polymorfismy VEGF -2578 (C/A) (obr.11) a -1154 (G/A) jsme vyšetřili u 213 pacientů s chronickou glomerulonefritidou. Detailnější rozbor vyšetřovaných pacientů je uveden v tabulce č.2 (viz výše). Převažovali pacienti s IGAN (113/100 s ostatními diagnózami). Pacienti s MGN byli starší než ostatní, průměrná doba sledování byla 2 roky. Arteriální hypertenze byla v době diagnózy přítomna u 70% pacientů, nejméně postižená byla skupina pacientů s diagnózou MGN. Renální funkce byly v době diagnózy lehce snížené napříč celým spektrem pacientů (vyšší hladina serového kreatininu a snížená glomerulární filtrace). Nejtěžší postižení renálních funkcí měli pacienti s IGAN, nejlehčí postižení pacienti s MGN. Nefrotická proteinurie byla vstupně zaznamenána také u celého spektra pacientů, nejvyšších hodnot dosahovala u pacientů s MCD/FSGS a MGN (oproti IGAN), průměrně kolem 4g/den. Tomuto odpovídala také hladina albuminu, která byla nejnižší u pacientů s nejvyšší proteinurií. Na konci sledování byla

hladina serového kreatininu v průměru $151,1 \pm 127,7$ $\mu\text{mol/l}$ a průměrná GFR $1,3 \pm 0,75$ ml/s, takže během dvouletého sledování relativně stabilní. Došlo k výraznému snížení proteinurie (průměrně na 1,5g/den) a nárůstu serového albuminu napříč celým spektrem pacientů.

Výsledky provedených vyšetření uvádíme v následující tabulce (Tab 8).

Chronická GN	MCD/FSGS	MGN	IGAN	Všechny GN	Kontrolní
N	56	44	113	213	311
-2578 VEGF C/A					
AA	11 (19,6%)	14 (31,8%)	21 (18,6%)	46 (21,6%)	62 (20%)
AC	21 (37,5%)	20 (45,5%)	62 (54,9%)	103 (48,4%)	177 (57%)
CC	24 (42,9%)	10 (22,7%)	30 (26,5%)	64 (30%)	72 (23%)
Alela A	38,35%	54,5%	46,05%	45,8%	54,2%
Alela C	61,65%	45,5%	53,95%	54,2%	51,5%
-1154 VEGF G/A					
AA	4 (7,3%)	8 (18,2%)	14 (12,6%)	26 (12,4%)	72 (23%)
AG	20 (36,4%)	20 (45,4%)	45 (40,5%)	85 (40,5%)	127 (41%)
GG	31 (56,3%)	16 (36,4%)	52 (46,9%)	99 (47,1%)	112 (36%)
Alela A	25,5%	40,9%	32,85%	32,65%	43,5%
Alela G	74,5%	59,1%	67,15%	67,35%	56,5%

Tab 8.: Distribuce -2578 (C/A) a -1154 (G/A) VEGF polymorfismu u pacientů s GN. Polymorfismus -2578 C/A: CC genotyp: MCD/FSGS: MGN, IGAN $p < 0,05$, MCD/FSGS: kontroly $p < 0,01$, ostatní porovnání n.s. ($p > 0,05$).



Obr.11: VEGF -2578 A/C, inzerce 18 bazí na pozici -2549 je asociována s přítomností A alely. Kratší alela (bez inzerce) je asociována s přítomností C alely.

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 GFR 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 serového kreatininu v době diagnózy (GG alela: $150 \pm 170,5$ ml/s versus CC a CG alela: $102,4 \pm 46,8$ $\mu\text{mol/l}$, $P = 0,07$) a analogická korelace mezi -1154 G/A polymorfismu VEGF a klinicko-laboratorním nálezem u pacientů s MCD/FSGS. Ostatní data (arteriální hypertenze, proteinurie, serový albumin, GFR a serový kreatinin na konci sledování) nebyla signifikantně rozdílná.

5. DISKUZE

5.1. Mutace v genu *NPHS2*

Ve skupině 71 pacientů s FSGS/MCD byla nalezena mutace v genu *NPHS2* u jednoho pacienta. Jednalo se o homozygotní záměnu 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 od 1,3 let (85). U naší pacientky došlo k nástupu SRNS již v dětském věku (3 roky) a nyní je zařazena v čekací listině na transplantaci ledviny s těžkou renální insuficiencí.

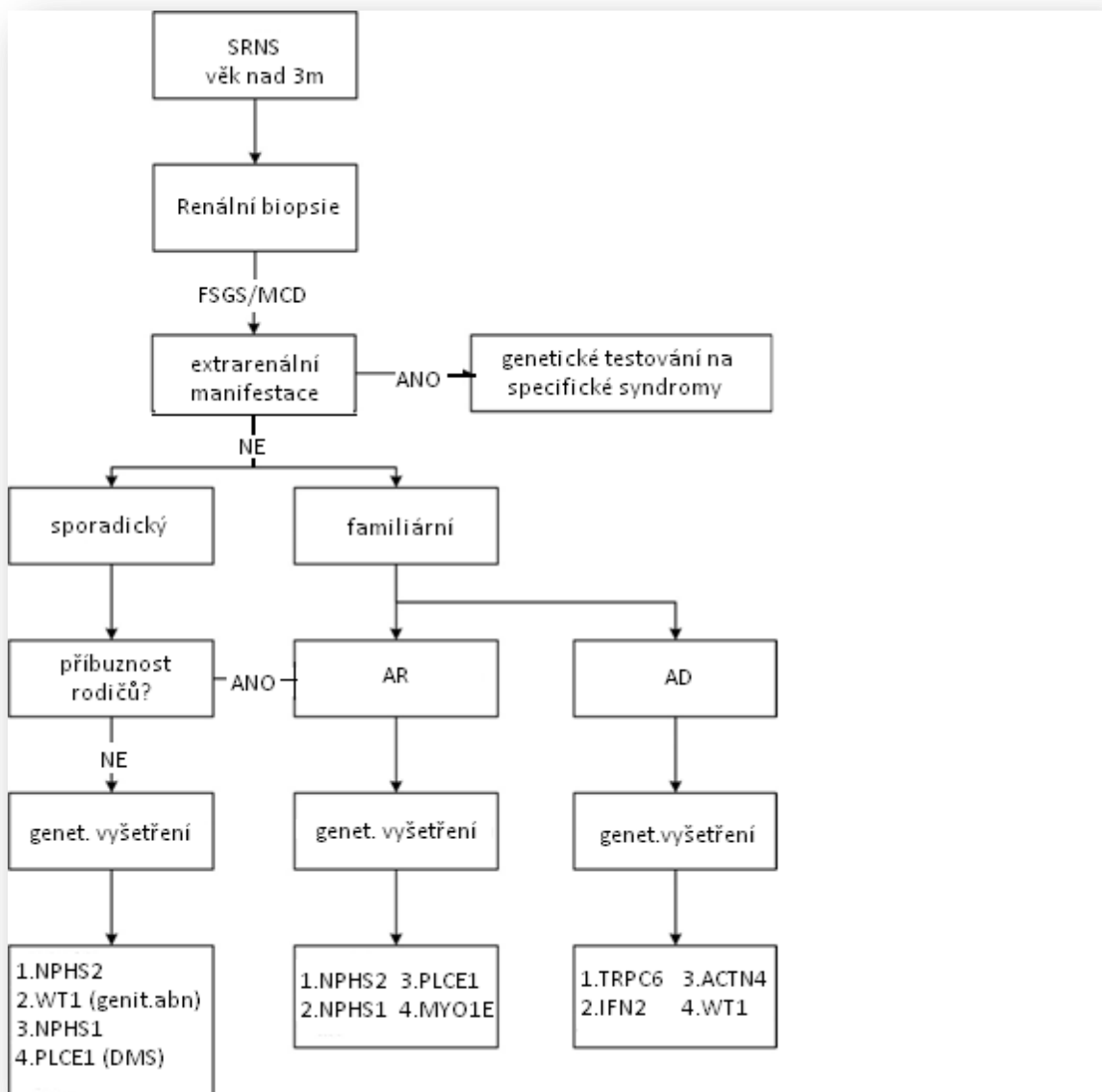
Dále byla v souboru u jednoho pacienta nalezena nepopsaná varianta p.G97S nacházející se v heterozygotním stavu v nekonzervované oblasti genu *NPHS2*. Jednalo se o pacienta se SRNS vzniklým v dětství. Můžeme pouze spekulovat, zda tato záměna může ovlivňovat vznik choroby, neboť nebyla nalezena u žádného dalšího pacienta ani u kontrolní skupiny. Po porovnání oblasti přiléhající nalezené záměně bylo ovšem zjištěno, že tato oblast podocinu není příliš konzervovaná a aminokyselina serin se v místě 97 nachází například u divokého prasete (viz výše). Klinický průběh onemocnění a špatná odpověď na terapii byla porovnatelná s FSGS pacienty, kteří mají popsanou jednu *NPHS2* mutaci nebo u FSGS pacientů bez nalezené mutace (86). U pacientů s nástupem nefrotického syndromu v dospělosti jsme nenašli žádnou kauzální mutaci v genu *NPHS*. Proto předpokládáme, že mutace v genu *NPHS2* nejsou častou příčinou FSGS/MCD s nástupem nefrotického syndromu 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 (86). Kanadská studie z roku 2007 našla heterozygotní mutaci v *NPHS2* genu pouze u 1 z 87 dospělých pacientů (87). Naopak 4 heterozygotní mutace v kombinaci s nálezem polymorfismu p.R229Q byly nalezeny u 47 pacientů s FSGS vzniklým v dospělosti ve španělské studii (88). V této studii byla doba vzniku nefrotického syndromu a progresse renálních funkcí směrem k renálnímu selhání delší a pomalejší u pacientů s kombinací polymorfismu p.R229Q a ještě jednou patogenetickou mutací *NPHS2* než u pacientů s 2 patogenetickými *NPHS2* mutacemi.

Navíc, vzhledem k faktu, že pacienti se složenou heterozygotní mutací s p.R229Q a další mutací neodpovídají na terapii kortikosteroidy nebo další imunosupresivní terapii a nerelabují po transplantaci ledvin, genetické doporučení v těchto rodinách radí spíše ukončit nefunkční imunosupresivní terapii, provést transplantaci ledviny od živého dárce a nabídnout možnost screeningu párů s *NPHS2* mutací na p.R229Q. 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 (86).

Lze říci, že nefrotický syndrom 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 (85), (89). Bylo popsáno přes 100 patogenních mutací a množství variant genu nejednoznačného významu. Není přítomno místo nejčastějších mutací – mutace jsou rozloženy po celém genu. Nejtěžší průběh onemocnění s časnějším nástupem je u posunových a nonsense mutací (90).

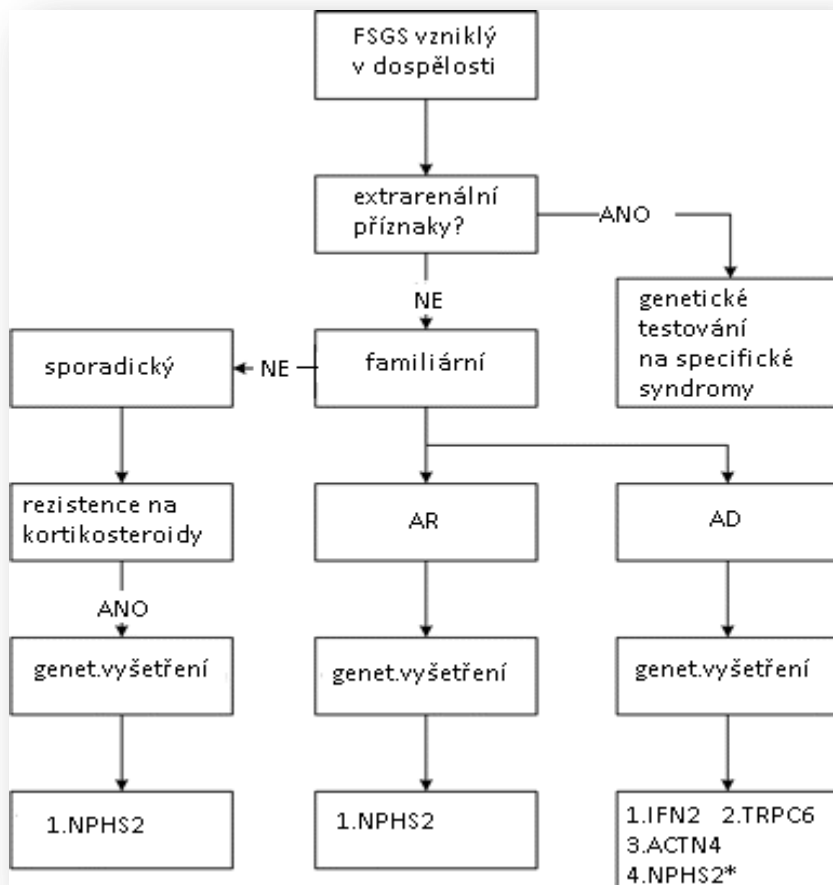
Obecně jsou pacienti s mutacemi v genu *NPHS2* kortikorezistentní a i odpověď na další imunosupresi je velmi špatná. Mutační analýza *NPHS2* genu by proto měla být prováděna u všech dětských pacientů se SRNS. Pokud bude nalezena homozygotní nebo heterozygotní mutace na obou alelách, měla by být dobře zváženo další pokračování imunosupresivní terapie.

V roce 2012 vypracovali holandské lékaře schémata doporučující vyšetřovací postup u pacientů s FSGS (dle doby vzniku onemocnění zvláště u dětí (obr.12) a dospělých (obr.13) (96).



Obr.12: Diagnostický algoritmus pro mutační screening u dětí se SRNS (96).

V klinické praxi bude rodinná anamnéza součástí vstupního vyšetření. Pokud bude rodinná anamnéza pozitivní, mělo by být genetické vyšetření u dětí provedeno ještě před začátkem podávání terapie kortikosteroidy. U pacientů se SRNS by měla být provedena renální biopsie k vyloučení jiných onemocnění (jako jsou IGAN, Alportův syndrom, Membranoproliferativní GN). Histologický nálezn kompatibilní s FSGS vylučuje postižení MCD a IgM nefropatií.



Obr.13: Diagnostický algoritmus pro mutační screening u dospělých s FSGS (96).

*NPHS2 mutace může mít pseudo-autosomálně dominantní způsob přenosu - 1 rodič s homozygotní mutací v NPHS2 - 2.rodič s p.R229Q- dítě nesoucí jednu pato-genetickou mutaci v kombinaci s p.R229Q.

5.2. Rekurence FSGS ve štěpu po transplantaci ledviny

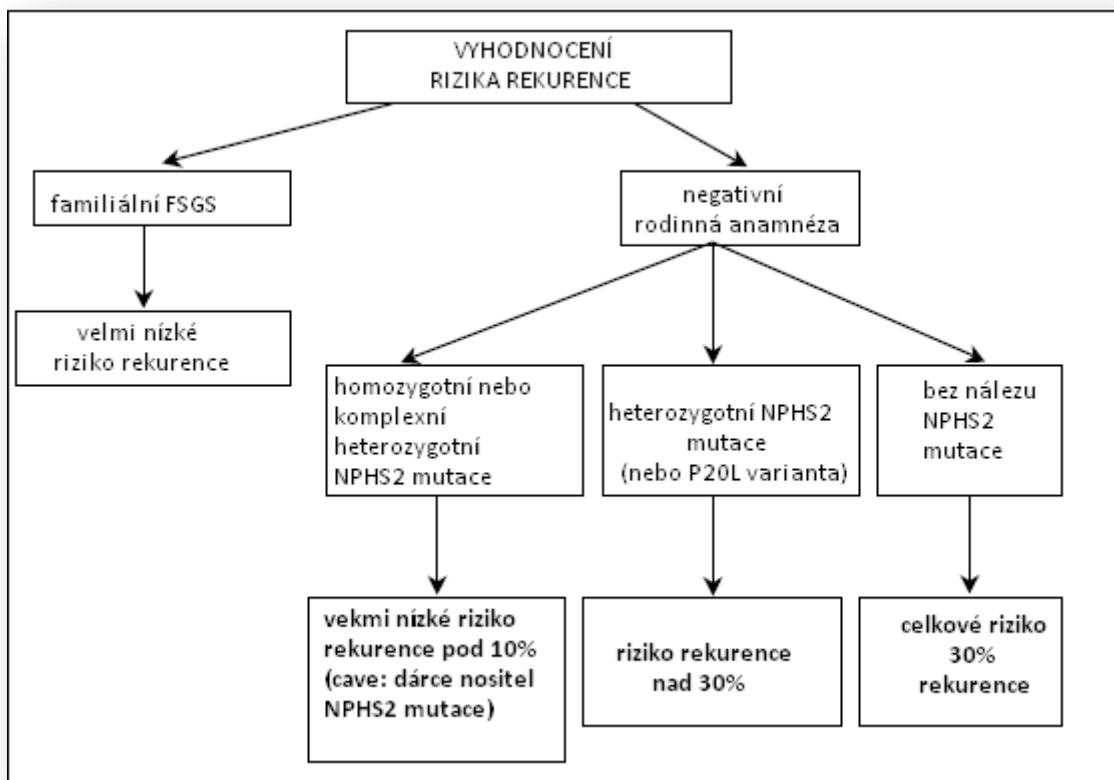
Přibližně u 30% pacientů s FSGS dojde po transplantaci ledviny k rekurenci onemocnění ve štěpu (91). Francouzská studie z roku 2004 zahrnovala 338 pacientů se SRNS. Transplantováno bylo 189 pacientů. U 32 transplantovaných pacientů se dvěma *NPHS2* mutacemi došlo k rekurenci FSGS ve štěpu pouze v 1 případě. Mezi 74 transplantovanými pacienty se sporadickou formou SRNS došlo k rekurenci u 25 pacientů (u těchto pacientů byla heterozygotní mutace *NPHS2* zastižena 1x, heterozygotní varianta/polymorfismus 3x, ostatní byli bez prokázané změny v genu *NPHS2*). 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

(90) 92). Bertelli a spolupracovníci popsali v roce 2003 ve skupině 53 transplantovaných pacientů s FSGS relaps NS ve štěpu u 38% pacientů s *NPHS2* mutacemi. V hodnocení však byli zahrnuti jak pacienti s mutací pouze na jedné alele genu, tak pacienti s 2 patogenetickými mutacemi. U pacientů s mutacemi na obou alelách byl relaps zjištěn pouze ve 3% případů. (93). 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 (94). V této studii také popsali vztah mezi hladinou serového albuminu v době diagnózy a rizikem rekurence, které je vyšší. Pokud je hladina albuminu v době diagnózy pod 25g/l, potom je riziko rekurence vyšší (78%).

S výjimkou pacientů s kongenitálním nefrotickým syndromem způsobeným mutacemi v genu *NPHS1*, kdy dochází k vytvoření anti-nefrinových protilátek (96), u pacientů s FSGS s genetickým podkladem (2 homozygotní mutace) po transplantaci ledviny prakticky nedochází k rekurenci, jak bylo pospáno výše. (96). 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 (97). 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.

V roce 2005 vypracovala americká skupina doporučení pro vyhodnocení míry rizika rekurence FSGS u daného pacienta, které je stále platné (92). Obr.14.



Obr.14: Vyhodnocení míry rizika rekurence NS ve štěpu ledviny – převzato z (92)

Pokud se jedná o příbuzenskou transplantaci ledviny, měli by být i příbuzní vyšetřeni stran mutací v *NPHS2* genu. V případě pacienta s homozygotní nebo složenou heterozygotní mutací v *NPHS2* genu a plánované transplantaci orgánu od rodiče je nutno pečlivě vážit riziko rekurence. Rodič je v tomto případě obligátním nositelem heterozygotní mutace a riziko rekurence je potom celkově vyšší. Výsledky však jsou nejednoznačné, proto heterozygoti s *NPHS2* mutací na jedné alele mohou být příbuzenskými dárci štěpu.

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 ($p=0,008$) (98). Riziko bylo 2,77x vyšší. V přítomnosti alely p.R229Q. V pozdější studii byla však asociace tohoto polymorfismu s mikroalbuminurií u populace zdravých jedinců i u diabetiků vyloučena (99). Tento polymorfismus má častější frekvenci u severoameričanů, evropanů a evropských američanů (4-7%) než mezi afričany, afroameričany a asiaty (0-1,5%), což předpokládá

vznik v Evropě, ačkoli není možné rozpoznat geografický původ (100) 101)102). V Evropské populaci byla nejvyšší frekvence p.R229Q polymorfismu popsána u Francouzů 4,5%, Italů 3,2% a Španělů 3,1%. (90), (103), (88). U Slovanů nebyla frekvence polymorfismu zatím studována. 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 (104).

Polymorfismus p.P20L nacházející se v genu *NPHS2* v 1. exonu byl vyšetřován také u velké skupiny pacientů s různými diagnózami (71 pacientů FSGS/MCD, 169 pacientů s IGAN, 46 pacientů s MGN a 300 kontrol). Incidence p.P20L varianty ve vyšetřovaných souborech jak ve studiích, tak v naší skupině pacientů, je nízká (0-1%) (90), (105). Záměna aminokyseliny prolinu za leucin se nachází v nekonzervované oblasti genu. V roce 2006 byl popsán haplotyp p.P20L s určitou variantou *NPHS2* promotoru (-535CTTTTTT3), která je asociovaná se sníženou expresí podocinu. (106). Tento haplotyp byl nalezen pouze u pacientů s FSGS a méně často u pacientů s IGAN ($P < 0.035$). Menší význam polymorfismu naopak přikládá španělská studie, která našla p.P20L variantu v heterozygotním stavu ve stejné frekvenci jak u pacientů se SRNS 0,75% (2/264) tak u kontrol 0,55% (2/360) (88). V naší práci jsme našli polymorfismus p.P20L v heterozygotním stavu u 8,8% pacientů se SRNS, (celkově u 4,2% pacientů s FSGS), u 2,8% IGAN progresivní formy (ze všech pacientů s IGAN 1,8%), u 1% pacientů z kontrolní skupiny. U jedné pacientky se SRNS byla nalezena kombinace 2 polymorfismů p.R229Q a p.P20L. Naše výsledky jsou relativně špatně hodnotitelné. V kontrolní skupině byl výskyt nízký, ale u pacientů s FSGS a SRNS byl vyšší (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). *VEGF* je důležitým signálním proteinem zapojeným ve vaskulogenezi a angiogenezi.

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 serového kreatininu).

V čínské studii u 195 pacientů byl popsán vliv CC genotypu na pozici -2578 *VEGF* promotoru na progresi IGAN (107). V našem vzorku toto potvrzeno nebylo. V britské studii, která se zaměřovala na pacienty po transplantaci ledviny byla zjištěna vyšší produkce *VEGF* u pacientů s -2578 C/C homozygotů a -1154 G/G homozygotů. *VEGF* -1154 GG a GA genotyp byl signifikantně asociován s rizikem akutní rejeckce po 3 měsících ($p=0,004$). Dále *VEGF* -2578 CC a CA genotyp byl asociován s vyšším rizikem rejeckce ($p=0,005$). Tato data ukazují, že -1154 *G a -2578 *C polymorfismů *VEGF*, které kódují vyšší produkci *VEGF* jsou silně asociované s akutní rejeckcí a mohli by být důležitým ukazatelem rejeckčního rizika (81). 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 (108).

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 (109), s poškozením glomerulárních funkcí (110) a s progresí renální nedostatečnosti k renálnímu selhání (111). Jiné studie ovšem spíše zdůrazňují vliv VEGF na reparaci kapilár glomerulů u proliferativních GN (112). V klinické studii s 35 pacienty se systémovým lupus erythematoses (SLE) a lupusovou nefritidou byla zjištěna snížená intrarenální exprese VEGF, která je asociovaná s horší prognózou onemocnění (113). Ve finské studii z roku 2000 byla studována močová exkrece VEGF, bylo zjištěno snížení exkrece VEGF u pacientů s aktivitou MGN. Změny souvisely s aktivitou onemocnění - při dosažení remise či parciální remise onemocnění došlo opět ke zvýšení exkrece (114). Vlivy změněné exprese polymorfismů VEGF jsou nyní zkoumány v mnoha oborech medicíny.

6. ZÁVĚR

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 studiemi 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 podocytů). 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, nenašli 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. SEZNAM LITERAURY

- 1) Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M: Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev*, 2003, 83(1): 253-307.
- 2) 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.
- 3) Bearer EL, Orci L: Endothelial fenestral diaphragm: a quick-freeze, deep-etch study. *J Cell Biol*, 1985, 100(2): 418-428.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Kitamoto Y, Tokunaga H, Miyamoto K, Tomita K: VEGF is an essential molecule for glomerular structuring. *Nephrol Dial Transplant*, 2002, 17(9): 25-27.
- 7) 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.
- 8) Robert B, Zho X, Abrahamson DR: Coexpression of neuropilin-1, Flk1, and VEGF(164) in developing and mature mouse kidney glomeruli. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000, 279(2): 275-282.
- 9) Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J: The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 2003, 9(6): 669-676.
- 10) Eremita V, Baelde HJ, Quaggin SE: Role of the VEGF: a signaling pathway in the glomerulus: evidence for crosstalk between components of the glomerular filtration barrier. *Nephron Physiol*, 2007, 106(2): 32-37.
- 11) Sugimoto H, Hamano Y, Charytan D, Cosgrove D, Kieran M, Sudhakar A, Kalluri R: Neutralization of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) by anti-VEGF antibodies and soluble VEGF receptor 1 (sFlt-1) induces proteinuria. *J Biol Chem*, 2003, 278(15): 12605-12608.
- 12) Kamba T, Tam BY, Hashizume H, Haskell A, Sennino B, Mancuso MR, Norbert SM, O'Brian SM, Davis RB, Gowen LC, Anderson KD, Thurson G, Joho S, Springer ML, Kuo CJ, Macdonald DM: VEGF-dependent plasticity of fenestrated capillaries in

the normal adult microvasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 290(2): 560-576.

13) Haas CS, Câmpean V, Kuhlmann A, Dimmler A, Reulbach U, Forster C, Aigner T, Acker T, Plate K, Amann K: Analysis of glomerular VEGF mRNA and protein expression in murine mesangioproliferative glomerulonephritis. *Virchows Arch*, 2007, 450(1): 81-92.

14) Kanwar YS, Farquhar MG: Presence of heparan sulfate in the glomerular basement membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76(3): 1303-1307.

15) Rennke HG, Cotran RS, Venkatachalam MA: Role of molecular charge in glomerular permeability Tracer Studies with Cationized Ferritins. *J Cell Biol*, 1975, 67(3): 638-646.

16) Caulfield JP, Farquhar MG: Distribution of anionic sites in glomerular basement membranes: their possible role in filtration and attachment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976, 73(5): 1646-1650.

17) Goldberg S, Harvey SJ, Cunningham J, Tryggvason K, Miner JH: Glomerular filtration is normal in the absence of both agrin and perlecan-heparan sulfate from the glomerular basement membrane. *Nephrol Dial Transplant*, 2009, 24(7): 2044-2051.

18) Bolton GR, Deen WM, Daniels BS: Assessment of the charge selectivity of glomerular basement membrane using Ficoll sulfate. *Am J Physiol*, 1998, 274 (5/2): 889-896.

19) Barker DF, Hostikka SL, Zhou J, Chow LT, Oliphant AR, Gerken SC, Gregory MC, Skolnick MH, Atkin CL, Tryggvason K: Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Aport syndrome. *Science*, 1990, 248 (4960): 1224-1227.

20) Lemmink HH, Mochizuki T, van den Heuvel LP, Schroder CH, Barrientos A, Monnens LA, van Oost BA, Brunner HG, Reeders ST, Smeets HJ: Mutations in the type IV collagen alpha 3 (COL4A3) gene in autosomal recessive Alport syndrom. *Hum Mol Genet*, 1994, 3(8): 1269-1273.

21) Rodewald R, Karnovsky MJ: Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J Cell Biol*, 1974, 60(2): 423-433.

22) 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.

- 23) Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J, Lenkkeri U, Kestilä M, Jalanko H, Holmberg C, Tryggvason K: Nephlin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(14): 7962-7967.
- 24) Holthöfer H, Ahola H, Solin ML, Wang S, Palmén T, Luimula P, Miettinen A, Kerjaschki D: Nephlin localizes at the podocyte filtration slit area and is characteristically spliced in the human kidney. *Am J Pathol*, 1999, 155(5): 1681-1687.
- 25) Tryggvason K: Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephlin, a key component of the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol*, 1999, 10(11): 2440-2445.
- 26) Pollak MR, Alexander MP, Henderson JM: A case of familial kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2007, 2(6): 1367–1374.
- 27) Frishberg Y, Feinstein S, Rinat Ch, Becker-cohen R, Lerer I, Raas-rothschild A, Ferber B, Nir A: The Heart of Children with Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome : Is It All Podocin ? *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17: 227–231.
- 28) Schwarz K, Simons M, Reiser J, Saleem MA, Faul C, Kriz W, Shaw AS, Holzman LB, Mundel P: Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephlin. *J Clin Invest*, 2001, 108(11): 1621–1629.
- 29) 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.
- 30) 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.
- 31) Elger M, Kriz W: Podocytes and the development of segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant*, 1998, 13(6): 1368-1373.
- 32) Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F, Lee H, Fuchshuber A, Dahan 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.
- 33) Barletta GM, Kovari JA, Verma RK, Kerjaschi D, Holzman LB: Nephlin and Neph1 co-localize at the podocyte foot process intercellular junction and form cis hetero-oligomers. *J Biol Chem*, 2003, 278(21): 19266–19271.

- 34) Verma R, Wharram B, Kovari J, Kunkel R, Nihalani D, Wary KK, Wiggins RC, Killen P, Holzman LB: Fyn binds to and phosphorylates the kidney slit diaphragm component Nephlin. *J Biol Chem*, 2003, 278(23): 20716-20723.
- 35) Verma R, Kovari J, Soofi A, Nihalani D, Patrie K, Holzman LB: Nephlin ectodomain engagement results in Src kinase activation, nephrin phosphorylation, Nck recruitment, and actin polymerization. *J Clin Invest*, 2006, 116(5): 1346–1359.
- 36) Garg P, Verma R, Nihalani D, Johnstone DB, Holzman LB: Neph1 cooperates with nephrin to transduce a signal that induces actin polymerization. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(4): 8698-8712.
- 37) 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.
- 38) 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.
- 39) Wolf G, Stahl RA: Rapid review CD2-associated protein and glomerular disease. *Lancet*, 2003, 362: 1746–1748.
- 40) Clapham DE, Runnels LW, Strübing C: The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci*, 2001, 2(6): 387-396.
- 41) Huber TB, Schermer B, Müller RU, Höhne M, Bartram M, Calixto A, Hagmann H, Reinhardt C, Koos F, Kunzelmann K, Shirokova E, Krautwurst D, Harteneck C, Simons M, Pavenstädt H, Kerjaschki D, Thiele C, Walz G, Chalfie M, Benzing T: Podocin and MEC-2 bind cholesterol to regulate the activity of associated ion channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(46): 17079–17086.
- 42) Kanda S, Harita Y, Shibagaki Y, Sekine T, Igarashi T, Inoue T, Hattori S: Tyrosine phosphorylation-dependent activation of TRPC6 regulated by PLC- γ 1 and nephrin: effect of mutations associated with focal segmental glomerulosclerosis. *Mol Biol Cell*, 2011, 22(11): 1824-1835.
- 43) Jefferson JA, Nelson PJ, Najafian B, Shankland S: Podocyte Disorders : Core Curriculum 2011. *Am J Kidney Dis*, 2011, 58(4): 666–677.
- 44) Siddall EJ, Radhakrishnan J: The pathophysiology of edema formation in the nephrotic syndrome. *Kidney Int*, 2012, 82(6): 635-642.
- 45) Flinter F, Maher ER, Saggarr-Malik, A, d'A Crawford M: The genetics of renal disease. *Oxford monographs on medical genetics* 48, 2003, Oxford University Press.

- 46) Ryšavá R, Tesař V, Merta M: Nefrotický syndrom. *Intermí medicína pro praxi*, 2005, 3: 131 - 134.
- 47) Tesař, V: Nefrotický syndrom - patogeneze, diagnostika, komplikace, léčba. *Medicína Pro Praxi*, 2008, 5(2): 62-64.
- 48) 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.
- 49) Korbet SM: Treatment of primary focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int*, 2002, 62(6): 2301-2310.
- 50) 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.
- 51) Kaplan JM, Kim SH, North KN, Rennke H, Correia LA, Tong HQ, Mathis BJ, Rodríguez-Pérez JC, Allen PG, Beggs AH, Pollak MR: Mutations in ACTN4, encoding α -actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet*, 2000, 24: 251-256.
- 52) 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.
- 53) 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.
- 54) 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, Bakkaloglu 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, Holzman 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.

55) 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.

56) Reiterova J, Safrankova H: Geneticky podmíněné formy nefrotického syndromu. *Aktuality v nefrologii*, 2010, 16(3): 96-100.

57) 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.

58) 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.

59) 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, Bakkaloglu A, PodoNet Consortium10: Disruption of PTPRO causes childhood-onset nephrotic syndrome. *Am J Hum Genet*, 2011, 89: 139-147.

60) Shalhoub RJ: Pathogenesis of lipoid nephrosis: a disorder of T-cell function. *Lancet*, 1974, 7(2): 556-560.

61) Clement LC, Avila-casado C, Macé C, Soria E, Bakker WW, Kersten S, Sumant S: Podocyte secreted Angiopoietin-like 4 mediates proteinuria in glucocorticoid sensitive nephrotic syndrome. *Nat Med*, 2011, 17(1): 117-122.

62) Chehade H, Cachat F, Girardin E, Rotman S, Correia AJ, Fellmann F, Bonny O: Two new families with hereditary minimal change disease. *BMC nephrol*, 2013, 14(1): 65.

63) D'Agati VD: The spectrum of focal segmental glomerulosclerosis: new insights. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2008, 17(3): 271-281.

64) Sharma R, Sharma M, McCarthy ET, Ge XL, Savin VJ: Components of normal serum block the focal segmental glomerulosclerosis factor activity in vitro. *Kidney Int*, 2000 58(5): 1973-1979.

- 65) McCarthy ET, Sharma M, Savin V: Circulating permeability factors in idiopathic nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2010, 5(11): 2115–2121.
- 66) Wei C, El Hindi S, Li J, Fornoni A, Goes N, Sageshima J, Maignel D, Karumanchi SA, Yap HK, Saleem M, Zhang Q, Nikolic B, Chaudhuri A, Daftarian P, Salido E, Torres A, Salifu M, Sarwal MM, Schaefer F, Morath C, Schwenger V, Zeier M, Gupta V, Roth D, Rastaldi MP, Burke G, Ruiz P, Reiser J: Circulating urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Med*, 2011, 17(8): 952-960.
- 67) Jefferson JA, Nelson PJ, Najafian B, Shankland S: Podocyte Disorders: Core Curriculum 2011, *Am J Kidney Dis*, 2011, 58(4): 666–677.
- 68) Stokes MB, Valeri AM, Markowitz GS, D'Agati V: Cellular focal segmental glomerulosclerosis: Clinical and pathologic features. *Kidney Int*, 2006, 70(10): 1783-1792.
- 69) Kandasamy Y, Smith R, Wright IMR, Lumbers E: Extra-uterine renal growth in preterm infants: Oligonephropathy and prematurity. *Pediatr Nephrol*, 2013, 1–6.
- 70) Český registr biopsií nativních ledvin 1994–2010
http://www.nefrol.cz/resources/upload/data/369_registr_biopsii_94-2012.pdf
- 71) 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.
- 72) Kim YG, Suga SI, Kang DH, Jefferson JA, Mazzali M, Gordon KL, Matsui K, Breiteneder-Geleff S, Shankland SJ, Hughes J, Kerjaschki D, Schreiner GF, Johnson R: Vascular endothelial growth factor accelerates renal recovery in experimental thrombotic microangiopathy. *Kidney Int*, 2000, 58(6): 2390–2399.
- 73) Vogelmann SU, Nelson WJ, Myers BD, Lemley K: Urinary excretion of viable podocytes in health and renal disease. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003, 285(1): 40–48.
- 74) Eremina V, Sood M, Haigh J, Nagy A, Lajoie G, Ferrara N, Gerber HP, Kikkawa Y, Miner JH, Quaggin S: Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J Clin Invest*, 2003, 111(5): 707–716.
- 75) 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.

- 76) Vincenti V, Cassano C, Rochci M: Assignment of the vascular endothelial growth gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation*, 1996; 93: 1493–1495.
- 77) 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.
- 78) Klagsbrun M, D'Amore PA: Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, 1996, 7(3): 259-270.
- 79) 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.
- 80) 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.
- 81) 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.
- 82) 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.
- 83) Brenchley PE, Ralph SA, Summers A: VEGF polymorphisms and renal pathologies. *Adv Nephrol Necker Hosp*, 2002, 32: 17–23.
- 84) 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.
- 85) 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.
- 86) Caridi G, Gigante M, Ravani P, Trivelli A, Barbano G, Scolari F, Dagnino M, Murer L, Murtas C, Edefonti A, Allegri L, Amore AI, 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.

- 87) 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.
- 88) Santín S, Tazón-Vega B, Silva I, Cobo MÁ, Giménez I, Ruíz 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.
- 89) 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.
- 90) 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.
- 91) Couser W: Recurrent glomerulonephritis in the renal allograft: An update of selected areas. *Exp Clin Transplant*, 2005, 3:283–288.
- 92) Vincenti F, Ghiggeri GM: New insights into the pathogenesis and the therapy of recurrent focal glomerulosclerosis. *Am J Transplant*, 2005, 5(6): 1179–1185.
- 93) Bertelli R, Ginevri F, Caridi G, Dagnino M, Sandrini S, Di Duca M, Emma F, Sanna-Cherchi S, Scolari F, Neri TM, Murer L, Massella L, Basile G, Rizzoni G, Perfumo F, Ghiggeri GM: Recurrence of focal segmental glomerulosclerosis after renal transplantation in patients with mutations of podocin. *Am J Kidney Dis*, 2003, 41(6): 1314-1321.
- 94) 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.
- 95) 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.
- 96) Rood IM, Deegens J, Wetzels J: Genetic causes of focal segmental glomerulosclerosis: implications for clinical practice. *Nephrol Dial Transplant*, 2012, 27(3), 882–890.

- 97) Yang HC, Fogo A: “Idiopathic” FSGS: an increasingly obsolete diagnosis? *Nephrol Dial Transplant*, 2010, 25(3): 654–656.
- 98) 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.
- 99) Tonna SJ, Needham A, Polu K, Uscinski A, Appel GB, Falk RJ, Katz A, Al-Waheeb S, Kaplan BS, Jerums G, Savige J, Harmon J, Zhang K, Curhan GC, Pollak M: NPHS2 variation in focal and segmental glomerulosclerosis. *BMC nephrol*, 2008, 9:13.
- 100) Köttgen A, Hsu CC, Coresh J, Shuldiner AR, Berthier-schaad Y, Gambhir TR, Smith MW, Boerwinkle E, Kao W: The association of podocin R229Q polymorphism with increased albuminuria or reduced estimated GFR in a large population- based sample of U S adults. *Am J Kidney Dis.*, 2008, 52(5): 868–875.
- 101) Dusel JAE, Burdon KP, Hicks PJ, Hawkins GA, Bowden DW, Freedman B: Identification of podocin (NPHS2) gene mutations in African Americans with nondiabetic end-stage renal disease. *Kidney Int*, 2005, 68(1): 256–262.
- 102) Machuca E, Hummel A, Nevo F, Dantal J, Martinez F, Al-Sabban E, Baudouin V, Abel L, Grünfeld JP, Antignac C: Clinical and epidemiological assessment of steroid-resistant nephrotic syndrome associated with the NPHS2 R229Q variant. *Kidney Int*, 2009, 75(7): 727–735.
- 103) Aucella F, De Bonis P, Gatta G, Muscarella LA, Vigilante M, di Giorgio G, D’Errico M., Zelante L, Stallone C, Bisceglia L: 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*, 2005, 99(2): 31–36.
- 104) 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.
- 105) 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.
- 106) Di Duca M, Oleggini R, Sanna-Cherchi S, Pasquali L, Di Donato A, Parodi S, Bertelli R, Caridi G, Frasca G, Cerullo G, Amoroso A, Schena FP, Scolari F, Ghiggeri

- GM, E. I. N. C.: Cis and trans regulatory elements in NPHS2 promoter : implications in proteinuria and progression of renal diseases. *Kidney Int*, 2006, 70(7): 1332–1341.
- 107) 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.
- 108) Reiterová J, Obeidová H, Leníček M, Stekrová J, Merta M, Maixnerová D, Víték 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.
- 109) 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- β , and vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and susceptibility to primary glomerulonephritis. *Tissue Antigens*, 2010, 76(4): 289-296.
- 110) 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.
- 111) 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.
- 112) 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.
- 113) Avihingasanon Y, Benjachat T, Tassanarong A, Sodsai P, Kittikovit V, Hirankarn N: Decreased renal expression of vascular endothelial growth factor in lupus nephritis is associated with worse prognosis. *Kidney Int*, 2009, 75(12): 1340-1348.
- 114) Honkanen EO, Teppo AM, Grönhagen-Riska C: Decreased urinary excretion of vascular endothelial growth factor in idiopathic membranous glomerulonephritis. *Kidney Int*, 2000, 57(6): 2343–2349.

8. PUBLIKACE

1. publikace in extenso, které jsou podkladem disertace - přiložené v závěru (příloha 1-5)

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.

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, Víték 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. **(IF 1,268)**

b) bez IF

10) Maixnerová D, Honsová E, Merta M, Reiterová J, Rysavá R, Tesar 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, Tesar V: The pathogenetic aspects and gene polymorphisms of IgA nephropathy. *Prague Med Rep*, 2006, 107(2): 171-188.