

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

MVDr. Kateřina Pavelcová

Patofyziologie urátových transportérů v primární dně

Pathophysiology of urate transporters in primary gout

Disertační práce

Školitelka: doc. Ing. et Mgr. Blanka Stibůrková, Ph.D.

Praha, 2021

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, 7. 6. 2021

MVDr. Kateřina Pavelcová

Identifikační záznam:

PAVELCOVÁ, Kateřina. *Patofyziologie urátových transportérů v primární dně*. [Pathophysiology of urate transporters in primary gout]. Praha, 2021. 120 s., 4 příl. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Revmatologický ústav a Revmatologická klinika 1. LF UK. Školitelka Stibůrková, Blanka.

Abstrakt

V proximálních tubulech ledvin a ve střevě jsou lokalizované proteiny (tzv. urátové transportéry), které zajišťují exkreci i reabsorpci kyseliny močové. Polymorfismy v genech kódujících tyto proteiny mohou vést k narušení transportní funkce a k rozvoji hyperurikémie a dny. Sérová hladina kyseliny močové je však určována i dalšími faktory, mezi něž patří příjem exogenních purinů ve stravě, syntéza endogenních purinů a degradace nukleových kyselin, ale i určitá onemocnění.

U 250 pacientů s primární hyperurikémií a dnou jsme Sangerovým sekvenováním analyzovali exony a přiléhající intronové oblasti u deseti genů kódujících urátové transportéry: *ABCG2*, *ABCC4*, *SLC2A9*, *SLC22A12*, *SLC22A11*, *SLC22A13*, *SLC17A1*, *SLC17A3*, *SLC22A6* a *SLC22A8*. Možnou souvislost mezi identifikovanými genetickými variantami a primární hyperurikémií a dnou jsme posuzovali na základě porovnání alelických frekvencí s evropskou populací, podle topologických modelů, podle programů predikujících funkční dopad variant a rešerší v odborné literatuře. V úvahu jsme brali i závěry funkčních studií zkoumajících dopad nesynonymních variant v genech *ABCG2* a *SLC2A9*. Zaměřili jsme se také na vliv současného výskytu více variant asociovaných s hyperurikémií a dnou, dále na kombinaci variant asociovaných s hyperurikémií a dnou s variantami snižujícími riziko dny.

V deseti vyšetřovaných genech jsme identifikovali deset polymorfismů pravděpodobně asociovaných s primární hyperurikémií a dnou, které se nacházely v genech *ABCG2*, *SLC2A9* a *SLC22A8*. V genu *SLC2A9* se jednalo o synonymní variantu p.L189L, u níž zatím není objasněn mechanismus dopadu na funkci proteinu. V genu *ABCG2* je s hyperurikémií a dnou asociovaná častá nesynonymní varianta p.Q141K, častá intronová varianta c.1492+49G>T a vzácné nesynonymní varianty p.R147W, p.T153M, p.F373C, p.T434M, p.S467P a p.S572R. V genu *SLC22A8* jsme identifikovali variantu p.R149C, která by mohla být asociovaná s hyperurikémií. Identifikovali jsme také pět polymorfismů, která pravděpodobně snižují riziko dny. Jednalo se o variantu p.V282I v genu *SLC2A9* a varianty p.V12M, c.203+36A>G, c.1195-60A>T a c.1738-46G>A v genu *ABCG2*.

U pacientů se současným výskytem polymorfismů asociovaných s hladinou kyseliny močové a dnou jsme zjistili, že při kombinaci variant zvyšujících a snižujících riziko dny jednoznačně převažuje vliv polymorfismů asociovaných s dnou. Výrazná hyperurikémie a pokročilé stádium dny bylo pozorováno u pacientů s některým polymorfismem asociovaným s hyperurikémií a dnou v kombinaci s častou variantou p.Q141K, která je dle odborných studií spojována s nedostatečnou odpovědí na léčbu urikostatikem alopurinolem.

Klíčová slova: hyperurikémie, dna, urátové transportéry, kyselina močová, *ABCG2*, *SLC2A9*, *SLC22A8*

Abstract

There are localised proteins (so-called urate transporters) in the renal proximal tubules and in the intestine, which excrete and reabsorb uric acid. Polymorphisms in the genes coding these proteins can result in the disruption of the transport function and development of hyperuricemia and gout. However the serum level of uric acid is also determined by other factors which include the intake of exogenous purines in food, synthesis of endogenous purines and degradation of nucleic acids, but also certain conditions.

In 250 patients with primary hyperuricemia and gout we used Sanger sequencing to analyse the exons and adjacent intron regions in ten genes coding urate transporters: *ABCG2*, *ABCC4*, *SLC2A9*, *SLC22A12*, *SLC22A11*, *SLC22A13*, *SLC17A1*, *SLC17A3*, *SLC22A6* and *SLC22A8*. We examined a possible connection between the identified genetic variants and primary hyperuricemia and gout based on a comparison of allele frequencies with the European population, according to topological models, according to programs predicting the functional impacts of variants and searches in specialised literature. We also took into account the conclusions of functional studies analysing the impact of nonsynonymous variants in the *ABCG2* and *SLC2A9* genes. We also focused on the effect of the concomitant occurrence of several variants associated with hyperuricemia and gout, also on the combination of variants associated with hyperuricemia and gout with variants reducing the risk of gout.

In ten examined genes we identified ten polymorphisms most likely associated with primary hyperuricemia and gout found in the *ABCG2*, *SLC2A9* and *SLC22A8* genes. In the *SLC2A9* gene this was the p.L189L synonymous variant, for which the mechanism of the impact on the function of the protein is still unclear. In the *ABCG2* gene the frequent p.Q141K nonsynonymous variant, frequent c.1492+49G>T intron variant and the rare p.R147W, p.T153M, p.F373C, p.T434M, p.S467P and p.S572R nonsynonymous variants are associated with hyperuricemia. In the *SLC22A8* gene we identified the p.R149C variant, which could be associated with hyperuricemia. We also identified five polymorphisms, which most likely reduce the risk of gout. This was the p.V282I variant in the *SLC2A9* gene and the p.V12M, c.203+36A>G, c.1195-60A>T and c.1738-46G>A variants in the *ABCG2* gene.

In patients with the concomitant occurrence of polymorphisms associated with the level of uric acid and gout we found that the effect of the polymorphisms associated with gout prevails in a combination of variants increasing and decreasing the risk of gout. Marked hyperuricemia and an advanced stage of gout was observed in patients with some polymorphism associated with hyperuricemia and gout in combination with the frequent p.Q141K variant, which according to specialised studies is connected with the insufficient response to treatment with the uricostatic drug allopurinol.

Key words: hyperuricemia, gout, urate transporters, uric acid, *ABCG2*, *SLC2A9*, *SLC22A8*

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své školitelce doc. Blance Stibůrkové, že mi dala možnost zapojit se do zajímavého výzkumného projektu. Dále bych chtěla poděkovat kolegům Janě Bohaté, Elišce Bubeníkové, Lence Hasíkové, Pavlovi Čepkovi a Pavlovi Šimkovi za přínosnou spolupráci. Poděkování za podporu patří také dalším kolegům z Revmatologického ústavu, kteří se přímo nepodíleli na výzkumném projektu prezentovaném v této práci. Za spolupráci jsem vděčná také odborníkům z Kliniky pediatrie a dědičných poruch metabolismu 1. LF UK a VFN, z Katedry buněčné biologie Přírodovědecké fakulty UK a z Oddělení farmacie Tokijské univerzity. Velké nepracovní poděkování patří Kazi a Máše.

Obsah

| | |
|---|-----------|
| Seznam zkratek..... | 9 |
| 1. Literární úvod..... | 11 |
| 1.1 Kyselina močová | 11 |
| 1.1.1 Ztráta aktivity urikázy | 12 |
| 1.2 Hyperurikémie..... | 13 |
| 1.3 Dna | 14 |
| 1.3.1 Stádia dny | 15 |
| 1.3.2 Patogeneze dny | 15 |
| 1.3.3 Léčba dny | 16 |
| 1.4 Hypourikémie..... | 18 |
| 1.5 Genetické faktory v rozvoji hyperurikémie a dny | 19 |
| 1.6 Urátové transportéry..... | 20 |
| 1.6.1 Urátový transportér ABCG2 (gen <i>ABCG2</i>)..... | 23 |
| 1.6.2 Urátový transportér MRP4 (gen <i>ABCC4</i>)..... | 24 |
| 1.6.3 Urátový transportér URAT1 (gen <i>SLC22A12</i>)..... | 24 |
| 1.6.4 Urátový transportér GLUT9 (gen <i>SLC2A9</i>) | 25 |
| 1.6.5 Urátový transportér OAT4 (gen <i>SLC22A11</i>)..... | 25 |
| 1.6.6 Urátový transportér OAT10 (gen <i>SLC22A13</i>)..... | 26 |
| 1.6.7 Urátový transportér NPT1 (gen <i>SLC17A1</i>) | 26 |
| 1.6.8 Urátový transportér NPT4 (gen <i>SLC17A3</i>) | 26 |
| 1.6.9 Urátový transportér OAT1 (gen <i>SLC22A6</i>)..... | 27 |
| 1.6.10 Urátový transportér OAT3 (gen <i>SLC22A8</i>)..... | 27 |
| 2. Cíle práce..... | 29 |
| 3. Metodika..... | 30 |
| 3.1 Sestavení vyšetřovaných kohort..... | 30 |
| 3.1.1 Kohorta pacientů s primární hyperurikémií a dnou..... | 30 |
| 3.1.2 Kontrolní kohorta | 31 |
| 3.2 Izolace genomové DNA | 32 |
| 3.3 Polymerázová řetězová reakce | 32 |
| 3.3.1 Primery a podmínky PCR pro gen <i>ABCG2</i> | 33 |
| 3.3.2 Primery a podmínky PCR pro gen <i>ABCC4</i> | 34 |
| 3.3.3 Primery a podmínky PCR pro gen <i>SLC22A12</i> | 35 |
| 3.3.4 Primery a podmínky PCR pro gen <i>SLC2A9</i> | 36 |
| 3.3.5 Primery a podmínky PCR pro gen <i>SLC22A11</i> | 37 |
| 3.3.6 Primery a podmínky PCR pro gen <i>SLC22A13</i> | 37 |
| 3.3.7 Primery a podmínky PCR pro gen <i>SLC17A1</i> | 38 |
| 3.3.8 Primery a podmínky PCR pro gen <i>SLC17A3</i> | 38 |
| 3.3.9 Primery a podmínky PCR pro gen <i>SLC22A6</i> | 39 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3.10 Primery a podmínky PCR pro gen <i>SLC22A8</i> | 39 |
| 3.4 Sekvenování | 40 |
| 3.5 Hodnocení nalezených variant | 41 |
| 3.5.1 Určení alelické frekvence minoritní alely | 41 |
| 3.5.2 Predikce funkčního dopadu variant | 42 |
| 3.5.3 Porovnání alelické frekvence ve vyšetřované kohortě a v evropské populaci | 42 |
| 3.5.4 Topologické modely | 42 |
| 3.5.6 Funkční studie | 43 |
| 3.6 Vyšetření u kontrolní kohorty | 43 |
| 3.6.1 Metoda tetra-primer ARMS-PCR..... | 44 |
| 3.6.2 Metoda RFLP-PCR | 44 |
| 3.7 Vyšetření komplementární DNA..... | 44 |
| 4. Výsledky | 46 |
| 4.1 Charakteristika kohorty | 46 |
| 4.2 Geny urátových transportérů | 47 |
| 4.2.1 Gen <i>ABCG2</i> | 47 |
| 4.2.1.1 Hodnocení detekovaných variant | 48 |
| 4.2.2 Gen <i>ABCC4</i> | 52 |
| 4.2.2.1 Hodnocení detekovaných variant | 54 |
| 4.2.3 Gen <i>SLC22A12</i> | 57 |
| 4.2.3.1 Hodnocení detekovaných variant | 58 |
| 4.2.4 Gen <i>SLC2A9</i> | 59 |
| 4.2.4.1 Hodnocení detekovaných variant | 61 |
| 4.2.5 Gen <i>SLC22A11</i> | 63 |
| 4.2.5.1 Hodnocení detekovaných variant | 64 |
| 4.2.6 Gen <i>SLC22A13</i> | 66 |
| 4.2.6.1 Hodnocení detekovaných variant | 67 |
| 4.2.7 Gen <i>SLC17A1</i> | 69 |
| 4.2.7.1 Hodnocení detekovaných variant | 69 |
| 4.2.8 Gen <i>SLC17A3</i> | 71 |
| 4.2.8.1 Hodnocení detekovaných variant | 72 |
| 4.2.9 Gen <i>SLC22A6</i> | 73 |
| 4.2.9.1 Hodnocení detekovaných variant | 74 |
| 4.2.10 Gen <i>SLC22A8</i> | 76 |
| 4.2.10.1 Hodnocení detekovaných variant | 77 |
| 5. Diskuze..... | 80 |
| 5.1 Diskuze k výsledkům sekvenování jednotlivých genů..... | 80 |
| 5.1.1 Gen <i>ABCG2</i> | 80 |
| 5.1.2 Gen <i>ABCC4</i> | 83 |

| | |
|---|------------|
| 5.1.3 Gen <i>SLC22A12</i> | 84 |
| 5.1.4 Gen <i>SLC2A9</i> | 85 |
| 5.1.5 Gen <i>SLC22A11</i> | 87 |
| 5.1.6 Gen <i>SLC22A13</i> | 87 |
| 5.1.7 Gen <i>SLC17A1</i> | 88 |
| 5.1.8 Gen <i>SLC17A3</i> | 88 |
| 5.1.9 Gen <i>SLC22A6</i> | 89 |
| 5.1.10 Gen <i>SLC22A8</i> | 89 |
| 5.2 Diskuze k současnému výskytu variant ovlivňujících hladinu kyseliny močové..... | 91 |
| 5.3 Diskuze k použitým metodám..... | 94 |
| 5.4 Přednosti a limity této práce..... | 94 |
| 6. Závěr | 96 |
| 7. Seznam použité literatury..... | 97 |
| 8. Seznam publikací..... | 115 |
| 9. Prohlášení k podílu na výsledcích..... | 119 |
| 10. Přílohy | 120 |

Seznam zkratek

ABC = ATP-vazebná doména (ATP binding cassette), podle ní též pojmenování ABC transportních proteinů

ABCC4 = gen kódující protein MRP4 (ATP-binding cassette sub-family C member 4)

ABCG2 = protein kódovaný stejnojmenným genem *ABCG2* (ATP-binding cassette sub-family G member 2)

AMP = adenosinmonofosfát

ARMS = amplifikační refrakterní mutační systém (amplification refractory mutation systém), součást metody tetra-primer ARMS-PCR

ATP = adenosintrifosfát

bp = pár bází (base pair)

BMI = index tělesné hmotnosti (body mass index)

cAMP = cyklický adenosinmonofosfát

cGMP = cyklický guanosinmonofosfát

cDNA = komplementární DNA

CNV = variabilita počtu kopií (copy number variation)

Da = Dalton, jednotka molekulové hmotnosti

DMSO = dimethylsulfoxid

DNA = deoxyribonukleová kyselina

FE_{km} = frakční exkrece kyseliny močové

GLUT9 = protein kódovaný genem *SLC2A9* (glucose transporter type 9), zkratky GLUT9a a GLUT9b označují dvě sestřihové varianty proteinu

GMP = guanosinmonofosfát

GWAS = genomová asociační studie (genome-wide association study)

HPLC = vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IMP = inosinmonofosfát

KM = kyselina močová

MAF = minoritní alelická frekvence

MRP4 = protein kódovaný genem *ABCC4* (multidrug resistance-associated protein 4)

MSD = doména překlenující membránu (membrane-spanning domain)

N/A = nedostupné, neaplikovatelné (not available, not applicable)

NBD = doména vázající nukleotid (nucleotide binding domain)

NPT1 = protein kódovaný genem *SLC17A1* (sodium-dependent phosphate transport protein 1)

NPT4 = protein kódovaný genem *SLC17A3* (sodium-dependent phosphate transport protein 4)

OAT = transportní proteiny (organic anion transporters)

OAT1 = protein kódovaný genem *SLC22A6* (organic anion transporter 1)

OAT3 = protein kódovaný genem *SLC22A8* (organic anion transporter 3)

OAT4 = protein kódovaný genem *SLC22A11* (organic anion transporter 4)

OAT10 = protein kódovaný genem *SLC22A13* (organic anion transporter 10)

OMIM = databáze lidských genů a genotypů v souvislosti s fenotypy (Online Mendelian Inheritance in Man, webové stránky: omim.org)

PCR = polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

RFLP = polymorfismus délky restrikčních fragmentů (restriction fragment length polymorphism), součást metody RFLP-PCR

RNA = ribonukleová kyselina

SLC = transportní proteiny (solute carrier transporters)

SLC2A9 = gen kódující protein GLUT9 (solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 9)

SLC17A1 = gen kódující protein NPT1 (solute carrier family 17 member 1)

SLC17A3 = gen kódující protein NPT4 (solute carrier family 17 member 3)

SLC22A6 = gen kódující protein OAT1 (solute carrier family 22 member 6)

SLC22A8 = gen kódující protein OAT3 (solute carrier family 22 member 8)

SLC22A11 = gen kódující protein OAT4 (solute carrier family 22 member 11)

SLC22A12 = gen kódující protein URAT1 (solute carrier family 22 member 12)

SLC22A13 = gen kódující protein OAT10 (solute carrier family 22 member 13)

SNP = jednonukleotidový polymorfismus (single-nucleotide polymorphism)

SNV = jednonukleotidová varianta (single-nucleotide variant)

URAT1 = protein kódovaný genem *SLC22A12* (urate transporter 1)

UTR = nepřekládaná oblast (untranslated region)

WT = referenční sekvence, tzv. divoký typ (wild type)

XMP = xanthosinmonofosfát

1. Literární úvod

Tato práce se zabývá hledáním možných souvislostí mezi genetickými variantami v genech kódujících proteiny, které obstarávají transport kyseliny močové v těle (tzv. urátové transportéry), a vznikem hyperurikémie a dny. Urátové transportéry zajišťují exkreci i reabsorpci kyseliny močové. Pokud je vlivem genetických variant narušená transportní funkce urátových transportérů, tak může dojít k rozvoji hyperurikémie a dny (a vzácně také k hypourikémii). Aby bylo možné sledovat souvislost mezi genetickými variantami a vznikem hyperurikémie a dny, tak jsme do studované kohorty zařadili pouze jedince s primární hyperurikémií a primární dnou. Pacienti se vzácnými enzymopatiemi vedoucími k hyperurikémií a se sekundární hyperurikémií a dnou byli z této studie vyloučeni.

1.1 Kyselina močová

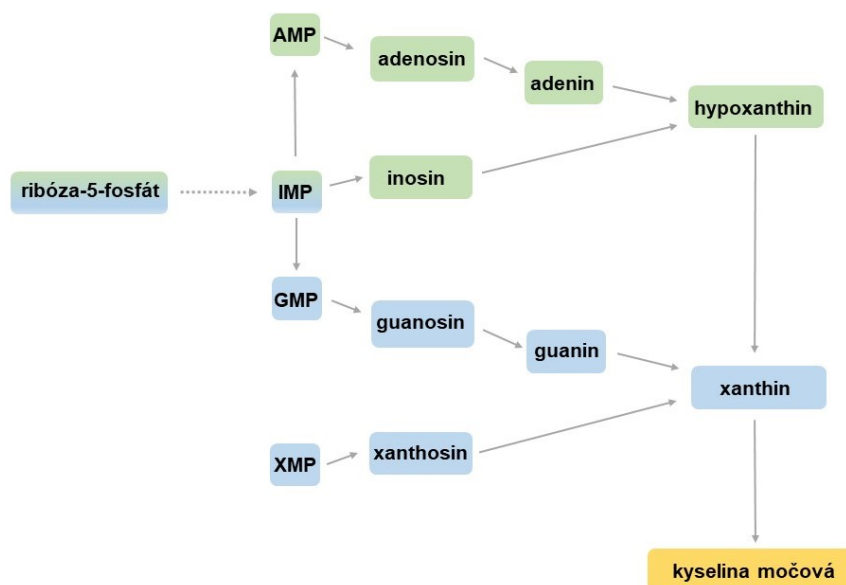
Ve druhé polovině 18. století izoloval švédský chemik Carl Wilhelm Sheele z močového kamene jakousi látku, kterou nazval „kyselina lithová“ (Bobulescu a Moe 2012). Později se zjistilo, že není součástí všech typů močových kamenů, a tak byla přejmenována na kyselinu močovou. Nové pojmenování je odvozeno od skutečnosti, že je kyselina močová běžnou součástí moči.

Kyselina močová (chemicky 2,6,8-trioxypurin) je u lidí konečným produktem degradace purinů, ke které dochází především v játrech, ale také ve střevě a v mléčné žláze (Bobulescu a Moe 2012). Základem její struktury je purinový skelet, který je tvořen pyrimidinovým a imidazolovým jádrem. Při fyziologickém pH je přítomná převážně v podobě urátu monosodného (So a Thorens 2010). Naproti tomu v moči, která má pH mezi hodnotami 5 a 6, se vyskytuje převážně v nedisociované formě (Wright et al. 2010). (Pozn.: Jelikož se kyselina močová vyskytuje při pH krve převážně v ionizované formě, tak je v literatuře běžně označována pojmem „urát“.)

Hladina kyseliny močové v těle je určována rovnováhou mezi příjmem purinů ve stravě (tzv. exogenní puriny), syntézou purinů *de novo* a degradací nukleových kyselin a různých koenzymů (tzv. endogenní puriny) a jejím vylučováním (viz Obrázek 1.1). Kyselina močová je z organismu vylučována především ledvinami (70 %) a z menší části také střevem (30 %) (Bobulescu a Moe 2012). V glomerulech je volně filtrována a k jejímu aktivnímu transportu dochází až v proximálních tubulech ledvin, kde jsou lokalizovány urátové transportéry. Ty jsou kromě ledvin exprimovány také ve střevě, kde rovněž obstarávají exkreci kyseliny močové (Hosomi et al. 2012). V tlustém střevě je kyselina močová z určité části degradována bakteriální mikroflórou až na amoniak a oxid uhličitý (Xu et al. 2016).

Referenční rozmezí hladiny kyseliny močové v séru je 120 – 420 $\mu\text{mol/l}$ u mužů a 120 – 340 $\mu\text{mol/l}$ u žen a dětí do 15 let. Míru zpětné resorpce kyseliny močové z tubulů ledvin udává tzv. frakční exkrece kyseliny močové (FE_{km}). Referenční rozmezí pro FE_{km} je u mužů 0,06 – 0,12, v procentech tedy 6 – 12 %, a u žen je horní mezí 20 % (Stibůrková et al. 2006).

Obrázek 1.1 - Syntéza kyseliny močové *de novo*



V organismu probíhá syntéza purinů *de novo* z výchozího substrátu ribózy-5-fosfátu, dále také tzv. šetřící reakce vedoucí k opětovnému využití jednotlivých purinových metabolitů a také dochází k degradaci purinů přijímaných v potravě. V tomto zjednodušeném schématu je znázorněná biosyntéza kyseliny močové, kde hraje důležitou roli inosinmonofosfát, který spojuje dílčí dráhy purinového metabolismu. Jednotlivé reakce jsou katalyzovány příslušnými enzymy (především deaminázy, nukleotidázy a purinnukleosidfosforyláza). Klinicky významný je enzym xanthin oxidáza (nově označovaný jako xanthin dehydrogenáza/oxidáza), který je potřebný pro přeměnu hypoxanthinu na xanthin a také xanthinu na kyselinu močovou. Dysfunkce xanthin oxidázy vede k rozvoji hypourikémie s xanthinurií (viz kapitola 1.4 Hypourikémie).

Seznam zkratk: AMP = adenosinmonofosfát, IMP = inosinmonofosfát, GMP = guanosinmonofosfát, XMP = xanthosinmonofosfát.

Schéma převzato a upraveno podle článků Jin et al. 2012 a Kushiyama et al. 2016.

1.1.1 Ztráta aktivity urikázy

U většiny savců je kyselina močová dále přeměňována enzymem urikázou na allantoin, (So a Thorens 2010). Experimentální inaktivace urikázy u myši vedla podle jedné studie k velmi vysokým hladinám kyseliny močové, poškození ledvin a k úhynu (Wu et al. 1994). U lidí a vyšších primátů je konečným produktem purinového metabolismu kyselina močová, jelikož v průběhu evoluce došlo k několika nezávislým mutacím v genu kódujícím urikázu (Oda et al. 2002).

Lidský organismus se adaptoval na ztrátu aktivity urikázy, která pro něj zřejmě představovala evoluční výhodu, což naznačuje i fakt, že je v ledvinách reabsorbováno kolem 90 % kyseliny močové (Bobulescu a Moe 2012). Podle jedné teorie pomáhala vyšší hladina

kyseliny močové udržovat dostatečný krevní tlak, což bylo přínosem v době, kdy ještě lidé neměli snadný přístup k soli (Watanabe et al. 2002). V současnosti naopak kyselina močová přispívá k epidemii hypertenze a ke kardiovaskulárním chorobám (Evans et al. 2018). Podle další teorie je kyselina močová důležitá z důvodu jejích výrazných antioxidačních účinků. Mohla by kompenzovat nedostatek kyseliny askorbové, jelikož primáti v průběhu evoluce ztratili enzym důležitý pro její syntézu (Ames et al. 1981). Podle jiné studie by však kyselina močová nemohla v antioxidačních účincích zastoupit kyselinu askorbovou a podle závěrů dalších autorů má tyto účinky pouze případně, že se její množství v plazmě pohybuje v referenčním rozmezí (Frei et al. 1988; Sautin a Johnson 2008).

1.2 Hyperurikémie

Hyperurikémie (tedy zvýšená hladina kyseliny močové) se rozvíjí nejčastěji z důvodu snížené renální exkrece kyseliny močové (asi 90 % případů) a méně často z důvodu její zvýšené produkce (asi 10 % případů) (Ragab et al. 2017). Laboratorně je definována vzestupem sérové hladiny kyseliny močové nad 340 $\mu\text{mol/l}$ u žen a 420 $\mu\text{mol/l}$ u mužů. Z hlediska příčiny ji lze rozdělit na primární a sekundární. Příčinami primární hyperurikémie je především zvýšený příjem purinů ve stravě a snížené vylučování kyseliny močové ledvinami a gastrointestinálním traktem. Hyperurikémie se může vyskytnout sekundárně u různých onemocnění z důvodu zvýšené syntézy endogenních purinů, patří mezi ně metabolický syndrom, leukémie, *diabetes mellitus*, psoriáza, poruchy štítné žlázy a různá ledvinná onemocnění (Pavelka 2008; Stiburkova et al. 2019) (viz Příloha 3). Syndrom spánkové apnoe je také asociován s hyperurikémií, neboť hypoxie zvyšuje obrát purinů (Hasday a Grum 1987). K hyperurikémii může vést také užívání některých léků, jako jsou diuretika, salicyláty a cyklosporin, jelikož snižují vylučování kyseliny močové ledvinami (Pavelka 2008; Svobodová 2016).

Hyperurikémie není asociována pouze s rozvojem dny, ale také s hypertenzí a srdečními onemocněními. Na rozdíl od dny však zatím nebylo objasněno, zda se hyperurikémie uplatňuje přímo v patogenezi, nebo jestli působí pouze jako rizikový faktor těchto onemocnění (Yang et al. 2005). Zvýšená hladina kyseliny močové má proliferativní účinky, které se mohou projevit u buněk hladkého svalstva cév. Je spojena také se zvýšenou tvorbou cytokinů a C-reaktivního proteinu (CRP), čímž může přispívat ke vzniku hypertenze (Kanellis a Kang 2005). Tento předpoklad potvrzuje i další studie, podle které je zvýšená hladina kyseliny močové v některých případech (speciálně u adolescentů) asociována se vznikem hypertenze (Feig 2012). Kromě toho je hyperurikémie asociována také s diabetem 2. typu (Sluijs et al. 2013). Déle byla zjištěna asociace s inzulinovou rezistencí a s nefropatií (Nath et al. 2007). Snížená funkce ledvin také vede k hyperurikémii a kyselinu močovou lze považovat za uremický toxin (Nigam et al. 2015). Na jednotlivé buňky má cytotoxické účinky, konkrétní vliv na orgány jako srdce či ledviny však zatím není zcela znám (Nigam a Bhatnagar 2018).

K rozvoji hyperurikémie také významně přispívají genetické faktory, především polymorfismy v genech kódujících urátové transportéry, což je tématem této práce (Stiburkova et al. 2017; Pavelcova et al. 2020) (viz Přílohy 1 a 2). Vzácně se mohou vyskytnout mutace v genech kódujících klíčové enzymy purinového metabolismu, které vedou k hyperurikémii, patří mezi ně deficiencie hypoxantin-guanin fosforibosyltransferázy (identifikace dle UniProt: P00492) či zvýšená aktivita fosforibosyl-pyrofosfát syntetázy (identifikace dle UniProt: P60891) (Ragab et al. 2017).

Hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza je kódovaná genem *HPRT1* (identifikace dle Ensembl: ENSG00000165704). Deficiencie tohoto enzymu je gonozomálně recesivním onemocněním (OMIM *308000), které se podle závažnosti postižení rozděluje do různých typů (Kostalova et al. 2015; Nanagiri a Shabbir 2021). Těžká deficiencie (aktivita enzymu je menší než 1,5 %) se označuje jako Lesch-Nyhanův syndrom (OMIM # 300322) (Harris 2018). V séru pacientů jsou nejen vysoké koncentrace kyseliny močové, ale také hypoxantinu a xantinu. Mezi hlavní klinické příznaky onemocnění patří mentální retardace, sebepoškozující chování a mimovolní pohyby (Yamada et al. 2011; Harris 2018). Částečná deficiencie hypoxantin-guanin fosforibosyltransferázy (s aktivitou enzymu mezi 8 a 60 %) je označována jako Kelley-Seegmillerův syndrom (OMIM # 300323) a v porovnání s Lesch-Nyhanovým syndromem se u ní prakticky nevyskytují neurologické potíže, takže zcela převažuje renální postižení, včetně tvorby močových kamenů, a může dojít i k rozvoji dny (Zoref-Shani et al. 2000). U dalšího typu hyperurikémie spojené s deficiencí hypoxantin-guanin fosforibosyltransferázy se pohybuje aktivita enzymu mezi 1,5 až 2 % a u pacientů je pozorováno jak neurologické, tak i renální postižení (Nanagiri a Shabbir 2021).

Další příčinou hyperurikémie může být vzácný defekt v genu *PRPS1* (identifikace dle Ensembl: ENSG00000147224) vedoucí ke zvýšené aktivitě enzymu fosforibosyl-pyrofosfát syntetázy. U některých pacientů s tímto gonozomálně recesivním onemocněním (OMIM # 300661) se kromě hyperurikémie a dny objevují i poruchy nervového systému a sluchu (García-Pavía et al. 2003).

1.3 Dna

Dna (neboli dnava artritida) je chronické onemocnění, které vzniká na podkladě poruchy metabolismu kyseliny močové. Je pro něj charakteristická depozice monosodných urátových krystalů v kloubních chrupavkách i dalších tkáních, kde vyvolávají místní zánětlivou reakci. U některých pacientů se dnou lze tyto krystaly prokázat v synoviální tekutině za použití mikroskopu (McCarty a Hollander 1961). Prevalence dny v Evropě je asi 1 až 4 % (Dehlin et al. 2020). Toto onemocnění postihuje častěji muže než ženy (4:1) (Svobodová 2016). Prevalence stoupá s věkem, u mužů je častější nástup dny v nižším věku v porovnání se ženami, jelikož estrogen a progesteron snižují riziko rozvoje onemocnění (Hak et al. 2010; Dehlin et al. 2020).

U dny jsou běžně pozorovány různé komorbidity. Rozsáhlá studie, která byla provedena u pacientů se dnou v USA v letech 2007 a 2008, ukázala, že mezi časté patří hypertenze (u 74 % pacientů), závažné chronické onemocnění ledvin (71 %), obezita (53 %), *diabetes mellitus* (26 %) a nefrolitiáza (24 %) (Zhu et al. 2012). Podle další studie provedené ve Francii k častým komorbiditám patří i srdeční onemocnění, poruchy jater a alkoholismus (Richette et al. 2015). Bylo také zjištěno, že užívání diuretik, obezita a hypertenze dvojnásobně zvyšují riziko vzniku dny (Evans et al. 2018).

1.3.1 Stádia dny

Stádia dny lze určovat podle klinických příznaků či s přihlédnutím k patogenezi onemocnění (Dalbeth a Stamp 2014). Tradiční dělení dle klinických příznaků je následující (Suchý 2011):

- A. Asymptomatická hyperurikémie
- B. Akutní dnavá artritida
- C. Interkritická dna neboli dna mezi jednotlivými akutními dnavými záchvaty
- D. Chronická tofózní dna

Dna však nemusí mít tento typický průběh. U mnoha lidí s hyperurikémií lze pokročilými zobrazovacími technikami nalézt urátové krystaly, i když nikdy neměli akutní dnavý záchvat a ani nemají tofy, tedy okem patrná depozita urátových krystalů (Dalbeth et al. 2015). Z toho důvodu bylo navrženo následující rozdělení stádií dny dle patogeneze (Dalbeth a Stamp 2014):

- A. Je přítomná hyperurikémie, ale pacient nemá příznaky dny a ani není prokázána přítomnost monosodných urátových krystalů.
- B. Lze prokázat ukládání monosodných urátových krystalů, ale pacient nemá příznaky dny.
- C. Ukládání monosodných urátových krystalů a pacient má (nebo již v anamnéze měl) příznaky akutního dnavého záchvatu.
- D. Pokročilé onemocnění, u pacientů se často vyskytují tofy či radiografické eroze.

1.3.2 Patogeneze dny

V patogenezi dny hraje významnou roli reakce imunitního systému na přítomnost krystalů kyseliny močové v kloubních dutinách. Krystaly jsou fagocytovány makrofágy, což vede k uvolňování enzymů obsažených v lysozomech a k produkci zánětlivých chemokinů (Cronstein a Sunkureddi 2013). Působením prozánětlivého interleukinu 1 β dochází ke zvýšené koncentraci neutrofilů v synoviální tekutině, k dalšímu uvolňování zánětlivých cytokinů a k rozvoji akutního zánětlivého procesu (Landis a Haskard 2001; Alberts et al. 2019). Na myších modelech bylo zjištěno, že blokátory interleukinu 1 významně snižují zánětlivý stav v kloubech. Tyto výsledky byly potvrzeny i u myší s deficitem receptoru pro interleukin 1, což ukazuje na významný podíl tohoto cytokinu v rozvoji zánětlivé odpovědi na

urátové krystaly (McDermott et al. 2011). Pro aktivaci interleukinu 1 je nutná kaspáza 1, která je součástí tzv. NLRP3 inflamazómu, což je jeden z typů makromolekulárních komplexů, které aktivují procesy vedoucí k prozánětlivé odpovědi (He et al. 2016). Zatím není jasné, jakým způsobem inflamazóm NLRP3 rozeznává monosodné urátové krystaly, ale je jisté, že se uplatňuje v patogenezi dny a že ovlivňuje podobu zánětlivé odpovědi (McDermott et al. 2011). Intenzivní výzkum role imunitního systému v rozvoji dny přispívá k vývoji nových léčiv, blokátor interleukinu 1 β canakinumab už je možné používat v léčbě (viz kapitola 1.3.3 Léčba dny) a v budoucnu by farmakoterapie mohla cílit i na inflamazóm NLRP3 (Schlesinger et al. 2012; Szekanecz et al. 2019).

K aktivaci neutrofilů dochází při akutní dnavé atace také na podkladě zvýšené produkce interleukinu 8 fagocyty. Ta je zapříčiněna interakcí krystalů kyseliny močové s buněčnými membránami fagocytujících buněk, což vede k aktivaci G proteinu, fosfolipázy C, tyrosinkinázy a dalších kináz (Liu et al. 2000). V jedné studii bylo zjištěno, že je u pacientů při akutním dnavém záchvatu i v období interkritické dny zvýšená hladina cirkulujícího interleukinu 8 (Kienhorst et al. 2015). Dle autorů nebyly u zdravých kontrol a ani u jedinců s jinými zánětlivými stavy (včetně revmatoidní artritidy a systémové sklerodermie) nalezeny zvýšené hladiny interleukinu 8 v periferní krvi.

Chronická tofózní dna je charakteristická přítomností tofů, což jsou ložiska krystalů kyseliny močové, které jsou uloženy v síťovině tvořené proteiny, lipidy a polysacharidy (Schlesinger a Thiele 2010). V tofech jsou produkovány osteoklasty a metaloproteinázy, které přispívají k poškození kloubů, jehož riziko se zvyšuje při opakujících se dnavých záchvatech (Gonzalez 2012). Na poškození kloubů se také významně podílí interleukin 1, jelikož hraje důležitou roli v tvorbě osteoklastů (Zwerina et al. 2007).

1.3.3 Léčba dny

Při léčbě dny se revmatolog zaměřuje na snížení hladiny kyseliny močové pod 360 $\mu\text{mol/l}$, dále na potlačení zánětu, snížení bolestivosti a předcházení dnavým atakám. Kromě farmakoterapie jsou důležitá i dietní opatření snižující příjem purinů z potravy, zvýšení fyzické aktivity a redukce váhy u obézních pacientů (Svobodová 2016; Richette et al. 2017). V terapii se používají různé skupiny léčiv:

- A. **Urikostatika.** Nejčastěji předepisovaným urikostatikem je alopurinol. Jeho účinky na snížení hladiny kyseliny močové byly popsány v 60. letech 20. století. Alopurinol kompetitivně inhibuje xanthinoxidázu, která katalyzuje přeměnu xantinu na kyselinu močovou, čímž snižuje její syntézu. Existuje asociace mezi variantou *rs2231142* (p.Q141K) v genu *ABCG2* a slabou odpovědí na alopurinol (Petru et al. 2016; Roberts et al. 2017). Přítomnost této varianty vede k hromadění alopurinolu a jeho metabolitu oxypurinolu v buňkách renálních tubulů. Následkem toho není v tubulární tekutině dostatek léčiva k vyvolání žádaného účinku (Wen et al. 2015).

Alternativním urikostatikem je febuxostat, který byl poprvé použit v roce 2008 (Dehlin et al. 2020).

- B. **Urikosurika.** Tato léčiva zvyšují vylučování kyseliny močové z těla. Lze je použít u pacientů, kteří netrpí urolitiázou či jiným postižením ledvin. Mezi nejčastěji předepisovaná urikosurika patří probenecid a lesinurad. Probenecid se používá u pacientů se špatnou tolerancí či nedostatečnou odpovědí na alopurinol (Pui et al. 2013). Urikosurické účinky však mají i další léčiva, jako je losartan a atorvastatin či sloučeniny bergeninu (Ragab et al. 2017). Slibné výsledky přinesla studie, podle které vede bergenin ke zvýšení exprese hlavního exkrečního urátového transportéru ABCG2 v ledvinách i střevě. Exprese proteinu GLUT9, který reabsorbuje kyselinu močovou, byla naopak v ledvinách snížena (Chen et al. 2020).
- C. **Nesteroidní antirevmatika.** Používají se k potlačení zánětu a k terapii akutní bolesti, mezi nejčastěji předepisovaná léčiva patří diklofenak a indometacin (Pavelka 2008). Z klinického hlediska je podstatné, že při zahájení terapie urikostatiky bez současného podání nesteroidních antirevmatik může dojít k rozvoji akutního dnavého záchvatu. Přesný mechanismus zatím není objasněn, dnovou ataku však mohou vyvolat i jiné stavy vedoucí k náhlému poklesu sérové hladiny kyseliny močové (Burns a Wortmann 2012).
- D. **Kortikosteroidy.** Léčí se jimi akutní bolest u pacientů, u kterých jsou kontraindikovány nesteroidní antirevmatika. Podle jedné studie má prednison a indometacin stejný efekt na snížení bolesti u akutní dny (Rainer et al. 2016).
- E. **Kolchicin.** Jedná se o alkaloid získávaný z ocúnu jesenního, který se v nízkých dávkách používá při akutních dnavých záchvatech ke zmírnění bolesti (Richette a Bardín 2010). Přesný mechanismus účinku kolchicinu zatím není znám, bylo však zjištěno, že ovlivňuje různé prozánětlivé i protizánětlivé imunitní mechanismy (Dalbeth et al. 2014).
- F. **Blokátory interleukinu 1.** Jedná se o nový typ terapie, který zatím není standardně zavedený v praxi. K použití u pacientů je zatím schválený pouze canakinumab, což je monoklonální protilátka proti interleukinu 1 β (Němec 2015). Canakinumab u pacientů významně snižuje bolestivost i zánět, navíc redukuje výskyt akutních dnavých záchvatů (Schlesinger et al. 2012).
- G. **Urátové oxidázy.** Nejsou zatím standardně používané v terapii. Patří mezi ně peglotikáza. Lze ji indikovat u pacientů s těžkou dnou, kteří špatně odpovídají na léčbu alopurinolem. Mezi nevýhody této léčby patří, že se zhruba u poloviny pacientů objevují vysoké titry protilátek proti peglotikáze, čímž se stává neúčinnou (Sundy et al. 2011; Ragab et al. 2017).

1.4 Hypourikémie

Příčinou hypourikémie může být porucha zpětného vstřebávání kyseliny močové v ledvinných tubulech a méně často také snížená syntéza kyseliny močové. Stejně jako hyperurikémii ji lze rozdělit na primární a sekundární. Primární hypourikémie je způsobená vrozenými defekty enzymů zapojených do metabolismu purinů, které vedou ke snížení produkce kyseliny močové. Tyto poruchy jsou však velmi vzácné. Naproti tomu sekundární hypourikémie se objevuje u onemocnění ledvin, které postihují tubuly (jako je Fanconiho syndrom, nefrotický syndrom či nádory), a také u poškození jater (Sebesta a Stiburkova 2014; Kuwabara et al. 2017).

Vzácná vrozená renální hypourikémie typu 1 (OMIM # 220150) je způsobena mutací v genu *SLC22A12*, který kóduje urátový transportér URAT1 (viz kapitola 1.6.3 Urátový transportér URAT1 (gen *SLC22A12*)) (Mancikova et al. 2016). Ve většině případů je onemocnění způsobeno inaktivující mutací, která vede ke snížené nebo úplné ztrátě transportní funkce proteinu. Hypourikémie typu 1 byla detekována u mnoha pacientů z Japonska, případy jsou však známé i z mnoha dalších zemí světa, včetně České republiky (Stiburkova et al. 2011). Hypourikémie typu 2 (OMIM # 612076) je způsobena mutací v genu *SLC2A9* (viz kapitola 1.6.4 Urátový transportér GLUT9 (gen *SLC2A9*)) (Stiburkova et al. 2012). Oba typy vrozené renální hypourikémie probíhají v mnoha případech asymptomaticky, někdy se však vyskytnou závažné komplikace jako nefrolitiáza či akutní selhání ledvin vyvolané zátěží, kterou může být například nadměrná fyzická aktivita (Ichida et al. 2008; Matsuo et al. 2008).

Mezi vzácné vrozené enzymopatie vedoucí ke snížení produkce kyseliny močové patří různé xanthinurie, které jsou podle postiženého enzymu rozdělovány do různých typů, konkrétně xanthinurie typu I, xanthinurie typu II a deficience molybdenového kofaktoru (ta se dále dělí do tří subtypů) (Reiss et al. 1999; Mraz et al. 2015; Stiburkova et al. 2018).

Xanthinurie typu I (OMIM # 278300) je autozomálně recesivní onemocnění, při kterém je v moči přítomná vysoká koncentrace xanthinu. Příčinou je deficientní enzym xanthin dehydrogenáza/oxidáza (dříve označovaný jako xanthin oxidáza, identifikace dle UniProt: P47989), který je kódován genem *XDH* (identifikace dle Ensembl: ENSG00000158125). Ke komplikacím tohoto onemocnění patří tvorba xanthinových močových kamenů a renální insuficience (Mraz et al. 2015).

Xanthinurie typu II (OMIM # 603592) se vyznačuje deficiencí xanthin dehydrogenázy/oxidázy i aldehydoxidázy (identifikace dle UniProt: Q06278), která je kódovaná genem *AOXI* (identifikace dle Ensembl: ENSG00000138356). Ke snížené aktivitě těchto enzymů dochází proto, že nemají k dispozici molybdenový kofaktor, pro jehož funkci je zapotřebí enzym molybden kofaktor syntetáza 1 (identifikace dle UniProt: Q96EN8), který je kódovaný genem *MOCOS* (identifikace dle Ensembl: ENSG00000075643). V moči pacientů je detekována vysoká koncentrace xanthinu a hypoxanthinu a naopak velmi malé

množství kyseliny močové. Častou komplikací tohoto autozomálně recesivního onemocnění je selhání ledvin (Stiburkova et al. 2018).

Z klinického hlediska existuje podstatný rozdíl v metabolizaci alopurinolu u pacientů s xanthinurií typu I a II. Toto léčivo je běžně v organismu přeměňováno na oxypurinol, k čemuž je zapotřebí aldehydoxidáza. Zatímco tedy jedinci s xanthinurií typu I metabolizují alopurinol běžným způsobem, tak u pacientů s xanthinurií typu II se oxypurinol vůbec nevytváří (Yamamoto et al. 1991).

Dalším typem xanthinurie je deficiencie molybdenového kofaktoru. Dochází k ní z důvodu mutací v různých genech kódujících enzymy nutné pro biosyntézu molybdenového kofaktoru. Podle postiženého enzymu se tato porucha rozděluje do tří subtypů označovaných A, B a C (Reiss et al. 1999). Dědičnost deficiencie molybdenového kofaktoru je autosomálně recesivní. Do klinického obrazu patří vážné neurologické postižení s těžkými záchvaty, opistotonem a psychomotorickou retardací, pacienti často umírají v raném věku (Reiss a Johnson 2003; Leimkühler et al. 2005).

K deficienci molybdenového kofaktoru typu A (OMIM # 252150) dochází z důvodu mutace v genu *MOCS1* (identifikace dle Ensembl: ENSG00000124615), který kóduje molybden kofaktor syntetázu 1 (identifikace dle UniProt: Q9NZB8) (Reiss a Johnson 2003). Do biosyntézy molybdenového kofaktoru se zapojují obě isoformy molybden kofaktor syntetázy 1 označované jako MOCS1A a MOCS1B (Hänzelmann et al. 2002). Pro deficienci molybdenového kofaktoru typu B (OMIM # 252160) je charakteristická dysfunkce molybdopterinové syntázy (identifikace dle UniProt: O96033), ke které dochází na podkladě mutace v genu *MOCS2* (identifikace dle Ensembl: ENSG00000164172) (Reiss 2000). Deficiencie molybdenového kofaktoru typu C (OMIM # 615501) je způsobená mutací v genu *GPHN* (identifikace dle Ensembl: ENSG00000171723), který kóduje protein gephyrin (identifikace dle UniProt: Q9NQX3). Jedná se o protein asociovaný s mikrotubuly, který je zapojený i do biosyntézy molybdenového kofaktoru (Reiss et al. 2011; Dejanovic et al. 2015).

1.5 Genetické faktory v rozvoji hyperurikémie a dny

Hladina kyseliny močové je podle závěrů různých studií genetickými faktory ovlivňována ze 40 až 80 %, u evropské populace konkrétně dosahuje tato hodnota podle jedné studie 60 % (Krishnan et al. 2012). K rozvoji dny nedochází u všech osob s hyperurikémií, takže zatím není jasné, jak je to s dědičností tohoto onemocnění. Na jeho vzniku se navíc kromě genetických faktorů podílejí také vlivy stravy a prostředí (Merriman 2015). Zatím bylo provedeno pouze omezené množství studií a podle závěrů jedné práce, která zkoumala 514 párů mužských monozygotických i dizygotických dvojčat, je fenotyp dny určen především vlivy prostředí (Krishnan et al. 2012).

Genomové asociační studie (GWAS, genome-wide association study) se zaměřují na odhalování lokusů, které jsou spojeny s konkrétním fenotypem, jako je hyperurikémie a dna. Předpokladem pro tyto studie je vyšetření velkého množství vzorků, aby mohly být kandidátní

geny obsahující dané lokusy co nejpřesněji vytipovány (Visscher et al. 2017). Jedna studie zahrnovala data od více než 140 000 jedinců evropského původu a autoři v ní identifikovali 28 významných lokusů asociovaných se zvýšenou hladinou kyseliny močové (Köttgen et al. 2013). Byly mezi nimi i lokusy zahrnující geny kódující urátové transportéry, konkrétně *ABCG2*, *SLC2A9*, *SLC17A3*, *SLC22A11* a *SLC22A12*. Dvě jiné studie identifikovaly další lokusy nacházející se v genech kódujících urátové transportéry, a to v *ABCG2*, *SLC2A9*, *SLC22A11*, *SLC22A12* a *SLC17A1* (Nakayama et al. 2017) (Yang et al. 2010). Opakovaně byly potvrzeny významné lokusy v genech *ABCG2* a *SLC2A9* (Vitart et al. 2008; Köttgen et al. 2013; Matsuo et al. 2016; Kawamura et al. 2019).

Kromě genů kódujících urátové transportéry se lokusy významné z hlediska hyperurikémie a dny nacházejí i v mnoha jiných genech, jejichž produkty nejsou přímo zapojené přímo do transportu kyseliny močové. Pomocí GWAS studií jsou například často odhalovány lokusy, které vedou k ovlivnění genové exprese (Boyle et al. 2017). Pozornost by měla být věnována i genům, jejichž produkty souvisejí s rozpoznáním urátových krystalů a s imunitní reakcí na ně. Například varianta *rs2149356* v genu *TLR4*, jehož produktem je toll-like receptor 4, je asociována s primární dnou v čínské populaci (Qing et al. 2013). Jiná studie zkoumala výsledky výše uvedené GWAS studie zahrnující 140 000 vzorků (Köttgen et al. 2013) a potvrdila asociaci se dnou u čtyř lokusů v genech *IGF1R* (inzulinu podobný růstový faktor 1), *PDZK1* (produkt tohoto genu patří mezi tzv. scaffold proteiny), *HLF* (jaterní leukemický faktor) a *MAF* (transkripční faktor Maf) (Phipps-Green et al. 2016). V nedávné metaanalýze byly identifikovány tři lokusy zodpovědné za přechod z asymptomatické hyperurikémie do dny: *rs7927466* v genu *CNTN5* (kontaktní 5), *rs9952962* v genu *MIR302F* (microRNA 302f) a *rs12980365* v genu *ZNF724* (zinc finger protein 724). Tato studie zároveň potvrdila, že následující lokusy jsou asociované s dnou: gen *ABCG2* (urátový transportér ABCG2), gen *SLC2A9* (urátový transportér GLUT9) a *rs671* v genu *ALDH2* (aldehyd dehydrogenáza 2) (Kawamura et al. 2019). Významné polymorfismy v genech kódujících urátové transportéry, u kterých byla odbornými studii zjištěna asociace s hyperurikémií a dnou, jsou popsány v následující kapitole a dále také v příslušných pasážích v diskuzi.

1.6 Urátové transportéry

Urát nemůže přestupovat přes buněčné membrány samostatně, k transportu jsou zapotřebí speciální proteiny, tzv. urátové transportéry (viz Tabulka 1.1 a Obrázek 1.2). Tyto proteiny významně ovlivňují hladinu kyseliny močové v těle. Urátové transportéry jsou exprimovány především v proximálních tubulech ledvin a ve střevě. Nacházejí se však i v dalších orgánech, kde chrání buňky před cytotoxickým působením kyseliny močové. Mezi tyto proteiny patří jednak multispecifické transportéry, jako je ABCG2 (kódovaný genem *ABCG2*) či OAT1 (*SLC22A6*), jejichž důležitou funkcí je transport různých léčiv a xenobiotik, ale také selektivnější transportéry, kterými jsou GLUT9 (*SLC2A9*) a URAT1

(*SLC22A11*) (Nigam a Bhatnagar 2018). Proteiny urátových transportérů lze rozdělit do dvou velkých rodin: ABC transportéry a SLC transportéry (Nigam et al. 2015).

ABC transportéry jsou velkou skupinou transmembránových proteinů, které se vyskytují prakticky ve všech tkáních. Transportují široké spektrum organických i anorganických látek. Pojmenovány jsou podle ATP-vazebné domény (ATP binding cassette, zkratka ABC), jelikož přenášejí substráty přes plazmatickou membránu za spotřeby adenosintrifosfátu (ATP) (Nigam 2015). ABC proteiny jsou tvořeny doménou překlenující membránu (membrane-spanning domain, MSD) a doménou vázající nukleotidy (nucleotide binding domain, NBD), konkrétně ATP-vazebnou doménu (ATP-binding cassette). Aby byl ABC transportér funkční, tak je potřeba, aby obsahoval dvě domény překlenující membránu, které obvykle obsahují šest transmembránových segmentů, a dvě ATP-vazebné domény. Pouze některé ABC proteiny mají všechny funkčně potřebné složky v jednom řetězci (jedná se o tzv. úplné transportéry), ostatní vytvářejí membránové spojené homodimery nebo heterodimery (jedná se o tzv. poloviční transportéry) (Tusnády et al. 2006; Deeley et al. 2006).

ABC proteiny se dělí do několika skupin. ABCA proteiny jsou úplné transportéry a jsou kromě jiného zapojené do lipidového metabolismu. Ve skupině ABCB jsou zahrnuty úplné i poloviční transportéry, patří mezi ně i P-glykoprotein 1 (gen *ABCB1*), u kterého byla jako u prvního ABC proteinu prokázána souvislost s lékovou rezistencí rakovinných buněk. Významným členem skupiny ABCC, kam patří úplné transportéry, je CFTR protein, jehož dysfunkce vede k cystické fibróze. Proteiny ze skupiny ABCD jsou poloviční transportéry, které jsou lokalizované v peroxisomech, kde transportují mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem. ABCE a ABCF proteiny obsahují ATP-vazebnou doménu, ale chybí jim transmembránová doména. Poslední skupinou jsou ABCG proteiny. Jedná se o poloviční transportéry, které mají opačnou strukturu než jiné ABC proteiny, tedy doménou vázající nukleotidy mají na N-konci a transmembránovou doménu na C-konci (Dean et al. 2001).

Velká rodina SLC proteinů (solute carriers) zahrnuje rozsáhlou skupinu tzv. OAT proteinů (organické aniontové transportéry, organic anion transporters). Tyto transportéry koncentrují anionty proti jejich chemickému gradientu. Kromě proximálních tubulů ledvin jsou exprimovány v různých epitelových buňkách, kde přispívají k bariérovým funkcím epitelu. Zajišťují exkreci a reabsorpci různých léků, jako jsou antibiotika, antivirotika, diuretika či cytostatika. Transportují také další xenobiotika, dále různé organické ionty, endogenní metabolity a urát (Sekine et al. 2000; 2006; Robertson a Rankin 2006; VanWert et al. 2009).

Tabulka 1.1 - Urátové transportéry a jejich geny

| Urátový transportér | Označení proteinu (identifikace podle UniProt) | Označení genu (identifikace podle Ensembl) | Lokus | Exprese proteinu | Molekulová hmotnost |
|--|--|--|---------|--|---------------------|
| Broad substrate specificity ATP-binding cassette transporter ABCG2; ATP-binding cassette sub-family G member 2 | ABCG2 (Q9UNQ0) | <i>ABCG2</i> (ENSG00000118777) | 4q22.1 | ledviny, placenta, střevo, játra, mozek a další tkáně | 72 314 Da |
| Multidrug resistance-associated protein 4; ATP-binding cassette sub-family C member 4 | MRP4 (O15439) | <i>ABCC4</i> (ENSG00000125257) | 13q32.1 | prostata, vejcovody, mozek, ledviny a další tkáně | 149 527 Da |
| Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 9; Glucose transporter type 9 | GLUT9 (Q9NRM0) | <i>SLC2A9</i> (ENSG00000109667) | 4p16.1 | ledviny, játra, placenta, plíce, chrupavka a další tkáně | 58 702 Da |
| Solute carrier family 22 member 12; Urate transporter 1 | URAT1 (Q96S37) | <i>SLC22A12</i> (ENSG00000197891) | 11q13 | ledviny | 59 630 Da |
| Solute carrier family 22 member 6; Organic anion transporter 1 | OAT1 (Q4U2R8) | <i>SLC22A6</i> (ENSG00000197901) | 11q12.3 | především ledviny, dále játra, mozek, placenta, kosterní svalovina | 61 816 Da |
| Solute carrier family 22 member 8; Organic anion transporter 3 | OAT3 (Q8TCC7) | <i>SLC22A8</i> (ENSG00000149452) | 11q12.3 | ledviny, srdce | 59 856 Da |
| Solute carrier family 22 member 11; Organic anion transporter 4 | OAT4 (Q9NSA0) | <i>SLC22A11</i> (ENSG00000168065) | 11q13.1 | ledviny, placenta | 59 972 Da |
| Solute carrier family 22 member 13; Organic anion transporter 10 | OAT10 (Q9Y226) | <i>SLC22A13</i> (ENSG00000172940) | 3p22.2 | především ledviny, mozek, střevo, srdce, v malé míře i v dalších tkáních | 60 862 Da |

| | | | | | |
|---|------------------|-------------------------------------|--------|--------------------------|-----------|
| Sodium-dependent phosphate transport protein 1; Solute carrier family 17 member 1 | NPT1 (Q14916) | <i>SLC17A1</i> (ENSG00000124568) | 6p22.2 | ledviny, játra, mozek | 51 132 Da |
| Sodium-dependent phosphate transport protein 4; Solute carrier family 17 member 3 | NPT4 (O00476) | <i>SLC17A3</i> (ENSG00000124564) | 6p22.2 | ledviny, játra | 46 106 Da |

V tabulce je uvedeno shrnutí základních informací o genech a příslušných proteinech (urátových transportérech), které byly vybrány pro analýzu.

Zdroje: databáze Ensembl (Howe et al. 2021), UniProt (Bateman et al. 2021) a NCBI (Agarwala et al. 2018)

1.6.1 Urátový transportér ABCG2 (gen *ABCG2*)

Protein ABCG2 (broad substrate specificity ATP-binding cassette transporter ABCG2; ATP-binding cassette sub-family G member 2) je považován za hlavní exkretor kyseliny močové. Je známý také pod názvem BCRP (breast cancer resistance protein). Je kódovaný genem *ABCG2* a je složen z 655 aminokyselin. Délka transkriptu je 4844 párů bází (ENST00000650821), kromě něj se vyskytují ještě čtyři další kratší transkripty kódující protein (Bateman et al. 2021; Howe et al. 2021).

Protein ABCG2 je tzv. polovičním transportérem, jelikož obsahuje pouze jednu doménu vázající nukleotid a jednu doménu překlenující membránu. Doména vázající nukleotid je klíčová pro vazbu ATP a je složena z vysoce konzervovaných sekvencí, kterými jsou Walkerův motiv A (umístěný v pozici aminokyselin 80 až 86), Walkerův motiv B (lokalizovaný v pozici aminokyselin 205 až 210) a specifická C doména neboli ABC typický motiv (umístěný v pozici aminokyselin 186 až 200) (Tamura et al. 2006; Macalou et al. 2016). Předpokládá se, že MSD obsahuje šest transmembránových segmentů. Protein ABCG2 může tedy transportovat substráty pouze, pokud je ve formě dimeru, kdy jsou k dispozici dvě MSD domény a dvě NBD domény (Mo a Zhang 2012).

Protein ABCG2 zajišťuje exkreci kyseliny močové nejen v proximálních tubulech ledvin, ale také ve střevě (Hosomi et al. 2012). Kromě toho je exprimován i v dalších tkáních, jako je placenta či mozek (Howe et al. 2021). Mezi další významné substráty tohoto proteinu patří různá xenobiotika, toxiny a hormony. Z klinického hlediska je podstatné, že je asociován s lékovou rezistencí, včetně rezistence vůči antracyklinům a dalším cytostatikům, jelikož zvyšuje jejich eflux z buněk (Dean et al. 2001; Mao a Unadkat 2015). Byl identifikován v různých nádorech, jako jsou adenokarcinomy trávicího traktu, karcinomy plic, karcinomy endometria či myelomy (Diestra et al. 2002).

Z hlediska vzniku primární dny je významná přítomnost jednonukleotidového polymorfismu p.Q141K (*rs2231142*), který vede k výraznému snížení exkrece kyseliny močové (až o 53 %) (Woodward et al. 2009; Ichida et al. 2012). Kromě toho bylo detekováno

několik dalších variant, u nichž byla prokázána asociace s hyperurikémií a dnou (Onuora 2020).

1.6.2 Urátový transportér MRP4 (gen *ABCC4*)

Protein MRP4 (multidrug resistance-associated protein 4; ATP-binding cassette sub-family C member 4) je kódovaný genem *ABCC4* a patří mezi exkretory kyseliny močové. Je exprimován na apikální membráně proximálních tubulů, ale také v dalších tkáních, jako jsou vejcovody, mozek či prostata. Nejdelší transkript ENST00000645237 je složen z 1325 aminokyselin (5855 párů bází) a kromě něj alternativním sestřihem vznikají ještě čtyři další kratší transkripty kódující protein (Bateman et al. 2021; Howe et al. 2021).

MRP4 transportuje stejně jako ostatní ABC proteiny různá léčiva a produkty metabolismu. Mezi jeho substráty patří metotrexát, prostaglandin E1, prostaglandin E2 či glukoronidy. Je zodpovědný také za vylučování cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) a cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP) do moči (Deeley et al. 2006). Protein MRP4 je úplným (kompletním) transportérem, jelikož obsahuje všechny potřebné struktury pro svou funkci – tedy dvě MSD domény a dvě NBD domény (Deeley et al. 2006).

Pokud jde o asociaci mezi variantami v genu *ABCC4* a dnou, tak podle jedné studie provedené u polynéské populace je intronová varianta *rs4148500* (c.2034+124C>T) signifikantně asociovaná s hyperurikémií a dnou a také se sníženou frakční exkrecí kyseliny močové. Tato varianta se však prakticky nevyskytuje u evropské populace (Tanner et al. 2017).

1.6.3 Urátový transportér URAT1 (gen *SLC22A12*)

Gen *SLC22A12* kóduje protein URAT1 (urate transporter 1; solute carrier family 22 member 12), který zajišťuje spolu s dalšími transportéry zpětné vstřebávání urátu. Protein URAT1 byl poprvé identifikován v ledvině myši a byl nejprve pojmenován jako renální specifický transportér (Mori et al. 1997). Je lokalizován na apikální membráně proximálních tubulů a kromě ledvin není exprimován v žádné jiné tkáni (Howe et al. 2021). Na rozdíl od jiných OAT proteinů je jeho substrátem výhradně kyselina močová (Sekine et al. 2006). Gen *SLC22A12* se vyskytuje v pěti transkriptech, z nichž nejdelší s označením ENST00000377574 zahrnuje 553 aminokyselin (2792 párů bází) (Bateman et al. 2021; Howe et al. 2021).

Podle závěrů různých studií mají některé polymorfismy v tomto genu vliv na hladinu kyseliny močové. Intronová varianta c.831-1697C>T (*rs475688*) zvyšuje riziko dny a synonymní varianta p.H86H (*rs3825016*) je asociovaná s hyperurikémií (Zou et al. 2018). Některé vzácné varianty v *SLC22A12* jsou naopak příčinou vzácné renální hypourikémie typu 1 (viz kapitola 1.4 Hypourikémie) (Mancikova et al. 2016).

1.6.4 Urátový transportér GLUT9 (gen *SLC2A9*)

Gen *SLC2A9* kóduje protein GLUT9 (glucose transporter type 9; solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 9), který patří do skupiny glukózových transportérů. Původně byl identifikován jako transportér glukózy a fruktózy, i když není tak výkonný jako transportéry GLUT1 či GLUT4. Až později byl potvrzen jeho význam v přenosu kyseliny močové, kterou transportuje rychleji než monosacharidy (Caulfield et al. 2008). Zajímavé je, že glukózové transportéry GLUT1 a GLUT5, které mají velmi podobnou proteinovou strukturu jako GLUT9, nemají schopnost transportovat kyselinu močovou (Long et al. 2017).

Protein GLUT9 zajišťuje zpětné vstřebávání kyseliny močové a v proximálních tubulech ledvin je exprimován ve dvou odlišných sestříhových variantách, které se liší lokalizací. Varianta GLUT9a se nachází na bazolaterální membráně tubulů, zatímco varianta GLUT9b na jejich apikální membráně (So a Thorens 2010). GLUT9a má délku 540 aminokyselin (transkript ENST0000026478, 1864 párů bází) a GLUT9b obsahuje 511 aminokyselin (transkript ENST00000506583, 1927 párů bází). Kromě ledvin je GLUT9 exprimován také v játrech, plicích, chrupavkách, placentě a v dalších tkáních (Bateman et al. 2021; Howe et al. 2021).

Pokud jde o souvislost mezi hladinou kyseliny močové a genem *SLC2A9*, bylo zjištěno, že u zdravé populace souvisí přítomnost polymorfismů v tomto genu až s 5% rozptylem v hodnotách sérové kyseliny močové (Vitart et al. 2008). Byly identifikovány genetické varianty, které snižují riziko vzniku dny, jako jsou p.V282I (*rs16890979*) a c.1002+78A>G (*rs6823877*), ale také jiné polymorfismy asociované s hyperurikémií a dnou, jako je p.R265H (*rs3733591*) a p.L108L (*rs13113918*) (Sarzynski et al. 2012; Meng et al. 2015; Zhang et al. 2018; Wan Taib et al. 2018). Kromě toho vedou některé varianty v *SLC2A9* ke vzácné renální hypourikémii typu 2 (viz kapitola 1.4 Hypourikémie) (Stiburkova et al. 2012).

1.6.5 Urátový transportér OAT4 (gen *SLC22A11*)

Gen *SLC22A11* kóduje transportér OAT4 (organic anion transporter 4; solute carrier family 22 member 11), který je exprimován na apikální membráně proximálních tubulů, kde zajišťuje zpětné vstřebávání kyseliny močové. Kromě urátu transportuje tento protein také hormony a různá xenobiotika. Pro jeho funkci je nutná interakce s různými anorganickými ionty (Hagos et al. 2007). Mimo ledvin je OAT4 vysoce exprimován také v placentě, což naznačuje, že pomáhá chránit plod před toxiny (Cha et al. 2000). Zároveň slouží ke vstřebávání prekurzorů estrogenů a k transportu dalších steroidů (Ugele et al. 2003).

Protein OAT4 je unikátní tím, že je exprimován pouze u lidí a u vyšších primátů (Hagos et al. 2007). Existuje osm transkriptů tohoto genu, z nichž jsou pouze čtyři funkční. Nejdelší transkript ENST00000301891 zahrnuje 550 aminokyselin a 3545 párů bází (Bateman et al. 2021; Howe et al. 2021).

Byl zkoumán vliv genetických variant na hladinu kyseliny močové. Podle jedné studie je intronová varianta c.822-318A>G (*rs17300741*) spojena s dnou, jejíž příčinou je snížená exkrece kyseliny močové (Sakiyama et al. 2014).

1.6.6 Urátový transportér OAT10 (gen *SLC22A13*)

Protein OAT10 (organic anion transporter 10; solute carrier family 22 member 13) kódovaný genem *SLC22A13* obstarává reabsorpci kyseliny močové na apikální straně proximálních tubulů (Higashino et al. 2020). Protein OAT10 byl u lidí identifikován v roce 1998, kdy byl nejprve zařazen mezi organické kationtové transportéry. Později se zjistilo, že transportuje organické anionty, jako je glutathion, nikotinát či p-aminohippurát, takže byl zařazen mezi OAT proteiny (Bahn et al. 2008; VanWert et al. 2009). Existují dvě setřihové varianty, z nichž funkční je pouze transkript s označením ENST00000311856, který zahrnuje 551 aminokyselin (2555 párů bází). OAT10 je kromě ledvin exprimován také mozku, střevě, srdci a v malé míře i v dalších tkáních (Bateman et al. 2021; Howe et al. 2021).

V rozsáhlé japonské studii bylo zjištěno, že nesynonymní varianta *rs117371763* (p.R377C) je asociována se sníženou hladinou kyseliny močové a se sníženým rizikem vzniku dny. Tato varianta způsobuje výrazný pokles funkce transportéru OAT10 (Higashino et al. 2020).

1.6.7 Urátový transportér NPT1 (gen *SLC17A1*)

Protein NPT1 (sodium-dependent phosphate transport protein 1; solute carrier family 17 member 1) je kódován genem *SLC17A1*. Jedná se o fosfátový transportér závislý na sodíku, který je exprimován na apikální membráně proximálních ledvinných tubulů, lze ho však najít také v játrech a v mozku. Kromě exkrece urátu zajišťuje transport i dalších látek, jako jsou organické kyseliny, glukóza či žlučové soli. Gen se vyskytuje ve čtyřech sestřihových variantách, nejdelší transkript s označením ENST00000244527 obsahuje 467 aminokyselin (1819 párů bází) (Iharada et al. 2010; Bateman et al. 2021; Howe et al. 2021)

Byla prokázána souvislost mezi jednonukleotidovými polymorfismy v genu *SLC17A1* a dnou (Hollis-Moffatt et al. 2012). Výjimkou je varianta p.I269T (*rs1165196*), která působí z hlediska dny protektivně, jelikož zřejmě zvyšuje exkreční aktivitu tohoto urátové transportéru (Sakiyama et al. 2016a). Podle jiných autorů je však p.I269T asociována s dnou (Hollis-Moffatt et al. 2012; Chiba et al. 2015).

1.6.8 Urátový transportér NPT4 (gen *SLC17A3*)

Dalším urátovým transportérem je NPT4 (sodium-dependent phosphate transport protein 4; solute carrier family 17 member 3), který je kódován genem *SLC17A3*. Je exprimován v játrech a na apikální straně proximálních tubulů a v menší míře také v dalších částech ledviny (Howe et al. 2021). Spolu s dalšími urátovými transportéry zajišťuje exkreci kyseliny močové a kromě toho transportuje i některá léčiva, jako je furosemid (Jutabha et al.

2010). Vyskytuje se v sedmi transkriptech, z nichž je pět funkčních. Nejdelší je transkript ENST00000397060, který obsahuje 498 aminokyselin (2052 párů bází). Dva další transkripty (konkrétně ENST00000360657 a ENST00000361703) kódující 420 aminokyselin neobsahují na rozdíl od transkriptu ENST00000397060 exon 4 (Bateman et al. 2021; Howe et al. 2021).

Pokud jde o souvislost mezi hladinou kyseliny močové a proteinem NPT4, bylo v jedné studii zjištěno, že jednonukleotidové varianty p.N68H (*rs387907257*) a p.F304S (*rs387907256*) významně snižují transport urátu proteinem NPT4 (Jutabha et al. 2010).

1.6.9 Urátový transportér OAT1 (gen *SLC22A6*)

Protein OAT1 kódovaný genem *SLC22A6* (organic anion transporter 1; solute carrier family 22 member 6) je exprimován na bazolaterální membráně proximálních tubulů a účastní se exkrece kyseliny močové (Motohashi et al. 2002; Bateman et al. 2021). Kromě urátu transportuje různá léčiva (jako jsou nesteroidní antiflogistika, ACE inhibitory, antibiotika, antivirotika, diuretika), mykotoxiny, uremické toxiny, prostaglandiny, vitaminy a další endogenní i exogenní látky. Může tedy ovlivňovat různé metabolické dráhy a dá se předpokládat jeho podíl na metabolických onemocněních, dně a chorobách ledvin (Liu et al. 2016). Protein OAT1 pocházející z krysí ledviny byl v roce 1997 funkčně charakterizován pomocí expresního systému oocytů *Xenopus leavis* a brzy byly identifikovány jeho ortology u lidí, prasat, myši a dalších druhů (VanWert et al. 2009). Protein OAT1 se skládá z 563 aminokyselin (2151 párů bází, transkript ENST00000377871). Kromě toho bylo zjištěno ještě pět dalších sestřihových variant. Je exprimován především v ledvinách a v menší míře také v játrech, mozku, placentě a kosterní svalovině (Bateman et al. 2021; Howe et al. 2021).

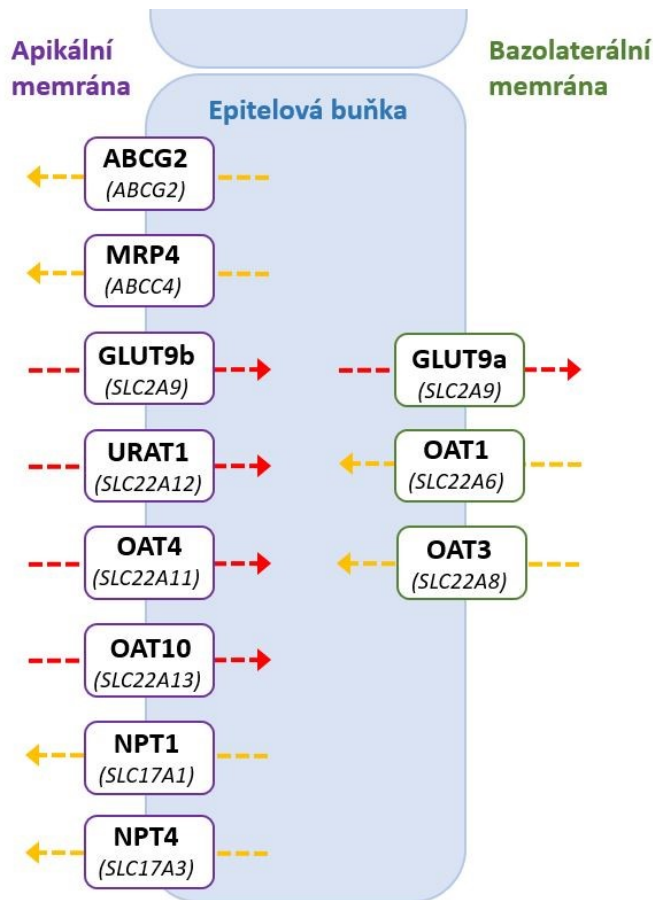
Z literatury zatím není známá asociace mezi polymorfismy vyskytujícími se v genu *SLC22A6* a hladinou kyseliny močové.

1.6.10 Urátový transportér OAT3 (gen *SLC22A8*)

Transportér OAT3 kódovaný genem *SLC22A8* (organic anion transporter 3; solute carrier family 22 member 8) je exprimován na bazolaterální membráně proximálních tubulů a v menší míře také v srdci (Motohashi et al. 2002; Bateman et al. 2021). Jedná se o nejsilněji exprimovaný OAT protein v ledvině (Erdman et al. 2006). Existuje pět funkčních transkriptů proteinu OAT3. Nejdelší transkript ENST00000336232 je složen z 2180 párů bází (542 aminokyselin) (Howe et al. 2021).

Protein OAT3 byl poprvé izolován z mozku krys při použití sondy obsahující konzervované sekvence proteinu OAT1 (Kusuhara et al. 1999). Protein OAT3 zajišťuje spolu s dalšími urátovými transportéry exkreci kyseliny močové (Bakhiya et al. 2003). Kromě toho je významný z hlediska eliminace různých léčiv, xenobiotik a endogenních produktů z těla. V genu *SLC22A8* byly zjištěny varianty, které snižují transportní funkci proteinu, z nichž nejvýznamnější jsou p.R149S (*rs45566039*), p.Q239Ter (*rs11568496*) a p.I260R (*rs11568493*) (Erdman et al. 2006).

Obrázek 1.2 - Urátové transportéry v proximálních tubulech ledvin



Na obrázku je vyznačeno, které urátové transportéry se nacházejí na apikální membráně epitelu proximálních tubulů ledvin a které na bazolaterální membráně a jakým směrem transportují kyselinu močovou. Některé transportéry fungují jako exkretory kyseliny močové, konkrétně se jedná o proteiny ABCG2 (gen *ABCG2*), MRP4 (gen *ABCC4*), NPT1 (gen *SLC17A1*), NPT4 (gen *SLC17A3*), OAT1 (gen *SLC22A6*) a OAT3 (gen *SLC22A8*). Jiné zajišťují reabsorpci kyseliny močové, konkrétně jsou to proteiny GLUT9 (gen *SLC2A9*), URAT1 (gen *SLC22A12*), OAT4 (gen *SLC22A11*) a OAT10 (gen *SLC22A13*). Protein GLUT9 se vyskytuje ve dvou sestříhových variantách, GLUT9a je lokalizován na bazolaterální membráně a GLUT9b na apikální membráně.

Pozn.: Seznam použité literatury je uvedený výše v podkapitolách týkajících se jednotlivých urátových transportérů.

2. Cíle práce

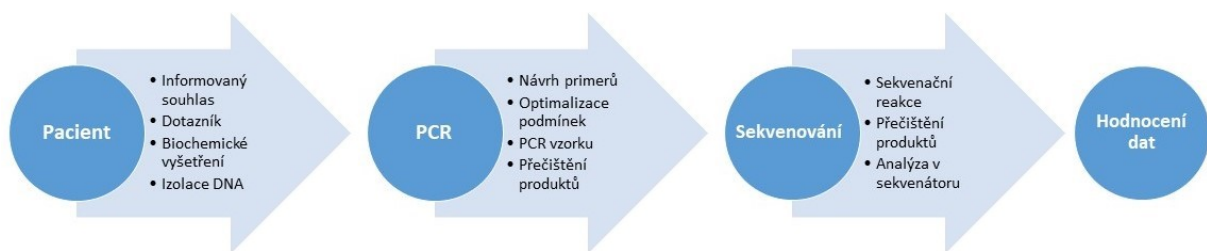
Cílem této práce bylo identifikovat genetické varianty, které by mohly být asociovány s primární hyperurikémií a s primární dnou. Zaměřovali jsme se na polymorfismy v genech, které kódují významné urátové transportéry lokalizované v proximálních tubulech ledvin a v menší míře také ve střevě, konkrétně *ABCG2* (*ABCG2*), *ABCC4* (*MRP4*), *SLC2A9* (*GLUT9*), *SLC22A12* (*URAT1*), *SLC22A11* (*OAT4*), *SLC22A13* (*OAT10*), *SLC17A1* (*NPT1*), *SLC17A3* (*NPT4*), *SLC22A6* (*OAT1*) a *SLC22A8* (*OAT3*).

Možnou asociaci detekovaných polymorfismů s primární hyperurikémií a dnou jsme posuzovali z mnoha hledisek, aby byly naše závěry co nejpřesnější. Prováděli jsme *in silico* analýzu funkčního dopadu variant pomocí predikčních programů. Dále jsme porovnávali alelickou frekvenci v kohortě pacientů s primární hyperurikémií a dnou s frekvencí v evropské populaci a v kohortě z běžné populace. Zaměřovali jsme se také na analýzu lokalizace variant v topologických modelech příslušných urátových transportérů. Naše zjištění jsme porovnávali s odbornou literaturou, včetně funkčních studií nesynonymních variant v genech *ABCG2* a *SLC2A9*, které byly prováděny na spolupracujících pracovištích. Nakonec jsme se snažili najít odpověď na otázku, jaký dopad má u jednotlivých pacientů současný výskyt více variant, které jsou pozitivně asociovány s hyperurikémií a dnou, nebo naopak riziko onemocnění snižují.

3. Metodika

Projekt zabývající se patofyziologií urátových transportérů v primární dně a hyperurikémii schválila etická komise Revmatologického ústavu (číslo 6181/2015). V následujícím schématu jsou pro přehlednost shrnuty základní kroky vedoucí k analýze genetických variant u pacientů s hyperurikémií a dnou, které jsou podrobně popsány dále v této kapitole.

Obrázek 3.1 - Základní kroky vedoucí k vyšetření alelických variant v genech kódujících urátové transportéry



3.1 Sestavení vyšetřovaných kohort

Byly sestaveny dvě kohorty. První zahrnovala pacienty s primární hyperurikémií a dnou, u kterých byly vyšetřovány geny kódující urátové transportéry. Kromě toho byla vytvořena také kontrolní kohorta zahrnující jedince z běžné populace, u které byly vyšetřovány vybrané alelické varianty.

3.1.1 Kohorta pacientů s primární hyperurikémií a dnou

Do kohorty byli zařazeni převážně pacienti z Revmatologického ústavu a z menší části také pacienti z Kliniky pediatrie a dědičných poruch metabolismu 1. LF UK a VFN. Původní kohorta 150 jedinců byla postupně rozšiřována o nové pacienty, u kterých byly primárně vyšetřovány geny kódující urátové transportéry, které mají dle literatury významnější vliv na hladinu kyseliny močové (Merriman 2015; Nigam a Bhatnagar 2018; Zhu et al. 2018).

Velikost kohorty uváděná v této práci je tedy různě široká u jednotlivých vyšetřovaných genů:

- geny *ABCG2*, *SLC2A9* a *SLC22A12*: 250 jedinců (z toho 182 jedinců s primární dnou a 68 jedinců s primární hyperurikémií)
- geny *ABCC4*, *SLC22A11*, *SLC22A13*, *SLC17A1*, *SLC17A3*, *SLC22A6* a *SLC22A8*: 150 jedinců (z toho 115 jedinců s primární dnou a 35 jedinců s primární hyperurikémií)

Dna byla diagnostikována na základě klasifikačních kritérií, která byla navržena a schválena organizacemi „American College of Rheumatology (ACR) Board of Directors“ a „the European League Against Rheumatism (EULAR) Executive Committee“ (Neogi et al.

2015). U jedinců s primární hyperurikémií byly opakovaně naměřeny hodnoty nad 360 $\mu\text{mol/l}$ u žen a nad 420 $\mu\text{mol/l}$ u mužů.

Pro naši studii bylo podstatné, aby byli v kohortě zařazeni pouze jedinci s primární hyperurikémií a dnou. Snažili jsme se tedy o vyloučení pacientů se sekundární dnou a enzymopatiemi, které vedou k hyperurikémii. K tomu sloužilo jednak vyšetření purinových metabolitů, a jednak dotazník, který vyplňovali ošetřující lékaři a zdravotní sestry. V dotazníku byla vyznačena rodinná anamnéza a věk nástupu primární hyperurikémie nebo dny. Byly zde zaznamenány i základní klinické údaje, jako je váha a systolický a diastolický tlak. Důležitou součástí dotazníku byly také komorbidity, které mohou ovlivňovat hladinu kyseliny močové, jako jsou nefrologická onemocnění, těžká psoriáza či aktivní maligní onemocnění. Purinové metabolity, konkrétně xanthin, hypoxanthin a oxypurinol, byly měřeny u každého pacienta dvakrát. První vzorek se odebíral za současné léčby alopurinolem nebo febuxostatem, během které byly očekávaným nálezem zvýšené hladiny xantinu a hypoxantinu. Pro druhé měření byli pacienti požádáni, aby 72 hodin před odběrem vzorku vysadili léky (což bylo schváleno etickou komisí Revmatologického ústavu). Vzorek byl samozřejmě odebírán i od pacientů před zahájením terapie alopurinolem nebo febuxostatem, aby nemuseli později kvůli tomuto vyšetření vysazovat léky. Ke stanovení purinových metabolitů byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Vyšetření probíhalo na spolupracujícím pracovišti (Biochemická laboratoř, Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu 1. LF UK a VFN) pomocí detektoru fotodiodového pole Waters 2695 a 2998.

V diagnostických laboratořích Revmatologického ústavu bylo provedeno biochemické vyšetření, mezi stanovované analyty patřila hladina kyseliny močové v séru a v moči, frakční exkrece kyseliny močové, kreatinin, glukóza, fosfor, vápník, fosfor, vitamin D, parametry lipidového metabolismu, jaterní enzymy a kreatinkináza. Byl vyšetřován také C-reaktivní protein.

Klinická a biochemická data jedinců v kohortě pacientů jsme charakterizovali pomocí mediánu a interkvartilového rozpětí, které pokrývá 50 % zjištěných hodnot a slouží k charakteristice variability dat. Čím menší je interkvartilové rozpětí, tím blíže jsou pozorovaná data soustředěná kolem mediánu.

3.1.2 Kontrolní kohorta

Kontrolní skupina jedinců z běžné populace zahrnovala 174 osob, jednalo se především o zaměstnance Revmatologického ústavu a jejich rodinné příslušníky. U těchto jedinců bylo provedeno biochemické vyšetření a byly zaznamenány klinické parametry stejně jako u kohorty jedinců s hyperurikémií a dnou. Vyšetřením bylo zjištěno, že 164 jedinců z kontrolní skupiny mělo normální hladinu sérové kyseliny močové, osm jedinců mělo hyperurikémií a dva lidé měli mírnou hypourikémií.

3.2 Izolace genomové DNA

K izolaci genomové DNA z plné periferní krve jsme používali komerční kit QIAamp DNA Mini Kits (Qiagen). Postupovali jsme podle návodu od výrobce. Princip metody je založený na vazbě DNA na speciální silikagelovou membránu, přičemž inhibitory polymerázové řetězové reakce jsou odstraněny v promývacích krocích. Izolovaná DNA byla následně až do analýzy uchována při teplotě -20°C .

3.3 Polymerázová řetězová reakce

Metodu polymerázové řetězové reakce (PCR) objevil v roce 1983 Kerry Mullis (Mullis 1990). Od té doby se základní protokol nijak nezměnil a skládá se z následujících několika kroků:

1. Úvodní denaturace DNA, probíhá při teplotě 94°C až 95°C obvykle po dobu 5 až 10 minut.
Následující tři kroky (2 až 4) jsou cyklicky opakovány. Počet cyklů se liší dle protokolu, delší PCR produkty vyžadují více cyklů. Obvyklý počet opakování je 35.
2. Denaturace DNA, probíhá při teplotě 94°C až 95°C obvykle po dobu 15 až 30 sekund.
3. Nasednutí primerů na DNA, teplota je specifická pro každý pár primerů, většinou se pohybuje mezi 48°C a 65°C . Doba trvání této fáze je obvykle 30 až 45 sekund.
4. Syntéza DNA, která obvykle probíhá při teplotě 72°C (teplota se může lišit v závislosti na použité polymeráze). Doba trvání této fáze závisí na délce výsledného PCR produktu, pro úsek 1000 párů bází stačí jedna minuta.
5. Po uplynutí cyklů následuje závěrečná syntéza DNA při 72°C obvykle po dobu 7 až 10 minut.
6. Ochlazení PCR reakce na 4°C .

Základními složkami PCR reakce jsou primery, genomová DNA, volné nukleotidy a DNA polymeráza. Primery syntetizované od výrobce je třeba před použitím naředit na pracovní koncentraci, v našem případě jsme používali primery o koncentraci $10\text{ pmol}/\mu\text{l}$. Izolováním získanou genomovou DNA jsme ředili na koncentraci $20\text{ ng}/\mu\text{l}$. Dále jsme používali speciální komerční PCR mixy, které už obsahovaly volné nukleotidy, DNA polymerázu a další pomocné složky.

Pro návrh primerů jsme používali volně dostupný program Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Po zadání vstupních dat (sekvence, očekávaná délka PCR produktu, teplota tání) program navrhl různé možnosti umístění páru primerů včetně seznamu případných nechtěných PCR produktů. Vybrané specifické primery byly následně objednány u externí firmy, pro jeden PCR produkt se jednalo vždy o jeden primer přední (neboli forward, označován jako primer F) a jeden primer zadní (neboli reverse, označován jako primer R). Sekvence primerů je standardně uváděná ve směru $5' \rightarrow 3'$.

Páry primerů byly navrhovány pro jednotlivé exony a exon-intronová rozhraní tak, aby bylo možné sekvenováním vyšetřit alespoň 100 párů bází před a za exonem. V některých případech, kdy se mezi dvěma exony nacházela velmi krátká intronová oblast, tak byl navržen jeden pár primerů pro oba exony. Primery jsme se snažili designovat tak, aby výsledný PCR produkt nebyl delší než 800 párů bází. Delší úseky totiž nelze kvůli limitacím používaného sekvenátoru Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) s elektroforetickými kapilárami o délce 50 cm bez problémů analyzovat.

Dalším krokem byla optimalizace podmínek PCR reakce, která spočívá ve volbě DNA polymerázy a stanovení teploty nasednutí primerů na DNA (neboli teplotu annealingu) pomocí teplotního gradientu (opakování té samé reakce v teplotním rozmezí 48 °C až 65 °C). Příliš nízká teplota annealingu vede k tvorbě nežádoucích PCR produktů, jelikož primery nasedají na vlákno DNA nespecificky. Zvýšením teploty annealingu se specifická zvyšuje, příliš vysoká teplota však vede k potlačení tvorby žádoucího PCR produktu. Pro PCR exonů jednotlivých genů jsme tedy používali již optimalizované podmínky, které jsou uvedeny v následujícím textu. Pro všechny geny byl použitý následující mix PCR reakce, pokud není dále v textu uvedeno jinak:

| | |
|--------------------------------------|--------|
| Combi PPP Master Mix (Top-Bio): | 10 µl |
| Primery F a R: | 0,8 µl |
| Voda: | 7,4 µl |
| Genomová DNA (koncentrace 20 ng/µl): | 1 µl |

Vznik požadovaného PCR produktu jsme ověřovali pomocí elektroforézy s využitím 2% agarózového gelu. Dále následovalo přečištění pomocí komerčního kitu Presto 96 Well PCR Cleanup Kits (Geneaid). Postupovali jsme podle návodu od výrobce. Principem metody je vazba fragmentů na matrici ze skleněných vláken, která je v každé jamce přečišťovací destičky. Nežádoucí složky jsou odstraněny v promývacích krocích a na závěr jsou PCR produkty z přečišťovací destičky uvolněny elučním pufrem.

3.3.1 Primery a podmínky PCR pro gen *ABCG2*

Primery byly navrženy pro všechny exony transkriptu ENST00000650821:

| | primer F (5' → 3') | primer R (5' → 3') |
|---------|---------------------------|------------------------------|
| exon 2 | CTTATCACAATGGTATGGGC | GGCCCAGTTATTTCACTCC |
| exon 3 | TGCATGACCTGTTTTGTTT | CACGCAACTACAGTTATCCAC |
| exon 4 | AAACCATAGAATTTCTTGACCAG | CTGCCTTTTCACATAAGTGTC |
| exon 5 | ATGGAGTAACTGTCATTTGC | CACGTTCATATTATGTAACAAGCC |
| exon 6 | CTACTTTTTCTACCAGGTATCCAC | GCTTTGTTTTCTTGATAATG |
| exon 7 | TAGCTAAATAATATGAGATGAAAAG | TAGCACCAAATGGAACAAAC |
| exon 8 | CGTGGGAAGAAGAGAGAAAAG | CAACAGCACTCACAGACAAC |
| exon 9 | TGCCTGGCCTATTTTTTC | CCTTTATTTGTTCTGCTGACTG |
| exon 10 | AGGGACGTTGGCCAAG | TGGGCAACAGAGCATGAC |
| exon 11 | TCACGCTTCCCTGTTCC | ACCCCTATACATATTTTCAAACATC |
| exon 12 | GGCATGCATAGTGGGTC | AAAAATAGCTGACAGTGAACAAC |
| exon 13 | GAGGGTGGTTGGAGAGTG | GTATATTCTCTAACATAATCTATTCCAG |

| | | |
|---------|-------------------------|-------------------------|
| exon 14 | GCAGAGGAGAAGAGTTTAGTGAG | CAAGGCTAACAGGAAATTCTC |
| exon 15 | ACATTAGTTGGTTTGGTGAGAC | ATTCGCGCACAACCTCAC |
| exon 16 | ACACACAATGACTGTTAGCTATG | GGGTTCTTTCATGTTTAATTCAG |

Mix pro PCR reakci exonu 14:

| | |
|---|-------------|
| Aptamer Hot Start Master Mix (Top-Bio): | 10 μ l |
| Primery F a R: | 0,8 μ l |
| Voda: | 7,4 μ l |
| Genomová DNA: | 1 μ l |

Teplotní profily pro exony 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16:

1. 94 °C 5 min
2. 94 °C 30 s
3. x °C 30 s
 - 57 °C: exony 3, 4, 5, 7, 9, 12, 13
 - 61,4 °C: exony 2, 6, 8, 11, 16
 - 65 °C: exon 10
 - 62,5 °C: exon 14
4. 72 °C 1 min (opakování kroků 2 až 4 celkem 35x)
5. 72 °C 10 min
6. 4 °C

Teplotní profil pro exon 15:

1. 94 °C 2 min
2. 94 °C 15 s
3. 53,5 °C 15 s
4. 72 °C 30 s (opakování kroků 2 až 4 celkem 35x)
5. 72 °C 5 min
6. 4 °C

3.3.2 Primery a podmínky PCR pro gen *ABCC4*

Primery byly navrženy pro všechny exony transkriptu ENST00000645237:

| | primer F (5' → 3'): | primer R (5' → 3'): |
|---------|--------------------------|-------------------------|
| exon 1 | GTAGCTCTGGGCTCCCTTTG | GTAAGGGGTGCAGTCGCTTC |
| exon 2 | AAGCAAAACCCATGGAGGTAG | CCAGACAACCTCCTCCAACC |
| exon 3 | GGAGCCCTGGGAGCAATTAG | CGCACTCCTCAAGGCTGTAG |
| exon 4 | AGATGAGTGATGAATGTTGCACTT | TTGGCCTGATGCAAATAGCAAG |
| exon 5 | GCTGGTGGGGCAGAGAGA | TGCCCTGGAAAAATGATACCG |
| exon 6 | GGTCGGATTCTCTTGCGAGT | GGTCGGATTCTCTTGCGAGT |
| exon 7 | TGTGTTGTGCGAAGCAAAAAGC | ACAGTATTTCCATGCCTGTTTGG |
| exon 8 | GTAGTTCCTGGCCACCTCTC | GCATTGTCTTTACCGCGCTC |
| exon 9 | TTCCAACCAACTCCCGTGTTT | TCCATGCTGCACCCCTAGTC |
| exon 10 | CTGGTAAAAGGGAATGGGCCTT | CCATCCTGCATAGTGGTCACA |
| exon 11 | TGTCATGCTTGGCTACTCTGTT | TACTGGGAGGACCGCTTAAA |
| exon 12 | AGATAACGTGCCCTGACTGT | CTCACCAGGAACATGACAACCT |

| | | |
|---------|--------------------------|---------------------------|
| exon 13 | GTGTATTGCGTCCTGTGTGAAG | CCTCCCAAGAAAGCCCTATGT |
| exon 14 | TGGTTTTGAGGACCTAGCCG | GGGATACAAACAGGTCTTAGAGTC |
| exon 15 | TGTCAACTAGGATTCCGGACC | GGGGGCCACCAGACTAAGTA |
| exon 16 | TGGCTGGGTCCAAGGATTAG | AGTAGGCAGCCCTCACTTTG |
| exon 17 | GAGCTGGAAGAACTATGCGAGT | GATGCCGCGGATCAGACAT |
| exon 18 | GAGTGTAAACTGCGGTGGTCT | AACCACAGGGTGGAGATCCG |
| exon 19 | TCTTTTCTGTGCAGTTTCCATTAG | TTGCCTCACAGCAAATGGATTC |
| exon 20 | ACCCACCAACCTTCCTGATA | TCAAACCTAACCTGACGCGA |
| exon 21 | CTTTGTATGGAAAAGCAGTCCCTG | TCCACATGCTCTAAGGGACAC |
| exon 22 | GGACGTTTATTTCCAGGCC | CGATTCCGAGAGGAGTCCAAG |
| exon 23 | GTGTGTGGGCCTTCTGGTAA | CTACCCAACCTGACACATCGT |
| exon 24 | CATGAGTTCACCACCCAGT | CCTGCTGACAGAGCAACCATA |
| exon 25 | CTCGTCTGTCTCCTGCTCT | TGGAGGGGAAGAGAAGGACT |
| exon 26 | CTCAGATCCTGCAAGCAAAGC | TGCTCATAAAAACATGCTCTATTGG |
| exon 27 | GGTATTTTGGAGCACGCTTTGT | CACATCCTCAATGATCTCCTGGG |
| exon 28 | AGACTGTGTTTGCTGATGGTGA | GGAATCTAGCTCTCCTGGGATAC |
| exon 29 | TCTAAGTGCTCTGTTTGCCCC | TAGCACTGAGGGTGTAGTTAAGC |
| exon 30 | TCTATGAAACTGGCTCGGCA | TGCCGTTAAGACCCACTCAT |
| exon 31 | AGAAACCTCATGCAGACGC | GGCACAAAACCTGATAGACGG |

Mix pro PCR reakci exonu 4:

| | |
|-------------------------------|--------|
| Aptamer Hot Start Master Mix: | 10 µl |
| Primery F a R: | 0,8 µl |
| DMSO | 1 µl |
| Voda: | 6,4 µl |
| Genomová DNA: | 1 µl |

Teplotní profily pro jednotlivé exony:

1. 94 °C 5 min
2. 94 °C 30 s
3. x °C 30 s
 - 55,3 °C: exony 3, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 21, 22, 23, 25, 27, 28
 - 60,7 °C: exon 2
 - 62,4 °C: exon 4
 - 64 °C: exony 9, 19, 24, 26, 30, 31
 - 65,1 °C: exony 7
 - 66,3 °C: exony 1
 - 66,7 °C: exony 16, 18, 20, 29
4. 72 °C 1 min (opakování kroků 2 až 4 celkem 35x)
5. 72 °C 10 min
6. 4 °C

3.3.3 Primery a podmínky PCR pro gen *SLC22A12*

Primery byly navrženy pro všechny exony transkriptu ENST00000377574:

| | | |
|--------|------------------------------|------------------------------|
| | primer F (5' → 3'): | primer R (5' → 3'): |
| exon 1 | CCTCACGCGGCCTCAGGGCCAGTT | GGGTCCCTCCCAGGACTGGACCTTT |
| exon 2 | CCCTCACTGTTCCACAGGGTCTTGCTCT | CCAGCAAGTAGGGCGCTTTCTAGACTTG |

| | | |
|-------------|------------------------------|-------------------------------|
| exony 3 a 4 | CATAGGGTGGGCTCTAGGTGTTCCAGAG | GGAGAGTGGGCAGGATCTCCTCTGAGGA |
| exony 5 a 6 | GCCAGGCACTGGGGGCCACAGGCAAT | CCGTGTGCCAGCGAGAGCCCCGATT |
| exon 7 | GCCCCACCGCCATTGTTCC | CTCCGGCAGCCTCCTCCTACCAG |
| exon 8 | GCTGAAGGGAGCCCTCATCTGATCTTGG | TAGGTCTGGGAGAAGCCAGTCCCTGCCTG |
| exon 9 | GCCTGGCCCGCGTGCAGGATCAA | GCCTCTGCTCCGCCTCTGTCAA |
| exon 10 | CTGGGCCCCCGAGAGCA | GGGGCCCCTTGGACTGTGAG |

Primery pro exony 1, 2, 5 a 6, 7, 8, 10 navíc obsahují přesahující konce (tzv. overhangs), které mají sekvenci univerzálních primerů T7 (5' → 3': AATACGACTCACTATAG) a RP (5' → 3': GAAACAGCTATGACCATG). Z toho důvodu byly pro sekvenování používány primery T7 a RP.

Mix pro PCR reakce exonů 3 a 4, 9:

| | |
|------------------------------------|---------|
| LA Hot Start Master Mix (Top-Bio): | 12,5 µl |
| Primery F a R: | 1 µl |
| Voda: | 9,5 µl |
| Genomová DNA: | 1 µl |

Teplotní profily pro exony 1, 2, 3 a 4, 5 a 6, 7, 8, 9, 10:

1. 94 °C 5 min
2. 94 °C 30 s
3. x °C 30 s
 - 62 °C: exony 3 a 4, 9
 - 64 °C: exon 1
 - 66 °C: exony 2, 5 a 6, 7, 8, 10
4. 72 °C 1 min (opakování kroků 2 až 4 celkem 35x)
5. 72 °C 10 min
6. 4 °C

3.3.4 Primery a podmínky PCR pro gen *SLC2A9*

Z vyšetřovaných genů se pouze *SLC2A9* významně liší ve dvou transkriptech:

- ENST00000264784, obsahuje 12 exonů
- ENST00000506583, obsahuje 10 exonů (chybí exony 1 a 2, navíc se liší exon 3 od exonu 3 z transkriptu ENST00000264784)

Byly navrženy primery pro 12 exonů transkriptu ENST00000264784 a dále pro exon 3 transkriptu ENST00000506583 (zde označován jako exon 3 varianta 2).

| | primer F (5' → 3'): | primer R (5' → 3'): |
|--------|-----------------------|-------------------------|
| exon 1 | TTTGACTGTTTCATTGCTGT | CCCAGATCCCCAGCTACAC |
| exon 2 | CTTGCGTCTCTTCTCTGTGTC | GAGTGGGGGCTAATCTCTGTGTC |
| exon 3 | GCCAATGAGATAAAGCTCAAA | CCTTTGGGCATTTGAATCTCT |
| exon 4 | GTGCCTGAGTCTTGCTCTACT | AGAGTTCAGCATCCTTGGTCT |
| exon 5 | TTGTGCTAAGTGCTGGGAAA | TAAGAGGCTTGAATACCAGAA |
| exon 6 | AGTTCCTCCCTCAGCCTTTG | CCCTATGATACCCAGCCCAGT |
| exon 7 | TAAGGTGTGTGGCTAGGAGGT | ACAGCATAGAGTTTGTGGCAAT |
| exon 8 | CACCTTGGGACTCTGAGTTTA | TGTGCCTTAAAGGACCTTATG |
| exon 9 | GTCTCAGGGTCAAAGCCGGTT | CCCCAAAACGATGAAGCCAGA |

| | | |
|-------------------|-----------------------|------------------------|
| exon 10 | GGGGACATCAAGTGACCTGTC | ATCCCCAGTCAGGCTTTGCTT |
| exon 11 | TGGGGGGGTTCTAAAGTGTG | TCCAGTTGAGAGGAGAGAGATC |
| exon 12 | TGGTGTTTTGTCTAGGAGTAT | ATAGAAGAACGCTGGGTCTAC |
| exon 3 varianta 2 | CTGTGTCCTATCCTGGCATCC | CTGCTGCTCACTCTTTTCTCT |

Teplotní profily pro jednotlivé exony:

1. 94 °C 5 min
2. 94 °C 30 s
3. 58 °C 30 s
 - 58 °C: exony 1, 2, 10
 - 62 °C: exony 3, 4, 5, 6, 7, 8, exon 3 varianta 2
 - 64 °C: exon 12
 - 66 °C: exony 9, 11
4. 72 °C 1 min (opakování kroků 2 až 4 celkem 35x)
5. 72 °C 10 min
6. 4 °C

3.3.5 Primery a podmínky PCR pro gen *SLC22A11*

Primery byly navrženy pro všechny exony transkriptu ENST00000301891:

| | primer F (5' → 3'): | primer R (5' → 3'): |
|-------------|------------------------|------------------------|
| exon 1 | GGACTGAGGGACTGACTCAACT | GGCCCCATCTGTAGACTGATCC |
| exon 2 | CTCTACCTCTGTGACCTGGC | GAAACAGAGGAGGCAGGAGG |
| exony 3 a 4 | CAAGAAGGAGGAGCTGGCTG | CTGCAACACTTAGCCCAGGA |
| exon 5 | TTATTCTGAAACCGCTGGGGAC | ATGATCCCTCAGTGCACGTCCT |
| exon 6 | AGAGTGAAGATGGGGTCGGA | TCCAGACAGAAATGCACCC |
| exon 7 | GTGTGTGAAGGGATGGTGGA | AGAGAGGGATTCCAGGTCCTC |
| exon 8 | CTATGCTCTGTCCCCCAACC | CTGCTTCTGTCTGGGTGCGAG |
| exon 9 | GAGAAGCCCTTAAGTTGCCCA | TGATCACTTCTACCCATGAGAC |
| exon 10 | CGGAGAAGCTGGGACTTCAT | GGGGTGAGATTGGAACCCAG |

Teplotní profil pro jednotlivé exony:

1. 94 °C 5 min
2. 94 °C 30 s
3. x °C 30 s
 - 61 °C: exony 3 a 4, 5, 6, 8
 - 65 °C: exony 1, 2, 7, 9, 10
4. 72 °C 1 min (opakování kroků 2 až 4 celkem 35x)
5. 72 °C 10 min
6. 4 °C

3.3.6 Primery a podmínky PCR pro gen *SLC22A13*

Primery byly navrženy pro všechny exony transkriptu ENST00000311856:

| | primer F (5' → 3'): | primer R (5' → 3'): |
|-------------|----------------------|----------------------|
| exon 1 | AGCAAGTTCCCAGAGCCAAG | ACCAGCAAAAGGACAAGCCT |
| exony 2 a 3 | GACAGGTGGTGTAGGGCTTG | CCAGTGCGACCACTTCAGAT |
| exon 4 | TCCCCCTTATGCCCTTACA | AACCCACCACAACACAACCT |

| | | |
|--------------|------------------------|-----------------------|
| exony 5 a 6 | GTGTGGGGTTCAGTTTGCAC | GAGACCATCCCAGCCAAACA |
| exon 7 | TGCTGTGACTGCTGACCAAG | CGGGAAGCCTTTACTCCTGG |
| exon 8 | TTCTGCTTCCAGGAGTAAAGGC | GCAAGCTAAGTAGACCTGGGC |
| exony 9 a 10 | GTCTGGACTCTCCCCAGGAA | CAGATTGTGGTGTCTGCCT |

Teplotní profil pro jednotlivé exony:

1. 94 °C 5 min
2. 94 °C 30 s
3. x °C 30 s
 - 62 °C: exony 1, 4
 - 64 °C: exony 2 a 3, 5 a 6, 7, 8, 9 a 10
4. 72 °C 1 min (opakování kroků 2 až 4 celkem 35x)
5. 72 °C 10 min
6. 4 °C

3.3.7 Primery a podmínky PCR pro gen *SLC17A1*

Primery byly navrženy pro všechny exony transkriptu ENST00000244527:

| | primer F (5' → 3') | primer R (5' → 3') |
|--------------|---------------------------|-------------------------|
| exon 2 | ATGGAGGTGAATGGGCACTG | GTCCAAGAATGCAGGGACTCA |
| exon 3 | GGGCTCCAAATTTCTGAATGTCC | AGAAGGATTTACACAACAAGCCC |
| exony 4 a 5 | GGGGAGCTACTTTCCATGAGG | TGATTTCCAAAGCCCCTTGACC |
| exon 6 | AGCATTCTTGCTATGAAGATGAGAG | TCTCTTTCACTCAGTGGAGTTCA |
| exony 7 a 8 | GAGGGGTCCCTGTGGATAAAAG | TGCGACTAGGGTCGTTAGAGA |
| exony 9 a 10 | GGTAATGTGGTCCCAGCAGTAAT | GCTAAGTGTGTGAGGTAATGCA |
| exon 11 | AACGCCAACCTTTCTGACTCT | TCCTTCTGGCATCTTCTCTGC |
| exon 12 | ATGATGACGTTTTTCGGCTATGT | ATGATGACGTTTTTCGGCTATGT |

Teplotní profil pro jednotlivé exony:

1. 94 °C 5 min
2. 94 °C 30 s
3. x °C 30 s
 - 59 °C: exony 3, 9 a 10
 - 60 °C: exon 6
 - 62 °C: exony 2, 4 a 5, 7 a 8, 11, 12
4. 72 °C 1 min (opakování kroků 2 až 4 celkem 35x)
5. 72 °C 10 min
6. 4 °C

3.3.8 Primery a podmínky PCR pro gen *SLC17A3*

Primery byly navrženy pro všechny exony transkriptu ENST00000397060:

| | primer F (5' → 3') | primer R (5' → 3') |
|-------------|-----------------------|----------------------|
| exon 2 | ACTGGCACACCAAGAGCAC | GCAATCACAAGCAGGACA |
| exon 3 | CAGAACCCCCGAGATCAA | TCCAAGCAAATAAACAGCAA |
| exony 4 a 5 | TTGAAAGCAAGCAAAAAGGTC | CATTGAGCAGATGATGAGGA |
| exon 6 | TGCTCGTCTCCTTATGGTTT | AGGCAGGAGAACTTCCAAA |
| exon 7 | GTGTGGTGCCACTTCTAGGC | CCAGATTTAAGGCCTCAAGA |

| | | |
|--------------|------------------------|------------------------|
| exon 8 | CATCTGTCGGATTTACCGTT | TGGAATGATTAGTGAGGGCA |
| exony 9 a 10 | GTTGTGGTCTCACTGCCTTT | TGTGGTTCTTCCCCTATGGT |
| exon 11 | GGGGAAGAACCACAGATAGACC | ATTGCCCAAACATAGCAGGTTG |
| exon 12 | AGCCACTTTCAGGAAATGAA | CCATCCAAGGTGGGATAACT |

Teplotní profil pro jednotlivé exony:

1. 94 °C 5 min
2. 94 °C 30 s
3. x °C 30 s
 - 51,2 °C: exon 3
 - 58 °C: exony 4 a 5, 6
 - 62 °C: exony 8 a 12
 - 63 °C: exony 9 a 10, 11
 - 65,5 °C: exony 2, 7
4. 72 °C 1 min (opakování kroků 2 až 4 celkem 35x)
5. 72 °C 10 min
6. 4 °C

3.3.9 Primery a podmínky PCR pro gen *SLC22A6*

Primery byly navrženy pro všechny exony transkriptu ENST00000377871:

| | primer F (5' → 3'): | primer R (5' → 3'): |
|-------------|-----------------------|------------------------|
| exon 1 | CTCCAGCGAAGGACAGCAG | GGGTCCATGTCACCCTCTTC |
| exon 2 | CAAGATGGGAAGATGGGGGC | GGGAGGAGGGGAGACTTGTA |
| exon 3 | CTACAGCACCAGCCTCATACT | TGTTCTATTGGCAGGAAGGTGA |
| exon 4 | CATCACCTGGCACTCAACT | ACACAGAGGCATTGGACTGG |
| exony 5 a 6 | GCCTCGTGGTCCTAGAGAGA | CCCTAGTGTGGGGTTACTGC |
| exony 7 a 8 | TAGCCAAGGCAGATTCCAGC | TGAGGTGTGTACTCAGTGGC |
| exon 9 | GAGAGGAGGTACCGGGAGTG | CTCAGCTATGCCTGGACACC |
| exon 10 | CTCTGTGTCCCTTTGTCCCC | CTTCCTCCTCCTTGTGTGGG |

Teplotní profil pro jednotlivé exony:

1. 94 °C 5 min
2. 94 °C 30 s
3. x °C 30 s
 - 62 °C: exony 1, 2, 3, 4, 5 a 6, 9
 - 63,2 °C: exony 7 a 8, 10
4. 72 °C 1 min (opakování kroků 2 až 4 celkem 35x)
5. 72 °C 10 min
6. 4 °C

3.3.10 Primery a podmínky PCR pro gen *SLC22A8*

Primery byly navrženy pro všechny exony transkriptu ENST00000336232:

| | primer F (5' → 3'): | primer R (5' → 3'): |
|--------|-----------------------|------------------------|
| exon 1 | ACGCACTACCAGGCACAAATA | AGACCCCAGCCTCCTCTG |
| exon 2 | CCGAAGAGCCACAGACAAAC | GATTCCAGTTGTAAGGGCTTTG |

| | | |
|--------------|-------------------------|--------------------------|
| exon 3 | CTGAGGCGGATGTAGAGGAG | AGAGTGTCAGGTCCAGGGTAAG |
| exon 4 | GAGTCCTATCGCCTTGAGCC | ATCCCGTCCACCTCCACTTA |
| exon 5 | GAGAACACTGGAATTTGTGCTG | CTAGTGGGCAGGACGAAGAG |
| exon 6 | GGCTCACAGCCTATAACCACATC | CCAGGAGAGGGGATTCTCTG |
| exon 7 | TGGCACAAGAAGTGAAGCTATT | CACAGTGACTIONAGAGGCAGAGC |
| exon 8 | CAGCTTTAAGTTTGGATCTGAGC | GAGTAGGGATTGGTAGCCTGTG |
| exony 9 a 10 | ACACAGGTCAGGTGGGACTGT | ATATGGGGCCTCCCTATACTCCTA |

Teplotní profil pro jednotlivé exony:

1. 94 °C 5 min
2. 94 °C 30 s
3. x °C 30 s
 - 54 °C: exon 4
 - 55,6 °C: exony 9 a 10
 - 59,3 °C: exony 1, 2, 3, 6
 - 61,8 °C: exon 5, 8
 - 66 °C: exon 7
4. 72 °C 1 min (opakování kroků 2 až 4 celkem 35x)
5. 72 °C 10 min
6. 4 °C

3.4 Sekvenování

K analýze PCR produktů jsme používali kapilární sekvenátor Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific). Tento přístroj využívá metodu Sangerova sekvenování, kterou zveřejnil v roce 1977 Frederick Sanger a jeho tým (Sanger et al. 1977). Principem této metody je, že do reakční směsi primerů a DNA polymerázy jsou přidány kromě standardních nukleových bází (deoxyribonukleotidtrifosfátů) i pozměněné dideoxyribonukleotidtrifosfáty. Tyto modifikované nukleotidy neobsahují na rozdíl od běžných nukleových bází 3'OH skupinu, která je potřeba k vytvoření další fosfodiesterové vazby, což vede k zástavě elongace řetězce DNA. Vznikají různě dlouhé fragmenty, které jsou ukončeny značenými dideoxyribonukleotidtrifosfáty. Sekvence DNA je určena analýzou těchto fragmentů pomocí kapilární elektroforézy v sekvenátoru.

Pro sekvenační reakci jsme používali komerční kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) a postupovali jsme podle návodu od výrobce. Tento kit obsahuje všechny složky, které jsou nutné pro Sangerovo sekvenování, s výjimkou PCR produktů a sekvenačních primerů. Experimentálně jsme zjistili, jestli je pro daný PCR produkt lepší používat primer F nebo primer R. Pokud byl PCR produkt delší než 700 párů bází nebo pokud jsme potřebovali ověřit přítomnost vzácné genetické varianty, tak jsme používali oba primery ve dvou sekvenačních reakcích.

Sekvenační produkty je třeba očistit od zbytků primerů, nukleotidů, barviv a dalších nečistot, k čemuž jsme používali komerční destičky CentriPure Dye Terminator - 96-well plates (Genaxxon bioscience). Tyto destičky obsahují dextranový gel, který zachytává

nečistoty a propouští pouze vodu a sekvenační produkty. Postupovali jsme podle návodu výrobce.

Takto přečištěné sekvenační produkty již bylo možné analyzovat v sekvenátoru Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer s elektroforetickými kapilárami o délce 50 cm.

3.5 Hodnocení nalezených variant

Sekvence jsme analyzovali pomocí softwaru Lasergene (DNASTAR), který umožňuje porovnat analyzované sekvence s referenčními sekvencemi daného úseku.

Genetické varianty lze obecně rozdělit na (Eichler 2019; Howe et al. 2021):

A. Jednonukleotidové varianty (single-nucleotide variants, SNV)

Mohou být označovány také jako jednonukleotidové polymorfismy (single-nucleotide polymorphism, SNP), pokud je známo, že se vyskytují alespoň u 1 % jedinců v populaci.

Tyto substituce jednoho páru bází lze dále rozdělit na:

1. SNV vyskytující se v nekódující oblasti genu
Některé SNV v intronu mohou vést k alternativnímu sestříhu.
2. SNV vyskytující se v kódující oblasti genu:
 - a. Nesynonymní SNV
 - i. Missense záměny (vedou k záměně aminokyseliny)
 - ii. Nonsense záměny (vedou ke vzniku nového stop kodonu)
 - b. Synonymní SNV (nedochází k záměně aminokyseliny)

B. Krátké inserce a delece (délka 1 až 49 bp)

C. Strukturální variace (rozsáhlé, délka nad 50 bp)

1. Inzerce
2. Delece
3. Inverze
4. Variabilita počtu kopií (copy number variation, CNV)

U genů kódujících urátové transportéry jsme nacházeli především jednonukleotidové varianty (převážně intronové, synonymní a nesynonymní missense záměny) a krátké delece. Genetické varianty přítomné v analyzovaných sekvencích jsme určovali s využitím databáze NCBI - National Center for Biotechnology Information (Agarwala et al. 2018). Po zadání sekvence lze vyhledat přesnou pozici varianty v daném genu, včetně jejího identifikačního kódu a dalších informací. Podrobnější informace k variantám lze dohledat například v databázi Ensembl (Howe et al. 2021).

3.5.1 Určení minoritní alelické frekvence

U jednotlivých variant jsme počítali minoritní alelickou frekvenci (MAF) v kohortě, kterou jsme porovnali s údaji v databázích, ve kterých lze najít MAF pro jednotlivé populace (například pro evropskou populaci), stejně jako souhrnnou celosvětovou MAF. Mezi tyto

databáze patří například Ensembl (Howe et al. 2021) nebo NCBI dbSNP (Agarwala et al. 2018), které sdružují data z různých zdrojů (jako je ExAC, 1000Genomes, gnomAD, NHLBI Exome Sequencing Project). V případě vybraných variant jsme MAF v kohortě pacientů se dnou a hyperurikémií porovnali s MAF v kontrolní kohortě z běžné populace (viz kapitola 3.6 Vyšetření u kontrolní skupiny z běžné populace).

3.5.2 Predikce funkčního dopadu variant

Predikční programy jsme používali především k analýze variant, které zatím nebyly uvedeny v dostupných genetických databázích nebo u kterých nebyly v literatuře nalezeny žádné podrobnosti ani závěry z funkčních studií. Tyto programy se zaměřují na odhad funkčnosti proteinu se zaměřenou aminokyselinou, slouží tedy k analýze nesynonymních jednonukleotidových variant. Patří mezi ně například PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), Provean (<http://provean.jcvi.org/index.php>), SIFT (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>), Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>) či MutPred (<http://mutpred.mutdb.org/>). Tyto programy přiřazují k variantám skóre a slovní hodnocení, zda se jedná o variantu benigní, nebo poškozující (způsobující onemocnění). K hodnocení možného dopadu varianty na sestřih proteinu lze použít například program Human Splicing Finder (www.umd.be/HSF3) či Splice Site Prediction (https://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html).

3.5.3 Porovnání alelické frekvence ve vyšetřované kohortě a v evropské populaci

Pro hodnocení genetických variant jsme předpokládali nulovou hypotézu, že naše data (tedy alelická frekvence variant) v kohortě jedinců s hyperurikémií a dnou vznikla výběrem z evropské populace, která je definována alelickými frekvencemi pro jednotlivé genetické varianty. Pomocí binomického testu jsme tedy u jednotlivých variant zjišťovali, zda by mohly být rozdíly mezi alelickou frekvencí v naší kohortě a alelickou frekvencí v evropské populaci větší, než jaké by se daly čekat v důsledku náhodné variability. Za statisticky významnou jsme považovali p-hodnotu $\leq 0,0005$, kterou jsme na základě výsledků binomického testu stanovovali pomocí oboustranného Z-testu.

3.5.4 Topologické modely

Některé polymorfismy se mohou vyskytovat v oblastech polypeptidového řetězce, které jsou důležité pro transportní funkci proteinu. Jedná se například o ATP-vazebné domény ABC proteinů či oblasti časté fosforylace. Lokalizace nesynonymní varianty ve funkčně významném místě může naznačit negativní dopad na funkci proteinu. Zajímalo nás tedy umístění identifikovaných alelických variant ve struktuře konkrétního proteinu, pro což jsme použili program TOPO2, neboli Transmembrane protein display software (Johns 2021). K vytvoření předpokládané sekundární struktury je třeba v tomto programu zadat veškerá vstupní data týkající se daného proteinu, tedy aminokyselinovou sekvenci, umístění N-konce

proteinu (intracelulárně nebo extracelulárně), typ a počet jednotlivých domén včetně příslušných aminokyselin – tyto informace jsme získali z veřejně přístupné databáze UniProt a v případě nejasností také z odborné literatury věnované příslušným proteinům (Bateman et al. 2021). Pomocí programu TOPO2 lze barevně odlišit požadované oblasti, čehož jsme využili ke znázornění identifikovaných alelických variant a ATP-vazebné domény.

3.5.6 Funkční studie

U proteinů, které mají v důsledku alelické varianty pozměněný aminokyselinový řetězec, lze vliv na transport kyseliny močové částečně odhadnout pomocí výše uvedených predikčních programů. Mnohem přesnější odpověď však přinášejí funkční studie zaměřené na míru exprese proteinu a schopnost přenosu urátu, které u vybraných variant prováděli naši kolegové z Katedry buněčné biologie Přírodovědecké fakulty UK a z Oddělení farmacie Tokijské univerzity. V genu *ABCG2* se zaměřili na delecii p.K360del (*rs750972998*) a na vzácné nesynonymní varianty p.R147W (*rs372192400*), p.T153M (*rs753759474*), p.F373C (*rs752626614*), p.T421A (*rs199854112*), p.T434M (*rs769734146*), p.S476P, p.S572R (*rs200894058*) a p.D620N (*rs34783571*) (Toyoda et al. 2019) (viz Příloha 4). V genu *SLC2A9* byly zkoumány nesynonymní varianty p.A17T (*rs6820230*), p.G25R (*rs2276961*), p.T275M (*rs112404957*), p.D281H (*rs73225891*), p.V282I (*rs16890979*), p.R294H (*rs3733591*) a p.P350L (*rs2280205*) (Hurba et al. 2014).

3.6 Vyšetření u kontrolní kohorty

U kontrolní kohorty z běžné populace jsme vyšetřovali přítomnost vybraných variant, které již byly detekovány sekvenováním u pacientů s primární hyperurikémií a dnou. Zaměřovali jsme se především na časté i vzácné nesynonymní varianty v genu *ABCG2* a vzácné varianty v dalších genech:

- Gen *ABCG2*: varianty p.V12M (*rs2231137*), p.Q141K (*rs2231142*), p.R147W (*rs372192400*), p.T153M (*rs753759474*), p.F373C (*rs752626614*), p.T421A (*rs199854112*), p.T434M (*rs769734146*), p.S476P, p.S572R (*rs200894058*) a p.D620N (*rs34783571*)
- Gen *SLC22A11*: varianty p.V202M (*rs201209258*) a p.R343L (*rs75933978*)
- Gen *SLC22A13*: varianty p.R16H (*rs72542450*) a p.R102H (*rs113229654*)
- Gen *SLC22A6*: varianta p.P104L (*rs11568627*)
- Gen *SLC22A8*: varianty p.R149C (*rs45566039*), p.V448I (*rs11568486*) a p.R513Q (*rs145474422*)

Všechny uvedené varianty byly s výjimkou p.D620N vyšetřeny metodou tetra-primer ARMS-PCR. Pro analýzu p.D620N byla použita metoda RFLP-PCR, jelikož se nám u této varianty nepodařilo optimalizovat podmínky tetra-primer ARMS-PCR reakce.

3.6.1 Metoda tetra-primer ARMS-PCR

Metoda tetra-primer ARMS-PCR (amplifikační refrakterní mutační systém, amplification refractory mutation systém, ARMS) byla převzata z článku s názvem „An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms“ (Ye et al. 2001). Tato metoda umožňuje amplifikovat obě varianty dané alely v jedné PCR reakci. V reakční směsi se používají dva páry primerů, které jsme pro vybrané nesynonymní varianty navrhli pomocí programu PRIMER1 (<http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html>). Dále jsme provedli gelovou elektroforézu, pomocí které šlo odlišit přítomnost vyšetřované varianty od standardní alely (tzv. divoký typ, z anglického „wild type“, zkratka wt). Podle velikosti PCR produktů a jejich počtu lze také rozlišit, jestli je daná varianta homozygotní (dva PCR produkty), nebo heterozygotní (tři PCR produkty). Při analýze vzorků z kontrolní populace jsme zároveň vždy vyšetřovali vzorek od pacienta s příslušnou variantou.

3.6.2 Metoda RFLP-PCR

Metoda RFLP-PCR (polymorfismus délky restrikčních fragmentů, restriction fragment length polymorphism, RFLP) je založena na použití restrikční endonukleázy k detekci jednonukleotidových variant nebo krátkých delecí a inzercí. Je třeba vybrat takový restrikční enzym, aby se jím rozpoznávaná sekvence nacházela v místě výskytu dané varianty a aby šlo štěpením od sebe odlišit standardní alelu od varianty.

Tuto metodu jsme použili pro analýzu varianty p.D620N, která se nachází v exonu 16 genu *ABCG2*. Nejprve bylo nutné provést amplifikaci exonu 16 pomocí specifických primerů. Pro štěpení PCR produktů jsme používali enzym *Mbo* I, jehož restrikční místa jsou:

5' ... ▼ GATC ... 3'

3' ... CTAG ▲ ... 5'

K analýze fragmentů byla použita gelová elektroforéza. Pro kontrolu byl analyzován i vzorek DNA od pacienta s variantou p.D620N.

3.7 Vyšetření komplementární DNA

Komplementární DNA (cDNA) jsme vyšetřovali v případech, kdy nebylo možné sekvenováním genomové DNA s jistotou rozpoznat genetickou variantu, typicky se to stávalo při výskytu delecí a inzercí a v genech *SLC22A12*, *SLC2A9* a *ABCG2*. Vyšetření jsme používali i u variant lokalizovaných v exon-intronových rozhraních k posouzení možného dopadu na sestřih proteinu. Komplementární DNA, která vzniká reverzní transkripcí, jsme mohli tímto způsobem vyšetřit pouze u genů kódujících proteiny, které jsou exprimovány v krvi (protein URAT1 kódovaný genem *SLC22A12* je exprimován výhradně v ledvinách). Pro PCR a sekvenování cDNA genů *SLC2A9* a *ABCG2* jsme navrhli primery obdobným způsobem jako primery pro jednotlivé exony.

Nejprve bylo třeba izolovat RNA z periferní krve, k čemuž jsme používali dva různé kity. Prvním kitem byl PAXgene Blood RNA Kits (Qiagen), jehož součástí jsou speciální

zkumavky pro odběr krve PAXgene Blood RNA Tubes (Qiagen), které stabilizují buněčnou RNA. Postupovali jsme podle návodu výrobce. Principem metody je selektivní vazba RNA na křemičitou membránu. Druhým používaným kitem byl Hybrid-R Blood RNA (GeneAll), který je založený na stabilizaci a lýze buněk pomocí speciálního roztoku a následně na vazbě RNA na speciální membránu se skleněnými vlákny. Opět jsme postupovali podle přiloženého návodu. Kit Hybrid-R Blood RNA má v porovnání s kitem PAXgene Blood RNA Kits nižší výtěžek, jelikož je RNA izolována z menšího objemu krve. Mezi jeho výhody však patří rychlejší izolace a možnost izolovat RNA z krve odebrané do běžně používaných typů zkumavek.

Po izolaci RNA následoval její přepis do cDNA, k čemuž jsme používali komerční kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems). Do doby následné analýzy pomocí PCR amplifikace a sekvenování jsme cDNA uchovávali při teplotě -20 °C.

4. Výsledky

4.1 Charakteristika kohorty

Ve vyšetřované kohortě bylo zařazeno celkem 250 pacientů, z toho 68 jedinců s primární hyperurikémií a 182 jedinců s primární dnou. Diagnostika proběhla dle klasifikačních kritérií definovaných následujícími odbornými organizacemi: American College of Rheumatology (ACR) Board of Directors, the European League Against Rheumatism (EULAR) Executive Committee (Neogi et al. 2015).

Žen bylo v této kohortě 36 (konkrétně 20 pacientek s primární hyperurikémií a 16 pacientek s primární dnou) a mužů bylo ve vyšetřované kohortě 214 (konkrétně 48 pacientů s primární hyperurikémií a 166 pacientů s primární dnou). Pokud jde o komorbidity, tak se u 14 jedinců vyskytovalo nefrologické onemocnění, u 28 pacientů *diabetes mellitus*, u šesti lidí psoriáza a u dvou pacientů maligní onemocnění. Hypertenze byla zjištěna u 98 jedinců. U 97 pacientů se v rodinné anamnéze vyskytovala dna. V okamžiku zařazení do kohorty bylo léčeno alopurinolem 175 pacientů, febuxostatem 17 jedinců a bez urikostatické léčby bylo 58 pacientů. Další charakteristika kohorty je uvedena v následující tabulce.

Tabulka 4.1 - Základní klinická a biochemická charakteristika kohorty

| | referenční hodnoty | medián | interkvartilové rozpětí | rozsah hodnot |
|---|--|--------|-------------------------|---------------|
| věk prvního nálezu hyperurikémie | | 40 | 28 | 6 – 84 |
| věk prvních příznaků dny | | 41,5 | 25,25 | 6 – 84 |
| BMI | norma 18,5 – 25 | 28,62 | 5,86 | 15,95 – 50,01 |
| kyselina močová v séru (bez léčby) | děti od 1 roku do 15 let 120 – 340 $\mu\text{mol/l}$ | 454 | 120,5 | 103 – 683 |
| kyselina močová v séru (s léčbou) | ženy 120 – 340 $\mu\text{mol/l}$ muži 120 – 420 $\mu\text{mol/l}$ | 374 | 134,25 | 163 – 808 |
| kreatinin v séru | ženy 60 – 100 $\mu\text{mol/l}$ muži 70 – 110 $\mu\text{mol/l}$ | 82 | 21 | 26 – 226 |
| močovina v séru | ženy 2,5 – 6,7 mmol/l muži 3,2 – 7,4 mmol/l | 5,1 | 2,1 | 2,1 – 83 |
| frakční exkrece kyseliny močové | ženy 6 – 20 % muži 6 – 12 % | 3,51 | 1,74 | 0,75 – 36,01 |
| C-reaktivní protein | 0 – 5 mg/l | 2,58 | 4,68 | 0,16 – 224,4 |
| glukóza v séru | 3,9 – 5,9 mmol/l | 5,3 | 0,85 | 3,3 – 9,6 |
| bilirubin | 2,0 – 17,0 $\mu\text{mol/l}$ | 11,35 | 6,83 | 4,4 – 32,8 |
| alkalická fosfatáza | ženy 0,7 – 2,1 $\mu\text{kat/l}$ muži 0,9 – 2,2 $\mu\text{kat/l}$ | 1,33 | 0,53 | 0,67 – 7,19 |
| vápník v séru | 2,10 – 2,55 mmol/l | 2,45 | 0,15 | 1,94 – 2,81 |

| | | | | |
|------------------------|--|-------|-------|-------------|
| fosfor v séru | 0,74 – 1,52 mmol/l | 1,12 | 0,28 | 0,68 – 1,92 |
| HDL-cholesterol | ženy 1,2 – 2,7 mmol/l muži 1 – 2,1 mmol/l | 1,25 | 0,35 | 0,61 – 6,08 |
| LDL-cholesterol | 1,2 – 3 mmol/l | 2,95 | 1,27 | 0,09 – 5,6 |
| vitamin D | 75 – 250 nmol/l | 46,35 | 30,58 | 11 – 130 |

V tabulce je u vybraných klinických a biochemických parametrů uveden medián a také interkvartilové rozpětí, které charakterizuje míru variability. Značné rozdíly jsou patrné v hodnotách kyseliny močové v závislosti na urikostatické léčbě, která byla u pacientů na 72 hodin přerušena pro vyloučení vzácných enzymopatií vedoucích k nadprodukci kyseliny močové (podrobnosti jsou uvedené v kapitole 3.1.1. Kohorta pacientů s primární hyperurikémií a dnou). Z výsledků dále vyplývá, že mediány frakční exkrece kyseliny močové a vitamínu D jsou nižší než referenční rozmezí.

4.2 Geny urátových transportérů

4.2.1 Gen *ABCG2*

Ve vyšetřované kohortě se vyskytovaly dvě časté nesynonymní varianty p.V12M (*rs2231137*) a p.Q141K (*rs2231142*). Kromě toho jsme detekovali také osm vzácných nesynonymních variant: p.R147W (*rs372192400*), p.T153M (*rs753759474*), p.F373C (*rs752626614*), p.T421A (*rs199854112*), p.T434M (*rs769734146*), p.S476P, p.S572R (*rs200894058*) a p.D620N (*rs34783571*). Varianta p.S476P není doposud uvedena v databázích Ensembl a NCBI. V kódující části genu jsme dále našli tříbázovou delecí p.K360del (*rs750972998*) a dvě synonymní varianty p.S65S (*rs369630458*) a p.E366E (*rs35622453*). V intronech jsme detekovali 19 variant, z toho 16 jednonukleotidových záměn, dvě krátké delece a jednu krátkou inzerci. Jednonukleotidová záměna c.689+1G>A (*rs757389397*) pravděpodobně vede vzhledem ke svému umístění (první báze vedle exonu) k alternativnímu sestřihu.

Tabulka 4.2 - Výsledky sekvenování genu *ABCG2*

| Referenční označení varianty | Změna kódující sekvence | Změna proteinové sekvence | Alelická frekvence v evropské populaci | Alelická frekvence ve světové populaci | Alelická frekvence v naší kohortě | Počet jedinců: wild type / heterozygotní / homozygotní |
|------------------------------|-------------------------|---------------------------|--|--|-----------------------------------|--|
| <i>rs2231137</i> | c.34G>A | p.V12M | 0,061 | 0,158 | 0,018 | 241 / 9 / 0 |
| <i>rs2231142</i> | c.421C>A | p.Q141K | 0,094 | 0,119 | 0,238 | 147 / 87 / 16 |
| <i>rs372192400</i> | c.439C>T | p.R147W | < 0,001 | < 0,001 | 0,002 | 249 / 1 / 0 |
| <i>rs753759474</i> | c.458C>T | p.T153M | < 0,001 | < 0,001 | 0,002 | 249 / 1 / 0 |
| <i>rs750972998</i> | c.1079_1081delAGA | p.K360del | < 0,001 | < 0,001 | 0,002 | 249 / 1 / 0 |
| <i>rs752626614</i> | c.1118T>G | p.F373C | < 0,001 | < 0,001 | 0,002 | 249 / 1 / 0 |
| <i>rs199854112</i> | c.1261A>G | p.T421A | < 0,001 | < 0,001 | 0,002 | 249 / 1 / 0 |
| <i>rs769734146</i> | c.1301C>T | p.T434M | < 0,001 | < 0,001 | 0,004 | 248 / 2 / 0 |
| N/A | c.1426T>C | p.S476P | N/A | N/A | 0,002 | 249 / 1 / 0 |

| | | | | | | |
|-------------|-----------------------|---------|---------|---------|-------|----------------|
| rs200894058 | c.1714A>C | p.S572R | <0,001 | <0,001 | 0,002 | 249 / 1 / 0 |
| rs34783571 | c.1858G>A | p.D620N | 0,004 | 0,003 | 0,004 | 248 / 2 / 0 |
| rs369630458 | c.195G>A | p.S65S | < 0,001 | < 0,001 | 0,002 | 249 / 1 / 0 |
| rs35622453 | c.1098G>A | p.E366E | 0,008 | 0,014 | 0,002 | 249 / 1 / 0 |
| rs4148152 | c.203+36A>G | ---- | 0,061 | 0,155 | 0,018 | 241 / 9 / 0 |
| rs2231138 | c.263+10A>G | ---- | 0,044 | 0,091 | 0,02 | 240 / 10 / 0 |
| rs5860119 | c.263+71_263+72insT | ---- | 0,014 | 0,033 | 0,006 | 247 / 3 / 0 |
| rs3219193 | c.264-72G>A | ---- | 0,004 | 0,001 | 0,002 | 249 / 1 / 0 |
| rs2231144 | c.532-16A>G | ---- | 0,019 | 0,14 | 0,01 | 245 / 5 / 0 |
| rs757389397 | c.689+1G>A | ---- | < 0,001 | < 0,001 | 0,002 | 249 / 1 / 0 |
| rs529343441 | c.689+67_689+69delGGG | ---- | 0,004 | 0,001 | 0,002 | 249 / 1 / 0 |
| rs753256449 | c.690-19_690-17delTGT | ---- | < 0,001 | < 0,001 | 0,002 | 249 / 1 / 0 |
| rs185332632 | c.842-84T>G | ---- | 0,007 | 0,002 | 0,002 | 249 / 1 / 0 |
| rs2231148 | c.1195-60A>T | ---- | 0,401 | 0,219 | 0,194 | 166 / 71 / 13 |
| rs2231153 | c.1367+20G>A | ---- | 0,945 | 0,672 | 0,978 | 0 / 11 / 239 |
| rs2231156 | c.1492+49G>T | ---- | 0,073 | 0,101 | 0,172 | 172 / 70 / 8 |
| rs2231155 | c.1492+38G>A | ---- | 0,006 | 0,054 | 0,006 | 247 / 3 / 0 |
| rs199473697 | c.1492+137G>T | ---- | 0,003 | 0,003 | 0,002 | 249 / 1 / 0 |
| rs6413443 | c.1492+77T>C | ---- | 0,008 | 0,002 | 0,002 | 249 / 1 / 0 |
| rs2231157 | c.1647+40T>C | ---- | 0,439 | 0,31 | 0,366 | 107 / 103 / 40 |
| rs2231162 | c.1648-21T>C | ---- | 0,952 | 0,758 | 0,94 | 9 / 12 / 229 |
| rs2231164 | c.1738-46G>A | ---- | 0,872 | 0,572 | 0,744 | 20 / 88 / 142 |
| rs2231165 | c.1820+110C>T | ---- | 0,021 | 0,09 | 0,006 | 247 / 3 / 0 |

4.2.1.1 Hodnocení detekovaných variant

A) Analýza pomocí predikčních programů

Tabulka 4.3 - Predikce funkčního dopadu nesynonymních variant

| Referenční označení varianty | Změna kódující sekvence | Změna proteinové sekvence | SIFT (hodnocení) | PolyPhen (hodnocení) | MutPred (hodnocení) | Mutation Taster (hodnocení) | Provean (hodnocení) |
|------------------------------|-------------------------|---------------------------|------------------|----------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|
| rs2231137 | c.34G>A | p.V12M | benigní | benigní | benigní | benigní | benigní |
| rs2231142 | c.421C>A | p.Q141K | benigní | benigní | benigní | benigní | benigní |
| rs372192400 | c.439C>T | p.R147W | poškozující | poškozující | poškozující | poškozující | poškozující |
| rs753759474 | c.458C>T | p.T153M | poškozující | benigní | benigní | benigní | benigní |
| rs752626614 | c.1118T>G | p.F373C | poškozující | poškozující | benigní | poškozující | poškozující |
| rs199854112 | c.1261A>G | p.T421A | benigní | benigní | benigní | benigní | benigní |
| rs769734146 | c.1301C>T | p.T434M | poškozující | možná poškozující | poškozující | poškozující | poškozující |
| N/A | c.1426T>C | p.S476P | poškozující | poškozující | poškozující | poškozující | poškozující |
| rs200894058 | c.1714A>C | p.S572R | poškozující | poškozující | poškozující | poškozující | poškozující |
| rs34783571 | c.1858G>A | p.D620N | benigní | benigní | benigní | poškozující | poškozující |

Byly použity predikční programy SIFT, PolyPhen, MutPred (MutPred 2021), Mutation Taster a Provean (viz kapitola 3.5.2 Predikce funkčního dopadu variant). V tabulce je pro přehlednost uvedeno slovní hodnocení analyzovaných variant (každý program má vlastní skóre).

Na základě predikčních programů lze za poškozující pokládat varianty p.R147W, p.F373C, p.T434M, p.S476P a p.S572R. Dva programy (Mutation Taster a Provean) označily za

poškozující variantu p.D620N. Programem Provean lze analyzovat i delece a varianta p.K360del (rs750972998) byla vyhodnocena jako benigní.

B) Statistická analýza

Tabulka 4.4 - Binomický test k porovnání alelické frekvence variant ve vyšetřované kohortě a v evropské populaci

| Referenční označení varianty | MAF v naší kohortě | K | p | q | Pravděpodobnost stejného výskytu mutantní alely jako je pozorovaný počet mutantních alel | Pravděpodobnost stejného nebo menšího výskytu mutantní alely v porovnání s pozorovaným počtem mutantních alel | Pravděpodobnost stejného nebo většího výskytu mutantní alely v porovnání s pozorovaným počtem mutantních alel | p-hodnota |
|------------------------------|--------------------|-----|--------------|-------|--|---|---|-------------------|
| rs2231137 | 0,018 | 9 | 0,061 | 0,939 | 0,00000222 | 0,00000304 | 0,99999918 | 0,000088 |
| rs2231142 | 0,238 | 119 | 0,094 | 0,06 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| rs372192400 | 0,002 | 1 | < 0,001 | 1 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| rs753759474 | 0,002 | 1 | < 0,001 | 1 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| rs750972998 | 0,002 | 1 | < 0,001 | 1 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| rs752626614 | 0,002 | 1 | < 0,001 | 1 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| rs199854112 | 0,002 | 1 | < 0,001 | 1 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| rs769734146 | 0,004 | 2 | < 0,001 | 1 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| rs200894058 | 0,002 | 1 | < 0,001 | 1 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| rs34783571 | 0,004 | 2 | 0,004 | 0,996 | 0,27121336 | 0,67667678 | 0,59453658 | 1 |
| rs369630458 | 0,002 | 1 | < 0,001 | 1 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| rs35622453 | 0,002 | 1 | 0,008 | 0,992 | 0,07267489 | 0,09069827 | 0,98197663 | 0,209468 |
| rs4148152 | 0,018 | 9 | 0,061 | 0,939 | 0,00000222 | 0,00000304 | 0,99999918 | 0,000088 |
| rs2231138 | 0,02 | 10 | 0,044 | 0,956 | 0,00177621 | 0,00302992 | 0,99874629 | 0,012156 |
| rs5860119 | 0,006 | 3 | 0,014 | 0,986 | 0,05144693 | 0,08030351 | 0,97114342 | 0,182784 |
| rs3219193 | 0,002 | 1 | 0,004 | 0,996 | 0,27066984 | 0,40546342 | 0,86520642 | 0,723142 |
| rs2231144 | 0,01 | 5 | 0,019 | 0,981 | 0,04752076 | 0,08645893 | 0,96106183 | 0,190102 |
| rs757389397 | 0,002 | 1 | < 0,001 | 1 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| rs529343441 | 0,002 | 1 | 0,004 | 0,996 | 0,27066984 | 0,40546342 | 0,86520642 | 0,723142 |
| rs753256449 | 0,002 | 1 | < 0,001 | 1 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| rs185332632 | 0,002 | 1 | 0,007 | 0,993 | 0,10513396 | 0,13496197 | 0,97017199 | 0,283358 |
| rs2231148 | 0,194 | 97 | 0,401 | 0,599 | 0,00000001 | 0,00000001 | 0,99999999 | < 0,000001 |
| rs2231153 | 0,978 | 489 | 0,945 | 0,055 | 0,00014776 | 0,99991452 | 0,00023324 | 0,001698 |
| rs2231156 | 0,172 | 86 | 0,073 | 0,927 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| rs2231155 | 0,006 | 3 | 0,006 | 0,994 | 0,22471675 | 0,64723256 | 0,57748418 | 1 |
| rs199473697 | 0,002 | 1 | 0,003 | 0,997 | 0,33494636 | 0,55757403 | 0,77737232 | 1 |
| rs6413443 | 0,002 | 1 | 0,008 | 0,992 | 0,07267489 | 0,09069827 | 0,98197663 | 0,209468 |
| rs2231157 | 0,366 | 183 | 0,439 | 0,561 | 0,00015181 | 0,00054289 | 0,99960892 | 0,001178 |

| | | | | | | | | |
|------------------|-------|-----|--------------|-------|--------------|--------------|--------------|-------------------|
| <i>rs2231162</i> | 0,94 | 470 | 0,952 | 0,048 | 0,03602042 | 0,12653583 | 0,90948458 | 0,249882 |
| <i>rs2231164</i> | 0,744 | 372 | 0,872 | 0,128 | < 0,00000001 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,000001 |
| <i>rs2231165</i> | 0,006 | 3 | 0,021 | 0,979 | 0,00503274 | 0,00673483 | 0,9982979 | 0,029014 |

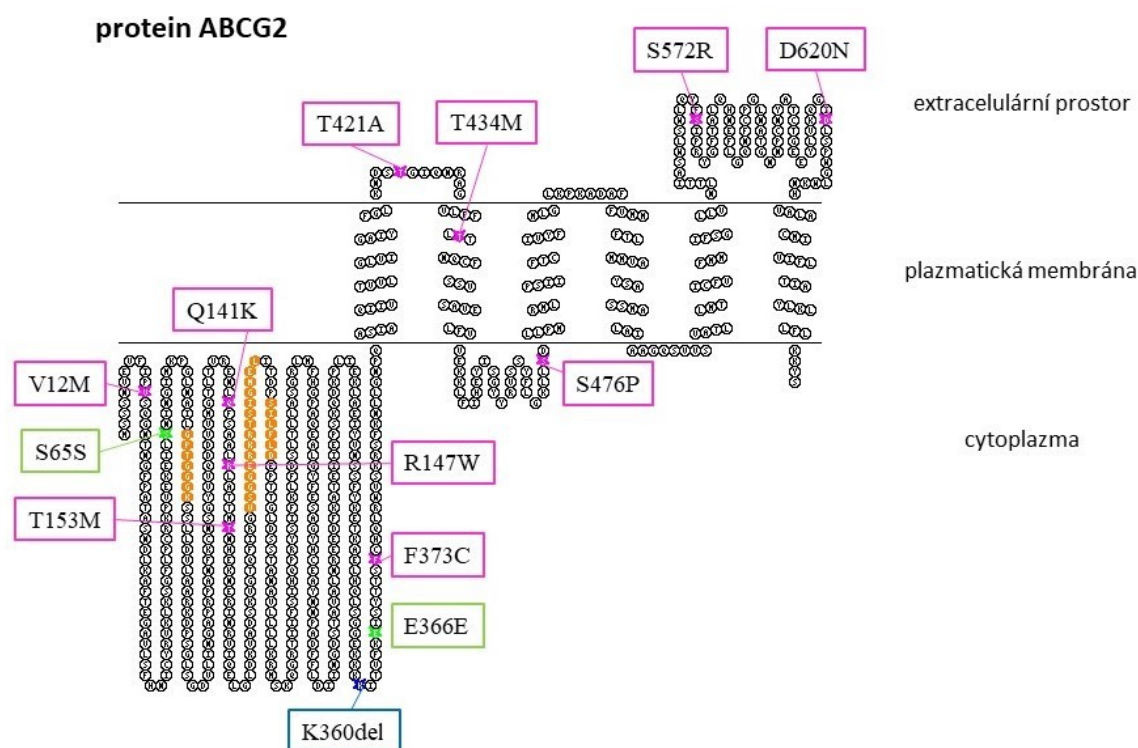
Počet alel (N) je 500. Za statisticky významnou je považovaná p-hodnota $\leq 0,0005$ (zvýrazněno tučně).

Seznam zkratk: K = počet mutantních alel, p = předpoklad výskytu mutantní alely, tedy MAF evropské populace, q = předpoklad výskytu wild type alely

V porovnání s evropskou populací byla alelická frekvence následujících variant signifikantně vyšší v kohortě pacientů s hyperurikémií a dnou: p.Q141K (*rs2231142*), p.R147W (*rs372192400*), p.T153M (*rs753759474*), p.K360del (*rs750972998*), p.F373C (*rs752626614*), p.T421A (*rs199854112*), p.T434M (*rs769734146*), p.S572R (*rs200894058*), p.S65S (*rs369630458*), c.689+1G>A (*rs757389397*), c.690-19_690-17delTGT (*rs753256449*) a c.1492+49G>T (*rs2231156*). U následujících variant byla alelická frekvence naopak významně nižší ve vyšetřované kohortě než v evropské populaci: p.V12M (*rs2231137*), c.203+36A>G (*rs4148152*), c.1195-60A>T (*rs2231148*) a c.1738-46G>A (*rs2231164*).

C) Analýza umístění v polypeptidové struktuře

Obrázek 4.1 - Předpokládaná sekundární struktura ABCG2 s detekovanými variantami



Pozice jednotlivých nesynonymních missense variant je znázorněná fialově, pozice synonymních variant je vyznačená zeleně a lokalizace delece je znázorněná modře. Topologický model byl vytvořen pomocí programu TOPO2 (Johns 2021).

Většina detekovaných variant se nachází v cytoplazmě poblíž N-konce proteinu, jedná se o nesynonymní varianty p.V12M, p.Q141K, p.R147W, p.T153M, p.F373C, dále o delecii p.K360del a o dvě synonymní varianty p.S65S a p.E366E. Tyto varianty se nacházejí poblíž funkčně důležité domény vázající nukleotid ATP, ale svou lokalizací do ní přímo nezasahují (Noguchi et al. 2014). Doména vázající nukleotid je na obrázku vyznačena oranžově a je složena z Walkerova motivu A (aminokyseliny na pozici 80 až 86), Walkerova motivu B (aminokyseliny na pozici 205 až 210) a ze specifické C domény (aminokyseliny na pozici 186 až 200) (Tamura et al. 2006). V cytoplazmatické smyčce se mezi druhou a třetí transmembránovou doménou vyskytuje nesynonymní varianta p.S476P. V extracelulárních smyčkách se nacházejí varianty p.T421A, p.S572R a p.D620N. Nesynonymní varianta p.T434M je lokalizována v transmembránovém segmentu.

D) Porovnání s kontrolní skupinou

Tabulka 4.5 - Výsledky vyšetření variant v ABCG2 metodou tetra-primer ARMS-PCR

| Referenční označení varianty | Změna kódující sekvence | Změna proteinové sekvence | Počet vyšetřených vzorků | Alelická frekvence v kontrolní kohortě | Počet jedinců: wild type / heterozygotní / homozygotní |
|------------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|--|--|
| <i>rs2231137</i> | c.34G>A | p.V12M | 149 | 0,017 | 144 / 5 / 0 |
| <i>rs2231142</i> | c.421C>A | p.Q141K | 159 | 0,075 | 136 / 22 / 1 |
| <i>rs372192400</i> | c.439C>T | p.R147W | 141 | 0,004 | 140 / 1 / 0 |
| <i>rs753759474</i> | c.458C>T | p.T153M | 148 | 0 | 148 / 0 / 0 |
| <i>rs752626614</i> | c.1118T>G | p.F373C | 159 | 0 | 159 / 0 / 0 |
| <i>rs2231142</i> | c.1261A>G | p.T421A | 160 | 0 | 160 / 0 / 0 |
| <i>rs769734146</i> | c.1301C>T | p.T434M | 143 | 0,004 | 142 / 1 / 0 |
| N/A | c.1426T>C | p.S476P | 152 | 0 | 152 / 0 / 0 |
| <i>rs200894058</i> | c.1714A>C | p.S572R | 154 | 0 | 154 / 0 / 0 |

Pozn.: Metodou tetra-primer ARMS-PCR se nepodařilo vyšetřit všech 174 jedinců zařazených v kontrolní skupině. Důvodem nemožnosti vyšetřit některé vzorky byla pravděpodobně přítomnost individuálních polymorfismů v místech, kde nasedají primery navržené na tetra-primer ARMS-PCR. Proto je tedy u každé varianty uvedený počet vyšetřených vzorků z kontrolní kohorty.

V kontrolní skupině jsme zjistili přítomnost dvou vzácných variant p.R147W a p.T434M vždy u jednoho jedince, což se prakticky shoduje s alelickými frekvencemi v kohortě pacientů s hyperurikémií a dnou. Varianta p.V12M se vyskytla v kontrolní kohortě u pěti jedinců (MAF = 0,017), takže alelická frekvence je srovnatelná s kohortou pacientů s hyperurikémií a dnou (MAF = 0,018), ale je mnohem nižší než v evropské populaci (MAF = 0,061).

Překvapivé bylo i porovnání minoritní alelické frekvence mezi jednotlivými skupinami u

varianty p.Q141K: u kontrolní skupiny se MAF = 0,075, u pacientů s hyperurikémií a dnou se MAF = 0,238 a u evropské populace se MAF = 0,094.

Tabulka 4.6 - Výsledky vyšetření varianty p.D620N metodou RFLP-PCR

| Referenční označení varianty | Změna kódující sekvence | Změna proteinové sekvence | Počet vyšetřených vzorků | Alelická frekvence v kontrolní kohortě | Počet jedinců: wt / heterozygotní / homozygotní |
|------------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|--|---|
| <i>rs34783571</i> | c.1858G>A | p.D620N | 140 | 0 | 140 / 0 / 0 |

Pozn.: Z důvodu výskytu individuálních polymorfismů nebylo možné analyzovat všech 174 vzorků.

Vzácná varianta p.D620N nebyla v kontrolní kohortě detekována.

4.2.2 Gen *ABCC4*

V genu *ABCC4* jsme našli čtyři časté (p.G187W – *rs11568658*, p.K304N – *rs2274407*, p.R317S – *rs2274406*, p.K1116N – *rs1751034*) a tři vzácné (p.E757K – *rs3765534*, p.I866V – *rs139970608*, p.T1142M – *rs11568644*) nesynonymní varianty. Varianta p.K304N může mít dopad na sestřih proteinu, jelikož vede k záměně báze na první pozici v exonu 8. Dále jsme identifikovali osm synonymních variant: p.I223I (*rs899494*), p.S323S (*rs2274405*), p.V345V (*rs11568703*), p.P403P (*rs762871137*), p.S486S (*rs11568670*), p.L904L (*rs1678339*), p.F948F (*rs1189466*) a p.I1085I (*rs11568652*). V nekódující části genu jsme ve vyšetřované kohortě identifikovali 54 variant, z toho 50 jednonukleotidových záměn, tři delece (c.621+82_621+85del – *rs5805910*, c.3630-88del – *rs4148539*, c.3871-5del – *rs755849835*) a jednu inzerci (c.2468_2469insA – *rs756989444*). Následující intronové varianty vedou pravděpodobně k alternativnímu sestřihu: c.186-5T>C (*rs4148437*), c.1161+8T>A (*rs3818494*), c.1825-7A>G (*rs11568696*), c.3871-3T>C (*rs9524765*).

Tabulka 4.7 - Výsledky sekvenování genu *ABCC4*

| Referenční označení varianty | Změna kódující sekvence | Změna proteinové sekvence | Alelická frekvence v evropské populaci | Alelická frekvence ve světové populaci | Alelická frekvence v naší kohortě | Počet jedinců: wild type / heterozygotní / homozygotní |
|------------------------------|-------------------------|---------------------------|--|--|-----------------------------------|--|
| <i>rs11568658</i> | c.559G>T | p.G187W | 0,031 | 0,052 | 0,027 | 143 / 6 / 0 |
| <i>rs2274407</i> | c.912G>T | p.K304N | 0,081 | 0,151 | 0,02 | 144 / 6 / 0 |
| <i>rs2274406</i> | c.951A>T | p.R317S | 0,619 | 0,518 | 0,637 | 19 / 71 / 60 |
| <i>rs3765534</i> | c.2269G>A | p.E757K | 0,009 | 0,031 | 0,01 | 147 / 3 / 0 |
| <i>rs139970608</i> | c.2596A>G | p.I866V | 0,006 | 0,001 | 0,01 | 148 / 1 / 1 |
| <i>rs1751034</i> | c.3348G>C | p.K1116N | 0,811 | 0,794 | 0,367 | 85 / 20 / 45 |
| <i>rs11568644</i> | c.3425C>T | p.T1142M | 0,006 | 0,003 | 0,003 | 149 / 1 / 0 |
| <i>rs899494</i> | c.669T>C | p.I223I | 0,843 | 0,808 | 0,823 | 5 / 43 / 102 |
| <i>rs2274405</i> | c.969A>G | p.S323S | 0,628 | 0,626 | 0,547 | 35 / 66 / 49 |

| | | | | | | |
|--------------------|--------------------|----------|---------|---------|-------|---------------|
| <i>rs11568703</i> | c.1035G>A | p.V345V | 0,007 | 0,002 | 0,013 | 146 / 4 / 0 |
| <i>rs762871137</i> | c.1209G>A | p.P403P | < 0,001 | < 0,001 | 0,003 | 149 / 1 / 0 |
| <i>rs11568670</i> | c.1458G>A | p.S486S | 0 | < 0,001 | 0,003 | 149 / 1 / 0 |
| <i>rs1678339</i> | c.2712A>G | p.L904L | 0,941 | 0,888 | 0,473 | 75 / 8 / 67 |
| <i>rs1189466</i> | c.2844T>C | p.F948F | 0,941 | 0,904 | 0,95 | 0 / 15 / 135 |
| <i>rs11568652</i> | c.3255C>A | p.I1085I | 0 | 0,001 | 0,233 | 80 / 70 / 0 |
| <i>rs4148435</i> | c.185+181G>T | ---- | 0,906 | 0,862 | 0,883 | 9 / 17 / 124 |
| <i>rs4148437</i> | c.186-5T>C | ---- | 0,403 | 0,215 | 0,387 | 51 / 82 / 17 |
| <i>rs899496</i> | c.621+50T>C | ---- | 0,813 | 0,711 | 0,8 | 6 / 48 / 96 |
| <i>rs4148472</i> | c.621+73C>T | ---- | 0,238 | 0,234 | 0,007 | 148 / 2 / 0 |
| <i>rs5805910</i> | c.621+82_621+85del | ---- | 0,576 | 0,477 | 0,033 | 142 / 6 / 2 |
| <i>rs148223655</i> | c.532-85G>A | ---- | 0 | 0,001 | 0,033 | 140 / 10 / 0 |
| <i>rs2389204</i> | c.785+158T>C | ---- | 0,629 | 0,629 | 0,233 | 102 / 26 / 22 |
| <i>rs2389203</i> | c.622-146C>A | ---- | 0,802 | 0,725 | 0,527 | 54 / 34 / 62 |
| <i>rs1678403</i> | c.622-130G>C | ---- | 0,81 | 0,743 | 0,533 | 55 / 30 / 65 |
| <i>rs3818486</i> | c.785+150T>C | ---- | 0,63 | 0,612 | 0,533 | 35 / 70 / 45 |
| <i>rs2274408</i> | c.911+80A>G | ---- | 0,619 | 0,52 | 0,597 | 29 / 63 / 58 |
| <i>rs7983079</i> | c.911+328A>G | ---- | 0,628 | 0,625 | 0,087 | 137 / 0 / 13 |
| <i>rs145154638</i> | c.911+128G>A | ---- | 0,027 | 0,008 | 0,01 | 147 / 3 / 0 |
| <i>rs17189446</i> | c.911+176G>T | ---- | 0,185 | 0,088 | 0,173 | 106 / 36 / 8 |
| <i>rs3818493</i> | c.1161+100C>T | ---- | 0,627 | 0,625 | 0,62 | 28 / 58 / 64 |
| <i>rs3818494</i> | c.1161+82C>G | ---- | 0,652 | 0,56 | 0,373 | 69 / 50 / 31 |
| <i>rs11568702</i> | c.1161+8T>A | ---- | 0,01 | 0,003 | 0,01 | 147 / 3 / 0 |
| <i>rs2274403</i> | c.1263+70T>C | ---- | 0,493 | 0,501 | 0,37 | 60 / 69 / 21 |
| <i>rs61965908</i> | c.1354-280T>C | ---- | 0,167 | 0,084 | 0,09 | 129 / 15 / 6 |
| <i>rs1557069</i> | c.1354-150A>G | ---- | 0,205 | 0,204 | 0,157 | 106 / 41 / 3 |
| <i>rs4148487</i> | c.1354-57G>A | ---- | 0,087 | 0,067 | 0,047 | 137 / 12 / 1 |
| <i>rs1751005</i> | c.1727+91A>G | ---- | 0,763 | 0,765 | 0,743 | 7 / 63 / 80 |
| <i>rs2296653</i> | c.1727+118C>T | ---- | 0,398 | 0,483 | 0,31 | 79 / 49 / 22 |
| <i>rs1678405</i> | c.1727+280A>G | ---- | 0,334 | 0,462 | 0,097 | 127 / 17 / 6 |
| <i>rs1073500</i> | c.1727+349T>G | ---- | 0,558 | 0,64 | 0,027 | 145 / 2 / 3 |
| <i>rs2478461</i> | c.1727+386A>G | ---- | 0,841 | 0,845 | 0,047 | 143 / 0 / 7 |
| <i>rs2009772</i> | c.1727+373A>G | ---- | 0,158 | 0,111 | 0,013 | 147 / 2 / 1 |
| <i>rs11568663</i> | c.1824+25G>A | ---- | 0,113 | 0,042 | 0,09 | 124 / 25 / 1 |
| <i>rs4148499</i> | c.1824+252A>G | ---- | 0,036 | 0,052 | 0,02 | 144 / 6 / 0 |
| <i>rs11568696</i> | c.1825-7A>G | ---- | 0 | 0,006 | 0,003 | 149 / 1 / 0 |
| <i>rs1729770</i> | c.2034+219G>A | ---- | 0,299 | 0,28 | 0,02 | 145 / 4 / 1 |
| <i>rs754994360</i> | c.1825-17C>A | ---- | < 0,001 | < 0,001 | 0,003 | 149 / 1 / 0 |
| <i>rs55709022</i> | c.2176-350G>A | ---- | 0,08 | 0,028 | 0,033 | 140 / 10 / 0 |
| <i>rs11568650</i> | c.2213+30T>C | ---- | 0,082 | 0,028 | 0,033 | 140 / 10 / 0 |
| <i>rs3765535</i> | c.2214-65T>C | ---- | 0,096 | 0,265 | 0,087 | 127 / 20 / 3 |
| <i>rs1678394</i> | c.2456-132T>G | ---- | 0,492 | 0,466 | 0,347 | 70 / 56 / 24 |
| <i>rs2296652</i> | c.2456-107A>G | ---- | 0,012 | 0,067 | 0,007 | 148 / 2 / 0 |
| <i>rs756989444</i> | c.2468_2469insA | ---- | < 0,001 | < 0,001 | 0,003 | 149 / 1 / 0 |
| <i>rs1189437</i> | c.2536-60C>A | ---- | 0,94 | 0,874 | 0,643 | 48 / 11 / 91 |
| <i>rs11568672</i> | c.2687-56C>T | ---- | 0,127 | 0,059 | 0,12 | 117 / 30 / 3 |
| <i>rs1189467</i> | c.2807-378A>T | ---- | 0,94 | 0,888 | 0,413 | 84 / 8 / 58 |
| <i>rs1189464</i> | c.2918-308A>G | ---- | 0,941 | 0,888 | 0,703 | 40 / 9 / 101 |
| <i>rs2274401</i> | c.3018+99A>G | ---- | 0,191 | 0,222 | 0,137 | 112 / 35 / 3 |
| <i>rs1189461</i> | c.3210+128A>G | ---- | 0,939 | 0,851 | 0,913 | 7 / 12 / 131 |

| | | | | | | |
|--------------|--------------|------|---------|---------|-------|---------------|
| rs11568667 | c.3210+43T>G | ---- | 0,003 | 0,001 | 0,017 | 145 / 5 / 0 |
| rs11568643 | c.3367-15A>G | ---- | 0,082 | 0,032 | 0,07 | 129 / 21 / 0 |
| rs7324065 | c.3456+42G>A | ---- | 0,064 | 0,049 | 0,027 | 142 / 8 / 0 |
| rs71431495 | c.3456+65G>A | ---- | 0,041 | 0,013 | 0,03 | 141 / 9 / 0 |
| rs12875235 | c.3629+50A>C | ---- | 0,127 | 0,06 | 0,1 | 124 / 22 / 4 |
| rs4148539 | c.3630-88del | ---- | < 0,001 | < 0,001 | 0,06 | 141 / 0 / 9 |
| rs1212955532 | c.3630-48C>G | ---- | 0 | < 0,001 | 0,263 | 75 / 71 / 4 |
| rs9524765 | c.3871-3T>C | ---- | 0,996 | 0,93 | 0,947 | 8 / 0 / 142 |
| rs755849835 | c.3871-5del | ---- | 0 | 0 | 0,027 | 142 / 8 / 0 |
| rs3742106 | c.*38T>G | ---- | 0,383 | 0,415 | 0,13 | 124 / 13 / 13 |

4.2.2.1 Hodnocení detekovaných variant

A) Analýza pomocí predikčních programů

Tabulka 4.8 - Predikce funkčního dopadu nesynonymních variant

| Referenční označení varianty | Změna kódující sekvence | Změna proteinové sekvence | SIFT (hodnocení) | PolyPhen (hodnocení) | MutPred (hodnocení) | Mutation Taster (hodnocení) | Provean (hodnocení) |
|------------------------------|-------------------------|---------------------------|------------------|----------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|
| rs11568658 | c.559G>T | p.G187W | poškozující | poškozující | benigní | benigní | poškozující |
| rs2274407 | c.912G>T | p.K304N | poškozující | benigní | benigní | benigní | benigní |
| rs2274406 | c.951A>T | p.R317S | poškozující | benigní | poškozující | poškozující | poškozující |
| rs3765534 | c.2269G>A | p.E757K | benigní | benigní | benigní | benigní | benigní |
| rs139970608 | c.2596A>G | p. I866V | benigní | benigní | benigní | poškozující | benigní |
| rs1751034 | c.3348G>C | p.K1116N | poškozující | možná poškozující | benigní | poškozující | poškozující |
| rs11568644 | c.3425C>T | p.T1142M | benigní | benigní | benigní | poškozující | poškozující |

Byly použity predikční programy SIFT, PolyPhen, MutPred, Mutation Taster a Provean (viz kapitola 3.5.2 Predikce funkčního dopadu variant). V tabulce je pro přehlednost uvedeno slovní hodnocení analyzovaných variant (každý program má vlastní skóre).

V hodnocení jednotlivých variant došly predikční programy ke shodnému výsledku pouze u varianty p.E757K, kterou označily za benigní.

B) Statistická analýza

Tabulka 4.9 - Binomický test k porovnání alelické frekvence variant ve vyšetřované kohortě a v evropské populaci

| Referenční označení varianty | MAF v naší kohortě | K | p | q | Pravděpodobnost stejného výskytu mutantní alely jako je pozorovaný počet mutantních alel | Pravděpodobnost stejného nebo menšího výskytu mutantní alely v porovnání s pozorovaným počtem mutantních alel | Pravděpodobnost stejného nebo většího výskytu mutantní alely v porovnání s pozorovaným počtem mutantních alel | p-hodnota |
|------------------------------|--------------------|-----|--------------|-------|--|---|---|-------------------|
| rs11568658 | 0,027 | 6 | 0,031 | 0,969 | 0,08145298 | 0,17654905 | 0,90490393 | 0,35096 |
| rs2274407 | 0,02 | 6 | 0,081 | 0,919 | 0,00000446 | 0,00000572 | 0,99999874 | 0,000166 |
| rs2274406 | 0,637 | 191 | 0,619 | 0,381 | 0,03918241 | 0,75394608 | 0,28523634 | 0,568234 |
| rs3765534 | 0,01 | 3 | 0,009 | 0,991 | 0,22154419 | 0,7143935 | 0,50715069 | 0,902688 |
| rs139970608 | 0,01 | 3 | 0,006 | 0,994 | 0,16108955 | 0,89187294 | 0,26921662 | 0,60075 |
| rs1751034 | 0,367 | 110 | 0,811 | 0,189 | < 0,00000001 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,000001 |
| rs11568644 | 0,003 | 1 | 0,006 | 0,994 | 0,2977155 | 0,46212061 | 0,83559489 | 0,822538 |
| rs899494 | 0,823 | 247 | 0,843 | 0,157 | 0,03944354 | 0,19434496 | 0,84509859 | 0,391458 |
| rs2274405 | 0,547 | 164 | 0,628 | 0,372 | 0,00073253 | 0,00236392 | 0,99836862 | 0,004306 |
| rs11568703 | 0,013 | 4 | 0,007 | 0,993 | 0,09929414 | 0,93853638 | 0,16075777 | 0,3323 |
| rs762871137 | 0,003 | 1 | < 0,001 | 1 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| rs11568670 | 0,003 | 1 | 0 | 1 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| rs1678339 | 0,473 | 142 | 0,941 | 0,059 | < 0,00000001 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,000001 |
| rs1189466 | 0,95 | 285 | 0,941 | 0,059 | 0,08348898 | 0,77948198 | 0,30400701 | 0,589842 |
| rs11568652 | 0,233 | 70 | 0 | 1 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| rs4148435 | 0,883 | 265 | 0,906 | 0,094 | 0,03069371 | 0,10858394 | 0,92210976 | 0,212624 |
| rs4148437 | 0,387 | 116 | 0,403 | 0,597 | 0,03998317 | 0,30327381 | 0,73670936 | 0,604522 |
| rs899496 | 0,8 | 240 | 0,813 | 0,187 | 0,04880753 | 0,30332271 | 0,74548481 | 0,614652 |
| rs4148472 | 0,007 | 2 | 0,238 | 0,762 | < 0,00000001 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,000001 |
| rs5805910 | 0,033 | 10 | 0,576 | 0,424 | < 0,00000001 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,000001 |
| rs148223655 | 0,033 | 10 | 0 | 1 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| rs2389204 | 0,233 | 70 | 0,629 | 0,371 | < 0,00000001 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,000001 |
| rs2389203 | 0,527 | 158 | 0,802 | 0,198 | < 0,00000001 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,000001 |
| rs1678403 | 0,533 | 160 | 0,81 | 0,19 | < 0,00000001 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,000001 |
| rs3818486 | 0,533 | 160 | 0,63 | 0,37 | 0,00013365 | 0,00038321 | 0,99975044 | 0,000654 |
| rs2274408 | 0,597 | 179 | 0,619 | 0,381 | 0,03423522 | 0,22990287 | 0,80433235 | 0,461064 |
| rs7983079 | 0,087 | 26 | 0,628 | 0,372 | < 0,00000001 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,000001 |
| rs145154638 | 0,01 | 3 | 0,027 | 0,973 | 0,0258501 | 0,03776039 | 0,98808971 | 0,101308 |
| rs17189446 | 0,173 | 52 | 0,185 | 0,815 | 0,05293275 | 0,33237746 | 0,72055529 | 0,655552 |
| rs3818493 | 0,62 | 186 | 0,627 | 0,373 | 0,04594683 | 0,42236825 | 0,62357858 | 0,848512 |
| rs3818494 | 0,373 | 112 | 0,652 | 0,348 | < 0,00000001 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,000001 |
| rs11568702 | 0,01 | 3 | 0,01 | 0,99 | 0,22516986 | 0,64723377 | 0,57793608 | 1 |
| rs2274403 | 0,37 | 111 | 0,493 | 0,507 | 0,00000484 | 0,00001179 | 0,99999306 | 0,000026 |
| rs61965908 | 0,09 | 27 | 0,167 | 0,833 | 0,00004687 | 0,00008923 | 0,99995765 | 0,000468 |
| rs1557069 | 0,157 | 47 | 0,205 | 0,795 | 0,00637778 | 0,02015737 | 0,98622041 | 0,045264 |
| rs4148487 | 0,047 | 14 | 0,087 | 0,913 | 0,00284082 | 0,0054659 | 0,99737492 | 0,017486 |
| rs1751005 | 0,743 | 223 | 0,763 | 0,237 | 0,0384381 | 0,23006796 | 0,80837015 | 0,463462 |
| rs2296653 | 0,31 | 93 | 0,398 | 0,602 | 0,0003342 | 0,00097665 | 0,99935755 | 0,002252 |

| | | | | | | | | |
|---------------------|--------------|-----|--------------|-------|--------------|--------------|--------------|-------------------|
| <i>rs1678405</i> | 0,097 | 29 | 0,334 | 0,666 | < 0,00000001 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,000001 |
| <i>rs1073500</i> | 0,027 | 8 | 0,558 | 0,442 | < 0,00000001 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,000001 |
| <i>rs2478461</i> | 0,047 | 14 | 0,841 | 0,159 | < 0,00000001 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,000001 |
| <i>rs2009772</i> | 0,013 | 4 | 0,158 | 0,842 | < 0,00000001 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,000001 |
| <i>rs11568663</i> | 0,09 | 27 | 0,113 | 0,887 | 0,03449638 | 0,11951207 | 0,91498431 | 0,243158 |
| <i>rs4148499</i> | 0,02 | 6 | 0,036 | 0,964 | 0,04365252 | 0,08330882 | 0,9603437 | 0,182644 |
| <i>rs11568696</i> | 0,003 | 1 | 0 | 1 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| <i>rs1729770</i> | 0,02 | 6 | 0,299 | 0,701 | < 0,00000001 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,000001 |
| <i>rs754994360</i> | 0,003 | 1 | < 0,001 | 1 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| <i>rs55709022</i> | 0,033 | 10 | 0,08 | 0,92 | 0,00047313 | 0,00075452 | 0,99971861 | 0,004066 |
| <i>rs11568650</i> | 0,033 | 10 | 0,082 | 0,918 | 0,0003222 | 0,00050645 | 0,99981575 | 0,003006 |
| <i>rs3765535</i> | 0,087 | 26 | 0,096 | 0,904 | 0,06987512 | 0,33383777 | 0,73603735 | 0,652162 |
| <i>rs1678394</i> | 0,347 | 104 | 0,492 | 0,508 | 0,00000012 | 0,00000026 | 0,99999986 | < 0,000001 |
| <i>rs2296652</i> | 0,007 | 2 | 0,012 | 0,988 | 0,17688639 | 0,30103728 | 0,87584911 | 0,559718 |
| <i>rs756989444</i> | 0,003 | 1 | < 0,001 | 1 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| <i>rs1189437</i> | 0,643 | 193 | 0,94 | 0,06 | < 0,00000001 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,000001 |
| <i>rs11568672</i> | 0,12 | 36 | 0,127 | 0,873 | 0,06610583 | 0,39848459 | 0,66762124 | 0,781452 |
| <i>rs1189467</i> | 0,413 | 124 | 0,94 | 0,06 | < 0,00000001 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,000001 |
| <i>rs1189464</i> | 0,703 | 211 | 0,941 | 0,059 | < 0,00000001 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,000001 |
| <i>rs2274401</i> | 0,137 | 41 | 0,191 | 0,809 | 0,00297963 | 0,00823905 | 0,99474057 | 0,020306 |
| <i>rs1189461</i> | 0,913 | 274 | 0,939 | 0,061 | 0,01754157 | 0,04664982 | 0,97089175 | 0,082406 |
| <i>rs11568667</i> | 0,017 | 5 | 0,003 | 0,997 | 0,00196134 | 0,99966869 | 0,00229266 | 0,000144 |
| <i>rs11568643</i> | 0,07 | 21 | 0,082 | 0,918 | 0,06656165 | 0,26263064 | 0,80393101 | 0,514184 |
| <i>rs7324065</i> | 0,027 | 8 | 0,064 | 0,936 | 0,00170829 | 0,00272008 | 0,99898821 | 0,011602 |
| <i>rs71431495</i> | 0,03 | 9 | 0,041 | 0,959 | 0,0805347 | 0,21158892 | 0,86894578 | 0,414924 |
| <i>rs12875235</i> | 0,1 | 30 | 0,127 | 0,873 | 0,02669859 | 0,09074118 | 0,93595741 | 0,187576 |
| <i>rs4148539</i> | 0,06 | 18 | < 0,001 | 1 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| <i>rs1212955532</i> | 0,263 | 79 | 0 | 1 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| <i>rs9524765</i> | 0,947 | 284 | 0,996 | 0,004 | < 0,00000001 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,000001 |
| <i>rs755849835</i> | 0,027 | 8 | 0 | 1 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| <i>rs3742106</i> | 0,13 | 39 | 0,383 | 0,617 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |

Počet alel (N) je 300. Za statisticky významnou je považovaná p-hodnota $\leq 0,0005$ (zvýrazněno tučně).

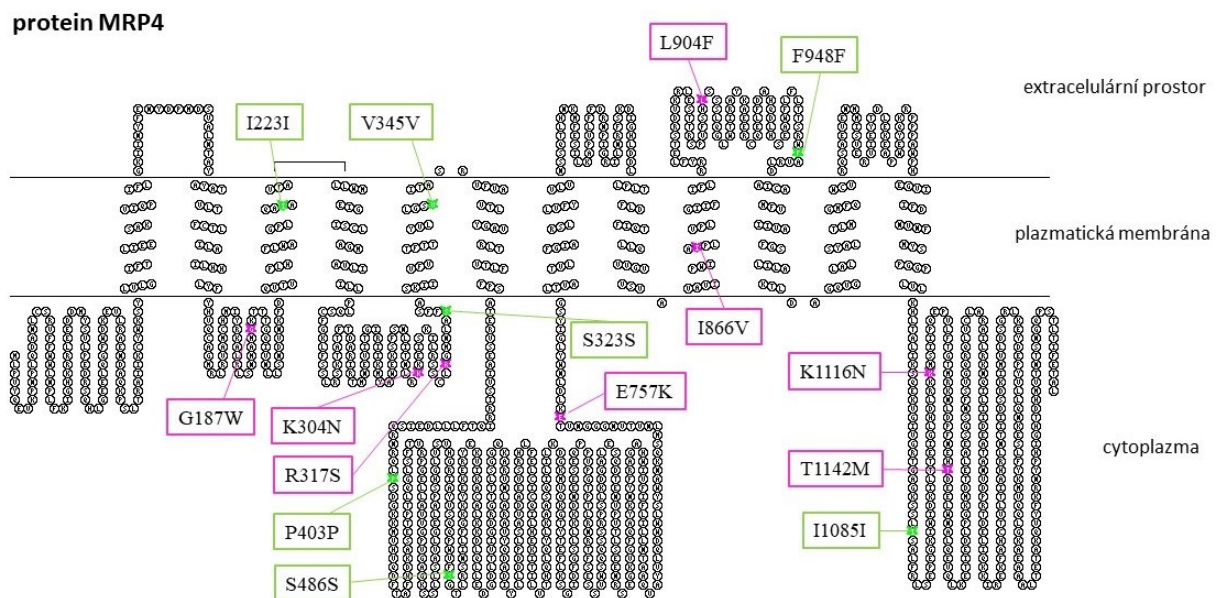
Seznam zkratk: K = počet mutantních alel, p = předpoklad výskytu mutantní alely, tedy MAF evropské populace, q = předpoklad výskytu wild type alely

Následující varianty jsou signifikantně častější v kohortě pacientů s primární hyperurikémií a dnou než v evropské populaci: p.P403P (*rs762871137*), p.S486S (*rs11568670*), p.I1085I (*rs11568652*), c.532-85G>A (*rs148223655*), c.1825-7A>G (*rs11568696*), c.1825-17C>A (*rs754994360*), c.2468_2469insA (*rs756989444*), c.3210+43T>G (*rs11568667*), c.3630-88del (*rs4148539*), c.3630-48C>G (*rs1212955532*) a c.3871-5del (*rs755849835*). Tyto varianty mají naopak významně nižší alelickou frekvenci ve vyšetřované kohortě v porovnání s evropskou populací: p.K304N (*rs2274407*), p.K1116N (*rs1751034*), p.L904L (*rs1678339*), c.621+73C>T (*rs4148472*), c.621+82_621+85del (*rs5805910*), c.785+158T>C (*rs2389204*),

c.622-146C>A (*rs2389203*), c.622-130G>C (*rs1678403*), c.911+328A>G (*rs7983079*), c.1161+82C>G (*rs3818494*), c.1263+70T>C (*rs2274403*), c.1354-280T>C (*rs61965908*), c.1727+280A>G (*rs1678405*), c.1727+349T>G (*rs1073500*), c.1727+386A>G (*rs2478461*), c.1727+373A>G (*rs2009772*), c.2034+219G>A (*rs1729770*), c.2456-132T>G (*rs1678394*), c.2536-60C>A (*rs1189437*), c.2807-378A>T (*rs1189467*), c.2918-308A>G (*rs1189464*) a c.3871-3T>C (*rs9524765*).

C) Analýza umístění v polypeptidové struktuře

Obrázek 4.2 - Předpokládaná sekundární struktura MRP4 s detekovanými variantami



Pozice jednotlivých nesynonymních missense variant je znázorněna fialově a pozice synonymních variant je vyznačena zeleně. Topologický model byl vytvořen pomocí programu TOPO2 (Johns 2021).

Protein MRP4 je složen z 12 transmembránových domén a dvou domén vázajících nukleotid (Chantemargue et al. 2018). Jedna NBD se nachází ve velké cytoplazmatické smyčce mezi šestou a sedmou transmembránovou doménou, kde byly detekovány varianty p.P403P, p.S486S a p.E757K. Druhá NBD je lokalizována v cytoplazmě poblíž C-konce proteinu a poblíž se vyskytují varianty p.I1085I, p.K1116N a p.T1142M. V extracelulární části proteinu jsou lokalizovány varianty p.L904F a p.F948F, zatímco v cytoplazmě se kromě již uvedených variant nacházejí ještě p.G187W, p.K304N, p.R317S a p.S323S. V transmembránových doménách jsou lokalizovány dvě synonymní varianty (p.I223I, p.V345V) a jedna nesynonymní varianta p.I866V.

4.2.3 Gen *SLC22A12*

V genu *SLC22A12* jsme ve vyšetřované kohortě nenašli žádnou nesynonymní variantu. Detekovali jsme však pět synonymních variant: p.N82N (*rs3825017*), p.H86H (*rs3825016*),

p.H142H (*rs11231825*), p.A416A (*rs1630320*), p.L437L (*rs7932775*). Kromě toho se ve vyšetřované kohortě vyskytly čtyři jednonukleotidové intronové záměny.

Tabulka 4.10 - Výsledky sekvenování genu *SLC22A12*

| Referenční označení varianty | Změna kódující sekvence | Změna proteinové sekvence | Alelická frekvence v evropské populaci | Alelická frekvence ve světové populaci | Alelická frekvence v naší kohortě | Počet jedinců: wild type / heterozygotní / homozygotní |
|------------------------------|-------------------------|---------------------------|--|--|-----------------------------------|--|
| <i>rs3825017</i> | c.246C>T | p.N82N | 0,004 | 0,071 | 0,004 | 248 / 2 / 0 |
| <i>rs3825016</i> | c.258C>T | p.H86H | 0,706 | 0,387 | 0,64 | 37 / 106 / 107 |
| <i>rs11231825</i> | c.426T>C | p.H142H | 0,706 | 0,386 | 0,644 | 36 / 106 / 108 |
| <i>rs1630320</i> | c.1248A>G | p.A416A | 1 | 0,977 | 1 | 0 / 0 / 250 |
| <i>rs7932775</i> | c.1309T>C | p.L437L | 0,202 | 0,397 | 0,23 | 154 / 77 / 19 |
| <i>rs373881060</i> | c.662-7C>T | --- | < 0,001 | < 0,001 | 0,01 | 245 / 5 / 0 |
| <i>rs368284669</i> | c.955-38G>A | --- | 0 | 0,009 | 0,004 | 248 / 2 / 0 |
| <i>rs11231837</i> | c.1598+18C>T | --- | 0,199 | 0,324 | 0,234 | 152 / 79 / 19 |
| <i>rs117280820</i> | c.1598+254C>A | --- | 0,042 | 0,024 | 0,008 | 248 / 0 / 2 |

4.2.3.1 Hodnocení detekovaných variant

A) Statistická analýza

Tabulka 4.11 - Binomický test k porovnání alelické frekvence variant ve vyšetřované kohortě a v evropské populaci

| Referenční označení varianty | MAF v naší kohortě | K | p | q | Pravděpodobnost stejného výskytu mutantní alely jako je pozorovaný počet mutantních alel | Pravděpodobnost stejného nebo menšího výskytu mutantní alely v porovnání s pozorovaným počtem mutantních alel | Pravděpodobnost stejného nebo většího výskytu mutantní alely v porovnání s pozorovaným počtem mutantních alel | p-hodnota |
|------------------------------|--------------------|-----|--------------|-------|--|---|---|----------------------|
| <i>rs3825017</i> | 0,004 | 2 | 0,004 | 0,996 | 0,27121336 | 0,67667678 | 0,59453658 | 1 |
| <i>rs3825016</i> | 0,64 | 320 | 0,706 | 0,294 | 0,00023874 | 0,0008564 | 0,99938234 | 0,001422 |
| <i>rs11231825</i> | 0,644 | 322 | 0,706 | 0,294 | 0,00042914 | 0,00160702 | 0,99882213 | 0,002754 |
| <i>rs1630320</i> | 1 | 500 | 1 | 0 | > 0,99999999 | > 0,99999999 | > 0,99999999 | 1 |
| <i>rs7932775</i> | 0,23 | 115 | 0,202 | 0,798 | 0,01305779 | 0,94506129 | 0,0679965 | 0,13265 |
| <i>rs373881060</i> | 0,01 | 5 | < 0,001 | 1 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| <i>rs368284669</i> | 0,004 | 2 | 0 | 1 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| <i>rs11231837</i> | 0,234 | 117 | 0,199 | 0,801 | 0,00666133 | 0,97642037 | 0,03024096 | 0,05688 |
| <i>rs117280820</i> | 0,008 | 4 | 0,042 | 0,958 | 0,00000458 | 0,00000555 | 0,99999903 | 0,000234 |

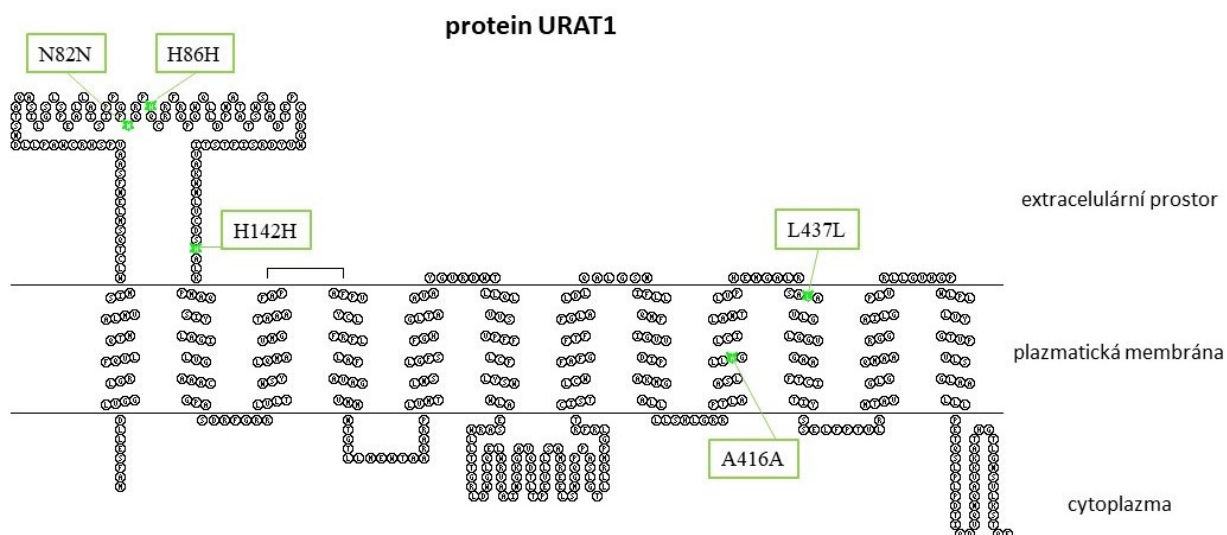
Počet alel (N) je 500. Za statisticky významnou je považovaná p-hodnota $\leq 0,0005$ (zvýrazněno tučně).

Seznam zkratk: K = počet mutantních alel, p = předpoklad výskytu mutantní alely, tedy MAF evropské populace, q = předpoklad výskytu wild type alely

Statistická analýza ukázala, že alelická frekvence intronových variant c.662-7C>T (*rs373881060*) a c.955-38G>A (*rs368284669*) je významně vyšší v kohortě pacientů s primární hyperurikémií a dnou v porovnání s alelickými frekvencemi uvedenými v databázích Ensembl a NCBI pro evropskou populaci. Alelická frekvence intronové varianty c.1598+254C>A (*rs117280820*) je naopak významně nižší ve vyšetřované kohortě než v evropské populaci.

B) Analýza umístění v polypeptidové struktuře

Obrázek 4.3 - Předpokládaná sekundární struktura URAT1 s detekovanými variantami



Pozice jednotlivých synonymních variant je vyznačena zeleně. Topologický model byl vytvořen pomocí programu TOPO2 (Johns 2021).

Tři z pěti synonymních variant (p.N82N, p.H86H, p.H142H) se nacházejí ve velké extracelulární smyčce, ve které jsou přítomna různá glykosylační místa (Li et al. 2019). Varianta p.A416A je lokalizována v deváté transmembránové doméně a varianta p.L437L v desátém transmembránovém segmentu.

4.2.4 Gen *SLC2A9*

V genu *SLC2A9* jsme detekovali sedm nesynonymních variant: p.A17T (*rs6820230*), p.G25R (*rs2276961*), p.T275M (*rs112404957*), p.D281H (*rs73225891*), p.V282I (*rs16890979*), p.R294H (*rs3733591*) a p.P350L (*rs2280205*). Ve vyšetřované kohortě jsme dále identifikovali pět synonymních variant: p.L108L (*rs13113918*), p.T125T (*rs10939650*), p.I168I (*rs3733589*), p.L189L (*rs13125646*) a p.S515S (*rs144428359*). V nekódující oblasti genu jsme našli 19 jednonukleotidových záměn, z nichž se 17 variant nacházelo

v intronových oblastech přiléhajících k exonům a dvě varianty se vyskytovaly v 5' nepřekládané oblasti (5' UTR). Jedna z intronových variant (konkrétně c.1002+68C>T) zatím není uvedena v databázích Ensembl a NCBI. V intronové oblasti jsme také identifikovali delecii c.63+18delT (*rs61256984*).

Tabulka 4.12 - Výsledky sekvenování genu *SLC2A9*

| Referenční označení varianty | Změna kódující sekvence | Změna proteinové sekvence | Alelická frekvence v evropské populaci | Alelická frekvence ve světové populaci | Alelická frekvence v naší kohortě | Počet jedinců: wild type / heterozygotní / homozygotní |
|------------------------------|-------------------------|---------------------------|--|--|-----------------------------------|--|
| <i>rs2276961</i> | c.73G>A | p.G25R | 0,528 | 0,407 | 0,606 | 44 / 109 / 97 |
| <i>rs112404957</i> | c.824C>T | p.T275M | 0,009 | 0,003 | 0,012 | 244 / 6 / 0 |
| <i>rs73225891</i> | c.841G>C | p.D281H | 0,029 | 0,007 | 0,024 | 238 / 12 / 0 |
| <i>rs16890979</i> | c.844G>A | p.V282I | 0,214 | 0,264 | 0,118 | 195 / 51 / 4 |
| <i>rs3733591</i> | c.881G>A | p.R294H | 0,191 | 0,294 | 0,2 | 161 / 78 / 11 |
| <i>rs2280205</i> | c.1049C>T | p.P350L | 0,484 | 0,271 | 0,538 | 54 / 123 / 73 |
| <i>rs6820230</i> | c.49G>A | p.A17T | 0,297 | 0,269 | 0,112 | 222 / 0 / 28 |
| <i>rs13113918</i> | c.322T>C | p.L108L | 0,8 | 0,821 | 0,876 | 7 / 48 / 195 |
| <i>rs10939650</i> | c.375G>A | p.T125T | 0,752 | 0,642 | 0,844 | 10 / 58 / 182 |
| <i>rs3733589</i> | c.504C>T | p.I168I | 0,045 | 0,156 | 0,026 | 237 / 13 / 0 |
| <i>rs13125646</i> | c.567T>C | p.L189L | 0,801 | 0,752 | 0,878 | 7 / 47 / 196 |
| <i>rs144428359</i> | c.1545C>T | p.S515S | 0,007 | 0,002 | 0,014 | 243 / 7 / 0 |
| <i>rs2276962</i> | c.150+24A>G | ---- | 0,042 | 0,158 | 0,018 | 241 / 9 / 0 |
| <i>rs2276963</i> | c.150+65C>T | ---- | 0,054 | 0,208 | 0,022 | 239 / 11 / 0 |
| <i>rs2240722</i> | c.151-60T>C | ---- | 0,528 | 0,408 | 0,72 | 44 / 52 / 154 |
| <i>rs2240721</i> | c.249+35C>T | ---- | 0,528 | 0,409 | 0,74 | 42 / 46 / 162 |
| <i>rs2240720</i> | c.249+119G>A | ---- | 0,528 | 0,411 | 0,77 | 45 / 25 / 180 |
| <i>rs28592748</i> | c.250-40A>G | ---- | 0,8 | 0,821 | 0,872 | 8 / 48 / 194 |
| <i>rs16891971</i> | c.410+29G>T | ---- | 0,026 | 0,053 | 0,008 | 246 / 4 / 0 |
| <i>rs772544951</i> | c.410+49A>G | ---- | 0 | 0 | 0,002 | 249 / 1 / 0 |
| <i>rs3733590</i> | c.535+67A>G | ---- | 0,071 | 0,183 | 0,028 | 236 / 14 / 0 |
| <i>rs13115193</i> | c.681+25G>A | ---- | 0,505 | 0,386 | 0,582 | 50 / 109 / 91 |
| <i>rs202000076</i> | c.681+13C>T | ---- | 0,001 | < 0,001 | 0,004 | 248 / 2 / 0 |
| <i>rs4292327</i> | c.682-31C>T | ---- | 0,224 | 0,14 | 0,238 | 142 / 97 / 11 |
| N/A | c.1002+68C>T | ---- | N/A | N/A | 0,002 | 249 / 1 / 0 |
| <i>rs1050991059</i> | c.1002+72G>A | ---- | 0 | 0 | 0,002 | 249 / 1 / 0 |
| <i>rs6823877</i> | c.1002+78A>G | ---- | 0,651 | 0,724 | 0,346 | 128 / 71 / 51 |
| <i>rs2280204</i> | c.1113+9A>C | ---- | 0,2 | 0,215 | 0,12 | 196 / 48 / 6 |
| <i>rs114361719</i> | c.1114-89G>C | ---- | 0,028 | 0,012 | 0,002 | 249 / 1 / 0 |
| <i>rs61256984</i> | c.63+18delT | ---- | 0,299 | 0,273 | 0,524 | 1 / 236 / 13 |
| <i>rs6449237</i> | c.-40-13T>C | ---- | 0,293 | 0,267 | 0,072 | 232 / 0 / 18 |
| <i>rs752032126</i> | c.-40-45G>A | ---- | 0 | 0 | 0,004 | 249 / 0 / 1 |

Nalezené varianty se nacházely v transkriptu s označením ENST00000264784 s výjimkou následujících variant v transkriptu ENST00000506583: p.A17T, c.63+18delT, c.-40-13T>C a c.-40-45G>A.

4.2.4.1 Hodnocení detekovaných variant

A) Analýza pomocí predikčních programů

Tabulka 4.13 - Predikce funkčního dopadu nesynonymních variant

| Referenční označení varianty | Změna kódující sekvence | Změna proteinové sekvence | SIFT (hodnocení) | PolyPhen (hodnocení) | MutPred (hodnocení) | Mutation Taster (hodnocení) | Provean (hodnocení) |
|------------------------------|-------------------------|---------------------------|------------------|----------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|
| rs2276961 | c.73G>A | p.G25R | benigní | benigní | benigní | benigní | benigní |
| rs112404957 | c.824C>T | p.T275M | benigní | benigní | benigní | benigní | benigní |
| rs73225891 | c.841G>C | p.D281H | poškozující | poškozující | benigní | benigní | poškozující |
| rs16890979 | c.844G>A | p.V282I | benigní | benigní | benigní | benigní | benigní |
| rs3733591 | c.881G>A | p.R294H | benigní | poškozující | benigní | benigní | poškozující |
| rs2280205 | c.1049C>T | p.P350L | benigní | benigní | benigní | benigní | benigní |
| rs6820230 | c.49G>A | p.A17T | benigní | benigní | benigní | benigní | benigní |

Byly použity predikční programy SIFT, PolyPhen, MutPred, Mutation Taster a Provean (viz kapitola 3.5.2 Predikce funkčního dopadu variant). V tabulce je pro přehlednost uvedeno slovní hodnocení analyzovaných variant (každý program má vlastní skóre).

Podle predikčních programů nemají varianty p.A17T, p.G25R, p.T275M, p.V282I a p.P350L poškozující vliv na funkci proteinu. U variant p.D281H a p.R294H se hodnocení mezi jednotlivými programy liší.

B) Statistická analýza

Tabulka 4.14 - Binomický test k porovnání alelické frekvence variant ve vyšetřované kohortě a v evropské populaci

| Referenční označení varianty | MAF v naší kohortě | K | p | q | Pravděpodobnost stejného výskytu mutantní alely jako je pozorovaný počet mutantních alel | Pravděpodobnost stejného nebo menšího výskytu mutantní alely v porovnání s pozorovaným počtem mutantních alel | Pravděpodobnost stejného nebo většího výskytu mutantní alely v porovnání s pozorovaným počtem mutantních alel | p-hodnota |
|------------------------------|--------------------|-----|--------------|-------|--|---|---|----------------------|
| <i>rs2276961</i> | 0,606 | 303 | 0,528 | 0,472 | 0,00007672 | 0,99981118 | 0,00026554 | 0,000562 |
| <i>rs112404957</i> | 0,012 | 6 | 0,009 | 0,991 | 0,12860298 | 0,83192167 | 0,29668131 | 0,635828 |
| <i>rs73225891</i> | 0,024 | 12 | 0,029 | 0,971 | 0,09147276 | 0,30772934 | 0,78374342 | 0,594026 |
| <i>rs16890979</i> | 0,118 | 59 | 0,214 | 0,786 | < 0,00000001 | 0,00000002 | > 0,99999999 | < 0,000001 |
| <i>rs3733591</i> | 0,2 | 100 | 0,191 | 0,809 | 0,03915039 | 0,71793207 | 0,32121832 | 0,649054 |
| <i>rs2280205</i> | 0,538 | 269 | 0,484 | 0,516 | 0,00193308 | 0,99306468 | 0,0088684 | 0,017718 |
| <i>rs6820230</i> | 0,112 | 56 | 0,297 | 0,703 | < 0,00000001 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,000001 |
| <i>rs13113918</i> | 0,876 | 438 | 0,8 | 0,2 | 0,00000219 | 0,99999729 | 0,0000049 | 0,000028 |
| <i>rs10939650</i> | 0,844 | 422 | 0,752 | 0,248 | 0,00000017 | 0,99999979 | 0,00000039 | 0,000002 |
| <i>rs3733589</i> | 0,026 | 13 | 0,045 | 0,955 | 0,0094932 | 0,01989337 | 0,98959984 | 0,052192 |
| <i>rs13125646</i> | 0,878 | 439 | 0,801 | 0,199 | 0,00000158 | 0,9999981 | 0,00000348 | 0,00002 |
| <i>rs144428359</i> | 0,014 | 7 | 0,007 | 0,993 | 0,0383447 | 0,97373347 | 0,06461123 | 0,10757 |
| <i>rs2276962</i> | 0,018 | 9 | 0,042 | 0,958 | 0,00144287 | 0,00236522 | 0,99907765 | 0,01035 |
| <i>rs2276963</i> | 0,022 | 11 | 0,054 | 0,946 | 0,00020254 | 0,00032311 | 0,99987943 | 0,002162 |
| <i>rs2240722</i> | 0,72 | 360 | 0,528 | 0,472 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| <i>rs2240721</i> | 0,74 | 370 | 0,528 | 0,472 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| <i>rs2240720</i> | 0,77 | 385 | 0,528 | 0,472 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| <i>rs28592748</i> | 0,872 | 436 | 0,8 | 0,2 | 0,00000651 | 0,99999128 | 0,00001523 | 0,000072 |
| <i>rs16891971</i> | 0,008 | 4 | 0,026 | 0,974 | 0,00248646 | 0,00343261 | 0,99905385 | 0,016906 |
| <i>rs772544951</i> | 0,002 | 1 | 0 | 1 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| <i>rs3733590</i> | 0,028 | 14 | 0,071 | 0,929 | 0,00001376 | 0,00002155 | 0,99999221 | 0,000256 |
| <i>rs13115193</i> | 0,582 | 291 | 0,505 | 0,495 | 0,00009332 | 0,99976446 | 0,00032887 | 0,000676 |
| <i>rs202000076</i> | 0,004 | 2 | 0,001 | 0,999 | 0,07579729 | 0,9856692 | 0,09012809 | 0,157092 |
| <i>rs4292327</i> | 0,238 | 119 | 0,224 | 0,776 | 0,03170738 | 0,79044989 | 0,24125749 | 0,485662 |
| <i>rs1050991059</i> | 0,002 | 1 | 0 | 1 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| <i>rs6823877</i> | 0,346 | 173 | 0,651 | 0,349 | < 0,00000001 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,000001 |
| <i>rs2280204</i> | 0,12 | 60 | 0,2 | 0,8 | 0,00000069 | 0,00000147 | 0,99999922 | 0,00001 |
| <i>rs114361719</i> | 0,002 | 1 | 0,028 | 0,972 | 0,00000981 | 0,00001049 | 0,99999932 | 0,000702 |
| <i>rs61256984</i> | 0,524 | 262 | 0,299 | 0,701 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| <i>rs6449237</i> | 0,072 | 36 | 0,293 | 0,707 | < 0,00000001 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,000001 |
| <i>rs752032126</i> | 0,004 | 2 | 0 | 1 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |

Počet alel (N) je 500. Za statisticky významnou je považovaná p-hodnota $\leq 0,0005$ (zvýrazněno tučně).

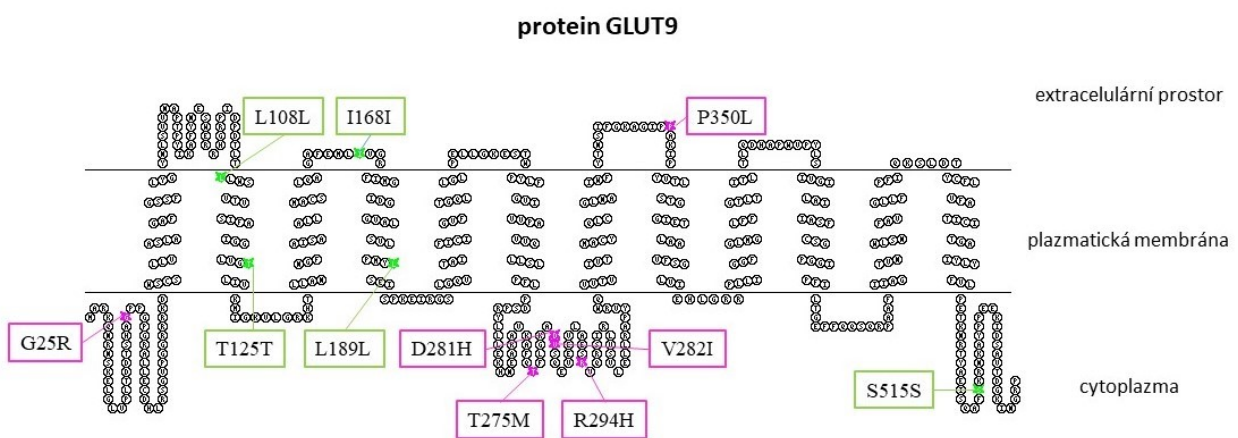
Seznam zkratk: K = počet mutantních alel, p = předpoklad výskytu mutantní alely, tedy MAF evropské populace, q = předpoklad výskytu wild type alely

Statistickou analýzou jsme zjistili, že následující varianty mají signifikantně vyšší alelickou frekvenci ve vyšetřované kohortě v porovnání s evropskou populací: p.L108L (*rs13113918*),

p.T125T (*rs10939650*), p.L189L (*rs13125646*), c.151-60T>C (*rs2240722*), c.249+35C>T (*rs2240721*), c.249+119G>A (*rs2240720*), c.250-40A>G (*rs28592748*), c.410+49A>G (*rs772544951*), c.1002+72G>A (*rs1050991059*), c.63+18delT (*rs61256984*) a c.-40-45G>A (*rs752032126*). Naopak tyto varianty mají dle výsledku binomického testu signifikantně vyšší alelické frekvence v evropské populaci než v kohortě pacientů s hyperurikémií a dnou: p.V282I (*rs16890979*), p.A17T (*rs6820230*), c.535+67A>G (*rs3733590*), c.1002+78A>G (*rs6823877*), c.1113+9A>C (*rs2280204*) a c.-40-13T>C (*rs6449237*).

C) Analýza umístění v polypeptidové struktuře

Obrázek 4.4 - Předpokládaná sekundární struktura GLUT9 s detekovanými variantami



Pozice jednotlivých nesynonymních missense variant je znázorněná fialově a pozice synonymních variant je vyznačená zeleně. Topologický model byl vytvořen pomocí programu TOPO2 (Johns 2021).

Nesynonymní varianta p.G25R se nachází v intracelulárním prostoru poblíž N-konce proteinu, zatímco synonymní varianta p.S515S je lokalizovaná v cytoplasmě poblíž C-konce. Intracelulárně se mezi šestou a sedmou transmembránovou doménou nachází smyčka, která je typickým místem fosforylace proteinu GLUT9 (Li et al. 2019). Z obrázku je patrné, že se v tomto místě nacházejí hned čtyři nesynonymní varianty: p.T275M, p.D281H, p.V282I a p.R294H. Podle jedné studie je sedmá transmembránová doména, ve které jsme neidentifikovali žádnou variantu, klíčová pro transportní funkci proteinu (Long et al. 2017). Synonymní varianty p.L108L, p.T125T a p.L189L jsou lokalizovány ve druhém a čtvrtém transmembránovém segmentu. V extracelulárním prostoru se nachází nesynonymní varianta p.P350L a synonymní varianta p.I168I.

4.2.5 Gen *SLC22A11*

V genu *SLC22A11* jsme detekovali dvě vzácné nesynonymní varianty, konkrétně p.V202M (*rs201209258*) a p.R343L (*rs75933978*). Kromě toho jsme ve vyšetřované kohortě zjistili přítomnost dvou vzácných synonymních variant p.T110T (*rs774860411*) a p.L496L

(rs753269187). V kohortě se vyskytla také jedna vzácná intronová varianta c.1589+54T>A (rs185640375) a dvě časté intronové varianty c.497+85A>G (rs2277312) a c.1058+53A>C (rs71456318).

Tabulka 4.15 - Výsledky sekvenování genu *SLC22A11*

| Referenční označení varianty | Změna kódující sekvence | Změna proteinové sekvence | Alelická frekvence v evropské populaci | Alelická frekvence ve světové populaci | Alelická frekvence v naší kohortě | Počet jedinců: wild type / heterozygotní / homozygotní |
|------------------------------|-------------------------|---------------------------|--|--|-----------------------------------|--|
| rs201209258 | c.604G>A | p.V202M | 0 | 0 | 0,003 | 149 / 1 / 0 |
| rs75933978 | c.1028G>T | p.R343L | 0,002 | 0,001 | 0,003 | 149 / 1 / 0 |
| rs774860411 | c.330G>A | p.T110T | 0 | < 0,001 | 0,003 | 149 / 1 / 0 |
| rs753269187 | c.1488C>G | p.L496L | 0 | 0 | 0,003 | 149 / 1 / 0 |
| rs2277312 | c.497+85A>G | --- | 0,563 | 0,453 | 0,233 | 95 / 40 / 15 |
| rs71456318 | c.1058+53A>C | --- | 0,531 | 0,235 | 0,407 | 59 / 60 / 31 |
| rs185640375 | c.1589+54T>A | --- | 0 | 0,001 | 0,003 | 149 / 1 / 0 |

4.2.5.1 Hodnocení detekovaných variant

A) Analýza pomocí predikčních programů

Tabulka 4.16 - Predikce funkčního dopadu nesynonymních variant

| Referenční označení varianty | Změna kódující sekvence | Změna proteinové sekvence | SIFT (hodnocení) | PolyPhen (hodnocení) | MutPred (hodnocení) | Mutation Taster (hodnocení) | Provean (hodnocení) |
|------------------------------|-------------------------|---------------------------|------------------|----------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|
| rs201209258 | c.604G>A | p.V202M | poškozující | benigní | benigní | benigní | benigní |
| rs75933978 | c.1028G>T | p.R343L | benigní | možná poškozující | benigní | benigní | poškozující |

Byly použity predikční programy SIFT, PolyPhen, MutPred, Mutation Taster a Provean (viz kapitola 3.5.2 Predikce funkčního dopadu variant). V tabulce je pro přehlednost uvedeno slovní hodnocení analyzovaných variant (každý program má vlastní skóre).

Podle programu SIFT je varianta p.V202M poškozující, zatímco podle ostatních použitých programů je benigní. Varianta p.R343L je možná poškozující podle hodnocení programu PolyPhen a poškozující podle programu Provean.

B) Statistická analýza

Tabulka 4.17 - Binomický test k porovnání alelické frekvence variant ve vyšetřované kohortě a v evropské populaci

| Referenční označení varianty | MAF v naší kohortě | K | p | q | Pravděpodobnost stejného výskytu mutantní alely jako je pozorovaný počet mutantních alel | Pravděpodobnost stejného nebo menšího výskytu mutantní alely v porovnání s pozorovaným počtem mutantních alel | Pravděpodobnost stejného nebo většího výskytu mutantní alely v porovnání s pozorovaným počtem mutantních alel | p-hodnota |
|------------------------------|--------------------|-----|--------------|-------|--|---|---|-------------------|
| rs201209258 | 0,003 | 1 | 0 | 1 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| rs75933978 | 0,003 | 1 | 0,002 | 0,998 | 0,3297487 | 0,87823071 | 0,45151799 | 0,897176 |
| rs774860411 | 0,003 | 1 | 0 | 1 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| rs753269187 | 0,003 | 1 | 0 | 1 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| rs2277312 | 0,233 | 70 | 0,563 | 0,437 | < 0,00000001 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,000001 |
| rs71456318 | 0,407 | 122 | 0,531 | 0,469 | 0,00000423 | 0,00001034 | 0,99999389 | 0,00002 |
| rs185640375 | 0,003 | 1 | 0 | 1 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |

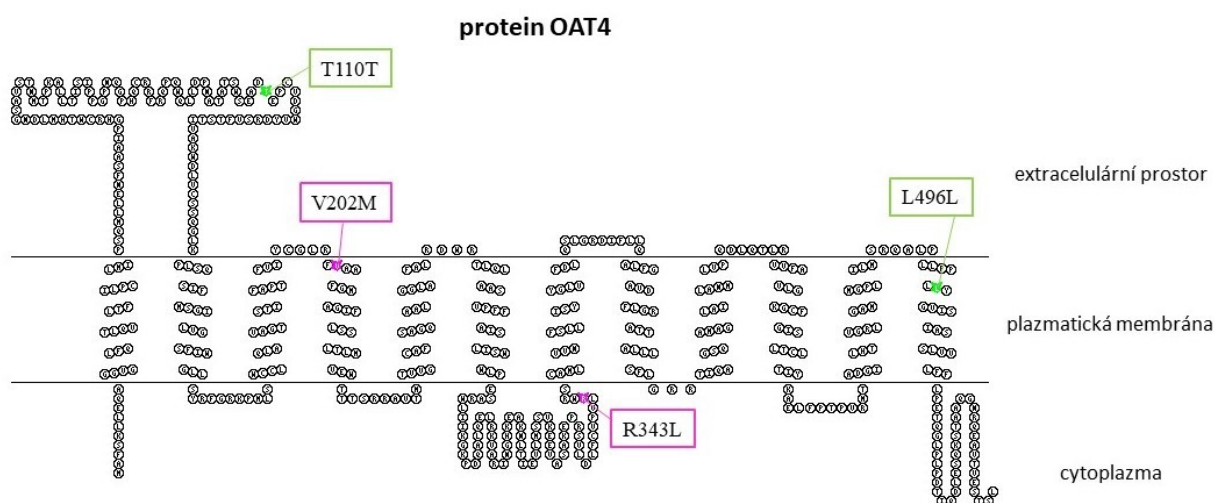
Počet alel (N) je 300. Za statisticky významnou je považovaná p-hodnota $\leq 0,0005$ (zvýrazněno tučně).

Seznam zkratk: K = počet mutantních alel, p = předpoklad výskytu mutantní alely, tedy MAF evropské populace, q = předpoklad výskytu wild type alely

Intronové varianty c.497+85A>G (*rs2277312*) a c.1058+53A>C (*rs71456318*) mají signifikantně nižší výskyt ve vyšetřované kohortě v porovnání s alelickými frekvencemi evropské populace. U variant p.V202M (*rs201209258*), p.T110T (*rs774860411*), p.L496L (*rs753269187*) a c.1589+54T>A (*rs185640375*) je v databázích Ensembl a NCBI uvedena nulová alelická frekvence, takže není překvapivé, že byl záchyt těchto variant v kohortě pacientů s primární hyperurikémií a dnou označen binomickým testem porovnávajícím MAF jako statisticky signifikantní.

C) Analýza umístění v polypeptidové struktuře

Obrázek 4.5 - Předpokládaná sekundární struktura OAT4 s detekovanými variantami



Pozice jednotlivých nesynonymních missense variant je znázorněna fialově a pozice synonymních variant je vyznačená zeleně. Topologický model byl vytvořen pomocí programu TOPO2 (Johns 2021).

Synonymní varianta p.T110T je lokalizována ve velké extracelulární smyčce, která je glykosylačním místem OAT proteinů. Nesynonymní varianta p.R343L se zase nachází v intracelulární smyčce mezi šestou a sedmou transmembránovou doménou, která je typickým místem fosforylace OAT proteinů (Li et al. 2019). Varianty p.V202M a p.L496L se vyskytují v transmembránových segmentech proteinu OAT4.

D) Porovnání s kontrolní skupinou

Tabulka 4.18 - Výsledky vyšetření variant v *SLC22A11* metodou tetra-primer ARMS-PCR

| Referenční označení varianty | Změna kódující sekvence | Změna proteinové sekvence | Počet vyšetřených vzorků | Alelická frekvence v kontrolní kohortě | Počet jedinců: wild type / heterozygotní / homozygotní |
|------------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|--|--|
| <i>rs201209258</i> | c.604G>A | p.V202M | 158 | 0,003 | 157 / 1 / 0 |
| <i>rs75933978</i> | c.1028G>T | p.R343L | 158 | 0 | 158 / 0 / 0 |

Pozn.: Metodou tetra-primer ARMS-PCR se nepodařilo vyšetřit všech 174 jedinců zařazených v kontrolní skupině. Důvodem nemožnosti vyšetřit některé vzorky byla pravděpodobně přítomnost individuálních polymorfismů v místech, kde nasedají primery navržené na tetra-primer ARMS-PCR. Proto je tedy u každé varianty uvedený počet vyšetřených vzorků z kontrolní kohorty.

Vzhledem k nulovým alelickým frekvencím varianty p.V202M v evropské i celosvětové populaci je poměrně překvapující její nález u jednoho jedince z kontrolní kohorty.

4.2.6 Gen *SLC22A13*

V kohortě jsme detekovali dvě vzácné nesynonymní varianty, u dvou pacientů to byla varianta p.R16H (*rs72542450*) a u jednoho pacienta varianta p.R102H (*rs113229654*). V kódující sekvenci jsme dále identifikovali dvě synonymní varianty, jednu častou p.A53A (*rs9842091*) a jednu vzácnou p.P186P (*rs146083340*). V nekódující části sekvence jsme našli šest intronových variant, z nichž varianta c.1346+141G>A není doposud uvedena v databázích Ensembl a NCBI.

Tabulka 4.19 - Výsledky sekvenování genu *SLC22A13*

| Referenční označení varianty | Změna kódující sekvence | Změna proteinové sekvence | Alelická frekvence v evropské populaci | Alelická frekvence ve světové populaci | Alelická frekvence v naší kohortě | Počet jedinců: wild type / heterozygotní / homozygotní |
|------------------------------|-------------------------|---------------------------|--|--|-----------------------------------|--|
|------------------------------|-------------------------|---------------------------|--|--|-----------------------------------|--|

| | | | | | | |
|--------------|---------------|---------|-------|---------|-------|--------------|
| rs72542450 | c.47G>A | p.R16H | 0,008 | 0,002 | 0,007 | 148 / 2 / 0 |
| rs113229654 | c.305G>A | p.R102H | 0,008 | 0,002 | 0,003 | 149 / 1 / 0 |
| rs9842091 | c.159T>C | p.A53A | 0,055 | 0,114 | 0,02 | 144 / 6 / 0 |
| rs146083340 | c.558C>T | p.P186P | 0,002 | 0,001 | 0,003 | 149 / 1 / 0 |
| rs41285121 | c.1022+31C>G | --- | 0,014 | 0,004 | 0,009 | 147 / 3 / 0 |
| rs551131182 | c.1346+107G>A | --- | 0,001 | < 0,001 | 0,003 | 149 / 1 / 0 |
| rs2236631 | c.1346+139C>T | --- | 0,053 | 0,034 | 0,047 | 136 / 14 / 0 |
| N/A | c.1346+141G>A | --- | N/A | N/A | 0,003 | 149 / 1 / 0 |
| rs1456539831 | c.1346+164G>A | --- | 0 | 0 | 0,003 | 149 / 1 / 0 |
| rs181912533 | c.1346+208C>T | --- | 0 | 0,003 | 0,003 | 149 / 1 / 0 |

4.2.6.1 Hodnocení detekovaných variant

A) Analýza pomocí predikčních programů

Tabulka 4.20 - Predikce funkčního dopadu nesynonymních variant

| Referenční označení varianty | Změna kódující sekvence | Změna proteinové sekvence | SIFT (hodnocení) | PolyPhen (hodnocení) | MutPred (hodnocení) | Mutation Taster (hodnocení) | Provean (hodnocení) |
|------------------------------|-------------------------|---------------------------|------------------|----------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|
| rs72542450 | c.47G>A | p.R16H | benigní | benigní | benigní | benigní | benigní |
| rs113229654 | c.305G>A | p.R102H | benigní | benigní | benigní | benigní | benigní |

Byly použity predikční programy SIFT, PolyPhen, MutPred, Mutation Taster a Provean (viz kapitola 3.5.2 Predikce funkčního dopadu variant). V tabulce je pro přehlednost uvedeno slovní hodnocení analyzovaných variant (každý program má vlastní skóre).

Žádná z nesynonymních variant v genu *SLC22A13* nemá dle použitých predikčních programů negativní dopad na funkci proteinu.

B) Statistická analýza

Tabulka 4.21 - Binomický test k porovnání alelické frekvence variant ve vyšetřované kohortě a v evropské populaci

| Referenční označení varianty | MAF v naší kohortě | K | p | q | Pravděpodobnost stejného výskytu mutantní alely jako je pozorovaný počet mutantních alel | Pravděpodobnost stejného nebo menšího výskytu mutantní alely v porovnání s pozorovaným počtem mutantních alel | Pravděpodobnost stejného nebo většího výskytu mutantní alely v porovnání s pozorovaným počtem mutantních alel | p-hodnota |
|------------------------------|--------------------|---|-------|-------|--|---|---|-----------|
| rs72542450 | 0,007 | 2 | 0,008 | 0,992 | 0,26207206 | 0,56928947 | 0,69278259 | 0,948326 |
| rs113229654 | 0,003 | 1 | 0,008 | 0,992 | 0,21737081 | 0,30721741 | 0,9101534 | 0,559702 |
| rs9842091 | 0,02 | 6 | 0,055 | 0,945 | 0,00159468 | 0,00235839 | 0,99923629 | 0,011326 |

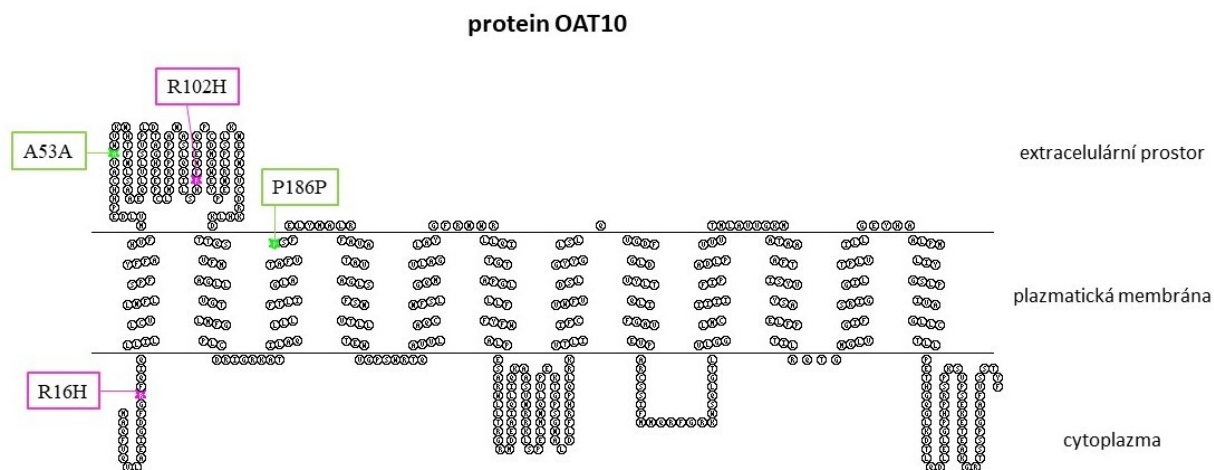
| | | | | | | | | |
|---------------------|--------------|----|-------|-------|--------------|--------------|--------------|-------------------|
| <i>rs146083340</i> | 0,003 | 1 | 0,002 | 0,998 | 0,3297487 | 0,87823071 | 0,45151799 | 0,897176 |
| <i>rs41285121</i> | 0,009 | 3 | 0,014 | 0,986 | 0,18564587 | 0,39383608 | 0,7918098 | 0,73086 |
| <i>rs551131182</i> | 0,003 | 1 | 0,001 | 0,999 | 0,22243454 | 0,96314158 | 0,25929297 | 0,714864 |
| <i>rs2236631</i> | 0,047 | 14 | 0,053 | 0,947 | 0,09582696 | 0,37198698 | 0,72383998 | 0,718256 |
| <i>rs1456539831</i> | 0,003 | 1 | 0 | 1 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| <i>rs181912533</i> | 0,003 | 1 | 0 | 1 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |

Počet alel (N) je 300. Za statisticky významnou je považovaná p-hodnota $\leq 0,0005$ (zvýrazněno tučně). Seznam zkratk: K = počet mutantních alel, p = předpoklad výskytu mutantní alely, tedy MAF evropské populace, q = předpoklad výskytu wild type alely

Ve vyšetřované kohortě se vždy u jednoho pacienta vyskytly intronové varianty c.1346+164G>A (*rs1456539831*) a c.1346+208C>T (*rs181912533*), jejichž alelická frekvence v evropské populaci je nulová. Binomický test tedy ukázal předpokládaný výsledek, že jejich záchyt ve vyšetřované kohortě je statisticky významný.

C) Analýza umístění v polypeptidové struktuře

Obrázek 4.6 - Předpokládaná sekundární struktura OAT10 s detekovanými variantami



Pozice jednotlivých nesynonymních missense variant je znázorněna fialově a pozice synonymních variant je vyznačena zeleně. Topologický model byl vytvořen pomocí programu TOPO2 (Johns 2021).

Protein OAT10 zahrnuje celkem 551 aminokyselin a z jeho modelu je patrné, že se všechny varianty v kódující oblasti genu nacházejí v první třetině polypeptidového řetězce od jeho N-konce. Nesynonymní varianta p.R16H je lokalizována v intracelulárním prostoru. Synonymní varianta p.A53A a nesynonymní varianta p.R102H se nacházejí v extracelulárním prostoru ve

velké smyčce, ve které jsou přítomná mnohá glykosylační místa (Li et al. 2019). Synonymní varianta p.P186P je součástí třetího transmembránového segmentu.

D) Porovnání s kontrolní skupinou

Tabulka 4.22 - Výsledky vyšetření variant v *SLC22A13* metodou tetra-primer ARMS-PCR

| Referenční označení varianty | Změna kódující sekvence | Změna proteinové sekvence | Počet vyšetřených vzorků | Alelická frekvence v kontrolní kohortě | Počet jedinců: wild type / heterozygotní / homozygotní |
|------------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|--|--|
| rs72542450 | c.47G>A | p.R16H | 158 | 0,009 | 155 / 3 / 1 |
| rs113229654 | c.305G>A | p.R102H | 158 | 0,003 | 157 / 1 / 0 |

Pozn.: Metodou tetra-primer ARMS-PCR se nepodařilo vyšetřit všech 174 jedinců zařazených v kontrolní skupině. Důvodem nemožnosti vyšetřit některé vzorky byla pravděpodobně přítomnost individuálních polymorfismů v místech, kde nasedají primery navržené na tetra-primer ARMS-PCR. Proto je tedy u každé varianty uvedený počet vyšetřených vzorků z kontrolní kohorty.

Alelické frekvence v kontrolní kohortě jsou srovnatelné s alelickými frekvencemi v kohortě pacientů s primární hyperurikémií a dnou i s údaji výskytu v evropské populaci.

4.2.7 Gen *SLC17A1*

V kódující části genu jsme detekovali pouze jednu variantu p.T269I (*rs1165196*).

V nekódující části genu analýza odhalila pět častých a dvě vzácné varianty.

Tabulka 4.23 - Výsledky sekvenování genu *SLC17A1*

| Referenční označení varianty | Změna kódující sekvence | Změna proteinové sekvence | Alelická frekvence v evropské populaci | Alelická frekvence ve světové populaci | Alelická frekvence v naší kohortě | Počet jedinců: wild type / heterozygotní / homozygotní |
|------------------------------|-------------------------|---------------------------|--|--|-----------------------------------|--|
| <i>rs1165196</i> | c.806C>T | p.T269I | 0,565 | 0,719 | 0,45 | 47 / 71 / 32 |
| <i>rs115398536</i> | c.207+115C>T | ---- | 0,013 | 0,018 | 0,003 | 149 / 1 / 0 |
| <i>rs373732735</i> | c.207+40C>T | ---- | 0,001 | 0,001 | 0,003 | 149 / 1 / 0 |
| <i>rs200114666</i> | c.208-14C>T | ---- | 0,004 | 0,005 | 0,007 | 148 / 2 / 0 |
| <i>rs10498730</i> | c.898-71T>C | ---- | 0,055 | 0,026 | 0,053 | 135 / 14 / 1 |
| <i>rs1165210</i> | c.1269+61A>G | ---- | 0,954 | 0,983 | 0,037 | 141 / 7 / 2 |
| <i>rs1165209</i> | c.1179-111C>T | ---- | 0,565 | 0,72 | 0,367 | 65 / 60 / 25 |
| <i>rs1165215</i> | c.*2+79C>T | ---- | 0,565 | 0,72 | 0,46 | 45 / 72 / 33 |

4.2.7.1 Hodnocení detekovaných variant

A) Analýza pomocí predikčních programů

Tabulka 4.24 - Predikce funkčního dopadu nesynonymních variant

| Referenční označení varianty | Změna kódující sekvence | Změna proteinové sekvence | SIFT (hodnocení) | PolyPhen (hodnocení) | MutPred (hodnocení) | Mutation Taster (hodnocení) | Provean (hodnocení) |
|------------------------------|-------------------------|---------------------------|------------------|----------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|
| <i>rs1165196</i> | c.806C>T | p.T269I | benigní | benigní | benigní | benigní | benigní |

Byly použity predikční programy SIFT, PolyPhen, MutPred, Mutation Taster a Provean (viz kapitola 3.5.2 Predikce funkčního dopadu variant). V tabulce je pro přehlednost uvedeno slovní hodnocení analyzovaných variant (každý program má vlastní skóre).

Predikčními programy jsme došli k jednotnému výsledku, že je varianta p.T269I benigní, což se dalo předpokládat vzhledem k jejímu častému výskytu (MAF v evropské populaci je 0,565).

B) Statistická analýza

Tabulka 4.25 - Binomický test k porovnání alelické frekvence variant ve vyšetřované kohortě a v evropské populaci

| Referenční označení varianty | MAF v naší kohortě | K | p | q | Pravděpodobnost stejného výskytu mutantní alely jako je pozorovaný počet mutantních alel | Pravděpodobnost stejného nebo menšího výskytu mutantní alely v porovnání s pozorovaným počtem mutantních alel | Pravděpodobnost stejného nebo většího výskytu mutantní alely v porovnání s pozorovaným počtem mutantních alel | p-hodnota |
|------------------------------|--------------------|-----|--------------|-------|--|---|---|-------------------|
| <i>rs1165196</i> | 0,45 | 135 | 0,565 | 0,435 | 0,00001581 | 0,00004092 | 0,99997489 | 0,000076 |
| <i>rs115398536</i> | 0,003 | 1 | 0,013 | 0,987 | 0,07796385 | 0,0976947 | 0,98026915 | 0,22123 |
| <i>rs373732735</i> | 0,003 | 1 | 0,001 | 0,999 | 0,22243454 | 0,96314158 | 0,25929297 | 0,714864 |
| <i>rs200114666</i> | 0,007 | 2 | 0,004 | 0,996 | 0,21735282 | 0,87983549 | 0,33751733 | 0,548822 |
| <i>rs10498730</i> | 0,053 | 16 | 0,055 | 0,945 | 0,10115046 | 0,51509415 | 0,58605631 | 1 |
| <i>rs1165210</i> | 0,037 | 11 | 0,954 | 0,046 | < 0,00000001 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,000001 |
| <i>rs1165209</i> | 0,367 | 110 | 0,565 | 0,435 | < 0,00000001 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,000001 |
| <i>rs1165215</i> | 0,46 | 138 | 0,565 | 0,435 | 0,00005943 | 0,000164 | 0,99989543 | 0,000306 |

Počet alel (N) je 300. Za statisticky významnou je považovaná p-hodnota $\leq 0,0005$ (zvýrazněno tučně).

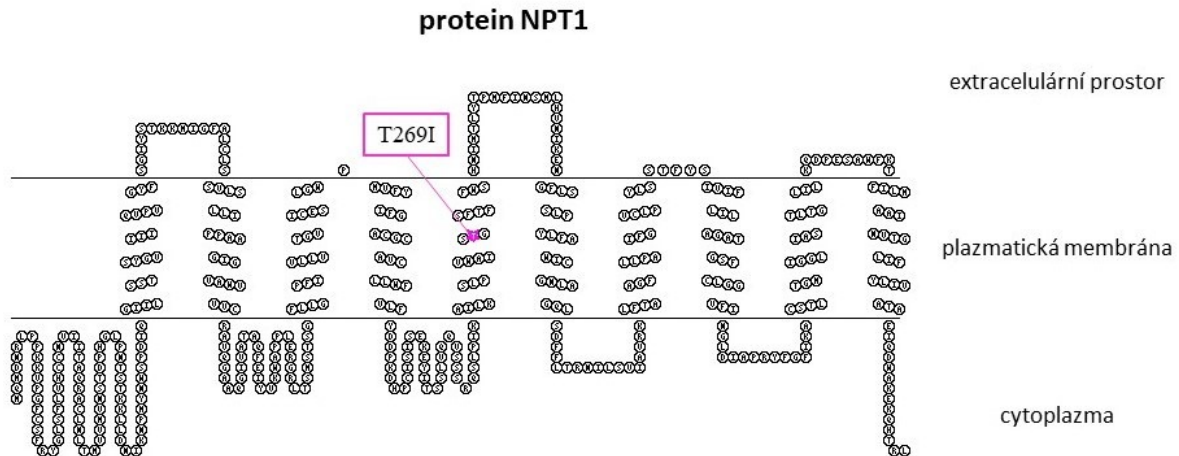
Seznam zkratk: K = počet mutantních alel, p = předpoklad výskytu mutantní alely, tedy MAF evropské populace, q = předpoklad výskytu wild type alely

Signifikantně nižší alelická frekvence v naší kohortě byla zjištěna u čtyř variant, konkrétně u p.T269I (*rs1165196*), c.1269+61A>G (*rs1165210*), c.1179-111C>T (*rs1165209*) a c.*2+79C>T (*rs1165215*). Překvapivě velký rozdíl v alelické frekvenci je především u

varianty c.1269+61A>G (MAF v kohortě pacientů je 0,037 versus MAF v evropské populaci je 0,954).

C) Analýza umístění v polypeptidové struktuře

Obrázek 4.7 - Předpokládaná sekundární struktura NPT1 s detekovanými variantami



Pozice nesynonymní missense varianty je znázorněná fialově. Topologický model byl vytvořen pomocí programu TOPO2 (Johns 2021).

Jediná nesynonymní varianta p.T269I se nachází v transmembránové oblasti proteinu, konkrétně v pátém transmembránovém segmentu.

4.2.8 Gen *SLC17A3*

V kohortě pacientů s hyperurikémií a dnou se vyskytly dvě časté nesynonymní varianty p.A100T (*rs1165165*) a p.G279R (*rs56027330*) a dále jedna běžná synonymní varianta p.S448S (*rs942379*). Ze sedmi detekovaných intronových variant byly jen dvě časté.

Tabulka 4.26 - Výsledky sekvenování genu *SLC17A3*

| Referenční označení varianty | Změna kódující sekvence | Změna proteinové sekvence | Alelická frekvence v evropské populaci | Alelická frekvence ve světové populaci | Alelická frekvence v naší kohortě | Počet jedinců: wild type / heterozygotní / homozygotní |
|------------------------------|-------------------------|---------------------------|--|--|-----------------------------------|--|
| <i>rs1165165</i> | c.298G>A | p.A100T | 0,228 | 0,216 | 0,29 | 75 / 63 / 12 |
| <i>rs56027330</i> | c.835G>A | p.G279R | 0,136 | 0,069 | 0,153 | 105 / 44 / 1 |
| <i>rs942379</i> | c.1344T>C | p.S448S | 0,539 | 0,703 | 0,553 | 33 / 68 / 49 |
| <i>rs78088212</i> | c.-33-97G>A | --- | 0,007 | 0,006 | 0,007 | 148 / 2 / 0 |
| <i>rs776724707</i> | c.625+46C>T | --- | 0 | 0 | 0,007 | 148 / 2 / 0 |
| <i>rs1165189</i> | c.1272-87T>G | --- | 0,251 | 0,226 | 0,3 | 71 / 68 / 11 |
| <i>rs536316856</i> | c.1362+115T>C | --- | 0,001 | < 0,001 | 0,007 | 148 / 2 / 0 |
| <i>rs1165188</i> | c.1272-146T>C | --- | 0,023 | 0,085 | 0,017 | 145 / 5 / 0 |
| <i>rs201755694</i> | c.1272-47T>G | --- | 0,001 | < 0,001 | 0,003 | 149 / 1 / 0 |

| | | | | | | |
|-------------|--------------|-----|-------|---------|-------|-------------|
| rs534795478 | c.1362+60T>G | --- | 0,001 | < 0,001 | 0,003 | 149 / 1 / 0 |
|-------------|--------------|-----|-------|---------|-------|-------------|

4.2.8.1 Hodnocení detekovaných variant

A) Analýza pomocí predikčních programů

Tabulka 4.27 - Predikce funkčního dopadu nesynonymních variant

| Referenční označení varianty | Změna kódující sekvence | Změna proteinové sekvence | SIFT (hodnocení) | PolyPhen (hodnocení) | MutPred (hodnocení) | Mutation Taster (hodnocení) | Provean (hodnocení) |
|------------------------------|-------------------------|---------------------------|------------------|----------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|
| rs1165165 | c.298G>A | p.A100T | benigní | benigní | benigní | benigní | benigní |
| rs56027330 | c.835G>A | p.G279R | benigní | benigní | benigní | benigní | benigní |

Byly použity predikční programy SIFT, PolyPhen, MutPred, Mutation Taster a Provean (viz kapitola 3.5.2 Predikce funkčního dopadu variant). V tabulce je pro přehlednost uvedeno slovní hodnocení analyzovaných variant (každý program má vlastní skóre).

Podle výsledků predikčních programů nemá ani jedna ze dvou identifikovaných nesynonymních variant negativní dopad na funkci proteinu.

B) Statistická analýza

Tabulka 4.28 - Binomický test k porovnání alelické frekvence variant ve vyšetřované kohortě a v evropské populaci

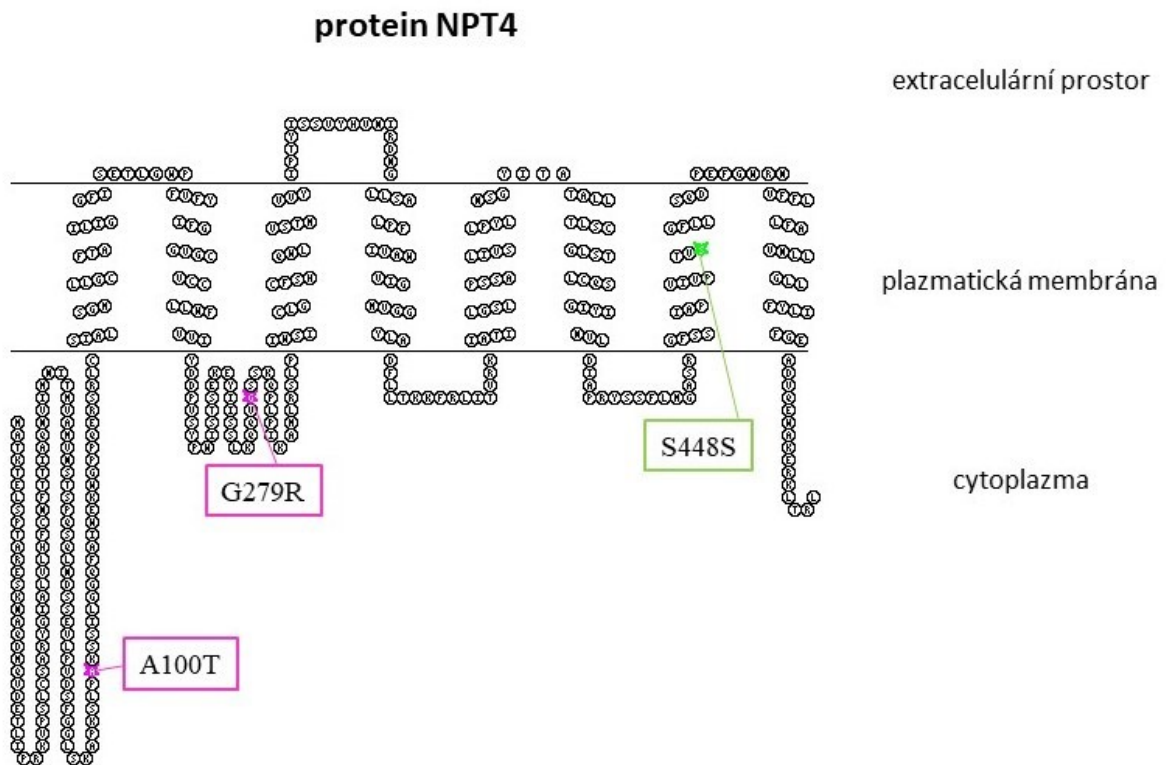
| Referenční označení varianty | MAF v naší kohortě | K | p | q | Pravděpodobnost stejného výskytu mutantní alely jako je pozorovaný počet mutantních alel | Pravděpodobnost stejného nebo menšího výskytu mutantní alely v porovnání s pozorovaným počtem mutantních alel | Pravděpodobnost stejného nebo většího výskytu mutantní alely v porovnání s pozorovaným počtem mutantních alel | p-hodnota |
|------------------------------|--------------------|-----|-------|-------|--|---|---|----------------------|
| rs1165165 | 0,29 | 87 | 0,228 | 0,772 | 0,0022973 | 0,99483039 | 0,00746692 | 0,012744 |
| rs56027330 | 0,153 | 46 | 0,136 | 0,864 | 0,04404522 | 0,83201216 | 0,21203307 | 0,428588 |
| rs942379 | 0,553 | 166 | 0,539 | 0,461 | 0,04088336 | 0,7104841 | 0,33039926 | 0,659846 |
| rs78088212 | 0,007 | 2 | 0,007 | 0,993 | 0,27091595 | 0,64953741 | 0,62137854 | 0,781782 |
| rs776724707 | 0,007 | 2 | 0 | 1 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| rs1165189 | 0,3 | 90 | 0,251 | 0,749 | 0,00796345 | 0,97689089 | 0,03107256 | 0,058648 |
| rs536316856 | 0,007 | 2 | 0,001 | 0,999 | 0,03328725 | 0,99642883 | 0,03685842 | 0,02838 |
| rs1165188 | 0,017 | 5 | 0,023 | 0,977 | 0,13164704 | 0,3107562 | 0,82089084 | 0,589744 |
| rs201755694 | 0,003 | 1 | 0,001 | 0,999 | 0,22243454 | 0,96314158 | 0,25929297 | 0,714864 |
| rs534795478 | 0,003 | 1 | 0,001 | 0,999 | 0,22243454 | 0,96314158 | 0,25929297 | 0,714864 |

Počet alel (N) je 300. Za statisticky významnou je považovaná p-hodnota $\leq 0,0005$ (zvýrazněno tučně).
Seznam zkratk: K = počet mutantních alel, p = předpoklad výskytu mutantní alely, tedy MAF evropské populace, q = předpoklad výskytu wild type alely

U dvou pacientů byla detekována heterozygotní intronová varianta c.625+46C>T (*rs776724707*), která má dle databází nulovou alelickou frekvenci v evropské i v celosvětové populaci. Není tedy překvapivé, že dle výsledků binomického testu je vyšší výskyt této varianty v kohortě pacientů s hyperurikémií a dnou statisticky významný.

C) Analýza umístění v polypeptidové struktuře

Obrázek 4.8 - Předpokládaná sekundární struktura NPT4 s detekovanými variantami



Pozice jednotlivých nesynonymních missense variant je znázorněná fialově a pozice synonymní varianty je vyznačená zeleně. Topologický model byl vytvořen pomocí programu TOPO2 (Johns 2021).

Obě nesynonymní varianty se nacházejí v intracelulárním prostoru, zatímco synonymní varianta p.S448S je součástí transmembránového segmentu.

4.2.9 Gen *SLC22A6*

V kohortě jedinců s hyperurikémií a dnou jsme identifikovali pouze jednu vzácnou nesynonymní variantu p.P104L (*rs11568627*). Dvě časté synonymní varianty p.P84P (*rs11568628*) a p.P117P (*rs11568629*) se vyskytly vždy současně (žádný pacient neměl pouze

jednu z těchto variant). Kromě toho jsme u jednoho pacienta našli vzácnou synonymní variantu p.Y111Y (*rs756195374*). Dále jsme detekovali tři časté a šest vzácných intronových variant. Intronová varianta c.797+8G>A (*rs1323492446*) se nachází v oblasti, která má vliv na sestřih proteinu.

Tabulka 4.29 - Výsledky sekvenování genu *SLC22A6*

| Referenční označení varianty | Změna kódující sekvence | Změna proteinové sekvence | Alelická frekvence v evropské populaci | Alelická frekvence ve světové populaci | Alelická frekvence v naší kohortě | Počet jedinců: wild type / heterozygotní / homozygotní |
|------------------------------|-------------------------|---------------------------|--|--|-----------------------------------|--|
| <i>rs11568627</i> | c.311C>T | p.P104L | 0,005 | 0,001 | 0,007 | 148 / 2 / 0 |
| <i>rs11568628</i> | c.252G>T | p.P84P | 0,068 | 0,023 | 0,09 | 125 / 23 / 2 |
| <i>rs11568629</i> | c.351A>G | p.P117P | 0,065 | 0,022 | 0,09 | 125 / 23 / 2 |
| <i>rs756195374</i> | c.333T>C | p.Y111Y | 0 | 0 | 0,003 | 149 / 1 / 0 |
| <i>rs10897312</i> | c.369+136C>T | --- | 0,082 | 0,211 | 0,067 | 130 / 20 / 0 |
| <i>rs1323492446</i> | c.797+8G>A | --- | 0 | 0 | 0,007 | 148 / 2 / 0 |
| <i>rs11568614</i> | c.798-57C>G | --- | < 0,001 | 0,001 | 0,007 | 148 / 2 / 0 |
| <i>rs2276300</i> | c.921+33C>T | --- | 0,001 | 0,034 | 0,009 | 147 / 3 / 0 |
| <i>rs369866532</i> | c.922-28G>A | --- | 0 | 0 | 0,003 | 149 / 1 / 0 |
| <i>rs3017671</i> | 1252+61T>C | --- | 1 | 0,996 | 1 | 0 / 0 / 150 |
| <i>rs11568633</i> | c.1361+56C>T | --- | 0,027 | 0,009 | 0,009 | 147 / 3 / 0 |
| <i>rs1031587383</i> | c.1361+25T>C | --- | N/A | N/A | 0,003 | 149 / 1 / 0 |
| <i>rs3017670</i> | c.1362-172T>C | --- | 0,842 | 0,846 | 0,137 | 127 / 5 / 18 |

4.2.9.1 Hodnocení detekovaných variant

A) Analýza pomocí predikčních programů

Tabulka 4.30 - Predikce funkčního dopadu nesynonymních variant

| Referenční označení varianty | Změna kódující sekvence | Změna proteinové sekvence | SIFT (hodnocení) | PolyPhen (hodnocení) | MutPred (hodnocení) | Mutation Taster (hodnocení) | Provean (hodnocení) |
|------------------------------|-------------------------|---------------------------|------------------|----------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|
| <i>rs11568627</i> | c.311C>T | p.P104L | poškozující | možná poškozující | benigní | poškozující | poškozující |

Byly použity predikční programy SIFT, PolyPhen, MutPred, Mutation Taster a Provean (viz kapitola 3.5.2 Predikce funkčního dopadu variant). V tabulce je pro přehlednost uvedeno slovní hodnocení analyzovaných variant (každý program má vlastní skóre).

In silico predikce naznačuje, že má varianta p.P104L negativní dopad na funkci proteinu.

B) Statistická analýza

Tabulka 4.31 - Binomický test k porovnání alelické frekvence variant ve vyšetřované kohortě a v evropské populaci

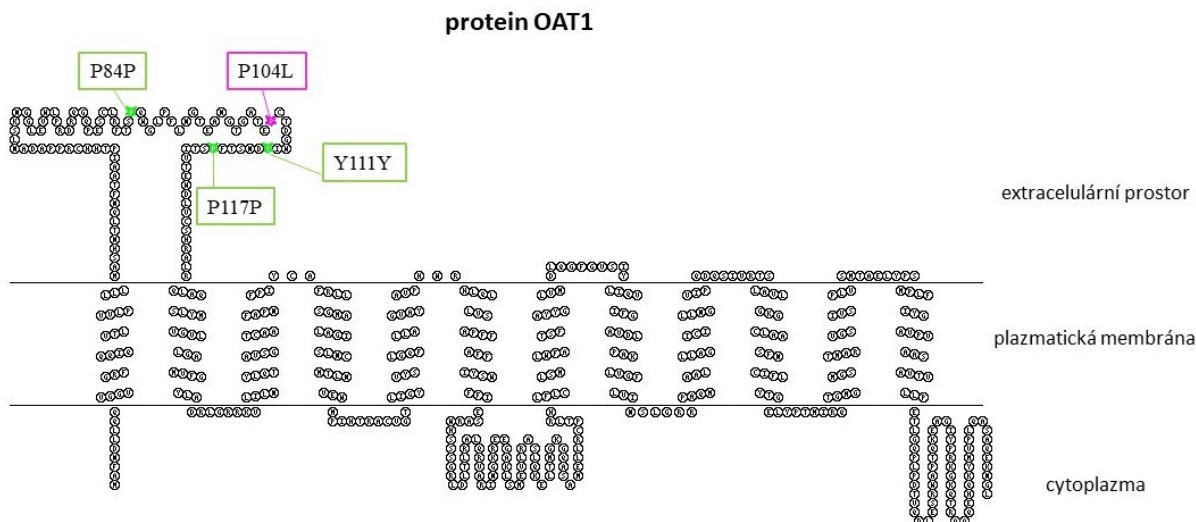
| Referenční označení varianty | MAF v naší kohortě | K | p | q | Pravděpodobnost stejného výskytu mutantní alely jako je pozorovaný počet mutantních alel | Pravděpodobnost stejného nebo menšího výskytu mutantní alely v porovnání s pozorovaným počtem mutantních alel | Pravděpodobnost stejného nebo většího výskytu mutantní alely v porovnání s pozorovaným počtem mutantních alel | p-hodnota |
|------------------------------|--------------------|-----|--------------|-------|--|---|---|-------------------|
| <i>rs11568627</i> | 0,007 | 2 | 0,005 | 0,995 | 0,2517564 | 0,80916247 | 0,44259393 | 1 |
| <i>rs11568628</i> | 0,09 | 27 | 0,068 | 0,932 | 0,02817034 | 0,94327421 | 0,08489613 | 0,161824 |
| <i>rs11568629</i> | 0,09 | 27 | 0,065 | 0,935 | 0,02003262 | 0,96431987 | 0,05571275 | 0,101138 |
| <i>rs756195374</i> | 0,003 | 1 | 0 | 1 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| <i>rs10897312</i> | 0,067 | 20 | 0,082 | 0,918 | 0,05588743 | 0,19606899 | 0,85981845 | 0,388264 |
| <i>rs1323492446</i> | 0,007 | 2 | 0 | 1 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| <i>rs11568614</i> | 0,007 | 2 | < 0,001 | 1 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| <i>rs2276300</i> | 0,009 | 3 | 0,001 | 0,999 | 0,00330984 | 0,99973867 | 0,00357117 | 0,000058 |
| <i>rs369866532</i> | 0,003 | 1 | 0 | 1 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| <i>rs3017671</i> | 1 | 300 | 1 | 0 | > 0,99999999 | > 0,99999999 | > 0,99999999 | 1 |
| <i>rs11568633</i> | 0,009 | 3 | 0,027 | 0,973 | 0,0258501 | 0,03776039 | 0,98808971 | 0,101308 |
| <i>rs3017670</i> | 0,137 | 41 | 0,842 | 0,158 | < 0,00000001 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,000001 |

Počet alel (N) je 300. Za statisticky významnou je považovaná p-hodnota $\leq 0,0005$ (zvýrazněno tučně). Seznam zkratk: K = počet mutantních alel, p = předpoklad výskytu mutantní alely, tedy MAF evropské populace, q = předpoklad výskytu wild type alely

Binomický test odhalil u pěti vzácných variant statisticky významnou vyšší alelickou frekvenci v porovnání s evropskou populací. Konkrétně se jedná o varianty p.Y111Y (*rs756195374*), c.797+8G>A (*rs1323492446*), c.798-57C>G (*rs11568614*), c.921+33C>T (*rs2276300*) a c.922-28G>A (*rs369866532*). Naopak signifikantně nižší byla alelická frekvence u časté intronové varianty c.1362-172T>C (*rs3017670*, MAF v naší kohortě 0,137 versus MAF v evropské populaci 0,842).

C) Analýza umístění v polypeptidové struktuře

Obrázek 4.9 - Předpokládaná sekundární struktura OAT1 s detekovanými variantami



Pozice jednotlivých nesynonymních missense variant je znázorněna fialově a pozice synonymních variant je vyznačena zeleně. Topologický model byl vytvořen pomocí programu TOPO2 (Johns 2021).

Z modelu proteinu je patrné, že všechny nesynonymní a synonymní varianty se nacházejí v extracelulární smyčce, ve které se nacházejí mnohá glykosylační místa (Li et al. 2019).

D) Porovnání s kontrolní skupinou

Tabulka 4.32 - Výsledky vyšetření variant v *SLC22A6* metodou tetra-primer ARMS-PCR

| Referenční označení varianty | Změna kódující sekvence | Změna proteinové sekvence | Počet vyšetřených vzorků | Alelická frekvence v kontrolní kohortě | Počet jedinců: wild type / heterozygotní / homozygotní |
|------------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|--|--|
| <i>rs11568627</i> | c.311C>T | p.P104L | 158 | 0,006 | 156 / 2 / 0 |

Pozn.: Metodou tetra-primer ARMS-PCR se podařilo vyšetřit všech 174 jedinců zařazených v kontrolní skupině. Důvodem nemožnosti vyšetřit některé vzorky byla pravděpodobně přítomnost individuálních polymorfismů v místech, kde nasedají primery navržené na tetra-primer ARMS-PCR. Varianta p.P104L byla vyšetřena u 158 vzorků z kontrolní kohorty.

Alelická frekvence v kontrolní kohortě je prakticky totožná s alelickými frekvencemi v kohortě pacientů i v evropské populaci.

4.2.10 Gen *SLC22A8*

V genu *SLC22A8* jsme detekovali tři vzácné nesynonymní jednonukleotidové varianty p.R149C (*rs45566039*), p.V448I (*rs11568486*) a p.R513G (*rs145474422*). V analyzovaných vzorcích se dále vyskytovaly tři synonymní jednonukleotidové záměny, z nichž se p.L317L (*rs57743826*) vyskytuje vzácně, p.T241T (*rs2276299*) se vyskytuje běžně a alelická

frekvence pro variantu p.P51P (*rs4149180*) se značně liší mezi evropskou a celosvětovou populací (0,027 versus 0,191). V kohortě jsme dále detekovali dvě časté intronové varianty c.437+79G>C (*rs4149182*) a c.1326-62G>A (*rs2187384*). U jednoho pacienta byla nalezena jednonukleotidová intronová záměna c.728+133T>C, která dosud není uvedena ve veřejně dostupných databázích NCBI a Ensembl. V kohortě byla detekována také intronová varianta c.1326-4G>A (*rs767079100*), která zřejmě vede k alternativnímu sestřihu.

Tabulka 4.33 - Výsledky sekvenování genu *SLC22A8*

| Referenční označení varianty | Změna kódující sekvence | Změna proteinové sekvence | Alelická frekvence v evropské populaci | Alelická frekvence ve světové populaci | Alelická frekvence v naší kohortě | Počet jedinců: wild type / heterozygotní / homozygotní |
|------------------------------|-------------------------|---------------------------|--|--|-----------------------------------|--|
| <i>rs45566039</i> | c.445C>T | p.R149C | 0 | 0 | 0,003 | 149 / 1 / 0 |
| <i>rs11568486</i> | c.1342G>A | p.V448I | 0,015 | 0,005 | 0,007 | 148 / 2 / 0 |
| <i>rs145474422</i> | c.1538G>A | p.R513G | 0,003 | 0,001 | 0,007 | 148 / 2 / 0 |
| <i>rs4149180</i> | c.153G>A | p.P51P | 0,027 | 0,191 | 0,033 | 140 / 10 / 0 |
| <i>rs2276299</i> | c.723T>A | p.T241T | 0,181 | 0,186 | 0,14 | 112 / 34 / 4 |
| <i>rs57743826</i> | c.951G>A | p.L317L | 0,015 | 0,005 | 0,01 | 147 / 3 / 0 |
| <i>rs4149182</i> | c.437+79G>C | ---- | 0,211 | 0,261 | 0,26 | 86 / 50 / 14 |
| N/A | c.728+133T>C | ---- | N/A | N/A | 0,003 | 149 / 1 / 0 |
| <i>rs2187384</i> | c.1326-62G>A | ---- | 0,192 | 0,132 | 0,247 | 89 / 48 / 13 |
| <i>rs767079100</i> | c.1326-4G>A | ---- | 0 | 0 | 0,003 | 149 / 1 / 0 |

4.2.10.1 Hodnocení detekovaných variant

A) Analýza pomocí predikčních programů

Tabulka 4.34 - Predikce funkčního dopadu nesynonymních variant

| Referenční označení varianty | Změna kódující sekvence | Změna proteinové sekvence | SIFT (hodnocení) | PolyPhen (hodnocení) | MutPred (hodnocení) | Mutation Taster (hodnocení) | Provean (hodnocení) |
|------------------------------|-------------------------|---------------------------|------------------|----------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|
| <i>rs45566039</i> | c.445C>T | p.R149C | poškozující | poškozující | poškozující | poškozující | poškozující |
| <i>rs11568486</i> | c.1342G>A | p.V448I | benigní | benigní | benigní | benigní | benigní |
| <i>rs145474422</i> | c.1538G>A | p.R513G | benigní | benigní | benigní | benigní | benigní |

Byly použity predikční programy SIFT, PolyPhen, MutPred, Mutation Taster a Provean (viz kapitola 3.5.2 Predikce funkčního dopadu variant). V tabulce je pro přehlednost uvedeno slovní hodnocení analyzovaných variant (každý program má vlastní skóre).

Ze tří nesynonymních jednonukleotidových variant má dle všech predikčních programů negativní dopad na funkci proteinu varianta p.R149C.

B) Statistická analýza

Tabulka 4.35 - Binomický test k porovnání alelické frekvence variant ve vyšetřované kohortě a v evropské populaci

| Referenční označení varianty | MAF v naší kohortě | K | p | q | Pravděpodobnost stejného výskytu mutantní alely jako je pozorovaný počet mutantních alel | Pravděpodobnost stejného nebo menšího výskytu mutantní alely v porovnání s pozorovaným počtem mutantních alel | Pravděpodobnost stejného nebo většího výskytu mutantní alely v porovnání s pozorovaným počtem mutantních alel | p-hodnota |
|------------------------------|--------------------|----|-------|-------|--|---|---|-------------------|
| <i>rs45566039</i> | 0,003 | 1 | 0 | 1 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |
| <i>rs11568486</i> | 0,007 | 2 | 0,015 | 0,985 | 0,11167132 | 0,1714587 | 0,94021262 | 0,342132 |
| <i>rs145474422</i> | 0,007 | 2 | 0,003 | 0,997 | 0,16487778 | 0,93741545 | 0,22746233 | 0,526468 |
| <i>rs4149180</i> | 0,033 | 10 | 0,027 | 0,973 | 0,10279405 | 0,80850073 | 0,29429332 | 0,618 |
| <i>rs2276299</i> | 0,14 | 42 | 0,181 | 0,819 | 0,01078757 | 0,03529503 | 0,97549255 | 0,076818 |
| <i>rs57743826</i> | 0,01 | 3 | 0,015 | 0,985 | 0,16892413 | 0,34038284 | 0,8285413 | 0,6348 |
| <i>rs4149182</i> | 0,26 | 78 | 0,211 | 0,789 | 0,00672208 | 0,98244338 | 0,0242787 | 0,044504 |
| <i>rs2187384</i> | 0,247 | 74 | 0,192 | 0,808 | 0,00355838 | 0,9920226 | 0,01153578 | 0,01977 |
| <i>rs767079100</i> | 0,003 | 1 | 0 | 1 | < 0,00000001 | > 0,99999999 | < 0,00000001 | < 0,000001 |

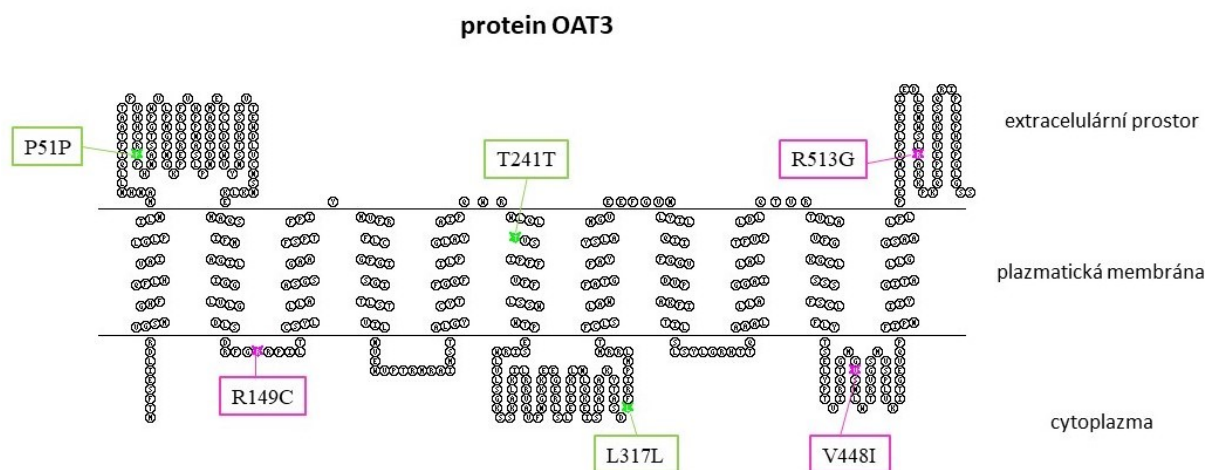
Počet alel (N) je 300. Za statisticky významnou je považovaná p-hodnota $\leq 0,0005$ (zvýrazněno tučně).

Seznam zkratk: K = počet mutantních alel, p = předpoklad výskytu mutantní alely, tedy MAF evropské populace, q = předpoklad výskytu wild type alely

Binomický test ukázal, že výskyt velmi vzácných variant p.R149C (*rs45566039*) a c.1326-4G>A (*rs767079100*) ve vyšetřované kohortě je statisticky významný v porovnání s alelickými frekvencemi v evropské populaci, které jsou podle dostupných databází rovny nule.

C) Analýza umístění v polypeptidové struktuře

Obrázek 4.10 - Předpokládaná sekundární struktura OAT3 s detekovanými variantami



Pozice jednotlivých nesynonymních missense variant je znázorněná fialově a pozice synonymních variant je vyznačená zeleně. Topologický model byl vytvořen pomocí programu TOPO2 (Johns 2021).

Nesynonymní i synonymní varianty jsou rozptýleny ve struktuře proteinu bez zjevné tendence k výskytu v určitých oblastech. Synonymní varianta p.P51P se nachází extracelulárně v oblasti, kde se u OAT proteinů typicky nacházejí glykosylační místa, zatímco intracelulární smyčka se synonymní variantou p.L317L je charakteristická přítomností fosforylovaných zbytků (Li et al. 2019).

D) Porovnání s kontrolní skupinou

Tabulka 4.36 - Výsledky vyšetření variant v *SLC22A8* metodou tetra-primer ARMS-PCR

| Referenční označení varianty | Změna kódující sekvence | Změna proteinové sekvence | Počet vyšetřených vzorků | Alelická frekvence v kontrolní kohortě | Počet jedinců: wild type / heterozygotní / homozygotní |
|------------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|--|--|
| <i>rs45566039</i> | c.445C>T | p.R149C | 146 | 0 | 146 / 0 / 0 |
| <i>rs11568486</i> | c.1342G>A | p.V448I | 158 | 0,003 | 157 / 1 / 0 |
| <i>rs145474422</i> | c.1538G>A | p.R513G | 158 | 0,006 | 156 / 2 / 0 |

Pozn.: Metodou tetra-primer ARMS-PCR se nepodařilo vyšetřit všech 174 jedinců zařazených v kontrolní skupině. Důvodem nemožnosti vyšetřit některé vzorky byla pravděpodobně přítomnost individuálních polymorfismů v místech, kde nasedají primery navržené na tetra-primer ARMS-PCR. Proto je tedy u každé varianty uvedený počet vyšetřených vzorků z kontrolní kohorty.

V kontrolní kohortě se podle očekávání nevyskytla velmi vzácná varianta p.R149C. Alelické frekvence variant p.V448I a p.R513G se mezi kontrolní skupinou, kohortou pacientů s primární hyperurikémií a dnou a evropskou populací nijak zásadně neliší.

5. Diskuze

Sekvenační analýzou a následným hodnocením variant v genech *ABCG2*, *ABCC4*, *SLC22A12*, *SLC2A9*, *SLC22A11*, *SLC22A13*, *SLC17A1*, *SLC17A3*, *SLC22A6* a *SLC22A8* se nám podařilo nejen identifikovat varianty, které jsou pravděpodobně asociovány s primární hyperurikémií a dnou, ale i varianty, které pravděpodobně snižují riziko tohoto onemocnění (viz Tabulka 5.1).

5.1 Diskuze k výsledkům sekvenování jednotlivých genů

5.1.1 Gen *ABCG2*

Protein ABCG2 je z hlediska vzniku hyperurikémie a dny nejvýznamnějším urátovým transportérem. Bylo již identifikováno velké množství variant v kódujícím genu *ABCG2*, které jsou asociovány se sníženou exkrecí kyseliny močové (Matsuo et al. 2009; Higashino et al. 2017; Toyoda et al. 2019) (viz Příloha 4).

Ve vyšetřované kohortě jsme detekovali častou variantu p.V12M (*rs2231137*), která je na rozdíl od jiných nesynonymních variant v tomto genu pravděpodobně asociována se sníženým rizikem rozvoje hyperurikémie a dny (Zhou et al. 2014; Tu et al. 2014; Yu et al. 2017; Toyoda et al. 2019) (viz Příloha 4), ačkoli nevede ke změně exprese proteinu a ani neovlivňuje jeho transportní aktivitu (Matsuo et al. 2009; Higashino et al. 2017). Není tedy zatím jasné, jakým způsobem může varianta p.V12M snižovat riziko dny (Lukkunaprasit et al. 2020). Pokud jde o naše data, tak jsme binomickým testem zjistili, že se u jedinců s hyperurikémií a dnou vyskytuje p.V12M skutečně signifikantně méně často než v evropské populaci (p-hodnota = 0,000088).

Druhou častou nesynonymní variantou vyskytující se v naší kohortě je p.Q141K (*rs2231142*), jejíž alelická frekvence je dle provedeného binomického testu významně častější v kohortě pacientů s primární hyperurikémií a dnou než v evropské populaci (p-hodnota < 0,000001). Přítomnost této varianty vede k významnému snížení exprese proteinu ABCG2, podle jedné studie o 47,2 % (Matsuo et al. 2009). Přítomnost p.Q141K má dopad i na transportní funkci proteinu, která je snížena přibližně o 53 % (Woodward et al. 2009). Důvodem může být to, že p.Q141K vede ke zvýšené citlivosti na degradaci proteinu ABCG2 v proteazomech (Furukawa et al. 2009). Zároveň byla opakovaně potvrzena asociace této varianty s hyperurikémií a dnou (Dehghan et al. 2008; Phipps-Green et al. 2010; Matsuo et al. 2011; Zhang et al. 2013; Higashino et al. 2017). V souvislosti s p.Q141K jsou zajímavé také naše předchozí výsledky týkající se 31 pacientů s nástupem primární hyperurikémie a dny v dětském a adolescentním věku. Varianta p.Q141K se vyskytla u 42,9 % jedinců s dnou a u 35,3 % jedinců s hyperurikémií (Stiburkova et al. 2019) (viz Příloha 3). Pro porovnání je třeba uvést, že u pacientů zařazených v kohortě prezentované v této práci, u kterých převládá nástup onemocnění v dospělém věku, má tato varianta frekvenci 23,8 % (alelická frekvence

v evropské populaci je 9,4 %), což bylo binomickým testem vyhodnoceno jako statisticky významné.

Přítomnost varianty p.Q141K je komplikací v léčbě dny, jelikož je asociována se špatnou odpovědí na léčbu alopurinolem (Roberts et al. 2017; Wallace et al. 2018). Naše předchozí data tuto souvislost také naznačila, i když výsledky nebyly statisticky signifikantní (Stiburkova et al. 2017) (viz Příloha 2). Touto problematikou jsme se zabývali u pacienta s těžkou tofózní dnou a nefrolitiázou, který velmi špatně reagoval na léčbu alopurinolem. Sekvenováním u něj byla zjištěna heterozygotní varianta p.Q141K a také vzácná nesynonymní varianta p.A161S v genu *HPRT1*, který kóduje hypoxantin-guanin fosforibosyltransferázu. Deficience tohoto enzymu vedla u pacienta k výrazné hyperurikémii způsobené zvýšenou produkcí purinů, která byla navíc komplikovaná přítomností p.Q141K v genu *ABCG2* (Petru et al. 2016).

Obě časté nesynonymní varianty p.V12M a p.Q141K jsou v odborné literatuře diskutovány také ve spojitosti s rakovinou a s odpovědí na farmakoterapii. Závěry se však značně liší mezi jednotlivými populacemi a také u různých typů rakoviny (Chen et al. 2019). U karcinomu prsu byla opakovaně potvrzena asociace s variantami v *ABCG2*. Jedna čínská studie zjistila signifikantně vyšší riziko rakoviny prsu u žen s následujícími alelami: homozygotní p.Q141K, nebo homozygotní p.V12M, nebo homozygotní p.Q141K v kombinaci s heterozygotní p.V12M, nebo heterozygotní p.Q141K v kombinaci s homozygotní p.V12M (Wu et al. 2015). Nositelky homozygotních variant p.V12M a p.Q141K však vykazovaly lepší odpověď na chemoterapii. Autoři další studie se zaměřovali na kurdské pacientky s rakovinou prsu, u kterých zjistili asociaci homozygotní varianty p.Q141K s rychlejší progresí onemocnění (Ghafouri et al. 2016). V této práci byla navíc pozorována u nositelek p.Q141K lepší odpověď na antracykliny a další cytostatika.

Studie týkající se dalších druhů rakoviny nejsou takto jednotné. Z rozsáhlé metaanalýzy, ve které se autoři zaměřovali na souvislost mezi p.Q141K a rakovinou v různých světových populacích, vyplynulo, že je tato varianta asociovaná se sníženou náchylností ke vzniku onemocnění (Chen et al. 2012). Do této analýzy byly zařazeny studie týkající se kolorektálního karcinomu, lymfomu, leukémie, rakoviny prostaty a renálního karcinomu. Pokud jde o kolorektální karcinom, tak jedna turecká studie došla k rozdílným závěrům, tedy že varianta p.Q141K je asociovaná s tímto onemocněním (Sari et al. 2015).

Z nesynonymních variant jsme ve vyšetřované kohortě detekovali kromě p.V12M a p.Q141K už jen vzácné nesynonymní varianty, které se obvykle vyskytly u jednoho nebo dvou pacientů. Jednalo se o varianty p.R147W (*rs372192400*), p.T153M (*rs753759474*), p.F373C (*rs752626614*), p.T421A (*rs199854112*), p.T434M (*rs769734146*), p.S476P, p.S572R (*rs200894058*) a p.D620N (*rs34783571*). V kohortě jsme navíc objevili třibázovou delecii p.K360del (*rs750972998*). Kolegové z Katedry buněčné biologie Přírodovědecké fakulty UK a z Oddělení farmacie Tokijské univerzity provedli funkční charakterizaci těchto variant (Toyoda et al. 2019) (viz Příloha 4). Dopad jednotlivých variant zkoumali na úrovni

expresi proteinu, jeho lokalizace a aktivity přenosu urátu, k čemuž používali expresní systém oocytů *Xenopus leavis* a lidské embryonální ledvinné buňky. Došli k následujícím závěrům:

- Varianty p.R147W a p.S572R: Vedou k výrazně snížené expresi proteinu (o více než 75 %) a k nulové transportní funkci.
- Varianta p.T153M: Vede k výrazně snížené expresi proteinu (o více než 50 %) a ke snížené transportní funkci (asi o 75 %).
- Varianta p.F373C: Vede k výrazně snížené expresi proteinu (o více než 50 %) a ke snížené transportní funkci (asi o 50 %).
- Varianty p.T434M a p.S476P: Neovlivňují expresi proteinu, ale výrazně snižují transportní funkci proteinu (je skoro nulová).
- Varianty p.K360del, p.T421A a p.D620N: Neovlivňují expresi ani transportní funkci proteinu.

K těmto vzácným variantám bohužel není dostupná skoro žádná další literatura.

Zmínku lze najít k variantě p.D620N, která by podle závěrů jedné studie měla vést k nižší transportní aktivitě proteinu, což je sice v protikladu s našimi výsledky, ale autoři nezkoumali přímo schopnost přenosu urátu (Vethanayagam et al. 2005). Binomickým testem jsme nezjistili významný rozdíl mezi alelickou frekvencí p.D620N v kohortě pacientů s hyperurikémií a dnou a evropskou populací. Varianty p.R147W, p.T153M, p.F373C, p.T421A, p.T434M, p.S476P a p.S572R měly v porovnání s evropskou populací v naší vyšetřované kohortě signifikantně vyšší MAF (p-hodnota < 0,000001), což byl očekávaný výsledek vzhledem k velmi vzácnému výskytu těchto variant. Nepředpokládáme tedy, že je p.D620N asociována s vyšším rizikem vzniku hyperurikémie a dny.

Vzácná intronová varianta c.689+1G>A (*rs757389397*), kterou jsme objevili u jednoho pacienta s těžkou tofózní dnou, vede k alternativnímu sestřihu a vzniku předčasného stop kodonu (Stiburkova et al. 2016b).

Podle závěrů rozsáhlé tchajwanské studie intronové varianty c.203+36A>G (*rs4148152*), c.1195-60A>T (*rs2231148*) a c.1738-46G>A (*rs2231164*) snižují riziko vzniku dny (Yu et al. 2017). V porovnání s evropskou populací se tyto varianty vyskytují ve vyšetřované kohortě pacientů s hyperurikémií a dnou s významně nižší alelickou frekvencí (p-hodnota < 0,0005), což by korespondovalo se závěry výše uvedené studie. Častá intronová varianta c.1492+49G>T (*rs2231156*) je dle tchajwanské práce naopak asociována se zvýšeným rizikem vzniku dny. V naší kohortě se tato varianta vyskytovala s výrazně nižší alelickou frekvencí než v evropské populaci (MAF = 0,194 versus MAF = 0,401, p-hodnota < 0,000001). I když naše výsledky odpovídají závěrům výše uvedené studie, tak je třeba přihlédnout k tomu, že se dopad jednotlivých SNP mezi různými populacemi může lišit. K těmto variantám bohužel nejsou k dispozici další studie, které by se týkaly asociace s kyselinou močovou, hyperurikémií či dnou.

5.1.2 Gen *ABCC4*

V tomto genu jsme detekovali především alelické varianty, které vedou dle literatury k různým lékovým rezistencím a o jejich vlivu na hladinu kyseliny močové a o možné asociaci s hyperurikémií a dnou není nic známo. V naší kohortě jsme podle očekávání nedetekovali intronovou variantu c.2034+124C>A (*rs4148500*), která je asociovaná s hyperurikémií, dnou a sníženou frakční exkrecí kyseliny močové (Tanner et al. 2017). Tato varianta se totiž prakticky nevyskytuje u Evropanů, zatímco u polynéské populace je častá (MAF = 0,24). V naší kohortě jsme nenašli ani další nesynonymní variantu p.P1036L, která snižuje transportní aktivitu MRP4 o 30%. Tato varianta se zřejmě vyskytuje jenom u polynéské populace (Tanner et al. 2017).

Není známá žádná asociace časté nesynonymní varianty p.G187W (*rs11568658*) s dnou. Tento SNP je poškozující podle tří predikčních programů (z pěti použitých), avšak jeho alelická frekvence ve vyšetřované kohortě se dle binomického testu signifikantně nelišila od evropské populace. Tato varianta je však významná z hlediska vzniku rezistence u léčiv používaných v terapii rakoviny (Tsukamoto et al. 2019).

Nesynonymní varianta p.E757K (*rs3765534*) vede podle japonské studie ke zvýšení toxicity thiopurinových léčiv, což jsou imunosupresiva používaná mimo jiné v terapii rakoviny (Krishnamurthy et al. 2008). Zatímco v Evropě se jedná o vzácnou variantu (MAF = 0,009), tak v Japonsku je častá (MAF = 0,18), což souvisí s poměrně běžným výskytem nežádoucích účinků po thiopurinových léčích. V naší kohortě nebyla alelická frekvence této varianty signifikantně častější než v evropské populaci a ani nejsou dostupné studie, které by naznačovaly souvislost p.E757K s hyperurikémií a dnou.

Častá nesynonymní varianta p.K1116N (*rs1751034*) je podle jedné studie asociovaná s tubulární dysfunkcí u pacientů užívajících antiretrovirové léčivo tenofovir (Salvaggio et al. 2017). Za zmínku stojí, že v naší vyšetřované kohortě byla tato varianta signifikantně méně častá než v evropské populaci (MAF = 0,367 versus MAF = 0,811, p-hodnota < 0,000001).

Z hlediska lékových rezistencí je významná i další častá nesynonymní varianta p.K304N (*rs2274407*), jejíž alelická frekvence je dle použitého binomického testu významně nižší u pacientů zařazených v naší kohortě než v evropské populaci (MAF = 0,02 versus MAF = 0,081, p-hodnota = 0,000166). Tato varianta se nachází v akceptorovém místě sestříhu exonu 8 a je podle jedné studie spojená s rezistencí vůči chemoterapii u dětí s akutní lymfoblastickou leukémií (Mesrian Tanha et al. 2017).

Další nesynonymní varianty p.R317S (*rs2274406*), p. I866V (*rs139970608*) a p.T1142M (*rs11568644*), které jsme identifikovali u pacientů s primární hyperurikémií a dnou, jsou také zkoumány z hlediska různých lékových rezistencí, i když u nich zatím nebyl prokázán jasný dopad na rozdíl od výše uvedených variant. Zatím není nic známo o jejich možné asociaci s hyperurikémií a dnou, což se týká i dalších synonymních a intronových variant detekovaných v naší kohortě.

5.1.3 Gen *SLC22A12*

Protein URAT1 obstarává výhradně reabsorpci kyseliny močové v proximálních tubulech ledvin a spíše než ve spojitosti s hyperurikémií a dnou je znám v souvislosti se vzácnou primární renální hypourikémií typu 1 (OMIM # 220150) (Mancikova et al. 2016). Mezi genetické varianty vedoucí ke vzniku tohoto onemocnění patří například nesynonymní varianta p.T467M, delece p.L415_G417del či varianta vedoucí ke vzniku stop kodonu p.W258X (Tanaka et al. 2003; Stiburkova et al. 2016a). Varianty asociované se vzácnou renální hypourikémií typu 1 se v naší kohortě pacientů s primární hyperurikémií a dnou podle našeho očekávání nevyskytly.

V naší kohortě nebyla nalezena žádná nesynonymní varianta v genu *SLC22A12*. V souvislosti s tímto zjištěním je diskutována teorie, že by nesynonymní varianty v tomto genu mohly působit jako supresivní faktor pro dnu. Například v jedné studii detekovali variantu p.G774A s frekvencí 2,3 % v kontrolní skupině, zatímco ve skupině pacientů s dnou nebyla identifikována ani jednou (Taniguchi et al. 2005). K podobným závěrům došli také autoři další studie, kteří zjistili, že varianty p.R90H a p.W258X se vyskytují u zdravých jedinců, zatímco nebyly detekovány ani u jednoho z celkem 1993 pacientů se dnou (Sakiyama et al. 2016b). Z hlediska dny působí tedy tyto nesynonymní varianty jako protektivní faktory. K opačným výsledkům však došla jiná studie, která detekovala nesynonymní varianty u 23 % pacientů s primární dnou, přitom žádná z těchto variant nebyla nalezena v kontrolní skupině. Neočekávané závěry této studie by se daly vysvětlit variabilitou výskytu variant v *SLC22A12* mezi různými populacemi, v tomto případě se jednalo o mexickou populaci (Vázquez-Mellado et al. 2007).

V kohortě pacientů s primární hyperurikémií a dnou jsme našli pouze čtyři intronové varianty a pět synonymních variant: p.N82N (*rs3825017*), p.H86H (*rs3825016*), p.H142H (*rs11231825*), p.A416A (*rs1630320*) a p.L437L (*rs7932775*). Z hlediska četnosti je jedinou vzácně se vyskytující synonymní variantou v naší kohortě p.N82N, která je dle literatury asociována s hyperurikémií (Cho et al. 2015) (Lee et al. 2018). Zajímavé výsledky přinesla také studie, která zkoumala asociaci hladiny kyseliny močové s variantou p.N82N u dětí ve věku tří až devíti let. Autoři došli k závěru, že děti s touto variantou mají vyšší hladinu kyseliny močové (Lee et al. 2018). Naše data však ukázala, že se alelické frekvence p.N82N ve vyšetřované kohortě a v evropské populaci signifikantně neliší. Další synonymní variantou asociovanou s hyperurikémií je p.H86H (Sun et al. 2015) (Zou et al. 2018). Ani u této varianty binomický test neukázal signifikantní rozdíl v alelických frekvencích.

Běžně se vyskytující varianta p.H142H podle jedné vietnamské studie naopak snižuje riziko vzniku dny (Duong et al. 2019). Podstatný rozdíl je však mezi alelickými frekvencemi ve vietnamské a evropské populaci (MAF = 0,288 versus MAF = 0,706). V naší kohortě se tato varianta vyskytla s frekvencí 0,64, což není podle provedené statistické analýzy v porovnání s MAF evropské populace významně rozdílné. Podle jiné španělské studie tato

varianta naopak souvisí se sníženou frakční exkrecí kyseliny močové u pacientů se dnou (Torres et al. 2014).

Podle jedné čínské studie je další synonymní varianta p.L437L, která se vyskytuje v naší kohortě, asociována s primární hyperurikémií (Li et al. 2010). Stejně jako u jiných studií zaměřených na vybranou populaci však není jasné, zda by měla tato varianta podobný efekt i v jiných populacích. V naší kohortě se alelická frekvence p.L437L signifikantně nelišila od evropské populace, takže z našich dat nelze vyvozovat asociaci s hyperurikémií.

Vzácná intronová varianta c.662-7C>T (*rs373881060*) zřejmě vede k alternativnímu sestřihu, k dispozici však zatím není žádná literatura, která dopad této varianty zkoumala. V naší kohortě se vyskytla u pěti pacientů a binomický test ukázal, že je její alelická frekvence signifikantně vyšší než v evropské populaci (p-hodnota < 0,000001).

O zbývajících SNP, které jsme detekovali ve vyšetřované kohortě, zatím není známo, zda mají vliv na vznik hyperurikémie a dny. V našem nedávném článku, který se týkal vlivu variant v genu *SLC22A12* (a také v genu *SLC2A9*) na hyperurikémií a dnu, byla provedena rozsáhlá statistická analýza. Nebyla nalezena žádná asociace mezi genetickými variantami a hladinou kyseliny močové v séru, frakční exkrecí kyseliny močové, hladinou kreatininu v séru, hypertenzí ani s věkem nástupu dny (Pavelcova et al. 2020) (viz Příloha 1).

5.1.4 Gen *SLC2A9*

V genu *SLC2A9* se vyskytují různé genetické varianty, o kterých je z odborné literatury známo, že jsou asociovány se dnou, nebo naopak riziko vzniku tohoto onemocnění snižují (Vitart et al. 2008). V kohortě pacientů s primární hyperurikémií a dnou jsme detekovali šest takových variant. Tento gen je však spojen i se vzácnou renální hypourikémií typu 2 (OMIM # 612076) (Stiburkova et al. 2012). Souvislost s tímto onemocněním byla prokázána například u variant p.T125M, p.R171C a p.R171H, které se v naší kohortě pacientů s primární hyperurikémií a dnou nevyskytly (Dinour et al. 2012) (Windpessl et al. 2016).

V naší kohortě jsme detekovali celkem sedm nesynonymních variant, konkrétně p.A17T (*rs6820230*), p.G25R (*rs2276961*), p.T275M (*rs112404957*), p.D281H (*rs73225891*), p.V282I (*rs16890979*), p.R294H (*rs3733591*) a p.P350L (*rs2280205*). Jedna z dřívějších studií, která probíhala ve spolupráci s Katedrou buněčné biologie Přírodovědecké fakulty UK a s Klinikou pediatrie a dědičných poruch metabolismu 1. LF UK a VFN, se zabývala funkčními studii všech těchto variant. Nebyly prokázány žádné signifikantní rozdíly mezi kontrolou (wild type protein) a mutantními proteiny s výše uvedenými variantami (Hurba et al. 2014).

Nesynonymní varianta p.V282I snižuje dle literatury riziko dny asi o polovinu, a to v evropské i asijské populaci (Meng et al. 2015; Zhang et al. 2016). Těmto závěrům odpovídá i naše zjištění, že v kohortě pacientů s primární hyperurikémií a dnou měla tato varianta signifikantně nižší alelickou frekvenci, než je MAF v evropské populaci (p-hodnota < 0,000001).

V čínské populaci byla prokázána souvislost mezi nesynonymní variantou p.R294H a vznikem dny a dnových tofů (Tu et al. 2010). Dále byl zjištěn vztah mezi p.R294H a náchylností ke dně také v japonské a malajské populaci (Yamada et al. 2017; Wan Taib et al. 2018) Vliv této varianty v evropské populaci zatím není zcela jasný (Hollis-Moffatt et al. 2011). V naší kohortě neprokázal binomický test významně vyšší alelickou frekvenci než v evropské populaci.

O ostatních nesynonymních variantách, které se vyskytly v naší kohortě (tedy p.A17T, p.G25R, p.T275M, p.D281H a p.P350L), zatím nejsou v odborné literatuře k dispozici důkazy, že by mohly být asociovány s hyperurikémií a dnou, některé studie tuto možnost naopak vylučují (Zhang et al. 2016; Nkeck et al. 2018; Zhou et al. 2019).

I některé synonymní SNP v genu *SLC2A9*, které se vyskytly v naší kohortě, ovlivňují dle odborných studií hladinu kyseliny močové. Častá varianta p.L108L (*rs13113918*) je dle literatury asociovaná s hyperurikémií (Rule et al. 2011; Sarzynski et al. 2012). Varianta p.I168I (*rs3733589*) je spojena s vyšším rizikem dny a u čínské populace byla zjištěna i vyšší pravděpodobnost tvorby tofů (Li et al. 2012; Nakayama et al. 2017). V další studii, která zkoumala vliv různých SNP na hladinu kyseliny močové u jedinců s chronickým onemocněním ledvin, byla za významnou označena častá synonymní varianta p.L189L (*rs13125646*) (Bhatnagar et al. 2016). Asociace mezi p.L189L a hyperurikémií byla zjištěna i u indiánů kmene Zuni, původem z Nového Mexika a Arizony v USA (Laston et al. 2015). Tato varianta měla na rozdíl od p.L108L a p.I168I v kohortě pacientů s hyperurikémií a dnou v porovnání s evropskou populací signifikantně vyšší alelickou frekvenci (p-hodnota = 0,00002).

Jedna *in silico* studie zkoumala, které části proteinu GLUT9 jsou klíčové pro vazbu a transport kyseliny močové (a také fruktózy). Jako významná byla identifikována sedmá transmembránová doména a následující aminokyselinové pozice: p.C181, p.C301, p.N429 a p.C459 (Long et al. 2017). Žádná z alelických variant detekovaných v naší kohortě pacientů s hyperurikémií a dnou se nenacházela v těchto pozicích a ani v sedmé transmembránové doméně dle předpokládané sekundární struktury GLUT9.

Pokud jde o intronové varianty, tak c.535+67A>G (*rs3733590*) je dle jedné studie asociovaná s hyperurikémií v čínské populaci (Zhang et al. 2018). V naší kohortě měla tato varianta dle binomického testu v porovnání s evropskou populací signifikantně nižší alelickou frekvenci (p-hodnota = 0,000256).

Možný vliv dalších variant, které jsme našli u pacientů s hyperurikémií a dnou, zatím nebyl v dostupné literatuře potvrzen. V našem nedávném článku jsme provedli rozsáhlou statistickou analýzu, ze které vyplynulo, že u žádné z variant vyskytujících se ve vyšetřované kohortě není asociace s hladinou kyseliny močové, kreatininem, frakční exkrecí kyseliny močové, hypertenzí ani s časným nástupem hyperurikémie a dny (Pavelcova et al. 2020) (viz Příloha 1).

5.1.5 Gen *SLC22A11*

V tomto genu jsme detekovali dvě vzácné nesynonymní varianty (p.V202M – *rs201209258*, p.R343L – *rs75933978*), o kterých není z literatury známo, že by ovlivňovaly hladinu kyseliny močové. Binomický test ukázal, že alelická frekvence varianty p.V202M je signifikantně vyšší v kohortě pacientů s primární hyperurikémií a dnou než v evropské populaci (MAF = 0,003 versus MAF = 0, p-hodnota < 0,000001). *In silico* analýza však označila tuto variantu za poškozující pouze v jednom případě (program SIFT), zatímco u varianty p.R343L předpokládají negativní dopad na funkci dva predikční programy (PolyPhen a Provean). Z topologického modelu proteinu OAT4 je patrné, že se varianta p.R343L vyskytuje v oblasti zvýšené fosforylace. Bez provedení funkčních studií však nelze s jistotou určit, zda mají tyto nesynonymní varianty negativní dopad na transportní funkci proteinu.

Intronová varianta c.497+85A>G (*rs2277312*) vyskytující se v naší kohortě je tzv. proxy jednonukleotidovým polymorfismem (proxy SNP), který je asociován s variantou *rs2078267*. Přítomnost proxy SNP *rs2277312* tedy naznačuje, že se u daného jedince s největší pravděpodobností vyskytuje také *rs2078267* (Johnson et al. 2008). Varianta *rs2078267* (c.1059-957C>T, označována také jako c.1058+1305C>T) se nachází hluboko v intronové oblasti, takže použitými primery, které jsme navrhli pro exony a přiléhající oblasti intronů, by ji nebylo možné detekovat. Na rozdíl od ní se varianta *rs2277312* nachází pouze 85 bp od exonu, takže jsme mohli tuto oblast běžně vyšetřit při sekvenování příslušného exonu. Podle literatury by mohla být varianta *rs2078267* spojena s vyšším BMI a s metabolickými onemocněními asociovanými s obezitou (Giri et al. 2020). V naší kohortě se varianta *rs2277312* vyskytuje s výrazně nižší frekvencí než v evropské populaci (MAF = 0,233 versus MAF = 0,563, p-hodnota < 0,000001). Vysvětlením by mohlo být, že do naší kohorty byli zařazeni převážně jedinci jen s mírně zvýšenou hodnotou BMI, jelikož jsme se snažili vyloučit případy sekundární hyperurikémie a dny. U varianty *rs2078267* byla zjištěna asociace se zvýšenou hladinou kyseliny močové, která je podle závěrů jedné QWAS studie sice významná u indické populace, ale nehraje takovou roli v evropské populaci (Giri et al. 2016).

5.1.6 Gen *SLC22A13*

Ve vyšetřované kohortě jsme detekovali dvě vzácné nesynonymní varianty p.R16H (*rs72542450*) a p.R102H (*rs113229654*), které jsou dle použitých predikčních programů benigní. Binomický test neukázal u těchto variant významný rozdíl v MAF mezi evropskou populací a pacienty s hyperurikémií a dnou. Dále jsme zjistili, že je varianta p.R102H dle předpokládané sekundární struktury OAT10 lokalizována v oblasti, kde často dochází posttranslačně ke glykosylaci (Li et al. 2019). V dostupné literatuře zatím není zmínka o jakékoliv asociaci variant p.R16H a p.R102H se sérovou hladinou kyseliny močové či s dnou. Ostatní varianty, které jsme našli v kohortě pacientů s primární hyperurikémií a dnou, se

vyskytují vzácně nebo mají nízkou alelickou frekvenci (MAF pod 0,06) a ani o nich není z odborné literatury známo, že by byly asociovány s hyperurikémií a dnou.

5.1.7 Gen *SLC17A1*

V kódující oblasti genu jsme detekovali pouze jednu nesynonymní variantu p.T269I (*rs1165196*), která podle predikčních programů nemá negativní dopad na funkci proteinu NPT1. Statistickou analýzou jsme zjistili, že je tato varianta signifikantně méně častá v kohortě pacientů s primární hyperurikémií a dnou než v evropské populaci (p-hodnota = 0,000076). Mnoho autorů se zabývalo možným vlivem této varianty na vznik dny a v jejich studiích došli k rozdílným závěrům. Podle některých je varianta p.T269I asociovaná se dnou, a to v různých zkoumaných populacích – v evropské, polynéské i japonské (Hollis-Moffatt et al. 2012; Urano et al. 2013; Torres et al. 2014; Chiba et al. 2015). Naopak studie, která byla provedená na čínské populaci, neprokázala asociaci varianty p.T269I se dnou (Wan et al. 2015). Podle další studie by dokonce tato varianta mohla snižovat riziko vzniku onemocnění, jelikož možná vede ke zvýšené exkreční aktivitě proteinu NPT1 (Sakiyama et al. 2016a). A právě se závěry této studie se shodují naše data.

Varianty c.1179-111C>T (*rs1165209*) a c.*2+79C>T (*rs1165215*) byly zahrnuty do studie, která se týkala vlivu SNP v genu *SLC17A1* na rozvoj dny (Urano et al. 2010). Nebyla odhalena žádná asociace s hladinou kyseliny močové a ani se dnou, a to ani u žádné z dalších intronových variant, které jsme identifikovali ve vyšetřované kohortě.

5.1.8 Gen *SLC17A3*

V tomto genu jsme neidentifikovali žádné vzácné nesynonymní varianty, ale pouze dvě časté (p.A100T – *rs1165165*, p.G279R – *rs56027330*), u kterých není z literatury známo, že by měly vliv na hladinu kyseliny močové. Podle predikčních programů jsou tyto varianty benigní. Ani binomickým testem jsme nezjistili statisticky signifikantní rozdíly mezi MAF ve vyšetřované kohortě a v evropské populaci, takže nepředpokládáme asociaci těchto variant s hyperurikémií a dnou.

Zajímavá studie efektu variant v genu *SLC17A3* na hladinu kyseliny močové byla provedena v kohortě jedinců z izolované komunity chorvatského ostrova Vis. Autoři se v ní zaměřují na častou synonymní variantu p.S448S (*rs942379*), která se objevuje i u našich pacientů s primární hyperurikémií a dnou (Polasek et al. 2010). V tomto článku je zahrnuta i nesynonymní varianta p.S448R, která má stejné referenční označení *rs942379* a jejíž MAF v evropské populaci je roven nule (v naší kohortě se nevyskytla). Autoři zjistili, že u žen, které mají variantu *rs942379* (p.S448S nebo p.S448R), se hladina kyseliny močové významně proměňuje v čase, takže při opakovaných měřeních se může střídát hyperurikémie s normourikémií. Stejnou souvislost zjistili autoři i u intronové varianty *rs9393672*, kterou jsme však v naší kohortě nedetekovali. Překvapivě však nebyl vliv varianty *rs942379* na kolísání hladiny kyseliny močové prokázán u mužů. Autoři se v této studii zabývali i dalšími

variantami v jiných genech (včetně *ABCG2*, *SLC22A12* a *SLC2A9*), ale obdobný efekt už nebyl zjištěn u žádné z nich. Pokud jde o variantu p.S448S v naší kohortě, tak statistická analýza neukázala, že by se v ní vyskytovala častěji než v evropské populaci.

5.1.9 Gen *SLC22A6*

V tomto genu jsme identifikovali pouze jednu nesynonymní variantu p.P104L (*rs11568627*), která nemá dle literatury vliv na transportní funkci proteinu (Fujita et al. 2005). Statistická analýza této varianty neukázala signifikantně odlišnou alelickou frekvenci v naší kohortě v porovnání s evropskou populací. *In silico* analýzou jsme došli k nejednotnému výsledku s převahou hodnocení této varianty jako poškozující.

Synonymní varianty p.P84P (*rs11568628*) a p.P117P (*rs11568629*) se vyskytovaly u všech pacientů vždy společně, a to vždy buď současně heterozygotně (23 pacientů), nebo současně homozygotně (dva pacienti). Pokud jde o intronové varianty, tak zajímavým nálezem je varianta c.797+8G>A (*rs1323492446*), která by mohla mít vzhledem ke své pozici dopad na sestřih proteinu. V literatuře však zatím nejsou data, která by tuto skutečnost potvrzovala.

Binomickým testem jsme zjistili u varianty c.1362-172T>C (*rs3017670*) statisticky významný rozdíl v alelické frekvenci mezi vyšetřovanou kohortou a evropskou populací (MAF 0,137 versus 0,842, p-hodnota < 0,000001), který je patrný i bez použití statistické analýzy. K této variantě nejsou v literatuře dostupné údaje o případném dopadu na transportní funkci proteinu a ani jiná data naznačující, že by měl z hlediska hyperurikémie a dny protektivní efekt. Vzhledem k umístění varianty (172 bází před exonem poblíž místa nasednutí primeru) spíše předpokládáme, že se nám nepodařilo tento úsek u všech pacientů kvalitně zanalyzovat sekvenováním, takže reálná alelická frekvence může být vyšší.

5.1.10 Gen *SLC22A8*

U jednoho pacienta jsme objevili vzácnou nesynonymní variantu p.R149C (c.445C>T) s referenčním označením *rs45566039*. Pod stejným označením je v databázi Ensembl zařazena varianta p.R149S (c.445C>A), která podle závěrů jedné studie vede ke kompletní ztrátě funkce proteinu (Erdman et al. 2006). Autoři v ní zkoumali schopnost transportu cimetidinu a estron sulfátu, dá se ale předpokládat, že stejně narušená by byla i exkrece kyseliny močové v proximálních tubulech ledvin. Je také pravděpodobné, že varianty p.R149C a p.R149S by mohly mít podobný dopad na funkci proteinu. Je tedy možné, že varianta p.R149C vede k hyperurikémii.

Ve vyšetřované kohortě jsme detekovali ještě dvě další nesynonymní varianty, konkrétně p.V448I (*rs11568486*) a p.R513G (*rs145474422*). Podle *in silico* analýzy jsou tyto varianty benigní. V dostupné literatuře není žádný záznam o možném dopadu na transportní funkci proteinu. Z intronových variant stojí za zmínku především vzácná varianta c.1326-4G>A (*rs767079100*), která by mohla vzhledem ke svému umístění vést k alternativnímu

sestříhu. S výjimkou *rs45566039* není v odborné literatuře u žádné varianty detekované ve vyšetřované kohortě potvrzená asociace s hladinou kyseliny močové nebo vliv na transportní funkci proteinu.

Tabulka 5.1 - Přehled genetických variant významně ovlivňujících hladinu kyseliny močové

| Gen | Referenční označení varianty | Změna proteinové nebo kódující sekvence | Vliv na vznik hyperurikémie a dny | Výsledky binomického testu | Odkaz v literatuře |
|-----------------|------------------------------|---|---|-----------------------------|---|
| <i>ABCG2</i> | <i>rs2231137</i> | p.V12M | snižuje riziko vzniku dny | signifikantně nižší MAF | (Yu et al. 2017) |
| <i>ABCG2</i> | <i>rs2231142</i> | p.Q141K | asociována s dnou | signifikantně vyšší MAF | (Dehghan et al. 2008) |
| <i>ABCG2</i> | <i>rs372192400</i> | p.R147W | pravděpodobně asociována s hyperurikémií a dnou | signifikantně vyšší MAF | (Toyoda et al. 2019) |
| <i>ABCG2</i> | <i>rs753759474</i> | p.T153M | pravděpodobně asociována s hyperurikémií a dnou | signifikantně vyšší MAF | (Toyoda et al. 2019) |
| <i>ABCG2</i> | <i>rs752626614</i> | p.F373C | pravděpodobně asociována s hyperurikémií a dnou | signifikantně vyšší MAF | (Toyoda et al. 2019) |
| <i>ABCG2</i> | <i>rs769734146</i> | p.T434M | pravděpodobně asociována s hyperurikémií a dnou | signifikantně vyšší MAF | (Toyoda et al. 2019) |
| <i>ABCG2</i> | N/A | p.S476P | pravděpodobně asociována s hyperurikémií a dnou | signifikantně vyšší MAF | (Toyoda et al. 2019) |
| <i>ABCG2</i> | <i>rs200894058</i> | p.S572R | pravděpodobně asociována s hyperurikémií a dnou | signifikantně vyšší MAF | (Toyoda et al. 2019) |
| <i>ABCG2</i> | <i>rs4148152</i> | c.203+36A>G | snižuje riziko vzniku dny | signifikantně nižší MAF | (Yu et al. 2017) |
| <i>ABCG2</i> | <i>rs2231148</i> | c.1195-60A>T | snižuje riziko vzniku dny | signifikantně nižší MAF | (Yu et al. 2017) |
| <i>ABCG2</i> | <i>rs2231156</i> | c.1492+49G>T | asociována s dnou | signifikantně vyšší MAF | (Yu et al. 2017) |
| <i>ABCG2</i> | <i>rs2231164</i> | c.1738-46G>A | snižuje riziko vzniku dny | signifikantně nižší MAF | (Yu et al. 2017) |
| <i>SLC22A12</i> | <i>rs3825017</i> | p.N82N | asociována s hyperurikémií | bez signifikantního rozdílu | (Cho et al. 2015) |
| <i>SLC22A12</i> | <i>rs3825016</i> | p.H86H | možná asociována s hyperurikémií | bez signifikantního rozdílu | (Sun et al. 2015) |
| <i>SLC22A12</i> | <i>rs11231825</i> | p.H142H | závěry studií se různí | bez signifikantního rozdílu | (Torres et al. 2014; Duong et al. 2019) |
| <i>SLC22A12</i> | <i>rs7932775</i> | p.L437L | asociována s hyperurikémií | bez signifikantního rozdílu | (Li et al. 2010) |
| <i>SLC2A9</i> | <i>rs16890979</i> | p.V282I | snižuje riziko vzniku dny | signifikantně nižší MAF | (Meng et al. 2015) |

| | | | | | |
|-----------------|-------------------|-------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---|
| <i>SLC2A9</i> | <i>rs3733591</i> | p.R294H | asociována s dnou | bez signifikantního rozdílu | (Tu et al. 2010) |
| <i>SLC2A9</i> | <i>rs13113918</i> | p.L108L | asociována s hyperurikémií | bez signifikantního rozdílu | (Sarzynski et al. 2012) |
| <i>SLC2A9</i> | <i>rs3733589</i> | p.I168I | asociována s dnou | bez signifikantního rozdílu | (Li et al. 2012) |
| <i>SLC2A9</i> | <i>rs13125646</i> | p.L189L | asociována s hyperurikémií | signifikantně vyšší MAF | (Bhatnagar et al. 2016) |
| <i>SLC2A9</i> | <i>rs3733590</i> | c.535+67A>G | asociována s hyperurikémií | signifikantně nižší MAF | (Zhang et al. 2018) |
| <i>SLC22A11</i> | <i>rs2277312</i> | c.497+85A>G | možná asociace s hyperurikémií | signifikantně nižší MAF | (Giri et al. 2016) |
| <i>SLC17A1</i> | <i>rs1165196</i> | p.T269I | závěry studií se různí | signifikantně nižší MAF | (Hollis-Moffatt et al. 2012; Wan et al. 2015) |
| <i>SLC22A8</i> | <i>rs45566039</i> | p.R149C | možná asociace s hyperurikémií | signifikantně vyšší MAF | (Erdman et al. 2006) |

Tabulka shrnuje genetické varianty podrobně diskutované v předchozím textu, které jsou signifikantně asociované s hyperurikémií, dnou, nebo naopak se snížením rizika vzniku dny. Jsou v ní uvedeny pouze varianty v genech *ABCG2*, *SLC22A12*, *SLC2A9*, *SLC22A11*, *SLC17A1* a *SLC22A8*, jelikož v genech *ABCC4*, *SLC22A13*, *SLC17A3* a *SLC22A6* nemá dle literatury a ani dle našich závěrů žádný z polymorfismů, které jsme identifikovali v kohortě pacientů s primární hyperurikémií a dnou, dopad na hladinu kyseliny močové.

Pro lepší přehlednost je asociace se dnou a s hyperurikémií ve sloupci „Vliv na vznik hyperurikémie a dny“ vyznačena okrově, zatímco spojitost se sníženým rizikem dny modře. Ve dvou případech je daná varianta podle jedné studie spojená s hyperurikémií a podle jiné studie naopak riziko dny snižuje (vyznačeno zeleně), takže jsou v odkazech na literaturu uvedeny obě studie s protichůdnými závěry. V ostatních případech je uveden pouze jeden článek, i když je k dané variantě k dispozici více odborných studií se shodnými závěry (ty jsou uvedeny v příslušném oddíle v diskuzi).

Ve sloupci „Výsledky binomického testu“ jsou uvedeny závěry statistické analýzy, ve které jsme porovnávali minoritní alelické frekvence (MAF) v kohortě pacientů s primární hyperurikémií a dnou s údaji pro evropskou populaci z databáze Ensembl (Howe et al. 2021). V tabulce je uveden výsledek ve vztahu k vyšetřované kohortě, vyšší MAF v porovnání s evropskou populací je vyznačen okrově a nižší MAF modře.

5.2 Diskuze k současnému výskytu variant ovlivňujících hladinu kyseliny močové

Zatím jsme diskutovali vliv jednotlivých genetických variant na vznik hyperurikémie a dny, tedy bez závislosti na dalších polymorfismech u daného pacienta, ať už se vyskytují ve stejném nebo jiném genu. Důležitá otázka však je, jaký dopad má kombinace různých variant asociovaných se zvýšeným nebo naopak se sníženým rizikem dny u jednoho pacienta. Zaměřovali jsme se především na vzácné varianty a dále na časté varianty, u kterých je signifikantní rozdíl v alelických frekvencích mezi vyšetřovanou kohortou a evropskou populací (varianty uvedeny v Tabulce 5.1). Jelikož se z poměrně malých kohort, ve které se navíc vzácné varianty často vyskytují pouze u jednoho člověka, nedají vyvozovat obecně platné

závěry, tak zde prezentujeme alespoň přehled vybraných pacientů, u kterých by genetické pozadí mohlo významně modulovat obraz onemocnění:

Pacient 1: Muž s dyslipidemií, u kterého se první příznaky dny objevily ve 23 letech. Při zařazení do kohorty u něj byla zjištěna hladina kyseliny močové v referenčním rozmezí. V genu *ABCG2* jsme detekovali heterozygotní varianty p.V12M a c.203+36A>G, které mají z hlediska dny protektivní účinky (Yu et al. 2017; Toyoda et al. 2019) (viz Příloha 4). V genu *SLC2A9* jsme identifikovali přítomnost heterozygotních variant p.I168I a c.535+67A>G, které jsou asociovány s hyperurikémií a dnou (Li et al. 2012; Zhang et al. 2018). Vliv patogenních variant v *SLC2A9* u tohoto pacienta zřejmě převážil nad protektivními variantami v *ABCG2*, stav navíc komplikuje dyslipidémie.

Pacient 2: Muž s primární dnou, u kterého jsme v genu *ABCG2* detekovali tři heterozygotní varianty asociované s hyperurikémií a dnou, a to častou p.Q141K, častou c.1492+49G>T a vzácnou p.T153M. I přes léčbu byla zjištěna vysoká hladina kyseliny močové v séru 511 $\mu\text{mol/l}$, ke které pravděpodobně vedla zhoršená terapeutická odpověď na alopurinol související s variantou p.Q141K a také snížená transportní aktivita proteinu *ABCG2* z důvodu výskytu variant p.Q141K a p.T153M (Dehghan et al. 2008; Roberts et al. 2017; Toyoda et al. 2019) (viz Příloha 4).

Pacient 3: Žena se sérovou hladinou kyseliny močové 495 $\mu\text{mol/l}$, u které byla hyperurikémie poprvé zjištěna, když jí bylo 14 let. Sekvenováním jsme zjistili v genu *ABCG2* tři heterozygotní varianty, častou p.Q141K, častou c.1492+49G>T a vzácnou p.T434M. Tyto varianty jsou asociované s hyperurikémií a dnou, p.Q141K a p.T434M vedou podle funkčních studií k výraznému snížení transportní funkce proteinu *ABCG2* (Woodward et al. 2009; Yu et al. 2017; Toyoda et al. 2019) (viz Příloha 4). U pacientky se doposud neobjevily příznaky dny.

Pacient 4: Muž s primární dnou, u kterého byla i přes léčbu opakovaně zjištěna vysoká hladina kyseliny močové (490 $\mu\text{mol/l}$ a 663 $\mu\text{mol/l}$). Pacient udával v rodinné anamnéze výskyt dny. V genu *ABCG2* jsme zjistili častou heterozygotní variantu p.Q141K a vzácnou heterozygotní variantu p.R147W, které jsou asociovány s dnou (Dehghan et al. 2008; Toyoda et al. 2019) (viz Příloha 4). Varianta p.Q141K navíc souvisí se špatnou odpovědí na terapii alopurinolem (Roberts et al. 2017).

Pacient 5: U muže s primární dnou a sérovou hladinou kyseliny močové 537 $\mu\text{mol/l}$ jsme detekovali v genu *ABCG2* dvě varianty s rozdílným efektem na hyperurikémii a dnu. Zatímco má častá varianta p.V12M z hlediska dny ochranný účinek, tak je vzácná varianta p.S572R pravděpodobně asociovaná se vznikem hyperurikémie a dny (Yu et al. 2017; Toyoda et al. 2019) (viz Příloha 4). Obě varianty se vyskytovaly u pacienta heterozygotně a zdá se, že převážil efekt varianty p.S572R.

Pacient 6: Muž s tofózní dnou, který měl v okamžiku zařazení do naší kohorty hladinu kyseliny močové 464 $\mu\text{mol/l}$, a to i přes terapii alopurinolem. Genetická analýza odhalila přítomnost heterozygotní varianty c.535+67A>G v genu *SLC2A9*, která je spojovaná

s hyperurikémií, a heterozygotní varianty p.Q141K v genu *ABCG2*, která je asociovaná se dnou a také se špatnou odpovědí na léčbu alopurinolem (Dehghan et al. 2008; Roberts et al. 2017; Zhang et al. 2018).

Pacient 7: Tento pacient byl do naší kohorty zařazen v 15 letech, kdy se u něj projeví první příznaky primární dny. Byla zjištěna vysoká hladina kyseliny močové 522 $\mu\text{mol/l}$ a v rodinné anamnéze byla přítomná dna. U pacienta jsme genetickým vyšetřením odhalili homozygotní variantu p.Q141K v genu *ABCG2*, která by mohla být sama o sobě příčinou dny v adolescentním věku (Stiburkova et al. 2019) (viz Příloha 3). V genu *SLC22A12* se ale navíc vyskytla vzácná varianta p.N82N, která je dle literatury také asociovaná s hyperurikémií a dnou (Cho et al. 2015).

Pacient 8: U pacienta byla poprvé objevená hyperurikémie v osmi letech, do naší kohorty byl zařazen ve 14 letech s hladinou kyseliny močové 568 $\mu\text{mol/l}$. V rodinné anamnéze se vyskytovala dna. U pacienta byla v genu *ABCG2* přítomná heterozygotní protektivní varianta p.V12M a heterozygotní patogenní varianta p.Q141K (Dehghan et al. 2008; Yu et al. 2017). V genu *SLC2A9* se navíc vyskytla heterozygotní varianta c.535+67A>G, která je asociovaná s hyperurikémií (Zhang et al. 2018). Vzhledem k nízkému věku nástupu hyperurikémie se zdá, že účinek patogenních variant převážil nad p.V12M, která snižuje riziko dny.

Pacient 9: Muž s primární dnou a atopickým ekzémem, u kterého byla zvýšená hladina kyseliny močové poprvé zjištěna ve 13 letech. V rodinné anamnéze se vyskytovala dna. Sekvenováním jsme detekovali heterozygotní varianty p.I168I a c.535+67A>G v genu *SLC2A9*, které jsou asociované s dnou (Li et al. 2012; Zhang et al. 2018). Navíc jsme zjistili přítomnost homozygotní varianty p.Q141K v genu *ABCG2*, která se významně podílí na vzniku hyperurikémie a dny (Dehghan et al. 2008). Pacient má tedy nejméně tři rizikové genetické faktory pro rozvoj dny, což koresponduje s prvním záchytem hyperurikémie v adolescentním věku (Stiburkova et al. 2019) (viz Příloha 3).

Pacient 10: Muž s tofózní dnou měl velmi vysokou hladinu sérové kyseliny močové 700 $\mu\text{mol/l}$ a první příznaky dny se u něj objevily ve 22 letech. V rodinné anamnéze pacient udával výskyt dny. Sekvenováním jsme odhalili stejnou kombinaci variant asociovaných s hyperurikémií jako u pacienta číslo 9 – tedy homozygotní p.Q141K v genu *ABCG2* a heterozygotní p.I168I a c.535+67A>G v genu *SLC2A9*. U obou pacientů byla horší odpověď na léčbu alopurinolem pravděpodobně z důvodu výskytu homozygotní varianty p.Q141K (Roberts et al. 2017).

Shrnutí: Zdá se tedy, že vzácné nesynonymní varianty v genu *ABCG2* vedou k rozvoji těžké dny, která nemůže být vyvážena protektivními variantami ve stejném a ani v jiném genu. K závažnému onemocnění vede také kombinace p.Q141K v genu *ABCG2* spolu s další variantou ve stejném nebo jiném genu, která je asociovaná s hyperurikémií a dnou.

5.3 Diskuze k použitým metodám

K analýze genů jsme používali kapilární sekvenátor Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific), který je založen na metodě Sangerova sekvenování (Sanger et al. 1977). Tento typ sekvenátorů se rozšířil do klinické praxe v 90. letech minulého století a výrazně zjednodušil práci oproti zdoluhavému manuálnímu sekvenování. Velkou výhodou přístrojů založených na metodě Sangerova sekvenování je velmi vysoká přesnost výsledků, z tohoto důvodu se také používají pro verifikaci výsledků ze sekvenování nové generace. Další výhodou je možnost analýzy poměrně dlouhého PCR produktu – konkrétní délka závisí na kapilárách instalovaných v daném přístroji, v našem případě nebyl problém analyzovat úseky o délce 800 bp. Pro naše účely byla tato metoda ideální i z toho důvodu, že nám umožnila podrobně analyzovat exony a přilehlé části intronů (Morozova a Marra 2008).

Kromě Sangerova sekvenování lze použít i sekvenování nové generace, které přináší možnost rychle analyzovat velké množství genů (Ansorge 2009). Výhodou je i možnost provedení analýzy z velmi malého množství vzorku DNA. Sekvenování nové generace lze použít k sekvenování celých genomů či k provádění GWAS studií k vyhledávání kandidátních genů. Mezi tyto metody patří jednomolekulové sekvenování, sekvenování pomocí nanopórů, sekvenace syntézou (Illumina), 454 sekvenování (firma Roche) či SOLiD (Life Technologies) (Morozova a Marra 2008; Gut 2013).

K vyšetření přítomnosti vybraných nesynonymních variant u kontrolní skupiny jsme používali převážně metodu tetra-primer ARMS-PCR (Ye et al. 2001). V jednom případě jsme použili metodu RFLP-PCR, jelikož pro daný úsek nebylo možné navrhnout primery pro tetra-primer ARMS-PCR. Metoda tetra-primer ARMS-PCR je výhodná svou rychlostí, snadnou proveditelností a finanční nenáročností. Naproti tomu metoda RFLP-PCR je dle našich zkušeností i závěrů jiných autorů náročnější na laboratorní zpracování i na optimalizaci podmínek (Duta-Cornescu et al. 2009).

5.4 Přednosti a limity této práce

Mezi přednosti této práce patří vyšetření unikátní kohorty 250 jedinců s primární hyperurikémií a dnou, u které byla známá podrobná klinická a biochemická data umožňující hodnocení dopadu genetických variant v širších souvislostech. Statistická analýza by však byla více vypovídající, kdyby byla tato kohorta rozsáhlejší.

K silným stránkám této práce dále patří, že výběr genů pro analýzu zahrnoval významné i méně známé urátové transportéry, a že jsme podrobně analyzovali kódující sekvence genů včetně přiléhajících intronových oblastí. Slabou stránkou naopak je, že nebyly analyzovány celé intronové oblasti genů, takže nemusely být zachyceny všechny varianty asociované s hyperurikémií a dnou.

Limitující se může zdát, že jsme pro analýzu zvolili pouze geny kódující urátové transportéry. Závěry QWAS studií totiž navrhuje i různé další geny, jejichž produkty ovlivňují

genovou expresi a imunitní reakce na krystaly kyseliny močové, což může být podnětem pro další výzkum.

Na závěr je třeba ještě podotknout, že se tato práce nevěnuje důležité otázce regulace genové exprese a různým epigenetickým mechanismům, což je dalším podnětem pro budoucí studie.

6. Závěr

U pacientů s primární hyperurikémií a dnou se nám analýzou genů kódujících urátové transportéry podařilo identifikovat deset genetických variant, které jsou pravděpodobně asociované s hyperurikémií a dnou, a pět genetických variant, které pravděpodobně naopak riziko dny snižují. Všechny tyto varianty jsou lokalizované pouze ve třech z deseti analyzovaných genů, konkrétně v *ABCG2*, *SLC2A9* a *SLC22A8*. V genu *ABCG2* jsme zjistili asociaci s hyperurikémií a dnou u osmi variant (p.Q141K, p.R147W, p.T153M, p.F373C, p.T434M, p.S467P, p.S572R a c.1492+49G>T) a spojitost se sníženým rizikem dny u čtyř variant (p.V12M, c.203+36A>G, c.1195-60A>T a c.1738-46G>A). V genu *SLC2A9* jsme odhalili jednu variantu asociovanou s hyperurikémií (p.L189L) a jednu variantu snižující riziko vzniku dny (p.V282I). V genu *SLC22A8* jsme zjistili možnou asociaci s hyperurikémií u varianty p.R149C.

Zhodnocením klinických a biochemických dat od pacientů, u kterých se vyskytovalo zároveň více genetických variant zvyšujících nebo snižujících riziko hyperurikémie a dny, jsme došli k zajímavým zjištěním. Vzácné nesynonymní varianty v genu *ABCG2* (p.R147W, p.T153M, p.F373C, p.T434M, p.S467P a p.S572R) jsou asociované s těžkou dnou i u pacientů s přítomností protektivních polymorfismů (p.V12M, c.203+36A>G, c.1195-60A>T a c.1738-46G>A a p.V282I) (Meng et al. 2015; Yu et al. 2017; Toyoda et al. 2019). Kombinace některé z variant asociovaných s hyperurikémií a s dnou spolu s variantou p.Q141K v genu *ABCG2* často vede k výrazné hyperurikémii a tofózní dně, což není způsobenou jen prostou součinností genetických variant, ale i tím, že je p.Q141K asociovaná se špatnou terapeutickou odpovědí na léčbu alopurinolem (Roberts et al. 2017).

V genu *SLC22A12* jsme zachytili výskyt čtyř synonymních variant (p.N82N, p.H86H, p.H142H, p.L437L), které jsou dle odborné literatury asociované s hyperurikémií, ale v naší kohortě se tato spojitost nepotvrdila (Li et al. 2010; Torres et al. 2014; Cho et al. 2015; Sun et al. 2015). Stejná situace nastala i u čtyř dalších variant v genu *SLC2A9* (p.R294H, p.L108L, p.I168I, c.535+67A>G) a u jedné varianty v genu *SLC22A11* (c.497+85A>G) (Tu et al. 2010; Li et al. 2012; Sarzynski et al. 2012; Giri et al. 2016; Zhang et al. 2018). K nesynonymní variantě p.T269I v genu *SLC17A1*, kterou jsme identifikovali v naší kohortě, jsou k dispozici odlišné závěry odborných studií. Podle některých je p.T269I asociovaná s hyperurikémií a dnou (Hollis-Moffatt et al. 2012; Urano et al. 2013; Torres et al. 2014; Chiba et al. 2015). Podle další studie je naopak asociovaná se sníženým rizikem vzniku dny, čemuž by odpovídala i naše data (Wan et al. 2015). V genech *ABCC4*, *SLC22A13*, *SLC17A3* a *SLC22A6* jsme neidentifikovali žádnou genetickou variantu, která by dle našich výsledků či závěrů odborných studií byla asociovaná s hyperurikémií a dnou.

7. Seznam použité literatury

AGARWALA, Richa, Tanya BARRETT, Jeff BECK, Dennis A. BENSON, Colleen BOLLIN, Evan BOLTON, Devon BOUREXIS, J. Rodney BRISTER, Stephen H. BRYANT, Kathi CANESE, Mark CAVANAUGH, Chad CHAROWHAS, Karen CLARK, Ilya DONDOZHANSKY, Michael FEOLO, Lawrence FITZPATRICK, Kathryn FUNK, Lewis Y. GEER, Viatcheslav GORELENKOV, Alan GRAEFF, Wratko HLAVINA, Brad HOLMES, Mark JOHNSON, Brandi KATTMAN, Viatcheslav KHOTOMLIANSKI, Avi KIMCHI, Michael KIMELMAN, Masato KIMURA, Paul KITTS, William KLIMKE, Alex KOTLIAROV, Sergey KRASNOV, Anatoliy KUZNETSOV, Melissa J. LANDRUM, David LANDSMAN, Stacy LATHROP, Jennifer M. LEE, Carl LEUBSDORF, Zhiyong LU, Thomas L. MADDEN, Aron MARCHLER-BAUER, Adriana MALHEIRO, Peter MERIC, Ilene KARSCH-MIZRACHI, Anatoly MNEV, Terence MURPHY, Rebecca ORRIS, James OSTELL, Christopher O'SULLIVAN, Vasuki PALANIGOBU, Anna R. PANCHENKO, Lon PHAN, Borys PIEROV, Kim D. PRUITT, Kurt RODARMER, Eric W. SAYERS, Valerie SCHNEIDER, Conrad L. SCHOCH, Gregory D. SCHULER, Stephen T. SHERRY, Karanjit SIYAN, Alexandra SOBOLEVA, Vladimir SOUSSOV, Grigory STARCHENKO, Tatiana A. TATUSOVA, Françoise THIBAUD-NISSEN, Kamen TODOROV, Bart W. TRAWICK, Denis VAKATOV, Minghong WARD, Eugene YASCHENKO, Aleksandr ZASYPKIN a Kerry ZBICZ, 2018. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research* [online]. **46**(D1), D8–D13. ISSN 13624962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkx1095

ALBERTS, Ben M., Connor BRUCE, Kolitha BASNAYAKE, Pietro GHEZZI, Kevin A. DAVIES a Lisa M. MULLEN, 2019. Secretion of IL-1 β From Monocytes in Gout Is Redox Independent. *Frontiers in Immunology* [online]. **10**, 70. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2019.00070

AMES, Bruce N., Robert CATHCART, Elizabeth SCHWIERS a Paul HOCHSTEIN, 1981. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **78**(11), 6858–62. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.78.11.6858

ANSORGE, Wilhelm J., 2009. Next-generation DNA sequencing techniques. *New biotechnology* [online]. **25**(4), 195–203. ISSN 1871-6784. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbt.2008.12.009

BAHN, Andrew, Yohannes HAGOS, Stefan REUTER, Daniela BALEN, Hrvoje BRZICA, Wolfgang KRICK, Birgitta C. BURCKHARDT, Ivan SABOLIĆ a Gerhard BURCKHARDT, 2008. Identification of a New Urate and High Affinity Nicotinate Transporter, hOAT10 (SLC22A13). *Journal of Biological Chemistry* [online]. **283**(24), 16332–16341. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M800737200

BAKHIYA, Adiya, Andrew BAHN, Gerhard BURCKHARDT a Natascha WOLFF, 2003. Human organic anion transporter 3 (hOAT3) can operate as an exchanger and mediate secretory urate flux. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* [online]. **13**(5), 249–56. ISSN 1015-8987. Dostupné z: doi:10.1159/000074539

BATEMAN, Alex, Maria Jesus MARTIN, Sandra ORCHARD, Michele MAGRANE, Rahat AGIVETOVA, Shadab AHMAD, Emanuele ALPI, Emily H. BOWLER-BARNETT, Ramona BRITTO, Borisas BURSTEINAS, Hema BYE-A-JEE, Ray COETZEE, Austra CUKURA, Alan Da SILVA, Paul DENNY, Tunca DOGAN, Thank God EBENEZER, Jun FAN, Leyla Garcia CASTRO, Penelope GARMIRI, George GEORGHIOU, Leonardo GONZALES, Emma HATTON-ELLIS, Abdulrahman HUSSEIN, Alexandr IGNATCHENKO, Giuseppe INSANA, Rizwan ISHTIAQ, Petteri JOKINEN, Vishal JOSHI, Dushyanth JYOTHI, Antonia LOCK, Rodrigo LOPEZ, Aurelien LUCIANI, Jie LUO, Yvonne LUSSI, Alistair MACDOUGALL, Fabio MADEIRA, Mahdi MAHMOUDY, Manuela MENCHI, Alok MISHRA, Katie MOULANG, Andrew NIGHTINGALE, Carla Susana OLIVEIRA, Sangya PUNDIR, Guoying QI, Shriya RAJ, Daniel RICE, Milagros Rodriguez LOPEZ, Rabie SAIDI, Joseph SAMPSON, Tony SAWFORD, Elena SPERETTA, Edward TURNER, Nidhi TYAGI, Preethi VASUDEV, Vladimir VOLYNKIN, Kate WARNER, Xavier WATKINS, Rossana ZARU, Hermann ZELLNER, Alan BRIDGE, Sylvain POUX, Nicole REDASCHI, Lucila AIMO, Ghislaine ARGOUD-PUY, Andrea AUCHINCLOSS, Kristian AXELSEN, Parit BANSAL, Delphine BARATIN, Marie Claude BLATTER, Jerven BOLLEMAN, Emmanuel BOUTET, Lionel BREUZA, Cristina CASALS-CASAS, Edouard DE CASTRO, Kamal Chikh ECHIOUKH, Elisabeth COUDERT, Beatrice CUCHE, Mikael DOCHE, Dolnide DORNEVIL, Anne ESTREICHER, Maria Livia FAMILIETTI, Marc FEUERMANN, Elisabeth GASTEIGER, Sebastien GEHANT, Vivienne GERRITSEN, Arnaud GOS, Nadine GRUAZ-GUMOWSKI, Ursula HINZ, Chantal HULO, Nevila HYKA-NOUSPIKEL, Florence JUNGO, Guillaume KELLER, Arnaud KERHORNOU, Vicente LARA, Philippe LE MERCIER, Damien LIEBERHERR, Thierry LOMBARDOT, Xavier MARTIN, Patrick MASSON, Anne MORGAT, Teresa Batista NETO, Salvo PAESANO, Ivo PEDRUZZI, Sandrine PILBOUT, Lucille POURCEL, Monica POZZATO, Manuela PRUESS,

Catherine RIVOIRE, Christian SIGRIST, Karin SONESSON, Andre STUTZ, Shyamala SUNDARAM, Michael TOGNOLLI, Laure VERBREGUE, Cathy H. WU, Cecilia N. ARIGHI, Leslie ARMINSKI, Chuming CHEN, Yongxing CHEN, John S. GARAVELLI, Hongzhan HUANG, Kati LAIHO, Peter MCGARVEY, Darren A. NATALE, Karen ROSS, C. R. VINAYAKA, Qinghua WANG, Yuqi WANG, Lai Su YEH a Jian ZHANG, 2021. UniProt: The universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research* [online]. **49**(D1), D480–D489. ISSN 13624962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkaa1100

BHATNAGAR, Vibha, Erin L. RICHARD, Wei WU, Caroline M. NIEVERGELT, Michael S. LIPKOWITZ, Janina JEFF, X. MAIHOFFER a Sanjay K. NIGAM, 2016. Analysis of ABCG2 and other urate transporters in uric acid homeostasis in chronic kidney disease: Potential role of remote sensing and signaling. *Clinical Kidney Journal* [online]. **9**(3), 444–453. ISSN 20488513. Dostupné z: doi:10.1093/ckj/sfw010

BOBULESCU, Ion Alexandru a Orson W. MOE, 2012. Renal Transport of Uric Acid: Evolving Concepts and Uncertainties. *Advances in Chronic Kidney Disease* [online]. **19**(6), 358–371. ISSN 15485595. Dostupné z: doi:10.1053/j.ackd.2012.07.009

BOYLE, Evan A., Yang I. LI a Jonathan K. PRITCHARD, 2017. An Expanded View of Complex Traits: From Polygenic to Omnigenic. *Cell* [online]. **169**(7), 1177–1186. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2017.05.038

BURNS, Christopher M. a Robert L. WORTMANN, 2012. Latest evidence on gout management: what the clinician needs to know. *Therapeutic Advances in Chronic Disease* [online]. **3**(6), 271–286. ISSN 2040-6223. Dostupné z: doi:10.1177/2040622312462056

CAULFIELD, Mark J., Patricia B. MUNROE, Deb O'NEILL, Kate WITKOWSKA, Fadi J. CHARCHAR, Manuel DOBLADO, Sarah EVANS, Susana EYHERAMENDY, Abiodun ONIPINLA, Philip HOWARD, Sue SHAW-HAWKINS, Richard J. DOBSON, Chris WALLACE, Stephen J. NEWHOUSE, Morris BROWN, John M. CONNELL, Anna DOMINICZAK, Martin FARRALL, G. Mark LATHROP, Nilesh J. SAMANI, Meena KUMARI, Michael MARMOT, Eric BRUNNER, John CHAMBERS, Paul ELLIOTT, Jaspal KOONER, Maris LAAN, Elin ORG, Gudrun VELDRE, Margus VIIGIMAA, Francesco P. CAPPUCCIO, Chen JI, Roberto IACONE, Pasquale STRAZZULLO, Kelle H. MOLEY a Chris CHEESEMAN, 2008. SLC2A9 is a high-capacity urate transporter in humans. *PLoS Medicine* [online]. **5**(10), 1509–1523. ISSN 15491277. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pmed.0050197

CHA, Seok Ho, Takashi SEKINE, Hiroyuki KUSUHARA, Erkang YU, Ju Young KIM, Do Kyung KIM, Yuichi SUGIYAMA, Yoshikatsu KANAI a Hitoshi ENDOU, 2000. Molecular cloning and characterization of multispecific organic anion transporter 4 expressed in the placenta. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **275**(6), 4507–4512. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.275.6.4507

CHANTEMARGUE, Benjamin, Florent DI MEO, Karel BERKA, Nicolas PICARD, Helene ARNION, Marie ESSIG, Pierre MARQUET, Michal OTYEPKA a Patrick TROUILLAS, 2018. Structural patterns of the human ABCC4/MRP4 exporter in lipid bilayers rationalize clinically observed polymorphisms. *Pharmacological research* [online]. **133**, 318–327. ISSN 1096-1186. Dostupné z: doi:10.1016/j.phrs.2018.02.029

CHEN, Liming, Jose E. MANAUTOU, Theodore P. RASMUSSEN a Xiao bo ZHONG, 2019. Development of precision medicine approaches based on inter-individual variability of BCRP/ABCG2. *Acta Pharmaceutica Sinica B* [online]. **9**(4), 659–674. ISSN 22113843. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsb.2019.01.007

CHEN, Mo, Chenyi YE, Jianing ZHU, Peiyu ZHANG, Yujie JIANG, Xiaoyong LU a Huaxiang WU, 2020. Bergenin as a Novel Urate-Lowering Therapeutic Strategy for Hyperuricemia. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [online]. **8**(July), 1–13. ISSN 2296634X. Dostupné z: doi:10.3389/fcell.2020.00703

CHEN, Pin, Lin ZHAO, Peng ZOU, Haitao XU, Ailin LU a Peng ZHAO, 2012. The contribution of the ABCG2 C421A polymorphism to cancer susceptibility: a meta-analysis of the current literature. *BMC Cancer* [online]. **12**(1), 383. ISSN 1471-2407. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2407-12-383

CHIBA, Toshinori, Hiroataka MATSUO, Yusuke KAWAMURA, Shushi NAGAMORI, Takashi NISHIYAMA, Ling WEI, Akiyoshi NAKAYAMA, Takahiro NAKAMURA, Masayuki SAKIYAMA, Tappei TAKADA, Yutaka TAKETANI, Shino SUMA, Mariko NAITO, Takashi ODA, Hiroo KUMAGAI, Yoshinori MORIYAMA, Kimiyoshi ICHIDA, Toru SHIMIZU, Yoshikatsu KANAI a Nariyoshi SHINOMIYA, 2015. NPT1/SLC17A1 is a renal urate exporter in humans and its common gain-of-function variant decreases the risk of renal underexcretion gout. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)* [online]. **67**(1), 281–7. ISSN 2326-5205. Dostupné z: doi:10.1002/art.38884

CHO, Sung Kweon, Soriul KIM, Jae Yong CHUNG a Sun Ha JEE, 2015. Discovery of URAT1 SNPs and

- association between serum uric acid levels and URAT1. *BMJ Open* [online]. **5**(11). ISSN 20446055. Dostupné z: doi:10.1136/bmjopen-2015-009360
- CRONSTEIN, Bruce N. a Prashanth SUNKUREDDI, 2013. Mechanistic Aspects of Inflammation and Clinical Management of Inflammation in Acute Gouty Arthritis. *JCR: Journal of Clinical Rheumatology* [online]. **19**(1), 19–29. ISSN 1076-1608. Dostupné z: doi:10.1097/RHU.0b013e31827d8790
- DALBETH, Nicola, Meaghan E. HOUSE, Opetai AATI, Paul TAN, Christopher FRANKLIN, Anne HORNE, Gregory D. GAMBLE, Lisa K. STAMP, Anthony J. DOYLE a Fiona M. MCQUEEN, 2015. Urate crystal deposition in asymptomatic hyperuricaemia and symptomatic gout: a dual energy CT study. *Annals of the Rheumatic Diseases* [online]. **74**(5), 908–911. ISSN 0003-4967. Dostupné z: doi:10.1136/annrheumdis-2014-206397
- DALBETH, Nicola, Thomas J. LAUTERIO a Henry R. WOLFE, 2014. Mechanism of action of colchicine in the treatment of gout. *Clinical therapeutics* [online]. **36**(10), 1465–79. ISSN 1879-114X. Dostupné z: doi:10.1016/j.clinthera.2014.07.017
- DALBETH, Nicola a Lisa STAMP, 2014. Hyperuricaemia and gout: Time for a new staging system? *Annals of the Rheumatic Diseases* [online]. **73**(9), 1598–1600. ISSN 14682060. Dostupné z: doi:10.1136/annrheumdis-2014-205304
- DEAN, Michael, Andrey RZHETSKY a Rando ALLIKMETS, 2001. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research* [online]. **11**, 1156–1166. ISSN 0022-2275. Dostupné z: doi:10.1101/gr.184901
- DEELEY, Roger G., Christopher WESTLAKE a Susan P C COLE, 2006. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiological reviews* [online]. **86**(3), 849–99. ISSN 0031-9333. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.00035.2005
- DEHGHAN, Abbas, Anna KÖTTGEN, Qiong YANG, Shih-Jen HWANG, WH Linda KAO, Fernando RIVADENEIRA, Eric BOERWINKLE, Daniel LEVY, Albert HOFMAN, Brad C. ASTOR, Emelia J. BENJAMIN, Cornelia M. VAN DUIJN, Jacqueline C. WITTEMAN, Josef CORESH a Caroline S. FOX, 2008. Association of three genetic loci with uric acid concentration and risk of gout: a genome-wide association study. *Lancet (London, England)* [online]. **372**(9654), 1953–61. ISSN 1474-547X. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(08)61343-4
- DEHLIN, Mats, Lennart JACOBSSON a Edward RODDY, 2020. Global epidemiology of gout: prevalence, incidence, treatment patterns and risk factors. *Nature Reviews Rheumatology* [online]. **16**(7), 380–390. ISSN 17594804. Dostupné z: doi:10.1038/s41584-020-0441-1
- DEJANOVIC, Borislav, Tania DJÉMIÉ, Nora GRÜNEWALD, Arvid SULLS, Vanessa KRESS, Florian HETSCH, Dana CRAIU, Matthew ZEMEL, Padhraig GORMLEY, Dennis LAL, Candace T MYERS, Heather C MEFFORD, Aarno PALOTIE, Ingo HELBIG, Jochen C MEIER, Peter DE JONGHE, Sarah WECKHUYSSEN a Guenter SCHWARZ, 2015. Simultaneous impairment of neuronal and metabolic function of mutated gephyrin in a patient with epileptic encephalopathy. *EMBO Molecular Medicine* [online]. **7**(12), 1580–1594. ISSN 1757-4676. Dostupné z: doi:10.15252/emmm.201505323
- DIESTRA, Julio E., George L. SCHEFFER, Isabel CATALÀ, Marc MALIEPAARD, Jan H. M. SCHELLENS, Rik J. SCHEPER, Jose R. GERMÀ-LLUCH a Miguel A. IZQUIERDO, 2002. Frequent expression of the multi-drug resistance-associated protein BCRP/MXR/ABCP/ABCG2 in human tumours detected by the BXP-21 monoclonal antibody in paraffin-embedded material. *The Journal of pathology* [online]. **198**(2), 213–9. ISSN 0022-3417. Dostupné z: doi:10.1002/path.1203
- DINOUR, Dganit, Nicola K. GRAY, Liat GANON, Andrew J.S. KNOX, Hanna SHALEV, Ben Ami SELA, Susan CAMPBELL, Lindsay SAWYER, Xinhua SHU, Evgenia VALSAMIDOU, Daniel LANDAU, Alan F. WRIGHT a Eliezer J. HOLTZMAN, 2012. Two novel homozygous SLC2A9 mutations cause renal hypouricemia type 2. *Nephrology Dialysis Transplantation* [online]. **27**(3), 1035–1041. ISSN 14602385. Dostupné z: doi:10.1093/ndt/gfr419
- DUONG, Nguyen Thuy, Nguyen Thy NGOC, Nguyen Tran Minh THANG, Bach Thi Hoai PHUONG, Nguyen Thanh NGA, Nguyen Doan TINH, Do Hai QUYNH, Nguyen Dang TON a Nong Van HAI, 2019. Polymorphisms of ABCG2 and SLC22A12 genes associated with gout risk in Vietnamese population. *Medicina (Lithuania)* [online]. **55**(1), 1–11. ISSN 1010660X. Dostupné z: doi:10.3390/medicina55010008
- DUTA-CORNESCU, Georgiana, Alexandra SIMON-GRUITA, Nicoleta CONSTANTIN, F. STANCIU,

- Michaela DOBRE, Dorina BANICA, Rodica TUDUCE, P. CRISTEA a Veronica STOIAN, 2009. A comparative study of ARMS - PCR and RFLP - PCR as methods for rapid SNP identification. *Romanian Biotechnological Letters*. **14**(6), 4845–4850. ISSN 12245984.
- EICHLER, Evan E., 2019. Genetic Variation, Comparative Genomics, and the Diagnosis of Disease. *New England Journal of Medicine* [online]. **381**(1), 64–74. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMra1809315
- ERDMAN, Andrew R., Lara M. MANGRAVITE, Thomas J. URBAN, Leah L. LAGPACAN, Richard A. CASTRO, Melanie DE LA CRUZ, Wendy CHAN, Conrad C. HUANG, Susan J. JOHNS, Michiko KAWAMOTO, Douglas STRYKE, Travis R. TAYLOR, Elaine J. CARLSON, Thomas E. FERRIN, Claire M. BRETT, Esteban G. BURCHARD a Kathleen M. GIACOMINI, 2006. The human organic anion transporter 3 (OAT3; SLC22A8): genetic variation and functional genomics. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* [online]. **290**(4), F905–F912. ISSN 1931-857X. Dostupné z: doi:10.1152/ajprenal.00272.2005
- EVANS, Peter L., James A. PRIOR, John BELCHER, Christian D. MALLEEN, Charles A. HAY a Edward RODDY, 2018. Obesity, hypertension and diuretic use as risk factors for incident gout: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Arthritis research & therapy* [online]. **20**(1), 136. ISSN 1478-6362. Dostupné z: doi:10.1186/s13075-018-1612-1
- FEIG, Daniel I., 2012. Hyperuricemia and Hypertension. *Advances in Chronic Kidney Disease* [online]. **19**(6), 377–385. ISSN 15485595. Dostupné z: doi:10.1053/j.ackd.2012.05.009
- FREI, Balz, Roland STOCKER a Bruce N. AMES, 1988. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **85**(24), 9748–52. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.85.24.9748
- FUJITA, Tomoe, Chaline BROWN, Elaine J. CARLSON, Travis TAYLOR, Melanie DE LA CRUZ, Susan J. JOHNS, Doug STRYKE, Michiko KAWAMOTO, Kazumi FUJITA, Richard CASTRO, Chung-Wen CHEN, Emil T. LIN, Claire M. BRETT, Esteban Gonzalez BURCHARD, Thomas E. FERRIN, Conrad C. HUANG, Maya K. LEABMAN a Kathleen M. GIACOMINI, 2005. Functional analysis of polymorphisms in the organic anion transporter, SLC22A6 (OAT1). *Pharmacogenetics and Genomics* [online]. **15**(4), 201–209. ISSN 1744-6872. Dostupné z: doi:10.1097/01213011-200504000-00003
- FURUKAWA, Tomoka, Kanako WAKABAYASHI, Ai TAMURA, Hiroshi NAKAGAWA, Yoshihiro MORISHIMA, Yoichi OSAWA a Toshihisa ISHIKAWA, 2009. Major SNP (Q141K) variant of human ABC transporter ABCG2 undergoes lysosomal and proteasomal degradations. *Pharmaceutical research* [online]. **26**(2), 469–79. ISSN 0724-8741. Dostupné z: doi:10.1007/s11095-008-9752-7
- GARCÍA-PAVÍA, Pablo, Rosa J. TORRES, Manuel RIVERO, Maqbool AHMED, Juan GARCÍA-PUIG a Michael A. BECKER, 2003. Phosphoribosylpyrophosphate synthetase overactivity as a cause of uric acid overproduction in a young woman. *Arthritis and rheumatism* [online]. **48**(7), 2036–41. ISSN 0004-3591. Dostupné z: doi:10.1002/art.11058
- GHAFOURI, Houshiyar, Bayazid GHADERI, Sabrieh AMINI, Bahram NIKKHOO, Mohammad ABDI a Abdolhakim HOSEINI, 2016. Association of ABCB1 and ABCG2 single nucleotide polymorphisms with clinical findings and response to chemotherapy treatments in Kurdish patients with breast cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* [online]. **37**(6), 7901–6. ISSN 1423-0380. Dostupné z: doi:10.1007/s13277-015-4679-1
- GIRI, Anil K., Priyanka BANERJEE, Shraddha CHAKRABORTY, Yasmeen KAUSER, Aditya UNDRU, Suki ROY, Vaisak PAREKATT, Saurabh GHOSH, Nikhil TANDON a Dwaipayan BHARADWAJ, 2016. Genome wide association study of uric acid in Indian population and interaction of identified variants with Type 2 diabetes. *Scientific Reports* [online]. **6**(January), 1–9. ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/srep21440
- GIRI, Anil K., Gauri PRASAD, Khushdeep BANDESH, Vaisak PAREKATT, Anubha MAHAJAN, Priyanka BANERJEE, Yasmeen KAUSER, Shraddha CHAKRABORTY, Donaka RAJASHEKAR, Viswanathan MOHAN, Saurabh GHOSH, Rubina TABASSUM, Ganesh CHAUHAN, Om Prakash DWIVEDI, Lakshmi RAMAKRISHNAN, Radha VENKATESAN, M. CHIDAMBARAM, D. PRABHAKARAN, K. S. REDDY, Monisha BANERJEE, Madhukar SAXENA, Sandeep MATHUR, Anil BHANSALI, Viral SHAH, S. V. MADHU, R. K. MARWAHA, Pradeep VENKATESH, S. K. AGGARWAL, Shantanu SENGUPTA, Sreenivas CHAVALI, Amitabh SHARMA, B. ABITHA, Aditya UNDRU, Suki ROY, Anjali SINGH, Punam JHA, Nikhil TANDON, Dwaipayan BHARADWAJ, Abhay SHARMA, Analabha BASU, Sandeep Kumar MATHUR a Mark I. MCCARTHY, 2020. Multifaceted genome-wide study identifies novel regulatory loci in SLC22A11 and ZNF45 for body mass index in Indians. *Molecular Genetics and Genomics* [online]. **295**(4), 1013–1026.

ISSN 16174623. Dostupné z: doi:10.1007/s00438-020-01678-6

GONZALEZ, Emilio B., 2012. An update on the pathology and clinical management of gouty arthritis. *Clinical rheumatology* [online]. **31**(1), 13–21. ISSN 1434-9949. Dostupné z: doi:10.1007/s10067-011-1877-0

GUT, Ivo Glynne, 2013. New sequencing technologies. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* [online]. **15**(11), 879–81. ISSN 1699-3055. Dostupné z: doi:10.1007/s12094-013-1073-6

HAGOS, Yohannes, Daniel STEIN, Bernhard UGELE, Gerhard BURCKHARDT a Andrew BAHN, 2007. Human renal organic anion transporter 4 operates as an asymmetric urate transporter. *Journal of the American Society of Nephrology* [online]. **18**(2), 430–439. ISSN 10466673. Dostupné z: doi:10.1681/ASN.2006040415

HAK, A. Elisabeth, Gary C. CURHAN, Francine GRODSTEIN a Hyon K. CHOI, 2010. Menopause, postmenopausal hormone use and risk of incident gout. *Annals of the rheumatic diseases* [online]. **69**(7), 1305–9. ISSN 1468-2060. Dostupné z: doi:10.1136/ard.2009.109884

HÄNZELMANN, Petra, Günter SCHWARZ a Ralf R. MENDEL, 2002. Functionality of Alternative Splice Forms of the First Enzymes Involved in Human Molybdenum Cofactor Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **277**(21), 18303–18312. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M200947200

HARRIS, James C., 2018. Lesch-Nyhan syndrome and its variants: examining the behavioral and neurocognitive phenotype. *Current opinion in psychiatry* [online]. **31**(2), 96–102. ISSN 1473-6578. Dostupné z: doi:10.1097/YCO.0000000000000388

HASDAY, Jeffrey D. a Cyril M. GRUM, 1987. Nocturnal increase of urinary uric acid:creatinine ratio. A biochemical correlate of sleep-associated hypoxemia. *The American review of respiratory disease* [online]. **135**(3), 534–8. ISSN 0003-0805. Dostupné z: doi:10.1164/arrd.1987.135.3.534

HE, Yuan, Hideki HARA a Gabriel NÚÑEZ, 2016. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends in biochemical sciences* [online]. **41**(12), 1012–1021. ISSN 0968-0004. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibs.2016.09.002

HIGASHINO, Toshihide, Keito MORIMOTO, Hirofumi NAKAOKA, Yu TOYODA, Yusuke KAWAMURA, Seiko SHIMIZU, Takahiro NAKAMURA, Kazuyoshi HOSOMICHI, Akiyoshi NAKAYAMA, Keiko OOOYAMA, Hiroshi OOOYAMA, Toru SHIMIZU, Miki UENO, Toshimitsu ITO, Takashi TAMURA, Mariko NAITO, Hiroshi NAKASHIMA, Makoto KAWAGUCHI, Mikiya TAKAO, Yosuke KAWAI, Naoki OSADA, Kimiyoshi ICHIDA, Ken YAMAMOTO, Hiroshi SUZUKI, Nariyoshi SHINOMIYA, Ituro INOUE, Tappei TAKADA a Hirotaka MATSUO, 2020. Dysfunctional missense variant of OAT10/SLC22A13 decreases gout risk and serum uric acid levels. *Annals of the Rheumatic Diseases* [online]. **79**(1), 164–166. ISSN 0003-4967. Dostupné z: doi:10.1136/annrhumdis-2019-216044

HIGASHINO, Toshihide, Tappei TAKADA, Hirofumi NAKAOKA, Yu TOYODA, Blanka STIBURKOVA, Hiroshi MIYATA, Yuki IKEBUCHI, Hiroshi NAKASHIMA, Seiko SHIMIZU, Makoto KAWAGUCHI, Masayuki SAKIYAMA, Akiyoshi NAKAYAMA, Airi AKASHI, Yuki TANAHASHI, Yusuke KAWAMURA, Takahiro NAKAMURA, Kenji WAKAI, Rieko OKADA, Ken YAMAMOTO, Kazuyoshi HOSOMICHI, Tatsuo HOSOYA, Kimiyoshi ICHIDA, Hiroshi OOOYAMA, Hiroshi SUZUKI, Ituro INOUE, Tony R. MERRIMAN, Nariyoshi SHINOMIYA a Hirotaka MATSUO, 2017. Multiple common and rare variants of ABCG2 cause gout. *RMD Open* [online]. **3**(2), e000464. ISSN 2056-5933. Dostupné z: doi:10.1136/rmdopen-2017-000464

HOLLIS-MOFFATT, Jade E., Peter J. GOW, Andrew A. HARRISON, John HIGHTON, Peter B.B. JONES, Lisa K. STAMP, Nicola DALBETH a Tony R. MERRIMAN, 2011. The SLC2A9 nonsynonymous Arg265His variant and gout: evidence for a population-specific effect on severity. *Arthritis Research & Therapy* [online]. **13**(3), R85. ISSN 1478-6354. Dostupné z: doi:10.1186/ar3356

HOLLIS-MOFFATT, Jade E., Amanda J. PHIPPS-GREEN, Brett CHAPMAN, Gregory T. JONES, Andre VAN RIJ, Peter J. GOW, Andrew A. HARRISON, John HIGHTON, Peter B. JONES, Grant W. MONTGOMERY, Lisa K. STAMP, Nicola DALBETH a Tony R. MERRIMAN, 2012. The renal urate transporter SLC17A1 locus: Confirmation of association with gout. *Arthritis Research and Therapy* [online]. **14**(2), R92. ISSN 14786354. Dostupné z: doi:10.1186/ar3816

HOSOMI, Atsushi, Takeo NAKANISHI, Takuya FUJITA a Ikumi TAMAI, 2012. Extra-renal elimination of uric acid via intestinal efflux transporter BCRP/ABCG2. *PLoS ONE* [online]. **7**(2), 2–9. ISSN 19326203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0030456

HOWE, Kevin L, Premanand ACHUTHAN, Jamie James ALLEN, Jamie James ALLEN, Jorge ALVAREZ-

JARRETA, M Ridwan AMODE, Irina M ARMEAN, Andrey G AZOV, Ruth BENNETT, Jyothish BHAI, Konstantinos BILLIS, Sanjay BODDU, Mehrnaz CHARKHCHI, Carla CUMMINS, Luca DA RIN FIORETTO, Claire DAVIDSON, Kamalkumar DODIYA, Bilal EL HOUDAIGUI, Reham FATIMA, Astrid GALL, Carlos GARCIA GIRON, Tiago GREGO, Cristina GUIJARRO-CLARKE, Leanne HAGGERTY, Anmol HEMROM, Thibaut HOURLIER, Osagie G IZUOGU, Thomas JUETTEMANN, Vinay KAIKALA, Mike KAY, Ilias LAVIDAS, Tuan LE, Diana LEMOS, Jose GONZALEZ MARTINEZ, José Carlos MARUGÁN, Thomas MAUREL, Aoife C MCMAHON, Shamika MOHANAN, Benjamin MOORE, Matthieu MUFFATO, Dene N OHEH, Dimitrios PARASCHAS, Anne PARKER, Andrew PARTON, Irina PROSOVETSKAIA, Manoj P SAKTHIVEL, Ahamed I Abdul SALAM, Bianca M SCHMITT, Helen SCHUILENBURG, Dan SHEPPARD, Emily STEED, Michal SZPAK, Marek SZUBA, Kieron TAYLOR, Anja THORMANN, Glen THREADGOLD, Brandon WALTERS, Andrea WINTERBOTTOM, Marc CHAKIACHVILI, Ameya CHAUBAL, Nishadi DE SILVA, Bethany FLINT, Adam FRANKISH, Sarah E HUNT, Garth R IISLEY, Nick LANGRIDGE, Jane E LOVELAND, Fergal J MARTIN, Jonathan M MUDGE, Joanela MORALES, Emily PERRY, Magali RUFFIER, John TATE, David THYBERT, Stephen J TREVANION, Fiona CUNNINGHAM, Andrew D YATES, Daniel R ZERBINO a Paul FLICEK, 2021. Ensembl 2021. *Nucleic Acids Research* [online]. **49**(D1), D884–D891. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkaa942

HURBA, Olha, Andrea MANCIKOVA, Vladimir KRYLOV, Marketa PAVLIKOVA, Karel PAVELKA a Blanka STIBURKOVÁ, 2014. Complex analysis of urate transporters SLC2A9, SLC22A12 and functional characterization of non-synonymous allelic variants of GLUT9 in the Czech population: No evidence of effect on hyperuricemia and gout. *PLoS ONE* [online]. **9**(9). ISSN 19326203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0107902

ICHIDA, Kimiyoshi, M. HOSOYAMADA, N. KAMATANI, S. KAMITSUJI, I. HISATOME, T. SHIBASAKI a T. HOSOYA, 2008. Age and origin of the G774A mutation in SLC22A12 causing renal hypouricemia in Japanese. *Clinical Genetics* [online]. **74**(3), 243–251. ISSN 00099163. Dostupné z: doi:10.1111/j.1399-0004.2008.01021.x

ICHIDA, Kimiyoshi, Hirotaka MATSUO, Tappei TAKADA, Akiyoshi NAKAYAMA, Keizo MURAKAMI, Toru SHIMIZU, Yoshihide YAMANASHI, Hiroshi KASUGA, Hiroshi NAKASHIMA, Takahiro NAKAMURA, Yuzo TAKADA, Yusuke KAWAMURA, Hiroki INOUE, Chisa OKADA, Yoshitaka UTSUMI, Yuki IKEBUCHI, Kousei ITO, Makiko NAKAMURA, Yoshihiko SHINOHARA, Makoto HOSOYAMADA, Yutaka SAKURAI, Nariyoshi SHINOMIYA, Tatsuo HOSOYA a Hiroshi SUZUKI, 2012. Decreased extra-renal urate excretion is a common cause of hyperuricemia. *Nature Communications* [online]. **3**(1), 764. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms1756

IHARADA, Masafumi, Takaaki MIYAJI, Takahiro FUJIMOTO, Miki HIASA, Naohiko ANZAI, Hiroshi OMOTE a Yoshinori MORIYAMA, 2010. Type 1 sodium-dependent phosphate transporter (SLC17A1 Protein) is a Cl(-)-dependent urate exporter. *The Journal of biological chemistry* [online]. **285**(34), 26107–13. ISSN 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M110.122721

JIN, Ming, Fan YANG, Irene YANG, Ying YIN, Jin Jun LUO, Hong WANG a Xiao Feng YANG, 2012. Uric acid, hyperuricemia and vascular diseases. *Frontiers in Bioscience* [online]. **17**(2), 656–669. ISSN 10939946. Dostupné z: doi:10.2741/3950

JOHNS, Susan Jean, 2021. *TOPO2, Transmembrane protein display software* [online]. 2021. Dostupné z: <http://www.sacs.ucsf.edu/TOPO2/>

JOHNSON, Andrew D., Robert E. HANDSAKER, Sara L. PULIT, Marcia M. NIZZARI, Christopher J. O'DONNELL a Paul I.W. DE BAKKER, 2008. SNAP: A web-based tool for identification and annotation of proxy SNPs using HapMap. *Bioinformatics* [online]. **24**(24), 2938–2939. ISSN 13674803. Dostupné z: doi:10.1093/bioinformatics/btn564

JUTABHA, Promsuk, Naohiko ANZAI, Kenichiro KITAMURA, Atsuo TANIGUCHI, Shuji KANEKO, Kunimasa YAN, Hideomi YAMADA, Hidetaka SHIMADA, Toru KIMURA, Tomohisa KATADA, Toshiyuki FUKUTOMI, Kimio TOMITA, Wako URANO, Hisashi YAMANAKA, George SEKI, Toshiro FUJITA, Yoshinori MORIYAMA, Akira YAMADA, Shunya UCHIDA, Michael F. WEMPE, Hitoshi ENDOU a Hiroyuki SAKURAI, 2010. Human Sodium Phosphate Transporter 4 (hNPT4/ SLC17A3) as a Common Renal Secretory Pathway for Drugs and Urate. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **285**(45), 35123–35132. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M110.121301

KANELLIS, John a Duk-Hee KANG, 2005. Uric acid as a mediator of endothelial dysfunction, inflammation, and vascular disease. *Seminars in nephrology* [online]. **25**(1), 39–42. ISSN 0270-9295. Dostupné z: doi:10.1016/j.semnephrol.2004.09.007

KAWAMURA, Yusuke, Hirofumi NAKAOKA, Akiyoshi NAKAYAMA, Yukinori OKADA, Ken YAMAMOTO, Toshihide HIGASHINO, Masayuki SAKIYAMA, Toru SHIMIZU, Hiroshi OOOYAMA, Keiko OOOYAMA, Mitsuo NAGASE, Yuji HIDAOKA, Yuko SHIRAHAMA, Kazuyoshi HOSOMICHI, Yuichiro NISHIDA, Ippei SHIMOSHIKIRYO, Asahi HISHIDA, Sakurako KATSUURA-KAMANO, Seiko SHIMIZU, Makoto KAWAGUCHI, Hirokazu UEMURA, Rie IBUSUKI, Megumi HARA, Mariko NAITO, Mikiya TAKAO, Mayuko NAKAJIMA, Satoko IWASAWA, Hiroshi NAKASHIMA, Keizo OHNAKA, Takahiro NAKAMURA, Blanka STIBURKOVA, Tony R. MERRIMAN, Masahiro NAKATOCHI, Sahoko ICHIHARA, Mitsuhiro YOKOTA, Tappei TAKADA, Tatsuya SAITOH, Yoichiro KAMATANI, Atsushi TAKAHASHI, Kokichi ARISAWA, Toshiro TAKEZAKI, Keitaro TANAKA, Kenji WAKAI, Michiaki KUBO, Tatsuo HOSOYA, Kimiyoshi ICHIDA, Ituro INOUE, Nariyoshi SHINOMIYA a Hiroataka MATSUO, 2019. Genome-wide association study revealed novel loci which aggravate asymptomatic hyperuricaemia into gout. *Annals of the Rheumatic Diseases* [online]. **78**(10), 1430–1437. ISSN 14682060. Dostupné z: doi:10.1136/annrheumdis-2019-215521

KIENHORST, Laura B E, Ellen VAN LOCHEM, Wietske KIEVIT, Nicola DALBETH, Marilyn E MERRIMAN, Amanda PHIPPS-GREEN, Arnoud LOOF, Waander VAN HEERDE, Sita VERMEULEN, Lisa K. STAMP, Elly VAN KOOLWIJK, Jacqueline DE GRAAF, Dirk HOLZINGER, Johannes ROTH, Hein J E M JANSSENS, Tony R. MERRIMAN, Jasper C A BROEN, Matthijs JANSSEN a Timothy R D J RADSTAKE, 2015. Gout Is a Chronic Inflammatory Disease in Which High Levels of Interleukin-8 (CXCL8), Myeloid-Related Protein 8/Myeloid-Related Protein 14 Complex, and an Altered Proteome Are Associated With Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)* [online]. **67**(12), 3303–13. ISSN 2326-5205. Dostupné z: doi:10.1002/art.39318

KOSTALOVA, Eva, Karel PAVELKA, Hana VLASKOVA a Blanka STIBURKOVA, 2015. Hyperuricemia and gout due to deficiency of hypoxanthine–guanine phosphoribosyltransferase in female carriers: New insight to differential diagnosis. *Clinica Chimica Acta* [online]. **440**, 214–217. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2014.11.026

KÖTTGEN, Anna, Eva ALBRECHT, Alexander TEUMER, Veronique VITART, Claudia HUNDERTMARK, Giorgio PISTIS, Daniela RUGGIERO a M CONALL, 2013. Genome-wide association analyses identify 18 new loci associated with serum urate concentrations [online]. **45**(2), 145–154. Dostupné z: doi:10.1038/ng.2500.Genome-wide

KRISHNAMURTHY, Partha, Matthias SCHWAB, Kazumasa TAKENAKA, Deepa NACHAGARI, Jessica MORGAN, Mark LESLIE, Weinan DU, Kelli BOYD, Meyling CHEOK, Hiromitsu NAKAUCHI, Catia MARZOLINI, Richard B. KIM, Balasubramanian POONKUZHALI, Erin SCHUETZ, William EVANS, Mary RELLING a John D. SCHUETZ, 2008. Transporter-Mediated Protection against Thiopurine-Induced Hematopoietic Toxicity. *Cancer Research* [online]. **68**(13), 4983–4989. ISSN 0008-5472. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6790

KRISHNAN, Eswar, Christina N. LESSOV-SCHLAGGAR, Ruth E. KRASNOW a Gary E. SWAN, 2012. Nature versus nurture in Gout: A twin study. *American Journal of Medicine* [online]. **125**(5), 499–504. ISSN 00029343. Dostupné z: doi:10.1016/j.amjmed.2011.11.010

KUSHIYAMA, Akifumi, Yusuke NAKATSU, Yasuka MATSUNAGA, Takeshi YAMAMOTOYA, Keiichi MORI, Koji UEDA, Yuki INOUE, Hideyuki SAKODA, Midori FUJISHIRO, Hiraku ONO a Tomoichiro ASANO, 2016. Role of Uric Acid Metabolism-Related Inflammation in the Pathogenesis of Metabolic Syndrome Components Such as Atherosclerosis and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Mediators of Inflammation* [online]. **2016**, 1–15. ISSN 0962-9351. Dostupné z: doi:10.1155/2016/8603164

KUSUHARA, Hiroyuki, Takashi SEKINE, Naoko UTSUNOMIYA-TATE, Minoru TSUDA, Ryoji KOJIMA, Seok Ho CHA, Yuichi SUGIYAMA, Yoshikatsu KANAI a Hitoshi ENDOU, 1999. Molecular cloning and characterization of a new multispecific organic anion transporter from rat brain. *The Journal of biological chemistry* [online]. **274**(19), 13675–80. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.274.19.13675

KUWABARA, Masanari, Koichiro NIWA, Akira OHTAHARA, Toshihiro HAMADA, Satoshi MIYAZAKI, Einosuke MIZUTA, Kazuhide OGINO a Ichiro HISATOME, 2017. Prevalence and complications of hypouricemia in a general population: A largescale cross-sectional study in Japan. *PLoS ONE* [online]. **12**(4), 1–13. ISSN 19326203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0176055

LANDIS, R. Clive a Dorian O. HASKARD, 2001. Pathogenesis of crystal-induced inflammation. *Current Rheumatology Reports* [online]. **3**(1), 36–41. ISSN 1523-3774. Dostupné z: doi:10.1007/s11926-001-0049-7

LASTON, Sandra L., V. Saroja VORUGANTI, Karin HAACK, Vallabh O. SHAH, Arlene BOBELU, Jeanette

- BOBELU, Donica GHAAHATE, Antonia M. HARFORD, Susan S. PAINE, Francesca TENTORI, Shelley A. COLE, Jean W. MACCLUER, Anthony G. COMUZZIE a Philip G. ZAGER, 2015. Genetics of kidney disease and related cardiometabolic phenotypes in Zuni Indians: the Zuni Kidney Project. *Frontiers in genetics* [online]. **6**, 6. ISSN 1664-8021. Dostupné z: doi:10.3389/fgene.2015.00006
- LEE, Hye Ah, Bo Hyun PARK, Eun Ae PARK, Su Jin CHO, Hae Soon KIM a Hyesook PARK, 2018. Long-term effects of the SLC2A9 G844A and SLC22A12 C246T variants on serum uric acid concentrations in children. *BMC Pediatrics* [online]. **18**(1), 296. ISSN 1471-2431. Dostupné z: doi:10.1186/s12887-018-1272-y
- LEIMKÜHLER, Silke, Mathilde CHARCOSSET, Philippe LATOUR, Claude DORCHE, Soledad KLEPPE, Fernando SCAGLIA, Irmina SZYM CZAK, Petra SCHUPP, Rita HAHNEWALD a Jochen REISS, 2005. Ten novel mutations in the molybdenum cofactor genes MOCS1 and MOCS2 and in vitro characterization of a MOCS2 mutation that abolishes the binding ability of molybdopterin synthase. *Human genetics* [online]. **117**(6), 565–70. ISSN 0340-6717. Dostupné z: doi:10.1007/s00439-005-1341-9
- LI, Changgui, Nan CHU, Binbin WANG, Jing WANG, Jian LUAN, Lin HAN, Dongmei MENG, Yunlong WANG, Peisu SUO, Longfei CHENG, Xu MA, Zhimin MIAO a Shiguo LIU, 2012. Polymorphisms in the presumptive promoter region of the SLC2A9 gene are associated with gout in a Chinese male population. *PloS one* [online]. **7**(2), e24561. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0024561
- LI, Changgui, Lin HAN, Albert M. LEVIN, Huaidong SONG, Shengli YAN, Yangang WANG, Yangang WANG, Dongmei MENG, S. LV, Yan JI, Xiaochen XU, Xianxian LIU, Yangang WANG, Li ZHOU, Zhimin MIAO a Q.-S. MI, 2010. Multiple single nucleotide polymorphisms in the human urate transporter 1 (hURAT1) gene are associated with hyperuricaemia in Han Chinese. *Journal of Medical Genetics* [online]. **47**(3), 204–210. ISSN 0022-2593. Dostupné z: doi:10.1136/jmg.2009.068619
- LI, Ting-Ting, Jia-Xing AN, Jing-Yu XU a Bi-Guang TUO, 2019. Overview of organic anion transporters and organic anion transporter polypeptides and their roles in the liver. *World Journal of Clinical Cases* [online]. **7**(23), 3915–3933. ISSN 2307-8960. Dostupné z: doi:10.12998/wjcc.v7.i23.3915
- LIU, Henry C., Neema JAMSHIDI, Yuchen CHEN, Satish A. ERALY, Sai Yee CHO, Vibha BHATNAGAR, Wei WU, Kevin T. BUSH, Ruben ABAGYAN, Bernhard O. PALSSON a Sanjay K. NIGAM, 2016. An Organic Anion Transporter 1 (OAT1)-centered Metabolic Network. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **291**(37), 19474–19486. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M116.745216
- LIU, Ru, Maria O'CONNELL, Kristen JOHNSON, Kenneth PRITZKER, Nigel MACKMAN a Robert TERKELTAUB, 2000. Extracellular signal-regulated kinase 1/extracellular signal-regulated kinase 2 mitogen-activated protein kinase signaling and activation of activator protein 1 and nuclear factor kappaB transcription factors play central roles in interleukin-8 expression. *Arthritis and rheumatism* [online]. **43**(5), 1145–55. ISSN 0004-3591. Dostupné z: doi:10.1002/1529-0131(200005)43:5<1145::AID-ANR25>3.0.CO;2-T
- LONG, Wentong, Rashmi PANIGRAHI, Pankaj PANWAR, Kenneth WONG, Debbie O NEILL, Xing-Zhen CHEN, M. Joanne LEMIEUX a Chris I. CHEESEMAN, 2017. Identification of Key Residues for Urate Specific Transport in Human Glucose Transporter 9 (hSLC2A9). *Scientific reports* [online]. **7**(January), 41167. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep41167
- LUKKUNAPRASIT, Thitiya, Sasivimol RATTANASIRI, Saowalak TURONGKARAVEE, Naravut SUVANNANG, Atiporn INGSATHIT, John ATTIA a Ammarin THAKKINSTIAN, 2020. The association between genetic polymorphisms in ABCG2 and SLC2A9 and urate: an updated systematic review and meta-analysis. *BMC medical genetics* [online]. **21**(1), 210. ISSN 1471-2350. Dostupné z: doi:10.1186/s12881-020-01147-2
- MACALOU, Sira, Robert W. ROBEY, Gustavo JABOR GOZZI, Suneet SHUKLA, Isabelle GROSJEAN, Tamas HEGEDUS, Suresh V. AMBUDKAR, Susan Elaine BATES a Attilio DI PIETRO, 2016. The linker region of breast cancer resistance protein ABCG2 is critical for coupling of ATP-dependent drug transport. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* [online]. **73**(9), 1927–37. ISSN 1420-9071. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-015-2118-5
- MANCIKOVA, Andrea, Vladimir KRYLOV, Olha HURBA, Ivan SEBESTA, Makiko NAKAMURA, Kimiyoshi ICHIDA a Blanka STIBURKOVA, 2016. Functional analysis of novel allelic variants in URAT1 and GLUT9 causing renal hypouricemia type 1 and 2. *Clinical and Experimental Nephrology* [online]. **20**(4), 578–584. ISSN 14377799. Dostupné z: doi:10.1007/s10157-015-1186-z
- MAO, Qingcheng a Jashvant D. UNADKAT, 2015. Role of the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in Drug Transport—an Update. *AAPS Journal* [online]. **17**(1), 65–82. ISSN 15507416.

Dostupné z: doi:10.1208/s12248-014-9668-6

MATSUO, Hirotaka, Toshinori CHIBA, Shushi NAGAMORI, Akiyoshi NAKAYAMA, Hideharu DOMOTO, Kanokporn PHETDEE, Pattama WIRIYASERMKUL, Yuichi KIKUCHI, Takashi ODA, Junichiro NISHIYAMA, Takahiro NAKAMURA, Yuji MORIMOTO, Keiko KAMAKURA, Yutaka SAKURAI, Shigeaki NONOYAMA, Yoshikatsu KANAI a Nariyoshi SHINOMIYA, 2008. Mutations in Glucose Transporter 9 Gene SLC2A9 Cause Renal Hypouricemia. *American Journal of Human Genetics* [online]. **83**(6), 744–751. ISSN 00029297. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajhg.2008.11.001

MATSUO, Hirotaka, Tappei TAKADA, Kimiyoshi ICHIDA, Takahiro NAKAMURA, Akiyoshi NAKAYAMA, Yuki IKEBUCHI, Kousei ITO, Yasuyoshi KUSANAGI, Toshinori CHIBA, Shin TADOKORO, Yuzo TAKADA, Yuji OIKAWA, Hiroki INOUE, K. SUZUKI, Rieko OKADA, Junichiro NISHIYAMA, Hideharu DOMOTO, Satoru WATANABE, Masanori FUJITA, Yuji MORIMOTO, Mariko NAITO, Kazuko NISHIO, Asahi HISHIDA, Kenji WAKAI, Yatami ASAI, Kazuki NIWA, Keiko KAMAKURA, Shigeaki NONOYAMA, Yutaka SAKURAI, Tatsuo HOSOYA, Yoshikatsu KANAI, Hiroshi SUZUKI, Nobuyuki HAMAJIMA a Nariyoshi SHINOMIYA, 2009. Common Defects of ABCG2, a High-Capacity Urate Exporter, Cause Gout: A Function-Based Genetic Analysis in a Japanese Population. *Science Translational Medicine* [online]. **1**(5), 5ra11–5ra11. ISSN 1946-6234. Dostupné z: doi:10.1126/scitranslmed.3000237

MATSUO, Hirotaka, Tappei TAKADA, Kimiyoshi ICHIDA, Takahiro NAKAMURA, Akiyoshi NAKAYAMA, Hiroshi SUZUKI, Tatsuo HOSOYA a Nariyoshi SHINOMIYA, 2011. ABCG2/BCRP dysfunction as a major cause of gout. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids* [online]. **30**(12), 1117–28. ISSN 1532-2335. Dostupné z: doi:10.1080/15257770.2011.633954

MATSUO, Hirotaka, Ken YAMAMOTO, Hirofumi NAKAOKA, Akiyoshi NAKAYAMA, Masayuki SAKIYAMA, Toshinori CHIBA, Atsushi TAKAHASHI, Takahiro NAKAMURA, Hiroshi NAKASHIMA, Yuzo TAKADA, Inaho DANJOH, Seiko SHIMIZU, Junko ABE, Yusuke KAWAMURA, Sho TERASHIGE, Hiraku OGATA, Seishiro TATSUKAWA, Guang YIN, Rieko OKADA, Emi MORITA, Mariko NAITO, Atsumi TOKUMASU, Hiroyuki ONOUE, Keiichi IWAYA, Toshimitsu ITO, Tappei TAKADA, Katsuhisa INOUE, Yukio KATO, Yukio NAKAMURA, Yutaka SAKURAI, Hiroshi SUZUKI, Yoshikatsu KANAI, Tatsuo HOSOYA, Nobuyuki HAMAJIMA, Ituro INOUE, Michiaki KUBO, Kimiyoshi ICHIDA, Hiroshi OYOYAMA, Toru SHIMIZU a Nariyoshi SHINOMIYA, 2016. Genome-wide association study of clinically defined Gout identifies multiple risk loci and its association with clinical subtypes. *Annals of the Rheumatic Diseases* [online]. **75**(4), 652–659. ISSN 14682060. Dostupné z: doi:10.1136/annrheumdis-2014-206191

MCCARTY, Daniel J. a Joseph L. HOLLANDER, 1961. Identification of urate crystals in gouty synovial fluid. *Annals of internal medicine* [online]. **54**, 452–60. ISSN 0003-4819. Dostupné z: doi:10.7326/0003-4819-54-3-452

MCDERMOTT, Michael, Sarah KINGSBURY a CONAGHAN, 2011. The role of the NLRP3 inflammasome in gout. *Journal of Inflammation Research* [online]. **4**(1), 39. ISSN 1178-7031. Dostupné z: doi:10.2147/JIR.S11330

MENG, Qingxi, Ji YUE, Mingfu SHANG, Qunqun SHAN, Jian QI, Zhaohu MAO, Jian LI, Fan ZHANG, Baolong WANG, Tingbao ZHAO a Weiguo WANG, 2015. Correlation of GLUT9 Polymorphisms with Gout Risk. *Medicine (United States)* [online]. **94**(44), e1742. ISSN 15365964. Dostupné z: doi:10.1097/MD.0000000000001742

MERRIMAN, Tony R., 2015. An update on the genetic architecture of hyperuricemia and gout. *Arthritis Research and Therapy* [online]. **17**(1), 1–13. ISSN 14786362. Dostupné z: doi:10.1186/s13075-015-0609-2

MESRIAN TANHA, Hamzeh, Soheila RAHGOZAR a Marjan MOJTABAVI NAEINI, 2017. ABCC4 functional SNP in the 3' splice acceptor site of exon 8 (G912T) is associated with unfavorable clinical outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* [online]. **80**(1), 109–117. ISSN 0344-5704. Dostupné z: doi:10.1007/s00280-017-3340-7

MO, Wei a Jian Ting ZHANG, 2012. Human ABCG2: Structure, function, and its role in multidrug resistance. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. **3**(1), 1–27. ISSN 21524114.

MORI, Kiyoshi, Yoshihiro OGAWA, Ken EBIHARA, Tomohiro AOKI, Naohisa TAMURA, Akira SUGAWARA, Takashi KUWAHARA, Shoichi OZAKI, Masashi MUKOYAMA, Kei TASHIRO, Issei TANAKA a Kazuwa NAKAO, 1997. Kidney-specific expression of a novel mouse organic cation transporter-like protein. *FEBS letters* [online]. **417**(3), 371–4. ISSN 0014-5793. Dostupné z: doi:10.1016/s0014-5793(97)01325-2

- MOROZOVA, Olena a Marco A. MARRA, 2008. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics* [online]. **92**(5), 255–64. ISSN 1089-8646. Dostupné z: doi:10.1016/j.ygeno.2008.07.001
- MOTOHASHI, Hideyuki, Yuji SAKURAI, Hideyuki SAITO, Satohiro MASUDA, Yumiko URAKAMI, Maki GOTO, Atsushi FUKATSU, Osamu OGAWA a Ken-Ichi INUI, 2002. Gene expression levels and immunolocalization of organic ion transporters in the human kidney. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* [online]. **13**(4), 866–874. ISSN 1046-6673. Dostupné z: doi:10.1681/ASN.V134866
- MRAZ, Martin, Olha HURBA, Josef BARTL, Zdenek DOLEZEL, Anthony MARINAKI, Lynette FAIRBANKS a Blanka STIBURKOVA, 2015. Modern diagnostic approach to hereditary xanthinuria. *Urolithiasis* [online]. **43**(1), 61–67. ISSN 2194-7228. Dostupné z: doi:10.1007/s00240-014-0734-4
- MULLIS, Kary Banks, 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* [online]. **262**(4), 56–61, 64–5. ISSN 0036-8733. Dostupné z: doi:10.1038/scientificamerican0490-56
- MUTPRED, 2021. *MutPred* [online]. Dostupné z: <http://mutpred.mutdb.org/>
- NAKAYAMA, Akiyoshi, Hirofumi NAKAOKA, Ken YAMAMOTO, Masayuki SAKIYAMA, Amara SHAUKAT, Yu TOYODA, Yukinori OKADA, Yoichiro KAMATANI, Takahiro NAKAMURA, Tappei TAKADA, Katsuhisa INOUE, Tomoya YASUJIMA, Hiroaki YUASA, Yuko SHIRAHAMA, Hiroshi NAKASHIMA, Seiko SHIMIZU, Toshihide HIGASHINO, Yusuke KAWAMURA, Hiraku OGATA, Makoto KAWAGUCHI, Yasuyuki OHKAWA, Inaho DANJOH, Atsumi TOKUMASU, Keiko OOOYAMA, Toshimitsu ITO, Takaaki KONDO, Kenji WAKAI, Blanka STIBURKOVA, Karel PAVELKA, Lisa K. STAMP, Nicola DALBETH, Yutaka SAKURAI, Hiroshi SUZUKI, Makoto HOSOYAMADA, Shin FUJIMORI, Takashi YOKOO, Tatsuo HOSOYA, Ituro INOUE, Atsushi TAKAHASHI, Michiaki KUBO, Hiroshi OOOYAMA, Toru SHIMIZU, Kimiyoshi ICHIDA, Nariyoshi SHINOMIYA, Tony R. MERRIMAN a Hirotaka MATSUO, 2017. GWAS of clinically defined gout and subtypes identifies multiple susceptibility loci that include urate transporter genes. *Annals of the Rheumatic Diseases* [online]. **76**(5), 869–877. ISSN 14682060. Dostupné z: doi:10.1136/annrheumdis-2016-209632
- NANAGIRI, Apoorva a Nadeem SHABBIR, 2021. *Lesch Nyhan Syndrome* [online]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32310539>
- NATH, Subrata D., V. Saroja VORUGANTI, Nedat H. ARAR, Farook THAMEEM, Juan C. LOPEZ-ALVARENGA, Richard BAUER, John BLANGERO, Jean W. MACCLUER, Anthony G. COMUZZIE a Hanna E. ABOUD, 2007. Genome Scan for Determinants of Serum Uric Acid Variability. *Journal of the American Society of Nephrology* [online]. **18**(12), 3156–3163. ISSN 1046-6673. Dostupné z: doi:10.1681/ASN.2007040426
- NĚMEC, Petr, 2015. Dnavá artritida – současné možnosti farmakoterapie. *Remedia*. **3**, 179–186.
- NEOGI, Tuhina, Tim L.Th A. JANSEN, Nicola DALBETH, Jaap FRANSEN, H. Ralph SCHUMACHER, Dianne BERENDSEN, Melanie BROWN, Hyon CHOI, N. Lawrence EDWARDS, Hein J.E.M. JANSSENS, Frédéric LIOTÉ, Raymond P. NADEN, George NUKI, Alexis OGDIE, Fernando PEREZ-RUIZ, Kenneth SAAG, Jasvinder A. SINGH, John S. SUNDY, Anne Kathrin TAUSCHE, Janitzia VAQUEZ-MELLADO, Steven A. YAROWS a William J. TAYLOR, 2015. 2015 Gout Classification Criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Collaborative Initiative. *Arthritis and Rheumatology* [online]. **67**(10), 2557–2568. ISSN 23265205. Dostupné z: doi:10.1002/art.39254
- NIGAM, Sanjay K., 2015. What do drug transporters really do? *Nature reviews. Drug discovery* [online]. **14**(1), 29–44. ISSN 1474-1784. Dostupné z: doi:10.1038/nrd4461
- NIGAM, Sanjay K. a Vibha BHATNAGAR, 2018. The systems biology of uric acid transporters. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* [online]. **27**(4), 305–313. ISSN 1062-4821. Dostupné z: doi:10.1097/MNH.0000000000000427
- NIGAM, Sanjay K., Wei WU, Kevin T. BUSH, Melanie P. HOENIG, Roland C. BLANTZ a Vibha BHATNAGAR, 2015. Handling of drugs, metabolites, and uremic toxins by kidney proximal tubule drug transporters. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* [online]. **10**(11), 2039–2049. ISSN 1555905X. Dostupné z: doi:10.2215/CJN.02440314
- NKECK, Jan René, Madeleine Singwé NGANDEU, Vicky Ama MOOR, Jériel Pascal NKECK, Jean Pierre CHEDJOU, Aude Laetitia NDOADOU MGUE a Wilfred F. MBACHAM, 2018. Genetic analysis for rs2280205 (A>G) and rs2276961 (T>C) in SLC2A9 polymorphism for the susceptibility of gout in Cameroonians: A pilot

- study. *BMC Research Notes* [online]. **11**(1), 1–5. ISSN 17560500. Dostupné z: doi:10.1186/s13104-018-3333-6
- NOGUCHI, Kohji, Kazuhiro KATAYAMA a Yoshikazu SUGIMOTO, 2014. Human ABC transporter ABCG2/BCRP expression in chemoresistance: basic and clinical perspectives for molecular cancer therapeutics. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine* [online]. **7**(1), 53. ISSN 1178-7066. Dostupné z: doi:10.2147/PGPM.S38295
- ODA, Masako, Yoko SATTA, Osamu TAKENAKA a Naoyuki TAKAHATA, 2002. Loss of urate oxidase activity in hominoids and its evolutionary implications. *Molecular Biology and Evolution* [online]. **19**(5), 640–653 [vid. 2020-03-09]. ISSN 07374038. Dostupné z: doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a004123
- ONUORA, Sarah, 2020. ABCG2 SNP associated with early-onset gout. *Nature reviews. Rheumatology* [online]. **16**(4), 186. ISSN 1759-4804. Dostupné z: doi:10.1038/s41584-020-0393-5
- PAVELCOVA, Katerina, Jana BOHATA, Marketa PAVLIKOVA, Eliska BUBENIKOVA, Karel PAVELKA a Blanka STIBURKOVA, 2020. Evaluation of the Influence of Genetic Variants of SLC2A9 (GLUT9) and SLC22A12 (URAT1) on the Development of Hyperuricemia and Gout. *Journal of Clinical Medicine* [online]. **9**(8), 2510. ISSN 2077-0383. Dostupné z: doi:10.3390/jcm9082510
- PAVELKA, Karel, 2008. Nové pohledy na léčbu hyperurikémie a dny. *Interní medicína pro praxi*. **10**(6), 268–272. ISSN 1212-7299.
- PETRU, Lenka, Katerina PAVELCOVA, Ivan SEBESTA a Blanka STIBURKOVA, 2016. Genetic background of uric acid metabolism in a patient with severe chronic tophaceous gout. *Clinica Chimica Acta* [online]. **460**, 46–49. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2016.06.007
- PHIPPS-GREEN, Amanda J., Jade E. HOLLIS-MOFFATT, Nicola DALBETH, Marilyn E MERRIMAN, Ruth TOPLESS, Peter J. GOW, Andrew A. HARRISON, John HIGHTON, Peter B B JONES, Lisa K. STAMP a Tony R. MERRIMAN, 2010. A strong role for the ABCG2 gene in susceptibility to gout in New Zealand Pacific Island and Caucasian, but not Māori, case and control sample sets. *Human molecular genetics* [online]. **19**(24), 4813–9. ISSN 1460-2083. Dostupné z: doi:10.1093/hmg/ddq412
- PHIPPS-GREEN, Amanda J., Marilyn E. MERRIMAN, Ruth TOPLESS, Sara ALTAF, Grant W. MONTGOMERY, Christopher FRANKLIN, Gregory T. JONES, Andre M. VAN RIJ, David WHITE, Lisa K. STAMP, Nicola DALBETH a Tony R. MERRIMAN, 2016. Twenty-eight loci that influence serum urate levels: Analysis of association with gout. *Annals of the Rheumatic Diseases* [online]. **75**(1), 124–130. ISSN 14682060. Dostupné z: doi:10.1136/annrheumdis-2014-205877
- POLASEK, Ozren, Iris JERONČIĆ, Rosanda MULIĆ, Zorana KLISMANIC, Marina PEHLIĆ, Tatijana ZEMUNIK a Ivana KOLČIĆ, 2010. Common variants in SLC17A3 gene affect intra-personal variation in serum uric acid levels in longitudinal time series. *Croatian medical journal* [online]. **51**(1), 32–39. ISSN 13328166. Dostupné z: doi:10.3325/cmj.2010.51.32
- PUI, Karen, Peter J. GOW a Nicola DALBETH, 2013. Efficacy and Tolerability of Probenecid as Urate-lowering Therapy in Gout; Clinical Experience in High-prevalence Population. *The Journal of Rheumatology* [online]. **40**(6), 872–876. ISSN 0315-162X. Dostupné z: doi:10.3899/jrheum.121301
- QING, Yu-Feng, Jing-Guo ZHOU, Quan-Bo ZHANG, Dong-Sheng WANG, Min LI, Qi-Bin YANG, Cui-Ping HUANG, Ling YIN, Shu-Yue PAN, Wen-Guang XIE, Meng-Yun ZHANG, Meng-Jun PU a Mei ZENG, 2013. Association of TLR4 Gene rs2149356 polymorphism with primary gouty arthritis in a case-control study. *PloS one* [online]. **8**(5), e64845. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0064845
- RAGAB, Gaafar, Mohsen ELSHAHALY a Thomas BARDIN, 2017. Gout: An old disease in new perspective – A review. *Journal of Advanced Research* [online]. **8**(5), 495–511. ISSN 20901232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jare.2017.04.008
- RAINER, Timothy Hudson, Chi Hung CHENG, Hein J.E.M. JANSSENS, Chi Yin MAN, Lai Shan TAM, Yu Fai CHOI, Wah Hon YAU, Ka Hing LEE a Colin Alexander GRAHAM, 2016. Oral Prednisolone in the Treatment of Acute Gout. *Annals of Internal Medicine* [online]. **164**(7), 464. ISSN 0003-4819. Dostupné z: doi:10.7326/M14-2070
- REISS, Jochen, 2000. Genetics of molybdenum cofactor deficiency. *Human Genetics* [online]. **106**(2), 157–163. ISSN 0340-6717. Dostupné z: doi:10.1007/s004390051023
- REISS, Jochen, Claude DORCHE, Birgit STALLMEYER, Ralf Rainer MENDEL, Nadine COHEN a Marie Therese ZABOT, 1999. Human molybdopter synthase gene: genomic structure and mutations in molybdenum

- cofactor deficiency type B. *American journal of human genetics* [online]. **64**(3), 706–11. ISSN 0002-9297. Dostupné z: doi:10.1086/302296
- REISS, Jochen a Jean L. JOHNSON, 2003. Mutations in the molybdenum cofactor biosynthetic genes MOCS1, MOCS2, and GEPH. *Human mutation* [online]. **21**(6), 569–76. ISSN 1098-1004. Dostupné z: doi:10.1002/humu.10223
- REISS, Jochen, Ulrike LENZ, Cecile AQUAVIVA-BOURDAIN, Sylvie JORIOT-CHEKAF, Karine MENTION-MULLIEZ a Muriel HOLDER-ESPINASSE, 2011. A GPHN point mutation leading to molybdenum cofactor deficiency. *Clinical genetics* [online]. **80**(6), 598–9. ISSN 1399-0004. Dostupné z: doi:10.1111/j.1399-0004.2011.01709.x
- RICHETTE, Pascal a Thomas BARDIN, 2010. Colchicine for the treatment of gout. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* [online]. **11**(17), 2933–2938. ISSN 1465-6566. Dostupné z: doi:10.1517/14656566.2010.529432
- RICHETTE, Pascal, Pierre CLERSON, Laure PÉRISSIN, René-Marc FLIPO a Thomas BARDIN, 2015. Revisiting comorbidities in gout: a cluster analysis. *Annals of the Rheumatic Diseases* [online]. **74**(1), 142–147. ISSN 0003-4967. Dostupné z: doi:10.1136/annrheumdis-2013-203779
- RICHETTE, Pascal, Michael DOHERTY, Eliseo PASCUAL, Victoria BARSKOVA, Fabio BECCE, Johann CASTAÑEDA-SANABRIA, Malcolm COYFISH, Sylvie GUILLO, Tim L. JANSEN, Hein JANSSENS, Frederic LIOTÉ, Christian David MALLEEN, George NUKI, Fernando PEREZ-RUIZ, José PIMENTAO, Leonardo PUNZI, T. PYWELL, Alexander SO, Anne Kathrin TAUSCHE, Till UHLIG, Jakub ZAVADA, Weiya ZHANG, Florence TUBACH a Thomas BARDIN, 2017. 2016 updated EULAR evidence-based recommendations for the management of gout. *Annals of the rheumatic diseases* [online]. **76**(1), 29–42. ISSN 1468-2060. Dostupné z: doi:10.1136/annrheumdis-2016-209707
- ROBERTS, Rebecca Lee, Mary C. WALLACE, Amanda Jane PHIPPS-GREEN, Ruth TOPLESS, Jill M. DRAKE, Paul TAN, Nicola DALBETH, Tony R. MERRIMAN a Lisa K. STAMP, 2017. ABCG2 loss-of-function polymorphism predicts poor response to allopurinol in patients with gout. *The pharmacogenomics journal* [online]. **17**(2), 201–203. ISSN 1473-1150. Dostupné z: doi:10.1038/tpj.2015.101
- ROBERTSON, Eliza E. a Gary O. RANKIN, 2006. Human renal organic anion transporters: characteristics and contributions to drug and drug metabolite excretion. *Pharmacology & therapeutics* [online]. **109**(3), 399–412. ISSN 0163-7258. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2005.07.005
- RULE, Andrew D., Mariza DE ANDRADE, Martha MATSUMOTO, Tom H. MOSLEY, Sharon KARDIA a Stephen T. TURNER, 2011. Association between SLC2A9 transporter gene variants and uric acid phenotypes in African American and white families. *Rheumatology (Oxford, England)* [online]. **50**(5), 871–8. ISSN 1462-0332. Dostupné z: doi:10.1093/rheumatology/keq425
- SAKIYAMA, Masayuki, Hirotaka MATSUO, Shushi NAGAMORI, Wei LING, Yusuke KAWAMURA, Akiyoshi NAKAYAMA, Toshihide HIGASHINO, Toshinori CHIBA, Kimiyoshi ICHIDA, Yoshikatsu KANAI a Nariyoshi SHINOMIYA, 2016a. Expression of a human NPT1/SLC17A1 missense variant which increases urate export. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* [online]. **35**(10–12), 536–542. ISSN 15322335. Dostupné z: doi:10.1080/15257770.2016.1149192
- SAKIYAMA, Masayuki, Hirotaka MATSUO, Seiko SHIMIZU, Hiroshi NAKASHIMA, Takahiro NAKAMURA, Akiyoshi NAKAYAMA, Toshihide HIGASHINO, Mariko NAITO, Shino SUMA, Asahi HISHIDA, Takahiro SATOH, Yutaka SAKURAI, Tappei TAKADA, Kimiyoshi ICHIDA, Hiroshi OYAMA, Toru SHIMIZU a Nariyoshi SHINOMIYA, 2016b. The effects of URAT1/SLC22A12 nonfunctional variants, R90H and W258X, on serum uric acid levels and gout/hyperuricemia progression. *Scientific Reports* [online]. **6**(October 2015), 1–6. ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/srep20148
- SAKIYAMA, Masayuki, Hirotaka MATSUO, Seiko SHIMIZU, Hiroshi NAKASHIMA, Akiyoshi NAKAYAMA, Toshinori CHIBA, Mariko NAITO, Tappei TAKADA, Hiroshi SUZUKI, Nobuyuki HAMAJIMA, Kimiyoshi ICHIDA, Toru SHIMIZU a Nariyoshi SHINOMIYA, 2014. A common variant of organic anion transporter 4 (OAT4/SLC22A11) gene is associated with renal underexcretion type gout. *Drug metabolism and pharmacokinetics* [online]. **29**(2), 208–10. ISSN 1880-0920. Dostupné z: doi:10.2133/dmpk.dmpk-13-nt-070
- SALVAGGIO, S. E., Andrea GIACOMELLI, Felicia Stefania FALVELLA, Maria Letizia ORENI, Paola MERAVIDGLIA, Chiara ATZORI, Emilio CLEMENTI, Massimo GALLI a Stefano RUSCONI, 2017. Clinical and genetic factors associated with kidney tubular dysfunction in a real-life single centre cohort of HIV-positive

- patients. *BMC infectious diseases* [online]. **17**(1), 396. ISSN 1471-2334. Dostupné z: doi:10.1186/s12879-017-2497-3
- SANGER, Frederick, Steve NICKLEN a Alan R. COULSON, 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **74**(12), 5463–5467. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.74.12.5463
- SARI, Fatih M, Hakan T YANAR a Gul OZHAN, 2015. Investigation of the functional single-nucleotide polymorphisms in the BCRP transporter and susceptibility to colorectal cancer. *Biomedical reports* [online]. **3**(1), 105–109. ISSN 2049-9434. Dostupné z: doi:10.3892/br.2014.383
- SARZYNSKI, Mark A., Peter JACOBSON, Tuomo RANKINEN, Björn CARLSSON, Lars SJÖSTRÖM, Claude BOUCHARD a Lena M.S. CARLSSON, 2012. Changes in Uric Acid Levels following Bariatric Surgery Are Not Associated with SLC2A9 Variants in the Swedish Obese Subjects Study. *PLoS ONE* [online]. **7**(12). ISSN 19326203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0051658
- SAUTIN, Yuri Y. a Richard J. JOHNSON, 2008. Uric Acid: The Oxidant-Antioxidant Paradox. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* [online]. **27**(6–7), 608–619. ISSN 1525-7770. Dostupné z: doi:10.1080/15257770802138558
- SCHLESINGER, Naomi, Rieke E. ALTEN, Thomas BARDIN, H. Ralph SCHUMACHER, Mark BLOCH, Alberto GIMONA, Gerhard KRAMMER, Valda MURPHY, Dominik RICHARD a Alexander K. SO, 2012. Canakinumab for acute gouty arthritis in patients with limited treatment options: results from two randomised, multicentre, active-controlled, double-blind trials and their initial extensions. *Annals of the Rheumatic Diseases* [online]. **71**(11), 1839–1848. ISSN 0003-4967. Dostupné z: doi:10.1136/annrheumdis-2011-200908
- SCHLESINGER, Naomi a Ralf G. THIELE, 2010. The pathogenesis of bone erosions in gouty arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* [online]. **69**(11), 1907–1912. ISSN 0003-4967. Dostupné z: doi:10.1136/ard.2010.128454
- SEBESTA, Ivan a Blanka STIBURKOVA, 2014. Purine disorders with hypouricemia. *Prilozi (Makedonska akademija na naukite i umetnostite. Oddelenie za medicinski nauki)* [online]. **35**(1), 87–92. ISSN 1857-9345. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24798598>
- SEKINE, Takashi, Seok Ho CHA a Hitoshi ENDOU, 2000. The multispecific organic anion transporter (OAT) family. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* [online]. **440**(3), 337–350. ISSN 00316768. Dostupné z: doi:10.1007/s004240000297
- SEKINE, Takashi, Hiroki MIYAZAKI a Hitoshi ENDOU, 2006. Molecular physiology of renal organic anion transporters. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* [online]. **290**(2), F251–F261. ISSN 1931-857X. Dostupné z: doi:10.1152/ajprenal.00439.2004
- SLUIJS, Ivonne, Joline W. J. BEULENS, Daphne L. VAN DER A, Annemieke M. W. SPIJKERMAN, Matthias B. SCHULZE a Yvonne T. VAN DER SCHOUW, 2013. Plasma Uric Acid Is Associated with Increased Risk of Type 2 Diabetes Independent of Diet and Metabolic Risk Factors. *The Journal of Nutrition* [online]. **143**(1), 80–85. ISSN 0022-3166. Dostupné z: doi:10.3945/jn.112.167221
- SO, Alexander a Bernard THORENS, 2010. Uric acid transport and disease. *The Journal of clinical investigation* [online]. **120**(6), 1791–1799. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI42344.dietary
- STIBURKOVA, Blanka, Dana GABRIKOVA, Pavel ČEPEK, Pavel ŠIMEK, Pavol KRISTIAN, Elizabeth CORDOBA-LANUS a Felix CLAVERIE-MARTIN, 2016a. Prevalence of URAT1 allelic variants in the Roma population. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* [online]. **35**(10–12), 529–535. ISSN 1525-7770. Dostupné z: doi:10.1080/15257770.2016.1168839
- STIBURKOVA, Blanka, Kimiyoshi ICHIDA a Ivan SEBESTA, 2011. Novel homozygous insertion in SLC2A9 gene caused renal hypouricemia. *Molecular Genetics and Metabolism* [online]. **102**(4), 430–435. ISSN 10967192. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymgme.2010.12.016
- STIBURKOVA, Blanka, Hiroshi MIYATA, Jakub ZÁVADA, Michal TOMČÍK, Karel PAVELKA, Gabriela STORKANOVA, Yu TOYODA, Tappei TAKADA a Hiroshi SUZUKI, 2016b. Novel dysfunctional variant in ABCG2 as a cause of severe tophaceous gout: Biochemical, molecular genetics and functional analysis. *Rheumatology (United Kingdom)* [online]. **55**(1), 191–194. ISSN 14620332. Dostupné z: doi:10.1093/rheumatology/kev350
- STIBURKOVA, Blanka, Katerina PAVELCOVA, Marketa PAVLIKOVA, Pavel JEŠINA a Karel PAVELKA,

2019. The impact of dysfunctional variants of ABCG2 on hyperuricemia and gout in pediatric-onset patients. *Arthritis research & therapy* [online]. **21**(1), 77. ISSN 1478-6362. Dostupné z: doi:10.1186/s13075-019-1860-8
- STIBURKOVA, Blanka, Katerina PAVELCOVA, Lenka PETRU a Jakub KRIJT, 2018. Thiopurine-induced toxicity is associated with dysfunction variant of the human molybdenum cofactor sulfurase gene (xanthinuria type II). *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. **353**, 102–108. ISSN 10960333. Dostupné z: doi:10.1016/j.taap.2018.06.015
- STIBURKOVA, Blanka, Katerina PAVELCOVA, Jakub ZAVADA, Lenka PETRU, Pavel SIMEK, Pavel CEPEK, Marketa PAVLIKOVA, Hirotaka MATSUO, Tony R. MERRIMAN a Karel PAVELKA, 2017. Functional non-synonymous variants of ABCG2 and gout risk. *Rheumatology (United Kingdom)* [online]. **56**(11), 1982–1992. ISSN 14620332. Dostupné z: doi:10.1093/rheumatology/kex295
- STIBURKOVÁ, Blanka, Eva POSPÍŠILOVÁ, Stanislav KMOCH a Ivan ŠEBESTA, 2006. Analysis of excretion fraction of uric acid. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids* [online]. **25**(9–11), 1301–4. ISSN 1525-7770. Dostupné z: doi:10.1080/15257770600893917
- STIBURKOVA, Blanka, Judy TAYLOR, Anthony M. MARINAKI a Ivan SEBESTA, 2012. Acute kidney injury in two children caused by renal hypouricaemia type 2. *Pediatric Nephrology* [online]. **27**(8), 1411–1415. ISSN 0931041X. Dostupné z: doi:10.1007/s00467-012-2174-0
- SUCHÝ, David, 2011. Základní fakta o hyperurikemii a dně. *Praktické lékařství*. **7**(6), 259–260. ISSN 1801-2434.
- SUN, Hong, Qiang QU, Jian QU, Xiao-Ya LOU, Yan PENG, Ying ZENG a Guo WANG, 2015. URAT1 gene polymorphisms influence uricosuric action of losartan in hypertensive patients with hyperuricemia. *Pharmacogenomics* [online]. **16**(8), 855–863. ISSN 1462-2416. Dostupné z: doi:10.2217/pgs.15.52
- SUNDY, John S., Herbert S.B. BARAF, Robert A. YOOD, N. Lawrence EDWARDS, Sergio R. GUTIERREZ-URENA, Edward L. TREADWELL, Janitzia VÁZQUEZ-MELLADO, William B. WHITE, Peter E. LIPSKY, Zeb HOROWITZ, William HUANG, Allan N. MAROLI, Royce W. WALTRIP, Steven A. HAMBURGER a Michael A. BECKER, 2011. Efficacy and Tolerability of Pegloticase for the Treatment of Chronic Gout in Patients Refractory to Conventional Treatment. *JAMA* [online]. **306**(7), 711. ISSN 0098-7484. Dostupné z: doi:10.1001/jama.2011.1169
- SVOBODOVÁ, Radka, 2016. Hyperurikemie a dnavá artropatie - diagnostika a léčba. *Interni Medicina pro Praxi*. **18**(3), 137–141. ISSN 18035256.
- SZEKANECZ, Zoltán, Szilvia SZAMOSI, Gergő E. KOVÁCS, Elek KOCSIS a Szilvia BENKŐ, 2019. The NLRP3 inflammasome - interleukin 1 pathway as a therapeutic target in gout. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. **670**, 82–93. ISSN 00039861. Dostupné z: doi:10.1016/j.abb.2019.01.031
- TAMURA, Ai, Masato WATANABE, Hikaru SAITO, Hiroshi NAKAGAWA, Toshiaki KAMACHI, Ichiro OKURA a Toshihisa ISHIKAWA, 2006. Functional Validation of the Genetic Polymorphisms of Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter ABCG2: Identification of Alleles That Are Defective in Porphyrin Transport. *Molecular Pharmacology* [online]. **70**(1), 287–296. ISSN 0026-895X. Dostupné z: doi:10.1124/mol.106.023556
- TANAKA, Motoko, Kazuko ITOH, Kazunori MATSUSHITA, Kazutaka MATSUSHITA, Naoki WAKITA, Masataka ADACHI, Hiroshi NONOGUCHI, Kenichiro KITAMURA, Makoto HOSOYAMADA, Hitoshi ENDOU a Kimio TOMITA, 2003. Two male siblings with hereditary renal hypouricemia and exercise-induced ARF. *American Journal of Kidney Diseases* [online]. **42**(6), 1287–1292. ISSN 02726386. Dostupné z: doi:10.1053/j.ajkd.2003.08.032
- TANIGUCHI, Atsuo, Wako URANO, Mariko YAMANAKA, Hisashi YAMANAKA, Makoto HOSOYAMADA, Hitoshi ENDOU a Naoyuki KAMATANI, 2005. A common mutation in an organic anion transporter gene, SLC22A12, is a suppressing factor for the development of gout [1]. *Arthritis and Rheumatism* [online]. **52**(8), 2576–2577. ISSN 00043591. Dostupné z: doi:10.1002/art.21242
- TANNER, Callum, James BOOCOCK, Eli A. STAHL, Amanda DOBBYN, Asim K. MANDAL, Murray CADZOW, Amanda J. PHIPPS-GREEN, Ruth K. TOPLESS, Jennie Harré HINDMARSH, Lisa K. STAMP, Nicola DALBETH, Hyon K. CHOI, David B. MOUNT a Tony R. MERRIMAN, 2017. Population-Specific Resequencing Associates the ATP-Binding Cassette Subfamily C Member 4 Gene With Gout in New Zealand Māori and Pacific Men. *Arthritis and Rheumatology* [online]. **69**(7), 1461–1469. ISSN 23265205. Dostupné z: doi:10.1002/art.40110

- TORRES, Rosa J., Eugenio DE MIGUEL, Rebeca BAILÉN, José R. BANEGAS a Juan G. PUIG, 2014. Tubular urate transporter gene polymorphisms differentiate patients with gout who have normal and decreased urinary uric acid excretion. *Journal of Rheumatology* [online]. **41**(9), 1863–1870. ISSN 14992752. Dostupné z: doi:10.3899/jrheum.140126
- TOYODA, Yu, Andrea MANČÍKOVÁ, Vladimír KRYLOV, Keito MORIMOTO, Kateřina PAVELCOVÁ, Jana BOHATÁ, Karel PAVELKA, Markéta PAVLÍKOVÁ, Hiroshi SUZUKI, Hirotaka MATSUO, Tappei TAKADA a Blanka STIBURKOVA, 2019. Functional Characterization of Clinically-Relevant Rare Variants in ABCG2 Identified in a Gout and Hyperuricemia Cohort. *Cells* [online]. **8**(4), 363. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells8040363
- TSUKAMOTO, Megumi, Miho YAMASHITA, Tsuyoshi NISHI a Hiroshi NAKAGAWA, 2019. A Human ABC Transporter ABCC4 Gene SNP (rs11568658, 559 G > T, G187W) Reduces ABCC4-Dependent Drug Resistance. *Cells* [online]. **8**(1), 39. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells8010039
- TU, Hung-Pin, Albert Min-Shan KO, Shang-Lun CHIANG, Su-Shin LEE, Han-Ming LAI, Chia-Min CHUNG, Chung-Ming HUANG, Chien-Hung LEE, Tzer-Min KUO, Mei-Jung HSIEH a Ying-Chin KO, 2014. Joint effects of alcohol consumption and ABCG2 Q141K on chronic tophaceous gout risk. *The Journal of rheumatology* [online]. **41**(4), 749–58. ISSN 0315-162X. Dostupné z: doi:10.3899/jrheum.130870
- TU, Hung Pin, Chung Jen CHEN, Silent TOVOSIA, Albert Min Shan KO, Chien Hung LEE, Tsan Teng OU, Gau Tyan LIN, Shun Jen CHANG, Shang Lun CHIANG, Hung Che CHIANG, Ping Ho CHEN, Shu Jung WANG, Han Ming LAI a Ying Chin KO, 2010. Associations of a non-synonymous variant in SLC2A9 with gouty arthritis and uric acid levels in Han Chinese subjects and Solomon Islanders. *Annals of the Rheumatic Diseases* [online]. **69**(5), 887–890. ISSN 00034967. Dostupné z: doi:10.1136/ard.2009.113357
- TUSNÁDY, Gábor E., Balázs SARKADI, István SIMON a András VÁRADI, 2006. Membrane topology of human ABC proteins. *FEBS Letters* [online]. **580**(4), 1017–1022. ISSN 00145793. Dostupné z: doi:10.1016/j.febslet.2005.11.040
- UGELE, Bernhard, Marie V. ST-PIERRE, Monika PIHUSCH, Andrew BAHN a Peer HANTSCHMANN, 2003. Characterization and identification of steroid sulfate transporters of human placenta. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* [online]. **284**(2), E390-8. ISSN 0193-1849. Dostupné z: doi:10.1152/ajpendo.00257.2002
- URANO, Wako, Atsuo TANIGUCHI, Naohiko ANZAI, Eisuke INOUE, Yoshikatsu KANAI, Mariko YAMANAKA, Hitoshi ENDOU, Naoyuki KAMATANI a Hisashi YAMANAKA, 2010. Sodium-dependent phosphate cotransporter type 1 sequence polymorphisms in male patients with gout. *Annals of the Rheumatic Diseases* [online]. **69**(6), 1232–1234. ISSN 00034967. Dostupné z: doi:10.1136/ard.2008.106856
- URANO, Wako, Atsuo TANIGUCHI, Eisuke INOUE, Chieko SEKITA, Naomi ICHIKAWA, Yumi KOSEKI, Naoyuki KAMATANI a Hisashi YAMANAKA, 2013. Effect of Genetic Polymorphisms on Development of Gout. *The Journal of Rheumatology* [online]. **40**(8), 1374–1378. ISSN 0315-162X. Dostupné z: doi:10.3899/jrheum.121244
- VANWERT, Adam L., Michael R. GIONFRIDDO a Douglas H. SWEET, 2009. Organic anion transporters: discovery, pharmacology, regulation and roles in pathophysiology. *Biopharmaceutics & Drug Disposition* [online]. **28**(3), n/a-n/a. ISSN 01422782. Dostupné z: doi:10.1002/bdd.693
- VÁZQUEZ-MELLADO, Janitzia, Ana Luisa JIMÉNEZ-VACA, Sergio CUEVAS-COVARRUBIAS, V. ALVARADO-ROMANO, Glustein POZO-MOLINA a Ruben BURGOS-VARGAS, 2007. Molecular analysis of the SLC22A12 (URAT1) gene in patients with primary gout. *Rheumatology (Oxford, England)* [online]. **46**(2), 215–9. ISSN 1462-0324. Dostupné z: doi:10.1093/rheumatology/kel205
- VETHANAYAGAM, R. R., Honggang WANG, Anshul GUPTA, Yi ZHANG, Fred LEWIS, Jashvant D. UNADKAT a Qingcheng MAO, 2005. Functional analysis of the human variants of breast cancer resistance protein: I206L, N590Y, and D620N. *Drug Metabolism and Disposition* [online]. **33**(6), 697–705. ISSN 00909556. Dostupné z: doi:10.1124/dmd.105.003657
- VISSCHER, Peter M., Naomi R. WRAY, Qian ZHANG, Pamela SKLAR, Mark I. MCCARTHY, Matthew A. BROWN a Jian YANG, 2017. 10 Years of GWAS Discovery: Biology, Function, and Translation. *The American Journal of Human Genetics* [online]. **101**(1), 5–22. ISSN 00029297. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajhg.2017.06.005
- VITART, Veronique, Igor RUDAN, Caroline HAYWARD, Nicola K. GRAY, James FLOYD, Colin N.A. PALMER, Sara A. KNOTT, Ivana KOLCIC, Ozren POLASEK, Juergen GRAESSLER, James F. WILSON,

Anthony MARINAKI, Philip L. RICHES, Xinhua SHU, Branka JANICIJEVIC, Nina SMOLEJ-NARANCIC, Barbara GORGONI, Joanne MORGAN, Susan CAMPBELL, Zrinka BILOGLAV, Lovorka BARAC-LAUC, Marijana PERICIC, Irena Martinovic KLARIC, Lina ZGAGA, Tatjana SKARIC-JURIC, Sarah H. WILD, William A. RICHARDSON, Peter HOHENSTEIN, Charley H. KIMBER, Albert TENESA, Louise A. DONNELLY, Lynette D. FAIRBANKS, Martin ARINGER, Paul M. MCKEIGUE, Stuart H. RALSTON, Andrew D. MORRIS, Pavao RUDAN, Nicholas D. HASTIE, Harry CAMPBELL a Alan F. WRIGHT, 2008. SLC2A9 is a newly identified urate transporter influencing serum urate concentration, urate excretion and gout. *Nature Genetics* [online]. **40**(4), 437–442. ISSN 10614036. Dostupné z: doi:10.1038/ng.106

WALLACE, Mary C., Rebecca L. ROBERTS, Payal NANAVATI, Jeffrey N. MINER, Nicola DALBETH, Ruth TOPLESS, Tony R. MERRIMAN a Lisa K. STAMP, 2018. Association between ABCG2 rs2231142 and poor response to allopurinol: replication and meta-analysis. *Rheumatology* [online]. **57**(4), 656–660. ISSN 1462-0324. Dostupné z: doi:10.1093/rheumatology/kex467

WAN TAIB, Wan Rohani, Mahfudzah ADANAN, Nazihah MOHD YUNUS, Tan HUAY LIN, Wan Syamimee WAN GHAZALI, Amanda Jane PHIPPS-GREEN a Tony Richard MERRIMAN, 2018. Association of solute carrier family 2, member 9 (SLC2A9) genetic variant rs3733591 with gout in a Malay sample set. *The Medical journal of Malaysia* [online]. **73**(5), 307–310. ISSN 0300-5283. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30350810>

WAN, W., Xia XU, Dongbao ZHAO, Yafei PANG a Y X WANG, 2015. Polymorphisms of uric transporter proteins in the pathogenesis of gout in a Chinese Han population. *Genetics and molecular research : GMR* [online]. **14**(1), 2546–50. ISSN 1676-5680. Dostupné z: doi:10.4238/2015.March.30.13

WATANABE, Susumu, Duk-Hee KANG, Lili FENG, Takahiko NAKAGAWA, John KANELIS, Hui LAN, Marilda MAZZALI a Richard J. JOHNSON, 2002. Uric Acid, Hominoid Evolution, and the Pathogenesis of Salt-Sensitivity. *Hypertension* [online]. **40**(3), 355–360. ISSN 0194-911X. Dostupné z: doi:10.1161/01.HYP.0000028589.66335.AA

WEN, Christopher C., Sook Wah YEE, Xiaomin LIANG, Thomas J. HOFFMANN, Mark N. KVALE, Yambazi BANDA, Eric JORGENSON, Catherine SCHAEFER, Neil RISCH a Kathleen M. GIACOMINI, 2015. Genome-wide association study identifies ABCG2 (BCRP) as an allopurinol transporter and a determinant of drug response. *Clinical pharmacology and therapeutics* [online]. **97**(5), 518–25. ISSN 1532-6535. Dostupné z: doi:10.1002/cpt.89

WINDPESSL, Martin, Marco RITELLI, Manfred WALLNER a Marina COLOMBI, 2016. A Novel Homozygous SLC2A9 Mutation Associated with Renal-Induced Hypouricemia. *American Journal of Nephrology* [online]. **43**(4), 245–250. ISSN 0250-8095. Dostupné z: doi:10.1159/000445845

WOODWARD, Owen M., Anna KÖTTGEN, Josef CORESH, Eric BOERWINKLE, William B. GUGGINO a Michael KÖTTGEN, 2009. Identification of a urate transporter, ABCG2, with a common functional polymorphism causing gout. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **106**(25), 10338–10342. ISSN 00278424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0901249106

WRIGHT, Alan F., Igor RUDAN, Nicholas D. HASTIE a Harry CAMPBELL, 2010. A complexity of urate transporters. *Kidney International* [online]. **78**(5), 446–452. ISSN 15231755. Dostupné z: doi:10.1038/ki.2010.206

WU, Huizhe, Yong LIU, Hui KANG, Qinghuan XIAO, Weifan YAO, Haishan ZHAO, Enhua WANG a Minjie WEI, 2015. Genetic Variations in ABCG2 Gene Predict Breast Carcinoma Susceptibility and Clinical Outcomes after Treatment with Anthracycline-Based Chemotherapy. *BioMed research international* [online]. **2015**, 279109. ISSN 2314-6141. Dostupné z: doi:10.1155/2015/279109

WU, Xiangwei, Maki WAKAMIYA, Sukeshi VAISHNAV, Robert GESKE, Charles MONTGOMERY, Pamela JONES, Allan BRADLEY a C. Thomas CASKEY, 1994. Hyperuricemia and urate nephropathy in urate oxidase-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **91**(2), 742–6. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.91.2.742

XU, Xianxiang, Canghai LI, Pan ZHOU a Tingliang JIANG, 2016. Uric acid transporters hiding in the intestine. *Pharmaceutical biology* [online]. **54**(12), 3151–3155. ISSN 1744-5116. Dostupné z: doi:10.1080/13880209.2016.1195847

YAMADA, Yasukazu, Kenichiro YAMADA, Noriko NOMURA, Arisa YAMANO, Reiko KIMURA, Misako NAIKI, Daisuke FUKUSHI, Nobuaki WAKAMATSU, Atsuo TANIGUCHI, Noriko YAMAOKA, Kiyoko KANEKO a Shin FUJIMORI, 2011. Molecular analysis of X-linked inborn errors of purine metabolism: HPRT1

and PRPS1 mutations. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* [online]. **30**(12), 1272–1275. ISSN 15257770. Dostupné z: doi:10.1080/15257770.2011.597369

YAMADA, Yoshiji, Jun SAKUMA, Ichiro TAKEUCHI, Yoshiki YASUKOCHI, Kimihiko KATO, Mitsutoshi OGURI, Tetsuo FUJIMAKI, Hideki HORIBE, Masaaki MURAMATSU, Motoji SAWABE, Yoshinori FUJIWARA, Yu TANIGUCHI, Shuichi OBUCHI, Hisashi KAWAI, Shoji SHINKAI, Seiji MORI, Tomio ARAI a Masashi TANAKA, 2017. Identification of C21orf59 and ATG2A as novel determinants of renal function-related traits in Japanese by exome-wide association studies. *Oncotarget* [online]. **8**(28), 45259–45273. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.16696

YAMAMOTO, Tetsuya, Kazuomi KARIO, Michio SUDA, Yuji MORIWAKI, Sumio TAKAHASHI a Kazuya HIGASHINO, 1991. A case of xanthinuria: a study on the metabolism of pyrazinamide and allopurinol. *Japanese journal of medicine* [online]. **30**(5), 430–4. ISSN 0021-5120. Dostupné z: doi:10.2169/internalmedicine1962.30.430

YANG, Qiong, Chao Yu GUO, L. Adrienne CUPPLES, Daniel LEVY, Peter W.F. WILSON a Caroline S. FOX, 2005. Genome-wide search for genes affecting serum uric acid levels: The Framingham Heart Study. *Metabolism: Clinical and Experimental* [online]. **54**(11), 1435–1441. ISSN 00260495. Dostupné z: doi:10.1016/j.metabol.2005.05.007

YANG, Qiong, Anna KÖTTGEN, Abbas DEGHAN, Albert V. SMITH, Nicole L. GLAZER, Ming Huei CHEN, Daniel I. CHASMAN, Thor ASPELUND, Gudny EIRIKSDOTTIR, Tamara B. HARRIS, Lenore LAUNER, Michael NALLS, Dena HERMANDEZ, Dan E. ARKING, Eric BOERWINKLE, Megan L. GROVE, Man LI, W. H. LINDA KAO, Michel CHONCHOL, Talin HARITUNIAN, Guo LI, Thomas LUMLEY, Bruce M. PSATY, Michael SHLIPAK, Shih Jen HWANG, Martin G. LARSON, Christopher J. O'DONNELL, Ashish UPADHYAY, Cornelia M. VAN DUIJN, Albert HOFMAN, Fernando RIVADENEIRA, Bruno STRICKER, Andre G. UITTERLINDEN, Guillaume PARÉ, Alex N. PARKER, Paul M. RIDKER, David S. SISCOVICK, Vilmundur GUDNASON, Jacqueline C. WITTEMAN, Caroline S. FOX a Josef CORESH, 2010. Multiple genetic loci influence serum urate levels and their relationship with gout and cardiovascular disease risk factors. *Circulation: Cardiovascular Genetics* [online]. **3**(6), 523–530. ISSN 1942325X. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCGENETICS.109.934455

YE, Shu, Sahar DHILLON, Xiayi KE, Andrew R. COLLINS a Ian N. M. DAY, 2001. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic acids research* [online]. **29**(17), E88-8. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/29.17.e88

YU, Kuang Hui, Pi Yueh CHANG, Shih Cheng CHANG, Yah Huei WU-CHOU, Li An WU, Ding Pin CHEN, Fu Sung LO a Jang Jih LU, 2017. A comprehensive analysis of the association of common variants of ABCG2 with gout. *Scientific Reports* [online]. **7**(1), 9988. ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-10196-2

ZHANG, Dandan, Min YANG, Dan ZHOU, Zhenli LI, Libin CAI, Yuqian BAO, Hong LI, Zhongyan SHAN, Juan LIU, Duo LV, Yi LIU, Chunxiao XU, Jie LING, Yuyang XU, Shuai ZHANG, Qiong HUANG, Yongyong SHI, Yimin ZHU a Maode LAI, 2018. The polymorphism rs671 at ALDH2 associated with serum uric acid levels in Chinese Han males: A genome-wide association study. *Gene* [online]. **651**(April 2017), 62–69. ISSN 18790038. Dostupné z: doi:10.1016/j.gene.2018.01.064

ZHANG, Lili, Kylee L. SPENCER, V. Saroja VORUGANTI, Neal W. JORGENSEN, Myriam FORNAGE, Lyle G. BEST, Kristin D. BROWN-GENTRY, Shelley A. COLE, Dana C. CRAWFORD, Ewa DEELMAN, Nora FRANCESCHINI, Angelo L. GAFFO, Kimberly R. GLENN, Gerardo HEISS, Nancy S. JENNY, Anna KOTTGEN, Qiong LI, Kiang LIU, Tara C. MATISE, Kari E. NORTH, Jason G. UMANS a W H Linda KAO, 2013. Association of functional polymorphism rs2231142 (Q141K) in the ABCG2 gene with serum uric acid and gout in 4 US populations: the PAGE Study. *American journal of epidemiology* [online]. **177**(9), 923–32. ISSN 1476-6256. Dostupné z: doi:10.1093/aje/kws330

ZHANG, Xu, Xiao YANG, Mengmeng WANG, Xiaona LI, Qing XIA, Shengqian XU, Jianhua XU, Guoqi CAI, Li WANG, Lihong XIN, Yanfeng ZOU a Faming PAN, 2016. Association between SLC2A9 (GLUT9) gene polymorphisms and gout susceptibility: an updated meta-analysis. *Rheumatology international* [online]. **36**(8), 1157–65. ISSN 1437-160X. Dostupné z: doi:10.1007/s00296-016-3503-6

ZHOU, Danqiu, Yunqing LIU, Xinju ZHANG, Xiaoye GU, Hua WANG, Xinhua LUO, Jin ZHANG, Hejian ZOU a Ming GUAN, 2014. Functional polymorphisms of the ABCG2 gene are associated with gout disease in the Chinese Han male population. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **15**(5), 9149–9159. ISSN 14220067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms15059149

- ZHOU, Zhaowei, Ke WANG, Juan ZHOU, Can WANG, Xinde LI, Lingling CUI, Lin HAN, Zhen LIU, Wei REN, Xuefeng WANG, Keke ZHANG, Zhiqiang LI, Dun PAN, Changgui LI a Yongyong SHI, 2019. Amplicon targeted resequencing for SLC2A9 and SLC22A12 identified novel mutations in hypouricemia subjects. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* [online]. 7(7). ISSN 2324-9269. Dostupné z: doi:10.1002/mgg3.722
- ZHU, Weifeng, Yan DENG a Xiaodong ZHOU, 2018. Multiple Membrane Transporters and Some Immune Regulatory Genes are Major Genetic Factors to Gout. *The Open Rheumatology Journal* [online]. 12(1), 94–113. ISSN 1874-3129. Dostupné z: doi:10.2174/1874312901812010094
- ZHU, Yanyan, Bhavik J. PANDYA a Hyon K. CHOI, 2012. Comorbidities of Gout and Hyperuricemia in the US General Population: NHANES 2007-2008. *The American Journal of Medicine* [online]. 125(7), 679-687.e1. ISSN 00029343. Dostupné z: doi:10.1016/j.amjmed.2011.09.033
- ZOREF-SHANI, Esther, Sofia FEINSTEIN, Yaacov FRISHBERG, Yael BROMBERG a Oded SPERLING, 2000. Kelley-Seegmiller syndrome due to a unique variant of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase: reduced affinity for 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate manifested only at low, physiological substrate concentrations. *Biochimica et biophysica acta* [online]. 1500(2), 197–203. ISSN 0006-3002. Dostupné z: doi:10.1016/s0925-4439(99)00103-9
- ZOU, Yao, Jinfeng DU, Yantong ZHU, Xi XIE, Jinwei CHEN a Guanghui LING, 2018. Associations between the SLC22A12 gene and gout susceptibility: a meta-analysis. *Clinical and experimental rheumatology* [online]. 36(3), 442–447. ISSN 0392-856X. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29352852>
- ZWERINA, Jochen, Kurt REDLICH, Karin POLZER, Leo JOOSTEN, G. KRONKE, Joerg DISTLER, Andreas HESS, Noreen PUNDT, Thomas PAP, Oskar HOFFMANN, Juerg GASSER, Clemens SCHEINECKER, Josef S. SMOLEN, W. VAN DEN BERG a Georg SCHETT, 2007. TNF-induced structural joint damage is mediated by IL-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 104(28), 11742–11747. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0610812104

8. Seznam publikací

Publikace k tématu disertační práce

1. TOYODA, Yu, Kateřina PAVELCOVÁ, Jana BOHATÁ, Pavel JEŠINA, Yu KUBOTA, Hiroshi SUZUKI, Tappei TAKADA a Blanka STIBURKOVA, 2021. Identification of Two Dysfunctional Variants in the ABCG2 Urate Transporter Associated with Pediatric-Onset of Familial Hyperuricemia and Early-Onset Gout. *International journal of molecular sciences* [online]. **22**(4). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22041935 (IF = 4,556)
2. PAVELCOVA, Katerina, Jana BOHATA, Marketa PAVLIKOVA, Eliska BUBENIKOVA, Karel PAVELKA a Blanka STIBURKOVA, 2020. Evaluation of the Influence of Genetic Variants of SLC2A9 (GLUT9) and SLC22A12 (URAT1) on the Development of Hyperuricemia and Gout. *Journal of Clinical Medicine* [online]. **9**(8), 2510. ISSN 2077-0383. Dostupné z: doi:10.3390/jcm9082510 (IF = 3,303)
3. HORVÁTHOVÁ, Veronika, Jana BOHATÁ, Markéta PAVLÍKOVÁ, Kateřina PAVELCOVÁ, Karel PAVELKA, Ladislav ŠENOLT a Blanka STIBURKOVÁ, 2019. Interaction of the p.Q141K Variant of the ABCG2 Gene with Clinical Data and Cytokine Levels in Primary Hyperuricemia and Gout. *Journal of Clinical Medicine* [online]. ISSN 2077-0383. Dostupné z: doi:10.3390/jcm8111965 (IF = 3,303)
4. STIBURKOVA, Blanka, Katerina PAVELCOVA, Marketa PAVLIKOVA, Pavel JEŠINA a Karel PAVELKA, 2019. The impact of dysfunctional variants of ABCG2 on hyperuricemia and gout in pediatric-onset patients. *Arthritis research & therapy* [online]. **21**(1), 77. ISSN 1478-6362. Dostupné z: doi:10.1186/s13075-019-1860-8 (IF = 4,103)
5. TOYODA, Yu, Kateřina PAVELCOVÁ, Martin KLEIN, Hiroshi SUZUKI, Tappei TAKADA a Blanka STIBURKOVA, 2019. Familial early-onset hyperuricemia and gout associated with a newly identified dysfunctional variant in urate transporter ABCG2. *Arthritis research & therapy* [online]. **21**(1), 219. ISSN 1478-6362. Dostupné z: doi:10.1186/s13075-019-2007-7 (IF = 4,103)
6. TOYODA, Yu, Andrea MANČÍKOVÁ, Vladimír KRYLOV, Keito MORIMOTO, Kateřina PAVELCOVÁ, Jana BOHATÁ, Karel PAVELKA, Markéta PAVLÍKOVÁ, Hiroshi SUZUKI, Hirotaka MATSUO, Tappei TAKADA a Blanka STIBURKOVA, 2019. Functional Characterization of Clinically-Relevant Rare Variants in ABCG2 Identified in a Gout and Hyperuricemia Cohort. *Cells* [online]. **8**(4), 363. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells8040363
7. QUAN, Virginia, Omer ALI, Katerina PAVELCOVA, Fiona HARRIS a Blanka STIBURKOVA, 2018. An Unusual Cause of Exercise-Induced Acute Kidney Injury. *The American journal of medicine* [online]. **131**(4), e145–e146. ISSN 1555-7162. Dostupné z: doi:10.1016/j.amjmed.2017.10.053 (IF = 4,760)
8. STIBURKOVA, Blanka, Katerina PAVELCOVA, Jakub ZAVADA, Lenka PETRU,

Pavel SIMEK, Pavel CEPEK, Marketa PAVLIKOVA, Hirotaka MATSUO, Tony R. MERRIMAN a Karel PAVELKA, 2017. Functional non-synonymous variants of ABCG2 and gout risk. *Rheumatology (United Kingdom)* [online]. **56**(11), 1982–1992. ISSN 14620332. Dostupné z: doi:10.1093/rheumatology/kex295 (IF = 5,245)

9. PETRU, Lenka, Katerina PAVELCOVA, Ivan SEBESTA a Blanka STIBURKOVA, 2016. Genetic background of uric acid metabolism in a patient with severe chronic tophaceous gout. *Clinica Chimica Acta* [online]. **460**, 46–49. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2016.06.007 (IF = 3,207)

Publikace netýkající se tématu disertační práce

1. PAVELCOVA, Katerina, Petra HANOVA, Hana CIFERSKA, Lenka HASIKOVA a Blanka STIBURKOVA, 2021. The Examination of a TPMT Gene Before Administration of Azathioprine in Rheumatology Practice and Identification of a Novel Variant p.W29R. *JCR: Journal of Clinical Rheumatology* [online]. **Publish Ah**. ISSN 1076-1608. Dostupné z: doi:10.1097/RHU.0000000000001727 (IF = 2,360)
2. STIBURKOVA, Blanka, Katerina PAVELCOVA, Lenka PETRU a Jakub KRIJT, 2018. Thiopurine-induced toxicity is associated with dysfunction variant of the human molybdenum cofactor sulfurase gene (xanthinuria type II). *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. **353**, 102–108. ISSN 10960333. Dostupné z: doi:10.1016/j.taap.2018.06.015 (IF = 3,585)

Abstrakta na mezinárodních konferencích k tématu disertační práce

1. BOHATA, Jana, Katerina PAVELCOVA, Blanka STIBURKOVA, 2020. SLC2A9 as a gene of both sides of dysuricemia – hypouricemia and hyperuricemia. In: *Poster Presentations*. 40th European Workshop for Rheumatology Research
2. PAVELCOVA, Katerina, Jana BOHATA, Karel PAVELKA, Blanka STIBURKOVA, 2020. Variants in the ABCG2 gene associated with primary hyperuricemia and gout. In: *Poster Presentations*. 40th European Workshop for Rheumatology Research
3. PAVELCOVA, Katerina, Jana BOHATA, Marketa PAVLIKOVA, Eliska BUBENIKOVA, Karel PAVELKA a Blanka STIBURKOVA, 2020. Evaluation of the Influence of Genetic Variants of SLC2A9 (GLUT9) and SLC22A12 (URAT1) on the Development of Hyperuricemia and Gout. *Journal of Clinical Medicine* [online]. **9**(8), 2510. ISSN 2077-0383. Dostupné z: doi:10.3390/jcm9082510
4. STIBURKOVA, Blanka, Katerina PAVELCOVA, Jana BOHATA, Marketa PAVLIKOVA, Tappei TAKADA, Yu TOYODA, Lenka HASIKOVA, Jakub ZAVADA a Karel PAVELKA, 2020. THU0404 Influence of urate transportosome for hyperuricemia and gout. *Annals of the Rheumatic Diseases* [online]. ISSN 0003-4967. Dostupné z: doi:10.1136/annrheumdis-2020-eular.5629
5. PAVELCOVA, Katerina, Jana BOHATA, Karel PAVELKA a Blanka STIBURKOVA,

2019. P107 Polymorphisms in SLC2A9 and SLC22A12 genes are related to hyperuricemia, gout and also to hypouricemia. In: *Abstracts* [online]. B.m.: BMJ Publishing Group Ltd and European League Against Rheumatism, s. A47.1-A47. ISSN 0003-4967. Dostupné z: doi:10.1136/annrheumdis-2018-EWRR2019.95
6. STIBURKOVA, Blanka, Yu TOYODA, Katerina PAVELCOVA, Martin KLEIN, Tappei TAKADA, Hiroshi SUZUKI. Identification and Characterization of a Novel Dysfunction Variant p.I242T in ABCG2 Transporter in a Family with Early-onset Hyperuricemia and Gout [abstract]. *Arthritis Rheumatol.* 2019; 71 (suppl 10). Dostupné z: <https://acrabstracts.org/abstract/identification-and-characterization-of-a-novel-dysfunction-variant-p-i242t-in-abcg2-transporter-in-a-family-with-early-onset-hyperuricemia-and-gout/>
 7. PAVELCOVA, Katerina, Lenka PETRU, Jakub ZAVADA, Karel PAVELKA a Blanka STIBURKOVA, 2018. P131 Study of urate transporters in primary gout and hyperuricemia. In: *Poster presentations* [online]. B.m.: BMJ Publishing Group Ltd and European League Against Rheumatism, s. A70.2-A70. ISSN 0003-4967. Dostupné z: doi:10.1136/annrheumdis-2018-EWRR2018.145
 8. STIBURKOVA, Blanka, Katerina PAVELCOVA, Jana BOHATA, Klara KOZAKOVA, Lenka PETRU, Jakub ZAVADA a Karel PAVELKA, 2018. FRI0231 Study of urate transporters in primary hyperuricemia and gout. In: *Annals of the Rheumatic Diseases* [online]. B.m.: BMJ Publishing Group Ltd and European League Against Rheumatism, s. 657.1-657. Dostupné z: doi:10.1136/annrheumdis-2018-eular.5311
 9. STIBURKOVA, Blanka, Katerina PAVELCOVA, Marketa PAVLIKOVA, Karel PAVELKA. Strong Impact of Dysfunctional Variants of ABCG2 on Hyperuricemia and Gout in Children and Adolescents [abstract]. *Arthritis Rheumatol.* 2018; 70 (suppl 10). Dostupné z: <https://acrabstracts.org/abstract/strong-impact-of-dysfunctional-variants-of-abcg2-on-hyperuricemia-and-gout-in-children-and-adolescents/>
 10. STIBURKOVA, Blanka, Katerina PAVELCOVA, Lenka PETRU, Pavel CEPEK, Jakub ZAVADA a Karel PAVELKA, 2017. OP0297 Functional polymorphisms of the ABCG2 gene in primary gout. In: *Oral Presentations* [online]. B.m.: BMJ Publishing Group Ltd and European League Against Rheumatism, s. 179.1-179. Dostupné z: doi:10.1136/annrheumdis-2017-eular.4901
 11. STIBURKOVA, Blanka, Katerina PAVELCOVA, Jakub ZAVADA, Lenka PETRU, Marketa PAVLIKOVA, Hirotaka MATSUO, Tony MERRIMAN, Karel PAVELKA. Allelic Variants of ABCG2 and Gout Risk [abstract]. *Arthritis Rheumatol.* 2017; 69 (suppl 10). Dostupné z: <https://acrabstracts.org/abstract/allelic-variants-of-abcg2-and-gout-risk/>
 12. PETRU, Lenka, Katerina PAVELCOVA, Pavel CEPEK, Pavel SIMEK, Jakub ZAVADA, Karel PAVELKA, Blanka STIBURKOVA, 2016. Analysis of ABCG2, SLC17A3, SLC22A11 and SLC17A1 genes in patients with primary hyperuricemia and gout. In: *Oral Presentations*. 11th Central European Congress of Rheumatology

13. STIBURKOVA, Blanka, Pavel SIMEK, Pavel CEPEK, Katerina PAVELCOVA a Karel PAVELKA, 2016. SAT0012 Genetic Analysis of ABCG2 in Primary Hyperuricemia and Gout. *Annals of the Rheumatic Diseases* [online]. **75**(Suppl 2), 668.1-668. ISSN 0003-4967. Dostupné z: doi:10.1136/annrheumdis-2016-eular.4050
14. STIBURKOVA, Blanka, Pavel CEPEK, Lenka PETRU, Katerina PAVELCOVA, Jakub ZAVADA, Karel PAVELKA. Genetic Analysis of Urate Transporters ABCG2, SLC17A3, SLC22A11 and SLC17A1 in Primary Hyperuricemia and Gout [abstract]. *Arthritis Rheumatol.* 2016; 68 (suppl 10). Dostupné z: <https://acrabstracts.org/abstract/genetic-analysis-of-urate-transporters-abcg2-slc17a3-slc22a11-and-slc17a1-in-primary-hyperuricemia-and-gout/>

Abstrakta na mezinárodních konferencích netýkající se tématu disertační práce

1. PAVELCOVA, Katerina, Lenka PETRU a Blanka STIBURKOVA, 2017. 07.05 Detection of polymorphisms in genes associated with azathioprine toxicity. In: *Genes and environment* [online]. B.m.: BMJ Publishing Group Ltd and European League Against Rheumatism, s. A68.3-A69. ISSN 0003-4967. Dostupné z: doi:10.1136/annrheumdis-2016-211054.5
2. PAVELCOVA, Katerina, Blanka STIBURKOVA, 2016. Detection of polymorphisms in TPMT gene before starting azathioprine therapy. In: *Poster Presentations*. 11th Central European Congress of Rheumatology

9. Prohlášení k podílu na výsledcích

V této práci jsou prezentovány výsledky rozsáhlého projektu analýzy deseti genů kódujících urátové transportéry, do kterého bylo zapojeno více odborných pracovníků z Oddělení molekulární biologie a imunologie Revmatologického ústavu. Z toho důvodu není disertační práce psána v první osobě jednotného čísla. Autorka této práce analyzovala kódující oblasti genů v následujícím rozsahu:

- kompletní analýza genů *SLC22A11* a *SLC22A13*
- většinová analýza genu *ABCG2*
- částečný podíl na analýze genů *SLC2A9*, *SLC22A12*, *SLC17A1*, *SLC22A6*
- okrajově analýza genů *SLC17A3*, *SLC22A8* a *ABCC4*

Hodnocení dat včetně statistické analýzy, predikce funkčního dopadu, topologických modelů proteinů a interpretace výsledků je vlastním dílem autorky.

10. Přílohy

V přílohách jsou zařazené vybrané články, na které je v této práci odkazováno.

Příloha 1:

PAVELCOVA, Katerina, Jana BOHATA, Marketa PAVLIKOVA, Eliska BUBENIKOVA, Karel PAVELKA a Blanka STIBURKOVA, 2020. Evaluation of the Influence of Genetic Variants of SLC2A9 (GLUT9) and SLC22A12 (URAT1) on the Development of Hyperuricemia and Gout. *Journal of Clinical Medicine* [online]. **9**(8), 2510. ISSN 2077-0383. Dostupné z: doi:10.3390/jcm9082510

Příloha 2:

STIBURKOVA, Blanka, Katerina PAVELCOVA, Jakub ZAVADA, Lenka PETRU, Pavel SIMEK, Pavel CEPEK, Marketa PAVLIKOVA, Hirotaka MATSUO, Tony R. MERRIMAN a Karel PAVELKA, 2017. Functional non-synonymous variants of ABCG2 and gout risk. *Rheumatology (United Kingdom)* [online]. **56**(11), 1982–1992. ISSN 14620332. Dostupné z: doi:10.1093/rheumatology/kex295

Příloha 3:

STIBURKOVA, Blanka, Katerina PAVELCOVA, Marketa PAVLIKOVA, Pavel JEŠINA a Karel PAVELKA, 2019. The impact of dysfunctional variants of ABCG2 on hyperuricemia and gout in pediatric-onset patients. *Arthritis research & therapy* [online]. **21**(1), 77. ISSN 1478-6362. Dostupné z: doi:10.1186/s13075-019-1860-8

Příloha 4:

TOYODA, Yu, Andrea MANČÍKOVÁ, Vladimír KRYLOV, Keito MORIMOTO, Katerina PAVELCOVÁ, Jana BOHATÁ, Karel PAVELKA, Markéta PAVLÍKOVÁ, Hiroshi SUZUKI, Hirotaka MATSUO, Tappei TAKADA a Blanka STIBURKOVA, 2019. Functional Characterization of Clinically-Relevant Rare Variants in ABCG2 Identified in a Gout and Hyperuricemia Cohort. *Cells* [online]. **8**(4), 363. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells8040363