

Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta
Autoreferát disertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Molekulární patofyziologie primární hyperurikemie a dny
Molecular Pathophysiology of Primary Hyperuricemia and Gout

Mgr. Jana Bohatá

2021

Doktorské studijní programy v biomedicíně
Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Předsedkyně oborové rady: doc. RNDr. Dana Holá, Ph.D.

Školící pracoviště: Revmatologický ústav a Revmatologická klinika 1. LF UK

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

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

Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
1. Úvod.....	6
1.1. Kyselina močová.....	6
1.2. Urátový transport.....	6
1.3. Poruchy urátového transportu.....	6
1.4. Primární dna.....	7
2. Hypotézy a cíle práce.....	9
3. Materiál a metodika.....	9
3.1. Izolace DNA/RNA.....	9
3.2. PCR.....	9
3.3. Sangerova metoda sekvenování.....	10
3.4. ARMS metoda.....	10
3.5. qPCR.....	10
3.6. Luminex.....	10
3.7. Funkční studie.....	10
4. Výsledky.....	10
4.1. Funkční analýza vzácných variant v genu <i>ABCG2</i>	10
4.2. Dysfunkční varianty v genu <i>ABCG2</i> asociované s familiární hyperurikemií a časným nástupem dny.....	10
4.3. Interakce varianty p.Q141K v genu <i>ABCG2</i> s klinickými daty a hladinou cytokinů u pacientů s primární hyperurikemií a dnou.....	11
4.4. Hladiny několika cirkulujících miRNA se liší u pacientů s hyperurikemií, dnou a pacientů v dnové atace ve srovnání s normourikemickými kontrolami.....	12
4.5. Vliv variant v genech <i>SLC2A9</i> a <i>SLC22A12</i> na rozvoj hyperurikemie a dny.....	12
4.6. Renální hypourikemie typu 1 u romské populace na východním Slovensku.....	13
4.7. Charakterizace nové dysfunkční varianty v genu <i>SLC22A12</i> u pediatrické pacientky s hypourikemií.....	13
5. Diskuze.....	13
6. Závěr.....	19
Použitá literatura.....	21
Seznam publikací:.....	26

Abstrakt

Primární hyperurikemie, jako stav zvýšené hladiny sérové kyseliny močové, je způsobena rozličnými faktory a nutně předchází formě zánětlivé artritidy označované jako dna. Kyselina močová je finálním produktem katabolismu purinů a pro svůj transport vyžaduje specializované proteiny. Patogenní varianty v genech pro tyto transportní proteiny mohou mít zásadní negativní dopad na jejich funkci, a tím ovlivňovat výsledné hladiny sérové kyseliny močové. Chronicky zvýšené hodnoty kyseliny močové ovšem nejsou jedinou predispozicí k rozvoji dny. Roli v progresi onemocnění pravděpodobně hrají další faktory, jako např. epigenetické mechanismy či vrozené predispozice k zánětlivým stavům, způsobeným dysregulací imunitního systému.

Cílem práce byla analýza poškozujících variant v genech pro významné urátové transportéry *ABCG2*, *SLC22A12* a *SLC2A9*, které mohou zapříčinit poruchu v exkreci či reabsorpci kyseliny močové a tím přispět ke vzniku primární hyperurikemie, potažmo dny, nebo vzácné dědičné renální hypourikemie. Další oblastí zájmu byly cirkulující miRNA v plazmě pacientů s primární hyperurikemií, dnou a dnovou atakou.

V genu *ABCG2* jsme identifikovali a funkčně charakterizovali přes deset vzácných nesynonymních variant. Většina z těchto variant měla negativní dopad na expresi, lokalizaci nebo funkci proteinu. Dále jsme v kohortě pacientů s primární hyperurikemií a dnou potvrdili význam často se vyskytující rizikové varianty p.Q141K a naše výsledky ukázaly, že přítomnost varianty signifikantně převyšuje některé ostatní rizikové faktory (věk, nadváha, vysoké hodnoty C-reaktivního proteinu) spojované s hyperurikemií a dnou.

V genech *SLC22A12* a *SLC2A9* jsme našli synonymní a intronové varianty spojené s hyperurikemií a dnou. V genu *SLC22A12* jsme objevili a funkčně popsali novou kauzální variantu pro renální hypourikemii typu 1. V kohortě romských pacientů a jejich rodinných příslušníků jsme odhalili násobně vyšší frekvenci dvou patogenních variant v genu *SLC22A12*, které jsou v běžné populaci extrémně vzácné.

Zjistili jsme signifikantně zvýšenou expresi pěti miRNA v plazmě pacientů s hyperurikemií, dnou nebo pacientů v dnové atace v porovnání s normourikemickou kontrolní skupinou. Žádná ze sledovaných miRNA se ale signifikantně nelišila mezi jednotlivými skupinami pacientů, nepodařilo se nám tedy najít vhodný biomarker progresu onemocnění.

Genetické faktory hrají zásadní roli v patogenezi primární hyperurikemie a dny i dědičné renální hypourikemie. U pacientů s rodinnou anamnézou dny může genetická analýza predikovat rozvoj onemocnění. U pacientů s hypourikemií může být genetická analýza zásadní v určení diagnózy dědičné renální hypourikemie.

Abstract

Primary hyperuricemia, as a condition of elevated serum uric acid levels, is caused by various factors and necessarily precedes a form of inflammatory arthritis referred to as gout. Uric acid is the end product of purine catabolism and requires specialized proteins for its transport. Pathogenic variants in the genes for these transport proteins can have a major negative impact on their function, thereby affecting the resulting serum uric acid levels. However, chronically elevated uric acid levels are not the only predisposition to the development of gout. Other factors, such as epigenetic mechanisms or genetic predispositions to inflammatory conditions caused by immune dysregulation, are likely to play a role in disease progression.

The aim of the study was to analyse damaging variants in genes for important urate transporters *ABCG2*, *SLC22A12* and *SLC2A9*, which may cause impaired excretion or reabsorption of uric acid and thus contribute to the development of primary hyperuricemia and gout, or rare hereditary renal hypouricemia. We also focused on circulating miRNAs in the plasma of patients with primary hyperuricemia, gout and gout attack.

We identified and functionally characterized over ten rare nonsynonymous variants in the *ABCG2* gene. Most of these variants had a negative impact on protein expression, localization or function. Furthermore, in a cohort of patients with primary hyperuricemia and gout, we confirmed the importance of the frequently occurring risk variant p.Q141K, and our results showed that the presence of the variant outweighed several other risk factors (age, overweight, higher C-reactive protein levels) associated with hyperuricemia and gout.

We found synonymous and intronic variants in the *SLC22A12* and *SLC2A9* genes associated with hyperuricemia and gout. We discovered and functionally described a novel causal variant for renal hypouricemia type 1 in the *SLC22A12* gene. In a cohort of Roma patients and their family members, we detected a multifold higher frequency of two pathogenic variants in the *SLC22A12* gene that are extremely rare in general population.

We found significantly increased expression of the five miRNAs in the plasma of patients with hyperuricemia, gout, or in patients during gout attack compared with a normouricemic control group. However, none of the observed miRNAs differed significantly between patient groups. Thus, we were unable to find a suitable biomarker of disease progression.

Genetic factors play a major role in the pathogenesis of primary hyperuricemia and gout as well as hereditary renal hypouricemia. Genetic analysis may predict the development of the disease in patients with a family history of gout. In patients with hypouricemia, genetic analysis may be essential in establishing the diagnosis of hereditary renal hypouricemia.

1. Úvod

1.1. Kyselina močová

Kyselina močová se vyskytuje v lidském těle jako konečný metabolit při degradaci purinů. Kyselina močová je syntetizována především v játrech a vylučována je ze dvou třetin ledvinami a z jedné třetiny gastrointestinálním traktem. Referenční hodnoty kyseliny močové v séru (sKM) se obecně uvádějí v rozmezí 120–340 $\mu\text{mol/l}$ pro ženy a děti a 120–420 $\mu\text{mol/l}$ pro muže. Stav, kdy má jedinec nižší hodnoty sKM, se označuje jako hypourikemie, naopak při hladinách vyšších mluvíme o hyperurikemii. Molekuly urátu vyžadují pro svůj transport specifické transmembránové proteiny. Tyto proteiny se dle své funkce dělí na reabsorpční a exkreční (sekreční). Většina z nich se nachází na apikální straně proximálních ledvinných tubulů, další jsou na straně bazolaterální a některé z nich jsou exprimovány i ve střevní tkáni [1].

1.2. Urátový transport

Mezi nejvýznamnější proteiny podílející se na transportu urátu patří ABCG2, URAT1 a GLUT9. Protein ABCG2 je exprimován ve tkáni ledvin, střeva, jater, dále v endotelu mozkových kapilár, kde je součástí hematoencefalické bariéry [2], nebo např. v placentě, kde slouží k ochraně plodu před negativním dopadem xenobiotik [3]. Schopnost přenosu urátu byla objevena díky celogenomové asociační studii, hledající lokusy asociované s koncentrací kyseliny močové a dnou, kde byla charakterizována varianta p.Q141K [4], která má zásadní dopad na schopnost přenosu urátu [5]. URAT1 je prvním popsaným urátovým transportérem [6] a je exprimován pouze v ledvinách, konkrétně na apikální membráně proximálních tubulů, kde se podílí na reabsorpci urátu. Protein GLUT9 slouží k transportu urátu, a podílí se tak na koncentraci sérové kyseliny močové [7]. Vyskytuje se ve dvou isoformách, které se od sebe liší rozdílem 29 aminokyselin, složením aminokyselin na N-konci a lokalizací, kdy jedna z isoform je pravděpodobně exprimována na bazolaterální a druhá na apikální membráně proximálních ledvinných tubulů [8,9].

1.3. Poruchy urátového transportu

Renální hypourikemie je hereditární heterogenní onemocnění ledvin, při kterém dochází k významnému poklesu hladin kyseliny močové v séru (významně pod 120 $\mu\text{mol/l}$) a násobnému zvýšení frakční exkrece kyseliny močové. Toto onemocnění je často asymptomatické, u některých jedinců ovšem může vést k závažným komplikacím, jako jsou nefrolitiáza, urolitiáza či akutní selhání ledvin. Příčinou tohoto onemocnění jsou poruchy reabsorpčních transportérů URAT1 (gen *SLC22A12*) a GLUT9 (gen *SLC2A9*).

Hyperurikemie je stav zvýšené hladiny sérové kyseliny močové, s hodnotami více než 420 $\mu\text{mol/l}$ pro muže a více než 340 $\mu\text{mol/l}$ v případě žen a dětí. V 90 % případů je příčinou nedostatečná exkrece kyseliny močové, v 10 % případů je způsobena její nadměrnou produkcí. Příčinou nedostatečné exkrece je právě porucha v urátovém transportu, která je geneticky podmíněná poškozujícími variantami v genech pro proteiny urátového transportu. Při dlouhotrvající hyperurikemii může dojít k progresi

do stavu dnave artritidy, nicméně novozélandská epidemiologická studie uvádí, že kumulativní incidence dny je u dlouhodobě sledovaných pacientů s vysokými hodnotami sKM ($\geq 590 \mu\text{mol/l}$) 49 %, z čehož vyplývá, že hyperurikemie je sice nutným předpokladem dny, ale podstatnou roli hrají ještě další faktory [10]. Přesný mechanismus tohoto jevu dosud není zcela objasněn, předpokládá se vliv mnoha faktorů, které ve vzájemné kombinaci zapříčiní rozvoj onemocnění.

1.4. Primární dna

Dna je zánětlivé onemocnění postihující primárně klouby. Typicky se projevuje jako akutní artritida metatarsofalangeálního skloubení palce nohy. K zánětlivé reakci dochází při imunitní odpovědi na krystaly urátu, které se při dlouhotrvající hyperurikemii usazují ve tkáni. Prvním stádiem dny je období asymptomatické hyperurikemie, které může přejít do stádia akutního dnaveho záchvatu. Následuje interkritická fáze dny, čímž je označováno období mezi jednotlivými dnavými záchvaty. Posledním stádiem je chronická fáze tofózní dny, kdy se ukládají depozita urátových krystalů do tkání, která jsou nazývána jako tofy. Přechod z asymptomatické hyperurikemie do dny je charakterizován prvním dnavým záchvatem. Dna je onemocnění, jehož vznik ovlivňuje celá řada faktorů. Genetické predispozice jedince ovlivňují sérovou hladinu kyseliny močové přibližně ze 30–60 % [11–13]. Existuje velké množství genů, které se podílí na patofyziologii dny.

Gen *ABCG2* kóduje stejnojmenný protein ABCG2. Pozornost v souvislosti se dnou se tomuto genu dostala v roce 2008, kdy byla provedena celogenomová asociační studie, která odhalila tři genové lokusy související s hladinou kyseliny močové a dnou. Jednalo se o lokusy v genech *ABCG2*, *SLC2A9* a *SLC17A3* [4]. Právě již dříve zmiňovaná nesynonymní varianta p.Q141K (rs2231142) v genu *ABCG2* byla i později v mnoha studiích opakovaně potvrzena jako riziková pro rozvoj dny. V porovnání s wild-type genotypem přítomnost této varianty, způsobující záměnu p.Q141K, vede ke snížení transportu urátu o 53 % [5]. Frekvence minoritní alely (MAF) se liší napříč populacemi, v evropské populaci je 9,4 %, výrazně častěji se pak vyskytuje ve východoasijské populaci s frekvencí 29,1 %, celosvětově pak s frekvencí 11,9 % (dle databáze Ensembl [14]). Záměna p.Q141K se nachází v ATP-vazebné doméně transportéru ABCG2, způsobuje její nestabilitu a také sníženou expresi proteinu [15]. Další běžnou variantou v *ABCG2* je nesynonymní varianta p.V12M (rs2231137) s hodnotou MAF 6,1 % pro evropskou populaci a 15,8 % celosvětově. Tato varianta má na základě metaanalýzy zahrnující několik různých populací protektivní efekt proti vzniku dny [16], ačkoliv nebyl prokázán funkční vliv této varianty na urátový transport [17]. Poslední častou variantou spojovanou s rizikem dny je varianta vedoucí k předčasnému vzniku terminačního kodonu p.Q126X (rs72552713), která je běžná v japonské populaci, s MAF 2,4 % [17]. Populační atributivní riziko běžně se vyskytujících dysfunkčních variant v *ABCG2* přispívajících k hyperurikemii je přes 29 %, což je více, než kolik představují ostatní rizikové faktory [18]. Důležité jsou ovšem i vzácné nesynonymní varianty, které se vyskytují s frekvencí menší než 0,1 % a významně se podílí na náchylnosti jejich nositelů ke vzniku dny. Funkční analýza těchto variant (p.R147W, p.T153M, p.K360del,

p.F373C, p.T421A, p.T434M, p.S476P, p.S572R, p.D620N) potvrdila jejich důležitost a vliv, neboť přítomnost variant má dopad na expresi proteinu, membránovou lokalizaci a urátový transport [19]. Běžné a vzácné varianty jsou nezávisle spojeny s rizikem dny, proto je důležité vyhodnocovat rizika rozvoje tohoto onemocnění u každého pacienta individuálně se znalostí jeho konkrétního genotypu [17].

Gen *SLC22A12* kóduje protein URAT1. Varianty v genu *SLC22A12* mohou vést k renální hypourikémii typu 1 [20–23]. Byly nalezeny i varianty asociované s primární hyperurikémií [24] a dnou [25], ale i varianty protektivní proti hyperurikémii a dně – p.R90H (rs121907896) a p.W258X (rs121907892) [26], což doposud nebylo prokázáno ve funkčních studiích.

Gen *SLC2A9* kóduje protein GLUT9. Varianty v genu *SLC2A9* ovlivňují urátovou reabsorpci a mohou způsobovat renální hypourikémii typu 2 [23,27]. Existují i studie, které uvádí spojitost variant v genu *SLC2A9* s hyperurikémií a dnou [28], nicméně funkční analýza neprokázala vliv těchto variant na expresi, lokalizaci či urátový transport [29]. Varianty v genu *SLC2A9* vysvětlují 3 % variance v hladinách sKM [30].

Výsledný fenotyp jedince není určován pouze kombinací jednotlivých genů a jejich alteracemi. Dalším významným faktorem jsou epigenetické změny, které mohou významně modifikovat genom. Jelikož variabilita progresu dny i samotné zánětlivé reakce při dnové atace je zatím velkou neznámou, vznikají hypotézy, které poukazují na roli epigenetických faktorů. Do popředí těchto studií se dostaly v poslední době hojně studované microRNA.

První studie, která se zabývala rolí miRNA u dny, se zaměřila na zánětlivou reakci při akutní dnové atace. Ukázalo se, že v mononukleárních buňkách pacientů s akutní dnou byla zvýšená exprese miR-155. Rovněž vystavení buněk urátovým krystalům zvyšovalo expresi miR-155. To dále vedlo ke snížení hladin proteinu SHIP-1, který je známý jako negativní regulátor proliferace, a zvýšení hladin prozánětlivých cytokinů [31]. Další obdobná studie prokázala zvýšení hladiny miR-146a indukovanou urátovými krystaly. Nadměrná exprese miR-146a následně potlačovala expresi prozánětlivých cytokinů IL-1 β , pro-IL1 β , TNF α , MCP-1 a IL-8 [32]. Důležitost miRNA v regulaci NLRP3 inflamazomu shrnuje i recentní review, která uvádí přes dvacet miRNA podílejících se na tomto procesu [33]. Nedávná studie popsala funkci miR-3146 u akutní dnové ataky, kdy tato miRNA byla zvýšená v neutrofilech u pacientů se dnou a způsobovala tvorbu neutrofilních extracelulárních pastí, které u dny zvyšují zánětlivou reakci [34].

Dalším cílem miRNA, kromě mRNA, které jsou exprimovány při zánětlivé reakci u dny, mohou být i mRNA samotných urátových transportérů. Velmi zajímavé výsledky přinesla studie, která se zabývala vlivem varianty p.Q141K v genu *ABCG2* na změnu RNA inhibice prostřednictvím miRNA. Přítomnost této varianty usnadňuje a zvyšuje translační represi pomocí miRNA [35]. U miR-34 bylo popsáno, že přímo cílí na mRNA genu *SLC22A12*, jenž kóduje transportér URAT1 [36]. MiR-143-3p byla u pacientů s hyperurikémií snížena a bylo prokázáno, že přímým cílem této miRNA je mRNA urátového transportéru GLUT9 [37].

Mimo výše zmíněné cíle mohou miRNA zasahovat a ovlivňovat také metabolismus kyseliny močové. U miR-448 bylo zjištěno, že může inhibovat expresi genu pro xantinoxidázu [38].

Podle recentní GWAS studie by miRNA mohly hrát roli v nedostatečně objasněném rozvoji dny z asymptomatické hyperurikemie. Tato studie objevila tři genetické lokusy, přičemž jedním z nich byl i rs9952962 blízko genu pro miR-302f, které byly asociované se zánětem vyvolaným urátovými krystaly [39].

2. Hypotézy a cíle práce

1. Zjistit, zda existují kauzální varianty v genech *ABCG2*, *SLC22A12* a *SLC2A9*, které by zvyšovaly riziko rozvoje onemocnění nebo progresu onemocnění z asymptomatické hyperurikemie do dny.
2. Zjistit, zda existují rozdíly v hladinách cirkulujících miRNA v plazmě pacientů s primární hyperurikemií, dnou a pacientů v dnové atace ve srovnání s normourikemickou kohortou.

Dílčí cíle

- Identifikovat kauzální varianty pro renální hypourikemii v genech *SLC22A12* a *SLC2A9*.
- Analyzovat frekvenci variant podmiňujících renální hypourikemii typu 1 u pacientů z romské populace.

3. Materiál a metodika

3.1. Izolace DNA/RNA

DNA byla izolována ze vzorků periferní krve, která byla odebírána do zkumavek s EDTA, pomocí kitu Exgene™ Blood SV mini (GeneAll), který je založen na principu purifikace DNA přes křemičitou membránu v kolonce. Další možností byla izolace pro vyšší výtěžky DNA za použití QIAamp DNA Mini Kitu (Qiagen) založeného na klasické fenol-chloroformové metodě.

RNA pro miRNA analýzu byla izolována z plazmy pacientů uchovávané v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pomocí miRNeasy Serum/Plasma Kitu (Qiagen). Principem tohoto kitu je kombinace Trizolu a křemičitých kolonek. Následně byla provedena reverzní transkripce vyizolované RNA za použití TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kitu (ThermoFisher), která se skládá ze 4 kroků: přidání poly(A) sekvence na 3' konec, přidání adaptorové sekvence na 5' konec, reverzní transkripce do cDNA a miRNA amplifikace.

3.2. PCR

Před sekvenováním byla provedena polymerázová řetězová reakce (PCR). Pro kódující sekvence analyzovaných genů byly navrženy specifické primery. Pro jednotlivé exony byly dále optimalizovány teploty reakce, především pro krok nasedání (annealing) primerů. Namnožené úseky DNA byly na závěr ověřeny pomocí elektroforézy. Posledním krokem před sekvenací reakcí bylo přečištění PCR produktů pomocí Presto 96 Well PCR Cleanup Kitu (Geneaid).

3.3. Sangerova metoda sekvenování

Sekvenační reakce je modifikovaná PCR reakce, kdy dochází k namnožení různě dlouhých úseků zakončených fluorescenčně značenými ddNTPs. K sekvenační reakci byl použit jeden specifický primer a BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher). Samotné sekvenování bylo provedeno na čtyřkapilárním sekvenátoru Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (ThermoFisher).

3.4. ARMS metoda

Zkratka ARMS vyjadřuje amplifikační refrakční mutační systém, jedná se o modifikovanou PCR, kdy se využívá dvou párů specifických primerů, jejichž produkty se liší v případě ne/přítomnosti sledované nukleotidové záměny. Tuto metodu jsme využívali pro zjištění genotypu u vzorků z kontrolní skupiny.

3.5. qPCR

Metoda kvantitativního PCR umožňuje sledovat kvantitativní nárůst produktu v čase, proto je také někdy označovaná jako real-time PCR. V našem případě byla tato metoda využita pro kvantifikaci miRNA, a pro každou miRNA byly použity specifické sondy TaqMan™ Advanced miRNA Assays (ThermoFisher). Kvantitativní PCR bylo provedeno na přístroji QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System (ThermoFisher).

3.6. Luminex

Pro zjištění hladin 27 cytokinů (FGF, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17A, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, TNF- α , VEGF) v plazmě pacientů byl použit Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 27-plex Assay kit (Bio-Rad) a přístroj Bio-Plex 200 System (Bio-Rad), který funguje na principu průtokové cytometrie.

3.7. Funkční studie

Nesynonymní varianty nalezené ve studovaných genech byly dále ověřovány ve spolupráci s Přírodovědeckou fakultou UK a s japonskou University of Tokyo Hospital ve funkčních studiích, aby se potvrdil jejich předpokládaný dopad podle predikčních programů (např. SIFT a PolyPhen). Funkční studie byly prováděny na buňkách HEK293A nebo oocytech *Xenopus laevis*. Pomocí klonovacích vektorů (plazmidů) byla provedena transfekce buněk, do nichž byla vložena mutantní (separátně pro jednotlivé varianty) a wild-type DNA (v případě HEK293A) či mRNA (v případě oocytů). Následně byla ověřena exprese proteinu metodou Western blot. Imunocytochemickými metodami byla poté detekována lokalizace proteinu. Schopnost přenosu urátu byla sledována za využití radioaktivně značeného urátu.

4. Výsledky

4.1. Funkční analýza vzácných variant v genu *ABCG2*

Cíle práce: Cílem studie byla funkční charakterizace devíti vzácných variant v genu *ABCG2* nalezených u 250 pacientů s primární hyperurikemií nebo dnou.

Výsledky: V kohortě pacientů s primární hyperurikemií a dnou bylo odhaleno celkem 11 nesynonymních variant v genu *ABCG2*: běžně se vyskytující varianty p.V12M

(rs2231137) a p.Q141K (rs2231142) a vzácné varianty p.R147W (rs372192400), p.T153M (rs753759474), p.F373C (rs752626614), p.T421A (rs199854112), p.T434M (rs769734146), p.S476P (bez rs), p.S572R (rs200894058), p.D620N (rs34783571) a tříbázová delece p.K360del (rs750972998). Všechny vzácné varianty snižovaly proteinovou expresi ABCG2, nejvíce p.R147W a p.S572R (snížení na <25 % oproti WT (wild type)), tyto dvě varianty měly negativní vliv i na buněčnou lokalizaci. Proteiny s těmito variantami nebyly lokalizované na plazmatické membráně, což znemožnilo jejich transportní funkci. Varianty p.T153M a p.F373C také snížily expresi (na <50 % oproti WT) a kvantitativně tak zhoršily transport urátu. Ze zbylých vzácných variant měly negativní dopad na funkci transportéru ABCG2 i varianty p.T434M a p.S476P. Varianty p.T421A, p.D620N a p.K360del neměly signifikantní dopad na funkci proteinu ABCG2.

4.2. Dysfunkční varianty v genu *ABCG2* asociované s familiární hyperurikemií a časným nástupem dny

Cíle práce: Cílem studie bylo nalézt kauzální dysfunkční varianty v genu *ABCG2* a funkčně je charakterizovat.

Výsledky: U 12leté pacientky romského etnika, která měla dlouhotrvající asymptomatickou hyperurikemii, byly nalezeny dvě vzácné varianty v genu *ABCG2* v heterozygotní formě – p.M131I (rs759726272) a p.R236X (rs140207606). Tyto varianty byly nalezeny i u rodinných příslušníků z mateřské linie. Obě varianty měly signifikantně negativní dopad na funkci transportéru ABCG2, varianta p.M131I snižovala funkci na přibližně 14 %, zatímco varianta p.R236X na nulu.

4.3. Interakce varianty p.Q141K v genu *ABCG2* s klinickými daty a hladinou cytokinů u pacientů s primární hyperurikemií a dnou

Cíle práce: Cílem této studie bylo vyhodnotit podíl vlivu rizikových a genetických faktorů (dysfunkční alely p.Q141K) na rozvoj dny. Dalším dílčím cílem byla analýza 27 cytokinů, přičemž naší otázkou bylo, zda se jejich hladiny liší mezi jednotlivými diagnózami a jaký je vztah mezi hladinou cytokinů a přítomností rizikové varianty p.Q141K, neboť tato varianta má vliv na snížení exprese [15], zatímco některé cytokiny mohou expresi zvyšovat [40].

Výsledky: V naší kohortě pacientů s hyperurikemií (MAF 21,3 %) a dnou (MAF 25 %) byla varianta p.Q141K čtenější ve srovnání s normourikemickou kontrolní skupinou (MAF 7,1 %). Pacienti s hyperurikemií či dnou byli starší, měli vyšší hodnoty BMI i vyšší hodnoty CRP. Avšak pacienti v naší kohortě, kteří byli nositeli alely p.Q141K, byli mladší než pacienti bez této rizikové alely. Nástup hyperurikemie/dny byl dřívější u homozygotů pro variantu p.Q141K. Podobně také hodnoty BMI a CRP byly u pacientů zatížených rizikovou variantou nižší než u ostatních pacientů. Hodnoty GFR (glomerulární filtrační rychlost) bývají u pacientů s hyperurikemií a dnou snížené z důvodu zhoršené funkce ledvin. Nicméně nositelé varianty p.Q141K měli tyto hodnoty signifikantně vyšší. Neprokázáli jsme žádnou asociaci s přítomností varianty p.Q141K a hladinou 27 vybraných cytokinů. Našli jsme pouze zvýšenou hladinu 11 z nich u

pacientů v dnavé atace, což odpovídá jejímu mechanismu, kterým je imunitní reakce na urátové krystaly.

4.4. Hladiny několika cirkulujících miRNA se liší u pacientů s hyperurikemií, dnou a pacientů v dnavé atace ve srovnání s normourikemickými kontrolami

Cíle práce: Naším cílem bylo vytipovat a následně ověřit miRNA, které by se v plazmě pacientů s hyperurikemií, dnou nebo dnovou atakou a u normourikemických kontrol signifikantně lišily a mohly by tak sloužit jako biomarker nástupu či progresu onemocnění. Dále jsme také hledali spojitost s hladinami cytokinů a klinickými/biochemickými parametry.

Výsledky: Výsledkem naší analýzy je pět miRNA (miR-17, miR-18a, miR-30c, miR-142 a miR-223), jejichž plazmatické hladiny byly zvýšené u pacientů s primární hyperurikemií, dnou či dnovou atakou ve srovnání se normourikemickými kontrolami. Dále byla nalezena negativní korelace mezi cytokinem MCP-1 a několika miRNA (miR-17, miR-30c, miR-126, miR-142 a miR-223). Téměř všechny ze studovaných miRNA byly pozitivně korelovány s hladinou CRP, který je ukazatelem akutní zánětlivé reakce. Pět miRNA bylo pozitivně korelováno s hladinou sérového kreatininu, tím pádem zároveň negativně korelováno s hodnotou odhadované GFR, která se získává výpočtem rovnice, která zahrnuje věk, pohlaví a hladinu sérového kreatininu. Na základě studie popisující vliv varianty p.Q141K v genu *ABCG2* na usnadnění posttranskripční regulace skrze miRNA [35] jsme analyzovali souvislost mezi hladinami jednotlivých miRNA a přítomností varianty p.Q141K u zkoumaných jedinců. Žádná signifikantní vazba mezi těmito parametry však nebyla nalezena.

4.5. Vliv variant v genech *SLC2A9* a *SLC22A12* na rozvoj hyperurikemie a dny

Cíle práce: Cílem této práce byla sekvenace kódujících oblastí genů *SLC2A9* a *SLC22A12*, identifikace jednotlivých variant a určení jejich četnosti v kohortě pacientů s primární hyperurikemií a dnou. Dále porovnání výsledných dat s biochemickými a klinickými parametry a konečně také srovnání ve vztahu k polymorfismům nalezeným v genu *ABCG2*.

Výsledky: Bylo detekováno celkem sedm nesynonymních variant v genu *SLC2A9*: p.G25R (rs2276961), p.T275M (rs112404957), p.D281H (rs73225891), p.V282I (rs16890979), p.R294H (rs3733591), p.P350L (rs2280205) a p.A17T (rs6820230) v druhé variantě transkriptu. Dále bylo identifikováno pět synonymních variant v genu *SLC2A9*: p.L108L (rs13113918), p.T125T (rs10939650), p.I168I (rs3733589), p.L189L (rs13125646) a p.S515S (rs144428359) i v genu *SLC22A12*: p.N82N (rs3825017), p.H86H (rs3825016), p.H142H (rs11231825), p.A416A (rs1630320) a p.L437L (rs7932775). V genu *SLC2A9* bylo nalezeno také 20 intronových variant, v genu *SLC22A12* pak tři intronové varianty. Některé varianty byly častější ve studované kohortě než v evropské populaci, naopak dvě nesynonymní varianty – p.V282I a intronová varianta c.1002+78A>G (rs6823877) byly méně časté a byl u nich již dříve popsán protektivní efekt snižující riziko dny [28].

Varianta p.A17T a jedna z intronových variant v genu *SLC2A9* byla častější u pacientů se dnou oproti pacientům s hyperurikemií. Naopak u pacientů s hyperurikemií byly častější tři intronové varianty v genu *SLC2A9*. U nositelů některé z rizikových alel v genu *ABCG2* se objevilo vyšší riziko přítomnosti varianty p.D281H a nižší riziko homozygotní formy varianty p.P350L v genu *SLC2A9*. Naopak pacienti s jednou z intronových variant v genu *SLC2A9* vykazovali nižší pravděpodobnost přítomnosti dysfunkčních variant v genu *ABCG2*.

4.6. Renální hypourikemie typu 1 u romské populace na východním Slovensku

Cíle práce: Cílem této studie bylo identifikovat konkrétní varianty v genech *SLC22A12* a *SLC2A9*. Dále zjistit, zda se v kohortě pacientů vyskytuje renální hypourikemie typu 1 nebo typu 2, případně která převažuje.

Výsledky: U kohorty 9 probandů a jejich 18 příbuzných byly v genu *SLC22A12* objeveny tři intronové varianty, čtyři synonymní varianty a dvě vzácné nesynonymní varianty, které již byly dříve popsány – p.L415_G417del a p.T467M. Konkrétně se jednalo o jednoho pacienta s heterozygotní a jednoho s homozygotní formou delece, 9 pacientů s heterozygotní a jednoho s homozygotní formou varianty p.T467M a dva složené heterozygoty s oběma variantami. U kontrolní skupiny 109 jedinců z makedonské romské populace byla nalezena pouze varianta p.T467M u 12 jedinců, delece p.L415_G417del nebyla vůbec detekována. Absence delece u této subkohorty je pravděpodobně způsobena genetickým driftem. V genu *SLC2A9* bylo nalezeno 12 intronových variant, tři synonymní varianty a čtyři běžné nesynonymní varianty.

4.7. Charakterizace nové dysfunkční varianty v genu *SLC22A12* u pediatrické pacientky s hypourikemií

Cíle práce: Cílem této kazuistiky bylo potvrdit diagnózu renální hypourikemie, zjistit konkrétní genetické varianty způsobující tento stav a funkčně je charakterizovat.

Výsledky: V genu *SLC2A9* byly nalezeny běžně se vyskytující nesynonymní varianty p.G25R (rs2276961), p.V282I (rs16890979), p.P350L (rs2280205) a další běžně se vyskytující synonymní a intronové varianty. Dále byly nalezeny dvě vzácné nesynonymní varianty v genu *SLC22A12* p.R325W (rs150255373) a p.R434C (rs145200251). Druhá z variant byla funkčně charakterizovaná již dříve, kdy byl prokázán její dopad na snížení exprese a transportní funkce proteinu URAT1 [21]. Nově identifikovaná varianta p.R325W byla dle predikčních programů potenciálně poškozující. Tento odhad poté potvrdila i provedená funkční analýza, která ukázala, že i tato varianta má negativní vliv na reabsorpci urátu.

5. Diskuze

ABCG2 je hlavní urátový exkretční protein exprimovaný v proximálních tubulech ledvin a ve střevě. Protein *ABCG2* je složen z 655 aminokyselin, potenciálně je tedy 655 míst, kde může důsledkem bodové nesynonymní mutace vzniknout záměna

aminokyseliny způsobující defekt proteinu. Kromě toho se mohou vyskytovat i jiné typy mutací, jako jsou inserce, delece, posuny čtecího rámce apod. Nesynonymní varianty v genu *ABCG2* mohou mít zásadní poškozující dopad na expresi, lokalizaci a funkci proteinu. Varianta p.Q141K (rs2231142), která byla poprvé popsána v asociaci se dnou v GWAS studii v roce 2008 [4], snižuje urátovou exkreci o 53 % oproti wild-type alele [5]. Tato varianta vede k nestabilitě v ATP-vazebné doméně, což způsobuje sníženou expresi proteinu [15]. Kromě toho souvisí se zhoršenou odpovědí na nejčastěji používaný lék potlačující tvorbu kyseliny močové – alopurinol [41,42]. Varianta p.Q141K se v evropské populaci vyskytuje s frekvencí 9,4 %, ve východní Asii s frekvencí 29 %, v jižní Asii s frekvencí 9,7 % a v Americe s četností 14 % (dle databáze Ensembl [14]).

Důležité je u pacientů s diagnózou primární hyperurikemie nebo dny sledovat nejen často se vyskytující varianty, ale také vzácné a populačně specifické varianty s frekvencí pod 1 %. Identifikace a funkční charakterizace vzácných variant v genu *ABCG2* byly hlavním cílem studie *Functional Characterization of Clinically-Relevant Rare Variants in ABCG2 Identified in a Gout and Hyperuricemia Cohort* [19]. V této studii bylo v kohortě 250 pacientů s hyperurikemií nebo dnou nalezeno kromě dvou běžných a dobře popsaných variant i devět vzácných variant v genu *ABCG2*, které byly dále studovány z hlediska jejich funkčního dopadu. Šest z těchto variant mělo negativní dopad na funkci proteinu z důvodu snížené exprese, chybné lokalizace nebo poškození transportní funkce. Zásadním přínosem studie je prokázání vlivu vzácných nesynonymních variant nalezených v evropské populaci na funkci transportního proteinu *ABCG2*. Souběžně s naší studií prováděli funkční analýzu několika variant v *ABCG2* i na Maďarské akademii věd, jejich publikace vyšla o několik měsíců později. Tato analýza zahrnovala šest vzácných variant, které byly analyzovány i v naší studii, konkrétně: p.R147W (rs372192400), p.T153M (rs753759474), p.F373C (rs752626614), p.T434M (rs769734146), p.S476P (bez rs) a delecii p.K360del (rs750972998). Protein s variantou p.R147W nebyl vůbec exprimován a detekován, a nebyl tím pádem nalezen ani na plazmatické membráně, což je ve shodě s výsledky naší studie. Dále varianta p.T153M způsobovala sníženou expresi, což je také ve shodě s výsledkem naší analýzy, kde byla u této varianty snížená exprese na polovinu oproti WT. U varianty p.F373C byla snížená exprese na plazmatické membráně, což se částečně liší od závěrů naší studie, kdy jsme u této varianty pozorovali pouze negativní vliv na celkovou expresi proteinu. Poslední tři varianty p.T434M, p.S476P a p.K360del nemají dle této studie zásadní negativní dopad na funkci proteinu, nicméně výsledky nejsou zcela jednoznačné a dle našich závěrů varianty p.T434M i p.S476P transportní funkci proteinu snižují. Drobné rozdíly ve výsledcích a závěrech studií lze vysvětlit odchylkami v metodice experimentů, kdy např. v maďarské studii byly použity kromě HEK293 buněk i HeLa buňky [43].

Důležitost zkoumání populačně specifických vzácných variant jsme potvrdili také studií *Identification of Two Dysfunctional Variants in the ABCG2 Urate Transporter Associated with Pediatric-onset of Familial Hyperuricemia and Early-Onset Gout* [44]. Tato studie je založená na případě 12leté romské pacientky s hyperurikemií, u které byly nalezeny dvě vzácné varianty v genu *ABCG2*, p.M131I (rs759726272) a p.R236X (rs140207606), které způsobovaly sníženou až nulovou transportní funkci proteinu

ABCG2. Obě tyto varianty mají napříč různými populacemi nulovou frekvenci (dle databáze Ensembl; [14]), v naší kohortě romských pacientů byly objeveny u této pacientky, jejích tří příbuzných z matčiny strany a dále u dvou nesouvisejících případů romských pacientů, nicméně v kohortě pacientů s primární hyperurikémií a dnou, která čítá téměř 400 jedinců, jsme žádného dalšího nositele těchto variant nenašli. V jiných studiích tyto varianty popsány nebyly, pouze varianta p.R236X byla popsána v souvislosti s Jr(a-) krevní skupinou [45]. Na význam vzácných variant upozornila i japonská studie, která u 480 pacientů se dnou odhalila tři časté a 19 vzácných nesynonymních variant v genu *ABCG2* a poukázala na nezávislost častých a vzácných nesynonymních variant a zásadní dopad na riziko dny u obou kategorií [17]. Pouze jedna z 19 vzácných nesynonymních variant z citované studie byla nalezena i v české kohortě 250 pacientů s primární hyperurikémií či dnou, konkrétně varianta p.K360del [19]. Závěry uvedených studií potvrzují důležitost individuálního přístupu k pacientům s ohledem na populačně specifické rozdíly.

Znalost genetických predispozic jedince je důležitá z hlediska možnosti rozvoje onemocnění, případně predikce jeho progresu. Navíc může pomoci při nastavení léčby, protože jedinci s variantou p.Q141K mají signifikantně sníženou odpověď na alopurinol ($p = 3 \times 10^{-7}$) [41,46], a i při podávání více než 300 mg denně jejich hladina kyseliny močové neklesá pod 360 mmol/l [42]. Informace o genetických predispozicích pacienta by tedy mohla již od počátku sloužit k úpravě dávkování nebo ke zvolení alternativního léčiva, varianta p.Q141K nemá vliv na odpověď na terapii febuxostatem [47].

Výše zmiňovaná varianta p.Q141K se vzhledem k četnosti a závažnosti jejího dopadu stala předmětem zájmu dalších studií. V jedné ze studií, které jsou podkladem této disertační práce – *Interaction of the p.Q141K Variant of the ABCG2 Gene with Clinical Data and Cytokine Levels in Primary Hyperuricemia and Gout*, jsme sledovali vztah a interakci mezi touto rizikovou variantou p.Q141K a dalšími rizikovými faktory primární hyperurikémie a dny [48]. Závěrem naší studie je zjištění, že u nositelů rizikové varianty p.Q141K se nástup onemocnění projeví dříve, a to i za menšího přispění dalších rizikových faktorů. Naše závěry jsou ve shodě s rozsáhlou japonskou studií, kde byla zjištěna populační atributivní rizika (PAR) genetických i environmentálních rizikových faktorů progresu hyperurikémie. Dysfunkce *ABCG2* způsobená běžnými patogenními variantami p.Q141K a p.Q126X je signifikantně vyšším rizikem (PAR 29 %) než ostatní rizikové faktory (nadváha/obezita, konzumace alkoholu, vyšší věk), s výjimkou pohlaví [18]. V naší kohortě měli jedinci zatíženi variantou p.Q141K riziko rozvoje onemocnění v nižším věku ($p=0,004$), při nižším BMI ($p=0,056$), nižším CRP ($p=0,007$) a vyšším GFR ($p=0,035$). Pozitivní korelace poškozujících variant v genu *ABCG2* s dřívějším nástupem onemocnění byla prokázána i v naší dřívější studii, kdy 88 % pacientů do 20 let bylo nositeli alespoň jedné z těchto alel, naopak u pacientů nad 60 let mělo alespoň jednu poškozující variantu pouze 30 %. Medián věku nástupu onemocnění byl 42 let u pacientů s alespoň jednou poškozující variantou, u pacientů bez přítomnosti takové varianty pak 48 let [16].

Součástí této studie byla i analýza 27 cytokinů, která ukázala signifikantní zvýšení 12 cytokinů v plazmě pacientů v akutní dnové atace a dále snížení třech cytokinů (eotaxin,

MCP-1 a RANTES) u všech skupin pacientů ve srovnání s normourikemickými kontrolami. Hypotézou, která nás k této analýze vedla, byl předpoklad, že by se hladiny některých cytokinů mohly lišit mezi skupinami a mohly by tak pomoci odlišit pacienty s hyperurikemií a pacienty se dnou, kteří již někdy v průběhu své diagnózy prodělali dnovou ataku. Výsledky naší studie však tuto hypotézu nepotvrdily. Z výsledků recentní španělské studie ovšem vyplývá, že plazmatické hladiny některých cytokinů, konkrétně IL-18, sIL-6R a RANTES u pacientů se dnou pozitivně korelují s velikostí urátových krystalů [49]. Tyto výsledky částečně souhlasí s naší hypotézou, přestože právě cytokin RANTES byl v naší kohortě snížený v plazmě pacientů s hyperurikemií, dnou a dnovou atakou.

Prozánětlivé cytokiny IL-1 β a TNF α mohou mít vliv na zvýšení exprese genu *ABCG2* [40]. Naopak varianta p.Q141K vede ke snížení hladiny jeho exprese [50]. Nenalezli jsme žádný signifikantní rozdíl v plazmě pacientů s hyperurikemií v porovnání pacientů se dnou, případně u pacientů během dnové ataky, ani žádnou souvislost s variantou p.Q141K. Hladina cytokinů tedy pravděpodobně nesouvisí s přechodem ze stavu hyperurikemie do klinicky definovatelné dny.

Z tohoto důvodu jsme se dále zaměřili i na epigenetické mechanismy, konkrétně miRNA, a ve studii *Circulating microRNA alternations in primary hyperuricemia and gout* jsme u stejné kohorty pacientů analyzovali hladiny vybraných miRNA v plazmě [51]. MicroRNA jsou v posledních letech hojně studované, zejména pro jejich potenciál neinvazivních biomarkerů. MicroRNA ovlivňují expresi až 60 % genů kódujících proteiny [52], a tak hrají roli ve většině buněčných procesů. Zatímco např. u nádorových onemocnění, kde je velký tlak na nalezení vhodných biomarkerů, vyšlo již velké množství publikací na téma miRNA, u hyperurikemie a dny je množství podobných publikací omezené. Naším cílem bylo najít potenciální miRNA, které by se mohly lišit mezi skupinami pacientů s primární hyperurikemií, dnou a dnovou atakou a normourikemickými kontrolami. Objevili jsme pět miRNA, které byly signifikantně zvýšené v plazmě pacientů s hyperurikemií a dnou ve srovnání s kontrolami. Nenašli jsme miRNA, které by se lišily mezi skupinou hyperurikemických pacientů a pacientů se dnou či akutní atakou, přestože existují studie, které poukázaly na regulaci inflamazomu NLRP3 prostřednictvím miRNA, konkrétně např. miR-223-3p negativně reguluje expresi NLRP3, čímž potlačuje aktivitu inflamazomu [53,54]. Očekávali jsme tedy, že pacienti v průběhu dnové ataky, případně jedinci s klinicky definovanou dnou, budou mít odlišné hladiny plazmatických miRNA v porovnání s jedinci s hyperurikemií. Výsledky ale naznačují, že zánětlivá aktivita spojená s vyšší expresí regulujících miRNA by mohla probíhat již u pacientů s hyperurikemií, neboť hladiny miRNA se u nich nelišily od ostatních skupin pacientů. Krystaly urátu, které jsou pohlceny makrofágy, aktivují NLRP3 inflamazom [55]; rovněž již byly publikovány studie popisující depozita urátových krystalů u asymptomatické hyperurikemie, a jejich přítomnost byla nalezena u 15 % pacientů s asymptomatickou hyperurikemií [56]. Je tedy možné, že u těchto pacientů probíhá zánětlivá reakce na krystaly urátu již v této fázi onemocnění, a proto by biomarkery pro prognózu onemocnění měly být nezávislé na zánětlivých procesech. Navíc hyperurikemie sama o sobě přispívá k produkci cytokinů a zvyšuje tak markery

chronického zánětu [57]. V poslední době řada publikací řeší otázku autoinflamatorních znaků dny. Protože stále neznáme příčinu konverze hyperurikemie do dny, začaly se některé studie zabývat zánětlivou složkou onemocnění, neboť se zdá, že hlavní příčinou, proč u někoho vzniká reakce na urátové krystaly dříve, je individuální nastavení imunitního systému. Zde hrají roli např. geny účastníci se tvorby a aktivace NLRP3 inflamazomu.

Nalezená negativní korelace mezi cytokinem MCP-1 a několika miRNA (miR-17, miR-30c, miR-126, miR-142 a miR-223) by mohla vysvětlovat výsledky naší předchozí studie, která zahrnovala i kvantifikaci 27 cytokinů, kde byly plazmatické hladiny tohoto cytokinu překvapivě vyšší ve skupině normourikemických kontrol. MCP-1 je totiž klíčovým chemokinem, který atrahuje monocyty a makrofágy do místa zánětu a při hyperurikemii je jeho hladina zvýšená [58,59]. Naší hypotézou, která z tohoto zjištění vyplynula, je, že zmíněné miRNA by mohly cílit a regulovat expresi MCP-1. Některé studie popsaly miRNA, které mohou cílit na 3' UTR oblast mRNA genu *MCP-1*, mezi nimi například i miR-126 [60] nebo miR-223 [61]. Nicméně existují i práce, které uvádí opačný trend, např. pozitivní korelaci miR-142 a MCP-1 u systémového lupus erythematodes [62]. Protichůdné závěry tedy vyžadují další studie pro objasnění cílových mRNA uvedených miRNA.

Geny *SLC22A12* a *SLC2A9* kódují proteiny URAT1 a GLUT9, které slouží k reabsorpci urátu [6,7]. Oba tyto geny jsou spojované s dědičnou renální hypourikemií, což je vzácné onemocnění zapříčiněné dysfunkcí proteinu URAT1 (renální hypourikemie typu 1) nebo proteinu GLUT9 (renální hypourikemie typu 2).

Nicméně u obou uvedených genů byly objeveny i varianty asociované s primární hyperurikemií a dnou. V genu *SLC22A12* bylo popsáno šest variant asociovaných s primární dnou – p.R284G, p.G290C, p.Q297E, p.E298D, p.I305S a p.A680T, avšak tyto varianty nebyly dále funkčně charakterizovány [25]. Některé varianty v genu *SLC2A9* jsou rovněž spojovány s hladinou kyseliny močové a dnou. Jedná se např. o variantu p.V282I (rs16890979) [4], ale tato varianta ani dalších sedm nesynonymních variant – p.A17T (rs6820230), p.G25R (rs2276961), p.V169M (rs144196049), p.T275M (rs112404957), p.D281H (rs73225891), p.R294H (rs3733591) a p.P350L (rs2280205), které dle asociační studie potenciálně souvisely s hyperurikemií, nebyly potvrzeny funkčními studiemi [29]. Vzhledem k přetrvávajícím nejasnostem a protichůdným závěrům studií byla předmětem naší studie *Evaluation of the influence of genetic variants of SLC2A9 (GLUT9) and SLC22A12 (URAT1) on the development of hyperuricemia and gout* identifikace variant v uvedených genech u 250 pacientů s primární hyperurikemií nebo dnou [63]. V této kohortě nebyly nalezeny žádné nesynonymní varianty v genu *SLC22A12*, ale bylo nalezeno pět synonymních variant a tři varianty intronové. V genu *SLC2A9* bylo nalezeno sedm nesynonymních variant, pět synonymních a celá řada intronových variant. Ve shodě s předchozími studiemi jsme v naší kohortě popsali nesynonymní variantu p.V282I (rs16890979) v genu *SLC2A9*, která byla méně častá v naší kohortě než v evropské populaci a byla již dříve popsána jako varianta snižující riziko dny o 56 % [28] a synonymní variantu p.N82N (rs3825017) v genu *SLC22A12* asociovanou s hyperurikemií [64]. Funkční dopad nesynonymní varianty p.V282I je však

dle predikčních programů benigní (SIFT 0,13, PolyPhen 0,206), zároveň ani funkční studie neprokázala vliv varianty na funkci proteinu [29], synonymní varianta p.N82N z podstaty vliv na protein nemá, jedná se tedy o asociaci, která je pouze ukazatelem, a nikoli samotnou příčinou.

Zatímco role genů *SLC22A12* a *SLC2A9* v kauzalitě primární hyperurikemie a dny je stále nevyjasněná, jejich přímý vliv na vznik RHUC1 a RHUC2 je zřejmý. Původně byla RHUC1 považována za onemocnění s výskytem pouze v Asii, protože první kazuistické studie pocházely z Japonska a Korey [20,65]. V současné době jsou ovšem známy i kauzální varianty specifické pro jiné populace, např. p.G366R, p.T467M a p.L415_G417del nalezené v české populaci, u nichž funkční studie potvrdily negativní dopad na lokalizaci a funkci [22].

Další publikace, která je podkladem této práce *Renal Hypouricemia 1: Rare Disorder as Common Disease in Eastern Slovakia Roma Population* řeší diagnózu dědičné renální hypourikemie u skupiny slovenských romských pacientů a jejich rodin [66]. Byly nalezeny varianty p.L415_G417del a p.T467M (rs200104135) v genu *SLC22A12*, které se s vyšší četností vyskytují právě v romské populaci [67]. Delece p.L415_G417del má zásadně negativní vliv na schopnost přenosu urátu, vede ke snížení na třetinu oproti WT alele. Rovněž varianta p.T467M snižuje funkci transportéru asi na 60 %. Obě varianty mají také negativní dopad na lokalizaci proteinu [22]. Zajímavé je, že u kohorty 109 jedinců z makedonské romské populace zmíněná delece nebyla nalezena, zatímco varianta p.T467M byla v této kohortě s MAF 6,4 %. Delece tedy s největší pravděpodobností vznikla až po odtržení a migraci romské subpopulace na rozdíl od varianty p.T467M, která je přítomna u obou evropských romských subpopulací. Varianta p.T467M byla popsána i u případu devítiletého probanda původem ze Srí Lanky, u kterého zapříčinila dědičnou renální hypourikemii typu 1 s mírným průběhem (sKM 97 $\mu\text{mol/L}$, FE KM 33 %) [68]. Uvedená varianta má nulovou frekvenci v Evropě, ale nízkou frekvenci mezi populacemi v jižní Asii (MAF 0,9 %, dle databáze Ensembl; Howe et al. 2021), odkud Romové před 1000 lety začali migrovat do Evropy [69]. U pacientů romského etnika s nefrolitiázou, urolitiázou či akutním renálním selháním je nutné v klinické praxi myslet i na diagnózu dědičné renální hypourikemie. Byť je toto onemocnění velmi vzácné v majoritní populaci, romská subpopulace má vyšší genetické predispozice k této diagnóze.

Onemocnění se ale může vzácně vyskytovat i u pacientů z majoritní populace. Ve studii *Clinical and Functional Characterization of a Novel URAT1 Dysfunctional Variant in a Pediatric Patient with Renal Hypouricemia* jsme prostřednictvím genetické analýzy u tříleté pacientky s přetrvávající hypourikemií a hyperurikosurií odhalili dvě vzácné varianty v genu *SLC22A12* [70]. Jednalo se o varianty p.R325W (rs150255373) a p.R434C (rs145200251), druhá z nich byla již dříve popsána v makedonské populaci u dvou pediatrických pacientek a jejich rodinných příslušníků. Varianta byla v této studii také funkčně charakterizována a byl prokázán její negativní dopad na lokalizaci, stabilitu i funkci proteinu [21]. Varianta p.R325W ovšem nebyla do té doby funkčně charakterizována, proto jsme provedli funkční analýzu, která prokázala její negativní vliv na lokalizaci a funkci proteinu. Ke stejným výsledkům dospěla i rozsáhlá asociační

studie, která vyšla několik měsíců před publikováním našeho článku, jejíž autoři došli rovněž k závěrům, že tato varianta má poškozující dopad na maturaci a transport proteinu a rovněž na reabsorpci urátu [71]. Obě tyto kazuistiky poukazují na důležitost genetických vyšetření, která mohou často odhalit nové a vzácné varianty zapříčiňující dědičnou renální hypourikemii.

V posledních letech se díky rozvoji a vyšší dostupnosti genomických metod podařilo získat řadu nových poznatků o transportu a metabolismu kyseliny močové a rovněž i o mechanismu imunitní reakce na urátové krystaly. Identifikace polymorfismů přispívajících k rozvoji primární hyperurikemie a dny s sebou přináší možnost prevence či včasného zahájení terapie.

Do popředí se nyní kromě GWAS studií dostávají i epigenetické analýzy, které mají za cíl objasnit dosud nepopsané principy, zejména nejasnost rozvoje dny z asymptomatické hyperurikemie. Aktuálně přibývají studie, které poukazují na autoinflamatorní rysy dnave artritidy, protože samotná hyperurikemie není vždy dostačující predispozicí dny, předpokládá se zde vliv individuálního nastavení imunitního systému. Do komplexity dny jako multifaktoriálního onemocnění tedy vstupují ještě další geny.

Do budoucna by v ideálním případě mohl mít každý pacient nastavenou optimální léčbu na základě svých genetických predispozic. Nicméně vzhledem ke komplexitě onemocnění a počtu genů, které přispívají k patogenezi dny, bude zapotřebí ještě řada studií.

6. Závěr

Primární hyperurikemie a dna jsou multifaktoriální onemocnění, u kterých mají významný podíl genetické predispozice jedince. Studie, které jsou podkladem disertační práce, potvrzují důležitost běžně i vzácně se vyskytujících patogenních variant v genu *ABCG2*, který kóduje hlavní urátový transportér s exkretční funkcí. Potvrdili jsme, že běžně se vyskytující nesynonymní varianta p.Q141K v genu *ABCG2* je pro své nositele rizikem, které převyšuje rizikové faktory, jako jsou věk, vysoké hodnoty BMI a CRP. Důležitý význam v rozvoji primární hyperurikemie a dny má ale i většina ze vzácných nesynonymních variant v genu *ABCG2*, které jsme popsali a funkčně charakterizovali.

V genech *SLC22A12* a *SLC2A9* existují, i dle naší studie, synonymní a intronové varianty asociované s hyperurikemií a dnou, nicméně funkční dopad byl zatím popsán pouze pro nesynonymní varianty, které způsobují dědičnou renální hypourikemii. Identifikovali jsme novou kauzální variantu pro renální hypourikemii typu 1. Dále jsme v kohortě slovenských romských pacientů a jejich příbuzných zjistili vysokou frekvenci kauzálních variant pro *RHUC1* a potvrdili jsme tak závěry našich předchozích studií, které prokázaly vysokou frekvenci těchto variant právě v evropské romské populaci. Tento fenomén je potřeba zahrnout do klinické praxe, kde by etnicita měla být součástí diagnostického algoritmu.

V plazmě pacientů s primární hyperurikemií, dnou a dnovou atakou jsme našli zvýšeně exprimované extracelulární miRNA v porovnání s normourikemickými kontrolami. Nepodařilo se nám najít žádnou miRNA, která by se významně lišila v

závislosti na stupni onemocnění. Z našich výsledků tedy nelze určit takovou miRNA, která by byla potenciálním biomarkerem progresu onemocnění. Nalezená negativní korelace s cytokinem MCP-1 by mohla vysvětlovat výsledky naší předchozí studie, kde byly plazmatické hladiny tohoto cytokinu navzdory očekávání vyšší ve skupině normourikemických kontrol. MiRNA a další epigenetické mechanismy jsou důležitou a zatím nepříliš probádanou složkou studovaného onemocnění, je zde tedy prostor a příležitost pro budoucí výzkum.

V klinické praxi by poznatky v oblasti genetiky a epigenetiky primární hyperurikemie a dny mohly přispět k rychlejší a přesnější diagnostice a k personalizované léčebné terapii, která by zohledňovala všechny individuální rizikové faktory, přispívající k tomuto multifaktoriálnímu onemocnění.

Použitá literatura

1. Xu, X.; Li, C.; Zhou, P.; Jiang, T. Uric acid transporters hiding in the intestine. *Pharm. Biol.* **2016**, *54*, 3151–3155, doi:10.1080/13880209.2016.1195847.
2. Eisenblätter, T.; Hüwel, S.; Galla, H.J. Characterisation of the brain multidrug resistance protein (BMDP/ABCG2/BCRP) expressed at the blood-brain barrier. *Brain Res.* **2003**, *971*, 221–231, doi:10.1016/S0006-8993(03)02401-6.
3. Mao, Q. BCRP/ABCG2 in the placenta: Expression, function and regulation. *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 1244–1255, doi:10.1007/s11095-008-9537-z.
4. Dehghan, A.; Köttgen, A.; Yang, Q.; Hwang, S.J.; Kao, W.L.; Rivadeneira, F.; Boerwinkle, E.; Levy, D.; Hofman, A.; Astor, B.C.; et al. Association of three genetic loci with uric acid concentration and risk of gout: a genome-wide association study. *Lancet* **2008**, *372*, 1953–1961, doi:10.1016/S0140-6736(08)61343-4.
5. Woodward, O.M.; Kottgen, A.; Coresh, J.; Boerwinkle, E.; Guggino, W.B.; Kottgen, M. Identification of a urate transporter, ABCG2, with a common functional polymorphism causing gout. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106*, 10338–10342, doi:10.1073/pnas.0901249106.
6. Enomoto, A.; Kimura, H.; Chairoungdua, A.; Shigeta, Y.; Jutabha, P.; Cha, S.H.; Hosoyamada, M.; Takeda, M.; Sekine, T.; Igarashi, T.; et al. Molecular identification of a renal urate-anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature* **2002**, *417*, 447–452, doi:10.1038/nature742.
7. Vitart, V.; Rudan, I.; Hayward, C.; Gray, N.K.; Floyd, J.; Palmer, C.N.A.; Knott, S.A.; Kolcic, I.; Polasek, O.; Graessler, J.; et al. SLC2A9 is a newly identified urate transporter influencing serum urate concentration, urate excretion and gout. *Nat. Genet.* **2008**, *40*, 437–442, doi:10.1038/ng.106.
8. Augustin, R.; Carayannopoulos, M.O.; Dowd, L.O.; Phay, J.E.; Moley, J.F.; Moley, K.H. Identification and characterization of human glucose transporter-like protein-9 (GLUT9): Alternative splicing alters trafficking. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 16229–16236, doi:10.1074/jbc.M312226200.
9. Kimura, T.; Takahashi, M.; Yan, K.; Sakurai, H. Expression of SLC2A9 isoforms in the kidney and their localization in polarized epithelial cells. *PLoS One* **2014**, *9*, doi:10.1371/journal.pone.0084996.
10. Dalbeth, N.; Phipps-Green, A.; Frampton, C.; Neogi, T.; Taylor, W.J.; Merriman, T.R. Relationship between serum urate concentration and clinically evident incident gout: An individual participant data analysis. *Ann. Rheum. Dis.* **2018**, *77*, 1048–1052, doi:10.1136/annrheumdis-2017-212288.
11. Emmerson, B.T.; Nagel, S.L.; Duffy, D.L.; Martin, N.G. Genetic control of the renal clearance of urate: A study of twins. *Ann. Rheum. Dis.* **1992**, *51*, 375–377, doi:10.1136/ard.51.3.375.
12. Krishnan, E.; Lessov-Schlaggar, C.N.; Krasnow, R.E.; Swan, G.E. Nature versus nurture in Gout: A twin study. *Am. J. Med.* **2012**, *125*, 499–504, doi:10.1016/j.amjmed.2011.11.010.
13. Wang, W.; Zhang, D.; Xu, C.; Wu, Y.; Duan, H.; Li, S.; Tan, Q. Heritability and genome-wide association analyses of serum uric acid in middle and old-aged Chinese twins. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2018**, *9*, 75, doi:10.3389/fendo.2018.00075.
14. Howe, K.L.; Achuthan, P.; Allen, J.; Allen, J.; Alvarez-Jarreta, J.; Ridwan Amode, M.; Armean, I.M.; Azov, A.G.; Bennett, R.; Bhai, J.; et al. Ensembl 2021. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, D884–D891, doi:10.1093/nar/gkaa942.
15. Woodward, O.M.; Tukaye, D.N.; Cui, J.; Greenwell, P.; Constantoulakis, L.M.; Parker, B.S.; Rao, A.; Kottgen, M.; Maloney, P.C.; Guggino, W.B. Gout-causing Q141K mutation in ABCG2 leads to instability of the nucleotide-binding domain and can be corrected with small molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110*, 5223–5228, doi:10.1073/pnas.1214530110.
16. Stiburkova, B.; Pavelcova, K.; Zavada, J.; Petru, L.; Simek, P.; Cepek, P.; Pavlikova, M.; Matsuo, H.; Merriman, T.R.; Pavelka, K. Functional non-synonymous variants of ABCG2 and gout risk. *Rheumatology* **2017**, *56*, 1982–1992, doi:10.1093/rheumatology/kex295.
17. Higashino, T.; Takada, T.; Nakaoka, H.; Toyoda, Y.; Stiburkova, B.; Miyata, H.; Ikebuchi, Y.; Nakashima, H.; Shimizu, S.; Kawaguchi, M.; et al. Multiple common and rare variants of ABCG2 cause gout. *RMD Open* **2017**, *3*, e000464, doi:10.1136/rmdopen-2017-000464.

18. Nakayama, A.; Matsuo, H.; Nakaoka, H.; Nakamura, T.; Nakashima, H.; Takada, Y.; Oikawa, Y.; Takada, T.; Sakiyama, M.; Shimizu, S.; et al. Common dysfunctional variants of ABCG2 have stronger impact on hyperuricemia progression than typical environmental risk factors. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 1–5, doi:10.1038/srep05227.
19. Toyoda, Y.; Mančíková, A.; Krylov, V.; Morimoto, K.; Pavelcová, K.; Bohatá, J.; Pavelka, K.; Pavlíková, M.; Suzuki, H.; Matsuo, H.; et al. Functional Characterization of Clinically-Relevant Rare Variants in ABCG2 Identified in a Gout and Hyperuricemia Cohort. *Cells* **2019**, *8*, 363, doi:10.3390/cells8040363.
20. Ichida, K.; Hosoyamada, M.; Hisatome, I.; Enomoto, A.; Hikita, M.; Endou, H.; Hosoya, T. Clinical and Molecular Analysis of Patients with Renal Hypouricemia in Japan-Influence of URAT1 Gene on Urinary Urate Excretion. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2004**, *15*, 164–173, doi:10.1097/01.ASN.0000105320.04395.D0.
21. Tasic, V.; Hynes, A.M.; Kitamura, K.; Cheong, H. Il; Lozanovski, V.J.; Gucev, Z.; Jutabha, P.; Anzai, N.; Sayer, J.A. Clinical and functional characterization of URAT1 variants. *PLoS One* **2011**, *6*, e28641, doi:10.1371/journal.pone.0028641.
22. Stiburkova, B.; Sebesta, I.; Ichida, K.; Nakamura, M.; Hulkova, H.; Krylov, V.; Kryspinova, L.; Jahnova, H. Novel allelic variants and evidence for a prevalent mutation in URAT1 causing renal hypouricemia: Biochemical, genetics and functional analysis. *Eur. J. Hum. Genet.* **2013**, *21*, 1067–1073, doi:10.1038/ejhg.2013.3.
23. Mancikova, A.; Krylov, V.; Hurba, O.; Sebesta, I.; Nakamura, M.; Ichida, K.; Stiburkova, B. Functional analysis of novel allelic variants in URAT1 and GLUT9 causing renal hypouricemia type 1 and 2. *Clin. Exp. Nephrol.* **2016**, *20*, 578–584, doi:10.1007/s10157-015-1186-z.
24. Graessler, J.; Graessler, A.; Unger, S.; Kopprasch, S.; Tausche, A.K.; Kuhlisch, E.; Schroeder, H.E. Association of the human urate transporter 1 with reduced renal uric acid. Excretion and hyperuricemia in a German caucasian population. *Arthritis Rheum.* **2006**, *54*, 292–300, doi:10.1002/art.21499.
25. Vázquez-Mellado, J.; Jiménez-Vaca, A.L.; Cuevas-Covarrubias, S.; Alvarado-Romano, V.; Pozo-Molina, G.; Burgos-Vargas, R. Molecular analysis of the SLC22A12 (URAT1) gene in patients with primary gout. *Rheumatology* **2007**, *46*, 215–219, doi:10.1093/rheumatology/kel205.
26. Sakiyama, M.; Matsuo, H.; Shimizu, S.; Nakashima, H.; Nakamura, T.; Nakayama, A.; Higashino, T.; Naito, M.; Suma, S.; Hishida, A.; et al. The effects of URAT1/SLC22A12 nonfunctional variants, R90H and W258X, on serum uric acid levels and gout/hyperuricemia progression. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–6, doi:10.1038/srep20148.
27. Kawamura, Y.; Matsuo, H.; Chiba, T.; Nagamori, S.; Nakayama, A.; Inoue, H.; Utsumi, Y.; Oda, T.; Nishiyama, J.; Kanai, Y.; et al. Pathogenic GLUT9 mutations causing renal hypouricemia type 2 (RHUC2). *Nucleosides. Nucleotides Nucleic Acids* **2011**, *30*, 1105–11, doi:10.1080/15257770.2011.623685.
28. Meng, Q.; Yue, J.; Shang, M.; Shan, Q.; Qi, J.; Mao, Z.; Li, J.; Zhang, F.; Wang, B.; Zhao, T.; et al. Correlation of GLUT9 Polymorphisms with Gout Risk. *Med. (United States)* **2015**, *94*, e1742, doi:10.1097/MD.0000000000001742.
29. Hurba, O.; Mancikova, A.; Krylov, V.; Pavlikova, M.; Pavelka, K.; Stibůrková, B. 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* **2014**, *9*, doi:10.1371/journal.pone.0107902.
30. Topless, R.K.; Flynn, T.J.; Cadzow, M.; Stamp, L.K.; Dalbeth, N.; Black, M.A.; Merriman, T.R. Association of SLC2A9 genotype with phenotypic variability of serum urate in pre-menopausal women. *Front. Genet.* **2015**, *6*, 313, doi:10.3389/fgene.2015.00313.
31. Jin, H.M.; Kim, T.J.; Choi, J.H.; Kim, M.J.; Cho, Y.N.; Nam, K. Il; Kee, S.J.; Moon, J.B.; Choi, S.Y.; Park, D.J.; et al. MicroRNA-155 as a proinflammatory regulator via SHIP-1 down-regulation in acute gouty arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **2014**, *16*, R88, doi:10.1186/ar4531.
32. Dalbeth, N.; Pool, B.; Shaw, O.M.; Harper, J.L.; Tan, P.; Franklin, C.; House, M.E.; Cornish, J.; Naot, D. Role of miR-146a in regulation of the acute inflammatory response to monosodium urate crystals.

Ann. Rheum. Dis. **2015**, *74*, 786–790, doi:10.1136/annrheumdis-2014-205409.

33. Zamani, P.; Oskuee, R.K.; Atkin, S.L.; Navashenaq, J.G.; Sahebkar, A. MicroRNAs as important regulators of the NLRP3 inflammasome. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2020**, *150*, 50–61, doi:10.1016/j.pbiomolbio.2019.05.004.
34. Shan, L.; Yang, D.; Feng, F.; Zhu, D.; Li, X. miR-3146 induces neutrophil extracellular traps to aggravate gout flare. *J. Clin. Lab. Anal.* **2021**, 1–11, doi:10.1002/jcla.24032.
35. Ripperger, A.; Benndorf, R.A. The C421A (Q141K) polymorphism enhances the 3'-untranslated region (3'-UTR)-dependent regulation of ATP-binding cassette transporter ABCG2. *Biochem. Pharmacol.* **2016**, *104*, 139–147, doi:10.1016/j.bcp.2016.02.011.
36. Sun, W.F.; Zhu, M.M.; Li, J.; Zhang, X.X.; Liu, Y.W.; Wu, X.R.; Liu, Z.G. Effects of Xie-Zhuo-Chu-Bi-Fang on miR-34a and URA1 and their relationship in hyperuricemic mice. *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *161*, 163–169, doi:10.1016/j.jep.2014.12.001.
37. Zhou, Z.; Dong, Y.; Zhou, H.; Liu, J.; Zhao, W. MiR-143-3p directly targets GLUT9 to reduce uric acid reabsorption and inflammatory response of renal tubular epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, *517*, 413–420, doi:10.1016/j.bbrc.2019.07.114.
38. Knake, C.; Stamp, L.; Bahn, A. Molecular mechanism of an adverse drug-drug interaction of allopurinol and furosemide in gout treatment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *452*, 157–162, doi:10.1016/j.bbrc.2014.08.068.
39. Kawamura, Y.; Nakaoka, H.; Nakayama, A.; Okada, Y.; Yamamoto, K.; Higashino, T.; Sakiyama, M.; Shimizu, T.; Ooyama, H.; Ooyama, K.; et al. Genome-wide association study revealed novel loci which aggravate asymptomatic hyperuricaemia into gout. *Ann. Rheum. Dis.* **2019**, *78*, 1430–1437, doi:10.1136/annrheumdis-2019-215521.
40. Mosaffa, F.; Lage, H.; Afshari, J.T.; Behravan, J. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha increase ABCG2 expression in MCF-7 breast carcinoma cell line and its mitoxantrone-resistant derivative, MCF-7/MX. *Inflamm. Res.* **2009**, *58*, 669–676, doi:10.1007/s00011-009-0034-6.
41. Wen, C.-C.; Yee, S.W.; Liang, X.; Hoffmann, T.J.; Kvale, M.N.; Banda, Y.; Jorgenson, E.; Schaefer, C.; Risch, N.; Giacomini, K.M. Genome-wide association study identifies ABCG2 (BCRP) as an allopurinol transporter and a determinant of drug response. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2015**, *97*, 518–525, doi:10.1002/cpt.89.
42. Wallace, M.C.; Roberts, R.L.; Nanavati, P.; Miner, J.N.; Dalbeth, N.; Topless, R.; Merriman, T.R.; Stamp, L.K. Association between ABCG2 rs2231142 and poor response to allopurinol: Replication and meta-analysis. *Rheumatol. (United Kingdom)* **2018**, *57*, 656–660, doi:10.1093/rheumatology/kex467.
43. Zámbo, B.; Móznér, O.; Bartos, Z.; Török, G.; Várady, G.; Telbisz, Á.; Homolya, L.; Orbán, T.I.; Sarkadi, B. Cellular expression and function of naturally occurring variants of the human ABCG2 multidrug transporter. *Cell. Mol. Life Sci.* **2020**, *77*, 365–378, doi:10.1007/s00018-019-03186-2.
44. Toyoda, Y.; Pavelcová, K.; Bohatá, J.; Ješina, P.; Kubota, Y.; Suzuki, H.; Takada, T.; Stiburková, B. Identification of two dysfunctional variants in the ABCG2 urate transporter associated with pediatric-onset of familial hyperuricemia and early-onset gout. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1–14, doi:10.3390/ijms22041935.
45. Zelinski, T.; Coghlan, G.; Liu, X.Q.; Reid, M.E. ABCG2 null alleles define the Jr(a-) blood group phenotype. *Nat. Genet.* **2012**, *44*, 131–132, doi:10.1038/ng.1075.
46. Roberts, R.L.; Wallace, M.C.; Phipps-Green, A.J.; Topless, R.; Drake, J.M.; Tan, P.; Dalbeth, N.; Merriman, T.R.; Stamp, L.K. ABCG2 loss-of-function polymorphism predicts poor response to allopurinol in patients with gout. *Pharmacogenomics J.* **2017**, *17*, 201–203, doi:10.1038/tpj.2015.101.
47. Stamp, L.K.; Topless, R.; Miner, J.N.; Dalbeth, N.; Merriman, T. No association between ATP-binding cassette transporter G2 rs2231142 (Q141K) and urate-lowering response to febuxostat. *Rheumatol. (United Kingdom)* **2019**, *58*, 547–548, doi:10.1093/rheumatology/key423.
48. Horváthová, V.; Bohatá, J.; Pavlíková, M.; Pavelcová, K.; Pavelka, K.; Šenolt, L.; Stiburková, B. Interaction of the p.Q141K Variant of the ABCG2 Gene with Clinical Data and Cytokine Levels in

- Primary Hyperuricemia and Gout. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 1965, doi:10.3390/jcm8111965.
49. Diaz-Torne, C.; Ortiz, M.A.; Garcia-Guillen, A.; Jeria-Navarro, S.; Sainz, L.; Fernandez-Sanchez, S.; Corominas, H.; Vidal, S. The inflammatory role of silent urate crystal deposition in intercritical gout. *Rheumatology* **2021**, *60*, 5463–5472, doi:10.1093/rheumatology/keab335.
 50. Kondo, C.; Suzuki, H.; Itoda, M.; Ozawa, S.; Sawada, J.I.; Kobayashi, D.; Ieiri, I.; Mine, K.; Ohtsubo, K.; Sugiyama, Y. Functional analysis of SNPs variants of BCRP/ABCG2. *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 1895–1903, doi:10.1023/B:PHAM.0000045245.21637.d4.
 51. Bohatá, J.; Horváthová, V.; Pavlíková, M.; Stibůrková, B. Circulating microRNA alternations in primary hyperuricemia and gout. *Arthritis Res. Ther.* **2021**, *23*, 1–11, doi:10.1186/S13075-021-02569-W.
 52. Friedman, R.C.; Farh, K.K.H.; Burge, C.B.; Bartel, D.P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* **2009**, *19*, 92–105, doi:10.1101/gr.082701.108.
 53. Bauernfeind, F.; Rieger, A.; Schildberg, F.A.; Knolle, P.A.; Schmid-Burgk, J.L.; Hornung, V. NLRP3 Inflammasome Activity Is Negatively Controlled by miR-223. *J. Immunol.* **2012**, *189*, 4175–4181, doi:10.4049/jimmunol.1201516.
 54. Wang, X.; Chi, J.; Dong, B.; Xu, L.; Zhou, Y.; Huang, Y.; Sun, S.; Wei, F.; Liu, Y.; Liu, C.; et al. MiR-223-3p and miR-22-3p inhibit monosodium urate-induced gouty inflammation by targeting NLRP3. *Int. J. Rheum. Dis.* **2021**, *24*, 599–607, doi:10.1111/1756-185X.14089.
 55. Martinon, F.; Pétrilli, V.; Mayor, A.; Tardivel, A.; Tschopp, J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* **2006**, *440*, 237–241, doi:10.1038/nature04516.
 56. Wang, P.; Smith, S.E.; Garg, R.; Lu, F.; Wohlfahrt, A.; Campos, A.; Vanni, K.; Yu, Z.; Solomon, D.H.; Kim, S.C. Identification of monosodium urate crystal deposits in patients with asymptomatic hyperuricemia using dual-energy CT. *RMD Open* **2018**, *4*, e000593, doi:10.1136/rmdopen-2017-000593.
 57. Crişan, T.O.; Cleophas, M.C.P.; Oosting, M.; Lemmers, H.; Toenhake-Dijkstra, H.; Netea, M.G.; Jansen, T.L.; Joosten, L.A.B. Soluble uric acid primes TLR-induced proinflammatory cytokine production by human primary cells via inhibition of IL-1Ra. *Ann. Rheum. Dis.* **2016**, *75*, 755–762, doi:10.1136/ANNRHEUMDIS-2014-206564.
 58. Kanellis, J.; Watanabe, S.; Li, J.H.; Kang, D.H.; Li, P.; Nakagawa, T.; Wamsley, A.; Sheikh-Hamad, D.; Lan, H.Y.; Feng, L.; et al. Uric acid stimulates monocyte chemoattractant protein-1 production in vascular smooth muscle cells via mitogen-activated protein kinase and cyclooxygenase-2. *Hypertension* **2003**, *41*, 1287–1293, doi:10.1161/01.HYP.0000072820.07472.3B.
 59. Grainger, R.; McLaughlin, R.J.; Harrison, A.A.; Harper, J.L. Hyperuricaemia elevates circulating CCL2 levels and primes monocyte trafficking in subjects with inter-critical gout. *Rheumatol. (United Kingdom)* **2013**, *52*, 1018–1021, doi:10.1093/rheumatology/kes326.
 60. Arner, E.; Mejhert, N.; Kulyté, A.; Balwierz, P.J.; Pachkov, M.; Cormont, M.; Lorente-Cebrián, S.; Ehrlund, A.; Laurencikiene, J.; Hedén, P.; et al. Adipose tissue MicroRNAs as regulators of CCL2 production in human obesity. *Diabetes* **2012**, *61*, 1986–1993, doi:10.2337/db11-1508.
 61. Ding, Q.; Shen, L.; Nie, X.; Lu, B.; Pan, X.; Su, Z.; Yan, A.; Yan, R.; Zhou, Y.; Li, L.; et al. MiR-223-3p overexpression inhibits cell proliferation and migration by regulating inflammation-associated cytokines in glioblastomas. *Pathol. Res. Pract.* **2018**, *214*, 1330–1339, doi:10.1016/j.prp.2018.05.012.
 62. Wang, Y.; Liang, J.; Qin, H.; Ge, Y.; Du, J.; Lin, J.; Zhu, X.; Wang, J.; Xu, J. Elevated expression of miR-142-3p is related to the pro-inflammatory function of monocyte-derived dendritic cells in SLE. *Arthritis Res. Ther.* **2016**, *18*, 1–11, doi:10.1186/s13075-016-1158-z.
 63. Pavelcova, K.; Bohata, J.; Pavlikova, M.; Bubenikova, E.; Pavelka, K.; Stiburkova, B. Evaluation of the Influence of Genetic Variants of SLC2A9 (GLUT9) and SLC22A12 (URAT1) on the Development of Hyperuricemia and Gout. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 2510, doi:10.3390/jcm9082510.
 64. Cho, S.K.; Kim, S.; Chung, J.Y.; Jee, S.H. Discovery of URAT1 SNPs and association between serum uric acid levels and URAT1. *BMJ Open* **2015**, *5*, e009360, doi:10.1136/bmjopen-2015-009360.
 65. Lee, J.H.; Choi, H.J.; Lee, B.H.; Kang, H.K.; Chin, H.J.; Yoon, H.J.; Ha, I.S.; Kim, S.; Choi, Y.; Cheong, H. II

- Prevalence of hypouricaemia and SLC22A12 mutations in healthy Korean subjects. *Nephrology* **2008**, *13*, 661–666, doi:10.1111/j.1440-1797.2008.01029.x.
66. Stiburkova, B.; Bohatá, J.; Pavelcová, K.; Tasic, V.; Plaseska-Karanfilska, D.; Cho, S.-K.; Potočnaková, L.; Šaligová, J. Renal Hypouricemia 1: Rare Disorder as Common Disease in Eastern Slovakia Roma Population. *Biomedicines* **2021**, *9*, 1607, doi:10.3390/biomedicines9111607.
 67. Stiburkova, B.; Gabrikova, D.; Čepek, P.; Šimek, P.; Kristian, P.; Cordoba-Lanus, E.; Claverie-Martin, F. Prevalence of URAT1 allelic variants in the Roma population. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2016**, *35*, 529–535, doi:10.1080/15257770.2016.1168839.
 68. Vidanapathirana, D.M.; Jayasena, S.; Jasinge, E.; Stiburkova, B. A heterozygous variant in the SLC22A12 gene in a Sri Lanka family associated with mild renal hypouricemia. *BMC Pediatr.* **2018**, *18*, 1–5, doi:10.1186/s12887-018-1185-9.
 69. Melegh, B.I.; Banfai, Z.; Hadzsiev, K.; Miseta, A.; Melegh, B. Refining the South Asian Origin of the Romani people. *BMC Genet.* **2017**, *18*, 1–13, doi:10.1186/S12863-017-0547-X.
 70. Stiburkova, B.; Bohata, J.; Minarikova, I.; Mancikova, A.; Vavra, J.; Krylov, V.; Doležel, Z. Clinical and Functional Characterization of a Novel URAT1 Dysfunctional Variant in a Pediatric Patient with Renal Hypouricemia. *Appl. Sci.* **2019**, *9*, 3479, doi:10.3390/app9173479.
 71. Tin, A.; Li, Y.; Brody, J.A.; Nutile, T.; Chu, A.Y.; Huffman, J.E.; Yang, Q.; Chen, M.H.; Robinson-Cohen, C.; Macé, A.; et al. Large-scale whole-exome sequencing association studies identify rare functional variants influencing serum urate levels. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1–11, doi:10.1038/s41467-018-06620-4.

Seznam publikací:

1. 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 (IF 2019 – 4,336)
2. 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), 1935. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22041935 (IF 2020 – 5,923)
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]. 8(11), 1965. ISSN 2077-0383. Dostupné z: doi:10.3390/jcm8111965
* sdílené prvoautorství (IF 2019 – 3,303)
4. **BOHATÁ, Jana**, Veronika HORVÁTHOVÁ, Markéta PAVLÍKOVÁ a Blanka STIBURKOVÁ, 2021. Circulating microRNA alternations in primary hyperuricemia and gout. *Arthritis Research & Therapy* [online]. 23(1), 1–11. ISSN 1478-6362. Dostupné z: doi:10.1186/S13075-021-02569-W (IF 2020 – 5,156)
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 (IF 2020 – 4,241)
6. STIBURKOVA, Blanka, **Jana BOHATÁ**, Kateřina PAVELCOVÁ, Velibor TASIC, Dijana PLASESKA-KARANFILSKA, Sung-Kweon CHO, Ludmila POTOČNAKOVÁ a Jana ŠALIGOVÁ, 2021. Renal Hypouricemia 1: Rare Disorder as Common Disease in Eastern Slovakia Roma Population. *Biomedicines* [online]. 9(11), 1607. Dostupné z: doi:10.3390/BIOMEDICINES9111607 (IF 2020 – 6,081)
7. STIBURKOVA, Blanka, **Jana BOHATA**, Iveta MINARIKOVA, Andrea MANCIKOVA, Jiri VAVRA, Vladimír KRYLOV a Zdenek DOLEŽEL, 2019. Clinical and functional characterization of a novel URAT1 dysfunctional variant in a pediatric patient with renal hypouricemia. *Applied Sciences (Switzerland)* [online]. 9(17), 10–17. ISSN 20763417. Dostupné z: doi:10.3390/app9173479 (IF 2019 – 2,474)