

UNIVERZITA KARLOVA

2. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



**Patogeneze nefrotického syndromu u dětí a prediktory odpovědi
na léčbu kortikoidy**

**Pathogenesis of nephrotic syndrome in children and predictors of
corticosteroid treatment response**

Martin Bezdíčka

Praha, 2022

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu Fyziologie a patofyziologie člověka na Pediatrické klinice 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy.

Školitel: doc. MUDr. Ondřej Souček, Ph.D.

Konzultant: doc. MUDr. Jakub Zieg, Ph.D.

Oponenti:

Obhajoba se bude konat před komisí pro obhajoby oborové rady Fyziologie a patofyziologie člověka dne v odhod. Předsedou komise pro obhajobu disertační práce byl jmenován:

Předseda oborové rady a garant doktorského studijního programu: prof. MUDr. Otomar Kittnar, MBA, CSc., Fyziologický ústav 1. LF UK, Albertov 5, 128 00 Praha 2

Děkan fakulty: prof. MUDr. Marek Babjuk, CSc.

Tato práce vznikla za podpory grantu Grantové agentury UK č. 384119, Projektu Ministerstva zdravotnictví koncepčního rozvoje výzkumné organizace 00064203 FN Motol a Operačního programu Výzkum a vývoj pro inovace Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (spolufinancováno EU; CZ.1.05/4.1.00/16.0337).

S disertační prací je možno se seznámit na Oddělení Ph.D. studia děkanátu 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5 (tel. 224 435 836).

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	5
1. Úvod do problematiky	6
2. Hypotézy a cíle disertační práce	12
3. Materiál a metodika	13
4. Výsledky	15
5. Diskuze	17
6. Závěr	26
7. Souhrn	27
8. Summary	28
9. Seznam literatury	29
10. Přehled publikační činnosti autora.....	34

Abstrakt

Nefrotický syndrom je onemocnění ledvin, jehož podstatou je porucha podocytů. Může vzniknout sekundárně následkem infekce, systémového onemocnění či některých léků, nebo se vyskytne jako náhlá izolovaná primární porucha ledvin. Současný standardní léčebný postup zatěžuje pacienty četnými závažnými nežádoucími účinky. U části nemocných, kteří jsou k úvodní několikátýdenní glukokortikoidní léčbě rezistentní, se daří identifikovat kauzální genetický podklad, u ostatních zůstává příčina neznámá. U pacientů reagujících na úvodní glukokortikoidní léčbu remisí později může dojít k opakovaným relapsům s nutností dlouhodobé glukokortikoidní terapie. Tato práce popisuje vlastní originální výzkumné studie, které se zabývaly možnostmi zlepšení diagnostiky genetických příčin nefrotického syndromu, objevováním molekulární podstaty druhé nejčastější genetické příčiny steroid-rezistentní formy onemocnění (způsobené mutacemi transkripčního faktoru WT1) a hledáním klinických a laboratorních faktorů predikujících rezistenci ke glukokortikoidní léčbě.

Kombinací klasického Sangerova sekvenování a moderního sekvenování nové generace (NGS) jsme jako první v kohortě 18 let sbíraných vzorků českých a slovenských dětí s nefrotickým syndromem identifikovali monogenní příčinu u 38 % z nich. Nejprevalentnější byly kauzální varianty v genech *NPHS2* (15 %), *WT1* (9,5 %) a *NUP93* (5,4 %). Funkční studie odhalila významné změny v afinitě 6/8 mutantních forem transkripčního faktoru WT1 k cílové sekvenci DNA a luciferázová esej v buněčné linii HEK293 pak i zvýšenou expresi jednoho z cílových genů *ACTN1* u dvou mutantů WT1 s největší změnou vazebné afinity. Z dostupných klinických a laboratorních dat pacientů se nám nepodařilo nalézt parametr, který by predikoval terapeutickou odpověď na glukokortikoidy. Metoda NGS významně urychluje a zlevňuje diagnostiku monogenních příčin glukokortikoid-rezistentního nefrotického syndromu. Výsledek genetické analýzy nám již dnes umožňuje navrhnout efektivní individualizovanou léčbu u některých jedinců. U ostatních a to i u těch, u kterých je kauzální gen známý, se čeká na objasnění nebo upřesnění molekulární podstaty onemocnění. To je předpokladem úspěšné, efektivní, cílené a nežádoucími účinky nezatížené léčby, která je však bohužel dnes pro většinu těchto pacientů nedostupná.

Abstract

Nephrotic syndrome is a kidney disease caused by injury of the podocytes. It can be secondary due to infection, systemic disease or certain drugs, but it may also present as sudden primary nephrotic syndrome without obvious inducer. Current standard treatment has many severe adverse effects. In some patients that are resistant to the initial several-week-long glucocorticoid treatment it is possible to reveal the causative genetic aetiology of the disease, whereas in the rest of them aetiology remains unknown. Those who respond well to initial glucocorticoid treatment and achieve remission may later on develop repeated relapses requiring long-term glucocorticoid therapy. This work describes our original research studies focusing on the improvement of genetic diagnostics of nephrotic syndrome, on the exploration of molecular mechanisms of the second most common genetic cause of the steroid-resistant nephrotic syndrome (transcription factor WT1 mutants) and on the search of clinical and laboratory factors that could predict the resistance to glucocorticoid treatment.

By combining Sanger and next-generation sequencing (NGS) we were the first to identify monogenic cause in 38 % of Czech and Slovak children with steroid-resistant nephrotic syndrome whose samples had been collected for 18 years. The most prevalent causative variants were in genes *NPHS2* (15 %), *WT1* (9,5 %) and *NUP93* (5,4 %). A functional study revealed that in 6/8 mutant forms of WT1 transcription factor the DNA-binding affinity was significantly changed. Subsequent luciferase assay in HEK293 cells showed that two WT1 mutant forms presenting with the largest change of the DNA-binding affinity induced the expression of one of the target genes *ACTN1*. The available clinical and laboratory data of the patients did not prove to be predictive of the response to the initial glucocorticoid treatment. The NGS significantly accelerates and reduces the costs of the genetic diagnostics of the monogenic causes of steroid-resistant nephrotic syndrome. The result of the genetic analysis already now allows for effective individualized treatment in some patients. However, in the majority of them including those with know monogenic cause of the disease, we are still waiting for clarification of the the molecular mechanism of the disease. This is an important prerequisite for successful, effective, targeted and side-effects-free treatment, which is nowadays unavailable to most patients.

1. Úvod do problematiky

1.1 Definice a diagnostika nefrotického syndromu

Nefrotický syndrom (NS) je onemocnění ledvin charakterizované **proteinurií**, **hypoalbuminemií** projevující se nejčastěji otoky kotníků a obličeje a **hyperlipidemií** (Varner et al., 2018; Skálová and Zieg, 2017). Jedná se o jedno z nejčastějších dětských ledvinových onemocnění s incidencí v Evropě cca 1/25 000 dětí (Dossier et al., 2016). Neléčený NS může dospět až k selhání ledvin a úmrtí. NS vzniká při zvýšené propustnosti glomerulární filtrační bariéry v ledvinách způsobené vrozeným nebo získaným poškozením specializovaných ledvinových buněk - podocytů (Varner et al., 2018; Torban et al., 2019). NS se u menších dětí diagnostikuje pomocí kvantitativního zhodnocení proteinurie z ranního jednorázového vzorku moči poměrem bílkoviny a kreatininu (nefrotická proteinurie je $> 200 \text{ mg/mmol}$) (Skálová and Zieg, 2017; KDIGO., 2012). U starších dětí lze proteinurii také vyšetřit 24hodinovým sběrem moči (hodnota bílkoviny je $> 960 \text{ mg/m}^2/\text{den}$) (Skálová and Zieg, 2017). Hypoalbuminémie je pak definována hodnotou sérového albuminu $< 25 \text{ g/l}$ (KDIGO., 2012). Hyperlipidémii ve většině laboratoří odpovídá vzestup sérového cholesterolu $> 4,2\text{-}5,0 \text{ mmol/l}$ (podle věku) a sérové koncentrace triglyceridů $> 1,6\text{-}2,2 \text{ mmol/l}$ (podle věku) (Geier, 2001; Skálová and Zieg, 2017). Chronické onemocnění ledvin se diagnostikuje a klasifikuje podle míry snížení glomerulární filtrace (GF) vypočtené dle Schwartzovy rovnice. GF vypovídá o schopnosti ledvin očistit plazmu od kreatininu za jednotku času (tzv. clearance kreatininu). Pro její výpočet je třeba znát koncentraci sérového kreatininu, výšku pacienta a pohlavně a věkově specifickou proporční konstantu. Normální renální funkce je definována hodnotou $> 90 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ (renální selhání je definováno jako $\text{GF} < 15 \text{ ml/min/1,73 m}^2$) (Staples et al., 2010).

1.2 Dělení nefrotického syndromu

NS lze dělit dle etiologie onemocnění, tj. **primární forma NS** (dělí se na monogenní a idiopatickou formu bez známé příčiny). **Sekundární NS** je komplikací primárně neledvinového chronického onemocnění (např. diabetes, systémový lupus, chronická hepatitida B a C, HIV, atp.) nebo důsledkem expozice některým lékům (např. penicilamin, lithium, ampicilin) nebo nefrotoickým těžkým kovům (např. rtuť, kadmium) (Varner et al., 2018; Kodner, 2009). Primární formy se častěji vyskytují u dětí, a proto zde můžeme aplikovat také věk jako parametr pro rozdělení NS (Santín et al., 2011). **Kongenitální NS** se projevuje u novorozenců a kojenců do 3 měsíců od narození (Bérody et al., 2019). Při manifestaci NS mezi 4. a 12. měsícem života,

se jedná o **infantilní formu onemocnění** a NS projevující se po 1. roce života označujeme jako **dětský NS** (Skálová and Zieg, 2017), přičemž proporce molekulárně geneticky pozitivních nálezů klesá s rostoucím věkem (kongenitální NS 85 % případů, infantilní NS 40 % případů, dětský NS 11 % případů) (Skálová and Zieg, 2017; Trautmann et al., 2015; Bérody et al., 2019; Sadowski et al., 2015). Dělení dle věku vzniku je čistě popisné bez jakéhokoliv zpřesnění budoucího průběhu NS. Další využívané dělení NS je dle histologického nálezu, kdy se u dětí indikovaných k renální biopsii nejčastěji setkáváme s „**nemocí minimálních změn glomerulů**“ (MCD, 80 – 90 % případů) a s histologickým nálezem **fokální segmentální glomerulosklerózy (FSGS, 10 – 20 % případů**; je závažnější postižení; častější u steroid-rezistentní formy než u senzitivní formy onemocnění) (Vivarelli et al., 2017; D'Agati et al., 2011; Bierzynska et al., 2017; Trautmann et al., 2015). Vzhledem ke své invazivitě, indikace primárně pouze u steroid-rezistentních případů a nepřesnostech při odběru, není renální biopsie a následné histologické hodnocení optimálním přístupem k určení prognózy onemocnění ani k určení cílené a efektivní terapie.

1.3 Dělení NS dle odpovědi na glukokortikoidní terapii

Standardní úvodní léčba primárního NS spočívá v šestitýdenním podávání vysokých dávek glukokortikoidů (60 mg/m²/den) a je jednotná pro všechny pacienty. Cílem léčby NS je dosažení remise onemocnění a zabránění jeho relapsu. S ohledem na cíle léčby se rozlišuje kompletní remise onemocnění (poměr sérových koncentrací celkové bílkoviny a kreatininu < 20 mg/mmol) a částečná remise (redukce proteinurie o více než 50 % a poměr sérových koncentrací celkové bílkoviny a kreatininu 20 – 200 mg/mmol) (KDIGO., 2012). Podle vymizení proteinurie na konci tohoto intervalu se onemocnění dělí na **steroid-senzitivní (SSNS, 80 % dětí)** nebo **steroid-rezistentní NS (SRNS, 20 % dětí)** (McKinney et al., 2001). Iniciální odpověď na léčbu glukokortikoidy je v současné době **hlavním prognostickým ukazatelem NS** (Narla and Swiatecka-Urban, 2020). U 80 – 90 % jedinců se SSNS se vyskytne nejméně jeden relaps (Lombel, Gipson, et al., 2013). Z toho až u 50 % pacientů dochází k opakujícím se relapsům onemocnění reagujících na standardní glukokortikoidní léčbu nebo je u nich remise dosaženo pouze dlouhodobým podáváním glukokortikoidů (tzv. **kortikodependence**) (Lombel, Gipson, et al., 2013; Downie et al., 2017). Může však také dojít ke vzniku **sekundární rezistence** ke glukokortikoidům, dle recentní studie je tomu tak až u 30 % jedinců původně k terapii senzitivních (Bierzynska et al., 2017). V tom případě je nutné

pokračovat v terapii jinými imunosupresivy či chemoterapeutiky (Lombel, Gipson, et al., 2013).

Jedinci se SRNS, u kterých jsou glukokortikoidy již od samého počátku terapie neefektivní (ale přijde se na to z důvodu nastavení diagnostických kritérií až po šesti týdnech léčby), mohou mít **monogenní etiologii** a profitovat z cílené terapie (např. substituce koenzymem Q10 u jedinců s patogenními variantami v genech pro enzymy biosyntézy přirozeného koenzymu Q10 (Stańczyk et al., 2018)). U genetických případů, kde cílená terapie není známá, je v současné době využívána léčba symptomatická (především podávání antihypertenziv, ACE-inhibitorů a blokátorů angiotenzinového receptoru) (Skálová and Zieg, 2017). Pozitivní genetický výsledek má také prognostický význam pro plánování transplantace ledviny, neboť je u těchto jedinců po úspěšně provedené transplantaci velmi nepravděpodobný relaps NS. Oproti tomu jedinci s negativním genetickým nálezem mají 50 % riziko vzniku rekurence po transplantaci (Bierzynska and Saleem, 2018). U jedinců s **idiopatickým SRNS** (negenetická forma) nemůžeme vyloučit patogenní variantu v doposud neznámém genu nebo jinou etiologii onemocnění. U těch tak zatím cílená terapie není možná a lékem první volby jsou kalcineurinové inhibitory, v případě nízkého efektu této terapie pak v kombinaci s nízkou dávkou glukokortikoidů (Skálová and Zieg, 2017; Lombel, Hodson, et al., 2013; Dogra and Kaskel, 2017). Všechny děti s NS, které nedosáhnou dlouhodobé remise nebo jen omezeného počtu relapsů, jsou vystaveny chronické vysoko-dávkované glukokortikoidní či dlouhodobé kalcineurinové léčbě s četnými vážnými nežádoucími účinky (např. katarakta, obezita, zhoršená obranyschopnost proti infekcím, porucha růstu, osteoporóza (Hahn et al., 2015), emoční nestabilita (Mishra et al., 2010), při dlouhodobém podávání kalcineurinů pak nefrotoxicita, poškození jater, hypertenze atd. (Safarini and Patel, 2020)) a mají vysoké riziko vzniku renálního selhání s nutností chronického dialyzačního programu nebo transplantace ledvin (Tullus et al., 2018).

1.4 Genetika nefrotického syndromu

Již před více než 20 lety se podařilo odhalit první gen asociovaný s kongenitálním NS. Jednalo se o gen *NPHS1* (kóduje **nefrin**, nezbytnou strukturní komponentu extracelulární části glomerulární filtrační membrány) (Kestilä et al., 1998). Později došlo k nálezu dalšího významného markeru podocytů, genu *NPHS2* (kóduje **podocin**, tvořící transmembránový spoj mezi extracelulárními komponenty glomerulární filtrační membrány a cytoskeletem buňky)

(Boute et al., 2000). Výzkum postupně odhalil, že proteiny podocin i nefrin se nacházejí specificky v podocytech, kde společně interagují s cytoskeletálními proteiny (CD2AP) (Koziell et al., 2002) a jsou hlavními komponentami podílejícími se na stavbě mezibuněčného spojení podocytů (Schwarz et al., 2001; Huber et al., 2001). Paralelně s nálezem patogenních variant genu *NPHS1* asociovaných s NS byly objeveny kauzální varianty genu *WT1*, které byly identifikovány u jedinců se SRNS asociovaného s dalšími neledvinovými projevy a poruchami (například Denys-Drashův a Frasierův syndrom) (Barboux et al., 1997; Klamt et al., 1998; Mueller, 1994). Patogenní varianty třech zmíněných genů (*NPHS1*, *NPHS2* a *WT1*) byly posléze v populačních studiích shledány jako nejčastější příčiny kongenitálního a infantilního NS (Trautmann et al., 2015; Hinkes et al., 2007). Genetické vyšetření SRNS je tedy nejvíce smysluplné především v nejnižších věkových kategoriích.

Rozvoj metod masivního paralelního genetického sekvenování (**next generation sequencing, NGS**) umožnil cílené a efektivní vyhledávání genetické příčiny NS. Rozsáhlá multicentrická studie (1783 rodin), která se zaměřila na vyšetření 27 v té době známých genů u dětí i dospělých s manifestací SRNS před 25. rokem života, identifikovala patogenní variantu u 30 % jedinců (Sadowski et al., 2015). Další studie, jejichž cílem bylo molekulárně genetické vyšetření celonárodních kohort dětí se SRNS, ukázaly také cca 20 – 30 % pozitivních nálezů (Bierzynska et al., 2017; Wang et al., 2017; Siji et al., 2018). Monocentrická studie z Dětské nemocnice v Bostonu však genetickou příčinu SRNS identifikovala pouze u 11 % případů ze 77 dětí se SRNS (z celkem 72 rodin) (Tan et al., 2018). V bostonské studii byl analyzován obdobný počet genů (24) jako ve výše uvedené multicentrické studii (Sadowski et al., 2015). Porovnání těchto dvou studií ukazuje, že proporce pozitivních nálezů může být ovlivněna velikostí sledované kohorty. Další podstatný vliv mohou mít příbuzenské vztahy ve zkoumané populaci (50 % pozitivních nálezů v rodinách s příbuzenskými vztahy a 25 % v rodinách s nepříbuzenskými vztahy dle (Sadowski et al., 2015)). Na proporcii pozitivních nálezů má také vliv s rostoucím poznáním v čase přibývajícím počet nově identifikovaných genů. Nedávná britská studie analyzující genetickou příčinu SRNS odhalila 26 % pozitivních případů při vyšetření 53 genů (Bierzynska et al., 2017). Majoritní podíl drží patogenní varianty v genech *NPHS1*, *NPHS2* a *WT1* (dnes známo až 70 genů), bez ohledu na velikost nebo etnikum studované populace (Trautmann et al., 2015; Bierzynska et al., 2017; Sadowski et al., 2015). Nevýhodou dnes poměrně rychlého odhalování dalších možných genetických příčin NS díky NGS je, že u mnoha genů není dosud objasněna jejich funkce, resp. role v patogenezi onemocnění a mnoho nalezených variant je klasifikováno jako varianty nejasného klinického

významu. Jediným způsobem, jak objasnit kauzalitu nových kandidátních genů či nových variant již známých genů, je provedení časově náročných a finančně nákladných funkčních studií in vitro.

1.5 Jiné možné příčiny nefrotického syndromu

Dvě třetiny dětí se SRNS mají negativní genetický nález a příčina poškození glomerulů u nich zůstává neobjasněna (Bierzynska et al., 2017). U části těchto dětí může být NS způsoben patogenní variantou v dosud nepopsaném genu, v literatuře se však také spekuluje o doposud nepotvrzených imunogenních sérových faktorech (Colucci et al., 2018). Vliv imunitních procesů v patogenezi NS se nabízí proto, že většina používaných léků moduluje aktivitu T anebo B lymfocytů (Colucci et al., 2018). Příkladem je podávání monoklonální protilátky rituximab, která cílí na specifický lymfocytární antigen CD20. Rituximab se také váže na lipidovou fosfodiesterázu SMPDL-3b podocytů (Ravani et al., 2016). Inhibuje apoptózu těchto buněk a stabilizuje jejich cytoskelet (Fornoni et al., 2011). Efektorem imunitně indukovaného poškození podocytů a potažmo glomerulární filtrační membrány u dětí s idiopatickým NS může být **solubilní faktor cirkulující v séru**. Důkazem existence takového sérového faktoru je například vysoké riziko rekurence onemocnění u transplantovaných pacientů s idiopatickým NS (Bierzynska and Saleem, 2018), kdy rekurenci NS po transplantaci ledviny bylo zabráněno výměnou krevní plazmy (Fine, 2007).

1.6 Verifikace monogenní příčiny SRNS

Základní metodou genetických analýz je **Sangerovo sekvenování** založené na amplifikaci vybraného úseku DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) se zařazováním fluorescenčně značených nukleotidů. Sangerovo sekvenování spolehlivě syntetizuje úseky o délce až 1000 párů bází (sekvenační přesnost je 99,9 %) (Kolísko, 2017). Metoda je vhodná k rutinnímu genetickému vyšetření chorob, které se dají vysvětlit nálezem patogenních variant v omezeném množství genů či jejich exonů (cca 1 – 5). Nevýhodou je časová náročnost metody (amplifikace 1 úseku DNA za 1 PCR cyklus) (Kolísko, 2017). V případě testování více genů nebo exonů, narůstají náklady na provedení metody a vyplatí se investovat do **sekvenování nové generace (NGS)**. NGS umožňuje sekvenování velkého počtu vybraných genů (panel až několika set genů) nebo celého exomu (soubor všech exonů všech

genů v analyzované DNA) či genomu (prakticky celá DNA včetně nekódujících oblastí) (Carter and He, 2016; Illumina, 2017). Rozdílem oproti výše uvedené základní metodě je masivní paralelní amplifikace milionů úseků DNA v jednom kroku. Nevýhodou NGS je pouze nižší přesnost (nalezené varianty se ověřují Sangerovým sekvenováním). Výhodou NGS je nižší cena a menší časová náročnost.

1.7 Funkční studie NS - mikroškalová termoforéza (MST)

Ověřit funkci mutovaného proteinu lze pomocí funkčních studií. Jednou z možností je **analýza vazebné interakce proteinu** s cílovým receptorem (jedná-li se o ligand), ligandem (jedná-li se o receptor), jiným proteinem (jedná-li se o proteinový komplex) nebo specifickou DNA sekvencí (jedná-li se o transkripční faktor). **Mikroškalová termoforéza (MST)** detekuje změnu rychlosti pohybu fluorescenčně označené molekuly při jejím navázání na svého vazebného partnera. Laserem indukované teplo v ohraničeném bodě směsi vazebných partnerů vyvolá pohyb molekul – termoforézu. Ta se mění s měnící se koncentrací fluorescenčně neoznačeného vazebného partnera zkoumané molekuly. Za ideálních podmínek eseje tak lze stanovit disociační konstantu (K_d) vazebné interakce (Jerabek-Willemsen et al., 2011; Jerabek-Willemsen et al., 2014). Výhodou metody MST je potřeba jen malého objemu vzorku, senzitivita v nanomolech, rychlá příprava i analýza, není nutná imobilizace proteinů a je možné využít proteiny s již předem konjugovanou fluorescenční značkou (Jerabek-Willemsen et al., 2014). Nevýhodou MST jsou omezení ve složení analytických pufrů, kdy například merkaptoethanol nebo vysoké koncentrace solí mohou negativně ovlivňovat fluorescenci a tedy i výsledek měření.

2. Hypotézy a cíle disertační práce

Hypotézy:

- 1) Cílené molekulárně genetické vyšetření dětí se SRNS odhalí příčinu jejich onemocnění a pomůže pochopit jeho podstatu.
- 2) Jedním z možných mechanismů vzniku onemocnění je změna exprese cílových genů v podocytech indukovaná mutovanými formami transkripčních faktorů (např. WT1).
- 3) Objasnění genetické příčiny a mechanismu vzniku SRNS pomůže otevřít cestu k terapii „šité na míru“ a zabrání tím rozvoji závažných nežádoucích účinků doposud standardně a uniformně používaných vysokých dávek glukokortikoidů.
- 4) Vybrané klinické a laboratorní parametry zaznamenané v době manifestace nefrotického syndromu by mohly predikovat odpověď na úvodní terapii glukokortikoidy.

Cíle:

Cílem této práce bylo pomocí metod molekulárně genetických (celoexomové a RNA sekvenování), analytických (mikroškalová termoforéza, luciferázová esej), kultivačních (příprava transfekovaných buněčných linií) a metod genového inženýrství (cílená mutagenese, příprava mutantních proteinů) podhalit mechanismy vzniku SRNS u dětí.

- 1) Kombinací Sangerova a celoexomového sekvenování cíleného na všechny známé geny asociované se SRNS zjistit prevalenci jednotlivých monogenních příčin onemocnění u dlouhodobě sbírané kohorty českých a slovenských dětí.
- 2) In vitro připravit v populaci dětí se SRNS nalezené mutované formy transkripčního faktoru WT1, analyzovat jejich vazebnou afinitu k cílové DNA sekvenci za použití mikroškalové termoforézy (MST) a popsat expresi cílových genů.
- 3) Otestovat vztah vybraných klinických a laboratorních parametrů zaznamenaných v době manifestace (otoky, výše proteinurie, hypertenze) k odpovědi na úvodní glukokortikoidní terapii.

3. Materiál a metodika

Kritéria pro zařazení pacientů do studií a popis laboratorních postupů užitých při analýzách jednotlivých složek práce jsou podrobně uvedeny v metodice disertační práce a v jednotlivých publikacích, které jsou podkladem předkládané disertační práce.

3.1 Metodika studie 1 - Molekulárně genetické vyšetření jedinců se SRNS

a) Zařazení pacientů a sběr vzorků DNA

Zařazení dětských pacientů společně se sběrem vzorků DNA probíhalo 18 let mezi roky 2000 – 2017. Celkově bylo do studie zařazeno 74 českých a slovenských dětí (38 chlapců a 36 dívek) ze 70 rodin splňujících kritéria zařazení.

b) Genetická analýza

Sangerova analýza genů *NPHS2* a *WT1* (pouze nejčastěji mutované exony 8 a 9 (Mucha et al., 2006)) byla provedena u všech dětí. U dětí s kongenitálním NS byl navíc sekvenován gen *NPHS1*. Všechny vzorky s negativním výsledkem z první části genetické analýzy byly podrobeny sekvenování nové generace pomocí navrženého panelu 48 genů v té době se známou asociací se SRNS z kitu Haloplex od Agilent Technologies. Na základě obecně přijímaných genetických standardů (ACMG) byly varianty vyhodnoceny jako patogenní, pravděpodobně patogenní, pravděpodobně benigní, benigní nebo varianty nejasného klinického významu (Kleinberger et al., 2016; Richards et al., 2015).

3.2 Metodika studie 2 – Analýza vazebné afinity mutantů WT1 k cílové DNA sekvenci

a) Původ *WT1* variant

Pro tuto studii bylo vybráno 9 pacientů s mutovaným genem *WT1*. Celkem 7/9 *WT1* pacientů bylo součástí kohorty ve „studii 1“ a další dva pacienty jsme detekovali později Sangerovým sekvenováním.

b) Příprava *WT1* proteinů

Varianty *WT1* byly připraveny syntézou DNA plazmidů *WT1* transkripčního faktoru získaného z buněk lidského adenokarcinomu (A549).

c) Exprese proteinů WT1

Expresa byla provedena v bakteriálním kmeni *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 (DE3) CodonPlus RIL. Přítomnost proteinu byla ověřena metodou SDS-PAGE.

d) Izolace a purifikace proteinů WT1

Izolace WT1 proteinů z bakteriálních pelet a separace proteinů byla provedena pomocí rychlé proteinové kapalinové chromatografie (FPLC, purifikační systém ÄKTA pure se softwarem Unicorn) nejprve na základě jejich iontového náboje a poté dle velikosti.

e) Vazebná analýza

MST byla provedena na přístroji Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies) s vlastním softwarem poskytujícím interaktivní protokol (MO.Control, NanoTemper Technologies). Křivky vazebné afinity pro každý mutantní WT1 protein (každý měřen 3x za sebou) byly zkalkulovány pomocí MO.Affinity Analysis softwaru (NanoTemper Technologies).

f) Luciferázová esej

Esej byla provedena na lidských buňkách HEK293 (Sigma-Aldrich) s vloženými vektory nesoucími vybrané *WT1* varianty s nejvyšší a nejnižší vazebnou afinitou dle MST, s vektorem nesoucím gen pro luciferázu s promotorem cílového genu *ACTN1* a s kontrolním reportérovým vektorem (Renilla, Promega). Všechny reakce byly připraveny v triplikátech (wild type WT1, WT1 p.His450Arg, p.Gln447Pro a HEK293 bez vektorů jako negativní kontrola) a šesti nezávislých 12-jamkových deskách. Esej byla provedena dle firemního protokolu Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega). Analýza byla spuštěna na čtečce FLUOstar omega (BMG Labtech).

g) Statistika

Pro výpočet statistických rozdílů výsledků vazebné analýzy a luciferázové eseje byl využit dvouvýběrový oboustranný t-test v softwaru R (Team, 2014).

3.3 Klinické a laboratorní prediktory odpovědi na glukokortikoidní léčbu

Pro tuto analýzu byli vybráni všichni pacienti se SRNS ze studie 1 a 2 s dostupnou informací o míře proteinurie, přítomnosti hypertenze a otoků při manifestaci onemocnění (40 pacientů). Data byla porovnána s daty dětí se SSNS (12 pacientů), které se nově manifestovali po roce 2017.

4. Výsledky

4.1 Studie 1 – Molekulárně genetické vyšetření jedinců se SRNS

4.1.1 Výsledky genetické analýzy

Kombinace Sangerova sekvenování a panelu vybraných genů (sekvenování nové generace) odhalilo kauzální (patogenní nebo pravděpodobně patogenní) varianty u 28/74 (38 %) dětí se SRNS. Sangerovo sekvenování odhalilo 26 % pozitivních pacientů a sekvenování nové generace poté doplnilo množství pozitivních pacientů o dalších 9/74 pacientů (12 %). Nejčastěji mutovanými geny byly *NPHS2* u 11/74 (15 %) pacientů, *WT1* u 7/74 (9,5 %) pacientů, *NUP93* u 4/74 (5,4 %) pacientů, *COQ2* u 2/74 (2,7 %) pacientů a *NPHS1*, *INF2*, *DGKE* a *LMX1B* vždy u 1/74 (1,4 %) pacientů. U variant *NUP93* byla ověřena jejich absence ve 380 zdravých kontrolách, neboť podíl pacientů s kauzálními variantami v tomto genu byl oproti podobným zahraničním studiím relativně vysoký.

4.1.2 Výsledky klinických a laboratorních nálezů

Dle věku manifestace bylo zaznamenáno 11 pacientů s kongenitálním NS, 10 pacientů s infantilním NS a 52 pacientů s NS v dětském věku (1 pacient nezařazen z důvodu chybějící informace o manifestaci NS). Výskyt kauzálních variant byl častější při manifestaci onemocnění do 12 měsíců věku v porovnání s manifestací později během dětství (13/21 vs. 15/52, $p = 0,02$ dle dvou-populačního proporčního testu). Otoky mělo při manifestaci SRNS 26/41 dětí (63 %) a hypertenzi 10/39 dětí (26 %), u ostatních nebyly tyto údaje k dohledání. Nebyl nalezen významný rozdíl v proporcích pacientů s otoky a hypertenzí a ve výši proteinurie při manifestaci onemocnění mezi pacienty s genetickou a negenetickou formou onemocnění. U 56/74 pacientů (76 %) byla provedena biopsie ledvin (10/56 (18 %) MCD, 42/56 (75 %) FSGS, 4/56 (7 %) difúzní mezangiální skleróza). Nefroblastom byl odhalen u tří pacientů (všichni Denys-Drashův syndrom). Extrarenální symptomy byly odhaleny u 23/74 pacientů (31 %): vrozené srdeční vady (2 pacienti), stenóza plicní tepny (2 pacienti), psychomotorická retardace (5 pacientů), hypotyreóza (3 pacienti), porucha růstu (4 pacienti), katarakta (2 pacienti), kryptorchismus (2 pacienti), pontocerebelární hypoplazie (1 pacient), patelární dysplázie, svalové kontraktury, svalová hypotonie a hypermobilita kloubů (1 pacient) či anorektální atrezie (1 pacient). Konečné stádium onemocnění ledvin bylo zaznamenáno u 28/74 pacientů (38 %; 18 z nich s genetickým SRNS). Výrazně častěji dospěli do tohoto stádia jedinci s genetickým SRNS nežli ti s geneticky negativním nálezem (Poměr rizik (HR) = 2,2; Interval spolehlivosti = CI 95% 1,2 – 3,8; $p = 0,0063$).

4.2 Studie 2 - Analýza vazebné afinity mutantů WT1 k cílové DNA sekvenci

4.2.1 Vazba WT1 proteinů k EGR1 DNA sekvenci

Celkem 3/8 WT1 mutantů (p.Arg439Pro, p.His450Arg, p.Arg463Ter) měly nižší vazebnou afinitu a 3/8 mutantů (p.Gln447Pro, p.Asp469Asn, p.His474Arg) měly zvýšenou vazebnou afinitu ($p < 0,01$ pro všechny). U zbylých 2/8 WT1 mutantů (p.Cys433Tyr, p.Arg467Trp) byla afinita podobná jako pro wild type WT1 protein. Fenotyp pacientů nebyl s těmito změnami DNA-vazebné afinity nikterak asociován. Luciferázová esej ukázala, že varianta p.His450Arg s nejnižší vazebnou afinitou i varianta p.Gln447Pro s nejvyšší vazebnou afinitou významně zvyšují expresi cílového proteinu *ACTN1* v porovnání s expresí stimulovanou wild type WT1 proteinem (p.His450Arg vs. wild type WT1, $p = 0,0044$; p.Gln447Pro vs. wild type WT1, $p < 0,001$).

4.2.2 Klinická data pacientů s *WT1* variantami

Onemocnění se u pacientů s *WT1* variantami manifestovalo především v prvním roce života (78 % infantilní NS). Medián manifestace byl 5 měsíců (min: 8 dní, max: 4,2 let). Nejčastějšími symptomy při manifestaci byly otoky obličeje a končetin (56 %), hypertenze (44 %) a hematurie (44 %). Denys-Drashův syndrom byl přítomen u 3/9 pacientů (33 %). Jeden pacient měl kromě SRNS hypospadii a rozštěp skrota. U biamniálních monochorionických dvojčat se vedle SRNS projevila stenóza plicní tepny. Konečné stádium onemocnění ledvin bylo zaznamenáno u všech pacientů s *WT1* variantami s nástupem ve věku od narození do 7,8 let (medián: 8 měsíců). Pouze 3 jedinci, kteří se dožili transplantace, doposud žijí, ostatních 6 zemřelo. Molekulárně genetické vyšetření odhalilo u těchto 9 pacientů 8 různých heterozygotních exonových variant v genu *WT1*. Nebyl nalezen statisticky významný klinický či laboratorní prediktor odlišující jedince s *WT1* SRNS od ostatních genetických případů SRNS (otoky $p = 1,00$; hypertenze $p = 0,55$; proteinurie $p = 0,29$).

4.3 Klinické a laboratorní prediktory odpovědi na glukokortikoidní léčbu

Mezi dětmi s glukokortikoid-rezistentní a glukokortikoid-senzitivní formou nefrotického syndromu nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v proporcí dětí s otoky, hypertenzí ani rozdíl v míře proteinurie (Tabulka 1).

Tab. 1

	SRNS	SSNS	p
Otoky	23/40	11/12	0,07
Hypertenze	11/40	7/12	0,10
Proteinurie (mg/mmol)	2905 ± 5086 (n = 40)	1388 ± 918 (n=12)	0,08

5. Diskuze

Tato práce pomocí kombinace Sangerova přímého sekvenování a NGS panelu zaměřeného na 48 známých kauzálních genů odhalila příčinu onemocnění u 38 % jedinců téměř 20 let sbírané unikátní kohorty českých a slovenských dětí se SRNS (Bezdička et al., 2018). Mezi nejčastěji zastoupenými kauzálními geny byly kromě i v jiných populacích zaznamenaných *NPHS2* (kóduje podocin – stavební kámen mezibuněčných spojů podocytů) a *WT1* (kóduje transkripční faktor WT1 - zásadní regulátor urogenitálního vývoje) také *NUP93*, který kóduje podjednotku transportního póru jaderné membrány (Braun et al., 2016), a naší kohortu tak od předchozích do jisté míry odlišuje. V dalším kroku jsme se zaměřili na odhalení molekulární podstaty asociace mezi nalezenými variantami transkripčního faktoru *WT1* a SRNS. Zjistili jsme, že proteinové produkty jednotlivých variant *WT1* se k cílové DNA sekvenci vážou s různou (vyšší i nižší) afinitou v porovnání s wild type WT1 proteinem. U dvou mutantních forem WT1 s opačným vlivem na DNA-vazebnou afinitu jsme pak pomocí luciferázové eseje v buňkách HEK293 ověřili, že obě významně zvyšovaly expresi cílového genu *ACTN1*. Míra proteinurie, přítomnost otoků ani hypertenze při manifestaci onemocnění se nelišily mezi jedinci se SRNS a SSNS.

5.1 Diskuze ke studii 1

5.1.1 Význam NGS a nejčastěji mutované geny u českých a slovenských dětí se SRNS

Přestože je NGS poměrně finančně nákladná metoda, v naší studii (panel 48 genů) vycházela cena za vyšetření jednoho vzorku (pacienta) na cca 6500,-Kč. Ten samý počet genů by v případě využití Sangerovy metody přišel u jednoho vzorku (pacienta) na cca 81600,-Kč. Kromě toho by vyšetření a analýza jednoho pacienta Sangerovou metodou trvala cca 192 dní, zatímco u NGS to bylo jen cca 21 dní. NGS je tak jednoznačně rychlejší a levnější alternativou. Vzhledem k vyšší chybovosti metody NGS je však stále vhodné významné nálezy NGS ověřovat Sangerovou metodou (Bezdička et al., 2018). Naše kombinace Sangerova a NGS sekvenování tak představuje snahu o časově i finančně optimální vyšetřovací postup.

Nejčastěji mutovanými geny v naší populaci byly *NPHS2* (15 %) a *WT1* (12 %). Mutace těchto dvou genů byly nejčastější také v dalších evropských studiích zaměřených na výzkum genetických příčin SRNS u dětí. Data z národního registru Španělska (Santín et al., 2011), Velké Británie (Bierzynska et al., 2017) či Německa (Büscher et al., 2010) ukázala prevalenci *NPHS2* u 6 – 20 % případů a prevalenci *WT1* u 2 – 12 % jedinců. Naopak gen *NPHS1*, který

byl v těchto studiích většinou třetím nejčastěji mutovaným genem (zastoupen v 7 – 17,5 % případů), byl v naší studii nalezen pouze u jednoho pacienta (1,4 %). V práci ze Saudské Arábie byla genetická příčina SRNS odhalena u 51 % případů (Al-Hamed et al., 2013), tedy významně více než v evropských studiích, ale u všech případů byl potvrzen příbuzenský vztah rodičů. V jiné práci mělo pozitivní výsledek genetického vyšetření SRNS dokonce 62 % pacientů, jednalo se však o mezinárodní studii kongenitálního NS (Heeringa et al., 2008), tedy pouze jedinců, kteří se manifestovali nejpozději do 3 měsíců věku. Z nich 55 % neslo kauzální varianty v genu *NPHS1*. Podobně tomu bylo u studie pacientů s manifestací SRNS do 1 roku života, ve které se genetická příčina potvrdila v 66 % (Hinkes et al., 2007). Je tedy zřejmé, že podíl geneticky potvrzených případů SRNS klesá s rostoucím věkem při manifestaci onemocnění a poměrné (nebo výhradní) zastoupení nejmladších dětí v konkrétní studii může významně ovlivnit nejen procento pozitivních nálezů ale také poměrné zastoupení jednotlivých kauzálních genů. V evropských poměrech zanedbatelným faktorem vysvětlujícím rozdílné procento geneticky podmíněných případů mezi jednotlivými studii je pak konsangvinita.

Významným nálezem naší studie je poměrně vysoký výskyt mutací v genu *NUP93* (třetí nejčastěji mutovaný gen), který byl v jiných evropských studiích raritní příčinou SRNS (5,4 % vs. 0,4 – 0,5 %) (Bierzynska et al., 2017; Braun et al., 2016). Role selektivních transportních pórů jaderné membrány (proteinového produktu *NUP93*) v patogenezi onemocnění byla poprvé popsána u 6 rodin srbského, německého a tureckého původu, kdy bylo pomocí funkční studie prokázáno, že genetickým vyšetřením detekované varianty *NUP93* vedou k abnormální struktuře pórů a způsobují snížení průchodnosti jaderné membrány pro transkripční faktor SMAD4, mediátor signální transdukce TGF- β . SMAD4 podporuje přežívání podocyty za nepříznivých podmínek extracelulárního prostředí (Braun et al., 2016). Snížená koncentrace SMAD4 v jádře tak může usnadnit poškození podocyty (Braun et al., 2016; Meng et al., 2012). V době realizace naší studie byl kromě výše zmíněných 6 rodin popsán již jen jeden další pacient (Bierzynska et al., 2017) s mutovaným *NUP93* v asociaci se SRNS. U všech našich čtyř pacientů byla nalezena patogenní varianta c.1772G>T (p.Gly591Val), a to buď v homozygotním (1/4 případů) nebo ve složeném heterozygotním stavu s další kauzální variantou *NUP93* (3/4 případů). Zajímavostí je, že tato varianta byla v heterozygotní formě nalezena u jednoho dalšího pacienta, u kterého se tím však vzhledem k autozomálně recesivní dědičnosti onemocnění příčina nevysvětlila. Naše nálezy tak podporují hypotézu o efektu zakladatele v Evropě, tedy rozšíření původně raritní genové varianty v populaci (Braun et al., 2016).

5.1.2 Lze klinicky odlišit genetický a negenetický SRNS?

Během prvních pěti let po manifestaci SRNS dospělo do konečného stádia onemocnění ledvin téměř 50 % dětí s genetickou formou ale jen necelých 25 % dětí s negativním genetickým nálezem. Podobně tomu bylo i v britské studii, kde se jednalo zhruba o 60 %, resp. 20 % dětí (Bierzynska et al., 2017), nebo ve studii německé (72 % resp. 29 %) (Büscher et al., 2010). Z těchto výsledků vyplývá, že genetická forma SRNS je spojena s významně vyšším rizikem vzniku selhání ledvin než je tomu u případů SRNS s negativním genetickým nálezem. Jistým klinickým prediktorem, který může předpovědět monogenní formu onemocnění, je věk při manifestaci. V naší studii byl genetický SRNS diagnostikován statisticky významně více u dětí do jednoho roku věku než u dětí starších (62 % vs. 29 % případů, $p = 0,02$). Věková závislost byla popsána i v mezinárodní studii SRNS, kdy nejvyšší záchyt genetických případů byl při manifestaci onemocnění do 3 měsíců věku (69,4 %) a mezi 3 a 12 měsíci života (49,7 %), u později manifestovaných proporce geneticky pozitivních jedinců významně klesla (21 %) (Sadowski et al., 2015). Z dostupných dat se nám nepodařilo nalézt vhodný prediktor, který by odlišil genetickou a negenetickou formu SRNS již při manifestaci onemocnění.

5.1.3 Význam genetického vyšetření SRNS v praxi vycházející ze studie 1

U dvou sourozenců byla identifikována již dříve popsaná homozygotní patogenní varianta c.683A>G (p.Asn228Ser) v genu *COQ2* (McCarthy et al., 2013). Gen *COQ2* kóduje enzym parahydroxybenzoid-polyprenyl-transferázu, která katalyzuje úvodní kroky biosyntézy koenzymu Q10 (Acosta et al., 2016). Mutace *COQ2* se mohou kromě SRNS projevit jako encefalomyelopatie, oční atrofie, selhání jater nebo laktátová acidóza (Acosta et al., 2016). U obou sourozenců byl z bioptického vzorku ledvin histologicky popsán obraz FSGS a u starší sestry došlo k úmrtí z důvodu selhání ledvin ještě před genetickou diagnózou. Mladší sestra zprvu částečně zareagovala na podání léku první volby u SRNS, tj. cyklosporinu A, ale její proteinurie zůstávala stále kolem 500 mg/m²/den (Bezdička et al., 2020). Na základě výsledku genetické analýzy a literárních údajů byl vysazen cyklosporin a zahájena léčba syntetickým koenzymem Q10, po čemž došlo cca do 2 měsíců k remisi onemocnění (Bezdička et al., 2020). V současné době je dívka již přes dva roky v remisi, což dokazuje dlouhodobý příznivý vliv terapie syntetickým koenzymem Q10 u jedinců s mutací *COQ2* a podtrhuje klinický význam vyšetřování genetické příčiny SRNS umožňující indikovat cílenou individualizovanou léčbu.

5.1.4 Závěry studie 1

Studie 1 zkoumající přínos dvoustupňového cíleného molekulárně genetického vyšetření longitudinálně sbírané kohorty českých a slovenských dětí se SRNS ukázala podobný záchyt

kauzálních variant jako v předchozích evropských studiích, tj. cca u 40 % případů. Nejčastěji mutovanými geny byly *NPHS2* kódující podocin a *WT1* kódující transkripční faktor WT1. Třetím nejčastěji mutovaným genem v naší populaci byl gen *NUP93*, jehož produkt reguluje transport biomolekul přes jadernou membránu a je důležitý pro přežívání podocytů za nepříznivých extracelulárních podmínek. Kombinace Sangerova přímého sekvenování a cíleného NGS panelu genů se jeví jako časově i finančně optimální vyšetřovací postup, který pomáhá objasnit genetickou příčinu SRNS u 4/10 nemocných dětí, předurčit jejich prognózu a potencionálně též otevírá možnosti k budoucí individualizované léčbě „šité na míru“ konkrétního pacienta.

5.2 Diskuze ke studii 2

5.2.1 Analýza vazebné afinity mutantů WT1 k cílové DNA sekvenci

Patogenní varianty genu *WT1* byly druhou nejčastější příčinou genetického SRNS u českých a slovenských dětí. Gen *WT1* kóduje transkripční faktor WT1, který je klíčový pro vývoj urogenitálního traktu (Stark et al., 1994; Essafi et al., 2011; Lipska et al., 2014). Přestože je jedním z nejčastějších příčin SRNS, není doposud známa molekulární podstata onemocnění a neexistuje práce, která by se zabývala tím, jak přesně jednotlivé kauzální varianty ovlivňují aktivitu přepisovaného transkripčního faktoru. Vazba transkripčního faktoru WT1 skrze 4 jeho zinkové prsty a hledání cílové DNA sekvence bylo zkoumáno již před lety, kdy byla objevena sekvence EGR1 (GCGGGGGCG) (Stoll et al., 2007; Rauscher et al., 1990). Tato sekvence je pojmenovaná po jiném transkripčním faktoru, který má 3 homologní zinkové prsty s WT1 proteinem a lze ji nalézt v regulačních oblastech mnoha genů, jejichž expresi tak WT1 řídí (Ullmark et al., 2018; Dong et al., 2015; Kann et al., 2015). Pomocí originální funkční studie jsme zjistili, že mutace v oblasti kódující druhý a třetí „zinkový prst“ proteinu WT1, tedy domény umožňující vazbu na DNA, měly oproti našemu očekávání velmi variabilní vliv na vazebnou afinitu k cílové DNA doméně EGR1.

Tři mutantní formy WT1 (p.Arg439Pro, p.His450Arg, p.Arg463Ter) v naší studii vykazovaly snížení vazebné afinity k cílové DNA. Bylo prokázáno, že snížená vazebná afinita WT1 proteinu k cílové DNA vede k redukci faktoru WNT4, který se během vývoje ledvin účastní přeměny mezenchymální tkáně na tkáň epiteliální (Stark et al., 1994; Essafi et al., 2011). Během tohoto procesu dochází ke vzniku ledvinového epitelu a později nefronů z metanefrického mezenchymu a ureterického pupene (Stark et al., 1994). Exprese WT1

v metanefrickém mezenchymu vývojově předchází expresi WNT4 a gen *WNT4* obsahuje specifické vazebné místo pro WT1 (Essafi et al., 2011). Při vyřazení genu *WT1* v myších embryonálních ledvinových mezenchymálních buňkách dochází ke ztrátě exprese WNT4 (Essafi et al., 2011). V jiné studii se u myších embryí s vyřazeným *WT1* nevyvinuly ledviny, gonády a slezina, a plody odumřely v polovině březosti v důsledku selhání koronárního oběhu (Kreidberg et al., 1993). U modelu transgenní dospělé myši se specificky indukovaným vyřazením *WT1* v podocytech skrze doxycyklin se objevila albuminurie, FSGS a rozpad podocytárních buněk spojený se ztrátou nefrinu a podocalyxinu, proteinů glomerulární filtrační membrány (Gebeshuber et al., 2013; Chau et al., 2011). Zmenšené ledviny s poškozením podocytů, porušeným vývojem glomerulární filtrační membrány a s edémem perikardia byly pozorovány u embrya dávného pruhovaného, u kterého byl vyřazen ortolog genu *WT1*. Při současné injekci *WT1* mRNA došlo u těchto embryí k fyziologickému vývoji ledvin, naopak při současné injekci *WT1* mRNA obsahující patogenní variantu bylo postižení podobné jako u embryí s vyřazeným *WT1* ortologem (Hall et al., 2015). Studie dále potvrdila, že linie buněk HEK293 s patogenní exonovou variantou ve *WT1* má sníženou expresi strukturních podocytárních proteinů nefrinu a synaptopodinu (Hall et al., 2015). Všechny tyto studie podporují hypotézu, že naše WT1 mutantní formy se sníženou vazebnou afinitou k DNA mají velmi pravděpodobně negativní vliv na vývoj ledvin a jsou tak příčinou onemocnění.

U tří dalších mutovaných WT1 proteinů (p.Gln447Pro, p.Asp469Asn a p.His474Arg) byla zjištěna zvýšená vazebná afinita k cílové DNA oproti wild type proteinu. Ze studií je známo, že injekce myších myeloblastických leukemických buněk s vloženým genem *WT1* do myši ukázala sníženou onkogenezi oproti leukemickým buňkám bez vloženého *WT1* (Smith et al., 2000). Transkripční faktor WT1 navíc indukoval apoptózu buněk primárního osteosarkomu skrze aktivaci proapoptického genu *Bak* (Loeb, 2006). Na druhou stranu zvýšená exprese WT1 byla pozorována u nefroblastomu, rakoviny prsu či tlustého střeva nebo u akutní myeloidní leukémie (Ullmark et al., 2018; Koesters et al., 2004). Tyto studie ukazují, že WT1 může být tumor supresorem nebo onkogenem podle koncentrace, v jaké se v organismu vyskytuje, nebo podle vlivu okolního prostředí. Za normálních okolností je WT1 stěžejním diferenciačním působkem ledvinových podocytů, zatímco aktivační mutací způsobená zvýšená transkripční aktivita může naopak vyvolat podocytární poškození. Bohužel neexistuje jediná studie, která by zkoumala vliv zvýšené exprese WT1 na vývoj ledvin a podpořila tak tuto hypotézu.

Luciferázová esej ukázala, že mutovaná forma WT1 s nejnižší (p.His450Arg) i nejvyšší (p.Gln447Pro) vazebnou afinitou obě zvyšují genovou expresi *ACTN1* v porovnání s wild type WT1 proteinem. Genová transkripce v eukaryotických organismech je zprostředkována komplexním RNA polymerázovým mechanismem, který je řízen kombinatorem navázáním vícero (stimulačních i inhibičních) transkripčních faktorů, přičemž se navíc uplatňují i jejich konformační změny (Reményi et al., 2004; He et al., 2014). Snížení ani zvýšení vazebné afinity mutantního proteinu WT1 tak nemusí jednoznačně predikovat konkrétní změnu v expresi jednotlivých cílových genů. Vazebná analýza je tak sice zajímavým poznatkem z oblasti bazálního výzkumu, efekt variant *WT1* na změnu buněčné funkce bude však nutné testovat pokročilejšími masivními paralelními metodami jako je např. analýza transkriptomu pomocí sekvenace RNA.

Dva poslední studované mutované proteiny WT1 (p.Cys433Tyr and p.Arg467Trp) nevykazovaly žádnou signifikantní změnu vazebné afinity oproti wild type proteinu. Obě tyto varianty byly již dříve popsány v asociaci se syndromickým (Denys-Drashův syndrom) i izolovaným SRNS (Pelletier et al., 1991; Clarkson et al., 1993). Existují dvě hlavní izoformy proteinu WT1. První z nich je izoforma „KTS minus“, která je transkripčním faktorem testovaným v této práci (Ullmark et al., 2018). Druhá izoforma „KTS plus“ obsahuje inserci lyzinu (K), threoninu (T) a serinu (S) mezi třetím a čtvrtým zinkovým prstem proteinu WT1. Tato inserce způsobuje flexibilnější konformaci zinkových prstů, kdy čtvrtý zinkový prst se hůře váže k cílové DNA a tím je také snížena vazebná afinita oproti „KTS minus“ izoformě (Ullmark et al., 2018). Předpokládá se, že WT1 „KTS plus“ interaguje s RNA vazebnými proteiny a ovlivňuje sestřih mRNA nebo její stabilitu (Ullmark et al., 2018; Bharathavikru et al., 2017). Vzhledem k tomu, že jsme testovali pouze WT1 „KTS minus“ protein, nemůžeme vyloučit, že stejné mutace WT1 v „KTS plus“ izoformě nepůsobí epigenetickým či jiným mechanismem, který jsme našimi analýzami nemohli zachytit. Dalším možným vysvětlením může být interakce transkripčního faktoru WT1 s kofaktory (např. p53, STAT3, BASP1), které modulují jeho aktivitu (Ullmark et al., 2018; Toska and Roberts, 2014). Pokud by výše uvedené *WT1* varianty ovlivňovaly vazebné místo pro kofaktory (a nikoliv vazebné místo pro DNA), mohlo by dojít ke změně transkripční aktivity bez odezvy v afinitě k cílové DNA. Přestože je SRNS považován za monogenní onemocnění, mohou existovat varianty nebo polymorfismy WT1 kofaktorů, které regulují transkripční aktivitu WT1 proteinu, obdobně jako tomu je u polygenních onemocnění, například u atypického hemolyticko - uremického syndromu (Štolbová et al., 2020).

5.2.2 Lze odlišit SRNS způsobený mutacemi *WT1* od ostatních monogenních forem?

Izolovaná forma SRNS u pacientů s mutovaným *WT1* byla v naší studii zjištěna pouze u 3/9 pacientů (33 %) a jednalo se výhradně o dívky. Podobně tomu bylo i v doposud nejrozsáhlejší studii jedinců se SRNS způsobeným patogenními variantami *WT1* genu (17/61 případů, tedy 28 %, se prezentovalo jako izolovaný SRNS a jednalo se pouze o dívky) (Lipska et al., 2014). Častěji mají jedinci se SRNS způsobeným mutacemi ve *WT1* další přidružené projevy, např. nefroblastom, tumor varlat či vaječnicků a poruchy pohlavního vývoje. Jedná se o Denys-Drashův syndrom (Roca et al., 2019). Úplná absence funkčního WT1 byla sledována u několika typů nefroblastomů, v nichž vzájemně docházelo buď ke zvýšení nebo snížení aktivity faktorů podílejících se na raném vzniku ledvin (např. IGF2, Wnt signalizace). Patogenní varianty genu *WT1* způsobující nefunkčnost transkripčního faktoru by tedy pravděpodobně mohly být jednou ze specifických příčin vzniku tohoto typu tumorů u pacientů se SRNS. Proti této hypotéze však hovoří existence více než 40 genů, jejichž defekty mohou být dle literatury asociovány se vznikem nefroblastomů či gonadálních tumorů (Treger et al., 2019). Změny funkce proteinu WT1 nebo jeho ztráta tedy nelze považovat za jediný specifický mechanismus vedoucí ke vzniku těchto tumorů. Pokud se ale zaměříme na geny asociované se SRNS, tak urogenitální tumory nebyly identifikovány u žádných jiných monogenních příčin SRNS a jsou výhradně asociovány s variantami v genu *WT1* (Bierzynska et al., 2017). Transkripční faktor WT1 reguluje vývojové faktory DAX1 a SF1 uplatňující se při vzniku varlat a vaječnicků (Kim et al., 1999; Wilhelm and Englert, 2002). Významná role WT1 byla experimentálně potvrzena u transgenních myších embryí s homozygotní patogenní variantou v genu *WT1*, u nichž byla pozorována porucha gonadálního vývoje (Kreidberg et al., 1993). Snížená transkripční aktivita WT1 tedy může vést k poruchám vývoje varlat i vaječnicků skrze regulaci faktorů DAX1 a SF1. Naše výsledky a výše uvedené práce potvrzují, že patogenní varianty *WT1* genu jsou kromě SRNS často asociovány i s dalšími zdravotními projevy a podtrhují důležitou roli WT1 ve vývoji urogenitální soustavy.

Zbývá tři pacienti měli kromě SRNS ještě postižení dalších tkání (mimo ledviny), konkrétně dva pacienti měli stenózu plicní tepny a zbývající jedinec měl rozštěp skrota s hypospadií. Stenóza plicnice je u pacientů s *WT1* nefropatií unikátním nálezem. Během vývoje srdce dochází k vycestování buněk epikardu do myokardu a k jejich přeměně na kardiovaskulární progenitorové buňky, které jsou schopny se diferencovat v buňky hladkého svalstva koronární stěny, endoteliální buňky, perivaskulární a srdeční intersticiální fibroblasty nebo kardiomyocyty (Martínez-Estrada et al., 2010; Thiery et al., 2009). Snail faktor, který

aktivuje proces přeměny epiteliální tkáň v tkáň mezenchymální, je regulován transkripčním faktorem WT1 (Martínez-Estrada et al., 2010). Množství snail faktoru je v epikardiálních buňkách s vyřazeným *WT1* sníženo (Martínez-Estrada et al., 2010). Další studie ukázala, že WT1 společně s korepresorem BASP1 brání spuštění opačného procesu (přeměna mezenchymální tkáň ve tkáň epiteliální – proces typický pro vývoj ledvin) inhibicí aktivátoru WNT4 v epikardiálních buňkách (Essafi et al., 2011; Costantini and Kopan, 2010). Na základě těchto studií se dá říci, že patogenní varianty ve *WT1* mohou v určité fázi embryonálního vývoje způsobit vrozené srdeční vady kvůli sníženému počtu kardiovaskulárních progenitorových buněk. Třetí pacient, u kterého byla diagnostikována hypospadie a rozštěp skrota, zemřel 2 týdny po manifestaci onemocnění ve věku pouhých 3 týdnů. Lze spekulovat, zda se nejednalo o další případ Denys-Drashova syndromu, neboť nefroblastom (důležitý znak tohoto syndromu) se může vyvinout i měsíce po manifestaci SRNS (Roca et al., 2019). Při porovnání SRNS asociovaného s mutacemi ve *WT1* s ostatními monogenními příčinami SRNS jsme nenašli statisticky významný rozdíl v míře proteinurie, výskytu otoků či hypertenze v době manifestace onemocnění. Hypertenze se naproti tomu vyskytovala častěji u pacientů s patogenními variantami *WT1* genu v porovnání s ostatními pacienty se SRNS způsobeným jinými geny ve studii autorů Lipska et al. (39 % vs. 15,5 %, $p < 0,001$) (Lipska et al., 2014). Náš odlišný výsledek může být důsledkem značně menší skupiny pacientů s *WT1* variantami a omezením na studium variant v exonech 8 a 9 (Lipska et al. vyšetřovali všechny exony a introny *WT1*).

5.2.3 Závěry studie 2

Funkční studie ukázala, že patogenní varianty v exonech 8 a 9 transkripčního faktoru WT1 mají variabilní vliv na vazebnou afinitu k cílové DNA doméně EGR1. Zároveň jsme zjistili, že zvýšená i snížená vazebná afinita vede ke zvýšené expresi cílového genu *ACTN1*, tedy že směr změny nemusí přímo korelovat se změnou exprese cílových genů. Vazebná analýza je tak sice zajímavým poznatkem z oblasti bazálního výzkumu, efekt variant *WT1* na změnu buněčné funkce bude však nutné testovat pokročilejšími masivními paralelními metodami jako je např. analýza transkriptomu pomocí sekvenace RNA. Pacienti s *WT1* variantami se dle naší studie neliší v základních klinických znacích oproti jiným monogenním příčinám SRNS, avšak častěji je u nich SRNS asociován s dalšími ledvinnými i neledvinnými projevy. Kombinace výsledků experimentální, klinické části a poznatků z literatury značí, že WT1 má komplexní vliv na urogenitální vývoj a pro pochopení mechanismu patogeneze vzniku onemocnění je třeba pokračovat ve výzkumu, který by pomohl odhalit signální dráhy ovlivněné mutantními formami WT1 proteinu.

5.3 Lze odlišit SRNS a SSNS pomocí příznaků při manifestaci onemocnění?

Původním cílem bylo analyzovat rozdíly v transkriptomu podocytů kultivovaných se séry nově manifestovaných pacientů se SRNS a SSNS, ale z důvodu neočekávaně malého počtu vzorků dětí se SRNS nebylo možné tento projekt včas dokončit. Proto jsme se rozhodli otestovat vybraná dostupná klinická data sesbíraná z naší historické kohorty pacientů. Míra proteinurie, přítomnost otoků ani výskyt hypertenze se mezi pacienty se SRNS a SSNS nelišil. Výskyt hypertenze se mezi pacienty se SRNS a SSNS statisticky významně nelišil ani v americké studii porovnávající klinické rozdíly těchto dvou skupin (1/7 SSNS x 6/9 SRNS, $p = 0,06$) (Shatat et al., 2007). Z dalších studií vyplývá, že nejsilnějším rizikovým faktorem pro výskyt hypertenze u jedinců s nefrotickým syndromem je pozitivní rodinná anamnéza (73 – 88 % SSNS pacientů s historií hypertenze v rodině) (Keshri et al., 2018; Kontchou et al., 2009). Hypertenzi tak nelze pokládat za specifický znak nefrotického syndromu a nemá smysl ho zvažovat jako prediktivní faktor terapeutické odpovědi na glukokortikoidy. Problematika výskytu otoků a míry nefrotické proteinurie u pacientů se SRNS a SSNS a případné rozdíly mezi nimi nejsou v literatuře diskutovány. Limitací naší studie je nedostupnost porovnávaných znaků u části pacientů, především kvůli nejednotnému sběru dat a absenci záznamů u nejstarších pacientů. První zařazení pacienti mají často neúplná a již nedohledatelná klinická či laboratorní data, což snižuje význam statistických analýz.

6. Závěr

Kombinací klasického sekvenování a následně cíleného NGS panelu genů jsme objasnili genetickou příčinu u 4/10 českých a slovenských dětí se SRNS, jejichž vzorky byly sbírány po dobu 18 let. Zvolený dvoukrokový vyšetřovací postup je časově i finančně efektivnější než použití pouze jedné z metod. Podíl geneticky potvrzených případů SRNS klesá s rostoucím věkem při manifestaci onemocnění a poměrné (nebo výhradní) zastoupení nejmladších dětí v konkrétní studii může významně ovlivnit nejen procento pozitivních nálezů ale také poměrné zastoupení jednotlivých kauzálních genů. Překvapivým výsledkem byl nález v jiných evropských studiích raritní *NUP93*, který byl třetím nejčastěji mutovaným genem a ukazuje na možnost efektu zakladatele. Genetické vyšetření pomáhá mimo jiné předurčit prognózu onemocnění a zatím výjimečně lze na jeho základě indikovat cílenou léčbu. Z dostupných dat se nám nepodařilo nalézt vhodný prediktor, který by odlišil genetickou a negenetickou formu SRNS již při manifestaci onemocnění.

V naší originální funkční studii jsme pozorovali významné změny v afinitě mutantních forem *WT1* k cílové DNA. Vazebná afinita však nekorelovala se změnou exprese v cílovém genu. Vazebná analýza je tedy zajímavým poznatkem z oblasti bazálního výzkumu, efekt variant *WT1* na změnu buněčné funkce bude však nutné testovat komplexněji (v porovnání se zjišťováním exprese jednoho či několika vybraných cílových genů), např. pokročilejšími masivními paralelními metodami jako je analýza transkriptomu pomocí sekvenace RNA. Naše výsledky nás tak směřují k novému cíli, kterým je objasnění patogeneze SRNS u pacientů s *WT1* variantami pomocí zkoumání jejich vlivu na změny exprese celých funkčních signálních drah. U pacientů s *WT1* variantami sice nebyl odhalen rozdílný klinický nebo laboratorní ukazatel oproti jiným genetickým příčinám SRNS, avšak přidružené urogenitální a extrarenální projevy tyto pacienty odlišuje a dělá z nich velmi zajímavé kandidáty navazujícího výzkumu.

Nepodařilo se nám nalézt klinický či laboratorní ukazatel, který by již při manifestaci onemocnění předpověděl odpověď na terapii glukokortikoidy. Odhalení takového ukazatele by pomohlo volit efektivnější léčbu v podobě imunosupresiv „druhé volby“ a naopak ušetřit významnou část pacientů závažných nežádoucích účinků terapie glukokortikoidy. Cíli dalšího výzkumu jsou odhalení molekulární podstaty onemocnění, které by otevřelo dveře k cílené individualizované léčbě šité pacientovi na míru. Jen tak lze dosáhnout zlepšení prognózy a kvality života těchto dětí.

7. Souhrn

Molekulárně genetické vyšetření jedinců se SRNS nám pomohlo odhalit prevalenci genetického SRNS u českých a slovenských dětí. Z výsledků vyplývá, že prvním krokem genetické analýzy příčin SRNS u českých a slovenských dětí by mělo být klasické sekvenování nejčastěji mutovaných genů *NPHS2*, *WT1* a *NUP93*. Druhým krokem je pak NGS cílený na všechny ostatní geny asociované se SRNS. Analýza vyžaduje expertní tým se zkušenostmi v genetice SRNS. Bohužel u 6/10 pacientů zůstává příčina SRNS neznámá. Kromě věku nelze z běžných klinických a laboratorních parametrů zatím určit, kdo bude mít genetický nálezný a tedy horší prognózu onemocnění.

Analýza vazebné afinity mutovaných forem *WT1* k cílové DNA doméně *EGR1* ukázala, že změny neasociují se změnou exprese cílového genu. Masivní paralelní sekvenační a další metody budou třeba k in vitro analýze funkčních změn podocytů s indukovanými genovými variantami nalezenými u jedinců se SRNS. Pacienti se SRNS způsobeným patogenními variantami *WT1* genu mají kromě SRNS často i další zdravotní projevy a dokazují tak význam *WT1* pro vývoj vícero orgánových systémů.

V současné době není k dispozici ukazatel, který by u dětí s NS předpověděl odpověď na terapii glukokortikoidy a ušetřil by tak významnou část z nich nežádoucích účinků této léčby. Pro zlepšení péče, prognózy a kvality života dětí s NS je třeba další výzkum cílit právě na odhalení časných prediktorů rezistence ke glukokortikoidům a na objasnění molekulární podstaty onemocnění. To může pootevřít dveře k vývoji nové specifické léčby šité pacientovi na míru.

8. Summary

Molecular genetic analysis of patients with SRNS revealed the prevalence of genetic SRNS in Czech and Slovak children. Our results showed that the standard genetic examination of monogenic SRNS should start with the Sanger sequencing of the most causative genes *NPHS2*, *WT1* and *NUP93*. The second step shall be NGS targeted to all known genes associated with SRNS. Despite this effort, unfortunately, 6/10 patients remain unelucidated. Besides the known association between age and decreasing probability to identify monogenic cause of SRNS, there is probably no single clinical or laboratory parameter that could predict whether the patient will have positive genetic testing.

The change in binding affinity of mutated WT1 proteins to the target EGR1 DNA domain doesn't necessarily predict the change in selected target gene expression. Other methods such as massive parallel RNA sequencing may be needed to elucidate the effect of WT1 mutants on the function of the podocytes. Patients with SRNS caused by pathogenic variants of *WT1* often suffer from other renal and extrarenal health issues, which proves the significance of WT1 in the development of multiple organs.

There is currently no validated measure or parameter that could predict the response to standard initial few-weeks-long glucocorticoid treatment in children with nephrotic syndrome and prevent them from serious adverse effects of the treatment. It is necessary to continue to search for a predictor of glucocorticoid treatment resistance and to reveal the molecular mechanism of the disease to improve patient care, prognosis and their quality of life. If successful, it may potentially open up for a new strategies allowing for disease-specific individualised treatment.

9. Seznam literatury

- Acosta, M. J., L. Vazquez Fonseca, M. A. Desbats, C. Cerqua, R. Zordan, E. Trevisson, and L. Salviati. 2016. 'Coenzyme Q biosynthesis in health and disease', *Biochim Biophys Acta*, 1857: 1079-85. doi:10.1016/j.bbabc.2016.03.036
- Al-Hamed, M. H., E. Al-Sabban, H. Al-Mojalli, N. Al-Harbi, E. Faqeih, H. Al Shaya, K. Alhasan, S. Al-Hissi, M. Rajab, N. Edwards, A. Al-Abbad, I. Al-Hassoun, J. A. Sayer, and B. F. Meyer. 2013. 'A molecular genetic analysis of childhood nephrotic syndrome in a cohort of Saudi Arabian families', *J Hum Genet*, 58: 480-9. doi:10.1038/jhg.2013.27
- Barbaux, S., P. Niaudet, M. C. Gubler, J. P. Grünfeld, F. Jaubert, F. Kuttann, C. N. Fékété, N. Souleyreau-Therville, E. Thibaud, M. Fellous, and K. McElreavey. 1997. 'Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome', *Nat Genet*, 17: 467-70. doi:10.1038/ng1297-467
- Bérody, S., L. Heidet, O. Gribouval, J. Harambat, P. Niaudet, V. Baudouin, J. Bacchetta, B. Boudaille, M. Dehennault, L. de Parscau, O. Dunand, H. Flodrops, M. Fila, A. Garnier, F. Louillet, M. A. Macher, A. May, E. Merieau, F. Monceaux, C. Pietrement, C. Rousset-Rouvière, G. Roussey, S. Taque, J. Tenenbaum, T. Ulinski, R. Vieux, A. Zaloszc, V. Morinière, R. Salomon, and O. Boyer. 2019. 'Treatment and outcome of congenital nephrotic syndrome', *Nephrol Dial Transplant*, 34: 458-67. doi:10.1093/ndt/gfy015
- Bezdička, M., M. Dluholucký, O. Cinek, and J. Zieg. 2020. 'Successful maintenance of partial remission in a child with COQ2 nephropathy by coenzyme Q10 treatment', *Nephrology (Carlton)*, 25: 187-88. doi:10.1111/nep.13600
- Bezdička, M., Š Štolbová, T. Seeman, O. Cinek, M. Malina, N. Šimánková, Š Průhová, and J. Zieg. 2018. 'Genetic diagnosis of steroid-resistant nephrotic syndrome in a longitudinal collection of Czech and Slovak patients: a high proportion of causative variants in NUP93', *Pediatr Nephrol*, 33: 1347-63. doi:10.1007/s00467-018-3950-2
- Bharathavikru, R., T. Dudnakova, S. Aitken, J. Slight, M. Artibani, P. Hohenstein, D. Tollervey, and N. Hastie. 2017. 'Transcription factor Wilms' tumor 1 regulates developmental RNAs through 3' UTR interaction', *Genes Dev*, 31: 347-52. doi:10.1101/gad.291500.116
- Bierzynska, A., H. J. McCarthy, K. Soderquest, E. S. Sen, E. Colby, W. Y. Ding, M. M. Nabhan, L. Kerecuk, S. Hegde, D. Hughes, S. Marks, S. Feather, C. Jones, N. J. Webb, M. Ognjanovic, M. Christian, R. D. Gilbert, M. D. Sinha, G. M. Lord, M. Simpson, A. B. Koziell, G. I. Welsh, and M. A. Saleem. 2017. 'Genomic and clinical profiling of a national nephrotic syndrome cohort advocates a precision medicine approach to disease management', *Kidney Int*, 91: 937-47. doi:10.1016/j.kint.2016.10.013
- Bierzynska, A., and M. A. Saleem. 2018. 'Deriving and understanding the risk of post-transplant recurrence of nephrotic syndrome in the light of current molecular and genetic advances', *Pediatr Nephrol*, 33: 2027-35. doi:10.1007/s00467-017-3793-2
- Boute, N., O. Gribouval, S. Roselli, F. Benessy, H. Lee, A. Fuchshuber, K. Dahan, M. C. Gubler, P. Niaudet, and C. Antignac. 2000. 'NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome', *Nat Genet*, 24: 349-54. doi:10.1038/74166
- Braun, D. A., C. E. Sadowski, S. Kohl, S. Lovric, S. A. Astrinidis, W. L. Pabst, H. Y. Gee, S. Ashraf, J. A. Lawson, S. Shril, M. Airik, W. Tan, D. Schapiro, J. Rao, W. I. Choi, T. Hermle, M. J. Kemper, M. Pohl, F. Ozaltin, M. Konrad, R. Bogdanovic, R. Büscher, U. Helmchen, E. Serdaroglu, R. P. Lifton, W. Antonin, and F. Hildebrandt. 2016. 'Mutations in nuclear pore genes NUP93, NUP205 and XPO5 cause steroid-resistant nephrotic syndrome', *Nat Genet*, 48: 457-65. doi:10.1038/ng.3512
- Büscher, A. K., B. Kranz, R. Büscher, F. Hildebrandt, B. Dworniczak, P. Pennekamp, E. Kuwertz-Bröking, A. M. Wingen, U. John, M. Kemper, L. Monnens, P. F. Hoyer, S. Weber, and M. Konrad. 2010. 'Immunosuppression and renal outcome in congenital and pediatric steroid-resistant nephrotic syndrome', *Clin J Am Soc Nephrol*, 5: 2075-84. doi:10.2215/cjn.01190210
- Carter, T. C., and M. M. He. 2016. 'Challenges of Identifying Clinically Actionable Genetic Variants for Precision Medicine', *J Healthc Eng*, 2016. doi:10.1155/2016/3617572
- Clarkson, P. A., H. R. Davies, D. M. Williams, R. Chaudhary, I. A. Hughes, and M. N. Patterson. 1993. 'Mutational screening of the Wilms's tumour gene, WT1, in males with genital abnormalities', *J Med Genet*, 30: 767-72. doi:10.1136/jmg.30.9.767
- Colucci, M., G. Corpetti, F. Emma, and M. Vivarelli. 2018. 'Immunology of idiopathic nephrotic syndrome', *Pediatr Nephrol*, 33: 573-84. doi:10.1007/s00467-017-3677-5
- Costantini, F., and R. Kopan. 2010. 'Patterning a complex organ: branching morphogenesis and nephron segmentation in kidney development', *Dev Cell*, 18: 698-712. doi:10.1016/j.devcel.2010.04.008
- D'Agati, V. D., F. J. Kaskel, and R. J. Falk. 2011. 'Focal segmental glomerulosclerosis', *N Engl J Med*, 365: 2398-411. doi:10.1056/NEJMra1106556

- Dogra, S., and F. Kaskel. 2017. 'Steroid-resistant nephrotic syndrome: a persistent challenge for pediatric nephrology', *Pediatr Nephrol*, 32: 965-74. doi:10.1007/s00467-016-3459-5
- Dong, L., S. Pietsch, Z. Tan, B. Perner, R. Sierig, D. Kruspe, M. Groth, R. Witzgall, H. J. Gröne, M. Platzer, and C. Englert. 2015. 'Integration of Cistromic and Transcriptomic Analyses Identifies Nphs2, Mafk, and Magi2 as Wilms' Tumor 1 Target Genes in Podocyte Differentiation and Maintenance', *J Am Soc Nephrol*, 26: 2118-28. doi:10.1681/asn.2014080819
- Dossier, C., N. Lapidus, F. Bayer, A. L. Sellier-Leclerc, O. Boyer, L. de Pontual, A. May, S. Nathanson, C. Orzechowski, T. Simon, F. Carrat, and G. Deschênes. 2016. 'Epidemiology of idiopathic nephrotic syndrome in children: endemic or epidemic?', *Pediatr Nephrol*, 31: 2299-308. doi:10.1007/s00467-016-3509-z
- Downie, M. L., C. Gallibois, R. S. Parekh, and D. G. Noone. 2017. 'Nephrotic syndrome in infants and children: pathophysiology and management', *Paediatr Int Child Health*, 37: 248-58. doi:10.1080/20469047.2017.1374003
- Essafi, A., A. Webb, R. L. Berry, J. Slight, S. F. Burn, L. Spraggon, V. Velecela, O. M. Martinez-Estrada, J. H. Wiltshire, S. G. Roberts, D. Brownstein, J. A. Davies, N. D. Hastie, and P. Hohenstein. 2011. 'A wt1-controlled chromatin switching mechanism underpins tissue-specific wnt4 activation and repression', *Dev Cell*, 21: 559-74. doi:10.1016/j.devcel.2011.07.014
- Fine, R. N. 2007. 'Recurrence of nephrotic syndrome/focal segmental glomerulosclerosis following renal transplantation in children', *Pediatr Nephrol*, 22: 496-502. doi:10.1007/s00467-006-0361-6
- Fornoni, A., J. Sageshima, C. Wei, S. Merscher-Gomez, R. Aguillon-Prada, A. N. Jauregui, J. Li, A. Mattiazzi, G. Ciancio, L. Chen, G. Zilleruelo, C. Abitbol, J. Chandar, W. Seeherunvong, C. Ricordi, M. Ikehata, M. P. Rastaldi, J. Reiser, and G. W. Burke, 3rd. 2011. 'Rituximab targets podocytes in recurrent focal segmental glomerulosclerosis', *Sci Transl Med*, 3: 85ra46. doi:10.1126/scitranslmed.3002231
- Gebeshuber, C. A., C. Kornauth, L. Dong, R. Sierig, J. Seibler, M. Reiss, S. Tauber, M. Bilban, S. Wang, R. Kain, G. A. Böhmig, M. J. Moeller, H. J. Gröne, C. Englert, J. Martinez, and D. Kerjaschki. 2013. 'Focal segmental glomerulosclerosis is induced by microRNA-193a and its downregulation of WT1', *Nat Med*, 19: 481-7. doi:10.1038/nm.3142
- Geier, Pavel. 2001. 'Nefrotický syndrom', *Pediatrics for Practice*, 2: 120-23
- Hahn, D., E. M. Hodson, N. S. Willis, and J. C. Craig. 2015. 'Corticosteroid therapy for nephrotic syndrome in children', *Cochrane Database Syst Rev*, 2015: Cd001533. doi:10.1002/14651858.CD001533.pub5
- Hall, G., R. A. Gbadegesin, P. Lavin, G. Wu, Y. Liu, E. C. Oh, L. Wang, R. F. Spurney, J. Eckel, T. Lindsey, A. Homstad, A. F. Malone, P. J. Phelan, A. Shaw, D. N. Howell, P. J. Conlon, N. Katsanis, and M. P. Winn. 2015. 'A novel missense mutation of Wilms' Tumor 1 causes autosomal dominant FSGS', *J Am Soc Nephrol*, 26: 831-43. doi:10.1681/asn.2013101053
- He, B., L. Ebarasi, Z. Zhao, J. Guo, J. R. Ojala, K. Hultenby, S. De Val, C. Betsholtz, and K. Tryggvason. 2014. 'Lmx1b and FoxC combinatorially regulate podocin expression in podocytes', *J Am Soc Nephrol*, 25: 2764-77. doi:10.1681/asn.2012080823
- Heeringa, S. F., C. N. Vlangos, G. Chernin, B. Hinkes, R. Gbadegesin, J. Liu, B. E. Hoskins, F. Ozaltin, and F. Hildebrandt. 2008. 'Thirteen novel NPHS1 mutations in a large cohort of children with congenital nephrotic syndrome', *Nephrol Dial Transplant*, 23: 3527-33. doi:10.1093/ndt/gfn271
- Hinkes, B. G., B. Mucha, C. N. Vlangos, R. Gbadegesin, J. Liu, K. Hasselbacher, D. Hangan, F. Ozaltin, M. Zenker, and F. Hildebrandt. 2007. 'Nephrotic syndrome in the first year of life: two thirds of cases are caused by mutations in 4 genes (NPHS1, NPHS2, WT1, and LAMB2)', *Pediatrics*, 119: e907-19. doi:10.1542/peds.2006-2164
- Huber, T. B., M. Kottgen, B. Schilling, G. Walz, and T. Benzing. 2001. 'Interaction with podocin facilitates nephrin signaling', *J Biol Chem*, 276: 41543-6. doi:10.1074/jbc.C100452200
- Chau, Y. Y., D. Brownstein, H. Mjoseng, W. C. Lee, N. Buza-Vidas, C. Nerlov, S. E. Jacobsen, P. Perry, R. Berry, A. Thornburn, D. Sexton, N. Morton, P. Hohenstein, E. Freyer, K. Samuel, R. van't Hof, and N. Hastie. 2011. 'Acute multiple organ failure in adult mice deleted for the developmental regulator Wt1', *PLoS Genet*, 7: e1002404. doi:10.1371/journal.pgen.1002404
- Illumina. 2017. 'An introduction to Next-Generation Sequencing Technology', *Illumina, Inc.*
- Jerabek-Willemsen, M., C. J. Wienken, D. Braun, P. Baaske, and S. Duhr. 2011. 'Molecular interaction studies using microscale thermophoresis', *Assay Drug Dev Technol*, 9: 342-53. doi:10.1089/adt.2011.0380
- Jerabek-Willemsen, Moran, Timon André, Randy Wanner, Heide Marie Roth, Stefan Duhr, Philipp Baaske, and Dennis Breitsprecher. 2014. 'MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond', *Journal of Molecular Structure*, 1077: 101-13. doi:https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.03.009
- Kann, M., S. Ettou, Y. L. Jung, M. O. Lenz, M. E. Taglienti, P. J. Park, B. Schermer, T. Benzing, and J. A. Kreidberg. 2015. 'Genome-Wide Analysis of Wilms' Tumor 1-Controlled Gene Expression in Podocytes Reveals Key Regulatory Mechanisms', *J Am Soc Nephrol*, 26: 2097-104. doi:10.1681/asn.2014090940

- KDIGO., Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. 2012. 'Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease.', *Kidney inter.*, Suppl. 2013; 3: 1–150.
- Keshri, S., S. Sharma, N. Agrawal, S. Bansal, B. P. Guillian, and K. C. Aggrawal. 2018. 'Hypertension and its severity in children with steroid sensitive nephrotic syndrome during remission', *Clin Exp Nephrol*, 22: 1157-62. doi:10.1007/s10157-018-1565-3
- Kestilä, M., U. Lenkkeri, M. Männikkö, J. Lamerdin, P. McCreedy, H. Putaala, V. Ruotsalainen, T. Morita, M. Nissinen, R. Herva, C. E. Kashtan, L. Peltonen, C. Holmberg, A. Olsen, and K. Tryggvason. 1998. 'Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome', *Mol Cell*, 1: 575-82. doi:10.1016/s1097-2765(00)80057-x
- Kim, J., D. Prawitt, N. Bardeesy, E. Torban, C. Vicaner, P. Goodyer, B. Zabel, and J. Pelletier. 1999. 'The Wilms' tumor suppressor gene (wt1) product regulates Dax-1 gene expression during gonadal differentiation', *Mol Cell Biol*, 19: 2289-99. doi:10.1128/mcb.19.3.2289
- Klamt, B., A. Koziell, F. Poulat, P. Wieacker, P. Scambler, P. Berta, and M. Gessler. 1998. 'Frasier syndrome is caused by defective alternative splicing of WT1 leading to an altered ratio of WT1 +/-KTS splice isoforms', *Hum Mol Genet*, 7: 709-14. doi:10.1093/hmg/7.4.709
- Kleinberger, J., K. A. Maloney, T. I. Pollin, and L. J. Jeng. 2016. 'An openly available online tool for implementing the ACMG/AMP standards and guidelines for the interpretation of sequence variants', *Genet Med*, 18: 1165. doi:10.1038/gim.2016.13
- Kodner, C. 2009. 'Nephrotic syndrome in adults: diagnosis and management', *Am Fam Physician*, 80: 1129-34
- Koesters, R., M. Linnebacher, J. F. Coy, A. Germann, Y. Schwitalle, P. Findeisen, and M. von Knebel Doeberitz. 2004. 'WT1 is a tumor-associated antigen in colon cancer that can be recognized by in vitro stimulated cytotoxic T cells', *Int J Cancer*, 109: 385-92. doi:10.1002/ijc.11721
- Kolísko, M. 2017. 'Moderní metody sekvenování DNA', *Nakladatelství Academia, SŠČ AV ČR*
- Kontchou, L. M., G. Liccioli, and I. Pela. 2009. 'Blood pressure in children with minimal change nephrotic syndrome during oedema and after steroid therapy: the influence of familial essential hypertension', *Kidney Blood Press Res*, 32: 258-62. doi:10.1159/000238823
- Koziell, A., V. Grech, S. Hussain, G. Lee, U. Lenkkeri, K. Tryggvason, and P. Scambler. 2002. 'Genotype/phenotype correlations of NPHS1 and NPHS2 mutations in nephrotic syndrome advocate a functional inter-relationship in glomerular filtration', *Hum Mol Genet*, 11: 379-88. doi:10.1093/hmg/11.4.379
- Kreidberg, J. A., H. Sariola, J. M. Loring, M. Maeda, J. Pelletier, D. Housman, and R. Jaenisch. 1993. 'WT-1 is required for early kidney development', *Cell*, 74: 679-91. doi:10.1016/0092-8674(93)90515-r
- Lipska, B. S., B. Ranchin, P. Iatropoulos, J. Gellermann, A. Melk, F. Ozaltin, G. Caridi, T. Seeman, K. Tory, A. Jankauskiene, A. Zurowska, M. Szczepanska, A. Wasilewska, J. Harambat, A. Trautmann, A. Peco-Antic, H. Borzecka, A. Moczulska, B. Saeed, R. Bogdanovic, M. Kalyoncu, E. Simkova, O. Erdogan, K. Vrljicak, A. Teixeira, M. Azocar, and F. Schaefer. 2014. 'Genotype-phenotype associations in WT1 glomerulopathy', *Kidney Int*, 85: 1169-78. doi:10.1038/ki.2013.519
- Loeb, D. M. 2006. 'WT1 influences apoptosis through transcriptional regulation of Bcl-2 family members', *Cell Cycle*, 5: 1249-53. doi:10.4161/cc.5.12.2807
- Lombel, R. M., D. S. Gipson, and E. M. Hodson. 2013. 'Treatment of steroid-sensitive nephrotic syndrome: new guidelines from KDIGO', *Pediatr Nephrol*, 28: 415-26. doi:10.1007/s00467-012-2310-x
- Lombel, R. M., E. M. Hodson, and D. S. Gipson. 2013. 'Treatment of steroid-resistant nephrotic syndrome in children: new guidelines from KDIGO', *Pediatr Nephrol*, 28: 409-14. doi:10.1007/s00467-012-2304-8
- Martínez-Estrada, O. M., L. A. Lettice, A. Essafi, J. A. Guadix, J. Slight, V. Velecela, E. Hall, J. Reichmann, P. S. Devenney, P. Hohenstein, N. Hosen, R. E. Hill, R. Muñoz-Chapuli, and N. D. Hastie. 2010. 'Wt1 is required for cardiovascular progenitor cell formation through transcriptional control of Snail and E-cadherin', *Nat Genet*, 42: 89-93. doi:10.1038/ng.494
- McCarthy, H. J., A. Bierzynska, M. Wherlock, M. Ognjanovic, L. Kerecuk, S. Hegde, S. Feather, R. D. Gilbert, L. Krischock, C. Jones, M. D. Sinha, N. J. Webb, M. Christian, M. M. Williams, S. Marks, A. Koziell, G. I. Welsh, and M. A. Saleem. 2013. 'Simultaneous sequencing of 24 genes associated with steroid-resistant nephrotic syndrome', *Clin J Am Soc Nephrol*, 8: 637-48. doi:10.2215/cjn.07200712
- McKinney, P. A., R. G. Feltbower, J. T. Brocklebank, and M. M. Fitzpatrick. 2001. 'Time trends and ethnic patterns of childhood nephrotic syndrome in Yorkshire, UK', *Pediatr Nephrol*, 16: 1040-4. doi:10.1007/s004670100021
- Meng, X. M., X. R. Huang, J. Xiao, A. C. Chung, W. Qin, H. Y. Chen, and H. Y. Lan. 2012. 'Disruption of Smad4 impairs TGF-β/Smad3 and Smad7 transcriptional regulation during renal inflammation and fibrosis in vivo and in vitro', *Kidney Int*, 81: 266-79. doi:10.1038/ki.2011.327
- Mishra, O. P., B. Basu, S. K. Upadhyay, R. Prasad, and F. Schaefer. 2010. 'Behavioural abnormalities in children with nephrotic syndrome', *Nephrol Dial Transplant*, 25: 2537-41. doi:10.1093/ndt/gfq097

- Mueller, R. F. 1994. 'The Denys-Drash syndrome', *J Med Genet*, 31: 471-7. doi:10.1136/jmg.31.6.471
- Mucha, B., F. Ozaltin, B. G. Hinkes, K. Hasselbacher, R. G. Ruf, M. Schultheiss, D. Hangan, B. E. Hoskins, A. S. Everding, R. Bogdanovic, T. Seeman, B. Hoppe, and F. Hildebrandt. 2006. 'Mutations in the Wilms' tumor 1 gene cause isolated steroid resistant nephrotic syndrome and occur in exons 8 and 9', *Pediatr Res*, 59: 325-31. doi:10.1203/01.pdr.0000196717.94518.f0
- Narla, D., and A. Swiatecka-Urban. 2020. 'Therapeutic Response to Corticosteroids Remains a Valid Approach to Initial Management of Children With Idiopathic Nephrotic Syndrome', *Front Pediatr*, 8: 533. doi:10.3389/fped.2020.00533
- Pelletier, J., W. Bruening, C. E. Kashtan, S. M. Mauer, J. C. Manivel, J. E. Striegel, D. C. Houghton, C. Junien, R. Habib, L. Fouser, and et al. 1991. 'Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome', *Cell*, 67: 437-47. doi:10.1016/0092-8674(91)90194-4
- Rauscher, F. J., 3rd, J. F. Morris, O. E. Tournay, D. M. Cook, and T. Curran. 1990. 'Binding of the Wilms' tumor locus zinc finger protein to the EGR-1 consensus sequence', *Science*, 250: 1259-62. doi:10.1126/science.2244209
- Ravani, P., A. Bonanni, R. Rossi, G. Caridi, and G. M. Ghiggeri. 2016. 'Anti-CD20 Antibodies for Idiopathic Nephrotic Syndrome in Children', *Clin J Am Soc Nephrol*, 11: 710-20. doi:10.2215/cjn.08500815
- Reményi, A., H. R. Schöler, and M. Wilmanns. 2004. 'Combinatorial control of gene expression', *Nat Struct Mol Biol*, 11: 812-5. doi:10.1038/nsmb820
- Richards, S., N. Aziz, S. Bale, D. Bick, S. Das, J. Gastier-Foster, W. W. Grody, M. Hegde, E. Lyon, E. Spector, K. Voelkerding, and H. L. Rehm. 2015. 'Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology', *Genet Med*, 17: 405-24. doi:10.1038/gim.2015.30
- Roca, N., M. Muñoz, A. Cruz, R. Vilalta, E. Lara, and G. Ariceta. 2019. 'Long-term outcome in a case series of Denys-Drash syndrome', *Clin Kidney J*, 12: 836-39. doi:10.1093/ckj/sfz022
- Sadowski, C. E., S. Lovric, S. Ashraf, W. L. Pabst, H. Y. Gee, S. Kohl, S. Engelmann, V. Vega-Warner, H. Fang, J. Halbritter, M. J. Somers, W. Tan, S. Shril, I. Fessi, R. P. Lifton, D. Bockenhauer, S. El-Desoky, J. A. Kari, M. Zenker, M. J. Kemper, D. Mueller, H. M. Fathy, N. A. Soliman, and F. Hildebrandt. 2015. 'A single-gene cause in 29.5% of cases of steroid-resistant nephrotic syndrome', *J Am Soc Nephrol*, 26: 1279-89. doi:10.1681/asn.2014050489
- Safarini, O. A., and J. Patel. 2020. 'Calcineurin Inhibitors.' in *StatPearls* (StatPearls Publishing Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL))
- Santín, S., G. Bullich, B. Tazón-Vega, R. García-Maset, I. Giménez, I. Silva, P. Ruíz, J. Ballarín, R. Torra, and E. Ars. 2011. 'Clinical utility of genetic testing in children and adults with steroid-resistant nephrotic syndrome', *Clin J Am Soc Nephrol*, 6: 1139-48. doi:10.2215/cjn.05260610
- Shatat, I. F., M. Schoeneman, J. T. Flynn, and R. P. Woroniecki. 2007. 'Association of steroid and cyclosporin resistance in focal segmental glomerulosclerosis', *Pediatr Nephrol*, 22: 834-9. doi:10.1007/s00467-006-0413-y
- Schwarz, K., M. Simons, J. Reiser, M. A. Saleem, C. Faul, W. Kriz, A. S. Shaw, L. B. Holzman, and P. Mundel. 2001. 'Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin', *J Clin Invest*, 108: 1621-9. doi:10.1172/jci12849
- Siji, A., K. N. Karthik, V. C. Pardeshi, P. S. Hari, and A. Vasudevan. 2018. 'Targeted gene panel for genetic testing of south Indian children with steroid resistant nephrotic syndrome', *BMC Med Genet*, 19: 200. doi:10.1186/s12881-018-0714-6
- Skálová, Sylva, and Jakub Zieg. 2017. 'Diagnostika a léčba nefrotického syndromu u dětí', *Urology for Practice*, 18: 105-08
- Smith, S. I., M. Down, A. W. Boyd, and C. L. Li. 2000. 'Expression of the Wilms' tumor suppressor gene, WT1, reduces the tumorigenicity of the leukemic cell line M1 in C.B-17 scid/scid mice', *Cancer Res*, 60: 808-14
- Stańczyk, M., I. Bałasz-Chmielewska, B. Lipska-Ziętkiewicz, and M. Tkaczyk. 2018. 'CoQ10-related sustained remission of proteinuria in a child with COQ6 glomerulopathy-a case report', *Pediatr Nephrol*, 33: 2383-87. doi:10.1007/s00467-018-4083-3
- Staples, A., R. LeBlond, S. Watkins, C. Wong, and J. Brandt. 2010. 'Validation of the revised Schwartz estimating equation in a predominantly non-CKD population', *Pediatr Nephrol*, 25: 2321-6. doi:10.1007/s00467-010-1598-7
- Stark, K., S. Vainio, G. Vassileva, and A. P. McMahon. 1994. 'Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4', *Nature*, 372: 679-83. doi:10.1038/372679a0
- Stoll, R., B. M. Lee, E. W. Debler, J. H. Laity, I. A. Wilson, H. J. Dyson, and P. E. Wright. 2007. 'Structure of the Wilms tumor suppressor protein zinc finger domain bound to DNA', *J Mol Biol*, 372: 1227-45. doi:10.1016/j.jmb.2007.07.017

- Štolbová, Š., M. Bezdíčka, Z. Prohászka, D. Csuka, I. Hrachovinová, J. Burkert, N. Šimánková, Š. Průhová, and J. Zieg. 2020. 'Molecular basis and outcomes of atypical haemolytic uraemic syndrome in Czech children', *Eur J Pediatr*, 179: 1739-50. doi:10.1007/s00431-020-03666-9
- Tan, W., S. Lovric, S. Ashraf, J. Rao, D. Schapiro, M. Airik, S. Shril, H. Y. Gee, M. Baum, G. Daouk, M. A. Ferguson, N. Rodig, M. J. G. Somers, D. R. Stein, A. Vivante, J. K. Warejko, E. Widmeier, and F. Hildebrandt. 2018. 'Analysis of 24 genes reveals a monogenic cause in 11.1% of cases with steroid-resistant nephrotic syndrome at a single center', *Pediatr Nephrol*, 33: 305-14. doi:10.1007/s00467-017-3801-6
- Team, R Core. 2014. 'R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>
- Thiery, J. P., H. Acloque, R. Y. Huang, and M. A. Nieto. 2009. 'Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease', *Cell*, 139: 871-90. doi:10.1016/j.cell.2009.11.007
- Torban, E., F. Braun, N. Wanner, T. Takano, P. R. Goodyer, R. Lennon, P. Ronco, A. V. Cybulsky, and T. B. Huber. 2019. 'From podocyte biology to novel cures for glomerular disease', *Kidney Int*, 96: 850-61. doi:10.1016/j.kint.2019.05.015
- Toska, E., and S. G. Roberts. 2014. 'Mechanisms of transcriptional regulation by WT1 (Wilms' tumour 1)', *Biochem J*, 461: 15-32. doi:10.1042/bj20131587
- Trautmann, A., M. Bodria, F. Ozaltin, A. Gheisari, A. Melk, M. Azocar, A. Anarat, S. Caliskan, F. Emma, J. Gellermann, J. Oh, E. Baskin, J. Ksiazek, G. Remuzzi, O. Erdogan, S. Akman, J. Dusek, T. Davitaia, O. Özkaya, F. Papachristou, A. Firszt-Adamczyk, T. Urasinski, S. Testa, R. T. Krmar, L. Hyla-Klekot, A. Pasini, Z. B. Özcahar, P. Sallay, N. Cakar, M. Galanti, J. Terzic, B. Aoun, A. Caldas Afonso, H. Szymanik-Grzelak, B. S. Lipska, S. Schnaidt, and F. Schaefer. 2015. 'Spectrum of steroid-resistant and congenital nephrotic syndrome in children: the PodoNet registry cohort', *Clin J Am Soc Nephrol*, 10: 592-600. doi:10.2215/cjn.06260614
- Treger, T. D., T. Chowdhury, K. Pritchard-Jones, and S. Behjati. 2019. 'The genetic changes of Wilms tumour', *Nat Rev Nephrol*, 15: 240-51. doi:10.1038/s41581-019-0112-0
- Tullus, K., H. Webb, and A. Bagga. 2018. 'Management of steroid-resistant nephrotic syndrome in children and adolescents', *Lancet Child Adolesc Health*, 2: 880-90. doi:10.1016/s2352-4642(18)30283-9
- Ullmark, T., G. Montano, and U. Gullberg. 2018. 'DNA and RNA binding by the Wilms' tumour gene 1 (WT1) protein +KTS and -KTS isoforms-From initial observations to recent global genomic analyses', *Eur J Haematol*, 100: 229-40. doi:10.1111/ejh.13010
- Varner, J. D., A. Matory, and R. A. Gbadegesin. 2018. 'Genetic Basis of Health Disparity in Childhood Nephrotic Syndrome', *Am J Kidney Dis*, 72: S22-s25. doi:10.1053/j.ajkd.2018.06.022
- Vivarelli, M., L. Massella, B. Ruggiero, and F. Emma. 2017. 'Minimal Change Disease', *Clin J Am Soc Nephrol*, 12: 332-45. doi:10.2215/cjn.05000516
- Wang, Y., X. Dang, Q. He, Y. Zhen, X. He, Z. Yi, and K. Zhu. 2017. 'Mutation spectrum of genes associated with steroid-resistant nephrotic syndrome in Chinese children', *Gene*, 625: 15-20. doi:10.1016/j.gene.2017.04.050
- Wilhelm, D., and C. Englert. 2002. 'The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sfl', *Genes Dev*, 16: 1839-51. doi:10.1101/gad.220102

10. Přehled publikační činnosti autora

Původní vědecké práce in extenso, které jsou podkladem disertace (s impakt faktorem):

Bezdička, M., Štolbová, Š., Seeman, T., Cinek, O., Malina, M., Šimánková, N., Průhová, Š., Zieg, J. Genetic diagnosis of steroid-resistant nephrotic syndrome in a longitudinal collection of Czech and Slovak patients: a high proportion of causative variants in *NUP93*. *Pediatric Nephrology*, 2018. 33(8): p. 1347-1363. *IF (2020): 3,714*

Bezdička, M., Dluholucký, M., Cinek, O., Zieg, J. Successful maintenance of partial remission in a child with *COQ2* nephropathy by coenzyme Q10 treatment. *Nephrology (Carlton)*, 2020. 25(2): p. 187-188. *IF (2020): 2,506*

Bezdička, M., Kaufman, F., Křížová, I., Dostálková, A., Rumlová, M., Seeman, T., Vondrák, K., Fencl, F., Zieg, J., Souček, O. Alteration in DNA-binding affinity of Wilms tumor 1 protein due to *WT1* genetic variants associated with steroid - resistant nephrotic syndrome in children. *Scientific reports*, 2022. 12(1), 8704. *IF (2020): 4,380*

Původní vědecké práce s impakt faktorem, které nejsou podkladem disertační práce:

Štolbová, Š., **Bezdička, M.**, Seeman, T., Prohászka, Z., Csuka, D., Hrachovinová, I., Burkert, J., Šimánková, N., Průhová, Š., Zieg, J. Molecular basis and outcomes of atypical haemolytic uraemic syndrome in Czech children. *Eur Journal of Pediatrics*. 2020. 179(11): p. 1739-1750. Epub 2020 May 18. Erratum in: *Eur J Pediatr*. 2022 Apr;181(4):1781. *IF (2020): 3,183*

Bezdička, M., Pavlíček, P., Bláhová, K., Háček, J., Zieg, J. Various phenotypes of disease associated with mutated *DGKE* gene. *European Journal of Medical Genetics*. 2020. 63(8): 103953. *IF (2020): 2,708*

Bezdička, M., Langer, J., Háček, J., Zieg, J. Dent Disease Type 2 as a Cause of Focal Segmental Glomerulosclerosis in a 6-Year-Old Boy: A Case Report. *Frontiers in pediatrics*, 2020. 8: 583230. *IF (2020): 3.418*

Bezdička, M., Kleiblová, P., Souček, J., Borecká, M., El-Lababidi, E., Smrž, D., Rataj, M., Šumník, Z., Malíková, J., Souček, O. Novel presentation of the c.1856A > G (p.Asp619Gly) *TSHR* gene-activating variant: relapsing hyperthyroidism in three subsequent generations manifesting in early childhood and an in vitro functional study. *Hormones (Athens, Greece)*, 2021. 20(4): p. 803–812. *IF (2020): 2.885*

Bezdička, M., Zemková, D., Skálová, S., Hovorková, E., Podhola, M., Burkert, J., & Zieg, J. Tubuloglomerular Disease With Cone-Shaped Epiphyses Associated With Hypomorphic Variant and a Novel p.Cys14Arg in the *TTC21B* Gene: A Case Report. *Frontiers in pediatrics*, 2021. 9: 752878. *IF (2020): 3.418*

Přednášky a plakátová sdělení na odborných setkáních:

10/2021 ES-PCR – mezinárodní kongres v Mariboru

Název přednášky: In vitro characterization of the DNA-binding affinity of the WT1 transcription factor mutants found in children with steroid-resistant nephrotic syndrome

- 10/2021 42. pracovní dny dětské nefrologie v Jindřichově Hradci
 Název přednášky: Afinity mutantů transkripčního faktoru WT1 k cílové DNA: Na cestě k poodhalení příčiny steroid-rezistentního nefrotického syndromu způsobeného patogenními variantami *WT1* genu
- 09/2021 ESPN Amsterdam 2021 (mezinárodní kongres)
 Online přednáška
 Název přednášky: In vitro characterization of the DNA-binding affinity of the WT1 transcription factor mutants found in children with steroid-resistant nephrotic syndrome
- 10/2020 Vědecká konference 2. LF UK
 Název přednášky: Funkční ověření aktivační mutace v *TSHR* genu u rodiny s familiární neautoimunitní hypertyreózou ve třech generacích
- 09/2020 41. pracovní dny dětské nefrologie v Luhačovicích
 Název přednášky: Úspěšná terapie koenzymem Q10 u dítěte s COQ2 nefropatií
- 06/2020 „Malé“ dny dětské nefrologie 2020
 Název přednášky: Klinický přínos genetického vyšetření u pacientů s nefropatiemi
- 06/2018 ES-PCR – mezinárodní kongres v Bratislavě
 Název přednášky: The change in the therapeutic approach based on genetic analysis in children with steroid-resistant nephrotic syndrome
- 05/2018 39. pracovní dny dětské nefrologie v Kroměříži
 Cena za nejlepší abstrakt konference
 Název přednášky: Změna léčebného přístupu na základě genetické analýzy u dětí se steroid-rezistentním nefrotickým syndromem
- 04/2018 Vědecká konference 2. LF UK
 Název přednášky: Změna léčebného přístupu na základě genetické analýzy u dětí se steroid-rezistentním nefrotickým syndromem
- 02/2018 GPN Hannover 2018 (mezinárodní kongres)
 Název: Genetic findings in atypical haemolytic-uraemic syndrome in Czech paediatric patients
- 06/2017 38. pracovní dny dětské nefrologie v Českém Krumlově
 Název: Genetické příčiny atypického HUS u českých pacientů

