

Ověření použitelnosti poměru expresí genů *NPHS2* a *SYNPO* při diagnostice fokální segmentální glomerulosklerózy a minimálních změn glomerulů

Šafaříková M.^{1,2}, Pazourková E.², Hořínek A.¹, Reiterová J.^{1,2}, Maixnerová D.², Honsová E.³, Zdražil J.⁴, Štekrová J.¹, Kohoutová M.¹, Tesař V.²

¹Ústav biologie a lékařské genetiky, 1. lékařská fakulta UK v Praze a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze

²Klinika Nefrologie, 1. lékařská fakulta UK v Praze a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze

³Institut klinické a experimentální medicíny v Praze

⁴III. Interní klinika, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice v Olomouci

SOUHRN

Cíl: Cílem této studie bylo ověřit použitelnost poměru expresí genů *NPHS2* a *SYNPO* při diagnostice fokální segmentální glomerulosklerózy (FSGS) a minimálních změn glomerulů (MCD) u českých pacientů a zároveň identifikovat nové markery, které by mohly vést k jednoznačnému rozlišení mezi oběma diagnózami.

Typ studie: Pilotní studie

Materiál a metody: Do studie bylo zařazeno 24 vzorků od pacientů s FSGS a MCD. Expresie genů byla stanovena metodou relativní kvantitativní real-time PCR provedené na kartách TaqMan® Array Micro Fluidic Cards s následnou normalizací dat k referenčnímu genu *GAPDH*.

Výsledky a závěry: Nebyly prokázány žádné statisticky významné rozdíly v expresi studovaných genů mezi pacienty s FSGS a MCD. Zároveň se nepodařilo potvrdit použitelnost poměru expresí genů *NPHS2* a *SYNPO* pro rozlišení FSGS a MCD u českých pacientů.

Klíčová slova: FSGS, MCD, genové exprese, kvantitativní real-time PCR.

SUMMARY

Šafaříková M., Pazourková E., Hořínek A., Reiterová J., Maixnerová D., Honsová E., Zdražil J., Štekrová J., Kohoutová M., Tesař V.: The verification of the applicability of *NPHS2*/*SYNPO* ratio for diagnosis of FSGS and MCD

Objective: The aim of this study was the verification of the applicability of *NPHS2*/*SYNPO* ratio for diagnosis of focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) and minimal change disease (MCD) in Czech patients and identification of new markers for distinguishing between MCD and FSGS.

Material and methods: Our study was performed on 24 samples from patients with FSGS and MCD. Gene expressions were determined using relative quantitative real-time PCR and TaqMan® Array Micro Fluidic Cards and normalized to the reference gene *GAPDH*.

Results and conclusion: Our results did not find any significant difference in the podocin/synaptopodin ratio and in any other studied genes between FSGS and MCD.

Keywords: FSGS, MCD, gene expressions, quantitative real-time PCR.

Úvod

Fokální segmentální glomeruloskleróza (FSGS) a minimální změny glomerulů (MCD) patří mezi časté příčiny nefrotického syndromu, který je charakterizován nefrotickou proteinurií, hypoproteinémií, hyperlipidémií a otoky [1]. MCD se podílí na vývoji nefrotického syndromu převážně u dětí a mladistvých. U dospělých má nejvyšší podíl výskytu FSGS, zatímco prevalence MCD výrazně klesá [2]. FSGS velmi špatně odpovídá na léčbu kortikosteroidy a často vede k renálnímu selhání. Prognóza u MCD je lepší a tito pacienti zpravidla dobře reagují na léčbu [3]. Etiologie FSGS a MCD je obvykle neznámá. Nicméně obě onemocnění jsou dávana do souvislosti např. s virovými infekcemi, léky a drogami [2,4]. U FSGS existují i familiární formy, které vznikají v důsledku mutací v genech kódujících podocytní proteiny, např. *ACTN4*, *INF2* a *NPHS2* [5]. Podocyty

jsou vysoce specializované renální buňky, které spolu s fenestrovaným endotelem kapilár a glomerulární bazální membránou tvoří filtrační bariéru. Svými dlouhými výběžky, tzv. pedicely, pokrývají celý povrch kapilár. Prostor mezi nimi vyplňuje nejdůležitější složka filtrační bariéry, tenká proteinová membrána zvaná slit diaphragm. Mezi hlavní funkce podocytů patří syntéza složek glomerulární bazální membrány a regulace filtrace v ledvinách [6].

Patogeneze FSGS a MCD je stejná. Dochází k poškození podocytů s následným splynutím jejich výběžků, které zapříčiňuje zvýšenou propustnost renální filtrační bariéry. U pacientů s MCD se histologický nálezn ve světle mikroskopu jeví normálně a patologické procesy je možné prokázat pouze pomocí elektronové mikroskopie. U FSGS jsou tyto změny patrné již při rutinním histologickém vyšetření. V raných fázích FSGS nalzáme splynutí pedicel převážně v juxtamedulárních glomerulech.

S progresí onemocnění se poškození následně rozšiřuje i do ostatních glomerulů. V případě, že je pro histologické vyšetření pacienta v rané fázi FSGS k dispozici pouze malý vzorek biopsie, který neobsahuje juxtamedulární glomeruly, může dojít k chybné diagnóze [7,8].

Vzhledem k tomu, že potřeba správné diagnózy je klíčová k predikci progresu onemocnění a volbě vhodné léčby, jsou hledány vhodné markery pro jednoznačné rozlišení FSGS a MCD. Jedním z těchto markerů se zdá být poměr expresí genů *NPHS2* a *SYNPO* [9].

Cílem této studie bylo ověřit použitelnost poměru expresí genů *NPHS2* a *SYNPO* při diagnostice FSGS a MCD u českých pacientů (Tabulka 1) a zároveň iden-

tifikovat nové markery, které by mohly vést k jednoznačnému rozlišení mezi oběma diagnózami. V rámci studie byla zkoumána exprese 28 vytipovaných genů (Tabulka 2), které jsou spojovány s různými nefropatiemi nebo imunitním systémem člověka.

Materiál a metody

Do studie bylo zařazeno 24 pacientů s histologicky potvrzenou diagnózou primární FSGS nebo MCD. Základní charakteristika souboru pacientů je uvedena v Tabulce 1. Vzorky renálních biopsií pocházely ze Všeobecné fakultní nemocnice v Praze, Fakultní nemocnice v Hradci Králové, Fakultní nemocnice u Svaté Anny v Brně a Fakultní nemocnice v Olomouci. Všichni pacienti podepsali před renální biopsií informovaný souhlas s molekulárně-genetickým vyšetřením.

Větší část renální biopsie byla použita pro rutinní histologické vyšetření. Tkáň určená pro analýzu genových expresí byla ihned po odběru vložena do stabilizač-

Table 1. The characteristics of analyzed diagnostic groups.

Diagnosis	N	Age at the time of biopsy (years±SD)	Gender (f/m)
MCD	7	44.7 ± 17.4	3/4
FSGS	17	46.1 ± 10.3	10/7

N=number of samples

Table 2. The alphabetical order of studied genes with results of the statistical analysis. All values were rounded.

Gene	P value (FSGS vs MCD)	Expressions in FSGS patients			Expressions in MCD patients		
		Med.	Min.	Max.	Med.	Min.	Max.
ACE	0.45	37.73	2.42	518.82	40.05	26.15	239.94
AGTR1	0.85	1.78	0.05	9.63	2.36	0.87	4.88
AGTR2	0.11	0.75	0	6.10	2.31	0.31	2.24
APOL1	0.90	27.36	10.85	111.19	34.70	10.48	390.12
CCL5	0.95	9.43	1.86	20.00	10.27	1.14	183.39
CCR3	0.95	0.64	0.04	10.18	0.43	0.12	8.88
CCR5	0.75	5.07	1.18	23.37	3.70	0.75	28.07
CD2AP	0.31	367.80	161.99	1629.02	455.65	274.14	813.94
CD80	0.95	0.24	0.08	0.84	0.33	0.07	1.73
CXCR3	1.00	0.50	0.09	1.64	0.30	0.10	1.86
IFNG	0.25	0.17	0	0.53	0.03	0	0.96
IL10	0.70	0.27	0.04	1.11	0.46	0.10	3.08
IL12A	0.35	0.41	0.22	1.85	0.33	0.14	2.41
IL18	0.43	9.60	0.88	22.32	12.54	0.28	23.10
IL2RA	0.95	0.78	0.21	6.38	1.42	0.23	15.55
INF2	0.75	0.07	0.02	0.20	0.08	0.02	0.37
KIRREL2	0.37	1.07	0.13	3.60	1.14	0.36	10.81
MMP14	1.00	49.14	12.24	269.99	40.27	10.54	500
NPHS1	0.25	53.47	0.52	647.97	77.86	19.38	587.64
NPHS2	0.23	28.66	0	163.39	53.73	6.97	249.77
PLA2R1	0.31	32.60	4.89	274.35	35.95	14.28	40.34
PLCE1	0.31	12.31	3.59	63.60	14.05	3.30	105.77
PODXL	0.41	239.48	16.40	2138.20	290.78	106.95	2283.11
SYNPO	0.23	30.27	5.87	274.92	45.09	10.45	341.04
TGFB1	1.00	14.00	5.16	47.15	17.06	5.92	167.01
TNFSF12	0.44	1.38	0.66	6.51	1.25	0.64	29.26
TRPC6	0.51	1.38	0.57	4.20	0.89	0.54	10.11
VEGFA	0.41	173.50	29.02	1521.49	197.92	120.57	1783.86

Med.= median, Min.= minimum, Max.= maximum

ního pufru RNA later (Ambion) a do izolace RNA byla uchovávána při teplotě -20°C . Pro izolaci celkové RNA byl použit GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich). Koncentrace získané RNA byla změřena nanofotometrem (Implen) na základě optické hustoty OD260/280. Pro následnou syntézu cDNA byl použit SuperScript® VIL0™ Synthesis Kit (Invitrogen). Produkt byl uskladněn při -20°C . Expresie genů byla stanovena metodou relativní kvantitativní real-time PCR v celkovém objemu 100 μl (přístroj ABI Prism® 7900HT Sequence Detection System, Applied Biosystems) provedené na kartách TaqMan® Array Micro Fluidic Cards (Applied Biosystems). Získaná data byla analyzována v programu ExpressionSuite Software v1.0.3 (Life Technologies, Inc.) a normalizována k referenčnímu genu *GAPDH*. Porovnání expresí genů bylo provedeno vzhledem k negaussovskému rozdělení hodnot neparametrickým Mann-Whitneyho testem s Bonferroniho korekcí a hladinou významnosti $p < 0,05$. Pro všechny statistické výpočty byl použit statistický program STATISTICA 10 (StatSoft CR s.r.o.).

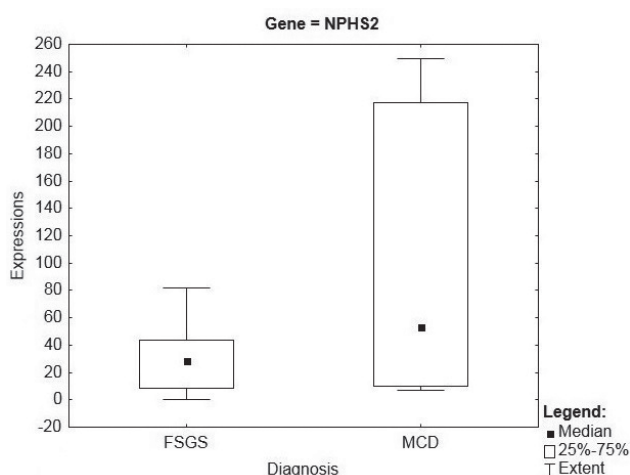


Fig. 1. The variable gene expressions of the *NPHS2* gene in FSGS and MCD patients. Relative gene expressions were calculated using normalization against the reference gene (*GAPDH*).

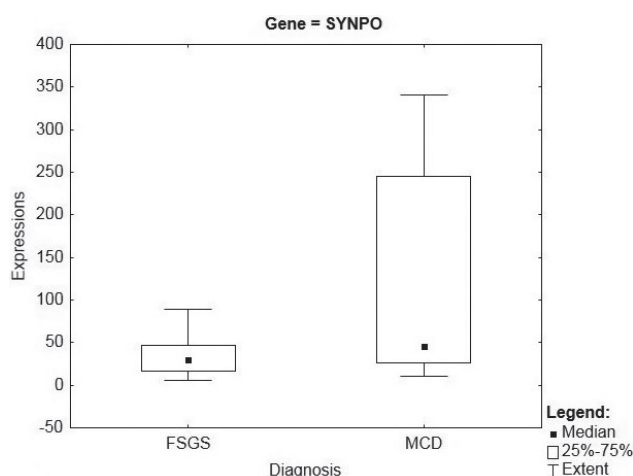


Fig. 2. The variable gene expressions of the *SYNPO* gene in FSGS and MCD patients. Relative gene expressions were calculated using normalization against the reference gene (*GAPDH*).

Výsledky a diskuse

Naše výsledky neprokázaly žádné statisticky významné rozdíly v expresi studovaných genů mezi pacienty s FSGS a MCD, což se dá vysvětlit vysokou variabilitou naměřených hodnot v obou skupinách pacientů. Detailně v Tabulce 2. Zároveň se nám nepodařilo potvrdit použitelnost poměru expresí genů *NPHS2* a *SYNPO* pro rozlišení FSGS a MCD [9]. Poměr expresí těchto genů vykazoval v našich vzorcích opět vysokou variabilitu. Podrobně zobrazeno na Obr. 1 a 2.

FSGS, zvláště její primární forma, může být velmi heterogenní nejen v etiologii, ale i v histologickém nálezu, pro jehož klasifikaci se standardně používá Kolumbijský systém [4]. Do naší skupiny pacientů s primární FSGS byly zařazeny vzorky s různými histologickými nálezy v rámci Kolumbijské klasifikace, což pravděpodobně způsobilo variabilitu jejich expresí. Pro další analýzy bude nutné získat více vzorků a roztřídit je do jednotlivých kategorií podle Kolumbijské klasifikace. Názory na klasifikaci MCD jsou rozdílné, a to ovlivňuje variabilitu klinického i histologického obrazu těchto pacientů. První přístup popisuje MCD jako samostatné onemocnění. Podle druhého přístupu jsou minimální změny glomerulů mírnější variantou FSGS [2]. Pacienti s MCD zařazení do studie neměli identické histologické nálezy, což pravděpodobně vedlo k variabilitě expresí analyzovaných genů. Na druhou stranu, všichni pacienti zařazení do studie byli kavkazského původu, takže je možné vyloučit variabilitu pocházející z etnického původu.

Bennett a kol. analyzovali exprese u vzorků od pacientů s FSGS a kontrol, které pocházely ze zdravé části ledvin po nefrektomii pacientů s Wilmsovým tumorem. Jejich výsledky prokázaly zvýšenou i sníženou expresi u mnohých genů, např. *NPHS2* a *VEGFA*. Naše studie se sice zabývala rozdíly mezi FSGS a MCD, avšak žádný z výše jmenovaných genů nevykazoval abnormální hladinu exprese při srovnání mezi oběma skupinami pacientů. Dle našeho názoru má studie Bennetta a kol. dva zásadní nedostatky. Za prvé, studie zahrnovala pouze čtyři dospělé pacienty s FSGS a tři kontrolní vzorky, které pocházely od dětí. Za druhé, srovnání nádorové tkáně s pacienty s FSGS mohlo vést ke zkreslení výsledků [10].

Velký přínos problematice rozlišení FSGS a MCD přinesli Hodgin a kol. Jejich studie zahrnovala geny účastníci se mnohých buněčných procesů, např. vývoje a diferenciaci, migrace, adheze a organizace cytoskeletu. Zároveň použili vzorky pacientů s FSGS, jejichž histologické nálezy byly řádně roztržiděné do skupin podle Kolumbijské klasifikace. Hodgin a kol. prokázali, že při srovnání pacientů s FSGS oproti pacientům s MCD a kontrolám se mnoho genů exprimuje rozdílně, např. *NPHS2*, *PODXL*, *PLCE1*, *NPHS1*, *SYNPO*, *PLA2R1*, a *INF2*. Naše analýzy nepotvrdily rozdílné hladiny exprese v genech, které byly zahrnuty v obou studiích. To mohlo být zapříčiněno i tím, že byly použity různě uchované vzorky. Hodgin a kol. analyzovali tkáň z parafínového bločku

fixovanou formalíнем a naše studie byla provedena na vzorcích uchovávaných ve stabilizačním pufru při -20°C [11].

Literatura

1. **Ryšavá, R., Tesař, V., Merta, M.** Nefrotický syndrom. *Interní med.*, 2005, 7, 3, p. 131–134.
2. **Becker, D. J.** Minimal change disease. *Nephrology Rounds*, 2008, 34, p. 111–134.
3. **Korbet, S. M., Schwartz, M. M., Lewis, E. J.** Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis: Clinical Course and Response to Therapy, *Am. J. Kidney Dis.*, 1994, 23, 6, p. 773–783.
4. **D'Agati, V. D., Fogo, A. B., Bruijn, J. A., Jennette J. C.** Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis: a working proposal. *Am. J. Kidney Dis.*, 2004, 43, 2, p. 368–382.
5. **Brown, E. J., Schlöndorff, J. S., Becker, D. J.** Mutations in the formin gene INF2 cause focal segmental glomerulosclerosis, *Nat. Genet.*, 2010, 42, 1, p. 72–76.
6. **Pavenstädt, H., Kriz, W., Kretzler, M.** Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol. Rev.*, 2003, 83, 1, p. 253–307.
7. **Howie, A. J.** Pathology of minimal change nephropathy and segmental sclerosing glomerular disorders. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2003, 18, 6, p. vi33–vi38.
8. **D'Agati, V. D., Kaskel, F. J., Falk, R. J.** Focal segmental glomerulosclerosis. *N. Engl. J. Med.*, 2011, 365, 25, p. 2398–2411.
9. **Schmid, H., Henger, A., Cohen, C. D.** Gene expression profiles of podocyte-associated molecules as diagnostic markers in acquired proteinuric diseases. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2003, 14, 11, p. 2985–2966.
10. **Bennett, M. R., Czech, K. A., Arend, L. J., Witte, D. P., Devarajan, P., Potter, S. S.** Laser capture microdissection-microarray analysis of focal segmental glomerulosclerosis glomeruli. *Nephron Exp. Nephrol.*, 2007, 107, 1, p. e30–e40.
11. **Hodgin, J. B., Borczuk, A. C., Nasr, S. H. et al.** A molecular profile of focal segmental glomerulosclerosis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Am. J. Pathol.*, 2010, 177, 4, p. 1674–1686.

Tato studie byla podporována grantovými projekty PRVOUK-P25/LF1/2 a SVV 260031.

Do redakce došlo 12. 1. 2016

Adresa pro korespondenci:

*Mgr. Markéta Šafaříková
ÚBLG, 1. LF UK v Praze a VFN v Praze
Albertov 4
128 00 Praha 2
e-mail: marketasafarikova@seznam.cz*