

# A késői típusú szteroid-rezisztens nephrosis szindróma és a nephronophthisis genetikája

Doktori tézisek

**Dr. Kerti Andrea**

Semmelweis Egyetem  
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Tory Kálmán, Ph.D., egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók: Dr. Prohászka Zoltán, az MTA doktora,  
egyetemi tanár  
Dr. Balogh István, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Szabó András, az MTA doktora,  
egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Bereczki Csaba, Ph.D., egyetemi  
docens  
Dr. Szabó László, Ph.D., egyetemi  
docens

Budapest  
2015



# Bevezetés

A gyermekkori krónikus veseelégtelenség leggyakoribb okai a monogénesen öröklődő vesebetegségek, illetve a vese és a húgyútak malformációi. A betegségek százalékos eloszlásáról nem állnak rendelkezésre az irodalomban részletes adatok. Egyes vizsgálatok alapján 6-7%-áért a szteroid-rezisztens nephrosziszindróma (SRNS), 6-10%-áért a nephronophthisis felelős.

Az SRNS az esetek felében immun-diszfunkció, másik felében monogénes podocytopathia következménye. A két forma elkülönítése fontos, hiszen kezelésük és prognózisuk különböző. Monogénes podocytopathiákban az immunszuppresszív kezelés hatástalan, a vesetranszplantációt követően azonban a betegség jellemzően nem újul ki. A podocytopathiákban leggyakrabban érintett gén az *NPHS2*, mutációi congenitalis, infantilis, gyermekkori és felnőttkori SRNS-t is okozhatnak. A különböző életkorokban kezdődő SRNS háttérében különböző típusú mutációk állnak. Kiemelendő az p.R229Q polimorfizmus szerepe, mely egy mutációhoz transz-asszociáltan felnőttkori SRNS-t okoz. Gyakorisága (MAF=3% Európában) miatt fontos szerepe van a genetikai tanácsadásban is. Homozigóta formában való patogenitásáról nincs egységes vélemény.

A nephronophthisis hátterében leggyakrabban *NPHP1* mutáció áll. Jellemző klinikai tünetei a polyuria-polydypsia, az anaemia és a növekedésbeli elmaradás. Az izolált, extrarenalis tünetekkel nem járó nephronophthisis felismerése nehéz, a bevezető tünetek enyhe megjelenése, illetve a haematuria, proteinuria jellegzetes hiánya miatt a betegek jelentős része csak a krónikus veseelégtelenség végstadiumában kerül orvoshoz. A diagnózis felállításáig a gyermekek akár évekig élhetnek csökkent vesefunkcióval, így az uraemia szövődményeinek kialakulási esélye nagy. Nephronophthisisben a genetikai diagnózis fontos a prognózis és az extrarenalis érintettség lehetőségének megítélésében, a genetikai tanácsadásban, és feleslegessé teszi a vesebiopsziát.

Monogénes SRNS és nephronophthisis klinikai gyanúja esetén a diagnózis felállításának egyetlen biztos módja a kóroki mutáció azonosítása. Ugyanakkor egy mutáció nem minden esetben kóroki. Annak eldöntéséhez, hogy a talált genetikai variáns felelős lehet-e a betegség kialakulásáért, alapvető a mutációk által okozott fenotípus részletes ismerete. Magyarországon a közelmúltig genetikai vizsgálat nem volt elérhető ezen betegcsoportokban.

Jelen dolgozat célja a gyermekkori végstadiumú veseelégtelenség klinikai etiológiájának meghatározása, a szteroid-rezisztens nephrosis szindróma és a nephronophthisis hátterében álló leggyakoribb kóroki gének mutáció-szűrésének bevezetése, az azonosított mutációk patogénitásának meghatározása és a pontos

genetikai diagnózis ismeretében a genotípus-fenotípus összefüggésének vizsgálata.

# Célkitűzések

Munkám során a következő célokat tűztük ki:

1. A krónikus veseelégtelenség etiológiájának meghatározása a Semmelweis Egyetem, I.sz. Gyermekgyógyászati Klinikán gondozott betegek körében.
2. Online regiszter létrehozása szteroid-rezisztens nephrosis szindróma és cisztás vesebetegség miatt Magyarországon gondozott betegek részére.
3. A szteroid-rezisztens nephrosis szindróma kialakulásáért felelős *NPHS1*, *NPHS2*, *WT1* és *PAX2* gének szűrésének bevezetése Magyarországon.
4. Az *NPHS2* p.V290M mutáció szerepének vizsgálata felnőttkori nephroticus mértékű proteinuriában.
5. Az *NPHS2* p.R229Q patogenitásának vizsgálata.
6. A nephronophthisis kialakulásáért felelős *NPH1*-mutációk szűrésének bevezetése Magyarországon.
7. A nephronophthisisre jellemző klinikai tünetek vizsgálata genetikailag igazolt cisztás vesebetegség miatt gondozott betegek körében.

# Módszerek

## *Vizsgált betegcsoportok*

A gyermekkori végstádiumú veseelégtelenség okainak meghatározásához a Semmelweis Egyetem, I.sz. Gyermekklinikán 2002 és 2012 között kezelt 88 család klinikai adatait dolgoztuk fel.

Hatvanhárom szteroid-rezisztens nephrosis szindróma vagy nephroticus mértékű proteinuria ( $>40\text{mg/m}^2/\text{óra}$ ) miatt gondozott beteget vizsgáltunk.

Vizsgálatunkba 85 családból származó 95 cisztás vese vagy krónikus veseelégtelenség miatt gondozott beteget vontunk be, akiknél nem észleltünk sem hematuriát, sem nephroticus mértékű proteinuriát, sem húgyúti malformációt. Közülük a nephronophthisre jellemző klinikai tünetek meghatározásához genetikailag igazolt nephronophthisis (n=19), autoszomális recesszív policisztás vesebetegség (n=14), vesehypoplasia (n=9), autoszomális domináns tubulointerstitialis vesebetegség (n=2), illetve a felmenők klinikuma alapján autoszomális domináns policisztás vesebetegség (n=26) miatt gondozott gyermekek klinikai adatait dolgoztuk fel. A betegeket diagnózisuk alapján két csoportra osztottuk: (1.) nephronophthisis illetve (2.) nem nephronophthisis miatt gondozottak, majd köztük vizsgáltuk az anaemia, a polyuria-polydipsia, a növekedésbeli elmaradás, a hypertonia és az ametropia előfordulási gyakoriságát.

## *Laboratóriumi módszerek*

Izolált szteroid-rezisztens nephrosis szindróma vagy nephroticus mértékű proteinuria miatt gondozott betegeknél az *NPHS2* gén 8 exonját (n=43), az *NPHS1* gén 29 exonját (n=4), illetve a 14., a 22. és a 24. exonját (n=13), a *WT1* gén 8. és 9. exonját (n=20) valamint a *PAX2* gén 12 exonját (n=6) és hasítási helyeit szekvenáltuk. Felnőttkori nephrosis szindrómában csak az *NPHS2* p.R229Q polimorfizmusát és a p.V290M mutációját (n=6) vizsgáltuk.

Az *NPHS2* gén c.868G>A p.V290M mutáció vizsgálatát két kohortban végeztük el: 83 főleg Európából és Észak-Afrikából származó betegnél (francia kohort) és 95 főleg Olaszországból, Törökországból, Németországból és Lengyelországból származó betegeknél (PodoNet kohort). A PodoNet kohort betegeinek vizsgálata külföldi laboratóriumokban történt.

A p.V290M mutációt hordozó betegek és családtagjaik illetve az FN6 család haplotípus analízisét az *NPHS2* génhez közeli régióban elhelyezkedő D1S3760, D1S215, D1S3759 és D1S2751 markerek segítségével végeztük el, a haplotípus frekvenciákat Fischer exact teszttel hasonlítottuk össze.

Az *NPHS2* gén p.R229Q polimorfizmusának szűrését 212 kontroll személynél és a p.V290M mutációt hordozó érintett gyermekek összesen 7 egészséges, heterozigóta p.V290M mutációt



hordozó hozzátartozójánál végeztük el az 5. exon szekvenálásával vagy a ClaI restrikciós endonukleáz segítségével.

A nephronophthisis miatt gondozott betegeknél az *NPHP1* homozigóta deléció szűrését az *NPHP1* gén 2-es és 18-as intron, valamint a 7-es és 19-es exon felsokszorosításával végeztük (n=26). Azoknál a betegeknél, akiknél nem igazolódott homozigóta deléció, az *NPHP1* gén heterozigóta delécióját vizsgáltuk MLPA és QMPSF módszerrel (n=16). Akiknél heterozigóta *NPHP1* deléció igazolódott, a másik allélon feltételezett pontmutáció kimutatása céljából az *NPHP1* gén 20 exonjának és hasítási helyeinek direkt szekvenálását (n=7) végeztük el.

A genetikai vizsgálatok egy része az INSERM U983, Hôpital Necker-Enfants Malades, University of Michigan, Ann Arbor, MI és a Debreceni Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet, Molekuláris Genetika Laboratóriumban készült.

### *Statisztikai elemzés*

Az adatokat a Statisztika 12.0 programmal elemeztük. Statisztikailag szignifikánsnak a  $p < 0,05$  értéket tekintettük. A folytonos változók eloszlását Shapiro-Wilk teszttel vizsgáltuk. Nem normál eloszlású változókat két csoport között a Mann-Whitney U teszttel hasonlítottunk össze. Kontingencia táblák vizsgálatához a Fischer exact tesztet használtuk.

## Eredmények

*A krónikus veseelégtelenség etiológiája a Semmelweis Egyetem, I.sz. Gyermekklinikán gondozott gyermekek körében.*

A vizsgált 88 családból 26 családban (30%) SRNS, kilenc családban (10%) nephronophthisis, 12 családban izolált vese hypoplasia (14%), hét családban egyéb veleszületett vese vagy húgyúti fejlődési rendellenesség (CAKUT) (8%), hat családban (7%) Alport szindróma, három családban (3%) autoszomális recesszív policisztás betegség, hat családban (7%) glomerulonephritis, 15 családban egyéb betegség (17%), három családban ismeretlen ok (3%) állt a végstádiumú veseelégtelenség hátterében. Eredményeink alapján a végstádiumú veseelégtelenséghez az esetek közel felében monogénes betegség vezet. Az SRNS és a nephronophthisis az összes eset 40%-áért volt felelős.

*Online regiszter létrehozása szteroid-rezisztens nephrosis szindróma és cisztás vesebetegség miatt Magyarországon gondozott betegek részére.*

Az online regiszterbe 81 SRNS és 141 cisztás vesebetegség, közülük 26 nephronophthisis miatt gondozott beteg adatait összesítettük.

*A szteroid-rezisztens nephrosis szindróma kialakulásáért felelős NPHS1, NPHS2, WT1 és PAX2 gének szűrésének bevezetése Magyarországon.*

A NPHS1 (2%), NPHS2 (14%), WT1 (9%) és PAX2 gének (7%) szűrése során az 57 vizsgált család 32%-ában azonosítottunk kóroki mutációt, mely megfelelt az irodalomból ismert gyakoriságnak. Az NPHS2 p.E264\* nonszensz mutáció korábban nem volt ismert.

*Az NPHS2 p.V290M mutáció szerepének vizsgálata felnőttkori nephroticus mértékű proteinuriában.*

Az NPHS2 homozigóta és összetett heterozigóta p.V290M hordozó betegek fenotípusa eltért az irodalomban leírt NPHS2-asszociált fenotípustól, ilyen ennyire enyhe lefolyású nephrosis szindróma NPHS2 mutációt hordozók között ezidáig nem volt ismert. Hypalbuminaemia és oedema a 21 éves fiúnál még nem jelentkezett, a hölgy beteg esetében pedig csak 27 éves korban. Jelenleg, 21 és 31 éves korban mindkettőjük vesefunkciója normális. A p.V290M mutáció az NPHS2 mutációk 16 százalékát adta, tehát a magyar populációban gyakori. Európai felnőttkori nephrosis szindrómában betöltött szerepének vizsgálata céljából allélfrekvenciáját két külföldi, késői nephrosis miatt gondozott kohortban is vizsgáltuk. Míg a francia kohortban 83 francia vagy olasz beteg közül egy

esetben sem azonosítottuk, a PodoNet kohortban 95 beteg közül 2 beteg (német, török) hordozott p.V290M mutációt. A három p.V290M mutációt hordozó magyar beteg szüleinek 12 allélját tipizáltuk. A négy p.290M allél azonos volt, míg a nyolc p.290V allél közül hét különböző volt egymástól és a p.290M alléltól is (4/4 vs. 1/8;  $p=0,01$ ). Mindezek alapján a p.V290M egy alapító mutáció, mely magyarázza a regionális előfordulásban lévő különbséget.

*Az NPHS2 homozigóta p.R229Q patogenitásának vizsgálata.*

Egy betegnél azonosítottunk homozigóta R229Q-t. Proteinuriáját 7 hónaposan észlelték, később szövettani vizsgálat focalis segmentalis glomerulosclerosist mutatott. Betegsége végstádiumú veseelégtelenségig 33 évesen progrediált. Gyermekkorában észlelték nystagmusát, amblyopiáját. A családtagok vizsgálatakor a bátyjánál és édesapjánál is homozigóta p.R229Q polimorfizmust találtunk, akiknek nem volt kóros proteinuriájuk 40, illetve 59 éves korban.

Szemészeti vizsgálat során a *PAX2* mutációkra jellemző „morning glory anomália” igazolódott. A *PAX2* gén szekvenálása során egy ismert de novo heterozigóta frameshift mutációt (c.76dupG, p.V26Gfs\*28) találtunk, mely a beteg vese- és szemérintettségét is egyértelműen magyarázza, jóllehet focalis segmentalis glomerulosclerosissal való társulása ritka.

### *A NPHS2 [p.R229Q;p.V290M] patogenitásának vizsgálata.*

Az irodalom a [p.R229Q;p.V290M] társulást, mint bármely más p.R229Q-mutáció társulást, patogénnek tartotta. Együttes előfordulásukat azonban egy betegben sem azonosították. Amennyiben ezen asszociáció patogén lenne, számos betegben kellett volna találjanak a [p.R229Q;p.V290M] társulást. Hiánya alapján megkérdőjeleztük a patogenitását. Ennek vizsgálata céljából a p.V290M mutációt hordozó egészséges családtagoknál szűrtük az R229Q polimorfizmust. Várakozásunknak megfelelően, két családtagban azonosítottuk a [p.R229Q;p.V290M] társulást, akik egészségesek voltak, 43 és 37 évesen sem volt proteinuriájuk. Ezek alapján a [p.R229Q];[p.V290M] asszociáció valóban nem patogén.

### *A nephronophthisis kialakulásáért felelős NPH1 gén mutáció szűrésének bevezetése Magyarországon.*

A nephronophthisis miatt gondozott betegek 63%-ánál azonosítottunk *NPH1* mutációt, 9 esetben homozigóta, 5 esetben heterozigóta deléció igazolódott, mely egy esetben egy pont mutációhoz (c.656C>A, p.S219X), két esetben egy kisebb delécióhoz (c.489delT, p.Phe163Leufs\*19, illetve c.84\_87delTTCT, p.Ser29Argfs\*4), két esetben a 18-20. exon deléciójához társult. Az azonosított mutációk közül a c.489delT mutáció és a 18-20. exon deléciója korábban nem volt ismert.

*A nephronophthisisre jellemző klinikai tünetek vizsgálata genetikailag igazolt cisztás vesetegség miatt gondozott betegek körében.*

Vizsgáltuk a nephronophthisisre specifikus klinikai tüneteket nephronophthisis (n=19) és egyéb cisztás vesebetegség miatt gondozott betegek (n=51) körében. Az anaemia gyakoriságában nem találtunk különbséget a két csoport között (1/16, 6% vs. 4/49, 8%,  $p>0,05$ ), ugyanakkor nephronophthisisben szignifikánsan gyakoribb volt a polyuria-polydipsia (15/18, 83% vs. 2/37, 5%,  $p\leq 0,05$ ), a növekedésbeli elmaradás (5/19, 26% vs. 2/44, 5%,  $p\leq 0,05$ ), az ametropia (9/17, 53% vs. 4/20, 20%,  $p\leq 0,05$ ) és kisebb volt a hypertonia gyakorisága (1/18, 6% vs. 15/46, 33%  $p\leq 0,05$ ). A nephronophthisis miatt gondozott betegek felénél a négy tünet közül (polyuria-polydipsia, növekedésbeli elmaradás, normotensio ametropia) három jelen volt. Eredményeink alapján a cisztás vesebetegségben szenvedő betegek körében a nephronophthisisre utaló specifikus tünetek a polyuria-polydipsia és a növekedésbeli elmaradás mellett a normotensio és az ametropia.

## Következtetések

Eredményeim alapján az alábbi következtetéseket vontam le:

1. A magyar kohortban a gyermekkori krónikus veseelégtelenség legalább 40%-áért a szteroid-rezisztens nephrosis szindróma és a nephronophthisis felelős.
2. Az *NPH1* deléciója a nephronophthisis miatt gondozott gyermekek  $\frac{2}{3}$ -ában azonosítható. Gyakorisága alapján a krónikus tubulointerstitialis nephropathiában végzett genetikai vizsgálatoknak – az új generációs szekvenálás korszakában is – az első lépése kell legyen.
3. A hazai szteroid-rezisztens nephrosis szindróma kohortban a családok 32%-ában azonosítottunk kóroki mutációt.
4. Az *NPH2* p.V290M mutáció okozhat 3. évtizedben megjelenő nephrosis szindrómát is, ezért a korábbi mutáció szűrési algoritmusoktól eltérően Kelet-és Közép-Európában 14 éves kor után kezdődő szteroid-rezisztens nephrosis szindróma vagy nephroticus mértékű proteinuria esetén az p.R229Q polimorfizmus mellett (5.exon) a p.V290M mutáció (7.exon) szekvenálása is indokolt.

5. Szemben a korábbi nézettel az *NPHS2* [p.V290M];[p.R229Q] asszociáció nem patogén, ezért a p.V290M mutációt hordozó betegek és családtagok házastársait nem szükséges az p.R229Q polimorfizmusra szűrni.

6. Az *NPHS2* gén homozigóta p.R229Q polimorfizmusa önmagában nem okoz nephrosis szindrómát. Azonosítása esetén a korábbi gyakorlattal ellentétben a kóroki mutáció kimutatása céljából további genetikai vizsgálatok szükségesek.

7. Az *NPH1* mutációhoz társuló tünetek jellegzetesen a polyuria-polydipsia és a növekedésbeli elmaradás mellett nem az anaemia, hanem a normotensio és a szemérintettség (ametropia, amblyopia).



## Saját publikációk jegyzéke

### **Az értekezés alapjául szolgáló közlemények időrendben:**

Kerti A, Csohany R, Szabo A, Arkossy O, Sallay P, Moriniere V, Vega-Warner V, Nyiro G, Lakatos O, Szabo T, Lipska BS, Schaefer F, Antignac C, Reusz G, Tulassay T, Tory K (2013) *NPHS2* p.V290M mutation in late-onset steroid-resistant nephrotic syndrome. *PEDIATRIC NEPHROLOGY* 28:(5) pp. 751-757.

Kerti A, Csohany R, Wagner L, Javorszky E, Maka E, Tory K (2013) *NPHS2* homozygous p.R229Q variant: potential modifier instead of causal effect in focal segmental glomerulosclerosis. *PEDIATRIC NEPHROLOGY* 28:(10) pp. 2061-2064.

Kerti A, Jávorszky E, Csohány R, Varga N, Szabó A, Árkossy O, Sallay P, Balogh L, Szabó T, Reusz Gy, Tulassay T, Tory K (2013) A szteroid-rezisztens nephrosis szindróma genetikai vizsgálata Magyarországon. *GYERMEKGYÓGYÁSZAT* 64:(1) pp. 30-34.

Tory K, Menyhard DK, Woerner S, Nevo F, Gribouval O, Kerti A, Straner P, Arrondel C, Cong EH, Tulassay T, Mollet G, Perczel A, Antignac C (2014) Mutation-dependent recessive inheritance of *NPHS2*-associated steroid-resistant nephrotic syndrome. *NATURE GENETICS* 46:(3) pp. 299-304.

### **Az értekezés témájához kapcsolódó áttekintő közlemény:**

Tory K, Kerti A, Reusz Gy (2011) Az izolált szteroid-rezisztens nephrosis szindróma genetikája - az ezredfordulót övező két évtized eredményei. *HYPERTONIA ÉS NEPHROLOGIA* 15:(5) pp. 209-213.

**Egyéb, az értekezés témájához nem kapcsolódó közlemény:**

Kis E, Cseprekal O, Biro E, Kelen K, Ferenczi D, Kerti A, Szabo AJ, Szabo A, Reusz GS (2009) Effects of bone and mineral metabolism on arterial elasticity in chronic renal failure. PEDIATRIC NEPHROLOGY 24:(12) pp. 2413-2420.

Szappanos A, Patócs A, Gergics P, Bertalan R, Kerti A, Acs B, Feldmann K, Rácz K, Tóth M (2011) The 83,557insA variant of the gene coding 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 enzyme associates with serum osteocalcin in patients with endogenous Cushing's syndrome. JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY 123:(1-2) pp. 79-84.

Dégi AA, Kerti A, Kis É, Cseprekál O, Reusz Gy (2011) Az ambuláns artériás stiffness index (AASI) vizsgálata vesetranszplantált gyermekek esetében. HYPERTONIA ÉS NEPHROLOGIA 15:(3) pp. 111-115.

Kis E, Cseprekal O, Kerti A, Salvi P, Benetos A, Tisler A, Szabo A, Tulassay T, Reusz GS (2011) Measurement of pulse wave velocity in children and young adults: a comparative study using three different devices. HYPERTENSION RESEARCH 34:(11) pp. 1197-1202.

Dégi AA\*, Kerti A\*, Kis E, Cseprekal O, Tory K, Szabo AJ, Reusz GS (2012) Cardiovascular risk assessment in children following kidney transplantation. PEDIATRIC TRANSPLANTATION 16:(6) pp. 564-576. (\*megosztott elsőszerzős közlemény)

Shroff R, Dégi AA, Kerti A, Kis E, Cseprekál O, Tory K, Szabó AJ, Reusz GS (2013) Cardiovascular risk assessment in children with

chronic kidney disease. PEDIATRIC NEPHROLOGY 28:(6) pp. 875-884.

Degi AA\*, Kerti A\*, Cseprekal O, Kis E, Sallay P, Szabo AJ, Reusz GS (2013) Ambulatory arterial stiffness index in children after kidney transplantation. PEDIATRIC TRANSPLANTATION 17:(7) pp. 598-604. (\*megosztott elsőszerzős közlemény)

Degi AA, Kis E, Kerti A, Cseprekal O, Szabo AJ, Reusz GS (2014) Prevalence of obesity and metabolic changes after kidney transplantation: hungarian pediatric cohort study. TRANSPLANTATION PROCEEDINGS 46:(6) pp. 2160-2163.

Cseprekál O, Kis E, Dégi AA, Kerti A, Szabó AJ, Reusz GS (2014) Bone Metabolism and Arterial Stiffness After Renal Transplantation. KIDNEY AND BLOOD PRESSURE RESEARCH 39:(6) pp. 507-515.