



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

## Optimalizace primerů pro PCR amplifikaci a následné sekvenování exonů genu PKD2

# BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ

**Autor:** Kristián Kozák

**Vedoucí práce:** Ing. Irena Hoštičková Ph.D.

České Budějovice 2022

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem *Optimalizace primerů pro PCR amplifikaci a následné sekvenování exonů genu PKD2* jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3. 8. 2022

.....

Kristián Kozák

### **Poděkování**

Tímto bych rád poděkoval svojí vedoucí bakalářské práce Ing. Ireně Hoštičkové Ph.D. za ochotu, vedení práce, cenné rady, předání zkušeností, trpělivost a za poskytnutí svých materiálů. Dále bych rád poděkoval všem zaměstnancům v laboratořích na Zemědělské fakultě za ochotu a spolupráci a taky bych rád poděkoval své rodině a svým přátelům za podporu a trpělivost.

# Optimalizace primerů pro PCR amplifikaci a následné sekvenování exonů genu PKD2

## Abstrakt

Polycystické onemocnění ledvin dominantního typu postihuje široké spektrum věkové kategorie a pro pacienty představuje určité omezení, či komplikace spojené s tímto onemocněním, ať už se jedná o nález cyst v orgánech nebo až nástup renální insuficience.

Po obeznámení charakteristiky, průběhu, diagnózy a terapie onemocnění, jsem navrhnul nové primery ohraničující úseky různých exonů genu PKD2. Nové primery jsem testoval a optimalizoval teploty nasedání primerů gradientovou PCR. Amplifikované úseky jsem později poslal na sekvenaci a ověřil jejich identitu. Podařilo se mi optimalizovat primery pro amplifikaci a následnou sekvenaci 4 exonů genu PKD2. Jedním z těchto exonů je i exon 2, ve kterém se vyskytuje kauzální mutace způsobující onemocnění PCHLAD v rodině, ze které jsem získal vzorky pro svůj výzkum.

## Klíčová slova

Polycystické onemocnění ledvin; gen PKD2; gen PKD1; mutace; optimalizace primerů; sekvenace; exon 2

# **Primer optimization for PCR amplification and exons sequencing of the PKD2 gene**

## **Abstract**

The dominant type of the kidney polycystic disease affects a wide age spectrum and it represents certain limitations or complications for the patients, whether it concerns a finding of cysts in the organs, or up to renal insufficiency.

After the familiarization of the characteristics, progress, diagnoses and therapy, I suggested new primers bounding the sections of the different exons of the PKD2 gene. I tested the new primers, as well as optimized the temperatures of annealing of the primers by the gradient PCR. I then sent the amplified sections to sequencing and verified their identity. I managed to optimize the primers for the amplification and further sequencing of the four exons of the PKD2 gene. One of these exons is also the exon 2, in which we can find the casual mutation which causes the autosomal dominant polycystic kidney disease ran in family, from which I gathered the samples for my research.

## **Key words**

Polycystic kidney disease; PKD2 gene; PKD1 gene; mutation; primer optimization; sequencing; exon 2

## Obsah

Úvod.....	8
1 Dědičné onemocnění ledvin .....	9
1.1 Polycystické onemocnění ledvin.....	9
1.1.1 Polycystické onemocnění ledvin dominantního typu (PCHLAD) .....	9
1.1.2 Polycystické onemocnění ledvin recesivního typu (PLCHAR) .....	9
1.2 Geny PKD1 a PKD2 z molekulárního hlediska .....	10
1.2.1 Mutační analýza a další metody.....	11
1.3 Polycystin 1,2 (popis).....	11
1.3.1 PC1 a PC2, vznik patogeneze PCHLAD .....	12
1.4 Obecný popis patogeneze .....	13
1.4.1 Princip vzniku onemocnění .....	13
1.4.2 Faktory ovlivňující buněčnou proliferaci v cystogenezi.....	13
1.4.3 Buněčná proliferace a její regulace.....	14
1.4.4 Syntéza tekutin.....	14
1.5 Apoptóza .....	14
1.6 Diagnostika .....	15
1.7 Klinické projevy .....	16
1.7.1 Renální projevy – Arteriální hypertenze.....	16
1.7.2 Renální projevy – krvácení do cyst.....	16
1.7.3 Renální projevy – infekce močových cest .....	17
1.7.4 Renální projevy – nefrolitiáza.....	17
1.7.5 Renální projevy – zvětšení bolestivých ledvin .....	18
1.7.6 Karcinom ledvin .....	18
1.7.7 Renální projevy – chronické selhání ledvin.....	18
1.7.8 Extrarenální projevy .....	19
1.7.9 Extrarenální projevy – Játra.....	19
1.7.10 Extracelulární projevy – Mozek .....	19
1.7.11 Extrarenální projevy – ostatní orgány.....	20
1.8 Terapie.....	20
2 Cíl práce a hypotézy .....	21
3 Metodika.....	22
3.1 Návrh primerů .....	22
3.2 Izolace DNA z bukálních stěrů .....	22
3.3 Koncentrace a čistota získané DNA.....	23

3.4	Ředění primerů.....	23
3.5	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	23
3.6	Elektroforéza .....	24
3.7	Vyhodnocení sekvencí DNA.....	25
4	Výsledky .....	26
4.1	Tabulka navržených primerů.....	26
4.2	Další použité primery .....	26
4.3	Vyhodnocení gradientové PCR a optimalizaci primerů.....	26
4.4	PCR pro následnou sekvenaci DNA .....	33
4.5	Výsledky sekvenací primeru exonu 2a, 2b, 3 a 5a. ....	35
5	Diskuze .....	39
6	Závěr.....	41
7	Seznam použitých zdrojů .....	42
8	Přílohy: .....	51
	Seznam obrázků a tabulek .....	52
	Seznam zkratk .....	53

## Úvod

Polycystická choroba ledvin se vyznačuje tvorbou cyst, a kromě jiných vážných klinických příznaků, jako např. hypertenze, tvorby aneurysmat a jaterních cyst většina pacientů končí v posledním stádiu s renální insuficiencí. V této práci se zabývám oběma formami polycystické choroby ledvin, ale větší pozornost věnuji dominantní formě. Za vznikem onemocnění stojí genové mutace v genech PKD1 a PKD2, samotná cystogenze se spouští mnoha faktory. Diagnostika se provádí pomocí ultrazvuku, počítačové tomografie, magnetické rezonance a mutační analýzy. V rámci rodin s poškozeným genem se provádí skríninky a výsledky diagnostiky se vyhodnocují pomocí tabulek, jejichž kritéria jsou velikost a počet cyst. Terapie doposud není známá a léčí se jen vedlejší komplikace spojené s onemocněním. Kromě nejčastěji používaných laboratorních metod (vysokoučinná kapalinová chromatografie – DHLPC a sekvenování nové generace) se pro mutační analýzu dá provést i PCR amplifikace exonů. Z tohoto důvodu se dostáváme k hypotéze, zda je možné využít PCR amplifikaci exonů k detekci mutací exonů v genu PKD2? Pro vyvrácení této hypotézy jsem se v rámci praktické práce pokusil navrhnout a optimalizovat primery pro exony genu PKD2, a u fungujících párů primerů ověřit jejich použitelnost pomocí sekvenace získaných fragmentů.



# 1 Dědičné onemocnění ledvin

## 1.1 Polycystické onemocnění ledvin

Polycystické onemocnění rozdělujeme na autozomálně recesivní a autozomálně dominantní. (Merta et al., 2007)

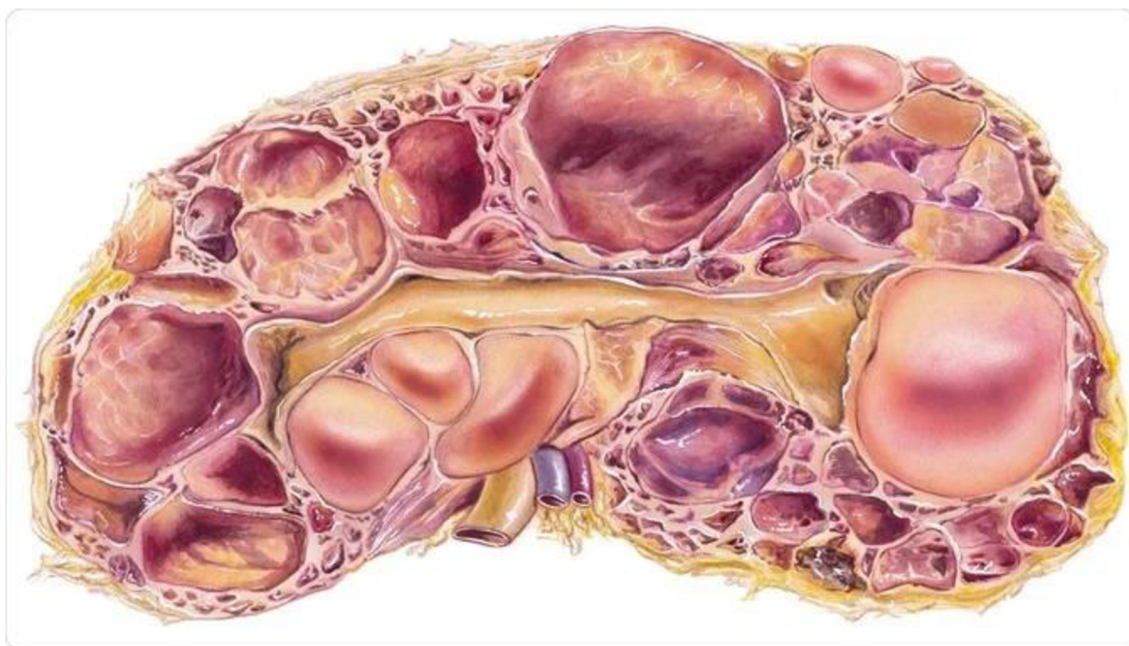
### 1.1.1 Polycystické onemocnění ledvin dominantního typu (PCHLAD)

PCHLAD se popisuje, jako nejčastější dědičné heterogenní onemocnění (PETERS et al., 1993). V populaci se mutace nejčastěji objevuje ve frekvenci kolem 1:1000 živě narozených dětí (Reeders ST et al., 1985). V přepočtu na živě narozených dětí za rok 2021 je zhruba každé 112. dítě (Český statistický úřad, 2022) postižené s touto nemocí. K závažnosti onemocnění přispívá, že se doposud neobjevil lék. Další komplikací nastává při rozšiřování rodin, jelikož se jedná o dědičné onemocnění, musí rodiče dělat komplikované a těžké rozhodnutí, jestli počnou dítě, či ne.

Mutace na genech PKD1 a PKD2 si jsou podobné v klinickém průběhu, rozsahu, charakteru, ale v podstatě se liší délkou nástupu chronického selhání ledvin. Obecně za vznikem nemoci stojí genetické i negenetické faktory (Merta et al., 2007). Onemocnění se projevuje vznikem cyst, které se plní glomerulární filtrací a způsobuje úbytek funkčního parenchymu ledvin (Hou et al., 2002). „Dochází k progresivnímu rozvoji a zvětšování cyst“ (Rossetti et al., 2002). U pacientů s extrémně zvětšenými ledvinami se z vysoké procentní pravděpodobnosti později vyvine chronické selhání ledvin a většinou dojde k úmrtí ve vyšším věku (TORRA R. et al., 2000). Celosvětově onemocnění figuruje na 4. místě v žebříčku příčin selhání ledvin nebo transplantací ledviny (Fedele et al., 2014). V pokročilejší fázi postihuje kromě ledvin i více orgánů, jako např. játra, slinivku břišní a slezinu. Diagnóza se nejčastěji provádí genetickým nebo ultrazvukovým vyšetřením (Reeders ST et al., 1985). Léčba zatím není známá a mírní se pouze klinické příznaky spojené s tímto onemocněním (Merta a Reiterová, 2004).

### 1.1.2 Polycystické onemocnění ledvin recesivního typu (PLCHAR)

Recesivní forma se ve srovnání s dominantní formou vyznačuje brzkým projevem onemocnění především v dětském věku, z toho důvodu dochází ke dřívějšímu selhání ledvin. Místo mutace se nachází na 6 chromozomu. Mezi klinické příznaky řadíme jaterní fibrózu, poškození ledvin a hypertenzi (Merta et al., 2007).



Obrázek č. 1: Ilustrační obrázek polycystické ledviny. (Zdroj: Medical A. I., [online]. [cit. 2022-08-02])

### ***1.2 Geny PKD1 a PKD2 z molekulárního hlediska***

Příčinou onemocnění je defekt na již zmíněných genech PKD1 a PKD2, jedná se totiž o genovou heterogenitu (Rossetti et al., 2002). Konkrétně u genu PKD1 se mutace vyskytuje na krátkých raménkách chromozomu 16. (Reeders ST et al., 1985) a na dlouhých raménkách chromozomu 4. dochází ke změně sekvence v genu PKD2 (Kimberling et al., 1993). Gen PKD1 je složen z 46 exonů (Bogdanova et al., 2001) a celkem z 52 kb (Peral et al., 1996) a gen PKD2 obsahuje 15 exonů a 68 kb genomové DNA (Mochizuki et al., 1996). Odlišnost místa vzniku mutace má velký vliv na projev a průběh onemocnění PCHLAD. Popisuje se, že se z 86 % vytváří nebo dědí mutace v genu PKD1 (PETERS et al., 1993) a ve zbylých 14 % v genu PKD2. Právě změna DNA v genu PKD2 má „mírnější průběh“ a zásadně se liší nástupem chronického selhání ledvin, a to až zpožděním o 20 let (TORRA R. et al., 2000). Mezi nejčastější výskyt změny bází u genu PKD1 je v exonech 15-18 a u genu PKD2 v exonech 4-6 (Merta a Reiterová, 2004). Samotnou změnu způsobuje substituce, delece, inserce a konverze DNA (Rossetti et al., 2002). Přičemž v roce 1997 popsali v online genové mutační databázi (HGMD) Krawczak a Cooper u genu PKD1 82 mutací (Rossetti et al., 2001). Momentálně dle dvou databází, databáze mutací autozomálně dominantních polycystických onemocnění ledvin a databáze lidských genových mutací, můžeme najít změnu sekvence pro gen PKD1 od 1177-2322 a pro gen PKD2 od 211-278 (Liu et al.,

2015). Pro dědění se mohou uplatnit mechanismy segregace, přenáší se neopravený zmutovaný gen, dále anticipace, dříve nastupují klinické příznaky než u rodičů a poslední je imprinting, dochází k jiné expresi genů přenesených od matky nebo otce (Merta a Reiterová, 2004).

### **1.2.1 Mutační analýza a další metody**

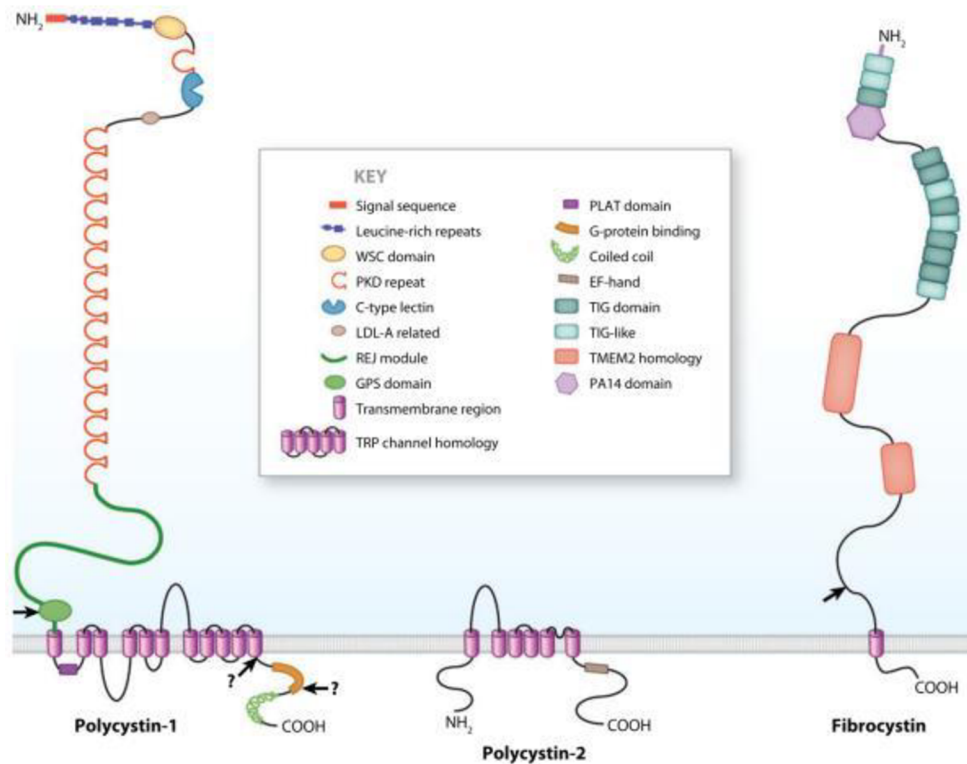
Mutace na genu PKD1 se těžko hledá z důvodu velkého počtu duplikovaných částí (Peral et al., 1996), proto se mutační analýza dělá spíše na genu PKD2. Při metodě se používá polymerázová řetězová reakce (PCR). Během analýzy se postižený úsek ohraničuje dvěma primeri. Existují i jiné metody k zjišťování mutací genů PKD1 a PKD2, například detekční přímé sekvenování, elektroforéza v gradientovém denaturačním gelu (DGGE), protein truncation test (PTT) (Merta a Reiterová, 2004), polymorfismus konformace jednovláknové DNA (SSCP), heteroduplexová analýza (Rossetti et al., 2002), výsledky se vyhodnocují sekvenováním (Rossetti et al., 2002). Denaturační vysokoúčinná kapalinová chromatografie (DHLPC) a sekvenování nové generace (NGS) se nejčastěji používají v laboratoři pro detekci mutací (Liu, 2015).

### **1.3 Polycystin 1,2 (popis)**

Geny PKD1 i PKD2 jsou předlohou pro membránové glykoproteiny nazývané Polycystin 1 a 2. (Tsiokas, 1999). Liší se funkcí, tvarem i velikostí (Merta et al., 2007). Polycystin 1, složený z 4302 aminokyselin (Igarashi et al., 2002), glykoprotein s membránou (Parnell et al., 1998) se vyskytuje v subcelulární oblasti v cíliích, plazmatické membráně atd. i v epitelových a neepitelových strukturách (Ibrahimov-Beskrovnaya, 1997) Skládá se z 4303 aminokyselin, jejichž součástí jsou C-terminální intercelulární konec, N-terminální extracelulární konec a 11 transmembránových repetit (Parnell et al., 1998). Z funkčního hlediska ovlivňuje přenos signálů a regulaci buněčného cyklu pomocí inhibitor cyklín dependentní kinázy z G0 do G1 fáze (Igarashi et al., 2002).

Polycystin 2 šestitransmembránový protein (Rankin, 1998), v němž je 986 aminokyselin. Tsiokas v roce 1999 popisoval polycystin 2, jako strukturálně podobému neselektivnímu kalciu v Ca<sup>2+</sup> iontovém kanále. Později se ukázalo, že polycystin 2 je neselektivní kationtový kanál schopný přenášet ionty vápníku (Igarashi et al., 2002). Stejně jako Polycystin 1 má C i N terminální konce, jenže se ale oba vyskytují v cytoplazmě (Ćelić et al., 2008). Na subcelulární úrovni je v cíliích (Streets, 2006) a

dopravuje se z endoplazmatického retikula na membránu (Cai et al., 1999), z tkání se vyskytuje v ledvinách, srdci, vaječnicích, varlatech, tenkém střevě atd. (Igarashi et al., 2002). V dospělosti se objevuje v ledvinách více než Polycystin 1 (Merta a Reiterová, 2004). Funkčně uvolňuje vápník z intracelulárních zásob přes aktivovaný kanál (Koulen et al., 2002).



Obrázek č. 2: Strukturální složení polycystinů – 1 a 2. (Zdroj: Medicine A. R., 2009; [online]. [cit. 2022-08-02])

### 1.3.1 PCI a PC2, vznik patologie PCHLAD

Oba Polycystiny mezi sebou navzájem reagují a pojí se C-konci za vzniku komplexu Tento jev má na svědomí zajištění intracelulární homeostázi vápníku (Tsiokas et al., 1997) a vliv na její regulaci (Vassilev et al., 2001). Jedna z funkcí je přenos signálu, jenž je zajišťován polycystiny v cílech chemickými nebo mechanickými podněty (Nauli et al., 2003) a převáděn do vápníkové signalizace (González-Perrett et al., 2001).

Předpokládá se, že porucha jednoho polycystinu způsobuje patologii onemocnění PCHLAD na buněčné úrovni. Poškození se vyznačuje buněčným dělením a růstem buněk, které jsou chráněny a inhibovány polycystinovými proteiny (Shillingford et al., 2006). Dalšími možnými patogenními faktory označujeme špatnou homeostázu vápníku

a polaritu buněk, vliv cyklického adenosin monosfátu (cAMP) a jeho hromadění, poruchu funkce cílů atd. (Merta et al., 2007).

## **1.4 Obecný popis patogeneze**

### **1.4.1 Princip vzniku onemocnění**

Před první změnou se zárodečná mutace promítne ztrátou nejprve jedné alely a poté druhé. Následně v cystogenezi při prvních změnách začíná silná proliferace v renálních tubulech (Weimbs, 2007) za vzniku malých dilatací (Bell et al., 2011) a (Terry et al., 2011), které se zvětšují v cysty různých velikostí (Weimbs, 2011). Posléze se cysty začnou plnit glomerulární filtrací. K plnění dochází z důvodu přesmyku resorpční funkce na sekreční funkci hyperplastické výstelky cyst. V lumen cyst zaniká kartáčovitý lem, zesiluje se bazální membrána a vznikají diferenciované buňky (Terry et al., 2011) a (Brill et al., 1996). Zralé cysty vznikají odtrhnutím dilatovaných částí od původních tubulů (Weimbs, 2007) a (Terry et al., 2011). V terminálně diferenciovaných buňkách dochází k nekontrolovanému buněčnému dělení, jako u rakovin (Evan a Vousden KH, 2011).

### **1.4.2 Faktory ovlivňující buněčnou proliferaci v cystogenezi**

Protoonkogeny s růstovými faktory c-myc, c-fos, c-K-ras, c-erb B2 nalézáme v buňkách v případě, že chybí Polycystin 1. Předpokládá se, že za běžných okolností Polycystin 1 s transkripční aktivitou snižuje obsah protoonkogenů (Arnould et al., 1998), které zvyšují buněčnou proliferaci (Lanoix et al., 1996).

Podle předpokladu, dalšími faktory spouštějícími cystogenezi, kromě ztráty funkcí PC1 a PC2 zárodečnou mutací, jsou modifikující geny, somatické mutace, apoptózy, abnormality extracelulárního matrixu, sekrece a absorpce tekutin, záněty, faktory prostředí a mutace zárodečných linií (Paul a Venden Heuvel, 2014). Z růstových faktorů jsou to nejčastěji epidermální růstový faktor (EGF) a další EGF- $\alpha$ ,  $\beta$ , heparin, amfiregulin (DU a Wilson, 1995) Dále růstové a extracelulární faktory ovlivňují signály (Evan G1 a Vousden KH, 2011), které mohou měnit genovou expresi (Zhang a Liu, 2002).

### ***1.4.3 Buněčná proliferace a její regulace***

Buněčná proliferace zajišťuje přísně regulovaný způsob růstu a dělení buněk. Buněčné dělení se uskutečňuje přes buněčný cyklus rozdělený do fází G1, S, G2 a M. Replikace DNA probíhá během S fáze a dělení buněk nastává v M fázi. Série proteinkináz kontrolují a regulují buněčnou proliferaci, např. cyklin-depedentní kináza (Mitchison, 2003) PC1 i PC2 se podílí na blokaci a regulaci buněčné proliferace, proto následné poškození jednoho z proteinu může vést ke vzniku onemocnění. (Vassilev et al., 2001)

### ***1.4.4 Syntéza tekutin***

Signalizace cAMP podporuje kromě buněčné proliferace i sekreci tekutin (Hanaoka a Guggino, 2000).

V sekreci tekutin do cyst hraje hlavní roli cyklický adenosin monofosfát (cAMP) (Masyuk et al., 2006). Vše začíná poškozením komplexu polycystinů, jenž narušuje intercelulární vápníkovou homesotázi (Harris a Peter., 2009). Nízká hladina vápníku inhibuje hydrolýzu cAMP a katalyzuje, akumuluje cAMP vyřazením z provozu inhibici adenylcyklázou 6 (Wang et al., 2010) a (Torres a Harris, 2013). Dalším faktorem, který ovlivňuje jeho pozitivní výskyt ve vyšším měřítku, je vysoká hladina vasopresinu. (Buchholz et al., 2011) a (Torres a Harris, 2013)

Inhibice regulátoru G-proteinu také zvyšuje syntézu cAMP (Torres a Harris, 2013). Mimo jiné se projevují další signální dráhy, které taky způsobují buněčnou proliferaci a sekreci tekutin (Harris a Peter., 2009).

### ***1.5 Apoptóza***

Jedná se o regulovaný proces odstraňování špatných buněk. Přesněji řečeno se apoptóza popisuje, jako buněčná programovaná smrt. Buňka se smršťuje, mění tvar cytoplazmatické membrány, dochází k fragmentaci jádra i DNA a ke kondenzaci chromatinu. Umírající buňka produkuje látky podporující fagocytózu (Elmore, 2007). Proces je regulován kaspázami, které se v neaktivní formě vyskytují v cytoplazmě buněk. Řadíme je do skupiny cysteinových proteáz a po aktivaci zahajují apoptózu (Wolf and Green, 1999). Dalším regulátorem jsou inhibitory kaspázy (IAP), které zastavují apoptózu inhibicí kaspázy a regulují buněčné dělení (Ashkenazi a Dixit, 1998). Popisují se 2 aktivační dráhy vnitřní – vnější. Vnitřní dráha se aktivuje

uvolňováním cytochromu c z mitochondrií a vnější cesta je zahájena extracelulárními faktory (Portt et al., 2011) Na myších modelech byla zaznamenána změna regulace apoptózy. Objevovali se faktory vyvolávající apoptózu a cytochromy uvolněné z mitochondrií u myši s agresivním vývojem cyst (Tao et al., 2005). Apoptózu ovlivňují i protoonkogeny c-Myc produkované polycystickými ledvinami, jenž působí na buněčnou proliferaci při začátcích onemocnění (Lanoix et al., 1996). Doposud není jasně objasněno, jestli má vliv dysregulovaná apoptóza na vzniku onemocnění PCHLAD (Tao et al., 2005).

## **1.6 Diagnostika**

V molekulární diagnostice se provádí vazebná analýza, která je limitována větším počtem vyšetřovaných jedinců v rodině s diagnostikovaným polycystickým onemocněním. Principem je navázáním vysoce polymorfních mikrosatelitních markerů. Kromě vazebné analýzy se provádí i mutační analýza se sekvenováním DNA (Pei a Watnick, 2010). Ve výzkumných projektech a příbuzenských transplantacích se preferuje přímá diagnostika (Merta et al., 2007).

„V prenatální diagnostice se při pozitivním výsledku u rodiny s těžkým průběhem PCHLAD přerušuje těhotenství vyšetření se provádí pomocí vazebné analýzy“ (Merta et al., 2007).

Bez rodinné anamnézy se musí klinické příznaky nebo nálezy porovnat s ostatními nemocí, jenž vytváří cysty. Myslíme tím tuberózní sklerózu, cystickou chorobu z urémie atd. (Merta et al., 2007). Ze zobrazovacích metod, jako tomografie, magnetická rezonance se nejvíce používá ultrazvukové vyšetření (UV). Existuje tabulka s věkem a počty cyst v ledvinách, podle kterých se vyhodnocují nálezy. V případě menších cyst se používá počítačová tomografie (CT) nebo magnetická rezonance. Pro magnetickou rezonanci a počítačovou tomografii se opět používají jiné tabulky. V potaz se bere i výskyt cyst v jiných orgánech, např. v játrech (Pei a Watnick, 2010). Ke špatnému rozpoznání dochází například u starších lidí se získanou cystickou chorobou při renální insuficienci, u kterých jsou zpřísněny podmínky pro vyhodnocení nemoci PCHLAD (Pei, 2006).

Kritéria pro diferenciální diagnostiku rozlišujeme podle: počtu výskytu onemocnění na obyvatele, dědičnosti, nástupu klinických projevů, počtu cyst, postižení dalších orgánů, nálezů v ledvinách a vývinu chronického selhání. U dominantní formy

ve srovnání s recesivní později nastupují klinické příznaky a u dalších postižených míst kromě ledvin se dominantní forma projevuje v játrech, mozku a recesivní způsobuje především jaterní fibrózu. Cystická choroba ledvin v urémii se liší od PCHLAD vznikem cyst během chronické nefropatie a v dalších orgánech se nevyskytuje. Tuberózní sklerózu v porovnání s PCHLAD lze zpozorovat už od dětského věku, k postiženým ledvinám přibývají angiomylipomy, karcinomy, skleróza a z dalších orgánů postihuje např. oči, srdce, kůži, mozek (Merta et al., 2007).

## ***1.7 Klinické projevy***

Klinické projevy rozdělujeme na renální a extrarenální (Merta et al., 2007). Do onemocnění PCHLAD s renálními projevy můžeme zařadit chronickou bolest břicha, anemií, nefrolitiázu, arteriální hypertenzi, hematurii, infekci močových cest a výjimečně karcinom ledvin (Milutinovic et al., 1990). U extrarenálních příznaků se cysty objevují v jiných orgánech, konkrétně jde o mozek, játra, slezina a jiné (Pei a Watnick, 2010).

### ***1.7.1 Renální projevy – Arteriální hypertenze***

Zpozorovat ji lze před poklesem glomerulární filtrace a ztrátou funkce ledvin ať už u dospělých či dětí (Chapman et al. 2010). Postihuje krevní aparát, přesněji zvyšuje krevní tlak (Zeier et al., 1993) i hypertrofii hmoty levé komory (Chapman et al. 2010). Hypertenze napomáhá k dřívějšímu nástupu renální insuficience (Zeier et al., 1993). Za příčiny vzniku onemocnění arteriální hypertenze označujeme snížení produkce NO a následnou aktivaci systému renin-angiotenzin-aldosteron, intrarenální ischemii atd (Chapman et al. 2010). K léčbě se používá inhibitor angiotenzin.konvertující enzym (ACEI), jenž snižuje krevní tlak, rezistenci cév a zvětšuje průtok plasmy v ledvinách. V malém množství snižuje se regrese renální insuficience a oddaluje se vznik cyst. Dále byl pozorován i útlum hypertrofie levé komory (Chapman et al. 2010). Spolu s ACEI se používá blokátor kalciového kanálu, jenž stabilizuje krevní tlak, ale nesnižuje glomerulární filtraci (Merta et al., 2007).

### ***1.7.2 Renální projevy – krvácení do cyst***

Krvácení do cyst vzniká infekcí nebo mechanickým poškozením s projevy bolestí v bedrech, horečkou, leukocytózy a hematurií. Riziko krvácení se také zvětšuje s nabývajícím se objemem ledviny (Mabillard et al., 2017). „Existují dvě cesty



krvácení. Jedna z nich je s otevřeným vývodným systémem, kdy se krev dostane do moči a vznikne hematurie. Druhá cesta je s uzavřeným vývodným systémem a krvácí do bederní oblasti, kde způsobuje bolest. Do krvácení se léčebně nezasahuje, většinou odezní do několika dní. V případě komplikací se příznaky léčí symptomaticky“ (Merta et al., 2007).

### **1.7.3 Renální projevy – infekce močových cest**

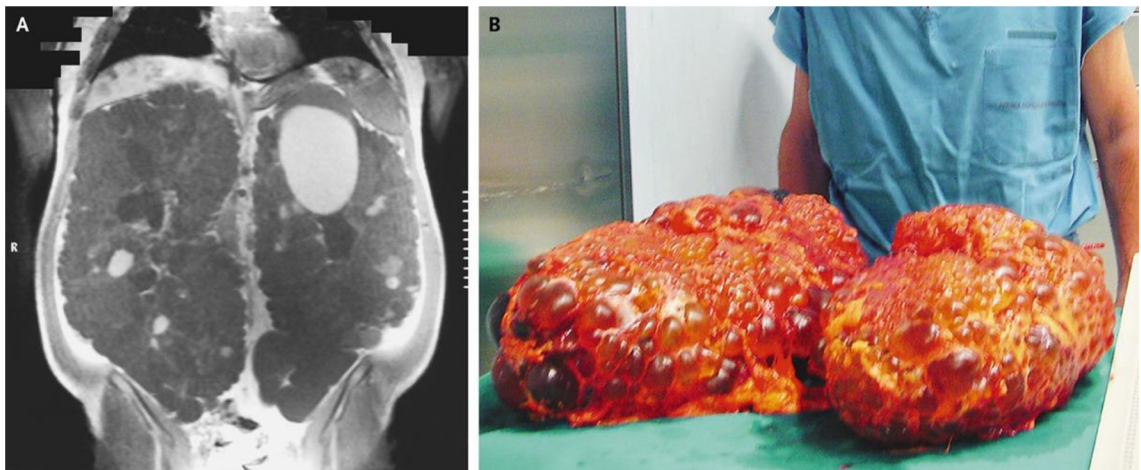
Infekce začíná putováním enterogramnegativní bakterie vzestupně z močového měchýře až do ledvin, kde dále způsobuje akutní pyelonefritidu (Hwang et al., 2013). Rozpoznáním mezi krvácením do cyst a infekci močových cest působící v ledvinách je obtížné, oba renální projevy mají podobné příznaky: bolest v bedrech, horečku a leukocytózu (Merta a Reiterová, 2004). Ale dříve, než se infekce dostane do ledvin, působí v dolních močových cestách s příznaky bolestivého a častého močení v malých objemech. Právě tyto symptomy u krvácení do cyst chybí (Hwang et al., 2013). K rozpoznání dále nepřispívá, že u některých infekci nelze prokázat kultivačním nálezem, protože cysty nemají vývod do močových cest (Bremmer, 2010). Proto se k diagnostice používá CT a US (Hwang et al., 2013). Při léčbě se nasazují lipofilní antibiotika, které prostupují těžko dostupnou tkání ledvin a stěny cyst (Merta et al., 2007). Na základě dané studie se polemizuje, jestli pyelonefritida má vliv na spuštění v cystogenezi buněčnou proliferaci nebo je markerem renální progresse (Hwang et al., 2013).

### **1.7.4 Renální projevy – nefrolitiáza**

Nefrolitiázy, litiázy jsou u nemocných PCHLAD častěji než u zdravých jedinců (Merta et al., 2007). Vytvářejí uráty, které způsobují komplikace častěji než u pacientů s onemocněním PCHLAD bez nich, a to obstrukci močových cest, jenž podporuje infekci, hematurii a bolesti v boku (Nishiura et al., 2009). Faktory, jež ovlivňují vznik nefrolitiázy, litiázy jsou mechanické: „mechanické cysty, dilatované tubuly“ (Merta et al., 2007) a metabolické: hypocitrická acidurie, hyperurikosurie a hyperkalciurie (Torres et al., 1988). Diagnóza se provádí pomocí ultrazvuku (US) a počítačové tomografie (CT) (Nishiura et al., 2009). Léčba se častěji provádí neinvazivní cestou než invazivní (Merta et al., 2007).

### **1.7.5 Renální projevy – zvětšení bolestivých ledvin**

Zvětšení ledvin má několik příčin (Merta et al., 2007). Za prvé se zvětšují růstem cyst. Byl zaznamenána váha ledvin 22 kg ve srovnání s 0,5 kg u zdravého jedince (Ekser a Riggti, 2010). Za druhé se zvětšují přibývajícím věkem a za třetí ovlivňují velikost i již výše uvedené příznaky, jako infekce, nefrolitiáza, krvácení do cyst a ruptura cyst. Velké zvětšení způsobuje komplikace v zažívání a stlačení dolní duté žíly. Jako léčba se podávají antibiotika a dochází k dekompresi cyst ať už laparoskopicky nebo chirurgicky (Merta et al., 2007).



Obrázek č. 4: Zaznamenání pacienta s ledvinami vážící 22 kilogramů (Ze zdroje: Ekser, Rigotti, 2010. [online]. [cit. 2022-08-02].)

### **1.7.6 Karcinom ledvin**

Nádory se neobjevují v porovnání se zdravými lidmi ve značném rozdílu (Merta et al., 2007).

### **1.7.7 Renální projevy – chronické selhání ledvin**

„Dříve než nastane chronické selhání ledvin a před poklesem glomerulární filtrace, dochází k poruše koncentrační, acidifikační schopnosti ledvin se sníženým průtokem krve“ (Merta et al., 2007). Riziko nástupu se zvyšuje věkem. Jen s rozdílem u mutace genu PKD1 o 20 let dřívější nástup chronického selhání ledvin (CHSL) ve srovnání s mutací v genu PKD2 (TORRA et al., 2000). Pokud pacienta postihne chronické selhání ledvin poskytuje se dialyzační léčba. Je možné využívat hemodialýzu i peritoneální dialýzu (Bremmer, 2010). Další komplikace, jako krvácení do cyst, infekce atd. jsou léčeny symptomaticky. V tomto stádiu s průměrným věkem přes 50 let se také

provádí transplantace ledviny bez význačných komplikací ve srovnání mezi jinými pacienty bez PCHLAD po transplantaci (Bremmer, 2010).

### **1.7.8 Extrarenální projevy**

Cysty se mohou objevovat i v jiných orgánech či v pojivových tkáních než v ledvinách. Nejčastěji se vyskytují v játrech a v mozku (Luciano a Dahl, 2014).

### **1.7.9 Extrarenální projevy – Játra**

Cysty v játrech vznikají z biliárních mikrohamartomů (Merta et al., 2007) a epitelu žlučovodů. Jejich výskyt se s věkem zvyšuje, ale není vyloučen nálezný v mladém věku, avšak ženy a starší lidé s chronickým selháním ledvin (CHSL) jsou na cysty náchylnější (Luciano a Dahl, 2014). Cysty rozdělujeme podle lokace výskytu na intrahepatální a periferní (Merta et al., 2007). Klinické příznaky jsou málo výrazné, popisuje se tlak a bolest v břiše (Luciano a Dahl, 2014). „Mohou se dostavit i komplikace ve smyslu infekce, ruptury i krvácení cyst, portální hypertenze. Diagnostika se provádí pomocí ultrazvuku a výpočetní tomografie. Rozdílem cyst v ledvině a v játrech je, že jaterní parenchym se zachovává a játra pouze zvětšují svůj objem“. Léčí se pouze komplikace symptomaticky, na infekci se podávají antibiotika, provádí se dekomprese cyst atd. Dochází i ke transplantaci jater a perkutánní posthepatické drenáži. Pokud se cysty vyskytují pouze v játrech mluvíme o autosomálně dominantní Polycystické chorobě jater (Merta et al., 2007).

### **1.7.10 Extracelulární projevy – Mozek**

V mozku se tvoří mozkové intrakraniální aneurysmaty, které praskají a hrozí intrakraniální krvácení (Luciano a Dahl, 2014). Výskyt aneurysmat je častější u mutace genu PKD2, s průměrným věkem přes 40. let u osob a je doprovázeno hypertenzí, bolestí hlavy, nevolností a zvracením (Schieninik et al., 1992). Prasknutím aneurysmatu může dojít k subarachnoidálnímu krvácení, které ohrožuje život pacienta PCHLAD“ (Merta et al., 2007). U rizikových rodin s rodinou anamnézou se provádí skríninky (Luciano a Dahl, 2014). K diagnostice se používá magnetická rezonance a počítačová tomografie. Riziková aneurysmata se chirurgicky odstraňují (Merta et al., 2007).

### ***1.7.11 Extrarenální projevy – ostatní orgány***

Kromě mozku a jater se cysty vyskytují i v jiných orgánech nebo je nějak ovlivňuje onemocnění PCHLAD. Popsány byli i ve slinivce břišní a sleziny (Merta et al., 2007), jenž ve slinivce způsobují chronickou obstruktivní pankreatitidu (Malka et al., 1998). Dále můžeme najít ve spojení s onemocněním PCHLAD perforace tlustého střeva, pupeční i tříselné kýly, střevní divertikuly a z kardiovaskulárního hlediska abnormality chlopní. Cysty se mohou vyskytovat i v semenných váčcích (Luciano a Dahl, 2014), jenž mohou způsobovat obstrukční azospermii, jinak řečeno cysty se stávají překážkou ve vývodných semenných cestách (Belet et al., 2002).

### ***1.8 Terapie***

Všichni pacienti s doposud nepropuknutým onemocněním s postiženým genem PKD1 nebo PKD2 jsou sledováni a mají nárok na provedení vazebné analýzy. Lék na onemocnění PCHLAD zatím neexistuje, pouze se léčí klinické příznaky spojené s onemocněním (Lariviere et al., 2015). K možné zpomalení progresu onemocnění PCHLAD napomáhá přísná kontrola krevního tlaku, omezení soli (méně než 6 gramů denně), nízký příjem bílkovin (méně než 1 gram na kilogram tělesné hmotnosti), pravidelné cvičení a častý příjem vody. V rámci klinických studií na zvířatech se pro příklad osvědčil antagonist vazopresinu (V2) (Bremmer, 2010) a z dietetického hlediska třeba sója (Merta a Reiterová, 2004). Vzhledem k tomu, že onemocnění je podobné rakovině, testují se různé blokátory, které se používají u nádorových onemocnění (Masyuk et al., 2006), (Merta a Reiterová, 2004). U zvířat se zkoumal inhibitor cest mTOR, jenž pomohl zpomalit vývoj a expanzi cyst se zachováním renální funkcí (Bremmer, 2010).

## **2 Cíl práce a hypotézy**

### **Cíle práce:**

- navrhnout primery pro sekvenování vybraných exonů genu PKD2
- optimalizovat PCR reakci pro navržené primery
- sekvenováním ověřit specifitu navržených primerů

### **Hypotézy:**

- je možné detekovat kauzální mutaci v genu PKD2 pomocí PCR amplifikace exonů?
- je možné použít nově vytvořené a funkční primery k detekci genové mutace na exonu 2 i u ostatních členů rodiny, kteří zatím neprošli mutační analýzou?

### 3 Metodika

Praktickou část této práce jsem prováděl ve školních laboratořích na Zemědělské fakultě na Jihočeské univerzitě v Českých Budějovicích.

#### 3.1 Návrh primerů

K návrhu jsem použil sekvenci celého genu PKD2 z databáze NCBI (PKD2 polycystin 2, transient receptor potential cation channel [Homo sapiens (human)] - Gene-NCBI (Benson et al., 2018).

Pro alignment sekvencí a zobrazení sekvencí jednotlivých exonů jsem použil program Geneious prime (Biomatters, Nový Zeland). Forward i reverse primery jsem tvořil „ručně“ tak, aby ohraničovaly celý exon a několik přilehlých nukleotidů, jejichž mutace také může ovlivnit transkripci daného exonu. K analýze tvorby vlásenek a dimerů z navržených oligonukleotidů jsem použil nástroj na webových stránkách <https://eurofinsgenomics.eu>: Oligo Analysis Tool a k ověření specifity primerů jsem použil a BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (Madden T., 2002). Posléze byly primery objednány u firmy IDT (Belgie)

#### 3.2 Izolace DNA z bukálních stěrů

K izolaci a ověření funkce primerů jsem obdržel 4 bukální stěry rodičů a dvou jejich dětí. V případě této rodiny se jedná o otce s polycystickými ledvinami, zdravou matkou a děti s neznámou diagnózou. Průběh onemocnění u otce odpovídá mutaci v genu PKD2. v následujících odstavcích a ve vyhodnocení je budu označovat číselně od 1 do 4. Pro izolaci jsem používal kit od firmy GENE AID. Níže popisuji celý postup izolace.

Tabulka č. 1: Seznam a označení použitých vzorků. (Vlastní zdroj)

Rodina	Číslo
Dcera 1	1
Otec	2
Dcera 2	3
Matka	4

Před vortexem jsem napipetoval 500 pufu S1 a 20 µl proteinázy K do centrifugační zkumavky. Po přidáním ustříhnutých bukálních stěrů se uvolnili buňky krouživými pohyby a centrifugační zkumavky jsem opět zvortexoval po vytáhnutí stěrů. Proběhla inkubace mikrozukavky 10 minut v 60 °C. K inkubovanému vzorku jsem

vložil kolonku Filter Column s kartáčkem s centrifugací na 2 minuty. Do nové zkumavky jsem přidal 500  $\mu$ l pufru S2 a 1  $\mu$ l Carrier RNA. Přimíchal jsem k inkubovaným vzorkům a zvortexoval. Následně jsem provedl opět inkubaci 5 minut při 60 °C, vortex a zase inkubaci 5 minut při 60 °C. Dále jsem přidal absolutní ethanol v obsahu 500  $\mu$ l a vortexoval 10 sekund. Přes novou GD kolonku v nový sběrný zkumavce jsem přefiltroval a centrifugoval na 1 minutu starý vzorek. Centrifugace se opakovala, pokud vzorek neprotekl celý přes kolonku. Poté jsem kolonku promýval různými pufrů. Vyměnil jsem novou sběrnou zkumavku, a jako první připipetoval 400  $\mu$ l pufru W1 s centrifugoval na 30 sekund, za druhé jsem promýval 600  $\mu$ l Wash pufru s centrifugací 30 sekund. Z důvodu vysušení vzorku jsem provedl centrifugaci na 3 minuty. Mezitím jsem si připravil do nové zkumavky 100  $\mu$ l elučního pufru pro každý vzorek, který se předeheřál na 60 °C. Jako poslední krok jsem přidal 100  $\mu$ l elučního pufru přes kolonku do nové mikrozukavky a centrifugoval 1 minutu. Tímto krokem jsem připravil DNA 4 lidí.

### **3.3 Koncentrace a čistota získané DNA**

Měření koncentrace a čistoty izolované DNA jsem prováděl na přístroji BioSpec nao Micro-volume UV-Vis. Spektrofotometr od firmy Shimadzu. K využití jsou 2 vlnové délky. První, kterou jsem použil ve své práci, 260-280 nm se používá k posouzení čistoty DNA a RNA a druhou vlnovou délkou 260/230 nm se měří kontaminace a čistota až druhotně. Jako první jsem ověřil čistý eluční pufr (blank), čímž se provede kalibrace přístroje pro měření vzorku konkrétních vzorků. Vložením 1  $\mu$ l vzorku na čočku nám přístroj vyhodnotil koncentraci a čistotu, každého vzorku.

### **3.4 Ředění primerů**

Po zkontrolování nově příchozích primerů se každý primer ředil 250  $\mu$ l H<sub>2</sub>O a vložil do termobloku na 20 minut o teplotě 37 °C. Z toho zásobního roztoku jsem vytvořil pracovní roztok smícháním 90  $\mu$ l H<sub>2</sub>O s 10  $\mu$ l čistého primeru. Zásobní roztoky se skladovaly v mrazáku a pracovní v lednici, které se používaly na polymerázové řetězové reakce (PCR).

### **3.5 Polymerázová řetězová reakce (PCR)**

Pro první testování nově vytvořených primerů jsem použil grandientovou PCR, za účelem zjištění optimální teploty. Teploty testované pro nasedání primerů byly byly 54

°C, 56 °C, 58 °C, 60 °C a 61,5 °C po dobu 1 minuty. Před nasedáním primerů proběhla denaturace při 94 °C, elongace při 72 °C a finální elongace při 72 °C. Denaturace, annealing i elongace se střídaly po 1 minutě a 30krát se tento cyklus opakoval.

Tabulka č. 2: Složení mixu pro gradientovou PCR. (Vlastní zdroj)

Složení PCR reakce	
Master Mix	5 µl
PCR H <sub>2</sub> O	3,5 µl
Forward primer	1,5 µl
Reverse primer	1,5 µl
DNA	1 µl

Celkově byla směs namíchána dohromady na 6 vzorků PCR, aby se do každé z 5 mikroskopavek napipetovalo dostatečné množství směsi. Po zjištění optimální teploty byla provedena konvenční PCR bez gradinetu s vybranou jednou teplotou pro každý pár primerů.

Tabulka č. 3: Složení mixu pro konvenční PCR. (Vlastní zdroj)

Složení PCR reakce pro následné sekvenování	
Master Mix	25 µl
PCR H <sub>2</sub> O	43,75 µl
Forward primer	3,125 µl
Reverse primer	3,125 µl
DNA	2,5 µl

Ze směsi jsem po hotové PCR použil 10 µl na elektroforézu pro kontrolu přítomnosti fragmentu a dalších 10 µl jsem přepipetoval s 5 µl forward primerem do mikroskopavky na sekvenaci. Vzorky jsem následně odeslal do firmy SEQME (Česká republika), kde byla vlastní sekvenace provedena. Výsledné sekvence mi byly zaslány e-mailem.

### 3.6 Elektroforéza

Agarózový gel 1,5 % v elektroforetické vaně se připravoval navážením 1,5 gramu práškové agarózy smícháním se 100 ml TBE pufru v Erlenmayerově baňce. Směs se zahřála do bodu varu v mikrovlnce a po zchladnutí jsem přidal 5 µl etidium bromid, zamíchal a nalil do elektroforetické vany s hřebínkem, špičkou odstranil bubliny a nechal ztuhnout cca 15 minut. Poté byl gel připraven k elektroforéze, vyndal se hřebínek a do jamek se pipetoval PCR produkt s obsahem 10 µl a po stranách velikostní marker (ladder). Elektroforézu jsem zapínal na 120 V po dobu 20 minut. Vyhodnocení probíhalo pod UV světlem ve vizualizačním zařízení propojeném s fotoaparátem.



### **3.7 *Vyhodnocení sekvencí DNA***

Získané sekvence byly vyhodnoceny a porovnány v programu Geneious Prime (Biomatters, Nový Zeland).

## 4 Výsledky

### 4.1 Tabulka navržených primerů

V tabulce uvádím všechny mnou navržené, objednané a vyzkoušené primery. Tabulka č. 4 Seznam navržených primerů. (Vlastní zdroj)

Exon	Forward primer	Reverse primer
5A	GGTCAGGCACAGTACCCAGC	CGGATAGCAAGGGAGGGG
5B	CCTAAAGAGGCTAATAACAG	GGCTTACCGAAATAAAGGAT
6A	TTGAGCAGCGTAAATATAGA	CCCCCTCAATTATATCAACT
6B	GATGGCACAAAATTCTCC	CTCAATTATATCAACTTCTGTT
6C	GACTGAAAGACCTCAGGAAG	TCCCCCTCAATTATATCAACTT
6D	GATGGCACAAAATTCTCC	CCCCCTCAATTATATCAACT
6E	GACTGAAAGACCTCAGGAAG	CCCCCTCAATTATATCAACT
8A	TGCAGCCATCGCCATTA	GATAGCAGCCCAAAGTA
8B	GTGCAGCCATCGCCATTA	CCCATGCAAAGAAGACAAT
9	TCTGTTATTCGGCAGCTACC	AAGTGTGGATGTTGGAAAAC
14A	TCCGAGAGTTAATCTGTAA	TTTCTCTGAAACAGAAACACT
14B	GAATGTCTAACTAAAGG	TTTCTCTGAAACAGAAACACT
14C	CTCCTACCAGCGGCAT	TTTCTCTGAAACAGAAACACT
14D	CCGAGAGTTAATCTGTAA	TAATACTCCATATGCTAATG
14E	AGGCTAATAACAGTATGAG	TTTCTCTGAAACAGAAACACT

### 4.2 Další použité primery

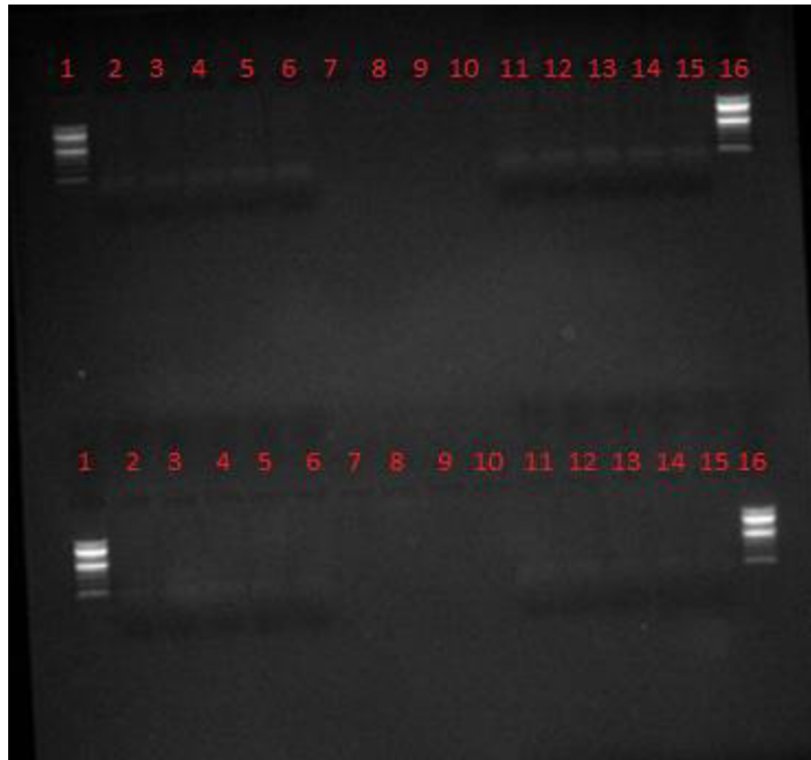
Tabulka č. 5 Seznam dalších použitých, mnou nenavrhaných primerů (navrhla Dr. Hoštičková). (Vlastní zdroj)

Exon	Forward primer	Reverse primer
2A	CATTGGAGCCAGATGTACTCT	CTTCCCAGTTGCCCTCTGGTGC
2B	CCCTTTTGCCATTCATGAGAT	GAACAAATCACGTCCCTTCTC
3	GTGAAGGCTGCTGGTATGTG	GCAAGGCACAGGCAAAGTTCTC
5C	CCAGGTCAGGCACAGTACCCAGC	TCCGTCTGGGTCCTTGGCATCC

### 4.3 Vyhodnocení gradientové PCR a optimalizaci primerů

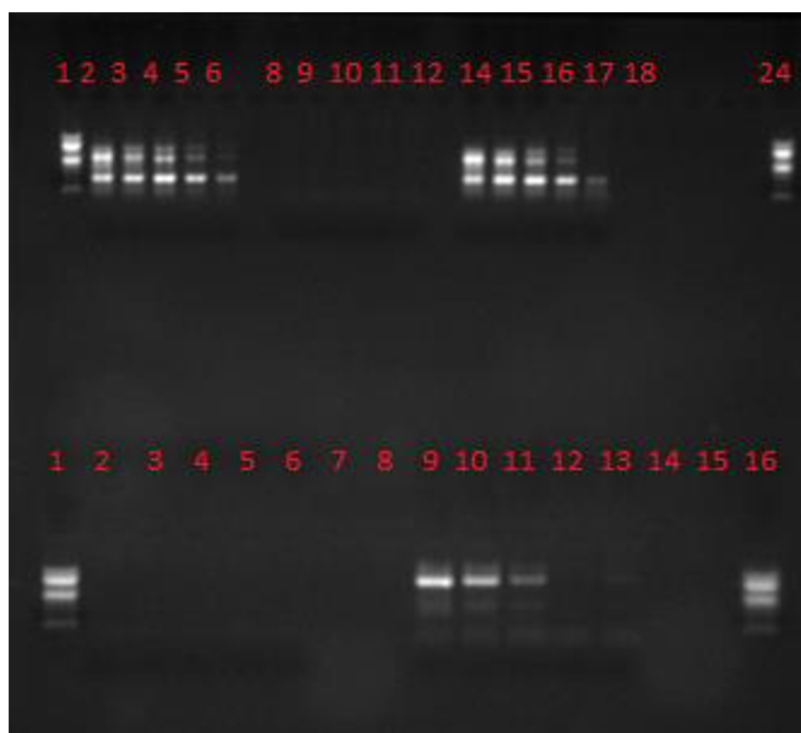
Ze všech mých navržených primerů se buď fragmenty nevytvořily nebo se vytvořilo více fragmentů. Fungovaly pouze primery navržené paní doktorkou Hoštičkovou s exony 2A, 2B, 3, 5C. Pokusil jsem se eliminovat potencionální chyby při návrhu, ale i přesto mi primery od exonu 5 do 14 nefungovaly pro sekvenaci.

Na obrázku č. 4 jsem testoval primery exonu 8 označené variantou A i B, jako templát jsem použil DNA otce a matky. Primery 8A jsem pipetoval do sloupců 2-6 a primery 8B do sloupců 11-15. Ladder 100 bp byl aplikován do jamek 1 a 16. V prvním řádku byly použity vzorky s otcovo DNA a ve spodním řádku s matčinou DNA. V případě této gradientové PCR mi ve všech 4 případech nevyšel žádný fragment, jen je v pozadí vidět stín.



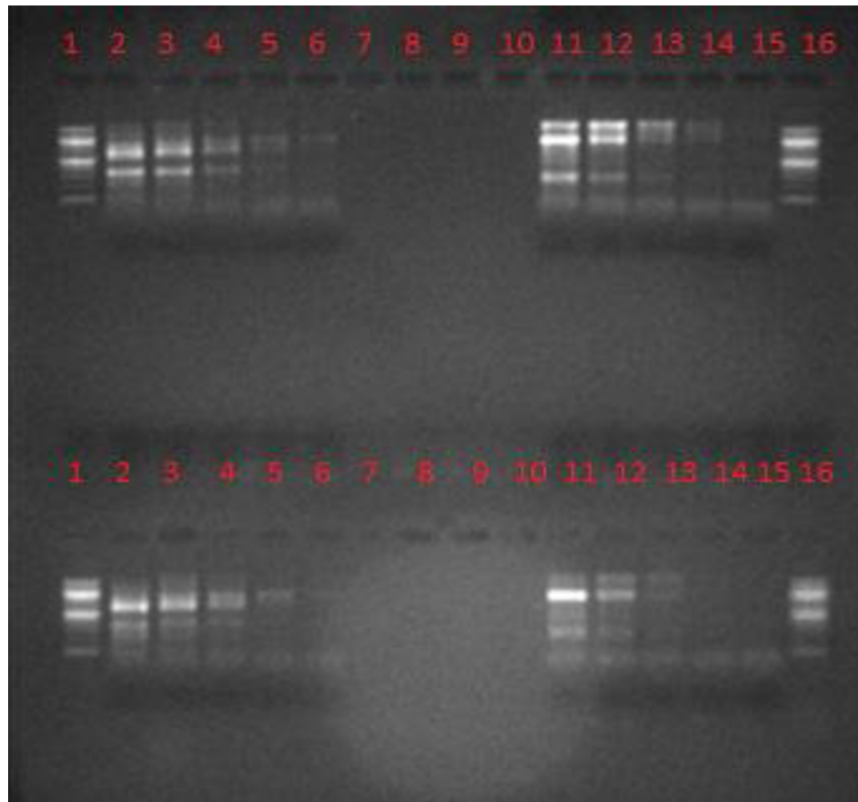
Obrázek č. 4: Elektroforetický snímek gradientové PCR pro testování primerů exonu 8 – varinta 8A (ve sloupcích 2-6), varinta 8B (ve sloupcích 11-15). Sloupce č. 1 a 16-100 bp ladder, teploty nasedání primerů: 54 °C (2,11), 56 °C (3,12), 58 °C (4,13), 60 °C (5,14) a 61,5 °C (6,15). (Vlastní zdroj)

Výsledek amplifikace s primerem 5A je vyobrazen na obrázku č. 5 ve sloupcích 2-6 a 14-18 na prvním řádku. U obou DNA – otce i matky se tvoří především 2 větší fragmenty a další menší, proto se v dalším postupu nedají použít. Fragменты s primerem 5B ve sloupcích 8-12 na prvním řádku a 2-6 na druhém řádku se vůbec nevyskytují s DNA matky ani otce. Nejlépe vypadající 1 hlavní fragment a v pozadí menší má primer 14C ve druhém řádku ve sloupci 9-14. I přes poměrně „vydařený“ fragment s malými fragmenty v pozadí, tento primer k sekvenaci není vhodný. Celkově se při zvyšující se teplotě nasedání primerů snižuje počet nespecifických fragmentů.



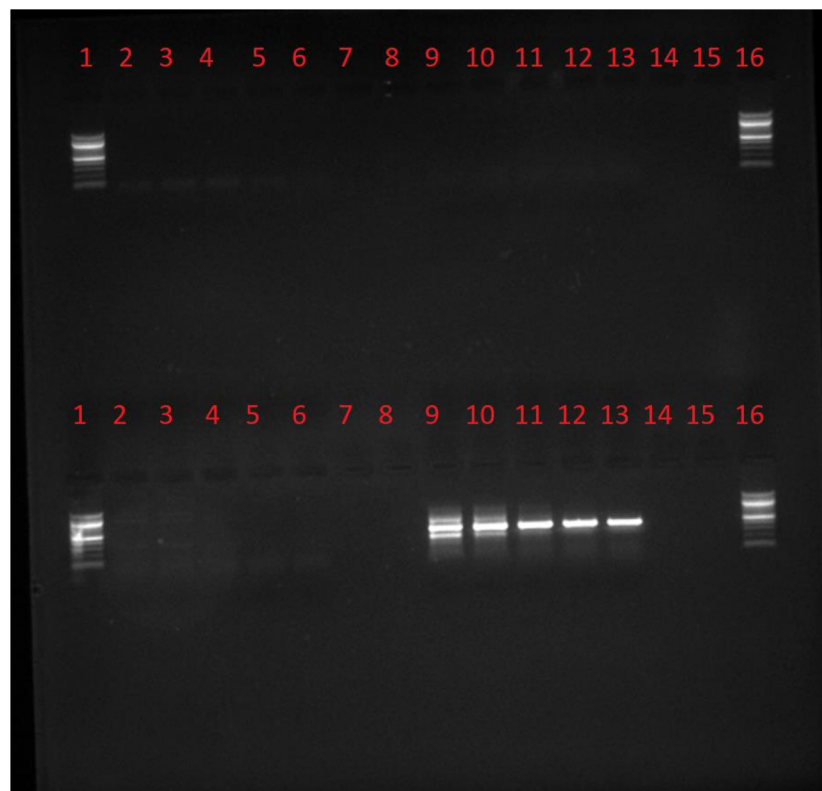
Obrázek č. 5: Elektroforetický snímek gradientové PCR pro testování primerů exonu 5 a 14 – varianta 5A (ve sloupcích 2-6 a 14-18 v prvním řádku), varianta 5B (ve sloupcích 8-12 na prvním řádku a 2-6 na druhém) a exonu 14 varianta 14C (na druhém řádku ve sloupcích 9-13). Sloupce č. 1 a 24; 1 a 16–100 bp ladder, teploty nasedání primerů: 54 °C (2, 8, 14 v prvním řádku a 2, 9 v druhém), 56 °C (3, 9, 15 v prvním řádku a 2, 10 v druhém), 58 °C (4, 10, 16 v prvním řádku a 4, 11 v druhém), 60 °C (5, 11, 17 v prvním řádku a 5, 13 v druhém) a 61,5 °C (6, 12, 18 v prvním řádku a 6, 13 v druhém). (Vlastní zdroj)

Obrázek č. 6 je rozdělen na 2 řádky, první obsahuje k testování otcovu DNA a druhá matčinu DNA. Ve sloupcích 2-6 byly aplikovány vzorky s primery exonu 14 varianty 14D ve sloupcích 11-15 primery exonu 14 varianty 14E. Ve všech jamkách s PCR produktem se vyskytuje více fragmentů a se vzrůstající teplotou úplně mizí. Proto jsem primery pro exon 14d a 14e nemohl použít na případnou sekvenaci.



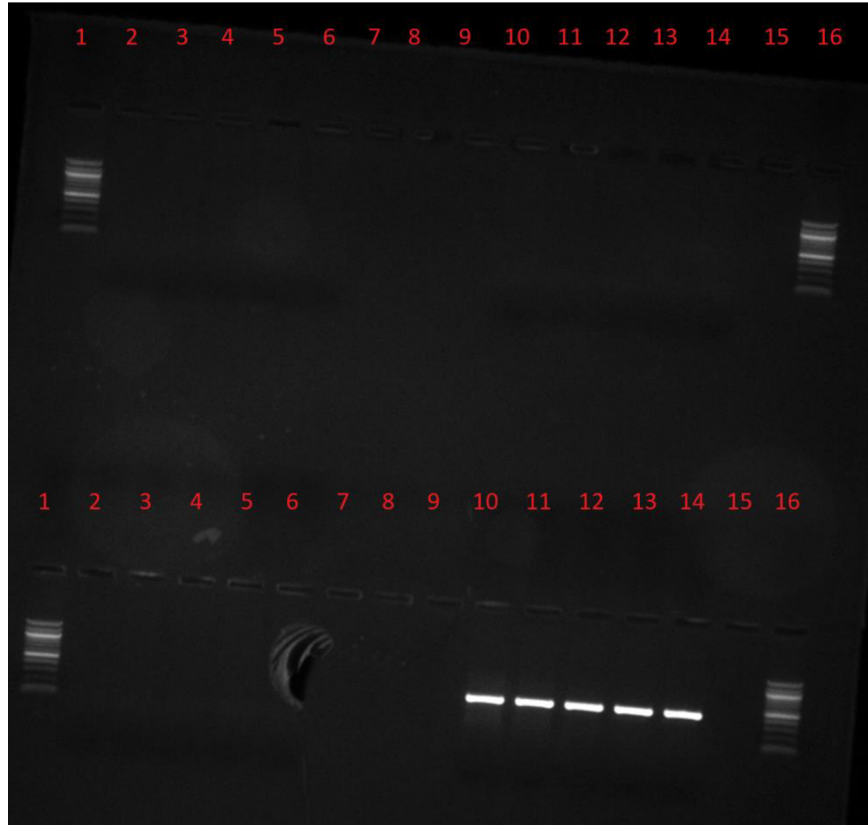
Obrázek č. 6: Elektroforetický snímek gradientové PCR pro testování primerů exonu 14 varianta 14D (ve sloupcích 2-6) a varinata 14E (ve sloupcích 11-15). Sloupce č. 1 a 16–100 bp ladder, teploty nasedání primerů: 54 °C (2, 11), 56 °C (3, 12), 58 °C (4, 13), 60 °C (5, 14) a 61,5 °C (6, 15). (Vlastní zdroj)

Na obrázku č. 7 mám zaznamenány výsledky amplifikace s primery 6A a 14A v prvním řádku, a na druhém 14B a 5C. Primery jsou testovány s DNA otce. První skupina vzorků s primery 6A má matný stín kolem 100 bp, jedná se nejspíš o kontaminaci. U druhé skupiny s primery 14A ve sloupcích 9-13 se fragmenty nevyskytují. Třetí skupina vzorků s primery 14B má nejasně ohraničené fragmenty kolem 100 bp, 300 bp a přes 500 bp. Avšak ani jedny primery se nedají použít k dalšímu kroku, kromě posledního páru primerů 5c. S nižší teplotou se rozštěpuje na nižší fragmenty, ale u teploty 61,5 °C ve sloupci 13 v druhém řádku fragment kolem 500 bp vypadá dobře a v následujícím sekvenování tento primer použiju.



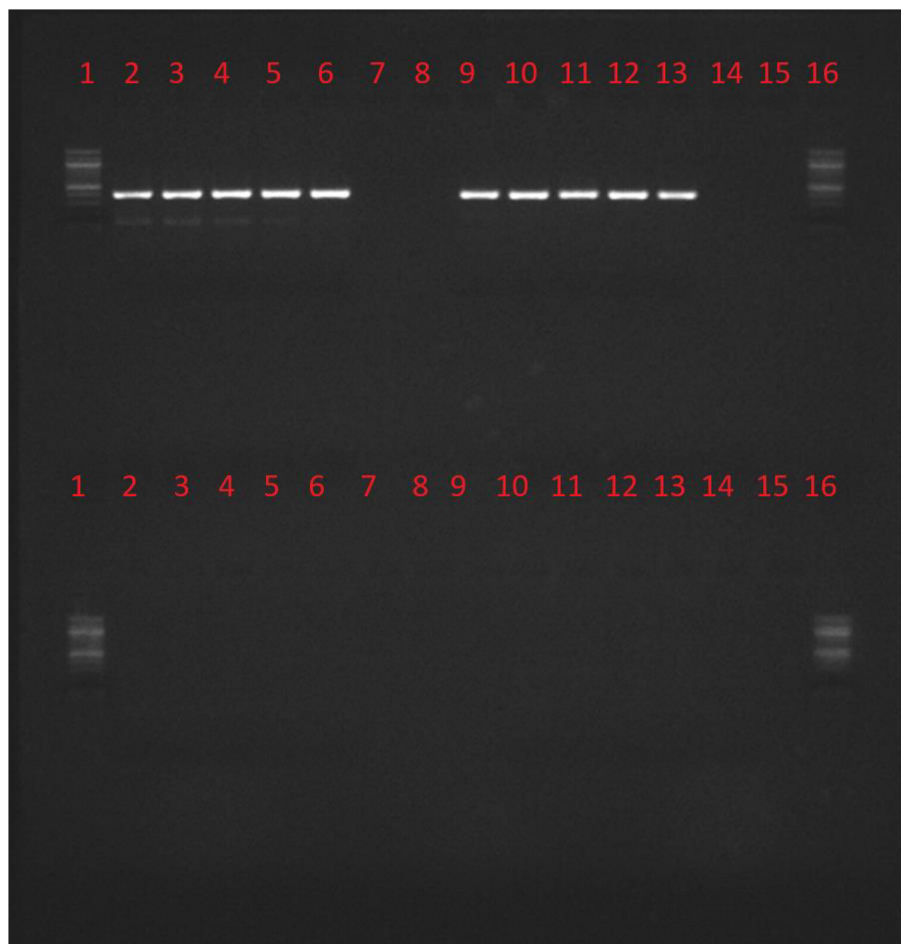
Obrázek č. 7: Elektroforetický snímek gradientové PCR pro testování primerů exonu: 6, 14 a 5 - varinata 6A (ve sloupcích 2-6); exonu 14 - varianta 14A (ve sloupcích 9-13) na prvním řádku, varianta 14B (ve sloupcích 2-6) a exonu 5- varinata 5C (ve sloupcích 9-13) na druhém řádku. Sloupce č. 1 a 16–100 bp ladder, teploty nasedání primerů: 54 °C (2, 9), 56 °C (3, 10), 58 °C (4, 11), 60 °C (5, 12) a 61,5 °C (6, 13). (Vlastní zdroj)

Kromě primeru 3 se na obrázku č. 8 produkty PCR s použitými primery 6B, 6C i 9 nevyskytují v elektroforetickém gelu. Všechny primery byly zkušeny otcovou DNA. Primeru 3 vyhovují všechny teploty. Fragment bez štěpení, kontaminace se nachází kolem 400 bp.



Obrázek č. 8: Elektroforetický gel gradientové PCR pro testování primerů exonu 6, 9, 3 - varianta 6B (ve sloupcích 2-6), varianta 6C (ve sloupcích 10-14) na prvním řádku a varianta 9 (ve sloupcích 2-6) a varianta 3 (ve sloupcích 10-14) na druhém řádku. Sloupce č. 1 a 16–100 bp ladder, teploty nasedání primerů: 54 °C (2, 10), 56 °C (3, 11), 58 °C (4, 12), 60 °C (5, 13) a 61,5 °C (6, 14). (Vlastní zdroj)

Primery 2A i 2B ohraničují a vytvářejí čisté fragmenty bez štěpených fragmentů kolem 400 bp, ideální pro všechny zkoušející teploty v prvním řádku. I když u primeru 2A je vidět kolem 100 bp stín fragmentu, který se ze zvyšující teplotou nasedání vytrácí. Ostatní primery 6D a 6E nevytváří žádné fragmenty.



Obrázek č. 9: Elektroforetický snímek gradientové PCR pro testování primerů exonu 2, 6 - varianta 2A (ve sloupci 2-6), varianta 2B (ve sloupci 9-13) na prvním řádku, varianta 6D (ve sloupci 2-6) a varianta 6E (ve sloupci 9-13) na druhém řádku. Sloupce č. 1 a 16 – 100 bp ladder, teploty nasedání primerů: 54 °C (2, 9), 56 °C (3, 10), 58 °C (4, 11), 60 °C (5, 12) a 61,5 °C (6, 13). (Vlastní zdroj)

Shrnutím výsledků a vyhodnocením gradientové PCR jsem mnou navržené fragmenty vyřadil z dalšího použití pro jejich nespecifickost a neamplifikovatelnost. Pro další část praktické práce jsem použil primery paní doktorky Hoštičkové (2A, 2B, 3, 5C), které vytvářejí specificky amplifikované fragmenty.

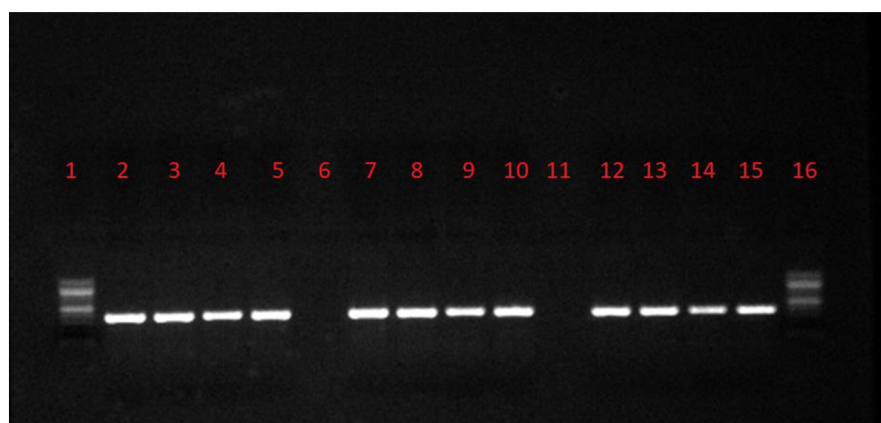


#### 4.4 PCR pro následnou sekvenaci DNA

Pro první a poslední jamku jsem napipetoval ladder (marker) 100 bp. V obrázku 6 mi vyšel elektroforeogram se 3. různými páry primerů. Pár primerů 2A se nachází ve sloupcích 2-5, pár 2B ve sloupcích 7-10 a pár 3 ve sloupcích 12-15. Band je čistý bez žádné nespecifické amplifikace v jedné úrovni o velikosti přes 400 bp s teplotou nasedání primerů 61,5 °C. Pro každý pár primerů byly použity všechny vzorky DNA (celé rodiny).

Tabulka č 6: Rozřazení DNA a primerů ke sloupcům na obrázku č. 10.

Sloupce	DNA	Primery
1	-	-
2	dcera 1	2A
3	otec	2A
4	dcera 2	2A
5	matka	2A
6	-	-
7	dcera 1	2B
8	otec	2B
9	dcera 2	2B
10	matka	2B
11	-	-
12	dcera 1	3
13	otec	3
14	dcera 2	3
15	matka	3
16	-	-



Obrázek č. 10: Elektroforetický snímek konvenční PCR – kontrola před přípravou vzorků na sekvenování. Ve sloupcích 2-6 - primer 2A, ve sloupcích 7-10 - primer 2B, ve sloupcích 12-15 - primer 3. Ladder 100 bp - jamky 1 a 16. Teplota nasedání primerů – 61 °C. (Vlastní zdroj)

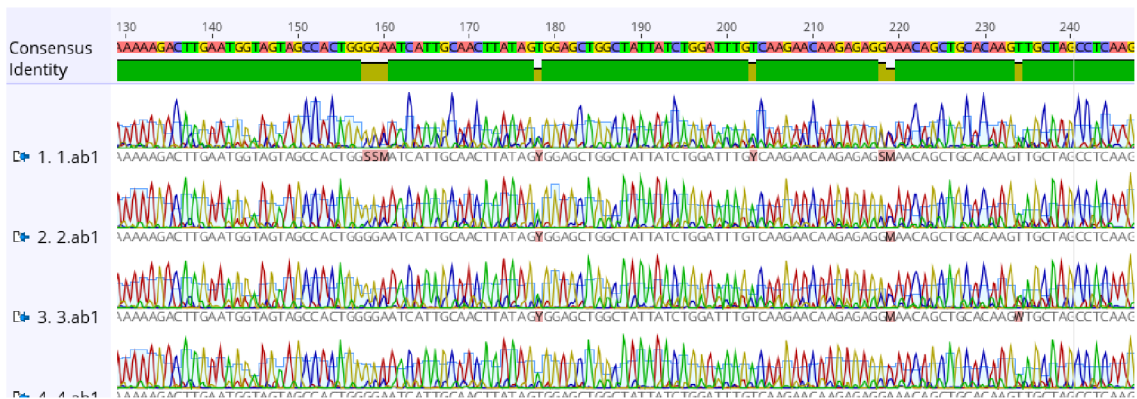
Pro amplifikaci vzorků DNA z celé rodiny na obrázek č. 11 byl použit primer 5C. Velikost amplifikovaných fragmentů se nachází kolem 500 bp. Teplota annealingu byla 61,5 °C.



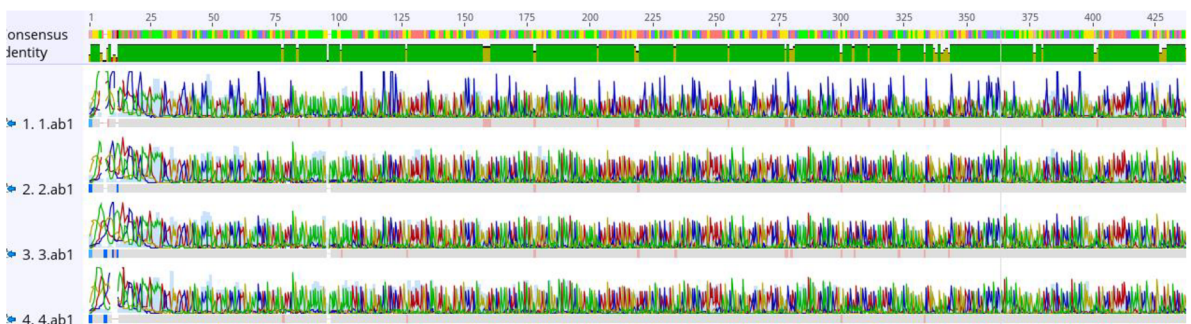
Obrázek č. 11: Elektroforetický snímek konvenční PCR – kontrola před přípravou vzorků na sekvenování. Primeru 5C ve sloupcích 2, 4, 6 a 8. DNA dcera 1 – sloupec 2, otec – sloupec 4, dcera 2 – sloupec 6, matka – sloupec 8. Teplota nasedání primerů - 61,5 °C. (Vlastní zdroj)

#### 4.5 Výsledky sekvenací primeru exonu 2a, 2b, 3 a 5a.

U všech členů rodiny po srovnání získaných sekvencí se kauzální mutace v exonu 5 ohraničené primerem 5C nevyskytuje. Sekvence bází se nepřekrývají, nedochází zde k posunu čtecího rámce, delecím, substitucím a dalším variantám vniku poškození genomu.

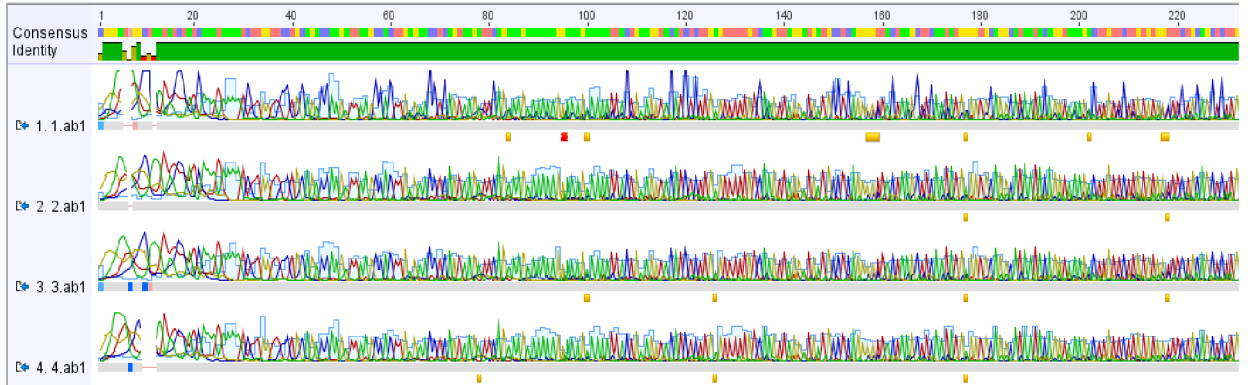


Obrázek č. 12: Sangerova metoda sekvenování exonu 5 s primerem 5C. DNA vzorek 1 – dcera 1, vzorek 2 – otec, vzorek 3 – dcera 2, vzorek 4 – matka. (Vlastní zdroj)



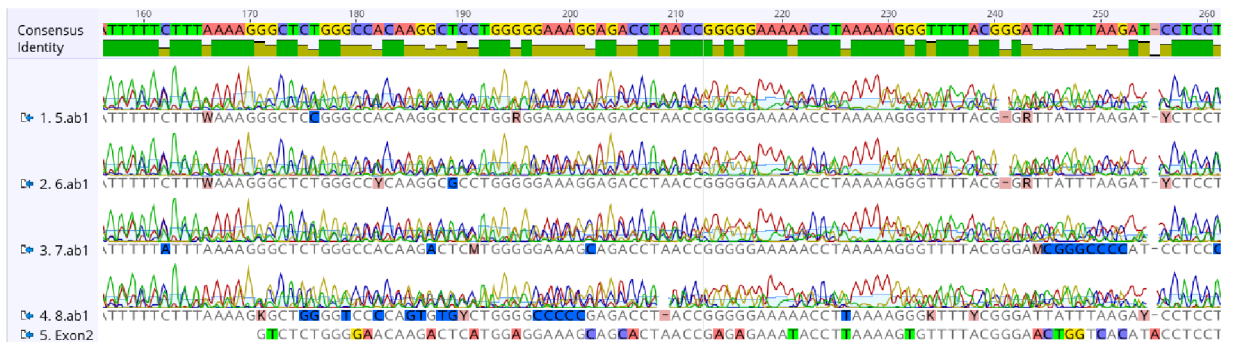
Obrázek č. 13: Sangerova metoda sekvenování exonu 5 s primerem 5C. DNA vzorek 1 – dcera 1, vzorek 2 – otec, vzorek 3 – dcera 2, vzorek 4 – matka. (Vlastní zdroj)

U všech členů rodiny po srovnání získaných sekvencí se kauzální mutace v exonu 3 ohraničené primerem 3 se opět nevyskytuje. Sekvence bazí se nepřekrývají, nedochází zde k posunu čtecího rámce, delecím, substitucím a dalším variantám vzniku poškození genomu.

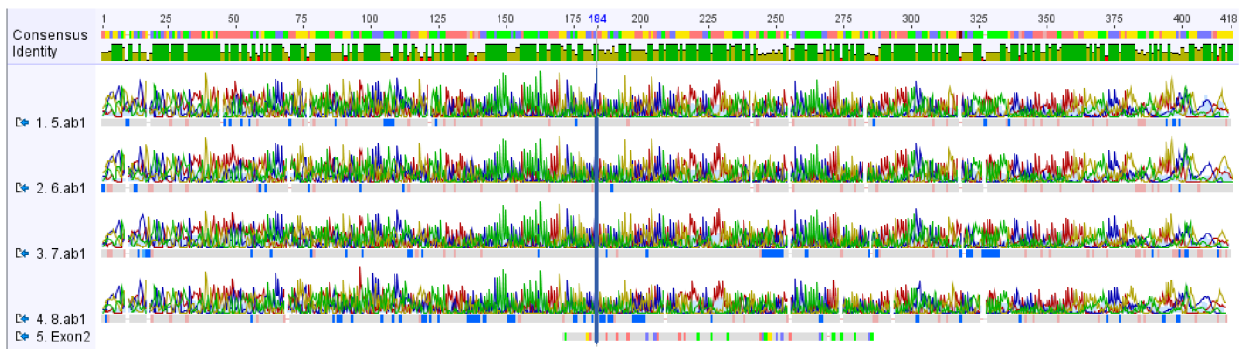


Obrázek č. 14: Sangerova metoda sekvenování exonu 3 s primerem 3. DNA vzorek 1 – dcera 1, vzorek 2 – otec, vzorek 3 – dcera 2, vzorek 4 – matka. (Vlastní zdroj)

Exon 2 ohraničený primerem 2A není k přečtení z důvodu překrytí sekvencí přes sebe. Proto se sekvence nedá vyhodnotit.

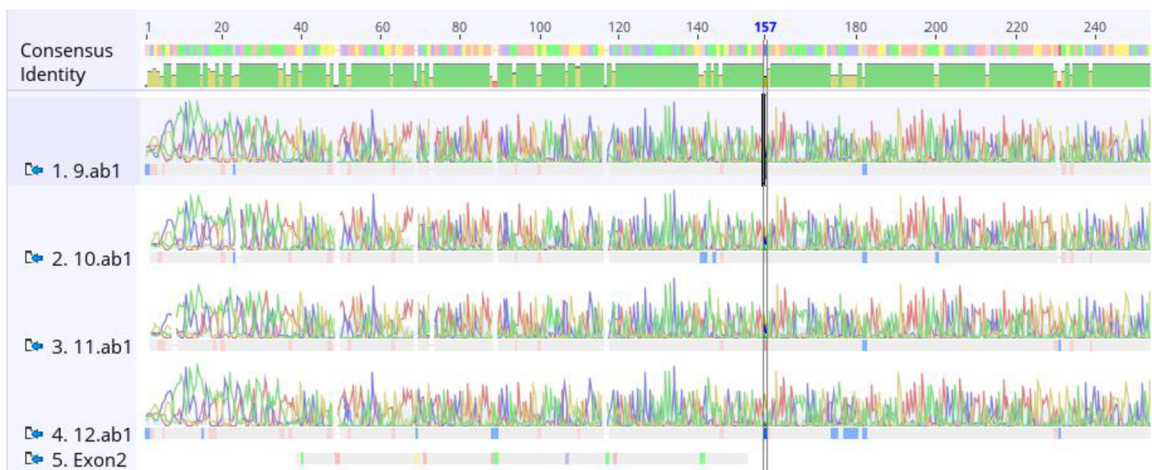


Obrázek č. 15: Sangerova metoda sekvenování exonu 2 s primerem 2A. DNA vzorek 1 – dcera 1, vzorek 2 – otec, vzorek 3 – dcera 2, vzorek 4 – matka. Znázorněna nečitelnost sekvence. (Vlastní zdroj)

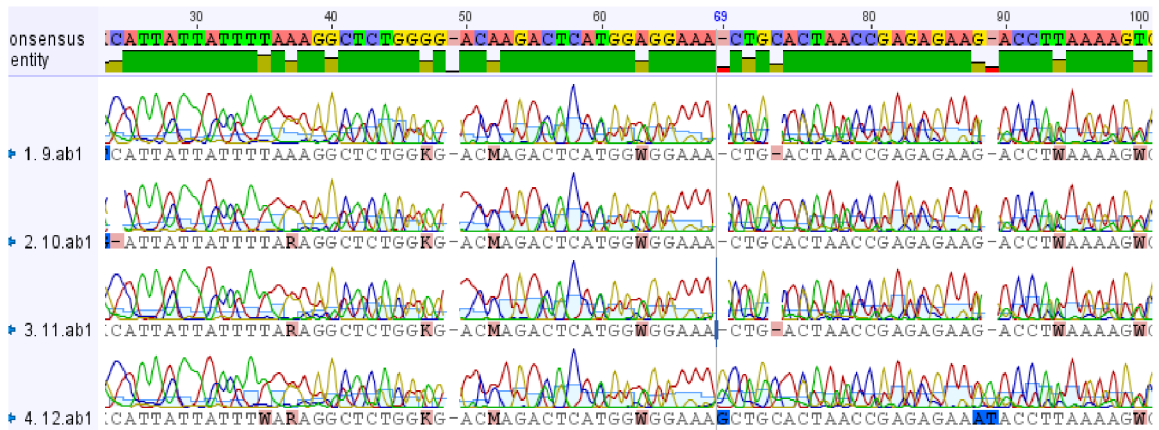


Obrázek č. 16: Sangerova metoda sekvenování exonu s 2 primerem 2A. DNA vzorek 1 – dcera 1, vzorek 2 – otec, vzorek 3 – dcera 2, vzorek 4 – matka. (Vlastní zdroj)

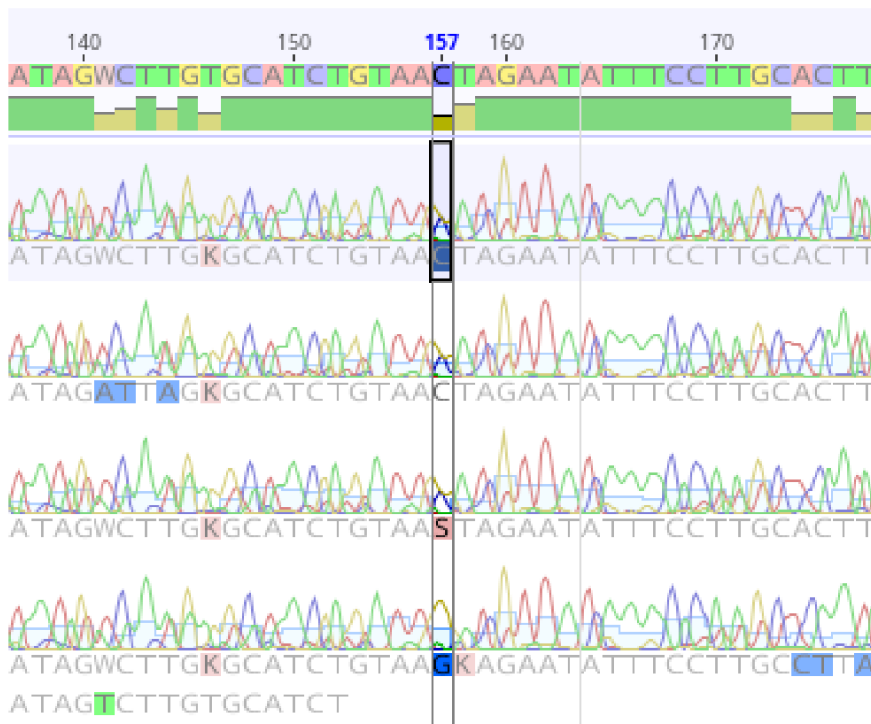
Sekvence fragmentů exonu 2 ohraničených primery 2B se nepřekrývají. Kromě několika delecí v sekvencích celé rodiny (srovnáno s referenční sekvencí z databáze NCBI), se vyskytnou i delece u otce, a potomku, zatímco u matky ne (pozice 69, 89), dále jsem našel na obrázku č. 14 konkrétní mutaci – záměna báze G za C u otce a potomků, jenž může způsobit onemocnění PCHLAD.



Obrázek č. 17: Sangerova metoda sekvenování exonu 2 s primerem 2B. DNA vzorek 1 – dcera 1, vzorek 2 – otec, vzorek 3 – dcera 2, vzorek 4 – matka. (Vlastní zdroj)



Obrázek č: 18 Sangerova metoda sekvenování exonu 2 s primerem 2B. Vzorek 1 – dcera 1, vzorek 2 – otec, vzorek 3 – dcera 2, vzorek 4 – matka. Delece na pozici 69 a 89. (Vlastní zdroj)



Obrázek č: 19 Sangerova metoda sekvenování exonu 2 pomocí primeru 2B. Bodová mutace G>C označená v oficiální zprávě z vyšetření otce v centru lékařské genetiky v ČB, jako kauzální pro onemocnění PCHLAD. (Vlastní zdroj)

## 5 Diskuze

Polycystická choroba ledvin s frekvencí výskytu kolem 1:1000 živě narozených dětí (Reeders ST et al., 1985) je poměrně časté, a u genu PKD1 s dřívějším nástupem renální insuficience, vážné onemocnění (Merta et al., 2007). Jedna z možností diagnostiky je mutační analýza (Pei a Watnick, 2010) a kromě běžných používaných laboratorních metod s vysokým procentem zaznamenání mutace (Liu, 2015), se dá použít i PCR amplifikace (Merta a Reiterová, 2004).

Pro začátek praktické práce jsem se pokusil vytvořit primery pro exony genu PKD2 5-14 a navázat tak na kvalifikační práci Bc. Sládkové (Sládková, 2020), která vyzkoušela navržené primery dr. Hoštičkovou pro exony 1-5. Navrhnutí a optimalizace mých primerů se neobešlo bez potíží. Ze všech 15 párů primerů neobstál ani jeden. Buď nebyl po gradientové PCR zaznamenán žádný fragment, nebo tam byl pouze náznak fragmentu ve formě stínu v pozadí, jedná se o primery 5B, 8A, 8B, 6A, 14A, 14B, 6B, 6C, 9, 6D a 6E. Zbylé primery 5A, 14C, 14D, 14e amplifikovaly více fragmentů, proto se žádné mé navržené primery nedaly použít při sekvenaci. A důvod? Pravděpodobně mohlo dojít u primerů ke špatnému navrhnutí, i když jsem je opětovně po negativním výsledku ověřoval a v programech Oligo Analysis Tool (eurofinsgenomics.eu) a BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (nih.gov) (Madden T., 2002). I přes uspokojivé výsledky analýzy nám tyto programy nezaručí 100% úspěšnost nasedání a ohraničení správného úseku DNA. Druhý důvod mohl být nedostatečně provedená příprava (např. krátký čas rozpouštění dodaných lyofilizovaných primerů, popř. kontaminace PCR mixu nebo i chybná syntéza primerů ze strany dodavatelské firmy). I přes to, že jsem u pár primerů zkusil opakovat pokus, zkoušel jsem různé kombinace forwardů s reverse primery stejného exonu, přesto výsledek byl stejný. Na obrázcích č. 5 a 6 můžeme vidět více fragmentů, které postupně mizí se zvyšující se teplotou nasedání primerů, dá se předpokládat, že zde byly amplifikovány jiné nespecifické fragmenty DNA. Pokusil jsem se i o gradientovou PCR a vyhodnocení sekvenování již použitých primerů, které navrhla paní doktorka Hoštičková (2A, 2B, 3, 5C) a porovnal je s výsledky použité v kvalifikační práci Bc. Sládkové (Sládková, 2020). Sekvence exonů 3 a 5 jsou obdobné, dobře čitelné, bez nálezu kauzální mutace, amplikony primerů 2A ohraničujících exon 2 nejsou dobře čitelné, jelikož se překrývají sekvence bází a proto se primerový pár 2A nedá použít k hodnocení exonu 2. Možná by výsledky byly lepší po úpravě podmínek PCR (snížení/ zvýšení obsahu hořčíku, či

snížení/zvýšení teploty nasednutí primerů). Všechny tyto výsledky máme podobné až na primerový pár 2B, pomocí kterého se mi podařilo dobře osekvenovat exon 2 a k vidění na obrázku č.18 jsou delece u potomků a otce. Tento nálezn dokládá zdědění otcovy alely genu, ale nevím, zda se může jednat o kauzální mutaci v exonu 2. U otce byla provedena v laboratoři Centra lékařské genetiky v ČB sekvenace celého genomu a byla zjištěna bodová mutace c.709+5G>C (IVS2+5G>C) v intronu 2 genu PKD2 (oficiální zpráva z vyšetření). I já jsem v těsné blízkosti exonu 2 u otce a jeho dvou dcer našel bodovou mutaci, která odpovídá popisu kauzální mutace z laboratorního vyšetření otce pomocí vazebné analýzy. Na obrázku č. 19 je znázorněna záměna báze z G za C na pátém nukleotidu za exonem 2. Jde o genovou mutaci, která má za následek vznik onemocnění PCHLAD u otce a jeho potomků. Podle těchto zjištění se domnívám, že obě dcery zdědily mutovanou alelu genu PKD2 po otci a doporučuji tedy, aby se nechaly obě vyšetřit v Centru lékařské genetiky a aby následně absolvovaly pravidelná vyšetření, která jsou u pacientů s PCHLAD pravidelně prováděna.



## 6 Závěr

Po obeznámení se s problematikou a obecnou charakteristikou onemocnění polycystické choroby ledvin dominantního typu, jsem navrhl 15 párů primerů pro amplifikaci fragmentů odpovídajících exonům genu PKD2. Pro optimalizování teploty nasedání těchto primerů jsem použil gradientovou PCR a pomocí elektroforetického gelu při elektroforéze jsem výsledky vyhodnotil pod UV světlem. Z neznámého důvodu se mi nepodařilo optimalizovat ani jeden pár mnou navržených primerů. Pokusil jsem se tedy optimalizovat podmínky reakce pro další 4 páry primerů, které navrhl paní doktorka Hoštičková. Primerový pár 2B exonu 2 se podařilo dobře amplifikovat k čitelné sekvenaci a bodovou mutaci zděděnou po otci na potomky najít. Přínosem této práce – i přes neúspěch při optimalizaci vlastních primerů k následné sekvenaci, je ověření a optimalizování primerového páru 2B, díky kterému můžeme jednoduše a levně v rámci této rodiny dohledat bodovou mutaci u dosud nevyšetřených členů rodiny. Dále se mi podařilo optimalizovat primery pro další dva exony genu PKD2. Během vypracování mé kvalifikační práce jsem se naučil základní metody využívané v molekulárně biologických laboratořích – izolace DNA, PCR, elektroforéza, navrhování a optimalizace primerů a získal tak cenné zkušenosti využitelné při mém dalším studiu a v zaměstnání.

## 7 Seznam použitých zdrojů

- ARNOULD, T., KIM, E., TSIOKAS, L., JOCHIMSEN, F., GRÜNING, W., CHANG, J. D. a WALZ, G., 1998. The polycystic kidney disease 1 gene product mediates protein kinase C  $\alpha$ -dependent and c-Jun N-terminal kinase-dependent activation of the transcription factor AP-1. *Journal of Biological Chemistry*. 273(11), 6013-6018 Dostupné z: doi:10.1074/jbc.273.11. 6013
- ASHKENAZI, A., DIXIT, V. M., 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 281(5381), 1305-1308. Dostupné z: doi:10.1126/science.281. 5381.1305
- BELET, U., DANACI, M., SARIKAYA, S., et al., 2002. Prevalence of epididymal, seminal vesicle, prostate, and testicular cysts in autosomal dominant polycystic kidney disease: considerations for routine screening and management. *Urology*. 60(1), 138-141. Dostupné z: doi:10. 1016/S0090-4295(02) 01612-6
- BELL, P. D., FITZGIBBON, W., SAS, K., et al., 2011. Polycystic kidney disease and renal injury repair: common pathways, fluid flow, and the function of polycystin-1. *Journal of the American Society of Nephrology*. 22(5), F1423-F1432. Dostupné z: doi:10.1681/ASN.2010050526
- BENSON, D.A., CAVANAUGH, M., CLARK, K., KARSCH-MIZRACHI, I., OSTELL, J., PRUITT, K.D., SAYERS, E.W. (2018). GenBank. *Nucleic Acids Res.* 46, D41-D47. (Benson et al., 2018)
- BOGDANOVA, N., MARKOFF, A., GERKE, V., MCCLUSKEY, M., HORST, J., a DWORNICZAK, B., 2001. Homologues to the First Gene for Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease Are Pseudogenes. *Genomics*. 74(3), 333-341. Dostupné z: doi:10.1006/geno.2001.6568
- BREMMER, M., 2010. Polycystic kidney disease: inheritance, pathophysiology, prognosis, and treatment. *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease*. 363(1), 71. Dostupné z: doi:10.2147/IJNRD.S6939
- BRILL, S. R., ROSS, K. E., DAVIDOW, C. J., YE, M., GRANTHAM, J. J., a CAPLAN, M. J., 1996. Immunolocalization of ion transport proteins in human autosomal dominant polycystic kidney epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93(19), 10206-10211. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.93.19.10206

- BUCHHOLZ, B., KLANKE, B., SCHLEY, G., et al., 2011. The Raf kinase inhibitor PLX5568 slows cyst proliferation in rat polycystic kidney disease but promotes renal and hepatic fibrosis: polycystic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 26(11), 3458-3465. Dostupné z: doi:10.1093/ndt/gfr432
- CAI, Y., MAEDA, X., CEDZICH, A., et al., 1999. Identification and characterization of polycystin-2, the PKD2 gene Product. *Journal of Biological Chemistry*. 274(40), 28557-28565. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.274.40.28557
- ĆELIĆ, A., PETRI, E. T., DEMELER, B., EHRLICH, B. E., BOGGON, T. J., 2008. Domain mapping of the polycystin-2 C-terminal tail using de novo molecular modeling and biophysical analysis. *Journal of Biological Chemistry*. 283(42), 28305-28312. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M802743200
- Český statistický úřad (ČSÚ), 2022. Pohyb obyvatelstva za rok 2021. *Český statistický úřad* [online]. [cit. 2022-07-08]. Dostupné z: <https://www.czso.cz/csu/czso/cr/pohyb-obyvatelstva-rok-2021#>
- DU, J., a WILSON, P. D., 1995. Abnormal polarization of EGF receptors and autocrine stimulation of cyst epithelial growth in human ADPKD: polycystic kidney disease. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 269(2), C487-C495. Dostupné z: doi:10.1152/ajpcell.1995.269.2.C487
- EKSER, B. RIGOTTI, P., 2010. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *New England Journal of Medicine* [online]. 363(1), 71. [cit. 2022-08-02]. ISSN 0028-4793. doi:10.1056/NEJMicm0905399).
- EKSER, B., RIGOTTI, P., 2010. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *New England Journal of Medicine*. 363(1), 71-71. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMicm0905399
- ELMORE, S., 2007. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*. 35(4), 495-516. Dostupné z: doi:10.1080/01926230701320337
- EVAN, G., VOUSDEN, K. H., 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer: common pathways, fluid flow, and the function of polycystin-1. *Nature*. 411(6835), 342-348. Dostupné z: doi:10.1038/35077213
- FEDELES, S. V., GALLAGHER, A.-R., SOMLO, S., 2014. Polycystin-1: a master regulator of intersecting cystic pathways. *Trends in Molecular Medicine*. 20(5), 251-260. Dostupné z: doi: 10.1016/j.molmed.2014.01.004

- GONZÁLEZ-PERRETT, S., KIM, K., IBARRA, C., et al., 2001. Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), is a Ca<sup>2+</sup>-permeable nonselective cation channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98(3), 1182-1187. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.98.3.1182
- HANAOKA, K., GUGGINO, W. B., 2000. CAMP regulates cell proliferation and cyst formation in autosomal polycystic kidney disease cells: polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology*. 11(7), 1179-1187. Dostupné z: doi:10.1681/ASN.V1171179
- HARRIS, P. C., TORRES, V. E., 2009. Polycystic kidney disease: polycystic kidney disease. *Annual Review of Medicine*. 60(1), 321-337. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.med.60.101707.125712
- HOU, X., MRUG, M., YODER, B. K., LEFKOWITZ, E. J., KREMMIDIOTIS, G., D'EUSTACHIO, P., BEIER, D. R., GUAY-WOODFORD, L. M., 2002. Cystin, a novel cilia-associated protein, is disrupted in the cpk mouse model of polycystic kidney disease. *Journal of Clinical Investigation*. **109**(4), 533-540. Dostupné z: doi:10.1172/JCI14099
- HWANG, J. H., PARK, H. Ch., JEONG, J. Ch., et al., 2013. Chronic asymptomatic pyuria precedes overt urinary tract infection and deterioration of renal function in autosomal dominant polycystic kidney disease. *BMC Nephrology*. 14(1), 1-3. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2369-14-1
- CHAPMAN, A. B., STEPNIAKOWSKI, K., RAHBARI-OSKOU, F., 2010. Hypertension in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Advances in Chronic Kidney Disease*. 17(2), 153-163. Dostupné z: doi:10.1053/j.ackd.2010.01.001
- IBRAGHIMOV-BESKROVNAYA, O., DACKOWSKI, W. R., FOGGENSTEINER, L., et al., 1997. Polycystin: In vitro synthesis, in vivo tissue expression, and subcellular localization identifies a large membrane-associated protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94(12), 6397-6402. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.94.12.6397
- IGARASHI, P., SOMLO, S., 2002. Genetics and pathogenesis of polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology*. 13(9), 2384-2398. Dostupné z: doi:10.1097/01.ASN.0000028643.17901.42

- KIMBERLING, W. J., KUMAR, S., GABOW, P. A., KENYON, J. B., CONNOLLY, Ch. J., SOMLO, S., 1993. Autosomal dominant polycystic kidney disease: Localization of the second gene to chromosome 4q13–q23. *Genomics*. 18(3), 467-472. Dostupné z: doi:10.1016/S0888-7543(11)80001-7
- KOULEN, P., CAI, Y., GENG, L., MAEDA, Y., NISHIMURA, S., WITZGALL, R., EHRLICH, B. E., SOMLO, S., 2002. Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel: Genetic and diagnostic implications. *Nature Cell Biology*. 4(3), 191-197. Dostupné z: doi:10.1038/ncb754
- LAONIX, J., D'AGATI, V., SZABOLCS, M., TRUNDEL, M., 1996. Dysregulation of cellular proliferation and apoptosis mediates human autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). *Oncogene*. (6):1153-1160. PMID: 8808689.
- LARIVIERE, W. B., IRAZABAL, M. V., TORRES, V. E., 2015. Novel therapeutic approaches to autosomal dominant polycystic kidney disease: considerations for routine screening and management. *Translational Research*. 165(4), 488-498. Dostupné z: doi: 10.1016/j.trsl.2014.11.003
- LIU, B., CHEN, S.-Ch., YANG, Y.-M., et al., 2015. Identification of novel PKD1 and PKD2 mutations in a Chinese population with autosomal dominant polycystic kidney disease: Prevalence, clinical presentation, mutation spectrum, and prognosis. *Scientific Reports*. 5(1), 476-485. Dostupné z: doi:10.1038/srep17468
- LUCIANO, R. L., DAHL, N. K., 2014. Extra-renal manifestations of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD): considerations for routine screening and management. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 29(2), 247-254. Dostupné z: doi:10. 1093/ndt/gft437
- MABILLARD, H., SRIVASTAVA, S., HASLAM, P., KARASEK, M., SAYER, J. A., 2017. Large retroperitoneal haemorrhage following cyst rupture in a patient with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Case Reports in Nephrology*. 2017 (2), 1-3. Dostupné z: doi:10.1155/2017/4653267
- Madden T. The BLAST sequence analysis tool. 2002 Oct 9 [Updated 2003 Aug 13]. In: McEntyre J, Ostell J, editors. The NCBI Handbook [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2002-. Chapter 16. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21097/\\_trim](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21097/_trim) (Madden T., 2002)

- MALKA, D., HAMMEL, P., VILGRAIN, V., FLÉJOU, J-F., BELGHITI, J., BERNADES, P., 1998. Chronic obstructive pancreatitis due to a pancreatic cyst in a patient with autosomal dominant polycystic kidney disease: considerations for routine screening and management. *Gut*. 42(1), 131-134. Dostupné z: doi:10.1136/gut.42.1.131
- MASYUK, A. I., MASYUK, T. V., SPLINTER, P. L., HUANG, B. Q., STROOPE, A. J., LARUSSO, N. F., 2006. Cholangiocyte cilia detect changes in luminal fluid flow and transmit them into intracellular Ca<sup>2</sup> and cAMP signaling: polycystic kidney disease. *Gastroenterology*. 131(3), 911-920. Dostupné z: doi: 10.1053/j.gastro.2006.07.003
- Medical A. I., (Medical Art Inc), Shutterstock [online]. [cit. 2022-08-02]. Dostupné z <https://www.shutterstock.com/cs/image-illustration/kidney-polycystic-disease-autosomal-dominant-adpkd-disorder-498636970>
- Medicine. A. R. (Annual review of medicine), 2009; [online]. 60: 321–337. [cit. 2022-08-02]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2834200/figure/F1/>
- MERTA, M., REITEROVÁ, J. a ŠTEKROVÁ, J., 2007. Polycystická choroba ledvin. *Interní medicína pro praxi*. 2007(6), 283-287. ISSN 1212-7299
- MERTA, M., REITEROVÁ, J., 2004. Dědičná onemocnění ledvin. Praha: Triton, 272 s. ISBN 80-7254-505-1.
- MILUTINOVIC, J., FIALKOW, P. J., AGODOA, L. Y., PHILLIPS, L. A., RUDD, T. G., SUTHERLAND, S., 1990. Clinical manifestations of autosomal dominant polycystic kidney disease in patients older than 50 years. *American Journal of Kidney Diseases*. 15(3), 237-243. Dostupné z: doi:10.1016/S0272-6386(12)80768-2
- MITCHISON, J.M., 2003. Growth during the cell cycle: polycystic kidney disease. *Cell Research*. 12(1), 165-258 [cit. 2022-07-09]. Dostupné z: doi:10.1016/S0074-7696(03)01004-0
- MOCHIZUKI, T., WU, G., HAYASHI, T., et al., 1996. PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein: a master regulator of intersecting cystic pathways. *Science*. 272(5266), 1339-1342. Dostupné z: doi:10.1126/science.272.5266.1339

- NAULI, S., M., ALENGHAT, F. J., LUO, Y., et al., 2003. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells: Genetic and diagnostic implications. *Nature Genetics*. 33(2), 129-137. Dostupné z: doi:10.1038/ng1076
- NISHIURA, J. L., NEVES, R. F. C. A., ELOI, S. R. M., CINTRA, S. M. L. F., AJZEN, S. A., HEILBERG, I. P., 2009. Evaluation of nephrolithiasis in autosomal dominant polycystic kidney disease patients. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 4(4), 838-844. Dostupné z: doi:10.2215/CJN.03100608
- PARNELL, S. C., MAGENHEIMER, B. S., MASER, R. L., RANKIN, C. A., SMINE, A., OKAMOTO, T., CALVET, J. P., 1998. The polycystic kidney disease-1 protein, polycystin-1, binds and activates heteroeric G-proteins in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 251(2), 625-631 [cit. 2022-08-01]. Dostupné z: doi:10.1006/bbrc.1998.9514 (Parnell et al., 1998)
- PAUL, B. M., VANDEN HEUVEL, G. B., 2014. Kidney: polycystic kidney disease. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*. 3(6), 465-487. Dostupné z: doi:10.1002/wdev.152
- PEI, Y., 2006. Diagnostic approach in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 1(5), 1108-1114. Dostupné z: doi:10.2215/CJN.02190606
- PEI, Y., WATNICK, T., 2010. Diagnosis and screening of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Advances in Chronic Kidney Disease*. 17(2), 140-152. Dostupné z: doi: 10.1053/j.ackd.2009.12.001
- PERAL, B., SAN MILLÁN, J. L., ONG, A. C., GAMBLE, V., WARD, C. J., STRONG, C., HARRIS, P. C., 1996 Screening the 3' region of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene reveals six novel mutations. *American journal of human genetics*. (1):86-96. ISSN 0002-9297.
- PETERS, D. J. M., SPRUIT, L., SARIS, J. J., et al., 1993. Chromosome 4 localization of a second gene for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nature Genetics*. 5(4), 359-362. Dostupné z: doi:10.1038/ng1293-359
- PORTT, L., NORMAN, G., CLAPP, C., GREENWOOD, M., GREENWOOD, M. T., 2011. Anti-apoptosis and cell survival: A review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1813(1), 238-259. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbamcr.2010.10.010

- Reeders, S.T., Breuning, M. H., Davies, K. E., Nicholls, R. D., Jarman, A. P., Higgs, D. R., Pearson, P. L., Weatherall, D. J., 1985. A highly polymorphic DNA marker linked to adult polycystic kidney disease on chromosome 16. *Nature*. 317(6037):542-4. doi: 10.1038/317542a0
- ROSSETTI, S., CHAUVEAU, D., WALKER, D., SAGGAR-MALIK, A., WINEARLS, Ch. G., TORRES, V. E., HARRIS, P. C., 2002. A complete mutation screen of the ADPKD genes by DHPLC. *Kidney International*. 61(5), 1588-1599. Dostupné z: doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00326.x
- ROSSETTI, S., STRMECKI, L., GAMBLE, V., et al., 2001. Mutation analysis of the entire PKD1 gene: Genetic and diagnostic implications. *The American Journal of Human Genetics*. 68(1), 46-63. Dostupné z: doi:10.1086/316939
- SHILLINGFORD, J. M., MURCIA, N. S., LARSON, C. H., et al., 2006. The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease: Genetic and diagnostic implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103(14), 5466-5471. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0509694103
- SCHIEVINK, W. I., TORRES, V. E., PIEPGRAS, D. G., D O WIEBERS, D. O., 1992. Saccular intracranial aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease: considerations for routine screening and management. *Journal of the American Society of Nephrology*. 3(1), 88-95. Dostupné z: doi:10.1681/ASN.V3188
- SLÁDKOVÁ, Nikola. 2020. Detekce mutace způsobující polycystózu ledvin. České Budějovice, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta. Vedoucí práce: Ing. Irena Hoštičková, Ph.D.
- STREETS, A. J., MOON, D. J., KANE, M. E., OBARA, T., ONG, A. C. M., 2006. Identification of an N-terminal glycogen synthase kinase 3 phosphorylation site which regulates the functional localization of polycystin-2 in vivo and in vitro. *Human Molecular Genetics*. 15(9), 1465-1473. Dostupné z: doi:10.1093/hmg/ddl070
- TAO, Y., KIM, J., STANLEY, M., HE, Z., FAUBEL, S., SCHRIER, R. W., EDELSTEIN, Ch. L., 2005. Pathways of caspase-mediated apoptosis in autosomal-dominant polycystic kidney disease (ADPKD): A review. *Kidney International*. 67(3), 909-919. Dostupné z: doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00155.x



- TERRY, S., HO, A., BEAUWENS, R., DEVUYST, O., 2011. Fluid transport and cystogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease: common pathways, fluid flow, and the function of polycystin-1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 1812(10), 1314-1321. Dostupné z: doi: 10.1016/j.bbdis.2011.01.011
- TORRA, R., BADENAS, C., PÉREZ-OLLER, L., et al., 2000. Increased prevalence of polycystic kidney disease type 2 among elderly polycystic patients. *American Journal of Kidney Diseases*. 36(4), 728-734. Dostupné z: doi:10.1053/ajkd.2000.17619
- TORRES, V. E., ERICKSON, S. B., SMITH, L. H., WILSON, D. M., HATTERY, R. R., SEGURA, J. W., 1988. The association of nephrolithiasis and autosomal dominant polycystic kidney disease. *American Journal of Kidney Diseases*. 11(4), 318-325 Dostupné z: doi:10.1016/S0272-6386(88)80137-9
- TORRES, V. E., HARRIS, P. C., 2013. Strategies targeting cAMP signaling in the treatment of polycystic kidney disease: polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology*. 25(1), 18-32. Dostupné z: doi:10.1681/ASN.2013040398
- TSIOKAS, L., ARNOULD, T., ZHU, Ch., KIM, E., WALZ, G., SUKHATME, V. P., 1999. Specific association of the gene product of PKD2 with the TRPC1 channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96(7), 3934-3939. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.96.7.3934
- TSIOKAS, L., KIM, E., ARNOULD, T., SUKHATME, V. P., WALZ, G., 1997. Homo – and heterodimeric interactions between the gene products of PKD1 and PKD2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94(13), 6965-6970. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.94.13.6965
- VASSILEV, P. M., GUO, L., CHEN, X-Z. et al., 2001. Polycystin-2 is a novel cation channel implicated in defective intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis in polycystic kidney disease: Genetic and diagnostic implications. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 282(1), 341-350. Dostupné z: doi:10.1006/bbrc.2001.4554
- WANG, X., WARD, Ch. J., HARRIS, P. C., TORRES, V. E., 2010. Cyclic nucleotide signaling in polycystic kidney disease: polycystic kidney disease. *Kidney*

- International*. 77(2), 129-140 [cit. 2022-07-21]. Dostupné z: doi:10.1038/ki.2009.438
- WEIMBS, T., 2007. Polycystic kidney disease and renal injury repair: common pathways, fluid flow, and the function of polycystin-1. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 293(5), F1423-F1432. Dostupné z: doi:10.1152/ajprenal.00275.2007
- WEIMBS, T., 2011. Third-hit signaling in renal cyst formation. *Journal of the American Society of Nephrology*. 22(5), 793-795. Dostupné z: doi:10.1681/ASN.201103.0284
- WOLF, B. B., GREEN, D. R., 1999. Suicidal tendencies: Apoptotic cell death by caspase family proteinases. *Journal of Biological Chemistry*. 274(29), 20049-20052. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.274.29.20049
- ZEIER, M., GEBERTH, S., SCHMIDT, K. G., MANDELBAUM, A., RITZ, E., 1993. Elevated blood pressure profile and left ventricular mass in children and young adults with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology*. 3(8), 1451-1457. Dostupné z: doi:10.1681/ASN.V381451
- ZHANG, W., LIU, H. T., 2002. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells: polycystic kidney disease. *Cell Research*. 12(1), 9-18. Dostupné z: doi:10.1038/sj.cr.7290105

## **8 Přílohy:**

- Seznam obrázků a tabulek
- Seznam zkratk

## **Seznam obrázků a tabulek**

Obrázek 1 Ilustrační obrázek polycystické ledviny

Obrázek 2 Strukturní složení polycystinů – 1 a 2

Obrázek 3 Zaznamenání pacienta s ledvinami vážící 22 kilogramů

Obrázek 4 Elektroforetický snímek gradientové PCR pro testování primerů exonu 8

Obrázek 5 Elektroforetický snímek gradientové PCR pro testování primerů exonu 5 a 14

Obrázek 6 Elektroforetický snímek gradientové PCR pro testování primerů exonu 14

Obrázek 7 Elektroforetický snímek gradientové PCR pro testování primerů exonu: 6, 14 a 5

Obrázek 8 Elektroforetický gel gradientové PCR pro testování primerů exonu 6, 9, 3

Obrázek 9 Elektroforetický snímek gradientové PCR pro testování primerů exonu 2, 6

Obrázek 10 Elektroforetický snímek konvenční PCR – kontrola před přípravou vzorků na sekvenování.

Obrázek 11 Elektroforetický snímek konvenční PCR – kontrola před přípravou vzorků na sekvenování.

Obrázek 12 Sangerova metoda sekvenování exonu 5 s primerem 5C

Obrázek 13 Sangerova metoda sekvenování exonu 5 s primerem 5C

Obrázek 14 Sangerova metoda sekvenování exonu 3 s primerem 3

Obrázek 15 Sangerova metoda sekvenování exonu 2 s primerem 2A

Obrázek 16 Sangerova metoda sekvenování exonu s 2 primerem 2A

Obrázek 17 Sangerova metoda sekvenování exonu 2 s primerem 2B

Obrázek 18 Sangerova metoda sekvenování exonu 2 s primerem 2B

Obrázek 19 Sangerova metoda sekvenování exonu 2 pomocí primeru 2B

Tabulka 1 Seznam a označení použitých vzorků

Tabulka 2 Složení mixu pro gradientovou PCR

Tabulka 3 Složení mixu pro konvenční PCR

Tabulka 4 Seznam navržených primerů

Tabulka 5 Seznam dalších použitých, mnou nenavržených primerů (navrhla Dr. Hoštičková)

Tabulka 6 Rozřazení DNA a primerů ke sloupcům na obrázku č. 10.

## **Seznam zkratek**

- ACEI – inhibitor angiotenzin konvertující enzym  
atd. – a tak dále  
Bc. – bakalář  
BLAST – Basic Local Alignment Search Tool  
bp – páry bází  
Ca<sup>2+</sup> - kationt vápníku  
cAMP – cyklický adenosin monofosfát  
CT – počítačová tomografie  
č. – číslo  
ČB – České Budějovice  
DGGE – elektroforéza v gradientovém denaturačním gelu  
DHLPC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie  
DNA – deoxyribonukleová kyselina  
dr. – doktor/ka  
EGF – epidermální růstový faktor  
CHSL – chronické selhání ledvin  
kb – kilo páru bází  
NCBI – The National Center for Biotechnology Information  
NGS – sekvenování nové generace  
PC1 – polycystin 1  
PC2 – polycystin 2  
PCR – polymerázová řetězová reakce  
PCHLAD – Polycystické onemocnění ledvin dominantního typu  
PKD1 a PKD2 – geny v DNA  
popř. – popřípadě  
PTT – protein truncation test  
SSCP – polymorfismus konformace jednovláknové DNA  
UV – ultrafialové světlo  
UZ – ultrazvukové vyšetření  
V2 – antagonistu vazopresinu