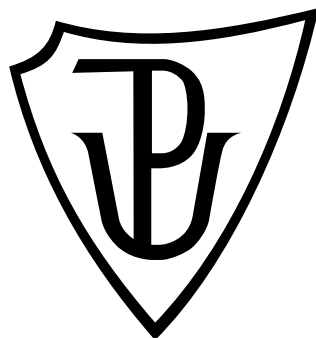


Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Ciliopatie: související onemocnění a jejich molekulárně-genetická diagnostika

Diplomová práce

Bc. Daniela Staňková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2018

Vedoucí práce: Ing. Arpád Bóday

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Ing. Arpáda Bódaye a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne 26. 4. 2018

.....

Souhrn

Cilia jsou komplexní struktury přítomné téměř v každé buňce organismu, kde hrají zásadní biologickou roli. Motilní cilia umožňují tok tekutiny nebo pohyb jednotlivých buněk, nemotilní jsou místem velkého zastoupení receptorů a signalizačních kaskád. Mutace genů kódujících komponenty cilia může mít za následek nesprávnou funkci této struktury, a dochází tak k rozvoji syndromových onemocnění obecně známých jako ciliopatie. Cílem této práce bylo popsat strukturu cilia a jeho roli v buňce i celém organismu. Experimentální část práce byla zaměřena na autozomálně dominantní polycystickou chorobu ledvin, u které byl navržen paralelně doplňující postup vyšetření pomocí mikrosatelitové vazebné analýzy v rodinách postižených autozomálně dominantní chorobou ledvin.

Summary

Cilium is a complex structure that can be found in almost every cell of the organism, where it plays a crucial role. Motile cilia cause fluid flow, or movement of a cell, immotile cilia have lot of receptors and signalling pathways. Mutation of the genes, which encode components of the cilium, can lead to a dysfunction of the cilium and to the development of the syndromes known as the ciliopathies. The aim of this thesis is to describe the structure of the cilium, its role in the organisms. The practical part of this thesis was focused on ADPKD. The new approach to the diagnosis – study of the genetic linkage was proposed.

Poděkování:

Touto cestou bych chtěla poděkovat Ing. Arpádu Bódayovi za poskytnuté rady a připomínky k této diplomové práci. Děkuji kolektivu pracovníků laboratoří Agel za pomoc při řešení praktické části práce. Dík patří i vedení Laboratoře lékařské genetiky Úseku molekulární biologie, Laboratoří Agel a.s. v Novém Jičíně za umožnění zpracování experimentální části práce.

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Cíle práce	2
3. Cilia a bičíky	3
3.1. Biologická stavba cilií.....	3
3.2. Ohýbání cilií	6
3.3. Signální kaskády uvnitř cilií.....	7
3.3.1. Hedgehog signální kaskáda	7
3.3.2. Wnt signální kaskáda	8
4. Ciliopatie.....	10
4.1. Primární ciliární dyskineze.....	13
4.1.1. Kartagener syndrom.....	13
4.2. Porucha primárních cilií.....	14
4.2.1. Autozomálně dominantní polycystická choroba ledvin	14
4.2.2. Molekulární podstata onemocnění	16
5. Materiál a metodika	20
5.1. Materiál	20
5.1.1. Přístroje	20
5.1.2. Laboratorní pomůcky	20
5.1.3. Chemikálie a použité roztoky	20
5.2. Metodika	21
5.2.1. Amplifikace mikrosatelitů v blízkosti vyšetřovaných genů.....	21
5.2.2. Analýza PCR fragmentů pomocí bioanalyzátoru Agilent 2100	23
5.2.3. Fragmentační analýza.....	24
5.2.4. Sekvence genů pomocí sekvenování nové generace	24
5.2.5. Ověření výsledků pomocí Sangerova sekvenování	24
5.2.5. Automatická purifikace sekvenačního produktu pomocí pipetovacího robota Biomek 4000	27
5.2.6. Automatické sekvenování	28
6. Výsledky.....	29
6.1. Rodina L1	29
6.2. Rodina L2	30
6.3. Rodina L8 a L12.....	31
6.4. Rodina L41	34

6.5. Rodina L18.....	35
6.6. Rodina L63.....	36
6.7. Rodina L80.....	37
6.8. Rodina L19.....	38
7. Diskuse.....	40
8. Závěr.....	44
9. Seznam použité literatury.....	45

Seznam použitých zkratek:

ADPKD	autozomálně dominantní choroba ledvin
ALMS	Alstorm syndrom
<i>ALMS1</i>	centrosome and basal body associated protein
<i>ARL 6</i>	ADP ribosylation factor like GTPase 6
<i>ARL13B</i>	ADP ribosylation factor like GTPase 13B
ATP	adenosintrifosfát
<i>B9D1</i>	B9 domain containing 1
BBS	Bardet Biedl syndrom
<i>BBS</i>	Bardet-Biedl syndrome (<i>BBS</i>) gene family
<i>CC2D2A</i>	coiled-coil and C2 domain containing 2A
<i>DYNC2H1</i>	dynein cytoplasmic 2 heavy chain 1
GDP	guanosindifosfát
<i>GLIS2</i>	GLIS family zinc finger 2
GTP	guanosintrifosfát
HGMD	Databáze mutací lidských genů (Human Gene Mutation Database)
IFT	intraflagelární transport
<i>IFT80</i>	intraflagellar transport 80
<i>INPP5E</i>	inositol polyphosphate-5-phosphatase E
<i>INVS</i>	inversin
<i>IQCB1</i>	IQ motif containing B1
JBTS	Joucet syndrom
<i>KIF7</i>	kinesin family member 7
LCA	Leberova kongenitální amauroza
<i>LCA5</i>	lebercilin
LUCA	poslední společný předek všech organismů (last universal common ancestor)
<i>MAK</i>	male germ cell associated kinase
<i>MKKS</i>	McKusick-Kaufman

<i>MKS</i>	Meckel Gruber syndrom
<i>MKSI</i>	Meckel syndrome, type 1
<i>NEK8</i>	NIMA related kinase 8
<i>NPHP</i>	Nefroftýza
<i>OFDI</i>	centriole and centriolar satellite protein
<i>PC</i>	Polycystin
<i>PCD</i>	Primární ciliární dyskeneze
<i>PCR</i>	Polymerázová řetězová reakce
<i>PKD1</i>	gen pro polycystin 1
<i>PKD2</i>	gen pro polycystin 2
<i>PKDB</i>	Polycystic kidney disease database
<i>RAS</i>	rat sarcoma viral oncogene homolog
<i>RP1</i>	axonemal microtubule associated
<i>RPGRIP1</i>	RPGR interacting protein 1
<i>RPGRIP1</i>	RPGR interacting protein 1
<i>SDCCAG8</i>	serologically defined colon cancer antigen 8
<i>SLSN</i>	Senior-Loken syndrom
<i>TCTN1</i>	tectonic family member 1
<i>TCTN2</i>	tectonic family member 2
<i>TMEM 67</i>	transmembrane protein 67
<i>TMEM216</i>	transmembrane protein 216
<i>TRIM32</i>	tripartite motif gene
<i>TTC21B</i>	tetratricopeptide repeat domain 21B
<i>TTC8</i>	tetratricopeptide repeat domain 8
<i>WDPCD</i>	WD repeat containing planar cell polarity effector
<i>WDR19</i>	WD repeat domain 19

Seznam obrázků

Obrázek 1: Struktura cilia viditelná na příčném řezu	5
Obrázek 2: Ukázka ohybu cilia	7
Obrázek 4: Schéma DNA chipu využívaného při analýze na bioanalyzáru Agilent 2100.....	23
Obrázek 5: Umístění genů <i>PKD1</i> a <i>PKD2</i> na genetické mapě spolu s analyzovanými mikrosatelity.....	29
Obrázek 6: Rodokmen s příslušnými haplotypovými bloky pro rodinu L1.....	30
Obrázek 7: Rodokmen s příslušnými haplotypovými bloky pro rodinu L2.....	31
Obrázek 8: Rodokmen s příslušnými haplotypovými bloky pro rodinu L8 a L21	32
Obrázek 9: Rodokmen s příslušnými haplotypovými bloky pro rodinu L41.....	34
Obrázek 10: Rodokmen s příslušnými haplotypovými bloky pro rodinu L18.....	35
Obrázek 11: Rodokmen s příslušnými haplotypovými bloky pro rodinu L63.....	36
Obrázek 12: Rodokmen s příslušnými haplotypovými bloky pro rodinu L80.....	38
Obrázek 13: Rodokmen s příslušnými haplotypovými bloky pro rodinu L19.....	39

Seznam tabulek

Tabulka 1: Přehled jednotlivých ciliopatií, jejich fenotypových projevů, způsobu dědičnosti a četnosti výskytu v populaci	10
Tabulka 2: Ciliopatie a jejich kauzální geny	12
Tabulka 3: Složení reakční směsi pro amplifikaci mikrosatelitů	21
Tabulka 4: Použité mikrosatelitové markery v blízkosti sledovaných genů <i>PKD1</i> a <i>PKD2</i> , sekvence primerů pro amplifikaci makrerů a jejich annealingová teplota	22
Tabulka 5: Teplotní profil PCR pro amplifikaci mikrosatelitů	22
Tabulka 6: Teplotní profil PCR amplifikace genu <i>PKD1</i>	24
Tabulka 7: Teplotní profil PCR amplifikace genu <i>PKD2</i>	25
Tabulka 8: Sekvence primerů použitých pro amplifikace genu <i>PKD1</i> (Liu <i>et al.</i> , 2014)	25
Tabulka 9: Sekvence primerů použitých pro amplifikace genu <i>PKD2</i> (Dedoussis <i>et al.</i> , 2008).....	25
Tabulka 10: Složení reakční směsi pro amplifikaci genů <i>PKD1</i> a <i>PKD2</i>	26
Tabulka 11: Teplotní profil purifikace PCR produktů	27
Tabulka 12: Teplotní profil sekvenační reakce	27
Tabulka 13: Složení reakční směsi sekvenační reakce.....	27

1. Úvod

Cilia jsou komplexní struktury, které jsou přítomny téměř v každé buňce. Dříve byla považována za nepodstatné součásti. Dnes již víme, že mají zásadní funkce pro buňku jako takovou, a tím pádem i pro celý organismus.

Cilia obsahují velké množství receptorů a iontových kanálů a jsou úzce spjata s důležitými signálními kaskádami. Není proto překvapením, že jejich nefunkčnost má na organismus zásadní vliv. Jelikož se jedná o struktury velice komplexní, jsou tvořeny velkým množstvím proteinů, a tomu odpovídá i velký počet kódujících genů. Proto i onemocnění vyvolaná poruchou cilií nesoucí souhrnné označení ciliopatie mají širokou genotypovou a z tohoto vyplývající fenotypovou variabilitu.

Pod označením ciliopatie se ukrývá několik syndromů. V této práci bude studováno a diagnostikováno jedno onemocnění spadající do této kategorie, kterým je autozomálně dominantní polycystická choroba ledvin (ADPKD). ADPKD je závažné onemocnění ledvin vyznačující se vznikem cyst především v ledvinách, ale i v jiných orgánech. Polycystóza ledvin v konečném stádiu nemoci vyžaduje transplantaci toho orgánu. ADPKD je onemocnění relativně časté, a tudíž se jedná o jednu z nejčtenějších příčin transplantace ledvin.

Správná a časná klinická diagnostika u příbuzných jedinců s ADPKD může být obtížná, jelikož typický symptom, cysty, se objevuje často až v druhé dekádě života. Proto je tak důležitá molekulární diagnostika onemocnění. Ta selektuje nositele mutantní alely od zdravých jedinců. Pacienti s identifikovanou kauzální mutací mohou být následně dispenzarizováni.

2. Cíle práce

- Provést literární rešerši týkající se cilií a ciliopatií se zaměřením na ADPKD
- Provést vazebnou analýzu a následně molekulární diagnostiku sekvenováním rodin s ADPKD, výsledky vazebné analýzy porovnat se sekvenačními daty
- Porovnat úskalí nepřímé molekulárně genetické diagnostiky, diskutovat její příspěvek (možné výhody i nevýhody) při hodnocení výsledků

3. Cilia a bičíky

Cilia a bičíky jsou vysoce specializované motilní jednotky, jejichž základní stavební jednotkou jsou mikrotubuly a dyneiny. Přestože jsou cilia a bičíky odlišovány, mají podobnou strukturu. Bičíky jsou běžnou součástí spermií a nalézáme je i u některých zástupců protozoa. Jejich úlohou je zajistit pohyb buňky v kapalném médiu. Cilia mají podobné uspořádání jako bičíky, a mohou zajišťovat nejen pohyb jednotlivých buněk (zejména u protozoí), ale jejich úlohou je umožnit pohyb kapaliny po povrchu tkání, jejíž součástí jsou buňky s cilií (McGrath *et al.*, 2003). V neposlední řadě mají i signalizační funkci.

Motilní cilia plní pohybovou funkci a jsou poměrně vzácná, vyskytují se jen u některých typů buněk. Nemotilní cilia jsou v jedné kopii přítomna téměř ve všech nedělicích se buňkách obratlovců (Wheatley, 1995). Přestože cilia byla objevena a popsána před více než sto lety, byla donedávna jejich funkce podceňovaná. Dnes již víme, že tyto struktury mají významnou senzorickou funkci a jsou součástí signálních drah důležitých pro buněčné procesy.

Cilia se v evoluci eukaryot objevují poměrně brzy. Předpokládá se, že byla přítomna u prvního univerzálního předka (LUCA- "last universal common ancestor"), a byla objevena v buňkách alespoň některých organismů z každé hlavní vývojové větve eukaryot. O původu cilií existuje několik evolučních teorií. Jednou z nich je předpoklad vzniku cilia pomocí symbiotického RNA viru, který vnikl do cytoplazmy eukaryotické buňky a stal se prekurzorem cilia (Satir *et al.*, 2008). Druhá teorie počítá s autogenním formováním z již existujícího mikrotubulárního organizačního centra.

3.1. Biologická stavba cilií

Celá cilia i bičíky jsou upevněny v takzvaném bazálním tělísku. Bazální tělísko je modifikovanou centriolou. Centriola má obecně několik funkcí. Je součástí centrozomu a organizuje mikrotubuly dělicího vřeténka. Zároveň je součástí cilia jako bazální tělísko. Přestože centromera jako organizátor mikrotubulu je u některých druhů, jako jsou rostliny a protista, nepřítomná, její existence v ciliích v podobě bazálních tělísek je nepostradatelná.

Centriola je komplexní strukturou, která má tvar válce. Je složená z devíti mikrotubulových tripletů, které, podobně jako mikrotubuly axonemy, jsou uspořádány v kruhu. Za toto uspořádání devíti tripletů, které jsou označovány A, B a C, je zodpovědný protein SAS-9. Na oblast bazálního tělíska navazuje takzvaná tranziční zóna. Tato oblast je přechodovou

oblastí mezi bazálním tělískem a samotným bičíkem. V tranziční zóně je ukončen růst C tubulu (Manton *et al.*, 1981).

Drtivá většina našich buněk má takzvané primární cilium, které se v buňkách vyskytuje, pokud je daná buňka v G₀ fázi buněčného cyklu. Je to dáno tím, že bazální tělísko, ze kterého vzniká cilium, vzniká z jedné centrioly centrozomu. V buňkách, ve kterých vznikají primární cilia, postupuje centrozom do oblasti buněčného kortexu.

Primární cilia vznikají vždy z centrioly mateřské buňky. Některé specifické buňky obsahují vyšší počet motilních cilií. Tyto buňky obsahují vyšší počet bazálních tělísek, která vznikají *de novo*. Až 90 % těchto nově vzniklých bazálních tělísek vzniká ze dceřiné centrioly původního centrozomu. V těchto buňkách dochází k syntéze bazálních tělísek ze struktury zvané deutrosom.

Cilia jsou tedy vysoce komplexní struktury, které vznikají v přesném procesu, který zajišťuje, aby všechny komponenty byly na správném místě. Úspěšné vytvoření cilia je zajištěno intraflagelárním transportem. Transport materiálu do cilia je zajištěn motorovým proteinem kinesinem. Naopak transport z cilia je zajištěn dyneinem. Oba tyto proteiny jsou schopny navázat takzvané IFT částice, které obsahují všechny potřebné komponenty pro růst cilia. Pro svou existenci potřebuje cilium neustálý přísun IFT, pro přísun nových proteinů. Bez IFT dochází časem ke zmenšení a zániknutí cilia. Kvůli poruchám IFT dochází ke vzniku mnoha onemocnění (Jonassen *et al.*, 2012).

Přestože struktura membrány a axonemy se mezi živočichy v některých detailech liší, jedná se o strukturu relativně konzervovanou, což dokládají některé proteomické studie (Pedersen *et al.*, 2012).

Všechna cilia jsou složena z axonemy, která se skládá ze skupiny mikrotubulových vláken a která je obklopena dvouvrstvou ciliární membránou. Membrána axonemy je pokračováním cytoplazmatické membrány, ovšem obsahuje jiné receptory a iontové kanály, které jsou zastoupeny v hojném počtu. Tato skutečnost odpovídá i faktu, že cilia mají signalizační funkci (Christensen *et al.*, 2007).

Motilní cilium obsahuje uprostřed centrální pár mikrotubulů, kolem kterého se v kruhu nachází devět mikrotubulových doubletů tvořených A a B tubuly. Zatímco A tubulus je tvořen 13 protofilamenty, B tubulus, který částečně přiléhá k A tubulu, je tvořen 10 protofilamenty. Spojení mezi A a B filamentem je ještě posíleno přítomností proteinu tektinu. A tubulus

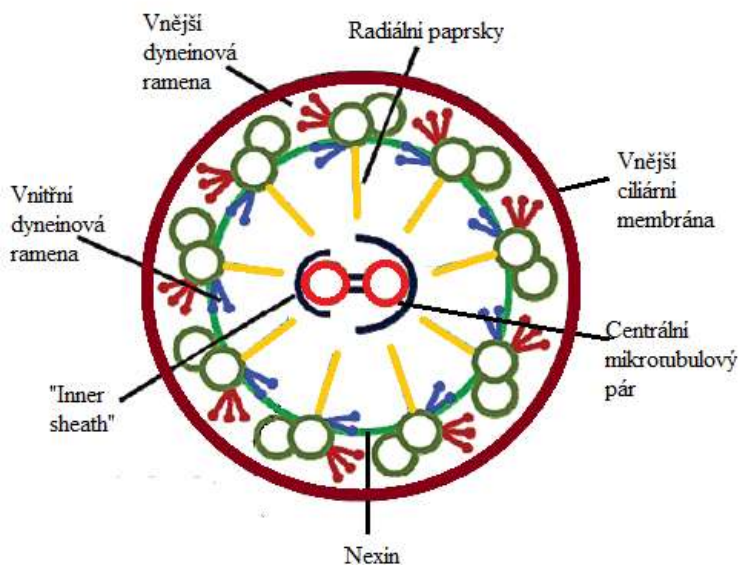
je v mnoha případech delší než B tubulus, a v distálních částech axonemy tak vzniká distální A-tubulový singlet.

Motilní cilia jsou často označována jako 9+2, kde devítka zastupuje počet doubletů a dvojka centrální mikrotubulový pár. Nemotilní cilium postrádá centrální dvojici mikrotubulů a je často označováno jako 9+0.

Ovšem i toto pravidlo má své výjimky. Příkladem mohou být motilní cilia na embryotickém uzlu obratlovců, která zajišťují tok perinodální tekutiny a jsou zodpovědná za správný vývoj pravolevé symetrie. Přestože se jedná o motilní struktury mají složení 9+0, což naznačuje absenci centrální dvojice mikrotubulů. Cirkulární pohyb těchto cilií je zajištěn vnějším dyneinovým ramenem (Hirokawa *et al.*, 2006). Další výjimkou z pravidla jsou mechanosensorická cilia, která se nacházejí v Cortiho orgánu. Jejich uspořádání mikrotubulů je 9+2, ale postrádají motilní funkci.

Soudržnost axonemy je zajištěna pomocí trojice proteinů. Centrální dvojice mikrotubulů je držena při sobě pomocí takzvaných „inner sheath“. Další struktura, která je tvořena z nexinu, propojuje jednotlivé doublety mezi sebou. Důležitou strukturou jsou i radiální paprsky (radial spokes), které směřují od centrálních mikrotubulů k A filamentům vnějších doubletů (viz obrázek 1).

Obrázek 1: Struktura cilia viditelná na příčném řezu



3.2. Ohýbání cílů

Samotný pohyb je vytvářen ohýbáním axonemy, která je složená z mikrotubulů. Mikrotubulin je důležitou součástí cytoskeletu. Slouží jako mechanická opora buňky, podílí se na buněčném transportu, segregaci chromozomů a v neposlední řadě je součástí cílů. Jedná se o dutou strukturu, která je složena z tubulinových dimerů s globulární strukturou. Dimer je složen z α a β podjednotky, které v mikrotubulu zaujímají určitou orientaci a určují tak polaritu vlákna. Jednotlivé dimery se spojují za vzniku duté struktury tvořené obvykle 13 protofilamenty.

Mikrotubuly jako takové jsou vysoce dynamické struktury. Na plus konci dochází k prodlužování mikrotubulu přidáváním dalších dimerů. Tento prudký nárůst může být následně vystřídán rozpadem mikrotubulu. Tato vlastnost, nazývaná mikrotubulová nestabilita, je způsobena schopností tubulinu hydrolyzovat GTP za vzniku GDP. Na rostoucí plus konec mikrotubulu jsou přidávány podjednotky s navázaným GTP. Tyto podjednotky tvoří takzvanou GTP čepičku, která zabraňuje rozpadu celého mikrotubulu. Pokud jsou však nové podjednotky přidávány pomaleji, než dochází k defosforylaci GTP, na plus konci se začnou hromadit podjednotky s navázaným GDP a následuje uvolňování podjednotek a rozpad celé struktury (Vulevic *et al.*, 1997) Mikrotubulinová nestabilita musí být v některých buněčných strukturách, mezi které patří například zmiňovaná cília, potlačena vazbou stabilizačních proteinů. Na stabilních mikrotubulech se nachází velké množství posttranslačních modifikací jako acetylace, detyrosinace, glycylyace a glutaminace. Tyto modifikace se nacházejí především v cíliích, centriolách a bazálních těliscích.

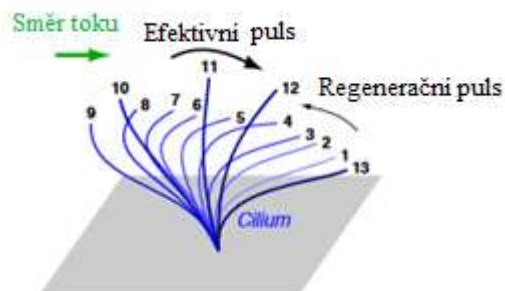
Další klíčovou složkou pohybu jsou motorové proteiny. Tyto motorové proteiny využívají energii z ATP pro svůj pohyb podél mikrotubulového vlákna. Dyneinové motory se pohybují směrem k mínus konci a v buňce hrají důležitou roli při transportu proteinů. V cilii generují jeho pohyb. Hlavička motorového proteinu je trvale připevněna k A podjednotce doubletu. Každé A vlákno má vnější a vnitřní motorový protein, přičemž ramena motorového proteinu se natahují směrem k B tubulu sousedního doubletu. Ramena se pohybují směrem k mínus konci a generují tak pohyb typický pro cília.

Tento pohyb byl zaznamenán i pomocí experimentu. Cília byla zbavena membrány a byla proteolyzována crosslinky, které drží pohromadě jednotlivá filamenta. Po přidání ATP došlo k prodloužení dané struktury až na pětinašobek původní hodnoty (Lodish *et al.*, 2000).

Ohyb cilia je důležitým dějem. V řasinkových epitelech dýchacích cest zajišťuje odstranění škodlivých nahromaděných tekutin. Ve vejcovodech vlivem ohybu cilií dochází k pohybu vajíčka a případně ke vzniku nového života. Při samotném embryonálním vývoji je důležité proudění kapaliny, které může mít výrazný vliv na jeho správný průběh.

Je tudíž zřejmé, že ohyb cilia není zcela náhodný, jelikož hydrodynamický tok jím generovaný musí mít určitý směr. V dýchacím traktu dochází v ciliích ke dvěma pulsům. Během prvního efektivního a rychlého pulsu dochází k ohnutí cilia dopředu. Druhý regenerační puls slouží k navrácení cilia do původní pozice s minimálním zasažením okolní vrstvy hlenu (Supatto *et* Vermot, 2011). Tyto asymetrické pulsy způsobují správný směr toku kapaliny (viz obrázek 2).

Obrázek 2: Ukázka ohybu cilia



Převzato z: Supatto, W., & Vermot, J. (2011). From cilia hydrodynamics to zebrafish embryonic development. In *Current topics in developmental biology* (Vol. 95, pp. 33-66). Academic Press.

3.3. Signální kaskády uvnitř cilií

Cilia jsou téměř všudypřítomná. Dlouhou dobu se předpokládalo, že nemají kromě motilní funkce žádnou jinou úlohu. Bylo však zjištěno, že jsou součástí buněčných signálních kaskád, které hrají klíčovou roli při vývoji organismů (Gheber *et* Priel, 1997).

3.3.1. Hedgehog signální kaskáda

Hedgehog signální kaskáda hraje zásadní roli při regulaci procesů v buňce, které zahrnují jak specifikaci buněk, tak jejich proliferaci (Walters *et al.*, 2011). U drosophily a obratlovců hraje zásadní roli při vývoji embrya. Chybná signalizace byla identifikována i u různých typů rakovin.

Hedgehog gen byl poprvé identifikován při embryonálním vývoji octomilky (Nüsslein-Volhard *et* Wieschaus, 1980). Embryo recesivního homozygota s mutantní formou Hedgehog

bylo pokryto výrůstky, které připomínaly bodlinky ježka (anglicky hedgehog). Tak byla pojmenována nejen příslušná genová rodina, ale i celá signální kaskáda.

Hedgehog genová rodina zahrnuje několik genů, které kódují proteiny plnící funkci ligandů v hedgehog signální kaskádě. U obratlovců mezi ně patří Sonic hedgehog, Indian hedgehog a Desert hedgehog (Chen *et al.*, 2007). U nižších obratlovců byly nalezeny i další formy těchto ligandů (McMahon, 2000).

Ligand je obvykle exprimován v buňkách mnoha orgánů. Dále je však zpracováván v exprimujících buňkách, kde pomocí autokatalytické reakce dochází k odstranění C-terminálního konce signální molekuly a zároveň je k C-terminálnímu konci proteinu připojena molekula cholesterolu (Mullor *et al.*, 2002). K N-terminálnímu konci je připojen palmitát. Tyto modifikace regulují aktivitu ligandu, difúzi a potenci.

Na uvolnění hedgehog proteinu a jeho difúzi se podílejí další dva proteiny. Dispatched protein je transmembránový protein s doménou citlivou pro steroly, který umožňuje uvolnění ligandu. Druhým je Tout-velu transmembránový protein, který zajišťuje transport ligandu.

Celá kaskáda je spuštěna navázáním jednoho z ligandů na transmembránový protein Patched. Hlavní úlohou tohoto proteinu je represe Smothened proteinu. Po navázání ligandu dochází k ukončení represe Smothened proteinu. Smothened protein je protein homologní ke G proteinům. Signál je u drosophily dále přenášen pomocí kinesin-like protein Costal, Fused a serin threonin proteinkinázy, až k transkripčnímu faktoru, který zajišťuje transkripci cílových genů (Rubin *et Sauvage*, 2006).

3.3.2. Wnt signální kaskáda

Wnt signální kaskáda ovlivňuje vývojové procesy organismu. Reguluje buněčnou proliferaci a diferenciaci.

Kanonická Wnt signální kaskáda je spuštěna vazbou Wnt ligandu na Frizzled transmembránový receptor. Receptor aktivuje Dishevelled, který svou činností naopak inhibuje komplex proteinů, mezi které patří glykogen syntetáza kináza-3 β , adenomatous polyposis coli, axin a kasein kináza 1. Komplex těchto proteinů zásadně ovlivňuje cílovou molekulu kanonické wnt signální kaskády, kterou je β -katenin. Pokud je kaskáda neaktivní, je β -katenin fosforylován a následně degradován v proteazomu. Při aktivaci celé dráhy pomocí vazby ligandu dochází k zastavení degradace β -kateninu a k jeho nahromadění v cytosolu

buňky. Následně pak β -katenin vstupuje do jádra a interaguje s transkripčními faktory a spouští expresi vybraných genů (Wodarz *et Nusse*, 1998).

Kanonická wnt signální kaskáda má spojitost s onemocněními spojenými s tvorbou cyst. Bylo zjištěno, že polycystin 1 má vliv na modululaci wnt signální dráhy (Kim *et al.*, 1999).

Druhou větví wnt signální kaskády je takzvaná nekanonická wnt signální dráha. V základu začíná stejně jako ta kanonická, vazbou ligandu na transmembránový Frizzled receptor. Spouštěčem nekanonické wnt dráhy je protein inversin. Ten způsobuje degradaci cytosolického dishevelled proteinu (Simmons *et al.*, 2005). Tím dojde k odklonu od kanonické dráhy. Membránový dishevelled protein ovšem degradaci uniká, ten způsobí aktivaci proteinu z rodiny RAS kináz RhoA a stimulaci JNK kinázy a Rho-asociované kinázy. Výsledkem je reorganizace buněčného cytoskeletu a změna transkripční aktivity.

4. Ciliopatie

Pojem ciliopatie zahrnuje velkou a různorodou skupinu onemocnění, jejichž podstatou je genetická mutace, kvůli jejímuž vlivu vzniká defektní protein, který se podílí na správné funkci, nebo struktuře cília. Jelikož cília jsou v lidském těle téměř všudypřítomná, mohou tyto mutace způsobovat nejrůznější fenotypy. Jejich projevy jsou cystická onemocnění ledvin, jater a pankreatu, defekty skeletu, situs inversus, hydrocephalus, exencephalus, obezita, hyperfagie, diabetes, retinitis pigmentosa, ztráta zraku a sluchu, ateroskleróza, hypertenze, špatné hojení ran, nádory, embryonální letalita, kognitivní defekty, choroby kůže, infertilita a mimoděložní těhotenství.

Fenotypové projevy ciliopatií se sice v některých případech mohou překrývat, ale často se od sebe velmi liší. Důvodem může být množství proteinů podílejících se na stavbě a funkci cília a jejich rozdílná funkce, nebo, chcete-li, úloha v této organelle. Je identifikováno přes čtyřicet kauzálních genů (Waters *et al.*, 2011) a vzhledem ke komplexnosti celé struktury je velice pravděpodobné, že budou objevovány nové. Pro přehled jsou jednotlivé ciliopatie a jejich kauzální geny uvedeny v tabulce (viz tabulka 1, viz tabulka 2).

Tabulka 1: Přehled jednotlivých ciliopatií, jejich fenotypových projevů, způsobu dědičnosti a četnosti výskytu v populaci

Název syndromu	Fenotypové projevy	Způsob dědičnosti	Četnost výskytu
Bardet Biedl syndrom (BBS)	obezita, diabetes, polydaktylie, cystické ledviny, retinis pigmentosa, hypogenitalismus, situs inversus	Autozomálně recesivní	1 : 13 500 - 160 000
Meckel - Gruber syndrom (MKS)	cystické ledviny, fibrosa jater, malformace CNS, jater a srdce, polydaktylie, laterální defekty	Autozomálně recesivní	1 : 9 000 - 140 000

Název syndromu	Fenotypové projevy	Způsob dědičnosti	Četnost výskytu
Joubert syndrom (JBTS)	hypotonie, ataxie, psychomotorické opožďení, okulomotorická apraxie, degenerace retiny, polymikrogrie, cystické ledviny, fibrosa jater a polydaktylie	Autozomálně recesivní	1 : 80 000
Nefronoftýza (NPHP)	snížená kortikomedulární diferenciacie, tubulointersticiální nefropatie, kortikomedulární cysty, fibróza jater a/nebo pankreatu, retinitis pigmentosa, hypoplazie mozečkového červu, situs inversus	Autozomálně recesivní	1 : 50 000
Senior- Løken syndrom (SLSN)	neftonoftýza, poškození retiny manifestující se jako Leberova kongenitální amauroza nebo jako dystrofie retiny	Autozomálně recesivní	1 : 1 000 000
Leberova kongenitální amauroza (LCA)	dystrofie retiny, těžké poškození zraku až slepota	Autozomálně recesivní, autozomálně dominantní	1 : 50 000 - 75 000
Alstorm syndrom (ALMS)	progresivní ztráta zraku a sluchu, kardiomyopatie, obezita, acanthosis nigricans, defekty ledvin, plic, jater, močového měchýře	Autozomálně recesivní, autozomálně dominantní	cca 900 celosvětově
Polycystické ledviny (PKD)	mnohočetné cysty v ledvinách, cysty v játrech, mozková aneuryzmata	Autozomálně recesivní, autozomálně dominantní	1 : 500-20 000

Tabulka 2: Ciliopatie a jejich kauzální geny

GENY	BBS	MKS	JBTS	NPHP	SLSN	LCA/RP	JADT	ALMS	PKD
<i>BBS1</i>	x								
<i>BBS2</i>	x								
<i>BBS4</i>	x								
<i>BBS5</i>	x								
<i>BBS7</i>	x								
<i>BBS9</i>	x								
<i>BBS10</i>	x								
<i>TRIM32</i>	x								
<i>BBS12</i>	x								
<i>MKKS</i>	x								
<i>ARL6</i>	x					x			
<i>TTC8</i>	x					x			
<i>WDPCP</i>	x	x							
<i>MKS1</i>	x	x							
<i>NPHP6</i>	x	x	x	x	x	x			
<i>TMEM67</i>	x	x	x	x					
<i>RPGRIP1</i>		x	x	x		x			
<i>CC2D2A</i>		x	x						
<i>TMEM216</i>		x	x						
<i>NPHP3</i>		x		x					
<i>TCTN2</i>		x							
<i>B9D1</i>		x							
<i>B9D2</i>		x							
<i>NPHP1</i>			x	x	x				
<i>TTC21B</i>			x	x					
<i>ARL13B</i>			x						
<i>INPP5E</i>			x						
<i>JBTS3</i>			x						
<i>KIF7</i>			x						
<i>TCTN1</i>			x						
<i>OFD1</i>			x						
<i>SDCCAG8</i>				x	x				
<i>NPHP4</i>				x	x				
<i>GLIS2</i>				x					
<i>WDR19</i>				x					
<i>NEK8</i>				x					
<i>INVS</i>				x					
<i>IQCB1</i>					x	x			
<i>RPGRIP1</i>						x			
<i>LCA5</i>						x			

GENY	BBS	MKS	JBTS	NPHP	SLSN	LCA/RP	JADT	ALMS	PKD
<i>PR2</i>						x			
<i>RPGRIP1</i>						x			
<i>MAK</i>						x			
<i>ATD1</i>							x		
<i>IFT80</i>							x		
<i>DYNC2H1</i>							x		
<i>ALMS1</i>								x	
<i>PKD1</i>									x
<i>PKD2</i>									x

4.1. Primární ciliární dyskineze

Jednotlivé ciliopatie lze rozdělit podle toho, zda se jedná o poruchu motilního, nebo nemotilního cilia. Defekty motilních cilií jsou označovány jako primární ciliární dyskineze (PCD). Primární ciliární dyskineze je obvykle autosomálně recesivní onemocnění. Ale i toto pravidlo má svou výjimku. Protože jsou cilia komplexní struktury, na jejichž stavbě a funkci se podílí množství různých proteinů, je i genetická variabilita tohoto onemocnění široká. Byly evidovány i případy, kdy byla PCD X vázaná (Narayan *et al.*, 2007).

Onemocnění má četnost v populaci 1 : 15 000 - 30 000. Drtivá většina pacientů je identifikována s mutací v některém z dyneinových ramen, která jsou zodpovědná za správný ohyb cilia. Pod označením PCD se ukrývá řada syndromů s překrývajícím se fenotypem. Nejvýznamnějším z nich je Kartagenerův syndrom, který byl identifikován jako první ciliopatie vůbec.

4.1.1. Kartagener syndrom

Kartagener syndrom je doprovázen stavem známým jako situs inversus. Postižení jedinci mají obrácené uspořádání vnitřních orgánů (Adams *et al.*, 1937). Naštěstí se tento stav u většiny pacientů vyskytuje bez potíží a je zjištěn až při důkladné lékařské prohlídce. Zrcadlová orientace je zapříčiněna poruchou primárních cilií, která ovlivňují embryonální vývoj jedince.

Kartagenerův syndrom lze zachytit i podle dalších typických příznaků, které se vyskytují i u dalších ciliopatií. Kvůli nedostatečné funkci právě motilních cilií dochází k hromadění hlenu uvnitř plic, stejně jako dalších znečišťujících látek. To dává prostor pro vývoj bakterií, a u pacientů se rozvíjí bronchiectázie, mají potíže s dýcháním, stejně jako rinoreu a těžký vlhký kašel. Často jsou pozorovány záněty středního ucha nebo ztráta sluchu. Jelikož se jedná

o poruchy motilních cilií jsou postiženy i bičíky spermií, a syndrom je tak často doprovázen i infertilitou mužských pacientů (Rott, 1979).

Diagnostika jedinců s tímto onemocněním je poměrně obtížná vzhledem k malé četnosti syndromu v běžné populaci. Prvním vodítkem je pozorování výše popsaných symptomů. Pro potvrzení diagnózy se provádí biopsie tkáně, která obsahuje motilní cilia. Ta je následně podrobena mikroskopickému pozorování ohybu cilia, nebo jsou pomocí elektronového mikroskopu hledány strukturní abnormality cilií, především v oblastech dyneinových ramen. Třetí metodou je genetické testování.

Jelikož se jedná o genetickou chorobu, není v současné době možné ji plně vyléčit. Proto je volena léčba symptomatická. Po diagnostikování PCD je třeba zajistit vhodnou léčbu pro daného jedince. Pro PCD je typické postupné zvyšování intenzity symptomů s přibývajícím věkem. Pacienti s vhodnou léčbou mají lepší prognózy pro budoucí život (McMANUS *et al.*, 2003). Nejvíce život ohrožující jsou právě bakteriální infekce. Proti těm běžným jsou používána antibiotika již při prvním podezření na zhoršení dýchání. Jedinci jsou preventivně naočkováni proti chorobám, které napadají především dýchací systém.

4.2. Porucha primárních cilií

Druhou skupinou ciliopatií je porucha primárních cilií, které jsou přítomné téměř v každé buňce a které mají senzorickou funkci. Ciliopatie tedy postihují celou skupinu orgánů.

U pacientů s diagnostikovanou ciliopatií často detekujeme poruchy renální funkce. Zvířecí modely potvrdily spojitost strukturní, nebo funkční abnormalitu cilií s následným formováním cyst (Yoder *et al.*, 2002). Autozomálně recesivní polycystická choroba ledvin je těžké vrozené onemocnění. Projevuje se zvětšením ledvin, tvorbou cyst a jaterní fibrózou (Bergmann *et al.*, 2005). U postiženého plodu se vyvíjí fenotyp Potterové s hypoplazií. Nedostatečná funkce plic je příčinou úmrtí novorozenců. V pozdějším věku dochází u pacientů k selhání ledvin, které jsou následně nahrazeny transplantací.

4.2.1. Autozomálně dominantní polycystická choroba ledvin

Významnou poruchou ledvin je autozomálně dominantní polycystická choroba ledvin. Jedná se o autozomálně dominantní dědičné onemocnění, které má v populaci poměrně vysoký výskyt. Prevalence je asi 1 : 400 - 1 : 1000. Takto vysoké číslo řadí ADPKD mezi jednu z nejvíce frekventovaných monogenových chorob vůbec. Při onemocnění dochází k remodelaci

nefronů a vzniku cyst. Ty jsou vyplněny tekutinou a jejich počet a velikost s přibývajícím věkem vzrůstá (Harris *et Torres*, 2009).

Vznikající cysty jsou příčinou snížené funkce ledvin a asi 50 % pacientů dospěje do konečného stádia nemoci zhruba kolem šedesátého roku života (Grantham *et al.*, 2011). Lidí postižených ADPKD je v současnosti kolem 12 milionů a každá čtvrtá provedená transplantace ledvin je v důsledku právě tohoto onemocnění. ADPKD však nezpůsobuje poškození a vznik cyst pouze v ledvinách. Postihuje i jiné orgány, nejčastěji pak játra a slinivku, kde stejně jako u ledvin dochází ke vzniku cyst.

Autosomálně dominantní polycystická choroba ledvin je způsobena mutací v jednom ze tří kauzálních genů. Mutace v genu *PKD1* je detekována v 85 % případů (Rossetti *et al.*, 2007). U zbylých jedinců je detekována mutace genu *PKD2*. Některé studie dlouhodobě naznačovaly, že se u malého procenta jedinců vyskytuje mutace i na třetím neznámém místě (Daoust *et al.*, 1995). Po genetickém vyšetření zůstávalo stále několik procent pacientů bez identifikované kauzální mutace. Nedávno byl objeven třetí kauzální gen ADPKD, který byl pojmenován *PKD3* (Porath *et al.*, 2016). Tento gen kóduje podjednotku glukosidázy. Ta je nezbytná pro správnou lokalizaci a maturaci polycystinu 1, který je kódován genem *PKD1*.

Pokud porovnáme jednotlivé ADPKD podle kauzálního genu, lze obecně říct, že onemocnění způsobená mutací genu *PKD1* mají závažnější průběh. Jedinci dospívají do konečného stádia nemoci v průměru o dvacet let dříve, než jedinci s mutací v genu *PKD2* (Hateboer *et al.*, 1999). Těžší dopad onemocnění je zřejmě způsoben tím, že se u postižených jedinců začnou cysty objevovat v nižším věku.

I díky mechanismu formování cyst je zřejmé, že nemoc se neprojevuje v prvních dekádách života. U jedinců s vyšším rizikem rozvoje choroby, to znamená u příbuzných diagnostikovaných pacientů, se často provádí diagnostika této nemoci.

4.2.1.1. Klinické projevy onemocnění a diagnostika

Přestože je ADPKD vrozené hereditární onemocnění, v nižším věku u většiny pacientů nedochází k projevům nemoci. Výjimkou je velmi časný nástup onemocnění, kdy mohou být cysty objeveny již prenatálně (Fick *et al.*, 1993). Do osmnáctého roku života se u nadpoloviční většiny dětských pacientů vyšetřených ultrasonografem nevyskytuje ani jedna cysta (Fick *et al.*, 1994). Mezi další symptomy nemoci se řadí abdominální bolesti, hypertenze, bolest hlavy a nevolnost.

Teprve u dospělých dochází k plnému rozvoji onemocnění, ovšem i u této skupiny nemocných dochází k odchylkám ve fenotypovém projevu, kdy na jedné straně spektra stojí jedinci téměř bez příznaků a na straně druhé pacienti s renálním selháním.

Typickým postiženým orgánem jsou samozřejmě ledviny, které jsou hypertrofované a vznikají na nich mnohočetné cysty.

Druhým závažným symptomem je hypertenze. Ta se vyskytuje již v dětství a její prevalence stoupá s progresí onemocnění. Vysoký krevní tlak je dobrým markerem onemocnění, neboť roste s jeho závažností. Zároveň se jedná o nepříznivý faktor zhoršující prognózu renálního onemocnění (Gabow *et al.*, 1990).

Kromě hypertenze jsou častá i jiná kardiovaskulární onemocnění, a to především poruchy srdečních chlopní. Zároveň může docházet k mozkovým aneurysmatům. Kardiovaskulární komplikace lze zmírnit a zpomalit užíváním léků snižujících krevní tlak (Ecdar *et al.*, 2009).

Dalším typickým příznakem je vznik cyst nejen v oblasti ledvin, ale i ve slinivce, játrech a slezině.

Diagnóza onemocnění je u většiny pacientů stanovena až v dospělosti na základě dostavujících se symptomů. Presymptomatická diagnostika je možná na základě rodinné anamnézy.

Klinická diagnostika je prováděna na základě ultrazvukového vyšetření ledvin, kdy lékaři sledují přítomnost cyst na ledvinách jedinců. Molekulární diagnostika je prováděna sekvenováním genů *PKD1* a *PKD2* a hledáním kauzálních mutací.

Molekulární diagnostika ADPKD je značnou výzvou. Gen *PKD1* má totiž šest pseudogenů, které se nacházejí na stejném chromozomu, a vykazují 97% homologii s genem *PKD1* (Mallawaarachchi *et al.*, 2016). Zároveň gen obsahuje velké množství CG bází a nemá žádná hot spot mutační místa (Trujillano *et al.*, 2014).

4.2.2. Molekulární podstata onemocnění

Produktem genu *PKD1* je protein Polycystin 1. Jedná se o 450 kDa velký protein s velkou N-terminální doménou, 11 transmembránovými doménami a krátkou C-terminální doménou. Přestože je C-terminální doména nejkratší, je to právě ona, která je zodpovědná za katalytickou aktivitu proteinu. Protein je exprimován v epitelových buňkách renálních

tubulů, ale i v buňkách dalších orgánů, jako jsou srdce, játra a kosterní aparát (Ward *et al.*, 1996).

Hladina polycystinu se mění v průběhu vývoje organismu, kdy nejvyšší hodnoty jsou detekovány v renální tkáni plodu, zatímco nejnižší v tkáni dospělého jedince (Chauvet *et al.*, 2002).

Produktem genu *PKD2* je protein polycystin 2. Jedná se o 110 kDa velký protein, který má šest transmembránových domén.

Oba polycystiny se v buňce nacházejí v těsné blízkosti vedle sebe v membráně primárního cilia. Vytvářejí společně komplex, v němž polycystin 1 hraje roli receptoru a polycystin 2 plní funkci iontového kanálu pro vápenaté ionty.

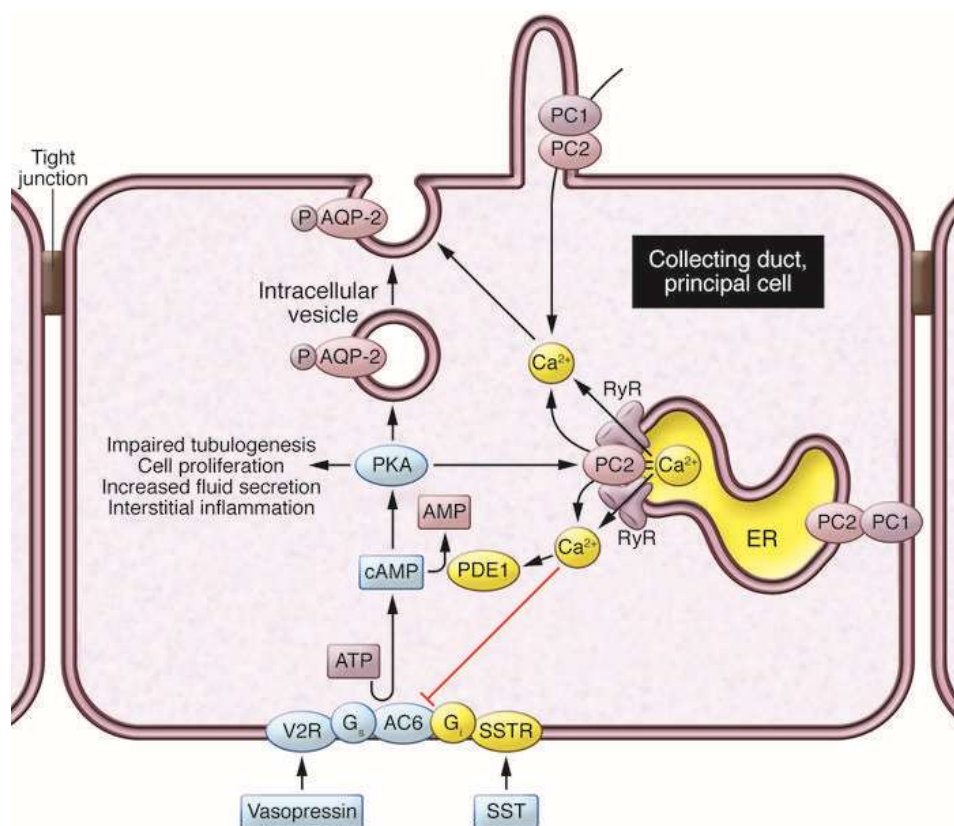
Polycystin 1 a polycystin 2 moduluji řadu signálních kaskád. Polycystin je inhibítozem buněčného růstu a dělení v několika signálních drahách (Chapin *et Caplan*, 2010). Způsobuje inhibici mTOR, který je zodpovědný za buněčný růst. Overexprese *PKD1* způsobuje aktivaci Janus kináz, čímž dochází ke zvýšení koncentrace proteinu p21, který je inhibítozem cyklin dependentních kináz, které řídí buněčný cyklus. Polycystin 2 redukuje buněčný růst přímou interakcí s eIF2a.

Polycystin je aktivátorem G-proteinů, které se účastní řady důležitých procesů v buňce. Rovněž se podílí na regulaci wnt signální kaskády.

PKD fenotyp je doprovázen zvýšenou proliferací buněk a exkrecí fluidních látek. Oba tyto procesy jsou stimulovány cAMP v důsledku odlišné reakce na tuto signální molekulu v epitelových buňkách cysty. Za normálních okolností způsobuje cAMP inhibici RAS/MAPK signální kaskády, která způsobuje proliferaci buněk. Ovšem v epitelových buňkách cyst dochází k opačné odpovědi. Namísto snižování aktivity RAS/MAPK signální kaskády dochází k její aktivaci pomocí B-Raf. Vše napovídá tomu, že tato situace je způsobena nejen cAMP, ale i sníženou hladinou vápenatých iontů v cystických buňkách.

Vápenaté ionty totiž inhibují klíčovou komponentu proliferační signální kaskády, B-Raf. Nefunkční *PKD1* vede ke sníženému influxu vápenatých iontů do buňky, a tím dojde k derepresi B-Raf a k následné proliferaci. Aby se tento proces ještě více podpořil, dochází kvůli nízké koncentraci vápenatých iontů k derepresi adenylát cyklázy, a tím pádem k vyšší koncentraci cAMP (viz obrázek 3).

Obrázek 3: Signální kaskáda vedoucí ke vzniku cyst při chybné signalizaci pomocí cAMP a vápenatých iontů



Převzato z: Harris, P. C., et Torres, V. E. (2014). Genetic mechanisms and signaling pathways in autosomal dominant polycystic kidney disease. *The Journal of clinical investigation*, 124(6), 2315-2324.

Zároveň bylo prokázáno, že zvýšenou koncentrací C terminálního konce Polycystinu 1 dochází ke stejným projevům, které byly popsány výše, a tudíž ke tvorbě cyst. C terminální konec polycystinu totiž stimuluje G protein, který stimuluje i adenylát cyklázu, a to vede ke zvýšené koncentraci cAMP.

Snižování hladiny renálního cAMP bylo prokázáno jako efektivní terapeutický prostředek při léčbě ADPKD.

4.2.2.1. Mechanismus formování cyst

Přestože ADPKD je, jak už název napovídá, považována za dominantní onemocnění, je recesivní na buněčné úrovni. Potomci pacientů s diagnostickou ADPKD, kteří zdělili mutovanou alelu genu pro polycystin, mají standardní vývoj ledvin. Cysty se začínají objevovat až v dospělosti. Studie ukazují, že buňky stojící za vznikem těchto cyst mají mutované obě alely genu pro polycystin. Každá cysta tedy vzniká samostatně pod vlivem nové mutace postihující opět produkci polycystinu (Pei, 2001). To vysvětluje i postupný vznik cyst v průběhu dekad. Pomalá akumulace cyst je vysvětlována nejen druhou mutací způsobující úplnou ztrátou funkce genu, ale i možným mechanickým poškozením ledvin,

které vyvolá následnou opravu. Oprava zahrnuje buněčný růst a dělení. Na regulaci těchto dějů má velký vliv hladina Polycystinu 1 a Polycystinu 2, snížená hladina těchto proteinů může vést ke špatné signalizaci, a tudíž k vzniku cysty (Leeuwen *et al.*, 2004).

Ve vyjíjejcím se nefronu byl dokázán vliv nekanonické hedgehog signální kaskády na vznik cyst. Během vývoje ledvin dochází k masivní buněčné proliferaci tak, aby docházelo k prodlužování tubulů. Tubulus je prodlužován pouze v jednom směru, a dělení tedy musí mít příslušnou orientaci tak, aby docházelo k prodloužení tubulu bez zvětšení jeho průměru.

Za správné dělení je nejspíš zodpovědná nekanonická signální kaskáda. Tubulární tok přítomný v lumenu nefronu může být detekován ciliem, to spouští signální kaskádu, výsledkem které je správná orientace dělení. Defektní cilium, tedy špatné sensorické vyhodnocení toku, nebo defektní signální kaskáda mohou vést ke špatné orientaci dělení a eventuálně k tvorbě cysty.

5. Materiál a metodika

5.1. Materiál

Pro experimentální část bakalářské práce byla použita kontrolní DNA a vzorky DNA izolované z krve pacientů. DNA poskytly Laboratoře Agel a.s., Nový Jičín.

5.1.1. Přístroje

- Spektrofotometr NanoDrop 2000 (Thermo Scientific)
- PCR box (Biosan)
- Termocyklér Mastercycler pro S (Eppendorf)
- Sekvenátor ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)
- Sekvenátor ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)
- Vortex (Biosan)
- Pipetovací robot Biomek 4000
- Bioanalyzátor 2100 (Agilent)
- MiSeq (Illumina)

5.1.2. Laboratorní pomůcky

- Mikropipety (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1 000 µl - Eppendorf)
- Multikanálová pipeta 10 µl (Eppendorf)
- Jednorázové špičky (Bioplastics)
- Mikrozkušavky (0,2 ml, 1,5 ml - Bioplastics)
- Jednorázové rukavice SensiPlus (Vulkan - medicals)
- Septa (Applied Biosystems)
- Stojan na mikrozkušavky (Bioplastics)
- Špičky do pipetovacího robota (Biomek AP96 P250 Pipette Beckman Coulter)

5.1.3. Chemikálie a použité roztoky

- Voda (PCR - H₂O) (Bioline)
- MyTaq HS DNA (Bioline)
- Gene Scan 500 LIZ Size standard (Applied Biosystems)
- Formamid
- LightCycler FastStart DNA Master HybProbe (Roche)

- Agencourt CleanSEQ (Beckman Coulter)
- 85% Ethanol
- Alkalická fosfatáza (Thermo Scientific)
- Exonukleáza I (Thermo Scientific)
- BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)
- BigDye Terminator Sequencing Buffer (Applied Biosystems)
- MyFi DNA polymeráza a mix (Bioline)

5.2. Metodika

5.2.1. Amplifikace mikrosatelitů v blízkosti vyšetřovaných genů

K amplifikaci se používaly primery, které zahrnovaly a amplifikovaly mikrosatelitovou oblast v blízkosti vyšetřovaných genů. Byla použita DNA rodiny s diagnostikovanou ADPKD.

Postup:

Byla připravena reakční směs (viz tabulka 3). U každého probanda a jeho rodinných příslušníků bylo amplifikováno deset mikrosatelitových oblastí. Pět z chromozomu šestnáct, z oblasti genu *PKD1*, a pět z chromozomu čtyři, tedy z oblasti genu *PKD2*. Reakční směs byla pipetována do popsaných 0,2 ml mikrozkušavek po 9 μ l. Do každé zkumavky byla následně přidána dvojice primerů (F a R). Vzorky byly vortexovány a centrifugovány. Zkumavky byly vloženy do termocycleru, teplotní profily reakce se lišily u jednotlivých skupin primerů (viz tabulky 4 a 5).

Tabulka 3: Složení reakční směsi pro amplifikaci mikrosatelitů

Chemikálie	Pipetovaný objem 1x (μ l)
Voda	3,5
MyTaq HS	5
Směs primerů F+R	1
DNA	0,5
Celkem	10

Tabulka 4: Použité mikrosatelitové markery v blízkosti sledovaných genů *PKD1* a *PKD2*, sekvence primerů pro amplifikaci makrerů a jejich annealingová teplota

Gen	Označení markeru	Sekvence Primerů	Ta	
PKD1	D16S665	5'-HEX-AGCTGGGGTCTCAGGGGAGCT 5'-GCGCACACAGCACTAACACG	66	
	D16S291	5'-6FAM- GCAGCCTCAGTTGTGTTTCCTAATC 5'- AGTGCTGGGATTACAGGCATGAACC	62	
	D16S663	5'-TET-GTCTTTCTAGGAATGAAATCAT 5'- ATGCAGCAAGACTCCATCT	52	
	D16S283	5'-TET-ACATATGTAGTCTTCTGCAGG 5'-ACAAGAGTGAATCTCTGACAG	54	
	D16S475	5HEX-GGTTGACAGAGTGAGACTC 5'- GGAACAGAAAATACTGCACG	60	
	PKD2	D4S1534	5'-HEX-ATTCAGTTTCAGCCCCAT 5'- ACCAGCCCAAGGTAGAGG	56
		D4S2929	5-TET-GGCCAGGAGTTCAAAA 5'- TGCAGCAAGTCCAACA	56
		D4S1563	5'-HEX-GCTGCCTGACACACTGG 5'- ACTATTGCTGTTGCTGACCC	63
		D4S414	5'-6FAM-TTGCACAAAGCATCAGCC 5'-TCAGGAACCTCAGCCCAT	57
		D4S423	5'-6FAM-TTGAGTAGTTCCTGAAGCAGC 5'- CAAAGTCCTCCATCTTGAGTG	58

Tabulka 5: Teplotní profil PCR pro amplifikaci mikrosatelitů

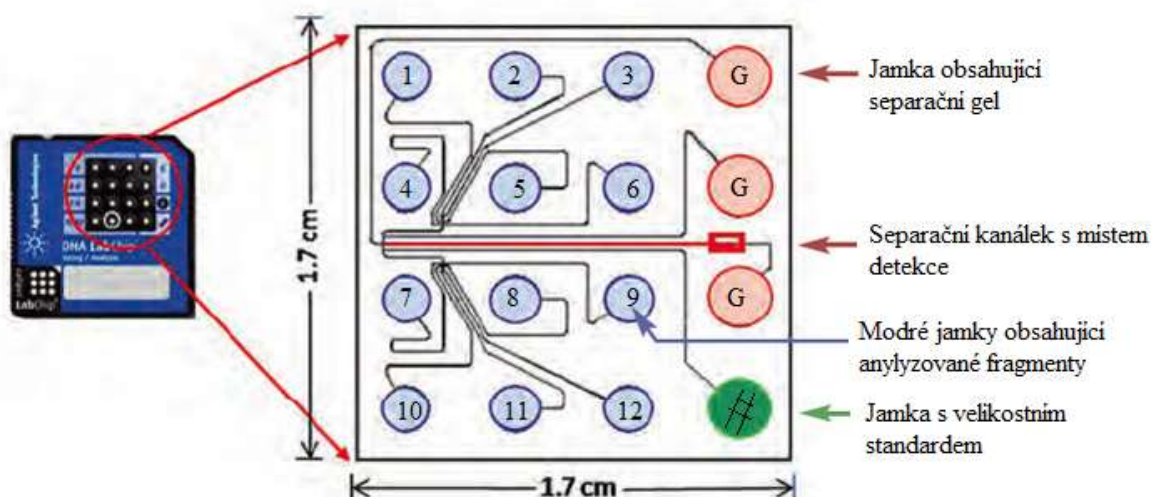
Denaturace	95 °C	5 min	32 cyklů
Denaturace	95 °C	30 sec	
Annealing	52-66 °C*	30 sec	
Syntéza	72 °C	30 sec	
Dosyntetizování	72 °C	10 min	

*viz tabulka 4

5.2.2. Analýza PCR fragmentů pomocí bioanalyzáru Agilent 2100

Pro ověření, charakterizaci a kvantifikaci výsledků polymerázové řetězové reakce byla provedena analýza na bioanalyzáru Agilent 2100. Ten v podstatě funguje na principu elektroforetické separace. Pro analýzu je zapotřebí v našem případě DNA chip. Chip je tvořen jamkami a tenkými kanálky, které jsou vyplněny zesíťovaným polymerem, do kterého je přidáno fluorescenční barvivo. Jednotlivé analyzované vzorky jsou nanášeny do jamek. Chip je vložen do analyzátoru. Pomocí elektrického pole dochází k separaci molekul na základě velikosti. Pro absolutní kvantifikaci je zapotřebí do jedné z jamek pipetovat marker molekulové hmotnosti. Výstupem jsou data ve formě grafů s píky, které znázorňují analyzované fragmenty, nebo ve formě elektroforetického gelu.

Obrázek 3: Schéma DNA chipu využívaného při analýze na bioanalyzáru Agilent 2100



Převzato z: <http://www.foodqualityandsafety.com/article/fish-and-chips/4/?singlepage=1>

Postup:

Všechny reagenty a chip jsou součástí kitu pro analýzu na přístroji Agilent. Postup práce na bioanalyzáru byl prováděn dle příslušného manuálu. Nejprve byl gel společně s fluorescenčním barvivem temperován na pokojovou teplotu. Následně bylo pipetováno 9 μ l gelu do jamky s označením G. Chip byl vložen do chipové stanice. Stanice byla nastavena do polohy tři a následně byl zamáčknut píst. Po 60 vteřinách byl píst uvolněn a vytáhnut do počáteční polohy. Do dvou jamek s označením G bylo pipetováno 9 μ l gelu. Do všech jamek se vzorkem i markerem molekulové hmotnosti bylo pipetováno 5 μ l markeru. Do jamky určené pro ladder byl pipetován 1 μ l markeru. Do zbylých dvanácti jamek byl pipetován 1 μ l

analyzovaného vzorku. Chip byl protřepán po dobu 60 sekund a následně byla spuštěna analýza.

5.2.3. Fragmentační analýza

Fragmentační analýza probíhá pomocí fluorescenčně značených primerů. Po PCR amplifikaci jsou vzorky smíchány s nosným médiem a markerem molekulové hmotnosti. Fragmentační analýza funguje na podobném principu jako sekvenční analýza podle Sangera, ovšem není zde označen každý nukleotid, ale pouze primer. Produkt je pomocí elektrického pole nucen projít tenkou kapilárou naplněnou gelem, kde je rozdělen podle velikosti. Kapilára je snímána laserem. Ve chvíli, kdy dochází k průchodu námi sledovaného fragmentu, dochází ke snímání a zaznamenání fluorescenčního signálu. Pomocí markeru molekulové hmotnosti je s velkou přesností určena i délka sledovaných fragmentů.

5.2.4. Sekvence genů pomocí sekvenování nové generace

V prvním kroku byly kauzální geny osekvenovány na přístroji Miseq od Illuminy. Zjištěné kauzální varianty byly následně confirmovány pomocí Sangerova sekvenování.

5.2.5. Ověření výsledků pomocí Sangerova sekvenování

Nejdříve byla provedena amplifikace cílového úseku. U ADPKD je tato práce obzvlášť náročná, jelikož gen *PKDI* má deset pseudogenů, s vysokou homologií, které komplikují PCR. Při navrhování primerů se tedy dbá na to, aby primery nasedaly pouze do oblastí unikátních pro geny, nikoli pseudogeny.

Primery pro diagnostiku ADPKD již byly navrženy a optimalizovány (viz tabulka 8 a 9). Oba primery F i R byly přidány do reakce společně s DNA polymerázou a vodou (viz tabulka 10). Teplotní profily PCR viz tabulky 6 a 7.

Tabulka 6: Teplotní profil PCR amplifikace genu *PKDI*

denaturace	94 °C	1 min	
denaturace	94 °C	30 sec	30 cyklů
annealing	60 °C*	5 sec	
syntéza	72 °C	90 sec	
dosyntetizování	72 °C	7 min	

* u exonu 1 byla použita annealingová teplota 63°C

Tabulka 7: Teplotní profil PCR amplifikace genu *PKD2*

denaturace	95 °C	15 min	
denaturace	94 °C	15 sec	30 cyklů
annealing	53 °C	8 sec	
syntéza	72 °C	8 sec	
dosyntetizování	72 °C	4 min	

Tabulka 8: Sekvence primerů použitých pro amplifikace genu *PKD1* (Liu *et al.*, 2014)

Exon	Primer	Sekvence 3' - 5'	Délka bp
1	PKD1 ex1 F	TAGCTGGGATTATAGGTGCTG	2073
	PKD1 ex1 R	CAGACACCTCCTGGAACCTCTC	
2 – 8	PKD1 ex2-8 F	TTGCTATGCTGTCCATCCTG	4211
	PKD1 ex2-8 R	TTCAGGAATAACTCACACACGC	
9-12	PKD1 ex9-12 F	TTCCACCGGAGTCTTCCTC	3215
	PKD1 ex9-12 R	GCAGCATGAAGCAGAGCAG	
13-15	PKD1 ex13-15 F	TTCTGCTCTGCTTCATGCTG	3221
	PKD1 ex13-15 R	TGGTAAATGGCTCGGAGG	
15-21	PKD1 ex15-21 F	AGAGGCAGTTTGTGCAGCTC	5861
	PKD1 ex15-21 R	ACACAGGACAGAACGGCTG	
22-26	PKD1 ex22-26 F	TCCAGTCAAGTGGGCTCTC	3445
	PKD1 ex22-26 R	CAATGAAGAGGAAAGCAGCAC	
27-34	PKD1 ex27-34 F	TTGTGGCATGACTGAGGC	3900
	PKD1 ex27-34 R	GCTCTTCCACAGACAACAGAG	

Tabulka 9: Sekvence primerů použitých pro amplifikace genu *PKD2* (Dedoussis *et al.*, 2008)

Exon	Primer	Sekvence 5' - 3'	Délka bp
1	Forward	CCGAGCGCGGCCGCGCAC	367
	Reverse	AAGCCGGGGTTATCGCGGCT	
1-2	Forward	CGAGGCCGAGGAGGAGGAGGA	400
	Reverse	GGCGCCGTGCATCTGCCGCTGCGGGT	
2	Forward	TTCTTAAATAAAATGATATC	248
	Reverse	ATCGTTTCAAACCTTCCCA	
3	Forward	GTGTGCCGGTTCCCTTGGGG	260
	Reverse	TGTGATAGAGAGGTAATTC	
4	Forward	CAGGGCAAAGCAGCGGCATG	371
	Reverse	CACCGAGTGCCAATGAGTCA	
5	Forward	GGCCTCAAGTGTTCCTGAT	349
	Reverse	AGGAGGGATGCATGTCCTCA	
6	Forward	TTGTTATTGTTTTAATTGTT	347
	Reverse	TAGAATAGGAAATTTGGTG	

<i>Exon</i>	<i>Primer</i>	<i>Sekvence 5' - 3'</i>	<i>Délka bp</i>
7	Forward	CATATTTCTAAAACACTGTA	291
	Reverse	TGTAGAACATGAACATGAAATTTATA	
8	Forward	ACACCATTTGGTTTATCCATTC	294
	Reverse	CTAATTTTCATATATACTTACATAC	
9	Forward	TGGTGTGGTTTATTTTATAGCTTC	209
	Reverse	CCACTATAAATATAAATGTACATACC	
10	Forward	TTGATTGATAATTCCAAATTATGTTTC	228
	Reverse	TTTGAGAATTAAGGTTTTTCCTACC	
11	Forward	CTAAACCAAGTCTTTTATTT	295
	Reverse	GAGCCCTTGGGCTAGAAAATA	
12	Forward	GGATGAATGTTATCTGTATCCTC	246
	Reverse	TGTGGTGTGTAGGTACCAAATC	
13	Forward	TTCTGTGGGGTCTCAGTGTC	291
	Reverse	TCACGCAAATTCTGCCAATTCC	
14	Forward	GTA CTGTGTTTTCTTGCAGC	275
	Reverse	TGTCAGCAACATATATTATTAATAAC	
15	Forward	CCTTTTTAGGATGAAAGGCTGG	249
	Reverse	CTCCATGCCTTCTGTAGATTG	

Tabulka 10: Složení reakční směsi pro amplifikaci genů *PKD1* a *PKD2*

Chemikálie	Pipetovaný objem 1x (μl)
Voda	3,5
MyFi	5
Směs primerů F+R	1
DNA	0,5
Celkem	10

Pročištění PCR produktu

Produkty byly enzymaticky přečištěny pomocí směsi enzymů exonukleázy a alkalické fosfatázy. Poměr obou enzymů využívaný v této reakci je 1:2. Exonukleáza štěpí fosfodiesterovou vazbu na volných koncích a používá se při odstranění jednořetězcových primerů. Alkalická fosfatáza slouží k defosforylaci volných dNTP.

Postup:

Dané množství obou enzymů bylo smícháno a důkladně zvortexováno. Následně byly enzymy rozpipetovány do zkumavek, a k nim pak bylo připipetováno 5 μl PCR produktů. Vzorky pak byly vloženy do termocycleru (Teplotní profil viz tabulka 11).

Tabulka 11: Teplotní profil purifikace PCR produktů

Teplota	Doba trvání
37 °C	15 min
85 °C	15 min

Asymetrická sekvenační PCR

Postup:

Reagencie byly smíchány dle tabulky 13. Reakční směs byla pipetována do popsaných 0,2ml mikrozkušavek po 7 µl. Do každé zkumavky byl následně přidán jeden z dvojice primerů (F nebo R) a PCR produkt. Vzorky byly zcentrifugovány a vloženy do termocycleru (viz tabulka 12).

Tabulka 12: Teplotní profil sekvenační reakce

denaturace	96 °C	1 min	25 cyklů
denaturace	96 °C	10 sec	
annealing	50 °C	5 sec	
syntéza	60 °C	4 min	

Tabulka 13: Složení reakční směsi sekvenační reakce

	1x	10x
BigDye	1 µl	10 µl
Voda	5 µl	50 µl
Sekvenační pufr	1 µl	10 µl
Primer F/R	0,5 µl	5 µl
PCR produkt	0,8 µl	8 µl

5.2.5. Automatická purifikace sekvenačního produktu pomocí pipetovacího robota Biomek 4000

Před sekvenací byly vzorky pročištěny pomocí pipetovacího robota Biomek 4000. Ten purifikuje produkty sekvenační reakce. V prvním kroku je amplifikovaná DNA navázána na magnetické kuličky. Následným promýváním jsou odstraněny kontaminující látky. Odplavení PCR produktů je zabráněno výše zmíněným navázáním na magnetické

kuličky, které po umístění zkumavek na magnetickou desku tvoří po obvodu zkumavky prstenec. DNA je fázi eluována do pufru.

Postup:

Produkty sekvenační reakce byly napipetovány do PCR desky, která byla následně stočena a zcentrifugována. Do pipetovacího robota byly voženy špičky a byly připraveny reagentie dle programu CleanSEQ. Následně byl spuštěn program CleanSEQ.

5.2.6. Automatické sekvenování

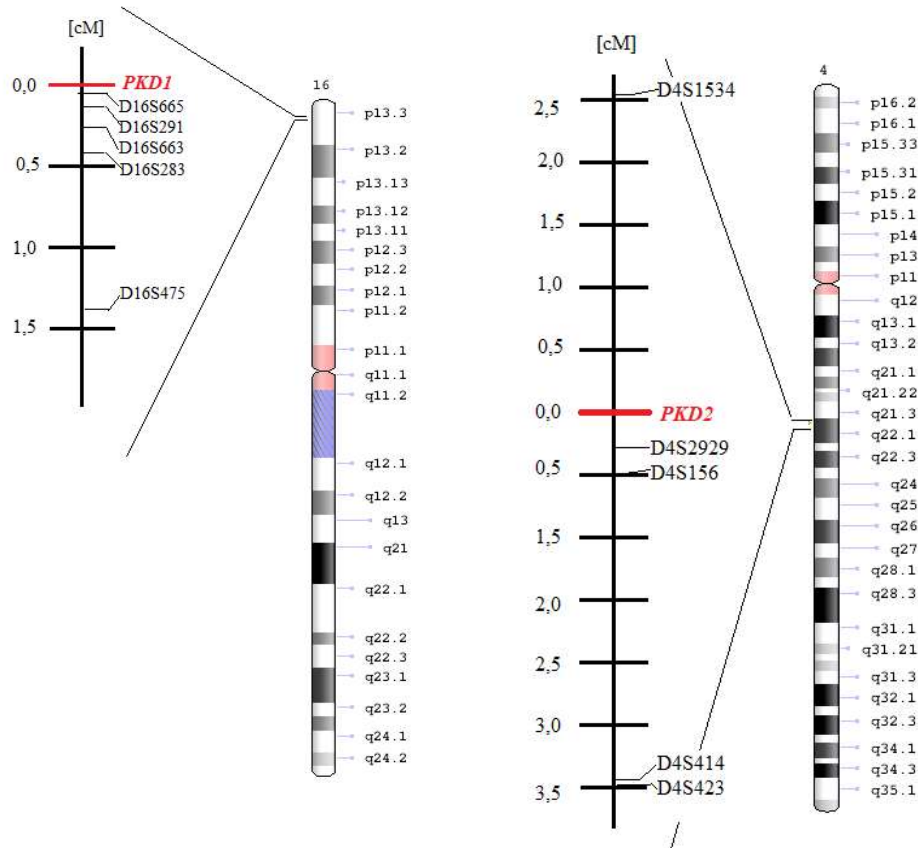
Připravené vzorky byly vloženy do sekvenátoru a osekvenovány. Výsledky byly analyzovány pomocí programu Sequencing Analysis 5.1.1.

Získané sekvence byly porovnány s referenční sekvencí za pomocí programu Sequencher.

6. Výsledky

V této práci byla analyzována DNA rodin, u kterých alespoň jeden ze členů trpěl autozomálně dominantní polycystickou chorobou ledvin. Je známo, že ADPKD je způsobena především dvěma kauzálními geny - *PKD1* a *PKD2*. Z okolí obou sledovaných genů bylo vybráno pět a pět mikrosatelitových markerů pro následnou vazebnou analýzu (viz obrázek 5).

Obrázek 4: Umístění genů *PKD1* a *PKD2* na genetické mapě spolu s analyzovanými mikrosatelity



Izolovaná DNA byla ředěna tak, aby se její koncentrace pohybovala okolo hodnot 1 ng/μl. Při vyšších koncentracích při mikrosatelitové analýze totiž vznikaly "side scattery", které brání přesnému odečítání vzorků. Po PCR amplifikaci proběhla fragmentační analýza, pomocí které byly stanoveny délky mikrosatelitových markerů u probandů a jejich rodinných příslušníků.

6.1. Rodina L1

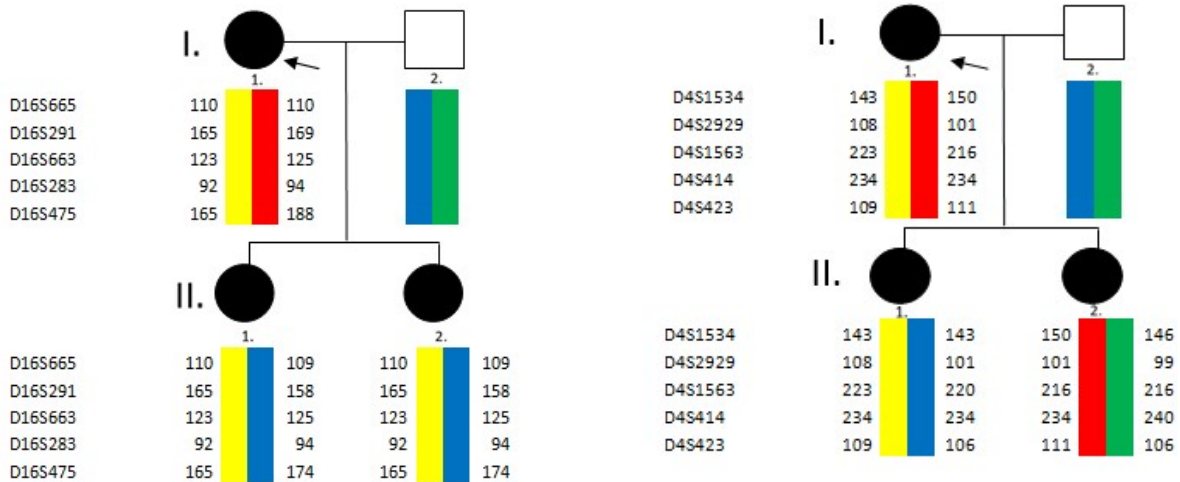
U první analyzované rodiny L1 byly k dispozici vzorky DNA tří jedinců. Jednalo se o matku probandku, u které byla klinickým genetikem indikována ADPKD a její dvě dcery, obě rovněž s indikovanou ADPKD. DNA zdravého otce bohužel nebyla k dispozici.

Bylo amplifikováno všech deset mikrosatelitových markerů, následně byly stanoveny haplotypy (viz obrázek 6).

Obrázek 5: Rodokmen s příslušnými haplotypovými bloky pro rodinu L1

a) Mikrosatelitové oblasti asociované s genem *PKD1*

b) Mikrosatelitové oblasti asociované s genem *PKD2*



*číslo udává délku mikrosatelitů v pb

U této rodiny bylo možné na základě vazebné analýzy stanovit, že možným kauzálním genem pro ADPKD je gen *PKD1*. Vidíme, že mikrosatelitové markery v okolí genu *PKD1* tvoří haplotypový blok, který je předán i oběma dcerám.

U markerů, které jsou ve vazbě s genem *PKD2*, byl každé z dcer předán jiný haplotypový blok, a tudíž gen *PKD2* z jiného chromozomu. Na základě této skutečnosti bylo možné vyloučit mutaci genu *PKD2*. Následně byla provedena i přímá diagnostika pomocí Sangerova sekvenování. Díky sekvenování byla v analyzovaných vzorcích DNA probandky a obou dcer nalezena delece c.12310_12313 genu *PKD1*. Delece se vyskytovala v heterozygotní formě. V dostupných databázích HGMD a PKDB je uvedena jako kauzální varianta asociovaná s rozvojem ADPKD.

Na základě vazebné analýzy a pomocí Sangerova sekvenování byla nalezena a potvrzena mutace genu *PKD1* u této rodiny.

6.2. Rodina L2

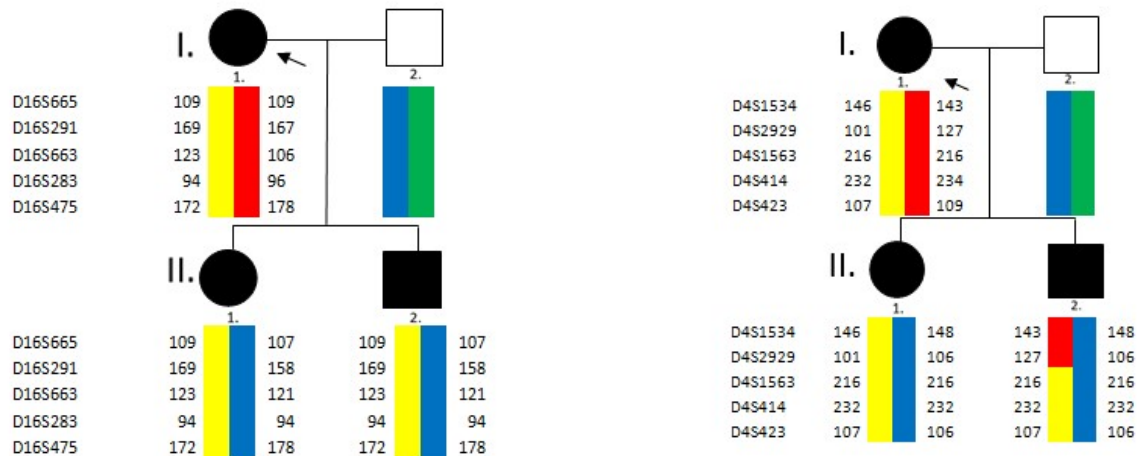
Druhou zkoumanou rodinou (L2) byla čtyřčlenná rodina, u které se podařilo získat vzorek DNA u tří jedinců, matky probandky a jejích dvou dětí, dcery a syna rovněž s klinickou

diagnózou polycystózy ledvin. Analyzováno bylo rovněž pět a pět mikrosatelitových markerů z oblastí blízkých kauzálním genům (výsledky viz obrázky 7).

Obrázek 6: Rodokmen s příslušnými haplotypovými bloky pro rodinu L2

a) Mikrosatelitové oblasti asociované s genem *PKD1*

b) Mikrosatelitové oblasti asociované s genem *PKD2*



U této rodiny nebylo obtížné na základě vazebné analýzy stanovit mutovaný gen. U obou potomků byl odhalen stejný haplotypový blok asociovaný s genem *PKD1*, který je na obrázku zvýrazněný žlutou barvou. U haplotypového bloku asociovaného s genem *PKD2* došlo při tvorbě vajíčka u matky ke crossing overu asi mezi mikrosatelitovými lokusy D4S2929 a D4S1563. Jelikož lokus D4S1563 je homozygtní jak u matky, tak i u dcer nelze ho s určitostí zařadit ani do jednoho haplotypového bloku. Jelikož se však gen *PKD2* nachází v oblasti mezi mikrosatelitovými lokusy D4S1534 a D4S2929 lze předpokládat, že každý z potomků získal od matky jinou variantu genu, a tudíž gen *PKD2* byl na základě vazebné analýzy vyloučen jako kauzální gen ADPKD u této rodiny.

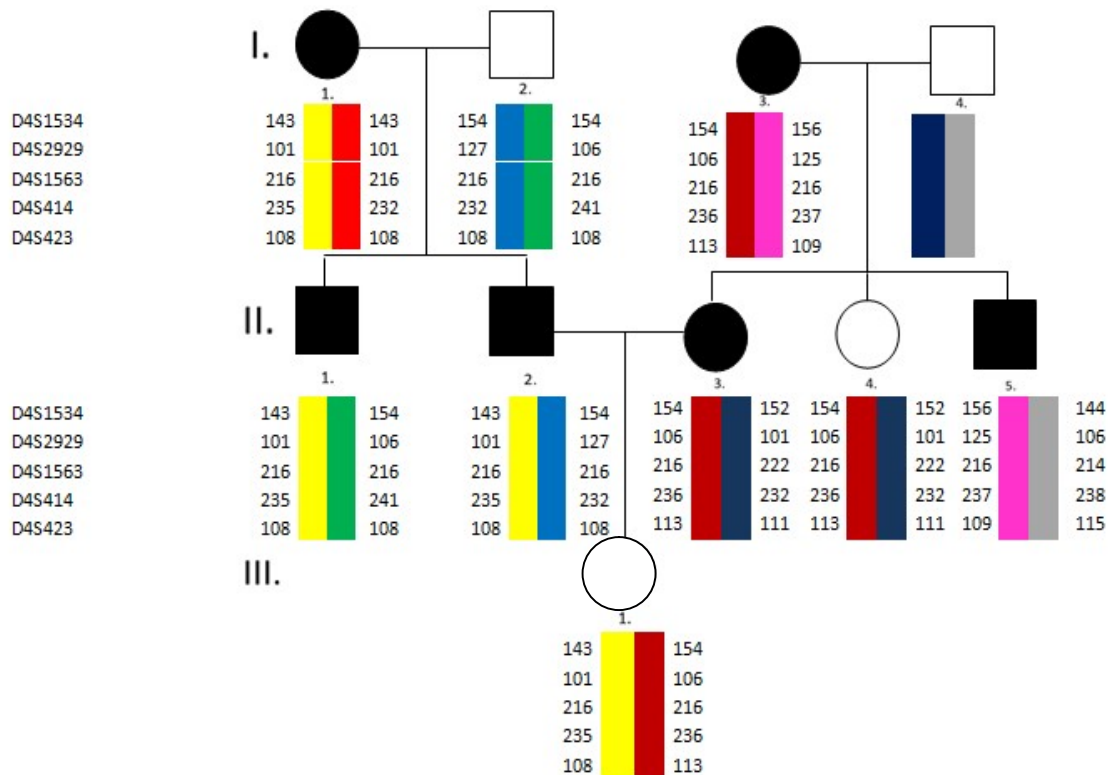
Při sekvenování byla nalezena delece c.6730_6731del (p.Ser2244fs16*) v genu *PKD1*. Tato delece je v dostupných databázích PKDB a HGMD vedena jako kauzální varianta asociovaná s rozvojem polycystózy ledvin.

6.3. Rodina L8 a L12

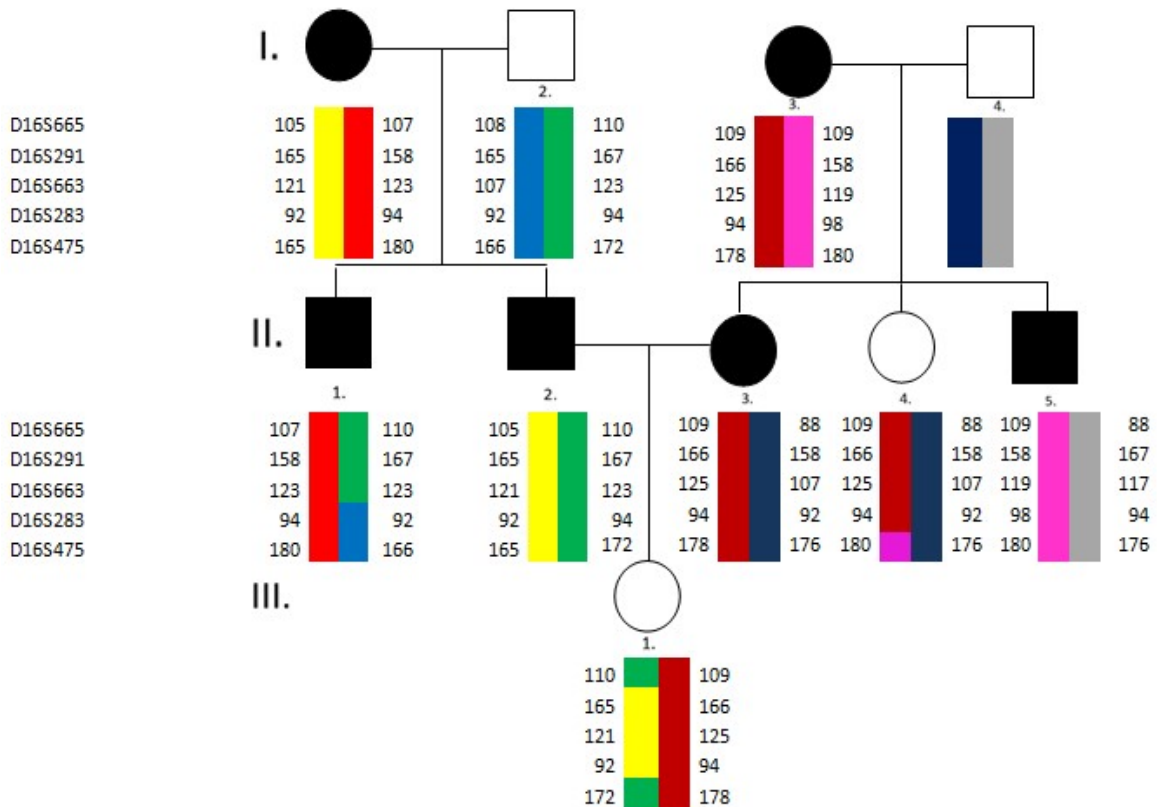
Dalším zkoumaným souborem byly dvě rodiny (L8 a L21). U dvou rodin s nezávislým výskytem polycystózy ledvin došlo k manželství mezi členkou rodiny L21 (II-3) a členem rodiny L8 (II-2). Holčička narozená z tohoto svazku (III-1) je zatím dle klinických nálezů bez příznaků.

Obrázek 7: Rodokmen s příslušnými haplotypovými bloky pro rodinu L8 a L21

a) Mikrosatelitové oblasti asociované s genem *PKD2*



b) Mikrosatelitové oblasti asociované s genem *PKD1*



U rodiny L8 (viz obrázek 8 - levá strana stromu) byl k dispozici vzorek DNA od matky probandky a jejích dvou synů. Na základě vazebné analýzy byl vyloučen gen *PKD1* jako kauzální gen pro ADPKD. Každý ze synů (II-1 a II-2) získal od matky jiný haplotypový blok asociovaný s genem *PKD1*, a tudíž i jinou variantu genu.

Naopak jako pravděpodobný kauzální gen se jeví gen *PKD2*, jelikož oba synové diagnostikovaní s polycystózou jater mají stejný haplotypový blok v oblasti genu *PKD2*, a tudíž stejnou variantu *PKD2* jako jejich matka. Pokud by byl *PKD2* potvrzen jako kauzální gen, byla by nositelkou mutované alely genu i nejmladší holčička (III-1), u které by se polycystóza ledvin rozvinula až v následujících letech, jelikož by se jednalo o ADPKD způsobenou genem *PKD2*, tedy s mírnějším průběhem a pozdějším nástupem onemocnění. Kauzální mutace ale nebyla objevena ani v jednom z genů.

Pokud se jedná o rodinu s označením L21 (viz obrázek 8 pravá část stromu), je situace poněkud komplikovanější. Jedná se o rodinu, kde matka (I-1) trpí ADPKD, u její dcery (II-3) a jejího syna (II-5) byly pomocí ultrazvuku objeveny cysty na ledvinách. Jedna z jejích dcer je zcela bez příznaků (II-4). Po provedení analýzy genů *PKD1* a *PKD2* byly oba geny vyloučeny jakou kauzální, protože obě dcery, nemocná i zdravá sdílejí stejné haplotypové bloky, a tudíž i stejné varianty obou sledovaných genů. U zdravé dcery (II-4) došlo ke crossing overu, který ovšem ovlivnil pouze mikrosatelit D16S475, který má od daného genu *PKD1* největší vzdálenost z námi pozorovaných mikrosatelitů.

Proto byla u této rodiny přednostně provedena sekvenace genu *PKD3*, který byl ovšem bez mutace u všech sledovaných jedinců.

Sekvenováním byla v genu *PKD1* nalezena sekvenční varianta c.11338_11345. Následkem této duplikace šesti nukleotidů v kódující sekvenci dochází v aminokyselinovém řetězci k předčasnému vzniku stop kodonu. Tato změna je v databázi HGMD popsána jako patogenní varianta asociovaná s rozvojem ADPKD. Tato varianta byla ovšem nalezena pouze u matky (I-3) a jejího syna (I-5), ale nebyla detekována ani u jedné z dcer (III-3 a III-5). Tyto údaje potvrdily neshody objevené již ve vazebné analýze.

Klinický obraz dcery s cystickými ledvinami se od zbytku rodiny rovněž odlišuje. Na rozdíl od matky a bratra s mnohočetnými cystami má tato žena jen drobné parapelvické cystičky. Možným vysvětlením je jiná příčina vzniku cyst, než je ADPKD.

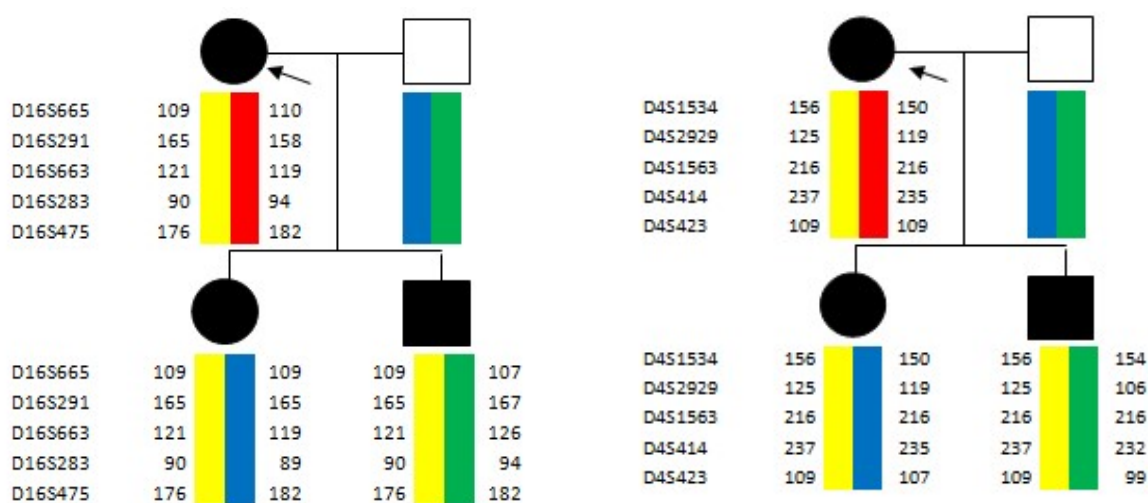
6.4. Rodina L41

U rodiny L41 byly k dispozici vzorky tří příbuzných jedinců, a to matky probandky s klinickým nálezem polycystických ledvin (I-1) a její dcery (II-1) a jejího syna (II-2) rovněž s potvrzenou polycystózou ledvin. Rodina byla klinickým genetikem odeslána na vyšetření genů kauzálních pro ADPKD. Biologický materiál zdravého otce nebyl k dispozici.

Obrázek 8: Rodokmen s příslušnými haplotypovými bloky pro rodinu L41

a) Mikrosatelitové oblasti asociované s genem *PKD1*

b) Mikrosatelitové oblasti asociované s genem *PKD2*



U této rodiny byla provedena vazebná analýza (viz obrázek 9), ovšem vzhledem k malému počtu rodinných příslušníků nebylo možné stanovit kauzální gen, protože oba potomci získali od matky stejnou variantu genu *PKD1* i *PKD2*.

Výsledek molekulárně-genetického vyšetření byl tudíž závislý na sekvenční analýze kauzálních genů.

V genu *PKD1* byla nalezena sekvenční varianta c.7693G>A v heterozygotní formě, tato změna nebyla v dostupných databázích dosud popsána. V běžné populaci se podle databáze ExAC vyskytuje s frekvencí 0,0026 %. Predikčním programem Align GVGD byla vyhodnocena jako varianta benigní. Programy SIFT, Mutation Taster, PolyPhen2 a UMD-Predictor byla vyhodnocena jako varianta patogenní.

Dále byla v genu *PKD1* nalezena varianta c.7828G>A v heterozygotní formě, tato změna nebyla v dostupných databázích dosud popsána. V běžné populaci se vyskytuje s frekvencí 0,0017 % (podle ExAC). Predikčním programem Align GVGD byla vyhodnocena jako

varianta benigní. Programy SIFT, Mutation Taster, PolyPhen2 a UMD-Predictor byla vyhodnocena jako varianta patogenní.

U probandky ani u jejích potomků nebyla nalezena kauzální varianta jednoznačně asociovaná s onemocněním. Byly nalezeny pouze dvě sekvenační varianty, které byly predikčními programy vyhodnoceny jako spíše patogenní.

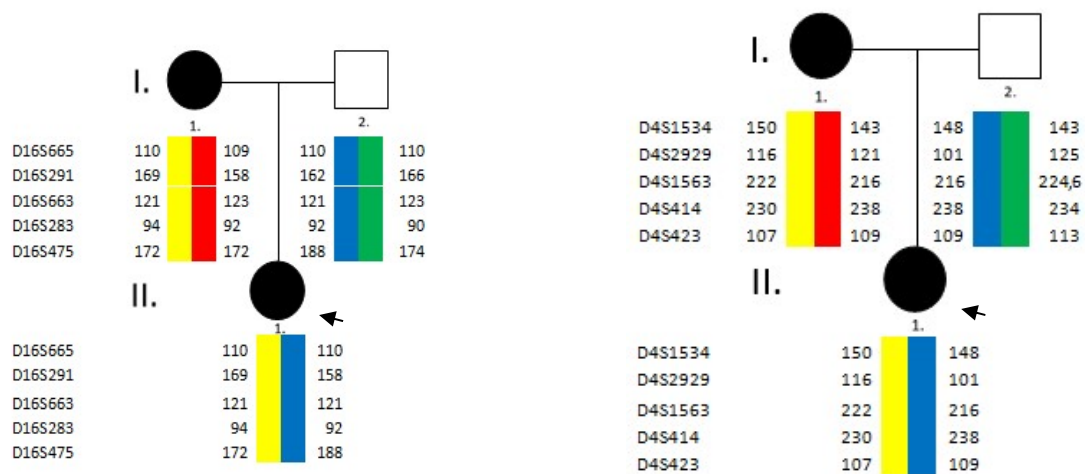
6.5. Rodina L18

Rodina L18 je tříčlenná rodina, u které byla k dispozici DNA od zdravého otce (I-2), matky s polycystózou ledvin (I-1) a jejich syna (II-1), u kterého byly rovněž ultrazvukovou metodou objeveny cysty na ledvinách. U této rodiny byla provedena vazebná analýza. Fragmentační analýzou byly zjištěny délky mikrosatelitů, které jsou ve vazbě s kauzálními geny *PKD1* a *PKD2*. Výsledky (viz obrázek 10).

Obrázek 9: Rodokmen s příslušnými haplotypovými bloky pro rodinu L18

a) Mikrosatelitové oblasti asociované s genem *PKD1*

b) Mikrosatelitové oblasti asociované s genem *PKD2*



Jelikož je tato rodina malá, není vazebná analýza informativní. Byly analyzovány haplotypové bloky potenciálně související s chorobou.

Výsledek posktnula provedená přímá mutační analýza genů *PKD1* a *PKD2*. Byla nalezena patogenní sekvenční varianta c.2264del v heterozygotní formě. Následkem delece 1 nukleotidu v kódující sekvenci genu dochází v aminokyselinovém řetězci k předčasnému vzniku stop kodonu.

Tato změna nebyla dosud v dostupných databázích popsána. Predikčním programem Mutation Taster byla vyhodnocena jako varianta patogenní. V rámci segreganční analýzy byli vyšetřeni rodiče probandky. Matka probandky je nositelkou stejné patogenní sekvenční varianty.

Díky těmto informacím lze určit haplotypový blok související s chorobou, který se nachází v okolí kauzálního genu. Pro analýzu dalších příbuzných této rodiny, případně potomků mohou být získané informace značným přínosem.

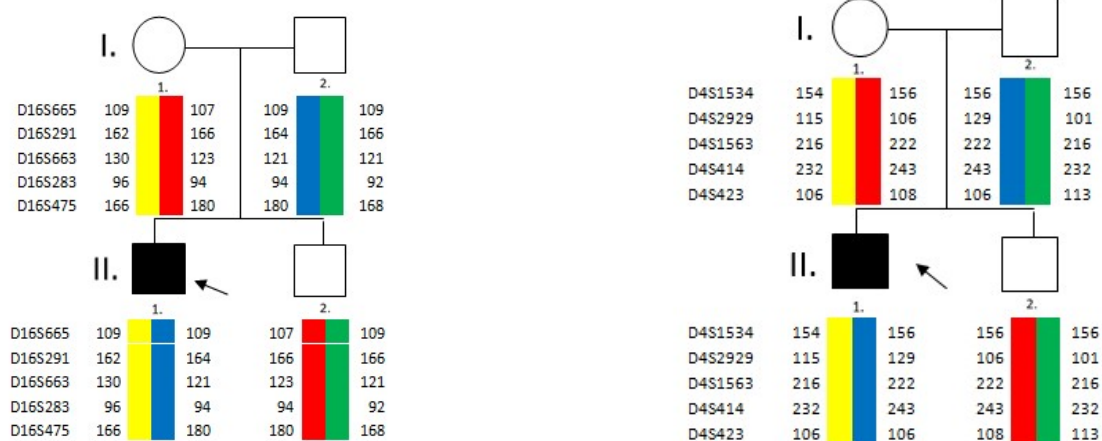
6.6. Rodina L63

Rodina s označením L63 byla zvláštní už ze své podstaty. Jedná se o čtyřčlennou rodinu - matku, otce a jejich dva syny. Ovšem pouze jeden ze synů (II-1) má cystózu ledvin. Všichni ostatní členové jsou zdraví (viz obrázek 11). Pomocí vazebné analýzy bylo zjištěno, že oba synové získali od každého z rodičů jiný haplotypový blok, a tudíž mají oba naprosto odlišné varianty obou kauzálních genů. Jelikož ani jeden z rodičů nemá polycystózu ledvin, zůstala v úvaze mutace *de novo*, nebo neúplná penetrance choroby s tím, že není možné určit na základě vazebné analýzy kauzální gen.

Obrázek 10: Rodokmen s příslušnými haplotypovými bloky pro rodinu L63

a) Mikrosatelitové oblasti asociované s genem *PKD1*

b) Mikrosatelitové oblasti asociované s genem *PKD2*



Sekvenováním obou genů byla u otce probanda (I-2) nalezena v genu *PKD1* sekvenční varianta c.9499A>T v heterozygotní formě. V databázi HGMD je tato varianta spojena s rozvojem polycystózy ledvin. V ClinVar databázi je uvedena jako varianta nejasného významu. Predikčním programem Align GVD byla vyhodnocena jako benigní. Programy SHIFT, Mutation Teaser UMD predictor a PolyPhen2 byla vyhodnocena jako pravděpodobně patogenní. Význam mutace na rozvoj onemocnění je tedy nejasný.

V analyzovaném vzorku matky (I-1) byla rovněž nalezena varianta nejasného významu. V genu *PKDI* byla nalezena varianta c.9646 A>C. Tato varianta nebyla doposud v databázích popsána. Predikčním programem Align GVD byla vyhodnocena jako varianta nejasného významu. Programy SHIFT, Mutation Teaser UMD-Predictora PolyPhen2 byla popsána jako varianta pravděpodobně patogenní. V databázi PKDB je uvedena pouze pravděpodobně patogenní varianta c.9647A>C, která ovlivňuje stejnou aminokyselinu jako výše popsaná mutace.

U syna s polycystózou ledvin byly sekvenační analýzou objeveny obě výše popsané varianty genu *PKDI* c. 9499A>T i c. 9646A>C. Na základě vyšetření rodičů bylo potvrzeno, že varianty leží v poloze trans a fenotyp probanda může být vyvolán aditivním efektem dvou hypomorfních variant. Hypomorfní alely jako příčina ADPKD jsou popisovány i v literatuře (Bergman *et al.*,2011).

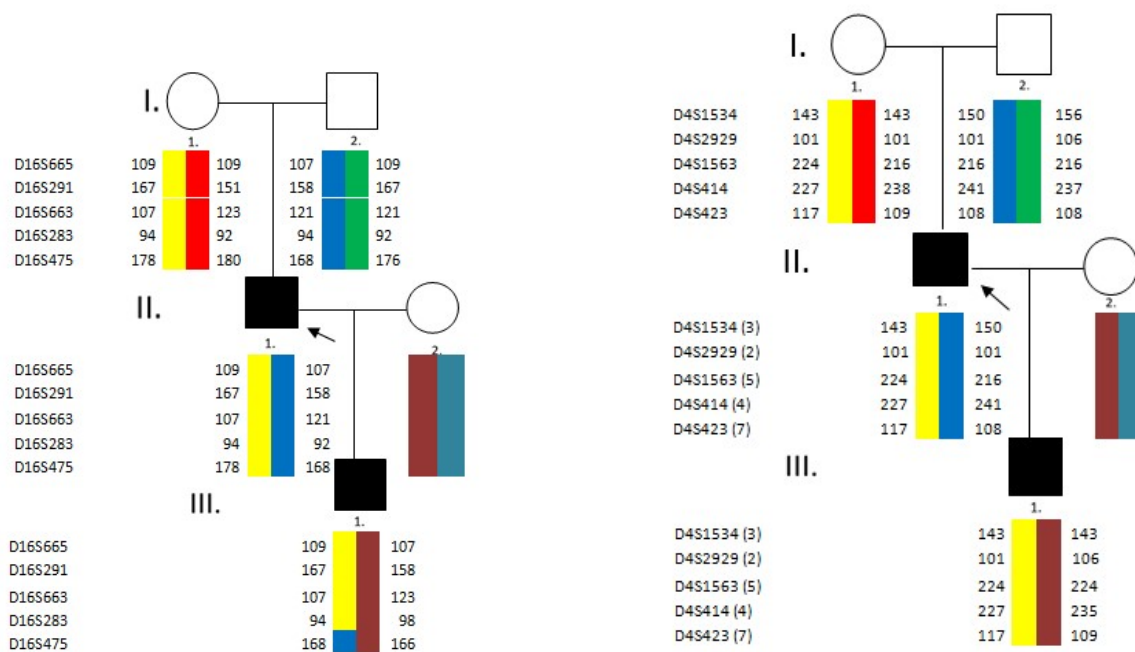
6.7. Rodina L80

Rodina L80 měla obdobnou etiologii jako rodina L63 zmíněná výše. Dva zdraví rodiče (I-1 a II-2) měli syna s polycystózou ledvin (II-2) a zároveň se polycystóza rozvinula i u jejich vnuka (III-1).(viz obrázek 12). Provedená vazebná analýza nedokázala určit kauzální gen. U genu *PKDI* navíc situaci zkomplikoval genotyp vnuka (III-1), u kterého se oba haplotypy podobaly otcovskému haplotypu a haplotyp matky pro případné upřesnění nebyl znám. Zároveň proběhl crossing over mezi mikrosatelity D16S283 a D16S475. Tento mikrosatelit D16S475 je od kauzálního genu *PKDI* nejvíce vzdálen, na genetické mapě je vzdálenost určena jako téměř 1,5 cM. U genu *PKD2* byla segregace poněkud jasnější. U obou genů, jak *PKDI*, tak *PKD2*, získal vnuk (III-1) variantu genů od své babičky (I-1). Diagnóza i v tomto případě musela být dále určena pomocí sekvenování.

Obrázek 11: Rodokmen s příslušnými haplotypovými bloky pro rodinu L80

a) Mikrosatelitové oblasti asociované s genem *PKD1*

b) Mikrosatelitové oblasti asociované s genem *PKD2*



Sangerovým sekvenováním babičky (I-1) a dědečka (I-2) nebyla odhalena žádná patogenní varianta kauzálních genů, což odpovídalo i fenotypu obou jedinců. U otce (I-1) a vnuka byla v genu *PKD1* nalezena kauzální sekvenční varianta c.3202C>T v heterozygotní formě. Následkem této substituce došlo v aminokyselinovém řetězci k předčasnému vzniku stop kodonu. V databázi PKDB je tato varianta popsána jako patogenní varianta asociovaná s rozvojem ADPKD.

Tato patogenní varianta byla nalezena i u syna probanda (III-1). Na základě vazebné analýzy bylo určeno, že zřejmě došlo k mutaci *de novo* u matky probanda, a onemocnění je tedy asociováno se žlutým haplotypovým blokem (viz obrázek 12).

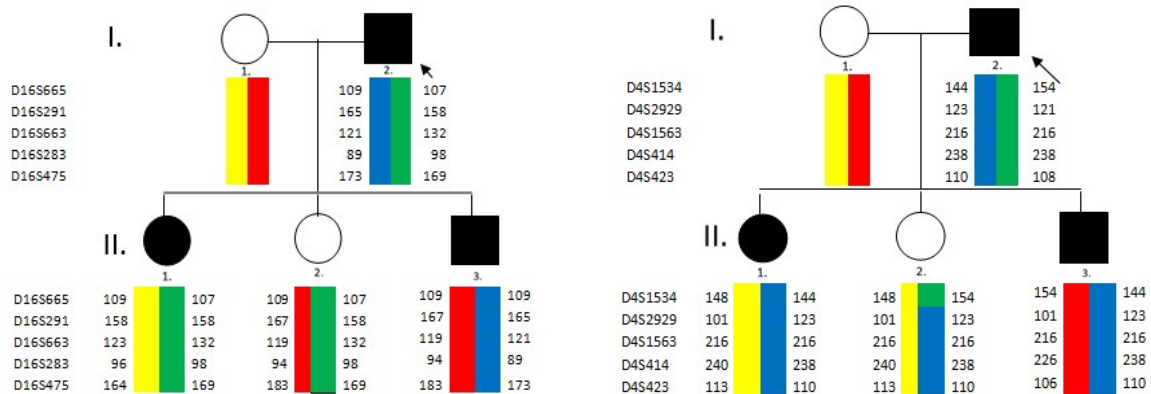
6.8. Rodina L19

U rodiny L19 byly k dispozici vzorky DNA čtyř jedinců, otce s polycystózou ledvin (I-2) a jeho tří dětí - syna a dcery s polycystózou (II-1 a II-3) a jeho zdravé dcery (II-2). Při vazebné analýze genu *PKD1* bylo zjištěno, že obě dcery (II-1 a II-2) získaly od otce stejný haplotypový blok, přestože jedna trpí polycystózou ledvin, a druhá ne (viz obrázek 13a). Syn získal odlišný haplotypový blok a polycystóza mu byla při ultrazvukovém vyšetření diagnostikována. Na základě této analýzy mohl být gen *PKD1* vyloučen jako kauzální.

Obrázek 12: Rodokmen s příslušnými haplotypovými bloky pro rodinu L19

a) Mikrosatelitové oblasti asociované s genem *PKD1*

b) Mikrosatelitové oblasti asociované s genem *PKD2*



Naproti tomu u genu *PKD2* všechny tři děti získaly stejný otcovský haplotypový blok, který je na obrázku označen modře (viz obrázek 13b). U zdravé dcery ale došlo ke crossing overu mezi mikrosatelity D4S1534 a D4S2929. Mezi těmito dvěma mikrosatelity se nachází i gen *PKD2*, a bylo proto otázkou, ve kterém místě k výměně došlo. Pravdou zůstává, že mikrosatelit D4S2929 je dle genetické mapy blíže ke genu *PKD2*, a tedy by zdravá dcera získala stejnou variantu genu *PKD2* jako oba její nemocní sourozenci.

Tato domněnka nemohla být ani potvrzena ani vyvrácena pouze na základě vazebné analýzy. Rozhodující proto byla provedená mutační analýza pomocí Sangerova sekvenování. U probanda byla nalezena kauzální mutace v genu *PKD2* c.478C>T v heterozygotní formě. Následkem mutace dochází v aminokyselinovém řetězci k substituci thyminu za cytosin, což vede k předčasnému vzniku stop kodonu. Tato změna byla nalezena v databázi PKDB a HGMD, kde je označena jako patogenní varianta asociovaná s onemocněním. Stejně varianty byly nalezeny i u dcery probanda II-1 a syna probanda II-3. Naopak u dcery II-2 tato varianta nebyla nalezena. Sekvenování tak potvrdilo rekombinaci mezi mikrosatelitovými lokusy S4S1534 a D4S2929, a to tak, že gen *PKD2* spadal do stejného haplotypového bloku jako mikrosatelit D4S1534.

7. Diskuse

Autozomálně dominantní polycystická choroba ledvin je nejčastějším genetickým onemocněním ledvin. V současné době jsou známy tři kauzální geny tohoto onemocnění *PKD1*, *PKD2* a nově objevený *PKD3*. Většina nemocných je diagnostikována s mutací genu *PKD1*, a to až v 85 % případů (Rossetti *et al.*, 2007). U zbylých jedinců je detekována mutace genu *PKD2*. Ve vzácných případech je nalezena mutace třetího kauzálního genu *PKD3*.

Molekulární diagnostika založená na přímém sekvenování kauzálních genů je momentálně rozšířenou diagnostickou metodou ADPKD. V současné době funguje v laboratoři diagnostika pomocí sekvenování nové generace. Nalezené patogenní varianty jsou následně opětovně resekvenovány pomocí Sangerova sekvenování, a to z důvodu potvrzení nálezu.

Ovšem i sekvenování má v tomto případě svá úskalí. Onemocnění je známo svou širokou genetickou heterogenitou. Všechny geny jsou poměrně velké s velkým množstvím exonů. Gen *PKD1* nacházející se na šestnáctém chromozomu je několikrát zduplikován, má šest pseudogenů. Vzniklé homologní úseky DNA komplikují sekvenační analýzu. V neposlední řadě existuje množství neklasifikovaných variant jednonukleotidových záměn nejasného významu (Rossetti *et al.*, 2007).

Gen *PKD1* má šest pseudogenů, které jsou rozmístěny na šestnáctém chromozomu. Pro eliminaci případné sekvenace pseudogenů namísto sledovaného genu musí být přijata speciální opatření. Sekvenování nové generace pracuje s referenčními sekvencemi lidského genu tak, že pomocí drobných jednonukleotidových výměn, které obsahují pseudogeny dokáže sekvenované fragmenty přiřadit k danému genu s vysokou specificitou.

Amplifikace pseudogenů může být komplikací i při správném hodnocení sekvenačních výsledků. Proto se musí věnovat zvláštní úsilí navrhování primerů. V programu BLAST jsou porovnány sekvence pseudogenů a kódujícího genu a jsou vytipovány oblasti, které jsou unikátní pouze pro kódující gen a na které jsou navrženy primery.

Sanger dosekvenování kauzálních genů bylo nutnou součástí této práce. Přímá a nepřímá molekulárně genetická diagnostika většinou byla prováděna paralelně. V některých případech již byla hotová analýza metodou NGS a následně byla provedena analýza skupiny STR za účelem porovnávání úspěšnosti jednotlivých přístupů, a umožnila tak komplexní sledování možných rekombinací a zkoumání genetické vazby.

V praktické části této práce byla zavedena a následně optimalizována vazebná analýza pomocí STR markerů. Byly vybrány rodiny, kde alespoň jeden rodinný příslušník měl dle ultrazvukového vyšetření polycystické ledviny. Následně se provedla amplifikace a fragmentační analýza pěti mikrosatelitových markerů ležících v genetické blízkosti genu *PKD1* a pěti mikrosatelitových markerů ležících v blízkosti genu *PKD2*.

Předpokladem bylo, že dané mikrosatelitové markery jsou ve vazbě s daným genem (Binczak-Kuleta *etl al.*, 2006); (Vouket *al.*, 2006); (Carta, 2006). Po zavedení vyšetření, optimalizaci a ověření vazby na velké testovací rodině, se přistoupilo k amplifikaci a anlyze STR markerů u rodin s familiární ADPKD.

Vazebná analýza má obecně tu výhodu, že ji lze použít jako diagnostický prostředek i u onemocnění, u kterých není znám kauzální gen. Této skutečnosti bylo využíváno zejména v minulosti. U ADPKD jsou v současné době snad všechny kauzální geny známy, ovšem jejich analýza je komplikovaná. Velkou výhodou má také u diagnostiky dalšího rodinného příslušníka, který může nést mutaci vedoucí k rozvoji ADPKD, ale v prvních dekádách jej nelze diagnostikovat na základě klinických projevů. U rodiny s již určeným haplotypem asociovaným s chorobou se zkracuje doba diagnostiky. Mikrosatelity jako vazebné markery mají tu výhodu, že se jedná o kodominantní marker, a tudíž jsme schopni zachytit obě alely.

Omezením vazebné analýzy je velikost dané rodiny, potřebujeme znát genotypy postižených i nepostižených jedinců. Při nízkém počtu jedinců není možné pomocí vazebné analýzy určit kauzální gen (*PKD1* nebo *PKD2*). Dva jedinci mohou mít stejné haplotypové bloky asociované s oběma pozorovanými geny, a tudíž se oba geny mohou zdát jako kauzální. Při vyšším počtu jedinců, kteří pocházejí i z různých generací, je možné odhalit i případné rekombinace.

Více sourozenců značně zvyšuje šanci na identifikaci haplotypů. V této práci nebylo možné u čtyř rodin identifikovat kauzální gen na základě vazebné analýzy, jelikož se jednalo o rodiny s malým počtem jedinců. Pomocí sekvenování byly nalezeny kauzální mutace, a tudíž diagnostika dalších členů rodiny na základě vazebné analýzy již nebude problémem.

Dalším omezením vazebné analýzy je výpovědní hodnota markerů, tedy jejich hetrozygotita, frekvence jejich alel v populaci a informativita. Mikrosatelitové markery jsou obecně vysoce polymorfní, jelikož mají na rozdíl od ostatních částí sekvencí vysokou mutační rychlost.

(Brinkmann *et al.*, 1998). Ta je obecně vysvětlována sklouznutím DNA polymerázy při replikaci DNA, nebo nerovnoměrným crossing overem.

V této práci bylo analyzováno 10 mikrosatelitových markerů s obecně vysokou mírou heterozygoty. Nízkou úroveň polymorfismu v námi zkoumaném vzorku měl mikrosatelit D16S283, u kterého bylo u všech testovaných jedinců identifikováno jen pět různých alel. Markery s nízkým počtem alel často nemají dostatečnou výpovědní hodnotu, a proto musí být kombinovány s ostatními markery.

Komplikací při vazebné analýze jsou rekombinace, ke kterým dochází s určitou pravděpodobností, kterou můžeme odhadnout pomocí genetické mapy. Rekombinací, a i případnou dvojitou rekombinací, mohou vznikat falešné diagnostiky vyšetřovaných pacientů.

Markery analyzované v této práci měly s daným genem poměrně silnou vazbu. Nejvzdálenější použitý marker byl od genu vzdálen 3,5 cM, což odpovídá 3,5 % rekombinací. V této práci bylo ovšem zaznamenáno několik rekombinačních událostí. U rodiny L1 došlo k rekombinaci mezi mikrosatelity obklopující gen *PKD2*, D4S2929 a D4S1563. Rekombinační událost mezi těmito dvěma mikrosatelity je relativně vzácná, neboť na genetické mapě leží v bezprostřední blízkosti - vzdáleny od sebe asi 0,25 cM. Tato rekombinace neměla negativní vliv na určení haplotypu, protože gen *PKD2* leží blíže mikrosatelitu D4S2929, a byl tedy zařazen k haplotypovému bloku blíže tomuto mikrosatelitovému markeru.

U rodiny L8 došlo k několika rekombinacím. U jednoho ze synů L8 II-1 došlo k rekombinaci mezi mikrosatelitovými oblastmi D16S663 a D16S283. Tento fakt nehrál při analýze téměř žádnou roli, jelikož se jednalo o rekombinaci v haplotypovém bloku, který nebyl asociován s chorobou, protože pocházel od zdravého otce. U tohoto jedince L8 II-1 došlo k další rekombinaci, tentokrát dvakrát v daném haplotypovém bloku, což je událost velice výjimečná, vezmeme-li v úvahu genetickou blízkost jednotlivých markerů, které mají od sebe vzdálenost v řádech desetin cM.

Třetí pozorovaná rekombinace je v rodině L21, ta byla zaznamenána u zdravé dcery (II-4), u které proběhla rekombinace v haplotypovém bloku asociovaném s genem *PKDI*, a to v oblasti mezi mikrosatelity D16S283 a D16S475, což jsou oblasti nejvzdálenější od námi pozorovaného genu.

Třetí, poslední, ale zato nejzajímavější rekombinace byla zpozorována u rodiny L19. U této rodiny vazebná analýza vyloučila mutaci genu *PKD1*. U genu *PKD2* došlo k zajímavému jevu. Otec s polycystózou ledvin předal svým třem dětem stejný haplotypový blok, ovšem u jediného zdravého dítěte došlo k rekombinaci někde v oblasti genu *PKD2*. Sekvenování potvrdilo mutaci genu *PKD2* u dvou dětí s polycystózou, zatímco u zdravé dcery mutace nebyla nalezena. Z toho vyplývá, že mikrosatelit D4S1534, který je dle dostupných dat od genu vzdálen asi 2,5 cM, zůstal ve vazbě s kauzálním genem, rekombinace proběhla v oblasti mezi genem *PKD2* a mikrosatelitem D4S2929. Mikrosatelit D4S2929 a gen jsou na genetické mapě vzdáleny asi jen 0,25 cM, což zpozorovanou rekombinaci činí velice vzácnou.

8. Závěr

V této diplomové práci byly stručně shrnuty ciliopatie se zaměřením na autozomálně dominantní polycystickou chorobu ledvin. Bylo vybráno několik rodin, ve kterých alespoň jeden člen trpěl polycystózou ledvin. U všech dostupných členů dané rodiny bylo provedeno molekulárně genetické vyšetření dvojího typu.

Byla provedena mutační analýza metodou NGS známých kauzálních genů a následně confirmace zachycené mutace pomocí Sangerova sekvenování.

Jako druhý molekulárně genetický diagnostický prostředek byla zvolena vazebná analýza, která byla zavedena v rámci této práce.

Úspěšnost a přesnost vazebné analýzy závisí na dostatečném počtu rodinných příslušníků, zdravých i nemocných, nejlépe ve třech generacích, a na informativitě rodiny probanda. Vzorek postiženého při vyšetřovacím procesu je nepostradatelný. V několika případech nebyla rodina dostatečně informativní, a proto nebylo možné určit kauzální gen– zda se jedná o *PKD1* nebo o *PKD2*.

U některých rodin bylo možné pomocí vazebné analýzy určit téměř se stoprocentní pravděpodobností kauzální gen a segregaci její mutované alely. V každém případě ale hlavní diagnostickou metodou zůstává sekvenování genů. Vazebná analýza měla své využití především v minulosti. V dnešní době je její využití zejména pomocné u případů s obtížnou diagnostikou.

Přestože vazebná analýza je diagnostická metoda, která byla používána spíše v minulosti a dnes byla nahrazena zejména sekvenováním, má i v dnešní době své možnosti využití především při záchytu sekvenčních variant s nejasným účinkem.

9. Seznam použité literatury

- Adams, R., Churchill, E. D.: Situs inversus, sinusitis, bronchiectasis. A report of five cases, including frequency statistics. *J. Thorac. Surg.* 7, 206–217 (1937)
- Al Jord, A., Lemaître, A. I., Delgehyr, N., Faucourt, M., Spassky, N., & Meunier, A. (2014). Centriole amplification by mother and daughter centrioles differs in multiciliated cells. *Nature*, 516(7529), 104-107.
- Bergmann, C., Senderek, J., Windelen, E., Küpper, F., Middeldorf, I., Schneider, F., & Seeman, T. (2005). Clinical consequences of PKHD1 mutations in 164 patients with autosomal-recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Kidney international*, 67(3), 829-848.
- Bergmann, C., von Bothmer, J., Brüchle, N. O., Venghaus, A., Frank, V., Fehrenbach, H., & Sarioglu, N. (2011). Mutations in multiple PKD genes may explain early and severe polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 22(11), 2047-2056.
- Binczak-Kuleta, A., Rozanski, J., Domanski, L., Myslak, M., Ciechanowski, K., & Ciechanowicz, A. (2006). DNA microsatellite analysis in families with autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD): the first Polish study. *Journal of applied genetics*, 47(4), 383-389.
- Brinkmann, B., Klintschar, M., Neuhuber, F., Hühne, J., & Rolf, B. (1998). Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *The American Journal of Human Genetics*, 62(6), 1408-1415.
- Carta, L. K. (2000). Andrea M. Skantar and. *choice*, 22, 4673-4680.
- Daoust, M. C., Reynolds, D. M., Bichet, D. G., & Somlo, S. (1995). Evidence for a third genetic locus for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Genomics*, 25(3), 733-736.
- Dedoussis, G. V. Z., Luo, Y., Starremans, P., Rossetti, S., Ramos, A. J., Cantiello, H. F., & Zhou, J. (2008). Co-inheritance of a PKD1 mutation and homozygous PKD2 variant: a potential modifier in autosomal dominant polycystic kidney disease. *European journal of clinical investigation*, 38(3), 180-190.
- Ecder, T., & Schrier, R. W. (2009). Cardiovascular abnormalities in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Nature Reviews Nephrology*, 5(4), 221.

- Fick, G. M., Duley, I. T., Johnson, A. M., Strain, J. D., Manco-Johnson, M. L., & Gabow, P. A. (1994). The spectrum of autosomal dominant polycystic kidney disease in children. *Journal of the American Society of Nephrology*, 4(9), 1654-1660.
- Fick, G. M., Johnson, A. M., Strain, J. D., Kimberling, W. J., Kumar, S., Manco-Johnson, M. L., ... & Gabow, P. A. (1993). Characteristics of very early onset autosomal dominant polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 3(12), 1863-1870.
- Gabow, P. A., Chapman, A. B., Johnson, A. M., Tangel, D. J., Duley, I. T., Kaehny, W. D., & Schrier, R. W. (1990). Renal structure and hypertension in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney international*, 38(6), 1177-1180.
- Gheber, L., & Priel, Z. (1997). Extraction of cilium beat parameters by the combined application of photoelectric measurements and computer simulation. *Biophysical journal*, 72(1), 449-462.
- Grantham, J. J., Mulamalla, S., & Swenson-Fields, K. I. (2011). Why kidneys fail in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nature Reviews Nephrology*, 7(10), 556-566.
- Harris, P. C., & Torres, V. E. (2009). Polycystic kidney disease. *Annual review of medicine*, 60, 321-337.
- Harris, P. C., & Torres, V. E. (2014). Genetic mechanisms and signaling pathways in autosomal dominant polycystic kidney disease. *The Journal of clinical investigation*, 124(6), 2315-2324.
- Hateboer, N., v Dijk, M. A., Bogdanova, N., Coto, E., Saggart-Malik, A. K., San Millan, J. L., & European PKD1-PKD2 Study Group. (1999). Comparison of phenotypes of polycystic kidney disease types 1 and 2. *The Lancet*, 353(9147), 103-107
- Hirokawa, N., Tanaka, Y., Okada, Y., & Takeda, S. (2006). Nodal flow and the generation of left-right asymmetry. *Cell*, 125(1), 33-45.
- Chapin, H. C., & Caplan, M. J. (2010). The cell biology of polycystic kidney disease. *The Journal of cell biology*, 191(4), 701-710.
- Chauvet, V., Qian, F., Boute, N., Cai, Y., Phakdeekitachoen, B., Onuchic, L. F., & Gubler, M. C. (2002). Expression of PKD1 and PKD2 transcripts and proteins in human embryo

- and during normal kidney development. *The American journal of pathology*, 160(3), 973-983
- Chen, X., Horiuchi, A., Kikuchi, N., Osada, R., Yoshida, J., Shiozawa, T., & Konishi, I. (2007). Hedgehog signal pathway is activated in ovarian carcinomas, correlating with cell proliferation: its inhibition leads to growth suppression and apoptosis. *Cancer science*, 98(1), 68-76.
- Christensen, S. T., Pedersen, L. B., Schneider, L., & Satir, P. (2007). Sensory cilia and integration of signal transduction in human health and disease. *Traffic*, 8(2), 97-109.
- Jonassen, J. A., SanAgustin, J., Baker, S. P., & Pazour, G. J. (2012). Disruption of IFT complex A causes cystic kidneys without mitotic spindle misorientation. *Journal of the American Society of Nephrology*, 23(4), 641-651.
- Kim, E., Arnould, T., Sellin, L. K., Benzing, T., Fan, M. J., Grüning, W., & Walz, G. (1999). The polycystic kidney disease 1 gene product modulates Wnt signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 274(8), 4947-4953.
- Leeuwen, I. S. L. V., Dauwerse, J. G., Baelde, H. J., Leonhard, W. N., Van De Wal, A., Ward, C. J., & Peters, D. J. (2004). Lowering of Pkd1 expression is sufficient to cause polycystic kidney disease. *Human molecular genetics*, 13(24), 3069-3077
- Liu, W., Chen, M., Wei, J., He, W., Li, Z., Sun, X., & Shi, Y. (2014). Modification of PCR conditions and design of exon-specific primers for the efficient molecular diagnosis of PKD1 mutations. *Kidney and Blood Pressure Research*, 39(6), 536-545.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Section 19.4, Cilia and Flagella: Structure and Movement. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21698/>
- Mallawaarachchi, A. C., Hort, Y., Cowley, M. J., McCabe, M. J., Minoche, A., Dinger, M. E., & Furlong, T. J. (2016). Whole-genome sequencing overcomes pseudogene homology to diagnose autosomal dominant polycystic kidney disease. *European Journal of Human Genetics*, 24(11), 1584.
- Manton, I., & Clarke, G. (1981). Cilia and flagella of eukaryotes. *The Journal of cell biology*, 91(3 PT 2), 107s-124s.
- McGrath, J., S. Somlo, S. Makova, X. Tian, and M. Brueckner. 2003. Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse. *Cell*. 114:61–73.

- McMahon, A. P. (2000). More surprises in the Hedgehog signaling pathway. *Cell*, *100*(2), 185-188.
- McManus, I. C., Mitchison, H. M., Chung, E. M., Stubbings, G. F., & Martin, N. (2003). Primary ciliary dyskinesia (Siewert's/Kartagener's syndrome): respiratory symptoms and psycho-social impact. *BMC Pulmonary Medicine*, *3*(1), 4.
- Mullor, J. L., Sánchez, P., & i Altaba, A. R. (2002). Pathways and consequences: Hedgehog signaling in human disease. *Trends in cell biology*, *12*(12), 562-569.
- Narayan, D., Krishnan, S. N., Upender, M., Ravikumar, T. S., Mahoney, M. J., Dolan, T. F., & Haddad, G. G. (1994). Unusual inheritance of primary ciliary dyskinesia (Kartagener's syndrome). *Journal of medical genetics*, *31*(6), 493-496
- Nüsslein-Volhard, C., & Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, *287*(5785), 795-801.
- Onuchic, L. F., Furu, L., Nagasawa, Y., Hou, X., Eggermann, T., Ren, Z., & Rudnik-Schöneborn, S. (2002). PKHD1, the polycystic kidney and hepatic disease 1 gene, encodes a novel large protein containing multiple immunoglobulin-like plexin-transcription-factor domains and parallel beta-helix 1 repeats. *The American Journal of Human Genetics*, *70*(5), 1305-1317.
- Pedersen, L. B., Schröder, J. M., Satir, P., & Christensen, S. T. (2012). The ciliary cytoskeleton. *Comprehensive Physiology*.
- Pei, Y. (2001). A 'two-hit' model of cystogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease?. *Trends in molecular medicine*, *7*(4), 151-156.
- Porath, B., Gainullin, V. G., Cornec-Le Gall, E., Dillinger, E. K., Heyer, C. M., Hopp, K., & Baheti, S. (2016). Mutations in GANAB, encoding the glucosidase II α subunit, cause autosomal-dominant polycystic kidney and liver disease. *The American Journal of Human Genetics*, *98*(6), 1193-1207.
- Rachel, R. A., Li, T., & Swaroop, A. (2012). Photoreceptor sensory cilia and ciliopathies: focus on CEP290, RPGR and their interacting proteins. *Cilia*, *1*(1), 22.
- Rossetti, S., Consugar, M. B., Chapman, A. B., Torres, V. E., Guay-Woodford, L. M., Grantham, J. J., & Zhang, Q. J. (2007). Comprehensive molecular diagnostics in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, *18*(7), 2143-2160.

- Rossetti, S., Consugar, M. B., Chapman, A. B., Torres, V. E., Guay-Woodford, L. M., Grantham, J. J., & Zhang, Q. J. (2007). Comprehensive molecular diagnostics in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(7), 2143-2160.
- Rott, H. D. (1979). Kartagener's syndrome and the syndrome of immotile cilia. *Human genetics*, 46(3), 249-261.
- Rubin, L. L., & de Sauvage, F. J. (2006). Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Nature reviews. Drug discovery*, 5(12), 1026.
- Satir, P., Mitchell, D. R., & Jékely, G. (2008). How did the cilium evolve?. *Current topics in developmental biology*, 85, 63-82.
- Simons, M., Gloy, J., Ganner, A., Bullerkotte, A., Bashkurov, M., Krönig, C., & Mlodzik, M. (2005). Inversin, the gene product mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between Wnt signaling pathways. *Nature genetics*, 37(5), 537.
- Supatto, W., & Vermot, J. (2011). From cilia hydrodynamics to zebrafish embryonic development. In *Current topics in developmental biology* (Vol. 95, pp. 33-66). Academic Press.
- Trujillano, D., Bullich, G., Ossowski, S., Ballarín, J., Torra, R., Estivill, X., & Ars, E. (2014). Diagnosis of autosomal dominant polycystic kidney disease using efficient PKD1 and PKD2 targeted next-generation sequencing. *Molecular genetics & genomic medicine*, 2(5), 412-421
- Vouk, K., Strmecki, L., Stekrova, J., Reiterova, J., Bidovec, M., Hudler, P., & Haarpaintner, G. (2006). PKD1 and PKD2 mutations in Slovenian families with autosomal dominant polycystic kidney disease. *BMC medical genetics*, 7(1), 6.
- Vulevic, B., & Correia, J. J. (1997). Thermodynamic and structural analysis of microtubule assembly: the role of GTP hydrolysis. *Biophysical journal*, 72(3), 1357-1375.
- Ward, C. J., Turley, H., Ong, A. C., Comley, M., Biddolph, S., Chetty, R., & Harris, P. C. (1996). Polycystin, the polycystic kidney disease 1 protein, is expressed by epithelial cells in fetal, adult, and polycystic kidney. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(4), 1524-1528.

- Waters, A. M., & Beales, P. L. (2011). Ciliopathies: an expanding disease spectrum. *Pediatric Nephrology*, 26(7), 1039-1056.
- Wheatley, D.N. 1995. Primary cilia in normal and pathological tissues. *Pathobiology*. 63:222–238.
- Wodarz, A., & Nusse, R. (1998). Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annual review of cell and developmental biology*, 14(1), 59-88.
- Yoder, B. K., Hou, X., & Guay-Woodford, L. M. (2002). The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia. *Journal of the American Society of Nephrology*, 13(10), 2508-2516.