

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární biologie, genetika a virologie



Bc. Miriam J. Kavec

**SEKVENČNÉ VARIANTY GÉNU *HNF1B* U AUTOZOMÁLNE RECESÍVNEJ
POLYCYSTICKEJ CHOROBY OBLIČIEK**

Sekvenční varianty genu *HNF1B* u autozomálně recesivní polycystické choroby ledvin

Sequence variety of *HNF1B* gene in autosomal recessive polycystic kidney disease

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Ing. Jitka Štekrová

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15. srpna 2017

.....

Touto cestou by som chcela vyjadriť veľkú vďaku mojej školiteľke Ing. Jitke Štekrovej za možnosť vypracovávať diplomovú prácu pod jej vedením. Veľmi si cením jej usmerňovanie, trpezlivosť a cenné rady, bez ktorých by táto práca nevznikla. Moje poďakovanie ďalej patrí slečne Mgr. Lene Obeidovej a doc. MUDr. Jane Reiterovej, ktoré so mnou trpezlivo konzultovali akýkoľvek problém a pomáhali mi zlepšovať kvalitu výslednej práce.

Špeciálne by som sa chcela poďakovať RNDr. Michaele Schierovej, ktorá mi pomáhala prekonávať problémy a nestrácať optimizmus v časoch, keď sa realita vzdala mojim predstavám.

Veľké ďakujem patrí mojim kolegom z práce, ktorí mi boli mentálnou oporou v ťažkých časoch. Veľmi si cením ich ústretovosť a ochotu vytvoriť mi vhodné podmienky na plnenie štúdijných povinností, i keď to nie vždy bolo ľahko realizovateľné.

V neposlednej rade chcem poďakovať mojim rodičom, za ich lásku, podporu, obetavosť a trpezlivosť, ktorú so mnou mali. Bez ich podpory by som sa nemohla stať tým, kým som dnes.

Táto práca bola vytvorená v rámci výskumného projektu podporená grantom **IGA MZCR NT 13090-4 a GAUK 1015**.

Abstrakt

Autozomálně recesivní polycystická choroba ledvin (ARPKD) je poměrně vzácné závažné dědičné onemocnění, které se projevuje cystickým postižením ledvin, dědičnou jaterní fibrózou a dilatací žlučových cest. Spektrum klinických projevů tohoto onemocnění je velmi variabilní a závisí na věku, ve kterém se onemocnění projevilo. Při těžkých formách onemocnění je možné detekovat první příznaky prenatálně okolo 20. týdne těhotenství díky zvětšeným echogenickým ledvinám a přítomnosti oligohydramnia. Kauzálním genem tohoto onemocnění je gen *PKHD1*, jehož proteinový produkt fibrocystin se pravděpodobně podílí na udržování intracelulární koncentrace Ca^{2+} kationtů. Přesný mechanismus ARPKD patofyziologie není známý. Fenotypové projevy tohoto onemocnění se mohou překrývat s mutacemi asociovanými s jinými geny. Jedním z genů napodobujících fenotyp ARPKD je gen *HNF1B*. Mutace v genu *HNF1B* jsou nejčastější monogenní příčinou vývojových abnormalit ledvin. *HNF1B* je tkáňově specifický transkripční faktor, který reguluje expresi *PKHD1*.

V praktické části jsem se zabývala genetickou analýzou *HNF1B* genu u 28 pacientů, u kterých nebyla potvrzena ARPKD diagnóza detekováním dvou *PKHD1* mutací. Pro účely mutačního skríningu jsem používala přímého sekvenování, NGS techniky pyrosekvenování a MLPA metodu k detekci rozsáhlých delecí či duplikací. V souboru pacientů jsem identifikovala pět nonsense/missense mutací, jednu alelickou delecí celého genu a jeden známý polymorfismus. Identifikovala jsem tři doposud nepopsané potenciálně patogenní mutace.

Tato práce sloužila k zavedení a optimalizaci genetické analýzy *HNF1B*: Na základě pozorování genotypově-fenotypové korelace je možné uvažovat o zavedení skríningu *HNF1B* v případech prenatálně diagnostikovaných hyperechogenních cystických ledvin.

Klíčova slova:

autozomálně recesivní polycystická choroba ledvin, *HNF1B*, *PKHD1*, transkripční komplexita u ARPKD, genotyp-fenotyp korelace, mutační screening, sekvenování nové generace, technika MLPA

Abstract

Autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD) is a rare severe inherited disease manifested by cystic renal disease, congenital hepatic fibrosis and dilatation of bile ducts. The spectrum of clinical manifestations is very wide and variable, depends on the age at which the disease was manifested. In severe forms of the disease, it is possible to detect the first symptoms prenatally around the 20th week of pregnancy due to increased echogenic kidneys and the presence of oligohydramnios. The causal gene of this disease is the *PKHD1* gene with protein product fibrocystin that is most likely contributing on maintaining the intracellular concentration of Ca^{2+} cations. The exact pathophysiology mechanism of ARPKD remains unknown. Phenotypic manifestations of this disease may overlap with mutations associated with other genes. One of the genes mimicking the ARPKD phenotype is the *HNF1B* gene. Mutations associated with *HNF1B* gene are the most common monogenic cause of developmental kidney abnormalities. *HNF1B* is a tissue-specific transcription factor that regulates the expression of *PKHD1*.

In experimental part I worked on genetic analysis of the *HNF1B* gene in 28 patients who have not been confirmed ARPKD diagnosis by detection of 2 *PKHD1* mutations. For the purposes of mutational screening, I used direct Sanger sequencing, NGS pyrosequencing techniques, and MLPA method to detect extensive deletions or duplications. In analysed patient cohort I identified five nonsense / missense mutations, one allelic deletion of the entire gene and one known polymorphism. I have identified three previously unpublished potentially pathogenic mutations.

The aim of this work was to introduce and optimize genetic analysis of *HNF1B*: Based on observations of genotypic-phenotypic correlation, *HNF1B* screening could be used for prenatal diagnosed hyperechogenic cystic kidneys.

Key words:

autosomal recessive polycystic kidney disease, *HNF1B*, *PKHD1*, transcriptional complexity in ARPKD, genotype-phenotype correlation, mutation screening, next generation sequencing, multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

Obsah

1. Úvod	10
2. Prehľad literatúry	11
2.1 Biológia obličiek	11
2.2 Polycystické ochorenia obličiek	13
2.2.1 Renálna cystogenéza	13
2.2.1.1 Rola primárných cilií v cystogenéze	14
2.2.1.2 Metabolické reprogramovanie – Warburgov efekt.....	16
2.3 Autozomálne recesívna polycystická choroba obličiek.....	17
2.3.1 Bunková patofyziológia ARPKD	19
2.3.1.1 cAMP sprostredkovaná proliferácia	20
2.3.1.2 Expresia EGFR.....	22
2.3.1.3 Sekrécia	22
2.3.1.4 Aktivácia mTOR dráhy	23
2.3.1.5 Vplyv ADAM 17 na bunkovú proliferáciu.....	23
2.3.1.6 ERK signalizácia	25
2.4 Gén <i>PKHD1</i> jeho produkt	25
2.4.2 Funkcia fibrocystínu	29
2.4.3 Splicing.....	31
2.4.4 Mutačné spektrum <i>PKHD1</i>	32
2.4.5 Genotypovo – fenotypová korelácia.....	34
2.5 Génová heterogénnosť u ARPKD?.....	36
2.5.1 ARPKD fenokopírovanie.....	38
2.6 Transkripčný faktor HNF1B	39
2.6.1 <i>HNF1B</i> mutácie asociované s ochoreniami.....	42
2.6.2 Regulácia <i>Pkhd1</i> promótoru.....	45
3. Ciele práce	48
4. Materiál a metódy	49
4.1. Súbor pacientov.....	49
4.2 Metódy.....	51
4.2.1 Získavanie vzoriek DNA.....	51
4.2.2 Príprava génovej knižnice	51
4.2.3 Sekvenačná PCR reakcia.....	54
4.2.4 Prečisťovanie produktu pred sekvenovaním.....	55
4.2.5 Sekvenácia.....	55

4.2.6 MLPA.....	56
4.2.7 Next Generation Sequencing – pyrosekvenovanie	57
4.2.7.1 Príprava génovej knižnice	58
4.2.7.2 Inkorporácia MID značiek	58
4.2.7.3 Miešanie a prečist'ovanie knižnice	59
4.2.7.4 Kvatifikácia a riedenie knižnice.....	60
4.2.7.5 Emulzná PCR reakcia (emPCR).....	61
4.2.7.6 Premývanie a obohacovanie guľičiek.....	62
4.2.7.7 Príprava pikotitračnej doštičky	64
4.2.7.8 Sekvenovanie	65
4.2.8 Použité programy a databázy	67
5. Výsledky	68
5.1 Bodové substituce missense	69
5.2 Bodové substituce nonsense.....	70
5.3 Bodové inzercie.....	73
5.4 Rozsiahle delécie.....	74
7. Diskusia	78
8. Súhrn.....	85
9. Zoznam použitej literatúry.....	86

Zoznam skratiek

ADPKD	autozomálne dominantná polycystická choroba obličiek (autosomal dominant polycystic kidney disease)
Akt	proteín kináza B
AMK	aminokyselina
APS	adenozín-5'-fosfosulfát
ARPKD	autozomálne recesívna polycystická choroba obličiek (autosomal recessive polycystic kidney disease)
ATP	adenozíntrifosfát
CAKUT	vrodené anomálie obličiek a močového traktu (congenital anomalies of the kidney and urinary tract)
cAMP	cyklický adenzín monofosfát
CBP	cAMP viažúci proteín (cAMP binding protein)
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
cGMP	cyklický guanozín monofosfát
CPLANE	efektor ciliogenézy a planárnej polarity (ciliogenesis and planar polarity effector)
CT	zberné kanáliky (collecting ducts)
DMSO	dimetylsulfoxid (C ₂ H ₆ OS)
dNTP	deoxynukleotidtrifosfáty
EGF	epidermálny rastový faktor (epidermal growth factor)
EGFR	receptor pre epidermálny rastový faktor (epidermal growth factor receptor)
ESE	exónový zostrihový efektor (exon splicing enhancer)
ESRD	terminálne štádium ochorenia obličiek (end stage renal disease)
FAK	fokálna adhezívna kináza (focal adhesive kinase)
FPC	fibrocystín
GA	gestačný vek (gestational age)
HATs	histón acetyltransferázy (histone acetyltransferases)
CHF	vrodená fibróza pečene (congenital hepatic fibrosis)
MCKD	medulárna cystická choroba obličiek (medullary cystic kidney disease)
MDR	miera detekcie mutácií (mutation detection rates)

MLPA	multiplexová amplifikácia závislá na ligácii sond (multiplex ligation-dependent probe amplification)
MODY5	diabetes mellitus typu 5 u mladistvých (type 5 maturity-onset diabetes of the young)
mTOR	mammalian target of rapamycin
NaOAc	octan sodný (ethanoát sodný)
NAS	nonsense sprostredkovaný alternatívny zostrih (nonsense-mediated alternative splicing)
NGS	sekvenovanie novej generácie (next generation sequencing)
NMD	nonsense sprostredkovaný mRNA rozpad (nonsense-mediated mRNA decay)
PbH1	paralelné beta-helix 1 opakovania
PC	primárne cílie (primary cilia)
PC1	polycystín 1
PC2	polycystín 2
PCR	polymerázová reťazová reakcia (polymerase chain reaction)
PD	prenatálna diagnostika
PI3-K	fosfatidylinozitol 3-kináza
PKA	proteín kináza A
PKD	polycystické ochorenia obličiek (polycystic kidney diseases)
RC	renálna cystogenéza
RCAD	syndróm renálnych cyst a diabetu (renal cysts and diabetes syndrome)
RPM	otáčky za minútu (revolutions per minute)
SIM	structured illumination microscopy
SOS	stočiť – otočiť – stočiť (metóda centrifugácie)
TCA	trikarboxylová kyselina (tri-carboxylic acid)
TF	transkripčný faktor
TGF- α	transformujúci rastový faktor alfa (transforming growth factor-alpha)
TM	trans-membránový
UTR	neprekladaná oblasť v translácii (untranslated region)
wt	divoký typ (wild type)

1. Úvod

Autozomálne recesívna polycystická choroba obličiek je závažným dedičným ochorením, ktoré sa vyznačuje cystickým postihnutím obličiek, dedičnou pečeňovou fibrózou a dilatáciou žlčových ciest. Miera výskytu sa pohybuje okolo 1:20 000 živých pôrodov. Spektrum klinických prejavov je široké a závisí na veku, v akom sa ochorenie manifestuje. Najzávažnejšie prípady postihnutia sa obyčajne odhalia už prenatálne okolo 20. týždňa tehotenstva, kedy je možné u plodu pozorovať zväčšené obličky so zvýšenou echogenitou a prítomnosť oligohydramnia. Až 30% ťažko postihnutých detí umiera krátko po pôrode na respiračnú insuficienciu z dôvodu pľúcnej hypoplázie. U detí, ktoré prežijú perinatálne obdobie, dochádza počas prvej dekády života k progresu postihnutia obličiek do terminálneho štádia, často je nevyhnutným krokom transplantácia. Pokiaľ dochádza k nástupu ochorenia v neskoršom veku, klinické prejavy zahŕňajú najmä pečeňové komplikácie - vrodenú fibrózu pečene a dilatáciu žlčových ciest. Kauzálnym génom tohto ochorenia je gén *PKHD1*, ktorý je lokalizovaný na primárnych cíliach buniek renálneho epitelu zberných kanálikov. Proteínovým produktom *PKHD1* je fibrocystín, ktorého funkcia nie je úplne objasnená. Predpokladá sa, že vytvára komplex s ďalšími ciliárnymi proteínami a podieľa sa na regulácii bunkovej proliferácie a diferenciáciu. Na základe fenotypových prejavov ARPKD je obtiažne stanoviť diagnózu exaktne, preto je potrebné u suspektných pacientov vykonať molekulárnu genetickú analýzu génu *PKHD1*. Avšak nie je nezvyčajnou skutočnosťou, že u pacientov, ktorých fenotyp indikuje na ARPKD ochorenie, nie sú mutačným screeningom potvrdené mutácie *PKHD1*.

Fenotyp ARPKD môže byť zamieňaný s mutáciami asociovanými s génom *HNF1B*, ktorý tvorí najčastejšiu monogénnu príčinu vývojových porúch obličiek. Klinické prejavy sa vyznačujú dilatáciou zberných kanálikov a prítomnosťou cýst, pričom je veľmi obtiažne rozlíšiť prejavy asociované s *HNF1B* mutáciami a fenotyp ARPKD. *HNF1B* je transkripčným faktorom, ktorý priamo reguluje *PKHD1* expresiu a teda jeho poškodením vplyvom mutácií môže byť ovplyvnená expresia *PKHD1*.

Molekulárna diagnostika dedičných ochorení je posledné roky rýchlo sa rozmáhajúcim odvetvím molekulárnej biológie. S nástupom sekvenovania novej generácie sa možnosti genetickej analýzy rozšírili vďaka technickým pokrokom. Avšak s rozvojom techniky musí udržať krok aj znalosť komplexity daného ochorenia a schopnosť vidieť veci v súvislostiach.

2. Prehľad literatúry

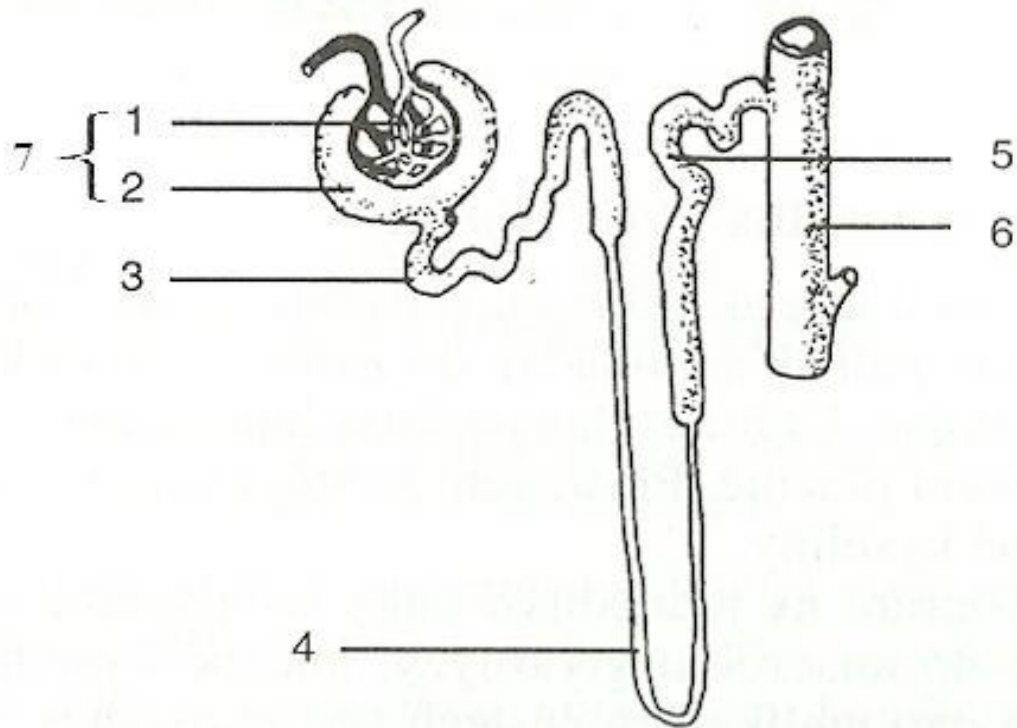
2.1 Biológia obličiek

Obličky sú párovým orgánom nachádzajúcim sa po oboch stranách bedrovej chrbtice, pričom u dospelého človeka váži jedna oblička približne 150 gramov. Ich hlavná funkcia spočíva v udržiavaní osmotickej rovnováhy reguláciou objemu vody a zloženia anorganických iónov. Tento proces prebieha roztredníctvom exkrécie jednotlivých substancií v adekvátnom množstve tak, aby boli zachované stále koncentrácie v extracelulárnej tekutine. Zohrávajú dôležitú funkciu v exkrécii metabolických odpadových produktov, napr. urey, kyseliny močovej či kreatínu, ktorý predstavuje koncový produkt rozpadu hemoglobínu a je zodpovedný za charakteristické zafarbenie moču. Ďalej sa podieľajú na eliminácii cudzorodých chemických látok – ako sú napr. lieky, potravinové aditíva či pesticídy – a ich metabolitov. Okrem exkrečnej funkcie figurujú obličky aj ako endokrinné žľazy sekretujúce hormóny, napr. erytropoietín, renín a aktívnu formu vitamínu D, ktorý ovplyvňuje rovnováhu vápniku v tele (VANDER *et al.* 1990).

Jedna oblička pozostáva z približne 1 milióna funkčných jednotiek – nefrónov, ktoré sa skladajú z Malpighiho telieska a systému tubulov (obr. 1).

Malpighiho teliesko je guľatý útvar tvorený Bowmanovým púzdom, do ktorého je vložené kĺbko kapilár – glomerulus. V Bowmanovom púzde sa nachádzajú podocyty - špecializované bunky, ktoré sa rozvetvujú do početných rozvetvených výbežkov (pedikúl), ktorými pokrývajú povrch kapilár. Medzi susednými pedikulami sa vytvára štrbinovitý priestor, v ktorom sa nachádza proteínová membrána, tzv. „split diaphragm“, ktorá zohráva dôležitú úlohu pri selektívnom filtračnom systéme, pretože nie je priepustná pre molekuly väčšie ako sérový albumín (OBEIDOVÁ, 2011). V glomerule prebieha ultrafiltrácia, na ktorej sa podieľa bazálna membrána fungujúca ako selektívny filter. Výsledkom filtrácie je vznik primárneho moču, ktorý má rovnaké zloženie ako krvná plazma, avšak bez obsahu proteínov. Primárny moč ďalej postupuje do systému tubulov - tvorený proximálnym tubulom, Henleyho slučkou, distálnym tubulom a zbernými kanálkami - kde je ďalej upravovaný procesmi reabsorpcie a sekrécie. V jednotlivých častiach tubulov sa nachádzajú rôzne epitelové bunky, v dôsledku čoho sa na ich membránach nachádzajú odlišné prenášače a kanály. Preto sa v odlišných častiach tubulov transportujú rovnaké látky odlišnými spôsobmi alebo naopak, odlišné látky zdieľajú rovnaký spôsob transportu (ČIHÁK, 2008). Vylučovanie látok ako napr. kreatinín či látok ovplyvňujúcich pH prebieha aktívnym transportom z krvi cez membránu epitelov do lúmenu

tubulov. Spätná reabsorpcia z primárneho moču do peritubulárnych kapilár prebieha ako aktívne (s primárnou reabsorpciou sa stretávame pri sodíkových iónoch; so sekundárnou pri transporte glukózy), tak i pasívne (transport močoviny). Výsledný moč odvádza distálny tubulus do zberného kanáliku, ktorý je spoločný pre viacero nefrónov (TROJAN a LANGMEIER, 2003).



Obr. 1: Stavba nefrónu. Prevzaté a upravené od ŠMARDÁ (2007).

- 1 – kĺbko kapilár (glomerulus)
- 2 – Bowmanové púzdre (capsula glomerulus Bowmani)
- 3 – vinutý kanálik 1. stupňa = proximálny tubulus (tubulus proximalis)
- 4 – Henleyho slučka (ansa nephroni Henlei)
- 5 – vinutý kanálik 2. stupňa = distálny tubulus (tubulus distalis)
- 6 – zberný kanálik (tubulus colligens)
- 7 – Maplighiho teliesko (corpusculum renale Malpighi)

2.2 Polycystické ochorenia obličiek

Polycystické ochorenia obličiek (PKD) zahŕňajú skupinu monogenických obličkových abnormalít, ktoré zapríčiňujú významný podiel na morbidite a mortalite. Charakteristickým znakom je prítomnosť tekutinou naplnených cýst vznikajúcich z tubulárnych segmentov. V niektorých prípadoch môžu izolované cysty vzniknúť ako degeneratívne lézie u dospelého jedinca, avšak bežnejším dôvodom vzniku nondysplastických mnohopočetných cýst je genetická príčina.

Najčastejšie sa stretávame s autozomálne dominantnou polycystickou chorobou obličiek (ADPKD), ktorá celosvetovo postihuje 1:500 dospelých ľudí (TRAN *et al.* 2014). Typickým znakom ADPKD sú početné obličkové cysty vytvárajúce sa počas intrauterinného vývoja plodu, avšak k nástupu ochorenia a progresu do posledného štádia (ESRD) dochádza až okolo 50.- 60. roku života. ADPKD je spôsobené mutáciami génov *PKD1* a *PKD2*, ktoré kódujú proteíny polycystín 1 (PC1) a polycystín 2 (PC2). Exprezia PC1 a PC2 bola pozorovaná v rôznych častiach bunky, napr. na primárnych cíliach epitelu obličiek. Sekvenčná homológia a funkčné štúdie naznačujú, že PC1 potencionálne plní funkciu transmembránového receptora pre G-proteíny spriahnuté so signalingom, zatiaľ čo PC2 slúži ako kanál pre transport Ca^{2+} iónov (CARDENAS-RODRIGUEZ a BADANO 2009). Napriek tomu, že presná funkcia PC1 a PC2 nie je preskúmaná, predpokladá sa, že spolu interagujú a vytvárajú Ca^{2+} permeabilné neselektívne kationové toky. Predpokladá sa, že rovnakou mechanosenzorickou dráhou sa komplex PC1/PC2 zúčastňuje bunkovej regulácie toku tekutín (HARRIS a TORRES 2014).

Pomerne ojedinelým ochorením s výskytom 1:20 000 na živých pôrodov je autozomálne recesívna polycystická choroba obličiek (ARPKD) spôsobená mutáciami génu *PKHD1*, ktorý kóduje fibrocystín/polyduktín. Viac si o tomto ochorení povieme v nasledujúcej kapitole 2.3.

2.2.1 Renálna cystogenéza

Patogenéza renálnej cystogenézy (RC) je komplexným procesom zahŕňujúcim početné bunkové aberácie, zvýšenú bunkovú proliferáciu, dediferenciáciu, sekréciu tekutín a pozmenenú polaritu buniek. Presný molekulárny mechanizmus RC doposiaľ nie je úplne objasnený, nakoľko sa jedná o veľmi zložitý proces, ktorý môžu ovplyvňovať početné faktory/procesy na rôznych úrovniach regulácie.

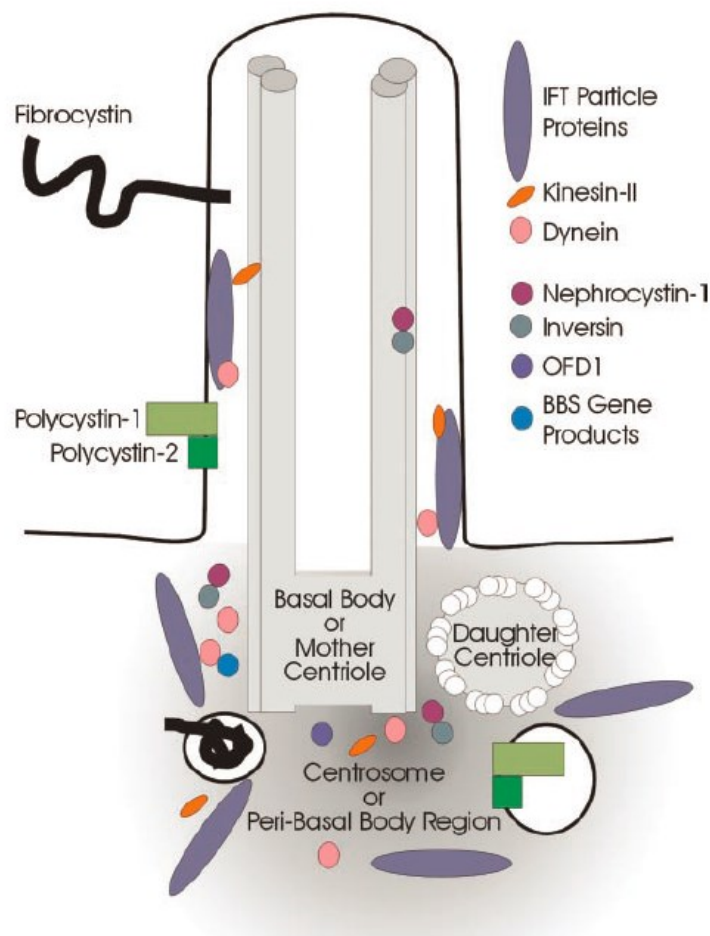
Pojem „cysta“ je v literatúre používaný na popis tekutinou naplnenej dutiny, ktorá je lemovaná epitelovými bunkami. Jeden z modelov RC hovorí, že na formovanie cýst je potrebná zvýšená bunková proliferácia a abnormálne extracelulárne interakcie vedúce k hromadeniu intratubulárnej tekutiny (CALVET 2002). Hromadenie intratubulárnej tekutiny a narušenie regulácie bunkového rastu vedie k dilatácii tubulov a následne k formácii cýst. Podľa iného modelu RC majú renálne epitelové bunky schopnosť mechanického senzoringu, ktorý slúži na indikáciu stavu kedy lúmen tubulárneho epitelu dosiahol požadovanú veľkosť. Pokiaľ sa tento mechanizmus detekcie naruší, bunky rastú aj po prekročení optimálnej hranice zasahujúc do okolitých tkanív, čo vedie k tvorbe cýst (LUBARSKY a KRASNOW 2003). Predpokladá sa, že detekcia veľkosti lúmenu je sprostredkovaná interakciami typu bunka-bunka a bunka-matrix. V RC môžu zohrávať svoju úlohu aj primárne cílie (PC) - organely kontrolujúce optimálny prietok tekutiny vo vyvíjajúcich sa tubuloch (PAZOUR a WITMAN 2004). Akonáhle sa dosiahne optimálna hodnota prietoku tekutiny v tubuloch, PC vyšlú signál na zastavenie ďalšieho bunkového delenia. Vzhľadom k faktu, že väčšina génov, ktorých mutácie vedú k renálnym polycystickým ochoreniam, sú lokalizované na primárnych cíliach, je možné predpokladať, že PC zohrávajú v RC dôležitú úlohu.

2.2.1.1 Rola primárnych cílií v cystogenéze

Komplexitu RC znásobuje snaha definovať v tomto procese úlohu PC podieľajúcich sa na vytváraní a udržiavaní tubulárnej integrity. PAZOUR a ROSENBAUM (2002) formulovali hypotézu „primárnych cílií“, ktorá pojednáva o úlohe štrukturálnych alebo funkčných abnormalít na primárnych cíliach tubulárneho epitelu v procese vývoja renálnych cýst. Podľa tejto hypotézy PC slúžia ako centrá časných krokov dráh signálnej transdukcie a sú zodpovedné za monitorovanie integrity nefrónu a žlčových ciest. Zúčastňujú sa v regulácii epitelovej proliferácie a diferenciácie.

Štruktúrne cílie pozostávajú z mikrotubulárnej axonémy, ktorá je pokrytá špeciálnou plazmatickou membránou. Ciliárna axonéma je tvorená 2 bazálnymi telieskami, ktoré tvoria jadro centrozómu a vyčnievajú z bunkového povrchu do extracelulárneho priestoru. Rozlišujeme 3 typy cílií: primárne, pohyblivé a nodálne (ČIHÁK 2008). PC sú nepohyblivé vlásenkovité štruktúry, ktorým sú v literatúre pripísané početné funkcie. Ciliárne proteíny sa podieľajú na regulácii bunkového cyklu; vystupujú ako chemosensory v olfakcii; zohrávajú mechanosensorickú funkciu na apikálnom povrchu buniek renálneho epitelu, kde monitorujú prietok moču a regulujú transport Ca^{2+} katiónov z extracelulárneho prostredia (PAZOUR

2004). PC sú považované za extrémne senzitivne bunkové organely a i malá zmena v jednom z ciliových proteínov môže mať veľký dopad na funkciu celej bunkovej podjednotky. Schématické znázornenie PC renálneho epitelu nájdeme na obr. 2. Lokalizácia jednej podjednotky na apikálnom bunkovom povrchu predurčuje priestorovú orientáciu bunky vzhľadom na okolité prostredie. U PKD nachádzame poruchu priestorového usporiadania (polarizácie) PC (FISHER *et al.* 2009).



Obr. 2: Diagram renálneho PC a asociovaných štruktúr. PC sa skladá z axonémy (mikrotubululárny cytoskelet), ktorá je pokrytá ciliárnou membránou. Axonéma zvyčajne pozostáva z 9 dvojzväzkov mikrotubulov, na obrázku znázornené len 2. Mikrotubulárne zväzky axonémy sú ukotvené v centriole, dcérska centriola je bez cilií. Centriola sa nachádza v strede centrosómu, ktorý hrá dôležitú úlohu v organizácii mitotického vretienka počas mitózy. PC sa zúčastňujú intraflagelárneho transportu (IFT). Počas IFT prebieha transport veľkých častíc pozdĺž ciliárnych mikrotubulov, na transporte sa podieľajú kinezín-II a dyneín. Obrázok prevzatý z PAZOUR (2004).

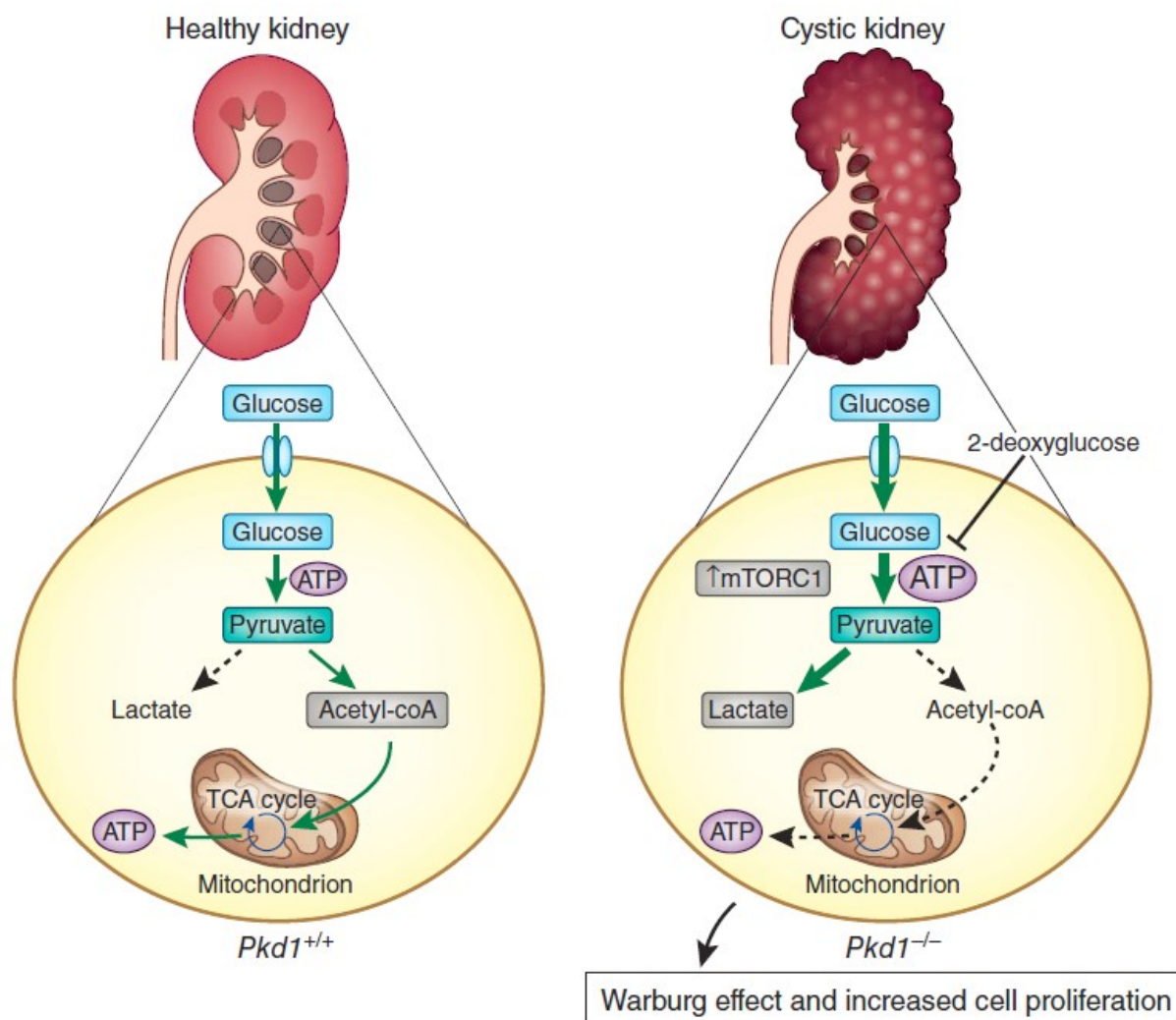
Počas embryonálneho vývoja zohrávajú PC dôležitú úlohu v rôznych signálnych dráhach (napr. Hedgehog, Wnt či Notch signálne dráhy) ktorých narušenie môže ovplyvňovať tvorbu renálnych cýst. Ako vplývajú pozmenené signálne dráhy na renálnu cystogenézu na úrovni molekulárneho mechanizmu však nie je doposiaľ objasnené.

2.2.1.2 Metabolické reprogramovanie – Warburgov efekt

Schopnosť buniek získavať energiu prostredníctvom aeróbnej glykolýzy redukciou pyruvátu na laktát bola po prvý raz popísaná u rakovinových buniek (WARBURG, 1956). Tento metabolický fenomén, nazvaný podľa svojho objaviteľa - Warburgov efekt, spočíva v tom, že bunky i napriek dostatočnému množstvu kyslíka v prostredí preferujú redukciu pyruvátu na laktát (namiesto obvyklého smerovania pyruvátu do cyklu TCA). I napriek tomu, že tento spôsob získavania energie je menej efektívny (z hľadiska produkcie ATP/molekulu glukózy), napomáha udržiavaniu bunkovej proliferácie. Produkty vznikajúce pri aeróbnej glykolýze zásobujú rôzne biosyntetické dráhy, ako napr. pentózovofosfátový cyklus, vďaka ktorému bunka získava zvýšené množstvo nukleozidov a lipidových prekursorov. Tento spôsob reprogramovania metabolizmu glukózy bol pozorovaný u mnohých tumorových buniek ako jedna zo základných charakteristík nádorových buniek.

PKD cysty by sa dali charakterizovať ako benígne neoplastické bunky, avšak ich bunkové procesy sa nedajú presne predpovedať. V nektorých prípadoch môžu tieto bunky invadovať a porušiť priľahlé tkanivá, pričom schopnosť rozširovania sa je typická je malígne neoplastické bunky (PRIOLO a HENSKE, 2013). Napr. cysty prítomné u ADPKD spĺňajú viaceré charakteristické znaky rakoviny (definované HANAHAN a WEINBERG, 2000) – zvýšenú bunkovú proliferáciu, poruchy bunkovej polarity a sekréciu proangiogenického vaskulárneho rastového faktoru A. Jeden z ďalších znakov rakovinových buniek je metabolické reprogramovanie, ktoré však až do roku 2013 nebolo s PKD ochoreniami spájané.

ROWE *et al.* (2013) identifikovali Warburgov efekt v ADPKD renálnych bunkách, kde dochádzalo k metabolickej zmene využívania glykolýzy v prípade neprítomnosti funkčného PC1 proteínu (obr. 3). Dôležitým zistením bolo, že metabolická alterácia u ADPKD nie je len sekundárnym následkom zvýšenej bunkovej proliferácie (bola pozorovaná aj u neproliferujúcich ADPKD renálnych buniek), ale môže byť primárnou príčinou iniciácie RC (ROWE a BOLETTA, 2014).



Obr. 3: Porovnanie metabolických procesov prebiehajúcich u zdravej obličky a cystickej obličky. U cystickej obličky pyruvát nevstupuje do TCA cyklu, ale redukuje sa na laktát, čo môže spôsobovať zvýšenú bunkovú proliferáciu (prevzaté a upravené z ROWE *et al.* 2013).

2.3 Autozomálne recesívna polycystická choroba obličiek

Autozomálne recesívnu polycystickú chorobu obličiek (ARPKD) zaraďujeme do skupiny vrodených fibrocystických syndrómov postihujúcich obličky i pečeň variabilnou mierou poškodenia. Charakteristickým znakom sú cystické dilatované zberné kanáliky (CT) vretenovitého tvaru v obličkách, ktoré sú lemované nediferencovaným epitelom a obklopené abnormálnym zoskupením extracelulárnej matrix. Podľa závažnosti ochorenia môže byť postihnutých 10 – 90% CT, čo má za následok variabilnú mieru renálnej dysfunkcie. Počet postihnutých CT je priamo úmerný miere zväčšenia obličiek. Štruktúra obličiek je špongiovitá

a morfológicky nie je možné definovať presné rozhranie medzi medulárnou vrstvou a kortexom. Histopatologické nálezy odhalili prítomnosť subkapsulárných cystických lézií, ktoré boli orientované radiálne a korešpondovali s rozšírenými CT (SWEENEY a AVNER, 2006).

Postihnutie pečene je značne variabilné a úzko súvisí s faktorom veku pacienta, t.j. kedy dochádza k nástupu komplikácií. Zatiaľ čo postihnutie obličiek nachádzame u detí v skorom ranom veku, postihnutie pečene sa zvyčajne manifestuje až v neskoršom detstve. Najčastejšími prejavmi sú dysgenéza žlčových ciest a zjazvenie pečeneňového tkaniva (vrodená fibróza pečene – CHF). Dilatované žlčové cesty spolu s CHF sú príčinou sekundárných zdravotných problémov, ako napr. opakujúce sa zápalý žlčových ciest, portálna hypertenzia, splenomegália (zväčšenie sleziny) a pažerákové či žalúdočné varixy (HARRIS a ROSSETTI 2004).

Majoritná väčšina prípadov ARPKD sa klinicky prezentuje už počas intrauterinného vývoja plodu alebo pri pôrode. Okolo 20. týždňa tehotenstva je možné prostredníctvom sonografu identifikovať u plodu zväčšené obličky so zvýšenou echogenitou. Početné viditeľné cysty sú prítomné len ojedinele - ich prítomnosť indikuje podozrenie včasného prejavu ADPKD (ZERRES *et al.* 2004). V dôsledku zníženej funkcie obličiek dochádza u plodu k zhoršenému vylučovaniu moču, čo má za následok znížené množstvo plodovej vody (oligohydramnion), či v obzvlášť závažných prípadoch až anhydramniom, t.j. absenciu plodovej vody. Väčšina plodov vykazuje tzv. „Potter“ črty tváre – charakteristickým vzhľadom tváre, ktorá vyzerá akoby bola pritlačená o okenné sklo (stlačený nos, veľké odstavajúce nízko posadené uši, nedostatočne vyvinutá dolná čeľusť - mikrogнатia). Ďalšími fenotypovými znakmi sú skrátene končatiny a hokejkovitý tvar chodidiel (BERGMANN *et al.* 2004). Podľa štatistík 25 – 30% novorodencov umiera krátko po pôrode v dôsledku pľúcnej hypoplázie a nedostatočne vyvinutému respiračnému systému. Približne u 50% prípadov dochádza v prvej dekáde života k progresii do terminálneho štádia ochorenia obličiek (ESRD) a k transplantácií obličiek. Častým sprievodným symptómom popísaným u 80% prípadov je zvýšený krvný tlak, ktorý pravdepodobne súvisí s narušenou reguláciou sodíkového transportu, čo vedie k zvýšenému intravaskulárnemu objemu (ADEVA *et al.* 2006).

Minoritná časť ARPKD prípadov sa manifestuje až v neskoršom detstve, klinické prejavy sú v týchto prípadoch spojené s menšou mierou zväčšenia obličiek a väčšou variabilitou vo veľkosti cýst. U pacientov sa obvykle prejavujú komplikácie spojené s CFH a dilatáciou žlčových ciest – v prípade, že sú dilatované len intrahepatálne žlčové cesty, hovoríme o tzv. Caroliho ochorení (JEONG *et al.* 2006). V ojedinelých prípadoch poškodenie pečene prograduje do takej miery, že je nutná transplantácia.

Hlavné fenotypové znaky ARPKD – dilatácia CT a malformácie žlčových ciest – indikujú, že základným ARPKD defektom by mohlo byť zlyhanie terminálnej diferenciácie CT a žlčovej sústavy (WARD *et al.* 2002).

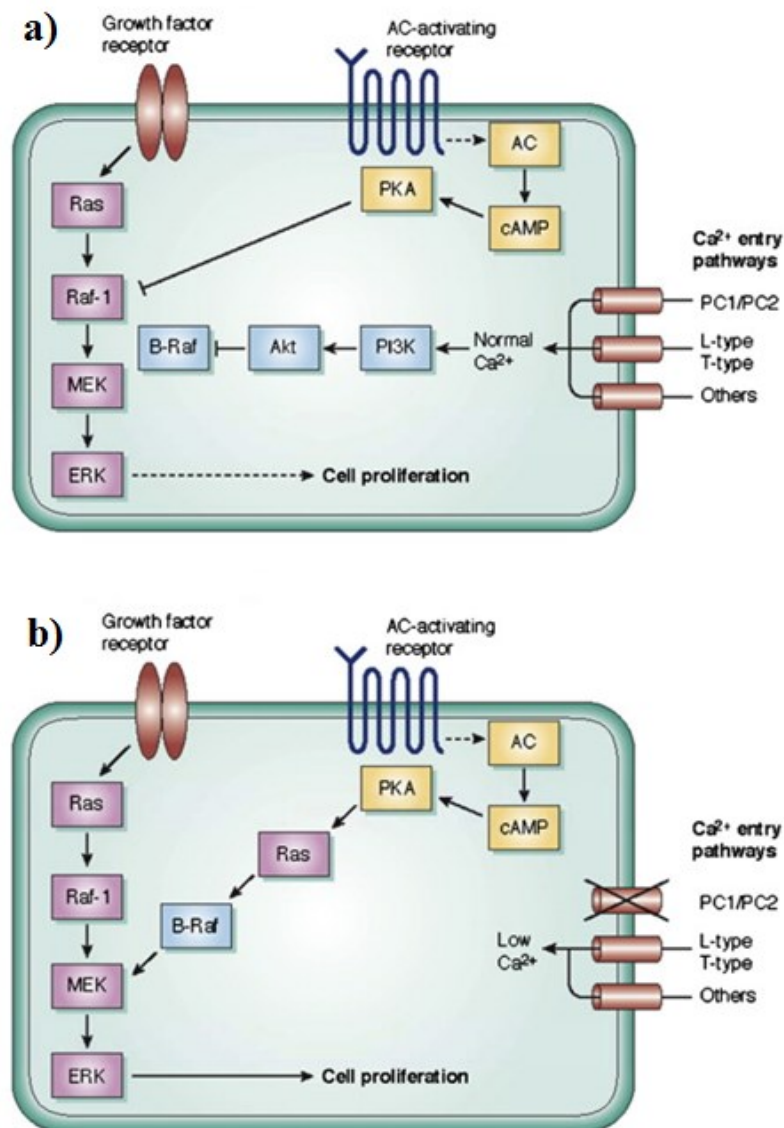
Zmienka o prvých pokusoch diagnostikovať ARPKD pochádza už z roku 1902 kedy sa v lekárskech záznamoch objavujú popisy cystického ochorenia obličiek s výraznými morfológickými znakmi. Nakoľko sú klinické prejavy ARPKD značne variabilné, v roku 1971 boli klasifikované 4 hlavné kategórie fenotypov – perinatálny, neonatálny, infantilný a juvenilný (BLYTH a OCKENDEN, 1971). Pri určovaní fenotypových skupín boli zohľadňované prejavy postihnutia obličiek/pečene a vek, kedy sa ochorenie prejavilo. Na základe týchto parametrov boli pacienti priradzovaní do jednotlivých klinicko-patologických fenotypových skupín. Napr. perinatálny fenotyp zahŕňal ťažkú formu cystických obličiek s minimálnymi komplikáciami žlčových ciest, kým juvenilný typ označoval pacientov s výraznou portálnou hypertenziou a pritom s minimálnymi obličkovými problémami. V dobe pred identifikáciou ARPKD kauzálneho génu sa predpokladalo, že každú fenotypovú kategóriu zapríčiňuje mutácia v inom géne, klinické prejavy indikovali rôzne genetické podstaty ochorenia. Až vedeckej skupine ZERRES *et al.* (1994) sa podarilo lokalizovať ARPKD gén na chromozóm 6 a tým potvrdiť, že ARPKD je monogénne ochorenie.

2.3.1 Bunková patofyziológia ARPKD

Na základe početných štúdií zaoberajúcich sa ARPKD bunkovými procesmi v CT, môžeme charakterizovať ARPKD patofyziologický vývoj ako sled procesov vedúcich k zmene diferenciovaných neproliferujúcich reabsorbívnych epitelových buniek na čiastočne dediferenciované sekrečné epitelové bunky, ktoré sa vyznačujú poruchami polarizácie a vysokou mierou proliferácie a apoptózy. Už v roku 1991 s použitím matematických modelov boli vedci schopní formulovať záver, že na tvorbu cýst u ARPKD je nevyhnutná (a zároveň postačujúca) bunková proliferácia a sekrécia (WELLING a GRANTHAM 1991). Avšak nasledujúce roky výskumu ukázali, že sa jedná o omnoho komplexnejší proces, ktorého presný molekulárny mechanizmus nie je doposiaľ úplne objasnený. V nasledujúcich riadkoch si charakterizujeme procesy, ktorých pôsobením a úzko prepojenými interakciami dochádza k vzniku a rozvoju ARPKD.

2.3.1.1 cAMP sprostredkovaná proliferácia

V literatúre nájdeme početné dôkazy potvrdzujúce esenciálnu rolu dráhy cyklického adenosil monofosfátu (cAMP) v podieľaní sa ako na bunkovej proliferácii, tak i v sekrécii tekutín v renálnom epitele ADPKD i ARPKD buniek. U ARPKD dochádza vplyvom mutovaného proteínu fibrocystínu k narušeniu intracelulárnej Ca^{2+} homeostázy alebo k prerušeniu Ca^{2+} signálnej dráhy, čo má za následok bunkovú dediferenciáciu a hyperproliferáciu vďaka cAMP-sprostredkovanej proliferáčnej dráhe (WALLACE 2011).



Obr. 4: Porovnanie dráh cAMP-dependentnej bunkovej proliferácie: a) zdravá renálna bunka b) ARPKD renálna bunka. Prevzaté a upravené z WALLACE 2011.

V normálnych ľudských i myších renálnych epitelových bunkách cAMP inhibuje dráhu Ras/Raf-1/MEK/ERK na úrovni Raf-1, čo vo výsledku znižuje bunkovú proliferáciu. U ARPKD epitelových buniek však cAMP naopak stimuluje Raf-1, čím sa aktivuje MEK/ERK dráha a dochádza k zvýšeniu bunkovej proliferácie (obr. 4). Na základe týchto poznatkov vieme, že cAMP môže mať ako mitogénny, tak i antimítogénny účinok.

Zmena povahy cAMP z antimítogénneho na mitogénny stimul pre Raf-1 priamo koreluje s intracelulárnou koncentráciou Ca^{2+} (YAMAGUCHI et al. 2004). Štúdie odhalili, že PI3-K/Akt dráha reguluje cAMP-závislú aktiváciu B-Raf/MEK/ERK a bunkovú proliferáciu v CT (YAMAGUCHI et al. 2003). Fosforylácia B-Raf prostredníctvom Akt mala za následok negatívnu reguláciu B-Raf aktivity (ZHANG a GUAN 2000).

Zníženie koncentrácie Ca^{2+} v bunkách ľudských renálnych epitelov po dobu 3 – 5 hodín spôsobilo konverciu normálneho fenotypu (kde cAMP inhibuje proliferáciu) na abnormálny bunkový fenotyp charakteristický pre ARPKD bunky - so stimulovanou proliferáciou prostredníctvom cAMP. Zníženie koncentrácie Ca^{2+} a zníženie Akt aktivity umožňuje cAMP dependentnú B-Raf aktiváciu, čo stimuluje bunkovú proliferáciu. Priama inhibícia či už PI3-K alebo Akt zapríčiňuje cAMP-dependentnú ERK aktiváciu a bunkovú proliferáciu, čo indukuje fenotypovú zmenu imitujúcu Ca^{2+} restrikciiu. Farmakologické zvýšenie koncentrácie Ca^{2+} spôsobilo zvýšenie úrovne fosforylácie Akt, zatiaľ čo pri použití blokátorov Ca^{2+} kanálu došlo k zníženiu hladiny fosforylácie Akt (YAMAGUCHI et al. 2006). Toto pozorovanie odhalilo, že abnormálny proliferatívny charakter buniek ARPKD je priamo podmienený zníženou intracelulárnou koncentráciou Ca^{2+} a vyvolanou cAMP mitogénnou aktivitou. Tento záver potvrdilo pozorovanie kedy pri zvýšení intracelulárnej koncentrácie Ca^{2+} došlo k zvýšeniu Akt aktivity a tiež bola pozorovaná blokácia cAMP-dependentnej B-Raf a ERK aktivácie. Experimentálne výsledky demonštrovali, že zvýšením Ca^{2+} koncentrácie dochádza k obnove normálnej antimítogénnej odpovedi na cAMP signály v ARPKD renálnych bunkách (YAMAGUCHI et al. 2006). U ARPKD dochádza vplyvom mutácií *PKHD1* k zmene proteínovej štruktúry/povahy FPC, čo znemožňuje správne fungovanie komplexu proteínov FPC/PC2/PC1. Strata funkcie tohto komplexu spôsobuje narušenie Ca^{2+} homeostázy a spúšťa cAMP-mitogénnu dráhu.

2.3.1.2 Expresia EGFR

V premene hyperplastických epitelových buniek na cystické bunky (čo vedie k formovaniu cýst a následnému zväčšovaniu obličiek) zohráva dôležitú úlohu EGFR. Renálne bunky ARPKD pacientov sú neobvykle citlivé na stimuláciu proliferácie prostredníctvom EGF. Tekutina nachádzajúca sa v cystách obsahuje mitogénne koncentrácie EGFR ligandov, ktoré sú sekretované do lúmenu cýst v množstvách schopných vyvolať bunkovú proliferáciu (ROHATGI *et al.* 2004). Cystické epitelové bunky v obličkách vykazujú ako kvalitatívne (zmena lokalizácie), tak i kvantitatívne (nadexpresia) zmeny expresie EGFR. K podobnému záveru prišli aj SATO *et al.* (2005) skúmajúc epitelové bunky žľčovodov u ARPKD modelu na krysách. Podobne ako renálne bunky, tak i epitelové bunky žľčovodov exprimujú EGFR vo zvýšenej miere, čo vedie k rozšíreniu kanálikov žľčovodu.

Štúdium ARPKD modelu odhalilo signifikantnú nadexpresiu a abnormálnu lokalizáciu EGFR na apikálnom povrchu epitelových buniek lemujúcich cysty. Zároveň bolo dokázané, že na EGFR sa špecificky viaže proteín TGF- α (patriaci do skupiny EGF), ktorý má k EGFR vysokú afinitu. Následne po naviazaní TGF- α dochádza k autofosforylácii, čo má za následok vytvorenie mitogénnych signálov (SWEENEY a AVNER 2006). Takto sa vytvára ustálený cyklus autokrínnej-parakrínnej stimulácie bunkovej proliferácie cýst. Veľmi podobný cyklus na stimuláciu proliferácie môžeme pozorovať u mnohých rakovinových foriem.

2.3.1.3 Sekrécia

Na rozdiel od ADPKD cýst, ktoré sú kompletne oddelené od prietoku moču, cysty u ARPKD sa podstatne štruktúrne líšia. Počas vývoja nedochádza k ich oddeleniu od nefrónu, a teda aferentné a eferentné tubulárne dráhy ostávajú neprerušené (SWEENEY a AVNER 2006). Rozdiely v štruktúre ARPKD a ADPKD cýst naznačujú, že u oboch ochorení funguje odlišný sekrečný mechanizmus. U ADPKD sa na sekrécii Cl^- podieľa cAMP sprostredkovaný kotransport (na bazolaterálnej membráne) a CFTR na apikálnej strane membrány, čo umožňuje rozpínanosť cýst. Pri pokusoch s ARPKD myším modelom však pri absencii CFTR neboli pozorované žiadne zmeny rastu obličkových/pečeňových cýst. (NAKANISHI *et al.* 2001). VEIZIS a COTTON (2005) identifikovali, že renálne epitelové bunky u ARPKD vykazujú sekrečnú aktivitu prostredníctvom zníženia Na^+ absorpcie v bunkách. Tento proces

je pripisovaný EGF-sprostredkovanému poklesu α podjednotky v epitelovom Na⁺ kanále. Pečeňové ARPKD bunky epitelu vykazujú hyperproliferáciu ako odpoveď na pôsobenie EGF. Ako však hyperproliferácia epitelových buniek vplyva na sekrečný mechanizmus ostáva zatiaľ neobjasnené.

2.3.1.4 Aktivácia mTOR dráhy

Serín/treonín špecifická kináza (mammalian target of rapamycin – mTOR) je evolučne konzervovaná signálna molekula, ktorá je stimulovaná širokým spektrom signálov a podnetov z vonkajšieho prostredia. Uplatňuje sa napr. pri vysporiadavaní sa bunky s oxidatívnym stresom, s nedostatkom živín či energie. Vzhľadom na fyziologické podmienky potrebuje bunka na rast a proliferáciu vhodné signály a žiadané prostredie. S aberantnou aktiváciou mTOR signálnej dráhy sa stretávame napr. u malígnych (rakovinových) či benígnych proliferáčnych ochoreniach, vrátane ADPKD. Výskum skupiny FISHER *et al.* (2009) odhalil, že i v prípade ARPKD dochádza k abnormálnej aktivácii mTOR signálnej dráhy, čo napomáha progresii ochorenia, napr. rastu cystického epitelového tkaniva. Toto zistenie vytvára priestor na možnú terapeutickú intervenciu priamo zacielenú na inhibíciu bunkovej proliferácie. Ako inhibítor mTOR dráhy je možné použiť rapamycín, ktorého účinkom by došlo k spomaleniu progresie ochorenia.

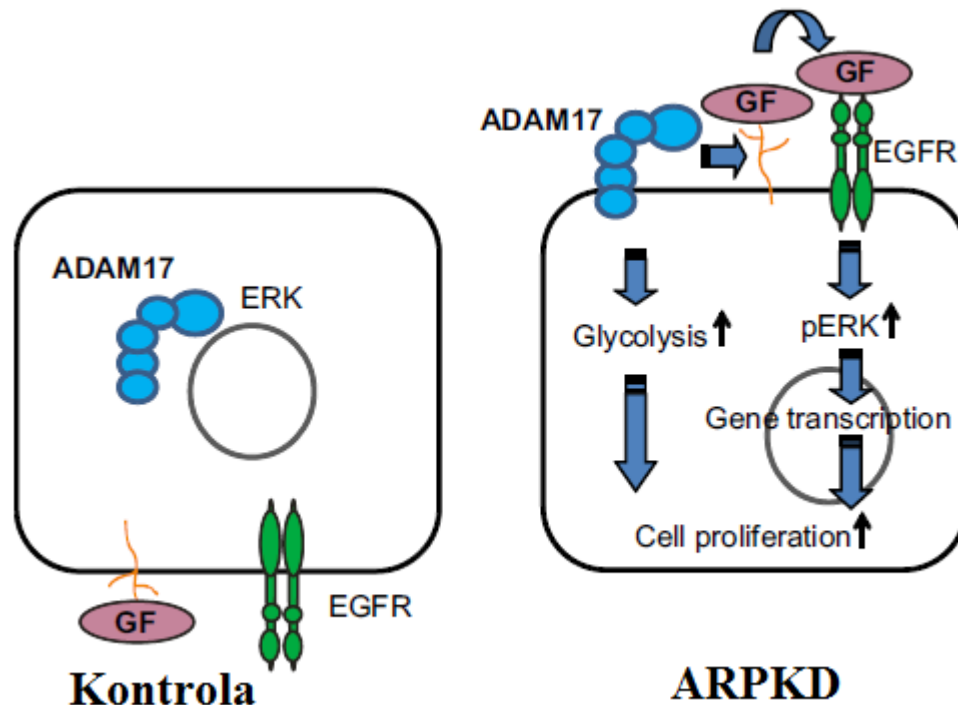
2.3.1.5 Vplyv ADAM 17 na bunkovú proliferáciu

GOOZ *et al.* (2014) odhalili možnú úlohu disintegrínového metaloenzýmu 17 (ADAM 17) v iniciácii bunkovej proliferácie prostredníctvom ovplyvnenia EGFR/MAPK/ERK dráhy. ADAM 17 bol prvotne identifikovaný ako „tumor nekrotický faktor α konvertujúci enzým“, ktorý slúži ako uvoľňovač rôznych rastových faktorov (TGF- α , heparín viažúci EGF) – tie následne aktivujú EGFR receptor, čo vyvolá aktiváciu EGFR-dependentných proliferáčnych signálnych dráh, ako napr. MAPK/ERK.

Štúdium cystického epitelového tkaniva ARPKD myši poukázalo na relokáciu ADAM 17 na bunkový povrch, pričom v kontrolných vzorkách sa ADAM 17 exprimoval v cytosole bunky. Aktivovaný ADAM 17 lokalizuje bunkový povrch, kde indukuje uvoľnenie rôznych rastových faktorov, čo má za následok konštantné zvýšenie aktivity apikálneho EGFR a udržiavanie zvýšenej miery proliferácie, ktorá je typickým znakom cystického epitelového tkaniva.

Aktivácia EGFR môže mať za následok zapnutie rôznych signálnych kaskád v bunke, napr. MAPK/ERK, p38 alebo JNK dráhy. GOOZ *et al.* (2014) pozorovali v ARPKD bunkách (v porovnaní s kontrolnými bunkami) trvalú aktiváciu proliferačnej ERK dráhy, ktorú však môžu aktivovať rôzne extracelulárne stimuly prostredníctvom rôznych receptorov. Dôležitým zistením bolo, že práve zvýšená aktivita ADAM 17 podmieňuje zvýšenú ERK aktiváciu/fosforyláciu. ADAM 17 je teda kľúčovým enzýmom zapríčínujúcim trvalú aktiváciu proliferačnej ERK dráhy prostredníctvom konštitutívneho uvoľňovania rôznych rastových faktorov v epitelových bunkách ZK.

V ARPKD bunkách ZK bola pozorovaná vyššia miera glykolytického metabolizmu, vyššia produkcia laktátu a výraznejšia citlivosť buniek voči inhibíciám glykolýzy (GOOZ *et al.* 2014). Tieto pozorovania naznačujú, že metabolické reprogramovanie známe ako Warburgov efekt je esenciálnym bioenergetickým prvkom nielen u ADPKD, ale i pri ARPKD. Pri inhibícii ADAM 17 expresie bolo pozorované v ARPKD bunkách zníženie produkcie laktátu, z čoho môžeme vyvodiť záver, že ADAM 17 pozitívne vplyva na prechod na aeróbnu glykolýzu. Schématické zhrnutie role ADAM 17 v ovplyvnení bunkovej proliferácie a glykolytického metabolizmu bunky je zobrazené na obr. 5.



Obr. 5: Schématické znázornenie indukcie bunkovej proliferácie prostredníctvom ADAM 17. Prevzaté a upravené z GOOZ *et al.* 2014.

2.3.1.6 ERK signalizácia

ERK signálna dráha je jedným z kľúčových regulátorov bunkovej proliferácie a tubulomorfogenézy v renálnych bunkách (ROUX a BLENIS 2004). Jeden z esenciálnych krokov je aktivácia proteínov tejto dráhy prostredníctvom fosforylácie príslušnou kinázou. MAI *et al.* (2005) pozorovali v myších bunkách CT s inhibovaným *Pkhd1* zníženú a oneskorenú fosforyláciu ERK proteínov príslušnou fokálnou adhezívnou kinázou (FAK). FAK patrí do skupiny tyrozínových kináz, obsahuje početné tyrozínové fosforylačné miesta a zohráva úlohu v remodelácii cytoskeletu, v bunkovej polarizácii a v tvorbe spojení bunka-bunka/bunka-matrix. Nedostatok funkčnej FAK je príčinou abnormalít v endoteliálnej tubulomorfogenéze (ILIC *et al.* 2003). Skutočnosť, že v bunkách so zníženou *Pkhd1* expreziou dochádzalo k zníženiu fosforylácie proteínov naznačuje, že do procesu abnormalnej tubulomorfogenézy u ARPKD je zahrnutá aj pozmenená ERK signálna dráha.

2.4 Gén *PKHD1* jeho produkt

I keď vysoká variabilita klinických prejavov ARPKD vzbudzovala podozrenie na geneticky heterogénny charakter ochorenia, dôkazy intra-familiárnej fenotypovej variability a väzbové analýzy svedčili skôr v prospech alelickej heterogénnosti, vplyvu prostredia a vplyvu genetických modifikátorov (KAPLAN *et al.* 1989).

ZERRES *et al.* (1994) v roku 1994 podrobili väzbovej analýze 16 rodín s vyskytujúcimi sa prípadmi ARPKD. U všetkých prípadov bol lokalizovaný ARPKD gén na tom istom lokuse, 6p21.1-p12, čo sčasti vyvrátilo podozrenie na heterogénny charakter ARPKD. Pacienti zo 16 rodín totiž vykazovali variabilnú klinickú manifestáciu príznakov, avšak v testovanom súbore chýbalo zastúpenie závažného fenotypu ARPKD. Nasledujúca štúdia GUAY-WOODFORD *et al.* (1995) zahŕňala jedincov z perinatálnej kategórie so závažným fenotypom, pričom väzbová analýza opätovne potvrdila lokalizáciu na chromozóme 6 a spresnila interval na 3.8 cM. Tieto štúdie potvrdili, že ARPKD je geneticky homogénne ochorenie, pri ktorom je závažný i miernejší fenotyp zapríčinený mutáciami v jednom géne. Lokácia ARPKD génu – nazvaného ako *PKHD1* (**p**olycystic **k**idney and **h**epatic **d**isease 1) – bola nasledovnými štúdiami spresnená na 1 cM, lemovaná markermi teloméry D6S1714 a centroméry D6S1024 (LENS *et al.* 1997).

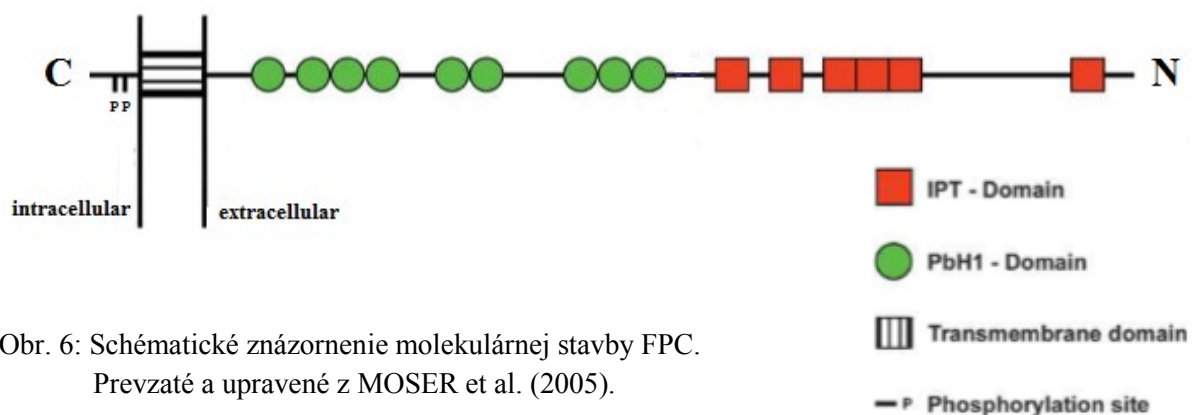
Napriek tomu, že prvé štúdie popisujúce lokalizáciu ARPKD génu na chromozóm 6 boli známe už v roku 1994, trvalo ďalších 8 rokov kým bol identifikovaný gén samotný.

Identifikáciu sťažoval nízky stupeň homológie fibrocystínu voči ostatným charakterizovaným proteínom a príliš veľká disperzná štruktúra génu.

V roku 2002 bol *PKHD1* gén identifikovaný nezávisle od seba 2 vedeckými skupinami s využitím odlišných prístupov. WARD *et al.* (2002) génovo analyzovali potkany s ARPKD a odhalili ortológny vzťah medzi potkaním lokusom a ARPKD lokusom u ľudí. ONUCHIC *et al.* (2002) použili prístup pozičného klonovania.

Gén *PKHD1* zaujíma približne 470 kb genomickej DNA, čo ho radí medzi jeden z najväčších génov v ľudskom genóme. Má minimálne 86 exónov, ktoré sú zostavované prostredníctvom komplexného skladania alternatívnych splicingových variantov. Komplexita splicingu u tohto génu umožňuje vznik veľkého počtu rôznych transkriptov, ktoré môžu byť potencionálne prekladané do membránovo-viazaných a sekretovaných proteínových produktov (ONUCHIC *et al.* 2002).

Predpokladaný najdlhší otvorený čítací rámec kóduje 67 exónov a vytvára integrálny membránový glykoproteín – fibrocystín (nazývaný aj polyduktín). Fibrocystín (FPC) je tvorený 4074 aminokyselinami (AMK) a v neglykozylovanom stave dosahuje molekulárnu hmotnosť približne 447 kD. Avšak v maturovanom stave bude jeho molekulárna hmotnosť signifikantne väčšia, vďaka prítomnosti početných potencionálnych glykozylačných miest. Je tvorený (obr.6) signálnym peptidom, rozsiahlou N-terminálnou extracelulárnou doménou (3860 AMK), jednou transmembránovou (TM) doménou a krátkou C-terminálnou doménou (192 AMK), ktorá obsahuje domnelé 4 cyklické adenosín monofosfát (cAMP)/cyklické guanozín monofosfát (cGMP) fosforylačné miesta (WARD *et al.* 2002, ONUCHIC *et al.* 2002).



Obr. 6: Schématické znázornenie molekulárnej stavby FPC.
Prevzaté a upravené z MOSER *et al.* (2005).

Analýza extracelulárnej časti odhalila prítomnosť viacerých TIG/IPT domén. WARD *et al.* (2002) objavili prítomnosť 7 kópií TIG/IPT domén, čo odpovedá 80-100 AMK. Tento typ domény nachádzame u rôznych proteínov (ako v extracelulárnej, tak i v cytoplazmatickej oblasti). Avšak TIG/IPT domény objavené u fibrocystínu vykazujú najväčšiu podobnosť s doménami nachádzajúcimi sa v extracelulárnych oblastiach receptorových proteínov, ako sú napr. receptor pre hepatocytový rastový faktor, receptor pre tyrozín kinázy (Ron trieda) či plexíny, ktoré sa zúčastňujú regulácie bunkovej adhézie, repulzie a proliferácie. Medzi poslednou TIG/IPT doménou a transmembránovou doménou sa nachádzajú početné paralelné beta-helix 1 opakovania (PbH1).

Napriek tomu, že popis funkcie fibrocystínu nie je doposiaľ presne objasnený, už tieto zistenia indikovali jeho možné funkcie. Podobnosť TIG/IPT domén s plexínmi a Ron triedou receptorov pre tyrozín kinázy napovedá, že by fibrocystín mohol hrať úlohu v regulácii bunkovej motility alebo v rozpoznávaní bunka-bunka. Avšak fibrocystín postráda niektoré štrukturálne prvky, ktoré sú charakteristické pre proteíny účastniace sa týchto procesov – preto je možné predpokladať, že mechanizmus účinku bude odlišný. PbH1 opakovania sú typické pre toxíny účastniace sa bakteriálnej patogenézy, adhezíny a virulénne faktory, a sú známe schopnosťou viazať karbohydrátové zvyšky. Prítomnosť PbH1 opakovaní u fibrocystínu poukazuje teda na možnú funkciu v rozpoznávaní a modifikácií karbohydrátov. Väzobné miesta môžu viazať karbohydrátové zvyšky glykoproteínov prítomných na povrchu bunky alebo v matrixe bazálnej membrány – interakcie karbohydrátových zvyškov s fibrocystínom môžu modulovať spojenia bunka-bunka alebo bunka-matrix. ONUCHIC *et al.* (2002) vyslovili názor, že variabilný počet TIG/IPT domén a PbH1 opakovaní u niektorých kratších transkriptov by mohol viesť k výsledným proteínovým produktom s rôznymi väzobnými afinitami pre cieľové faktory. Podobná splicingová variabilita ovplyvňujúca väzbu na cieľové faktory bola popísaná i u neurexínov (MISSLER a SUDHOF, 1998). V roku 2002 nebola ani jedna skupina vedcov schopná presne určiť, či fibrocystín zohráva úlohu ako receptor, ligand alebo membránový proteín (WARD *et al.* 2002, ONUCHIC *et al.* 2002).

2.4.1 Lokalizácia fibrocystínu v bunke

Krátko po popísaní molekulárnej štruktúry produktu génu *PKHDI* vedecká skupina WARD *et al.* (2003) charakterizovala celulórnú a subcelulórnú lokalizáciu fibrocystínu. Dizajn experimentu postavili na použití monoklonálnych protilátok, ktoré naviazali na C-terminálnu časť proteínu. Následne vzorky podrobili analýze pomocou western blott techniky,

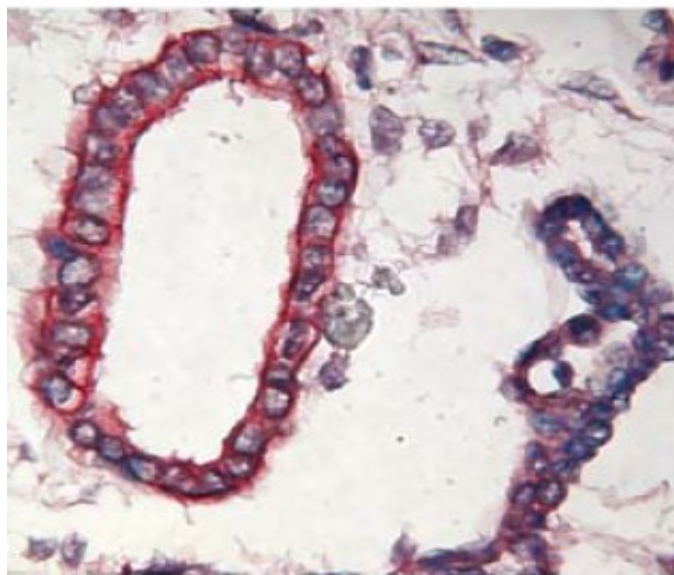
imunohistochemickému farbeniu a imunofluorescenčnej vizualizácii. Tieto pokusy odhalili tkanivovo-špecifickú lokalizáciu fibrocystínu – v prevalentnej miere sa nachádzal v tkanivách obličiek a pečene. V menšej miere bol detekovaný aj v pankrease, na Langerhansových ostrovcíkoch, v epididymálnych kanálikoch, v semenovode a v nadobličkovej žľaze.

V embryonálnych renálnych bunkách bol lokalizovaný najmä v miestach vetviacich sa uretrálnych a zberných kanálikov, v menšej miere vo vyvíjajúcom sa nefróne. V detských renálnych bunkách bola prítomnosť fibrocystínu detekovaná aj v oblasti Henlyho slučky. V renálnych bunkách dospelého človeka bola naopak prítomnosť fibrocystínu detekovaná striktne len v CT a v malej miere v oblasti renálneho kortexu.

V pečňových bunkách bol fibrocystín lokalizovaný v miestach vyvíjajúcich sa i maturovaných intrahepatických žlčových ciest, slabý signál bol zaznamenaný aj v hepatocytoch.

V tkanivách ARPKD suspektných pacientov nebolo možné detekovať fibrocystín v dilatovaných CT obličiek a v epitele žlčových ciest v pečeni.

Imunofluorescenčná vizualizácia odhalila subcelulárnu lokalizáciu fibrocystínu na ciliárnych axonómach (obr.7). Pri niektorých vzorkách bol zachytený aj slabý cytoplazmatický signál. WARD et al. (2003) nevedeli determinovať, či sú primárne cílie jediným funkčným miestom fibrocystínu. Ďalšie štúdie nepotvrdili, že by apikálna strana plazmatickej membrány mala pre funkciu fibrocystínu dôležitý význam. Nakoľko však samotná funkcia fibrocystínu nie je doposiaľ úplne objasnená, je stále možné predpokladať, že lokalizácia na plazmatickej membráne môže byť funkčne dôležitá.



Obr. 7: Imunohistochemická vizualizácia lokalizácie fibrocystínu. Na obrázku vidíme vzorku ľudskej fetálnej obličky demonštrujúcu robustnú membránovú lokalizáciu na apikálnej a bazolaterálnej membráne buniek ZK. Prezaté z SWEENEY a AVNER 2006.

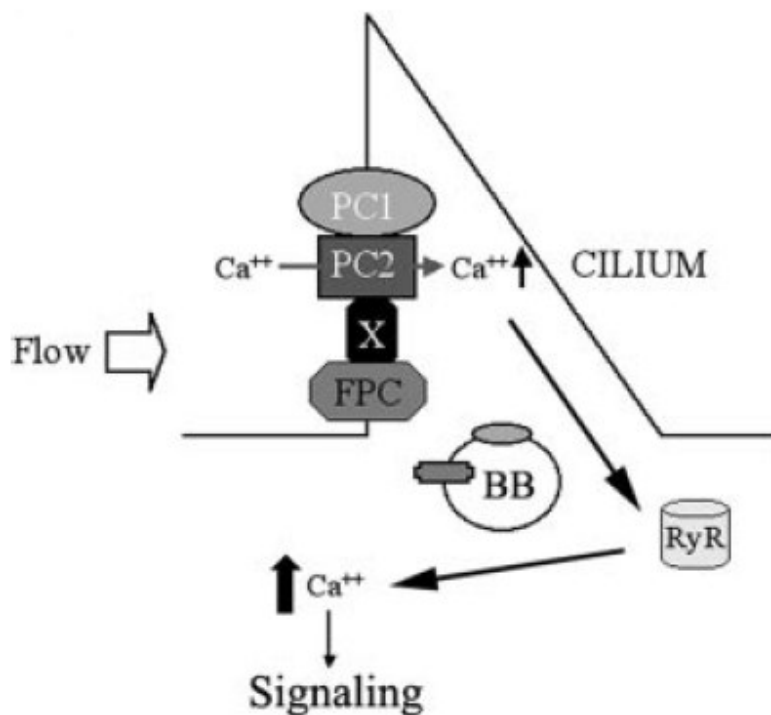
Na základe popísanej lokalizácie fibrocystínu bolo možné predpokladať jeho úlohu ako ciliárneho proteínu – buď slúžiaceho ako kontrolný bod maturácie tubulov alebo účastniaceho sa na mechanosenzorickej funkcii cilií.

2.4.2 Funkcia fibrocystínu

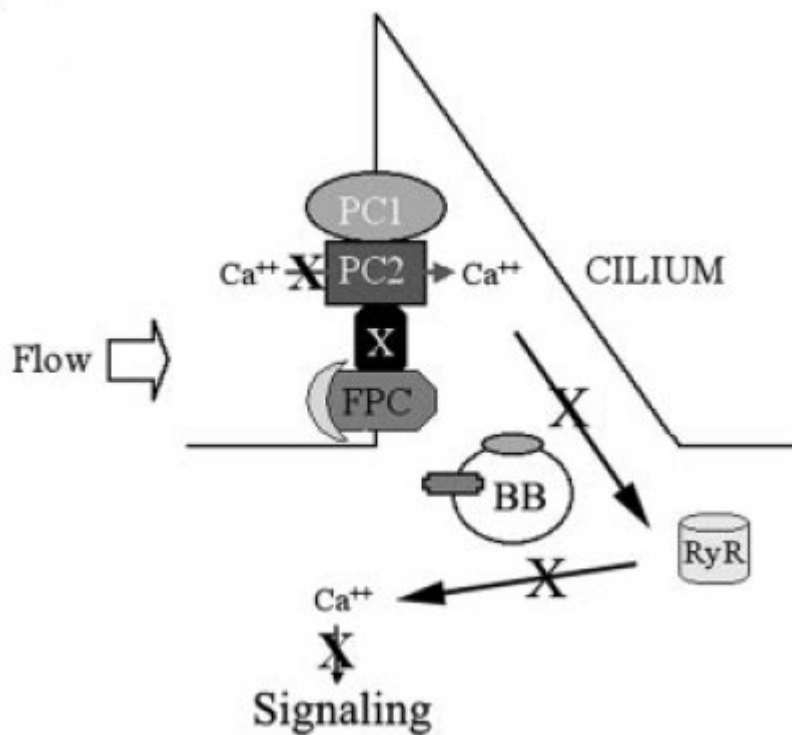
Pri štúdiu renálnych buniek s vyradeným *PKHDI* génom MAI *et al.* (2005) pozorovali inhibíciu tubulomorfogenézy, poškodenie bunka-bunka spojení, iniciáciu spontánneho bunkové rozptylu a disorganizáciu aktínového cytoskeletu, zvýšenú apoptózu a zníženú mieru bunkovej proliferácie. Strata funkcie FPC pravdepodobne narušuje dôležitú dráhu, ktorá zohráva kritickú úlohu v rozmiestnení aktínového cytoskeletu a znemožňuje nastavenie správnej polarizácii bunky. FPC pravdepodobne zohráva úlohu v udržiavaní tubulárnej žľčovodovej organostavby (KIM *et al.* 2008).

V súčasnosti stále chýbajú exaktné experimentálne výsledky, ktoré by popísali funkciu FPC. Pravdepodobne sa zúčastňuje regulácie bunkovej odpovede na koncentráciu Ca^{2+} kationov prostredníctvom interakcie s PC2. Štúdium skupiny WANG *et al.* (2007) odhalilo, že medzi FPC a PC2 nedochádza k priamej interakcii medzi ich intracelulárnymi doménami, avšak nie je vylúčená možnosť fyzického kontaktu extracelulárnych domén. Pravdepodobnejšie však interakciu medzi týmito 2 proteínami prostredkúva ďalšia zatiaľ neznáma molekula. Na obr. 8 môžeme vidieť schematické znázornenie model FPC/PC2 – po stimulácii vyvolanej prietokom tekutiny je vyslaný do bunky signál, ktorý prenášajú membránové proteíny lokalizované na PC, čo následne vyvolá aktiváciu Ca^{2+} kanálu a umožní vstup Ca^{2+} kationom do bunky. Vzápätí je zmenou koncentrácie Ca^{2+} v intracelulárnom prostredí aktivovaný ryanodínový receptor, ktorý zohráva úlohu v uvoľnení vápnika do cytoplazmy.

V prípade straty funkcie FPC nedochádza k prijatiu prvotného signálu vyvolaného prietokom tekutiny v extracelulárnom priestore. Následkom toho nemôže dôjsť k prenosu signálu a bunka tak nie je schopná reagovať na zmenu prietoku tekutiny zmenou koncentrácie Ca^{2+} kationov (obr. 9).



Obr. 8: Model komplexu fibrocystín-polycystíny lokalizovaný na PC (X = neznáma molekula; BB = bazálne telieska; RyR = ryanodínový receptor). Prevzaté a upravené z WANG et al. 2007.



Obr. 9: Obr. Z: Narušenie komplexu FPC/PC2 spôsobuje prerušenie Ca²⁺ signálu (X = neznáma molekula; BB = bazálne telieska; RyR = ryanodínový receptor). Prevzaté a upravené z WANG et al. 2007.

2.4.3 Splicing

Už v roku 2002 pri 1. popísaní produktu génu *PKHD1* bolo evidentné, že fibrocystín podlieha rozsiahlym a komplexným post-transkripčným zostrihovým úpravám (ONUCHIC *et al.* 2002). Doposiaľ nie je presne známe, ktoré z možných mRNA transkriptov sa prekladajú do poradia AMK v proteíne. Predpokladá sa, že gén *PKHD1* umožňuje vznik početných polypeptidov, ktoré sa odlišujú sekvenciou AMK i veľkosťou. SWEENEY a AVNER (2006) charakterizovali 2 hlavné kategórie výsledných produktov zostrihu. Jedna skupina (do ktorej patrí aj najdlhší ORF kódujúci fibrocystín) zahŕňa proteíny, ktoré majú jednu TM doménu a pravdepodobne sú asociované s plazmatickou membránou. Do druhej skupiny patria proteíny, ktoré nemajú TM doménu a teda sa jedná o sekrečné proteíny. Základom správneho pochopenia etiológie ARPKD je poznanie, ktoré *PKHD1* izoformy sú nevyhnutné na zabezpečenie renálnych a pečeno-žlčových funkcií. Disperzná distribúcia mutácií pozdĺž celého génu *PKHD1* naznačuje, že najdlhší ORF transkript je nevyhnutný pre správnu funkciu fibrocystínu v obličkách a pečeni. BERGMANN *et al.* (2004) formulovali hypotézu, že na zabezpečenie normálnej funkcie je potrebné dostatočné množstvo proteínu kódovaného najdlhším ORF. Mutáciami sa narušuje kritická funkčná stechiometrická alebo vývojová (časová) rovnováha medzi rozličnými proteínovými produktmi, ktorá je udržiavaná komplexnými úzko prepojenými spôsobmi zostrihu.

BODDU *at al.* (2016) pri porovnávaní *Pkhd1* transkripčného profilu v tkanivách obličiek/pečene u myších embryí/dospelých jedincov zistili, že spôsob zostrihu je tkanivovo-spezifický a podmienený vývojovým vekom jedinca. Zároveň na myšom modeli pozorovali odlišnú mieru postihnutia jednotlivých orgánov – kým pečeno-žlčový fenotyp bol porovnateľný s prejavmi u ľudí, renálny fenotyp vo väčšine prípadov chýbal alebo bol výrazne miernejší v porovnaní s renálnym fenotypom u ľudí. Tieto výsledky naznačujú, že u myší v renálnom tkanive dochádza ku kompenzáciám – alternatívne izoformy sú schopné do istej miery kompenzovať sekvenčné zmeny, ako sú napr. malé inzercie/delécie.

Presnosť zostrihového procesu ovplyvňuje nielen zachovanie konsenzus intrónového/exónového zostrihového miesta, ale i ESE motívy. V prípade pozmenenia sekvencie ESE motívu môže dôjsť k preskočeniu celého exónu (napr. mutácia R760H v exóne 22 spôsobuje narušenie sekvencie ESE motívu, čo vedie vo výslednom produkte zostrihu k absencii celého exónu 22).

2.4.4 Mutačné spektrum *PKHD1*

Veľkosť génu, nedostatočné znalosti o funkcii kódovaného proteínu a komplikovaný spôsob zostrihu sťažujú možnosť predikcie funkčných zmien spôsobených *PKHD1* sekvenčnými alteráciami. Doposiaľ bolo identifikovaných 748 mutácií, ktoré sú popísané v ARPKD/PKHD1 databáze spravovanej RWTH Univerzitou Aachen (<http://www.humgen.rwth-aachen.de>). V databáze Human Gene Mutation Database (HGMD) je v súčasnosti popísaných 522 PKHD1 mutácií (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>).

Najväčšiu skupinu (366) mutácií tvoria missense/nonsense mutácie. Druhou najpočetnejšou skupinou sú delécie malého rozsahu (72) a zostrihové substitúcie (39). Signifikantný rozdiel medzi uvedenými počtami mutácií v databáze HGMD a ARPKD/PKHD1 databáze spočíva v evidencii popísaných polymorfizmov. Kým databáza ARPKD/PKHD1 radí do zoznamu aj polymorfizmy, HGMD zoznam identifikovaných PKHD1 polymorfizmov neuvádza.

Sekvenčné alternácie *PKHD1* génu môžeme pomyselne rozdeliť do 3 kategórií:

1) Exónové mutácie

Medzi exónové mutácie zaraďujeme napr. nukleotidové missense substitúcie, nonsense substitúcie alebo delécie/duplikácie/inzercie malého rozsahu. Mutácie z tejto kategórie sú považované za potencionálne patologické. Bodové mutácie v kódujúcich oblastiach môžu ovplyvňovať fyzikálno-chemické vlastnosti proteínu, ako napr. post-translačné modifikácie (zmeny fosforylačných alebo glykozylačných miest), stabilitu maturovaného proteínu voči proteolytickému štiepeniu, alebo interakcie s ostatnými molekulami (FISCHER *et al.* 2009).

2) Intrónové mutácie

Vo väčšine prípadov sa vyhodnocujú len mutácie nachádzajúce sa na rozhraní intrónu a exónu. Mutácie na konsenzus zostrihových miestach môžu spôsobovať rôzne štrukturálne zmeny, ako napr. preskočenie celého exónu, aktiváciu kryptického zostrihového miesta, vytvorenie pseudoexónu vo vnútri intrónu alebo retenciu intrónu (MODREK a LEE 2003). Skúmanie vplyvu intrónových mutácií nachádzajúcich sa mimo konsenzus zostrihového miesta vyžaduje funkčné alebo mRNA štúdie, avšak štúdium na úrovni transkripcie je obvykle obmedzené (napr. chýbajúcim vhodným materiálom od pacienta).

3) Polymorfizmy

Do tejto kategórie radíme napr. zmeny v intrónoch, ktoré sa nenachádzajú v konsenzus zostrihových miestach; mutácie lokalizované na 5'/3' UTR; tiché exónové mutácie, ktoré nespôsobujú zmenu AMK, alebo substitučné zmeny, ktoré sú bežne prítomné u zdravých kontrol (BERGMANN *et al.* 2004). Tu je potrebné zdôrazniť, že aj zmena klasifikovaná ako polymorfizmus môže byť patologická. Napr. tiché exónové mutácie síce nevedú k zmene AMK, ale môžu spôsobiť tzv. preskočenie exónu („exon skipping“). V dôsledku tichej mutácie totiž môže dôjsť k pozmeneniu sekundárnej štruktúry pre-mRNA (LIU *et al.* 2001), k zmene miesta rozpoznávaného exónovým zostrihovým efektorom (TU *et al.* 2000) alebo k narušeniu skenovacieho mechanizmu, ktorý je nevyhnutný pre precízny zostrih.

Miera detekcie mutácií (MDR) sa pohybuje približne okolo 80% za predpokladu, že do súboru pacientov zahrnieme celé klinické spektrum ARPKD bez ohľadu na vek prejavenia ochorenia – od potratených plodov v prenatalnom období až po mierne postihnutých dospelých jedincov (BERGMANN *et al.* 2005). Až u 95% pacientov sme schopní identifikovať aspoň jednu mutáciu, čo však nie je dostačujúce k určeniu diagnózy.

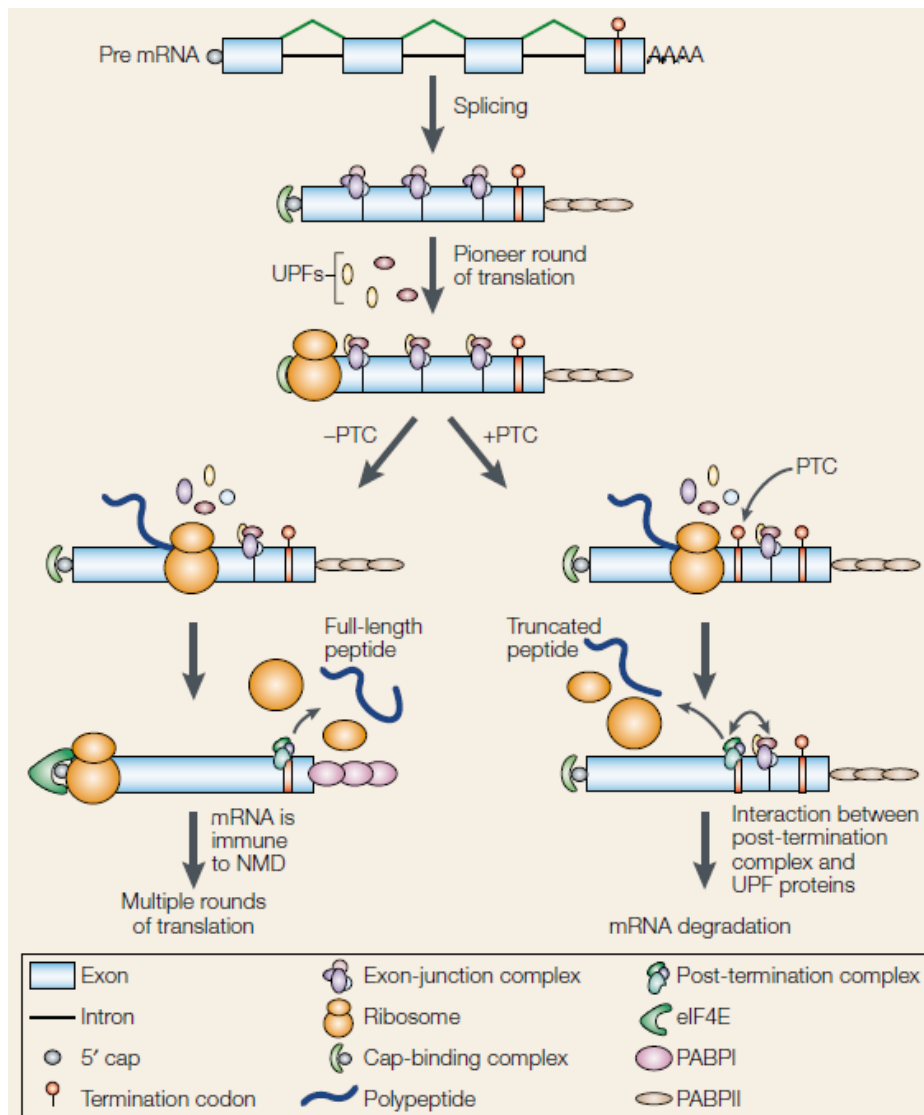
Väčšina detekovaných mutácií je unikátneho charakteru (tzv. „private mutations“), sú roztrúsené pozdĺž celého *PKHD1* génu bez prítomnosti „hot spot“ mutačného miesta. BERGMANN *et al.* (2003) identifikovali mutáciu p.Thr36Met v exóne 3, ktorá by mohla predstavovať potenciálny „hot spot“. Pri tejto mutácii dochádza k sekvenčnej zmene ACG kodónu 36 na ATG (c. 107C>T). Väčšina CpG dinukleotidov je náchylná k spontánnym mutáciám (príčinou je frekventovaná metylácia cytozínu a následná spontánna deaminácia na tymidín), preto je možné pokladať toto miesto za mutačný „hot spot“. Frekvencia výskytu p.Thr36Met v danom súbore pacientov bola $\approx 29\%$, nachádzala sa u nepríbuzných subjektov rôzneho etnického pôvodu, čo vylučuje možnosť efektu zakladateľa. Nasledujúce štúdie skupiny BERGMANN *et al.* (2004) poukázali na možnosť výskytu p.Thr36Met mutácie ako v homozygótnom, tak i v heterozygótnom stave, pričom klinické prejavy sa líšili od prípadu k prípadu (od predčasne potrateného ARPKD plodu až po dospelých jedincov s miernymi pečňovými komplikáciami). Pozorovaná fenotypová a haplotypová variabilita p.Thr36Met naznačujú, že sa naozaj jedná o *PKHD1* mutačný „hot spot“. Pri rozsiahlejšom štúdiu v roku 2005 bol identifikovaný efekt zakladateľa na fínskej populácii – mutácie p.Arg496X v exóne 16 a p.Val3471Gly v exóne 61 sa objavovali v 2/3 skúmaných fínskych

alel. Efekt zakladateľa bol pozorovaný aj na tureckej populácii, avšak frekvencia výskytu mutovaných alel bola menej signifikantná ako u fínskej populácie (BERGMANN *et al.* 2005).

2.4.5 Genotypovo – fenotypová korelácia

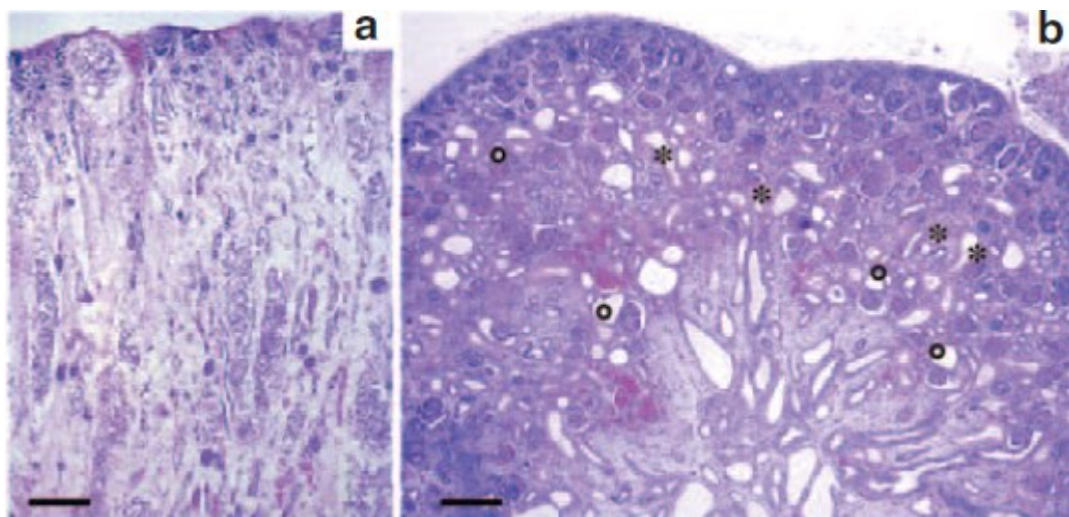
V priebehu posledných rokov boli uskutočnené početné štúdie zaoberajúce sa koreláciou medzi identifikovanými mutáciami a klinickými prejavmi. Prítomnosť 2 nonsense mutácií spôsobujúcich skrátenie proteínu vedie k letálnemu fenotypu, ktorý sa manifestuje v prenatálnom období ARPKD prejavmi detekovateľnými sonografom. U týchto pacientov dochádza k úmrtiu buď krátko po pôrode alebo v perinatálnom období, zriedkakedy prežijú neonatálne obdobie. Signifikantne častejší je miernejší fenotyp, ktorý je spôsobený prítomnosťou 2 missense mutácií alebo missense mutácie v kombinácii s nonsense mutáciou, ktorá spôsobí skrátenie proteínu (BERGMAN *et al.* 2003).

Kombinácia alelických mutácií je kritickým faktorom závažnosti fenotypových prejavov. Avšak predikcia fenotypu na základe genotypu v prípade ARPKD nie je príliš spoľahlivá. DENAMUR *et al.* (2010) popísali prípady 16 novorodencov, u ktorých neboli detekované 2 nonsense mutácie a predsa títo pacienti umreli krátko po pôrode. Naopak sa vyskytli prípady, kedy mal pacient s 2 nonsense mutáciami relatívne mierny ARPKD fenotyp a prospieval bez výraznejších komplikácií. U iných génov bol zistený zaujímavý jav, kedy niektoré predčasné STOP kodóny, vzniknuté nonsense mutáciami, aktivovali mechanizmus nonsense sprostredkovaný mRNA rozpad (NMD). NMD je kontrolný mechanizmus vďaka ktorému dochádza k redukcii translatovaného množstva skráteného proteínu. Predčasné STOP kodóny sú selektívne označené a určené na mRNA degradáciu (obr. 10). Ďalším uplatňovaným mechanizmom je nonsense sprostredkovaný alternatívny zostrih (NAS), pri ktorom sú exóny obsahujúce predčasný STOP kodón preskočené a vylúčené z finálneho transkriptu. Vďaka tomuto mechanizmu sa produkuje menej skrátený proteín s reziduálnou funkciou. NMD a NAS by mohli stáť za vysvetlením výskytu miernejšieho fenotypu u pacientov s nonsense mutáciami (FRANK *et al.* 2014).



Obr. 10: Schématické znázornenie mechanizmu NMD, ktorý sa uplňuje v prípade výskytu predčasného STOP kodónu (na obrázku prípad +PTC). Prevzaté a upravené z CARTEGNI *et al.* 2002.

DENAMUR *et al.* (2010) poukázal u ARPKD diagnostikovaných plodov na koreláciu detekovaných mutácií vzhľadom na gestačný vek (GA). U plodov (s potvrdenou ARPKD diagnózou) z umelo prerušných tehotenstiev histologické nálezy potvrdili, že GA hrá významnú rolu v korelácii závažnosti genotypu/fenotypu. U plodu so závažným genotypom (2 nonsense mutácie) dochádzalo k rýchlejšiemu progresu (obr. 11) ochorenia ako u plodu s miernym genotypom (len 1 nonsense alebo 2 missense mutácie).



Obr. 11: Histologický nález z pitvy dvoch plodov, u ktorých bolo umelo prerušené tehotenstvo v 30. týždni. a) U plodu so závažným genotypom bola pozorovaná rozsiahla dilatácia ZK a lézie v oblasti korticálnych tubulov. b) U plodu s miernym fenotypom boli dilatované ZK len v medulárnej oblasti (o = distálne tubuly; * = proximálne tubuly). Obrázok prevzatý z DENAMUR *et al.* 2010.

Porozumenie faktorom, ktoré stoja za širokou fenotypovou variabilitou ARPKD by malo výhody nielen z hľadiska možnosti stanovenia presnejšej prognózy, ale aj z hľadiska pochopenia patogenézy ochorenia (ROSSETTI *et al.* 2007). V súčasnej dobe je predikcia fenotypu determinovaná prítomnosťou 2 nonsense mutácií (predikcia závažného postihnutia) alebo 2 missense mutácií /1 missense a 1 nonsense mutácie (predikcia mierneho postihnutia).

2.5 Génová heterogénnosť u ARPKD?

Napriek tomu, že dlhé roky panovalo vo vedeckom svete presvedčenie o jednom kauzálnom ARPKD géne, najnovšie štúdie poukazujú na možné dôkazy génovej heterogénnosti. LU *et al.* (2017) vo svojej štúdií popísali spojenie ARPKD s ďalším potencionálne kauzálnym génom *DZIPIL*. Na vyšetrenie súboru pacientov použili genómovú SNP analýzu, pričom u všetkých ARPKD suspektných pacientov boli prekrývajúce sa homozygótne píky v chromozómovom lokuse 3q22.1-q23, čo predstavuje 7,5 Mb genomickej DNA. Následné celoexómové sekvenovanie odhalilo prítomnosť homozygótnych missense mutácií v géne *DZIPIL*. Vo všetkých prípadoch sa jednalo o mutácie v evolučne konzervovanej oblasti kódujúcej N-terminálnu časť proteínu, pričom podľa bioinformatickej predikcie boli všetky mutácie patogénne. Z tohto pozorovania môžeme usúdiť, že región kódujúci N-terminálnu časť je náchylnejší voči mutáciám a citlivejší na poškodenie ako C-terminálna časť.

DZIP1L kóduje proteín o veľkosti 767 AMK, ktorý obsahuje motív zinkového prstu typu C2H2 a niekoľko coiled-coil domén (GLAZER *et al.* 2010). U modelového organizmu *Danio rerio* a myši nachádzame paralóg *Dzip1* zúčastňujúci sa hedgehog signálnej dráhy a cíliogenézy (SEKIMIZU *et al.* 2004). Avšak u iných organizmov nie je funkcia *DZIP1L* doposiaľ preskúmaná.

Deleční mutanti *DZIP1L* u myši vykazovali včasný nástup ochorenia a progresívny cystický fenotyp – cysty boli pozorované nielen v CT, ale i v proximálnych tubuloch. Zatiaľ čo pri *ARPKD* sú cysty typicky prítomné len v CT a distálnych tubuloch, NAKANISHI *et al.* (2000) popísali, že cysty sa môžu vyskytovať aj v iných segmentoch nefrónu, vrátane distálnych tubulov. Ďalej boli pozorované aj extra-renálne dysmorfológie, ako napr. kraniofaciálne defekty či malformácie končatín. U pacientov s *DZIP1L* mutáciami však neboli extra-renálne fenotypové znaky pozorované.

Výskum skupiny LU *et al.* (2017) poukázal na lokalizáciu *DZIP1L* v oblasti centrioly a bazálnych teliesok v bunkách myších renálnych ZB, v ľudských dermálnych fibroblastoch a v embryonálnych fibroblastoch u myši. *DZIP1L* ostáva lokalizovaný na centriole počas celého bunkového cyklu, i vtedy, keď sa cílie počas mitózy rozostavia. Materská centriola, z ktorej sa neskôr vytvárajú bazálne telieska, potrebuje k správnej funkcii prítomnosť subdistálnych/distálnych priveskov alebo prechodového vlákna, ktoré sú nevyhnutné na správne ukotvenie bazálnych teliesok k membráne v prechodnej zóne. Je možné domnievať sa, že *DZIP1L* lokalizuje na distálnom konci materskej centrioly, pravdepodobne v mieste vzniku prechodnej zóny. Toto tvrdenie podporilo použitie mikroskopie SIM na preskúmanie ľudských fibroblastov, ktoré dokázalo, že *DZIP1L* kolokalizuje s proteínom tektonik 1 (TCTN1). Práve tento proteín je v literatúre popísaný ako proteín prechodnej zóny, a preto spoločné miesto expresie napovedá o možnom charaktere *DZIP1L* ako o proteíne prechodnej zóny. Zaujímavým zistením bolo, že *DZIP1L* asociuje s proteínom SEPT2, ktorý tvorí komponent difúznej bariéry prechodnej zóny. I keď doposiaľ nebol *DZIP1L* striktno popísaný ako súčasť komplexu proteínov prechodnej zóny, na základe nedávnych štúdií s použitím hmotnostnej spektrofotometrie sa *DZIP1L* zaradil do rozsiahleho zoznamu proteínov interagujúcich s elementom Inturned, ktorý je kľúčovým komponentom CPLANE komplexu prechodnej zóny umožňujúcim transport podskupiny intraflagelárnych transportných proteínov typu A na bazálne telieska (TORIYAMA *et al.* 2016). Tieto výsledky indikujú potencióálnu úlohu *DZIP1L* v CPLANE komplexe, avšak nateraz chýba vedecký dôkaz, ktorý by to jednoznačne potvrdzoval.

V mutantných *DZIP1L* bunkách bola pozorovaná odlišná distribúcia proteínov PC1 a PC2 pozdĺž ciliárnej membrány. V zdravých renálnych tubuloch vytvára PC1 a PC2 membránový komplex, pričom fibrocystín sa viaže a reguluje PC2. V mutantných *DZIP1L* bunkách neboli LU *et al.* (2017) schopní fibrocystín vôbec detekovať, a preto nebolo možné určiť, či je lokalizácia fibrocystínu v prípade straty *DZIP1L* tiež pozmenená.

Nakoľko sa jedná o nedávne publikované výsledky, ktoré môžu zásadným spôsobom zasiahnuť do molekulárnej diagnostiky ARPKD, bude potreba ďalšie skúmanie s cieľom porozumieť a objasniť molekulárnu podstatu zodpovednú za patológiu tohoto ochorenia.

2.5.1 ARPKD fenokopírovanie

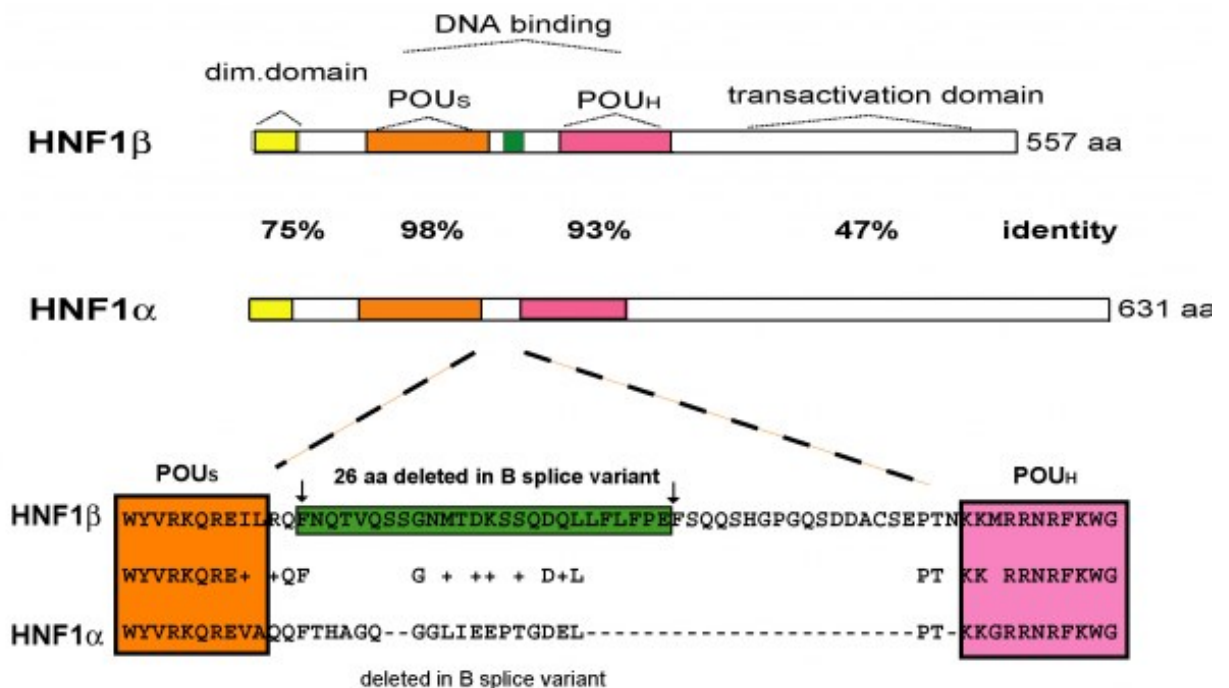
V uplynulej dekáde rokov vzrástol počet štúdií zaoberajúcich sa monogénnymi cystickými ochoreniami obličiek, spôsobenými mutáciami v génoch, ktoré kódujú proteíny podieľajúce sa na štruktúre a funkcií primárnych cilií. Táto rozširujúca sa skupina ochorení sa v literatúre označuje súhrnným pojmom „ciliopatie“ (PAZOUR 2004, BADANO *et al.* 2006). Ciliopatie sú charakterizované ako hepato-renálne fibrocystické ochorenia, pričom jednotlivé klinické prejavy rôznych ochorení môžu byť v určitých ohľadoch veľmi podobné. Preto nie je nezvyčajné, že mutácie v génoch iných ciliopatií môžu napodobňovať ARPKD fenotyp. Napr. u 2% ADPKD pacientov dochádza k nástupu ochorenia v skorom rannom detstve, pričom fenotypovo nie je možné klinicky odlíšiť ADPKD od ARPKD (BERGMANN *et al.* 2011). S podobnými prípadmi takmer nerozlišiteľného fenotypu sa stretávame aj u ďalších ciliopatických recesívnych ochorení - nefronoftíza, Joubertov syndróm, Bardet-Biedlov syndróm, Meckel-Gruberov syndróm (GUAY-WOODFORD 2014). V neposlednom rade môže byť renálny fenotyp ARPKD napodobnený mutáciami v géne *HNF1B* (v literatúre popisovaný aj ako *TCF2* gén), ktorý kóduje transkripčný faktor HNF1B. HNF1B nielenže zohráva dôležitú úlohu v nefrogenéze pri segmentácii nefrónov, ale i priamo reguluje promótor *PKHD1* génu (IGARASHI *et al.* 2005). Tieto informácie nám dali podnet na ďalšie podrobnejšie preskúmanie tohto transkripčného faktora (TF) a jeho možného vplyvu na ARPKD fenotyp.

2.6 Transkripčný faktor HNF1B

HNF1B (hepatocyte nuclear factor 1 β) je TF regulujúcim tkanivovo-špecifickú expresiu génov v obličkách, pečeni, pankrease, črevách a uretogenitálnom trakte. Zohráva dôležitú úlohu počas embryonálneho vývoja týchto orgánov (DECARAMER *et al.* 2007). Má 9 exónov a je lokalizovaný na chromozóme 17q12.

Štruktúrne je HNF1B (spolu s príbuzným faktorom HNF1A) členom veľkej rodiny TF obsahujúcich homeodoménu (štruktúrna doména proteínov o dĺžke približne 60 AMK, ktorá je schopná viazať sa na DNA). Oba faktory majú veľmi podobnú štruktúru (obr. 12), ktorá sa skladá z:

- N-terminálnej dimerizačnej domény
- tzv. „POU“ domény (Pit-1/Oct-1/Unc-86)
- homeodomény viažúcej DNA
- C-terminálnej transkripčne aktivačnej domény.



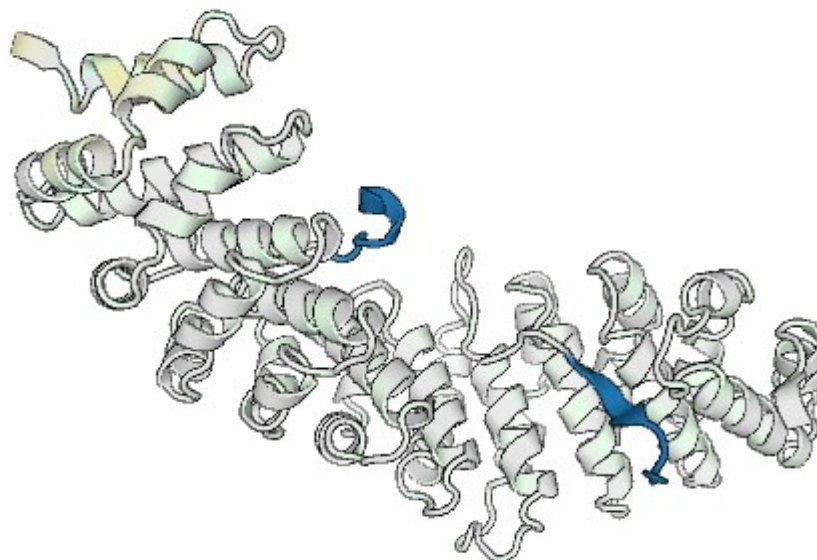
Obr. 12: Štruktúrne porovnanie génov HNF1A a HNF1B. Prevzaté a upravené z RYFFER 2009.

HNF1B i HNF1A rozoznávajú konsenzus sekvenciu 5'-GTTAATNATTAAC-3' a viažu sa na DNA buď vo forme homodiméru alebo heterodiméru. Po prvý raz boli popísané ich funkcie v pečeno-špecifickej regulácii génov pre albumín a transtretín – odtiaľ pochádza aj názov *hepatocyte nuclear faktor* (HORIKAWA *et al.* 1997), ale postupom času sa preukázalo, že pečeň nie je jediným miestom ich expsie. COFFINIER *et al.* (1999) skúmali miesta ich expsie v obličkách a prišli k záverom, že *HNF1A* sa exprimuje v proximálnych tubuloch, pričom expresia *HNF1B* bola zaznamenaná v zberných kanálikoch a v epiteliálnych bunkách všetkých segmentov nefrónu. Naopak, nebolo možné dokázať prítomnosť ani jedného TF v glomerule, intersticiálnych bunkách a v krvných cievach. Počas embryonálneho vývoja je *HNF1B* exprimovaný vo vetviacom sa uretrálnom pupeni, z ktorého sa ďalej vyvíja renálny zberný systém a močovod. Expresia *HNF1B* bola pozorovaná aj telieskach v tvare čiarky a písmena S, z ktorých sa ďalej vyvíja vlastný nefrón. Expresia *HNF1A* je obmedzená len na miesta neskorších S-tvarovaných teliesok a vyvíjajúceho sa proximálneho tubulu. Zaujímavým zistením bolo pozorovanie expsie *HNF1A* v mezonefrickom Wolffovom vývode (tvorí počiatok vas deferens a epididymis u mužov) a Müllerovom vývode, ktorý tvorí počiatok maternice, vajčkovodu a cervixu u žien (COFFINIER *et al.* 1999).

Funkcia *HNF1A* je v literatúre dobre popísaná, na rozdiel od funkcie *HNF1B*, ktorá zostáva doposiaľ celkom neobjasnená. *HNF1A* reguluje tkanivovo-špecifickú expresiu génov, ktoré kódujú transportné proteíny v proximálnom tubule. PONTOGLIO *et al.* (2000) vytvoril delečných mutantov u myši pre gén *HNF1A*, u ktorých pozoroval morfológicky normálny vývoj obličiek, avšak z dôvodu zníženej expsie *Sglt2* (gén pre sodíkovo-glukózový kotransportér) došlo u mutantov k rozvoju glykosúrie. Poruchy s reabsorpciou glukózy boli popísané aj u ľudí s *HNF1A* mutáciami. CHERET *et al.* (2002) použili na štúdium myši s deletovaným *HNF1A* a potvrdili, že znížená expresia *Npt1* a *Npt4* v proximálnom tubule vedie u mutantov k rozvoju fosfatúrie.

Úloha *HNF1B* je v obličkách, na rozdiel od *HNF1A*, popísaná len čiastočne. *HNF1B* rozoznáva tú istú konsenzus sekvenciu ako *HNF1A*, preto je možné predpokladať, že sa tiež účastní špecifickej génovej regulácie v obličkách. *HNF1B* sa viaže do veľkého žliabku DNA pomocou 2 DNA-viažúcich domén (obr. 13). BAI *et al.* (2002) identifikovali *HNF1B* väzobné miesta na promotore génov *Cdh16* kódujúcom proteín Ksp-kadherín a *Nkcc2*, ktorý kóduje kotransportéry pre sodíkové, draslíkové a chloridové ióny. Výskum skupiny GRESH *et al.* (2004) odhalil, že *HNF1B* priamo reguluje transkripciu viacerých génov (*UMOD*, *PKHD1* a *PKD2*) exprimovaných v tubulárnych epitelových bunkách. Všetky spomínané gény sú známe svojím spojením s cystickými chorobami obličiek: mutácie génu

UMOD sú kauzálnou príčinou MCKD, mutácie *PKD2* spôsobujú ADPKD a mutácie *PKHD1* zapríčiňujú ARPKD.



Obr. 13: DNA väzobné domény (vyznačené modrým zafarbením) a ich umiestnenie v 3D štruktúre proteínu HNF1B. Prevzaté z <https://swissmodel.expasy.org>.

Pri inaktivácii *HNF1B* génu bola pozorovaná zvýšená miera bunkovej proliferácie - výsledkom miestne špecifickej inaktivácie *HNF1B* v obličkách bola prítomnosť početných renálnych cýst a viacvrstvého dysplastického epitelového tkaniva v CT. U myší s miestne špecifickou pečennou inaktiváciou *HNF1B* bol pozorovaný výskyt dysplastického epitelového tkaniva ako v močovom mechúre, tak i v intrahepatických žľazových cestách. BLUTEAU *et al.* (2002) potvrdili úlohu *HNF1A* v regulácii bunkovej proliferácie – v bunkách pečenného adenómu a hepatocelulárnych karcinómov objavili prítomnosť bialelickej inaktivácie *HNF1A*. Toto zistenie viedlo k záverom, že *HNF1A* plní funkciu tumor supresorového génu. Vzhľadom na mieru homológie medzi týmito 2 TF, je možné predpokladať, že aj *HNF1B* sa bude uplatňovať v regulácii bunkového cyklu a zohrávať úlohu v patogenéze rakoviny obličiek/pečene. Tento predpoklad podporuje aj výskum skupiny REBOUISSOU *et al.* (2005), ktorej sa podarilo identifikovať v buniek chromofóbných renálnych karcinómov bialelickú inaktiváciu *HNF1B* génu.

Štúdie skupiny NAYLOR *et al.* (2013) odhalili ďalšiu funkciu HNF1B ako jedného z hlavných regulátorov v procese segmentácie nefrónu a formovania podocytov. Je možné predpokladať, že HNF1B riadi expresiu všetkých segmentovo-špecifických génov nefrónu, ale ku aktivácii

transkripcie jednotlivých génov dochádza exaktne selektívne vďaka jedinečnej kombinácii transkripčných kofaktorov, represorov alebo epigenetických modifikácií. Uvažovanie o HNF1B ako o majoritnom tubulárnom regulátore podporuje aj bioinformatické štúdie, ktoré identifikovali u početných tubulárnych génov potencionálne HNF1B viažúce miesta. Prevažná väčšina týchto génov bola lokalizovaná v proximálnej časti tubulov (BRUNSKILL *et al.* 2008). Štúdium role HNF1B vo vývoji obličiek je z experimentálneho hľadiska výzvou, pretože konštitutívna inaktivácia HNF1B vedie k embryonálnej letalite (BARBACCI *et al.* 1999).

2.6.1 HNF1B mutácie asociované s ochoreniami

V súčasnosti je v databáze Human Gene Mutation Database (HGMD) popísaných 203 mutácií, z ktorých najväčšiu skupinu tvorí 94 missense mutácií, druhou najčastejšou skupinou sú delécie veľkého rozsahu (41 mutácií) a delécie malého rozsahu (28). V menšej miere sa u tohto génu ďalej stretávame s mutáciami ovplyvňujúcimi zostrihové miesta, inzerciami malého/veľkého rozsahu a s regulačnými mutáciami (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>).

Pokiaľ sú mutácie prenášané z rodičov na potomstvo, uplatňujú sa princípy autozomálne dominantnej dedičnosti. Avšak v prípade *HNF1B* sa často vyskytujú spontánne vznikajúce mutácie, ktorým nepredchádza výskyt v rodinnej histórii a preto nie je možné ich predikovať. Až 50% de novo mutácií je pritom tvorených rozsiahlymi deléciami génu *HNF1B* (CLISSOLD *et al.* 2016). MDR génu *HNF1B* sa pohybuje okolo 30% - toto číslo môže byť ešte vyššie v prípade, že sa súbor pacientov obmedzí kritériami výberu (DECRAMER *et al.* 2007):

- len detskí pacienti
- len s určitými renálnymi komplikáciami (ako napr. cystické obličky či renálna hypodysplázia)
- len s včasným prejavom ochorenia.

Diabetes mellitus typu 5 u mladistvých

HNF1B bol prvotne popísaný ako kauzálny gén ochorenia diabetes mellitus typu 5 u mladistvých (MODY5). MODY5 je ojedinelá forma diabetes mellitus typu 2, ktorá je charakteristická autozomálne dominantnou dedičnosťou, včasným nástupom ochorenia, zníženou sekréciou inzulínu a absenciou obezity u pacientov. Toto ochorenie sa často spája s vrodenými abnormalitami obličiek a genitourinálneho traktu, pričom u pacientov môžeme pozorovať široké spektrum klinických príznakov. Typickými obličkovými abnormalitami

sú cysty prítomné v tubuloch; klinická manifestácia varíruje od jednoduchých cyst, cez multicystickú renálnu dyspláziu až po hypoplastickú glomerulocystózu. Postihnutie obličiek môže byť natoľko vážne, že vedie k zlyhaniu a nutnej transplantácii. Okrem prítomnosti cyst býva MODY5 fenotyp sprevádzaný ďalšími renálnymi poškodeniami, ako je napr. oligomeganefróniou, familiárna juvenilná hyperuremická nefropatia a renálna agenéza či hypoplázia. V súčasnosti je v HGMD popísaných 63 mutácií, ktoré sú spájané s fenotypom MODY 5.

Renálne komplikácie

Napriek tomu, že MODY5 je pomerne vzácnym dedičným ochorením, časom sa ukázalo, že *HNF1B* mutácie sú omnoho častejšou príčinou dedičných renálnych abnormalít, než sa pôvodne predpokladalo. Na základe záverov skupiny THOMAS *et al.* (2011) sú heterozygotne mutácie v géne *HNF1B* najčastejšou monogénnou príčinou vývojových porúch obličiek. S mutáciami génu *HNF1B* sa v literatúre spája široké klinické spektrum renálnych morfológických, štruktúrnych a funkčných abnormalít, ako sú napr. oblička v tvare podkovy, chýbajúca (alebo naopak zdvojená) oblička, dilatácia zberných kanálikov, bilaterálna hydronefróza, familiárna hypoplastická glomerulocystóza či hyperuremická nefropatia (CLISSOLD *et al.* 2016). Mutácie asociované s *HNF1B* sú tiež najčastejšou monogénnou príčinou dedičných anomálií obličiek a močového traktu (CAKUT). CAKUT tvorí 20 – 30% zo všetkých prenatálne identifikovaných renálnych komplikácií, pričom v 10 – 30% prípadov CAKUT podozrenia sa potvrdí *HNF1B* mutácia (RAAIJMAKERS *et al.* 2014). Väčšina novorodencov s *HNF1B* asociovaným postihnutím obličiek vykazuje prítomnosť renálnych cyst, pričom obličky bývajú vo väčšine prípadov normálnej veľkosti. Cysty sú početné a drobné, môžu sa nachádzať vo všetkých segmentoch nefrónu, prípadne aj v časti glomerulu (BOCKENHAUER a JAUREGUIBERRY 2015).

V súčasnosti je v HGMD registrovaných 58 popísaných mutácií, ktoré sa fenotypovo manifestujú renálnymi komplikáciami, napr. CAKUT - 34 mutácií, renálna hypodysplázia - 11 mutácií, multicystické ochorenia obličiek - 13 mutácií. Majoritná väčšina týchto mutácií bola popísaná počas posledných rokov, nakoľko v minulosti boli mutácie *HNF1B* primárne asociované s MODY 5 ochorením. V posledných rokoch však rapídne pribúdajú mutácie spojené s renálnym patologickým fenotypom.

Hypomagnezémia

HNF1B sa nepodieľa len na prenatálnej nefrogenéze, ale je implikovaný aj v postnatálnych fyziologických funkciách na udržiavanie správneho fungovanie tubulov. K tomuto zisteniu viedlo vedeckú skupinu ADALAT *et al.* (2009) pozorovanie, že častým klinickým prejavom ochorení asociovaných s *HNF1B* mutáciami je hypomagnezémia, pričom dochádza k stratám magnézia kvôli nedokonalnej funkcii obličiek. V literatúre sú s ochorením autozomálne dominantnej hypomagnezémie a hypokalcémie spájané mutácie génu *FXYD2*, ktorý kóduje γ podjednotku Na^+/K^+ ATPázy regulujúcej epitelový transport iónov. *FXYD2* sa exprimuje v obličkách a u človeka sú popísané 3 zosteriové formy (dôležité sú najmä 2 varianty: *FXYD2A* – produkt vznikajúci v prevažnej miere v proximálnych tubuloch; a *FXYD2B* – variant nachádzajúci sa prevažne v CT). ADALAT *et al.* (2009) prostredníctvom použitia luciferázovej *assay* zistili, že v intrónovej oblasti medzi 2 alternatívnymi iniciačnými exónmi *FXYD2* sa nachádza HNF1B viažuce miesto. Je teda možné predpokladať, že HNF1B slúži ako transkripčný aktivátor pre obe zosteriové formy. Tento predpoklad podporuje fakt, že hypokalcémia a hypomagnezémia sú výsledkom funkčného defektu v oblasti CT, v ktorom sa exprimuje zosteriová forma *FXYD2B*. Zistenie, že HNF1B priamo reguluje expresiu *FXYD2* proteínu kódujúceho γ podjednotku Na^+/K^+ ATPázy objasňuje funkčné spojenie hypomagnezémie s *HNF1B* asociovanými ochoreniami.

Neurokognitívne poruchy

HNF1B gén bol lokalizovaný na chromozóme 17q12 zaberajúc spolu s ďalšími 14 génmi úsek veľkosti približne 1,4 Mb genomickej DNA. Chromozomálna imbalancia tohto úseku je pomerne frekventovaným javom, často tu nachádzame segmentálne duplikácie a delécie väčšieho či menšieho rozsahu (MEFFORD *et al.* 2007). Veľkosť postihnutej chromozomálnej oblasti pri mikrolečnom syndróme a reciprokej mikroduplikácií sa pohybuje v rozmedzí od 1,06 do 2,46 Mb (NAGAMANI *et al.* 2010). Chromozomálne imbalancie úseku 17q12 sa často klinicky manifestujú mentálnou retardáciou, miernou formou autizmu, epilepsiou a schizofréniou. Dlhé obdobie boli 17q12 duplikácie spájané najmä s mentálnymi poruchami a na dokázanie spojitosti s abnormálnym renálnym fenotypom chýbali dôkazy. Až FAGUER *et al.* (2011) na skúmanej vzorke pacientov po prvý raz popísali spojenie 17q12 duplikácie s renálnymi abnormalitami (prítomnosť početných cýst, bilaterálna hypoplasticita, zvýšená echogenita) a s atréziou pažeráka. Naopak 17q12 delécie sa zvyčajne klinicky prejavujú vývojovými abnormalitami obličiek, ale až donedávna neboli asociované s mentálnym postihnutím a spomalením intelektuálneho vývoja. CLISSOLD *et al.* (2016)

dospeli k zaujímavému pozorovaniu – u pacientov so 17q12 deléciou sa signifikantne častejšie objavovali neurovývojové poruchy ako u pacientov s intragénovými mutáciami *HNF1B*. U týchto pacientov bola pozorovaná delécia úseku 17q12 s veľkosťou približne 1,3 Mb – v tejto oblasti sa nachádza spolu s *HNF1B* 15 génov. Presný molekulárny mechanizmus vzniku neurovývojových porúch nie je objasnený, ale jedno z možných vysvetlení je založené na haploinsuficienci jedného z 15 génov. *HNF1B* sa zúčastňuje vývoja zadného mozgu u myší a zebričiek a preto by mohol byť dobrým etiologickým génom podporujúcim teóriu haploinsuficiencie. Avšak rozdiely medzi výskytom psychického postihnutia u pacientov s intragénovými mutáciami a u pacientov s 17q12 deléciou jasne naznačujú, že haploinsuficiencia nie je vysvetlením molekulárneho mechanizmu neurovývojových porúch. Pravdepodobnejším vysvetlením sú komplexné interakcie medzi génmi nachádzajúcimi sa v deletovanej 17q12 oblasti a transkripčnými faktormi, čo umožňuje vznik neurovývojových porúch (CLISSOLD *et al.* 2016).

2.6.2 Regulácia *Pkhd1* promótoru

S cieľom preskúmať ako *HNF1B* mutácie vplyvajú na tvorbu cýst v obličkách, IGARASHI *et al.* (2005) vytvorili animálny model transgénnych myší u ktorých sledovali dominantne negatívnych *HNF1B* mutantov pod kontrolou špecifického promótoru v obličkách. U týchto myší boli po narodení pozorované početné cysty v obličkách, ktoré viedli k renálnemu zlyhaniu. Cysty boli prítomné v proximálnom/distálnom tubule, CT a v menšej miere sa nachádzali i v oblasti Bowmanovho vrečka. Dôležitým faktorom úspešnosti tohto experimentu bolo použitie tkanivovo-špecifického promótoru na reguláciu expície *HNF1B* mutantov - pri konštitutívnej inhibícii expície *HNF1B* totiž dochádzalo k embryonálnej letalite.

Pri porovnávaní expície rôznych génov spojených s cystickými obličkovými ochoreniami pozorovali IGARASHI *et al.* (2005) u transgénnych myší zníženú *Pkhd1* expíciu až o 70% (v porovnaní s wt kontrolami). Prekvapujúco expresia ADPKD génov *Pkd1* a *Pkd2* ostala voči kontrole nepozmenená. *Pkhd1* mRNA transkripty boli detekované v tubuloch bez cýst, avšak neboli prítomné v bunkách obklopujúcich cysty. Miesta expície *PKHD1* sa prekrývajú s miestami expície *HNF1B* – oba gény sú silne exprimované v renálnych CT s nižšou mierou expície v proximálnych a distálnych tubuloch. Pri vývoji metonefrosu sa oba gény exprimujú vo vetviacom sa močovodnom pupeni a vo vyvíjajúcich sa tubuloch. Miesta expície oboch génov však nie sú totožné len v obličkách, ale prekrývajú sa i v prípade pečene (oba gény

exprimované v intrahepatických i extrahepatických žľčových cestách), pankreasu a gastrointestinálneho traktu (NAGASAWA et al. 2002). Miestne špecifická *HNF1B* inaktívacia v pečeni má za následok malformácie žľčovodu, fenotypovo znak pripomínajúci žľčovodnú dysgenézu často prítomnú u ARPKD pacientov (COFFINIER et al. 2002). Prekrývajúca sa expresia oboch génov na početných miestach, nápadite podobný fenotyp asociovaný s mutáciami u oboch génov a znížená expresia *PKHD1* v prípade dominantne negatívnych HNF1B mutantov jasne naznačujú, že HNF1B by mohol priamo regulovať expresiu génu *PKHD1*. Štúdium *PKHD1* promótoru odhalilo prítomnosť evolučne konzervovaného HNF1B-viažúceho DNA miesta lokalizovaného 60 bp pred miestom iniciácie transkripcie (teda v polohe – 60 bp upstream). Toto DNA viažúce miesto sa zároveň nachádza blízko hypersenzitívneho miesta pre DNázu I, ktoré je lokalizované v proximálnej časti *PKHD1* promótoru (HIESBERGER et al. 2005). Je zaujímavé, že prítomnosť hypersenzitívneho miesta pre DNázu I bola preukázaná len v renálnych epitelových bunkách, nie však vo fibroblastoch – čo naznačuje, že pri expresii v renálnych epitelových bunkách sú potrebné lokálne alterácie chromatinovej štruktúry. DNA viažúce proteíny sa podieľajú na indukcii remodelácie chromatinu tým, že povolávajú enzýmy pozmeňujúce histón acetyláciu. Ako jeden z týchto enzýmov bol identifikovaný sodium butyrát, ktorý inhibuje histón deacetylázu a podporuje rozvoľnenie chromatinovej štruktúry, čím napomáha k aktivácii promótoru.

Výskum skupiny HIESBERGER *et al.* (2005) demonštroval esenciálnosť C-terminálnej domény HNF1B pri naviazaní koaktivátorov potrebných na správnu iniciáciu transkripcie *PKHD1*. Pokusy s použitím delečného mutantu HNF-1B Δ C s deletovanou oblasťou 236 AMK z C terminálneho konca odhalili, že aj napriek delécií veľkej časti C terminálnej domény, HNF1B je stále schopný viazať sa na promótor *PKHD1*. Schopnosť naviazať sa na HNF1B viažúce miesto na promótoře *PKHD1* ostala teda neovplyvnená, HNF1B sa viazal vo forme homodiméru alebo heterodiméru s wt HNF1B. Aj napriek úspešnému naviazaniu však dochádzalo k blokácii transkripcie. Aktivačná oblasť C terminálnej domény HNF1B sa nachádza medzi 352 – 483 AMK (HIESBERGER et al. 2005), pričom je dôležitá najmä integrita oblasti 388 – 471 AMK (pri delácii tejto oblasti dochádzalo k redukcii aktivácie promótoru až o 90%). Aktivačná doména je lokalizovaná približne v strede časti C terminálnej domény, na rozdiel od HNF1A, u ktorého boli identifikované 2 aktivačné domény nachádzajúce sa na C terminálnom konci.

Aktivácia *PKHD1* promótoru je ďalej stimulovaná cAMP-viažúcim proteínom (CBP) a p300/CBP-asociovaným faktorom (P/CAF). Tieto elementy vystupujú ako transkripčné koaktivátory a disponujú vlastnou histón acetyl transferázovou (HAT) aktivitou. CBP a P/CAF priamo interagujú s C terminálnou doménou, a teda jej deléciou dochádza k znemožneniu tejto interakcie (IGARASHI et al. 2005). Interakcia vyžaduje prítomnosť HNF1B vo forme diméru, či ako homodimér alebo ako heterodimér. Ak však vystupuje HNF1B ako monomér, k interakcii nedochádza. Jedno z možných vysvetlení je, že C terminálna doména HNF1B interaguje s HAT len vo forme diméru (s podobnými prípadmi sa stretávame u natívnych proteínov či pri fúzovanom Gal4 proteíne, kde monomér nie je schopný interakcie).

Na základe vedeckých skupín HIESBERGER *et al.* (2005) a IGARASHI *et al.* (2005) môžeme formulovať záver, že z hľadiska regulácie *PKHD1* promótoru sú esenciálnymi faktormi u HNF1B:

- prítomnosť C terminálnej domény
- správna integrita v oblasti 388 – 471 AMK
- dimerizácia proteínu

Pokiaľ je čo i len jeden faktor narušený, dochádza len k naviazaniu HNF1B na DNA viažúce miesto v proximálnej časti *PKHD1* promótru, avšak nedochádza k aktivácií transkripcie.

V *in vivo* podmienkach tkanivovo-špecifická expresia HNF-1B Δ C v obličkách indukovala fenotypové prejavy podobné tým, ktoré podmieňuje tkanivovo-špecifická inaktivácia *HNF1B*. Expresia *PKHD1* bola inhibovaná v cystických zberných kanálikoch, ale v proximálnych tubuloch bola expresia nepozmenená. V oboch častiach nefrónového segmentu však dochádzalo k expresii HNF-1B Δ C delečných mutantov. Nakoľko proximálna časť tubulov je miestom expresie *HNF1A*, je možné predpokladať, že tu dochádza ku kompenzácií straty funkcie HNF1B prostredníctvom HNF1A. Tento kompenzačný mechanizmus môže slúžiť bunke na ochranu pred represiou *PKHD1* expresie, čo v konečnom dôsledku ochráni bunku pred tvorbou cýst (HIESBERGER et al. 2005).

3. Ciele práce

Prvým cieľom mojej diplomovej práce je vytvoriť prehľad vyšetrení súboru ARPKD suspektných pacientov, u ktorých boli analyzované zároveň gény *PKDHI* a *HNF1B*, v období od roku 2012 do roku 2015.

U týchto pacientov bol prvotne analyzovaný gén *PKDHI*, ktorý je v literatúre popísaný ako gén zapríčiňujúci ARPKD, pričom sa nepodarilo identifikovať prítomnosť dvoch mutácií, ktoré sú potrebné na potvrdenie diagnózy. Preto som u týchto pacientov ďalej sekvenčne analyzovala gén *HNF1B*. Mutácie tohto génu sú v literatúre spájané s napodobňovaním renálneho fenotypu ARPKD. Preto je možné v prípade negatívneho výsledku mutačného screeningu *PKDHI* predpokladať, že mutácie zodpovedné za renálne komplikácie nájdeme v géne *HNF1B*.

Druhým cieľom práce bolo zavedenie a optimalizácia metódy diagnostikovania génu *HNF1B* na molekulárnej úrovni. Vo svojej práci som sa zamerala na popísanie limitov použitých metód a snahu navrhnúť efektívny prístup z hľadiska molekulárnej diagnostiky tohto génu.

Ako tretí cieľ som si stanovila preskúmať genotypovo-fenotypovú koreláciu medzi identifikovanými mutáciami v géne *HNF1B*, klinickou manifestáciou a vekom pozitívnych pacientov. Mutácie asociované s génom *HNF1B* sú najčastejším dôvodom obličkových malformácií u detí (CLISSFOLD *et al.* 2016) a tvoria najčastejšiu príčinu prenatálne detekovaných hyperechogenických obličiek, ktoré môžu byť zväčšené, ale i normálnej veľkosti (MADARIAGA *et al.* 2013). Podľa záverov RAAIJMAKERS *et al.* (2014) sú *HNF1B* mutácie príčinou 1% - 30% prenatálne diagnostikovaných CAKUT prípadov. CLISSOLD *et al.* (2016) identifikovali, že až 50% mutácií je tvorených rozsiahlymi deléciami génu *HNF1B* (CLISSOLD *et al.* 2016). Na základe týchto informácií som formulovala svoju hypotézu nasledovne: v genotypovo-fenotypovej korelácii detekovaných *HNF1B* mutácií bude zohrávať dôležitú úlohu vek pacienta, v ktorom sa prejavili renálne komplikácie. Predpokladám, že vo väčšine prípadov sa *HNF1B* mutácie budú nachádzať u detských pacientov a pacientov s prenatálne detekovanými renálnymi komplikáciami. Predpokladám, že 50% z detekovaných mutácií budú tvoriť delécie väčšieho rozsahu.

4. Materiál a metódy

4.1. Súbor pacientov

Na výskumnú časť diplomovej práce som mala k dispozícii súbor 28 pacientov, ktorí splnili stanovené klinické ARPKD kritéria: 1) typické znaky postihnutia obličiek pozorovateľné ultrazvukom (zväčšené hyperechogenické obličky s bilaterálne zhoršenou kortiko-medulárnou diferenciáciou) 2) typické postihnutie pečene (CHF, malformácie žlčovodu) 3) normálny nález pri vyšetrení ultrazvukom u oboch rodičov (v súlade s princípom autozomálne recesívnej dedičnosti).

Vzorky pacientov boli získavané priebežne počas rokov 2012 – 2015 na nefrologickom oddelení Všeobecnej fakultnej nemocnice v Prahe, Fakultnej nemocnice v Motole a ostatných spolupracujúcich pracovísk. V súbore pacientov sa nachádzali 3 plody, z toho jeden plod pochádzal z umelo prerušeného tehotenstva. Vekové rozmedzie žijúcich pacientov sa pohybovalo od 2 mesiacov až po 50 rokov (v niektorých prípadoch som nemala k dispozícii presné vekové údaje od klinických lekárov). V súbore sa nachádzali okrem ARPKD suspektných pacientov aj zdraví rodinní príslušníci, ktorých analýza bola dôležitá z hľadiska rodinnej anamnézy. V súbore pacientov sa nachádzali aj zdravé páry, ktoré plánovali rodičovstvo, ale v predošlých tehotenstvách sa u plodu vyskytli ARPKD príznaky.

Od všetkých pacientov (prípadne ich zákonných zástupcov) zaradených do štúdie bol vopred zajistený písomný informovaný súhlas s molekulárne genetickým vyšetrením v rámci aktuálneho prebiehajúceho súhlasu. Pri práci so vzorkami som dbala na zachovanie anonymity vyšetrovaných subjektov. Zoznam pacientov je zhrnutý v tabuľke č. 1 spolu s uvedeným pohlavím, vekom prejavu príznakov ARPKD a výsledkom analýzy génu *PKHD1*. Analýzu génu *PKHD1* spracovala moja konzultantka Mgr. Lena Obeidová a s jej povolením som tieto výsledky použila ako východzí bod mojich analýz.

Pacient	Pohlavie	Vek manifestácie ARPKD	Klinické prejavy	PKHD1
1744/12	Ž	2,5	neurčená forma PKD	x
1608/12	Ž	4	neurčená forma PKD	x
640/15	Ž	po narodení	bilaterálne zväčšené obličky s mikrocytami	G2705VfxX11 52861G

716/15	Ž	prenatálne	prenatálna forma ADPKD	x
943/12	Ž	12	chronické zlyhanie obličiek, transplantácia	x
886/12	M	v detskom veku	N	1307T
1360/12	Ž	prenatálne	prenatálne mikrocystická degenerácia oboch obličiek, RCAD	x
160/12	Ž	prenatálne	podozrenie na letálny kongenitálny kontraktúrny syndrom	x
889/12	M	10	chronické zlyhanie obličiek, transplantácia	x
446/13	plod	UUT	ARPKD suspektný plod	Q905X
1630/13	M	N	zdravý otec	N
1340/13	M	perinatálne	N	x
918/15	plod	prenatálne	ARPKD suspektný plod	x
471/15	M	N	zdravý otec	R92Q
467/15	Ž	N	zdravá matka	I417V
1222/15	M	50	renálne cysty	x
885/12	M	perinatálne	N	x
884/12	M	perinatálne	N	x
701/14	M	perinatálne	N	x
605/14	M	2 mesiace	N	T36M
140/15	plod	prenatálne	afunkčné polycystické obličky (21. týždeň), ARPKD suspektné	x
1439/15	M	prenatálne	N	x
021/16	M	perinatálne	N	c. 2408-2A>G p. Cys3472Arg
094/16	M	perinatálne	N	x
1178/12	Ž	perinatálne	N	x
887/12	M	perinatálne	N	Thr579Met
797/13	M	po narodení	N	x
1440/15	Ž	N	zdravá matka 797/15	N

Tab. 1: Zoznam pacientov. Pohlavie: M (muž), Ž (žena), UUT (umelo ukončené tehotenstvo). U niektorých pacientov nie sú požadované informácie k dispozícií (N).

4.2 Metódy

K analýze génu *HNF1B* som používala metódu Next Generation Sequencing (NGS) – pyrosekvenovanie (454 Life Sciences) - pričom nájdené mutácie som následne overila priamou sekvenáciou. Väčšinu vzoriek som analyzovala použitím reakcie PCR, prostredníctvom sekvenačnej reakcie som získala produkt na sekvenovanie, ktorý som prečistila a následne bol sekvenovaný na princípe Sangerovho sekvenačného princípu. Na analýzu rozsiahlejších delécií/duplikácií génu *HNF1B* som používala metódu multiplexovej amplifikácie závislej na ligácii sond (MLPA). Nájdené mutácie som hľadala v databáze HGMD a ich možný patogénny účinok som skúmala s použitím predikčných programov.

4.2.1 Získavanie vzoriek DNA

Izolácia genómovej DNA bola uskutočnená na automatizovanej linke QIAcube (Qiagen) s použitím kitu QIAamp DNA mini kit (250). DNA materiál bol získaný z lymfocytov periférnej krvi pacientov, výsledná koncentrácia DNA bola približne 30 µg/ml. V prípade izolácie z amniocytov plodovej vody bola izolácia manuálna s použitím kitu QIAamp DNA mini kit (250) a výsledná koncentrácia DNA sa pohybovala okolo 15-20 µg/ml. Prípravu DNA vzoriek zabezpečili pracovníci laboratória molekulárnej diagnostiky Ústavu biológie a lekárskej genetiky 1. LF a VFN.

4.2.2 Príprava génovej knižnice

Na prípravu génovej knižnice som používala amplifikačnú PCR reakciu so špecificky navrhnutými primermi (gén *HNF1B* pozostáva z 9 exónov; sekvencie použitých primerov uvádzam v tab. 2 spolu s rozsahom bp produktov, ktoré som použitím takto nadizajnovaných primerov získala). Primery boli nadizajnované tak, aby výsledný produkt pokrýval celý exón plus v priemere 50 bp z intrónovej oblasti, downstream i upstream. K *HNF1B* komplementárnym sekvenciám bola pridaná sekvencia primeru M13, vďaka čomu vznikali PCR produkty so sekvenciou M13 na koncoch fragmentov. Používala som primery vyrobené firmou GENERI BIOTECH. Reakčná zmes pozostávala z 9 µl PPP Master Mixu (Top-Bio), 0,6 µl oligonukleotidov (0,3 µl forward + 0,3 µl reverse, koncentrácia 0,1 mM) a 0,4 µl DNA materiálu. Amplifikácia prebiehala na prístroji MyCycler (Bio-Rad Laboratories) s použitím

programu: denaturácia 95°C/5 min; 35 cyklov: 94°C/30 s, 58°C/30 s, 72°C/30 s; záverečná polymerizácia 72°C/7 min.

Exón	Primer: Forward (5'- 3') / Reverse (3'- 5')	Rozsah [pb]
1	F: TGT AAA ACG ACG GCC AGT GGG TGG AGG GGT TCC TGG AT R: CAG GAA ACA GCT ATG ACC CGG GCG CAG TGT CAC TCA GG	528
2	F: TGT AAA ACG ACG GCC AGT CTC CCA CTA GTA CCC TAA CC R: CAG GAA ACA GCT ATG ACC GAG AGG GCA AAG GTC ACT TCA G	291
3	F: TGT AAA ACG ACG GCC AGT AGT GAA GGC TAC AGA CCC TAT C R: CAG GAA ACA GCT ATG ACC TTC CTG GGT CTG TGT ACT TGC	365
4	F: TGT AAA ACG ACG GCC AGT TTG TGT TTT TGG CCA AGC ACC A R: CAG GAA ACA GCT ATG ACC AAC CAG ATA AGA TCC GTG GC	381
5	F: TGT AAA ACG ACG GCC AGT TGC CGA GTC ATT GTT CCA GG R: CAG GAA ACA GCT ATG ACC CCT CTT ATC TTA TCA GCT CCA G	276
6	F: TGT AAA ACG ACG GCC AGT CTG TCT TTT GTG GTC CAA GTC C R: CAG GAA ACA GCT ATG ACC GAG TTT GAA GGA GAC CTA CAG	288
7	F: TGT AAA ACG ACG GCC AGT ATC CAC CTC TCC TTA TCC CAG R: CAG GAA ACA GCT ATG ACC ACT TCC GAG AAA GTT CAG ACC	341
8	F: TGT AAA ACG ACG GCC AGT TTT GCC TGT GTA TGC ACC TTG R: CAG GAA ACA GCT ATG ACC GCC GAG TCC ATG CTT GCC AC	257
9	F: TGT AAA ACG ACG GCC AGT CTT TGC TGG TTG AGT TGG GC R: CAG GAA ACA GCT ATG ACC TTC CAT GAC AGC TGC CCA CAG	208

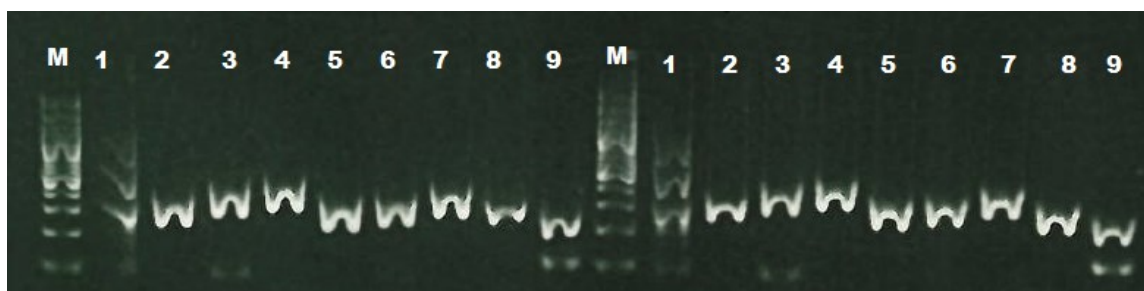
Tab. 2: Zoznam navrhnutých primerov pre gén *HNF1B* s vyznačenou časťou pridaného M13 primeru, (v primeroch pre 1. exón **vyznačené zvýraznením**).

Kontrolnú elektroforézu produktov amplifikácie som robila na 2% agarózovom géle s použitím bromfenolovej modrej farbičky, pri konštantom napätí 150V po dobu približne 20 minút. Ako interkalačné činidlo som používala GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X (Biotium), ktoré som pridávala priamo do gélu. Ako marker som používala GeneRuler 100bp DNA (v koncentrácií 0,5 µg/µl; od firmy Fermentas). Elektroforéza prebiehala s použitím prístroja

PowerPac Basic (Bio-Rad Laboratories). Produkty PCR som detekovala použitím UV transiluminátoru (LKB 2011 MacroVue Transilluminator).

Optimalizácia podmienok PCR reakcie

Pri použití anelačnej teploty 58°C som na kontrolnej elektroforéze pozorovala nešpecifické produkty v exóne 1, 3 a 9 (obr. 14).



Obr. 14: Vizualizácia PCR produktov u pacientov 1744/12 a 1608/12. Pri exóne 1, 3 a 9 môžeme v oboch prípadoch pozorovať nešpecifické produkty. M = marker

U týchto exónov som musela optimalizovať podmienky reakcie tak, aby som znížila výskyt nešpecifických produktov na minimum. Nakoľko som používala vopred pripravený PPP mix od výrobcu, možnosti optimalizácie boli obmedzené – nemohla som pozmeniť koncentráciu Mg^{2+} iónov a tým ani ovplyvniť hodnotu pH reakcie. Preto som experimentovala s meniacimi sa teplotami anelácie (58°C - 62°C) a s pridaním 0,5 μ l DMSO do reakčnej zmesi (obr.15).



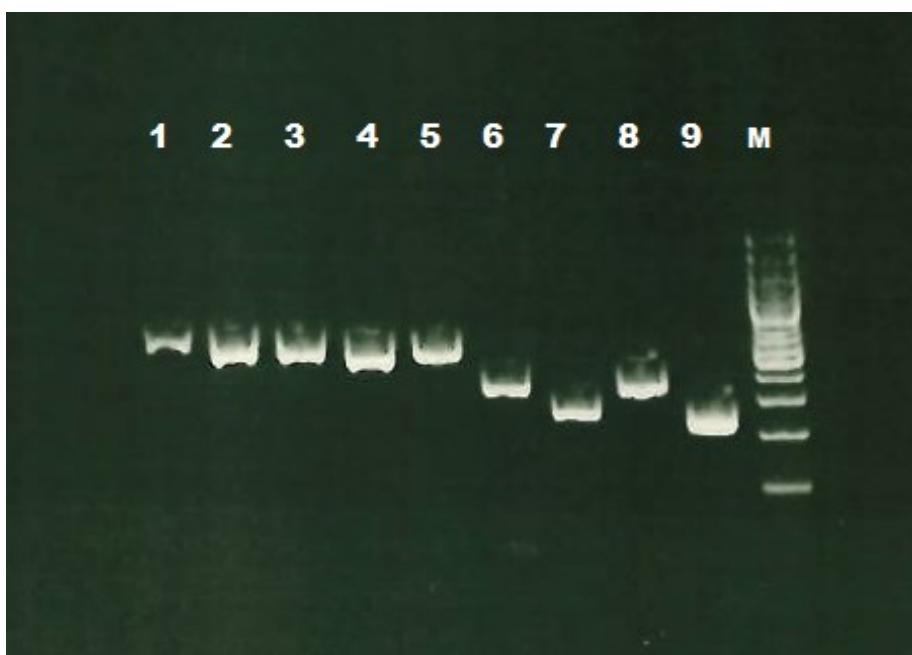
Obr. 15: Elektroforetický záznam optimalizácie exónov 1, 3 a 9. V jednotlivých dráhach nasledovné: M=marker, 1 - ex. 1, 58°C bez DMSO, 2 – ex. 1, 58°C s DMSO, 3 – ex. 1, 60°C s DMSO, 4 – ex. 1, 60°C s DMSO, 5 – ex. 3, 58°C bez DMSO, 6 – ex. 3, 58°C s DMSO, 7 – ex. 3, 60°C bez DMSO, 8 –ex. 3, 60°C s DMSO, 9 – ex. 9, 58°C bez DMSO, 10 – ex. 9, 58°C s DMSO, 11 – ex. 9, 60°C bez DMSO, 12 – ex. 9, 60°C s DMSO, od dráhy 13 – opakovanie poradia od dráhy 1 (pre dvojité kontrolu)

Optimálny výsledok som dosiahla pri podmienkach reakcie zhrnutých v tab. č. 3.

Exón	Anelačná teplota	Pridanie 0,5 μ l DMSO
1, 3, 9	60°C	áno
2, 4, 5, 6, 7, 8	58°C	nie

Tab. 3: Výsledné optimálne podmienky PCR reakcie.

Pri použití týchto podmienok reakcií boli výsledné PCR produkty relatívne čisté bez prítomnosti nešpecifických produktov (obr.16), a teda boli vhodné na použitie do ďalších krokov mutačnej analýzy.



Obr. 16: Elektroforetický záznam produktov (1.-9. exón HNF1B) po zavedení optimálnych podmienok reakcie pre jednotlivé exóny. M= marker

4.2.3 Sekvenačná PCR reakcia

Sekvenačnú reakciu som pripravovala do objemu 10 μ l (9,7 μ l reakčnej zmesi + 0,3 μ l produktu PCR reakcie). Pri PCR produktoch so slabším signálom na kontrolnej elektroforéze som pridávala do reakcie 0,5 – 1 μ l. Reakčná zmes pozostávala z 1 μ l reagentu BidDye terminator (Thermo Fisher Scientific), 2 μ l tlmivého roztoku (Thermo Fisher Scientific), 6,5 μ l sterilnej vody (pri všetkých experimentoch som pracovala so sterilnou vodou Braun Medical alebo s vodou, ktorá bola priložená v balení konkrétneho používaného kitu) a 0,2 μ l primeru M13 s koncentráciou 100 pmol/ μ l (Generi Biotech). V tabuľke č. 4 uvádzam

dizajn primerov použitých pre túto reakciu. Pri príprave génovej knižnice Sekvenačná reakcia prebiehala na prístroji MyCycler (Bio-Rad Laboratories) s použitím programu: denaturácia 98°C/5 min; následne 25 cyklov 96°C/20 s, 50°C/10 s 60°C/4 min; záverečná polymerizácia 60°C/2 min.

M13 Forward (5'- 3') primer: TGT AAA ACG ACG GCC AGT
M13 Reverse (3'- 5') primer: CAG GAA ACA GCT ATG ACC

Tab. 4: Forward a reverse M13 primer použitý v sekvenačnej PCR reakcii.

4.2.4 Prečisťovanie produktu pred sekvenovaním

Pre lepšie výsledky pri samotnej sekvenácii som produkt sekvenačnej PCR reakcie vždy prečisťovala nasledovným spôsobom. K 10 µl PCR produktu som pridala 26 µl zmesi octanu sodného a 96% etanolu (1 µl NaOAc + 25 µl etanolu). Po krátkom premiešaní som nechala zmes odstáť pri laboratórnej teplote 15 minút. Zmes som dala stočiť do centrifugy na 30 min/14 500 rpm. Odstriekla som supernatant (produkt čistenia ostal v pelete), pridala 60 µl 70% etanolu, dala stočiť do centrifugy (10 min/14 500 rpm) a neusadený obsah skúmavky opäť odstránila. Ešte raz som pridala 60 µl 70% etanolu a opakovala predchádzajúci krok. Po odstriednutí neusadeného supernatantu zo skúmavky som nechala pelety dôkladne vysušiť pri teplote 40°C na termobloku Dry Bath Incubator (Major Science). Následne som pridala 30 µl formamidu a pri teplote 96°C som nechala zmes denaturovať po dobu 5 min. Ihneď po denaturácii som vzorky prudko schladila v chladiacom stojane a uschovala do mraziaceho boxu, kde ostali uschované až do sekvenácie.

4.2.5 Sekvenácia

Sekvenáciu vzoriek realizovali pracovníci laboratória molekulárnej diagnostiky Ústavu biológie a lekárskej genetiky 1. LF a VFN s použitím prístroja ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Life Technologies) metódou Dye-terminator sequencing.

4.2.6 MLPA

Na detekciu *HNF1B* delécií a duplikácií som používala metódu MLPA (MRC-Holland). Táto metóda je založená na kvantifikácii počtu opakovaní prostredníctvom amplifikácie špecifických sond. Každá sonda sa skladá z 2 oligonukleotidov, ktoré hybridizujú k cieľovým sekvenciám a sú ligované do jednej sondy. V ďalšom kroku sú sondy amplifikované PCR reakciou s použitím rovnakého páru primerov. Fluorescenčne značený PCR primer umožňuje vizualizáciu produktov počas separácie fragmentov (separácia prebieha na princípe kapilárnej elektroforézy). Pre analýzu génu *HNF1B* som použila kit SALSA MLPA probemix P241-D2 MODY mix 1, ktorý obsahuje 42 prôb pre 4 gény: *GCK*, *HNF1A*, *HNF1B* a *HNF4A*. Usporiadanie prôb pre *HNF1B* gén uvádzam na obr. 17. Pri metóde MLPA som používala prístroj MyCycler (Bio-Rad Laboratories), kde som si vytvorila potrebné teplotné programy.

Length (nt)	SALSA MLPA probe	HNF1B Exon	Ligation site NM_000458.3	Partial sequence (24 nt adjacent to ligation site)	Distance to next probe
		<i>start codon</i>	<i>195-197 (exon 1)</i>		
484	16912-L18619	Exon 1	199-200	TTGGAAAATGGT-GTCCAAGCTCAC	5.3 kb
160	07699-L07458	Exon 2	591-592	TGCAGCAACACA-ACATCCCCCAGA	5.9 kb
386	16909-L21376	Exon 3	876-877	CTGAGCCCACCA-ACAAGAAGATGC	1.9 kb
364	07701-L07460	Exon 4	1070-1069 reverse	ACACGGACCTCA-GTGACCAAGTTG	0.2 kb
301	16908-L19837	Exon 4	1231-1230 reverse	TACCTGACAGCT-TGTTTGGAGGAG	21.1 kb
238	16906-L19835	Exon 5	20 nt after exon 5 reverse	CTCCAGAGCGAC-AATGGCCCAGGT	5.5 kb
463	07704-L07463	Exon 6	1418-1419	GTCTCAGGAGGA-GGTTTGCCCCCA	4.0 kb
136	09858-L21367	Exon 7	1653-1652 reverse	GCTCTGCTGCAT-GAGGGGCTGCTG	2.0 kb
202	08298-L09334	Exon 8	1817-1818	AGCAGCATCAGT-ACACTACCAAC	11.9 kb
436	16910-L19839	Exon 9	2007-2006 reverse	GAGGTGCCAGCA-GGACGTCCGTCA	
		<i>stop codon</i>	<i>1866-1868 (exon 9)</i>		

Obr. 17: Usporiadanie SALSA MLPA prôb pre sekvenciu génu *HNF1B* (prevzaté z https://www.mlpa.com/WebForms/WebFormDBData.aspx?FileOID=_WOidHfrq_-w)

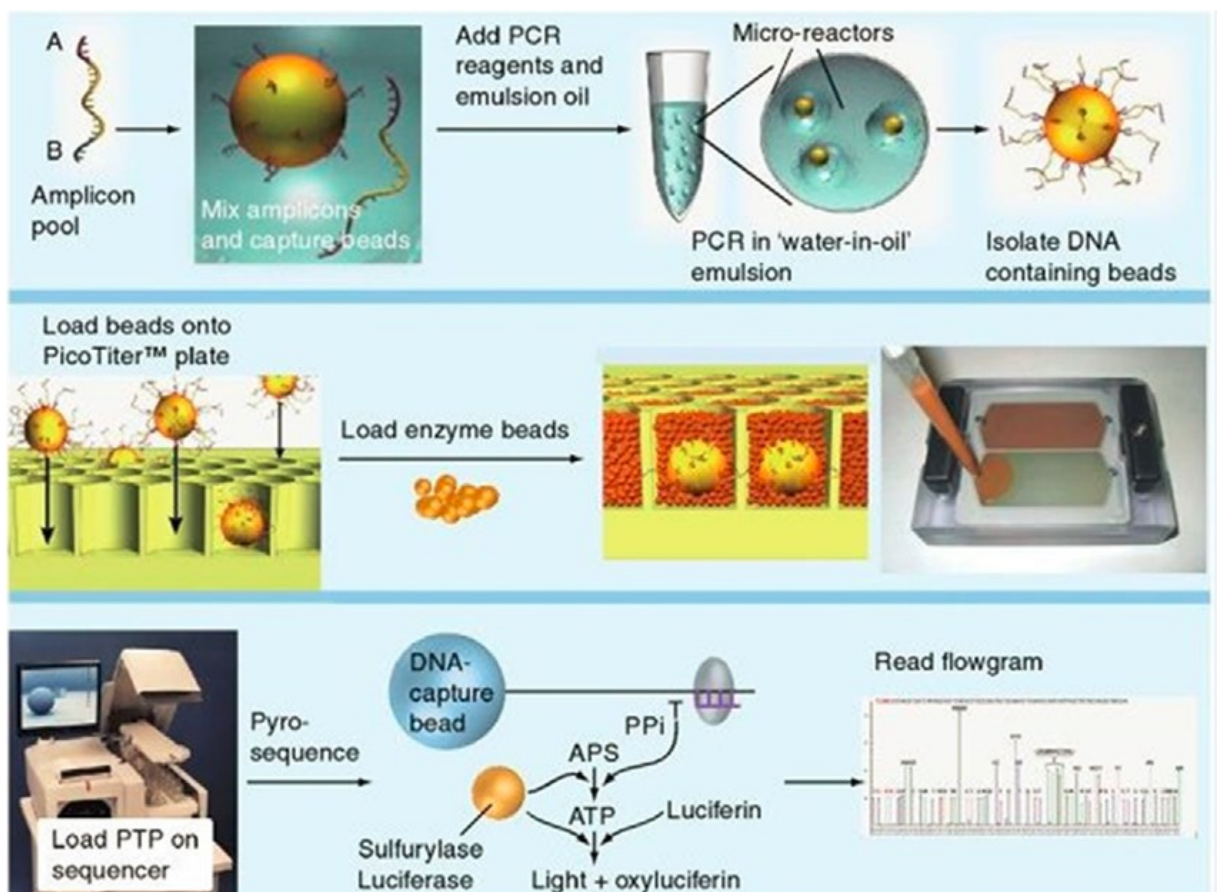
V prvom kroku som denaturovala 1,5 µl DNA + 1 µl vody (riedenie som robila tak, aby som vo výsledku získala 50-200 ng DNA) pri teplote 98°C/5 min, nechala klesnúť teplotu na 25°C a ku vzorkám pridala 0,75 µl MLPA buffer + 0,75 µl SALSA probe mix. Následne som nechala próby hybridizovať pri teplote 60°C/16 hod. K vzorkám s prihybridizovanými prôbami som pri teplote 54°C pridala 16 µl ligačnej zmesi (12,5 µl vody + 1,5 µl Ligase-65 buffer A + 1,5 µl Ligase-65 buffer B + 0,5 µl Ligase-65) a pri teplote 54°C nechala ligovať po dobu 15 min.

Druhým krokom bola PCR reakcia, ktorá prebiehala s použitím programu: denaturácia 98°C/5 min; 35 cyklov: 95°C/30 s, 60°C/30 s, 72°C/1 min; záverečná polymerizácia 72°C/20 min. Reakčná zmes pozostávala z 3,75 µl vody + 1 µl SALSA primer

mix + 0,25 μ l SALSA Polymerase a pridávala som ju priamo do skúmaviek k vzorkám s ligovanými sondami. Po skončení PCR reakcie boli vzorky analyzované prostredníctvom fragmentačnej analýzy s využitím genetického analyzátoru ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Life Technologies). Túto časť experimentu realizovali pracovníci laboratória molekulárnej diagnostiky Ústavu biológie a lekárskej genetiky 1. LF a VFN. Výsledky analýzy som vyhodnocovala s použitím zakúpenej verzie programu Coffalyser.Net (MRC-Holland).

4.2.7 Next Generation Sequencing – pyrosekvenovanie

Na analýzu bodových mutácií som používala metódu pyrosekvenovania 454 Life Sciences (obr. 18). Postupovala som podľa návodu Sequencing Method Manual, GS Junior Titanium Series (January 2013, 454 Sequencing, Roche).



Obr. 18: Postup a následnosť jednotlivých krokov pyrosekvenovania. Prevzaté a upravené z GEGA a KOZAL 2011.

4.2.7.1 Príprava génovej knižnice

Pri príprave génovej knižnice som postupovala rovnako ako v kapitole 4.2.2. Amplifikácia prebiehala na prístroji MyCycler (Bio-Rad Laboratories) s použitím programu: denaturácia 95°C/5 min; 35 cyklov: 94°C/30 s, 58°C/30 s, 72°C/30 s; záverečná polymerizácia 72°C/7 min.

4.2.7.2 Inkorporácia MID značiek

Každému pacientovi bola priradená špecifická MID značka, ktorá umožnila v ďalších krokoch zmiešať všetkých pacientov do jednej skúmavky a rozpoznanie výsledkov sekvenácie. Inkorporácia prebiehala formou PCR reakcie s použitím nadizajnovaných primerov (Generi Biotech) uvedených v tab. 5. Primery boli skonštruované tak, aby obsahovali sekvencie komplementárne k M13 primeru, špecifickú MID značku a adaptory A a B. Adaptory A a B boli tvorené krátkymi oligonukleotidmi, ktoré sa pripájali k PCR produktom z oboch strán. Adaptor A slúži na prichytenie DNA k magnetickej guľičke. Adaptor B je komplementárny k primeru, ktorý slúži na iniciáciu DNA syntézy počas sekvenovania.

Značka	Sekvencia primeru (5'-3')
MID1	F: CGT ATC GCC TCC CTC GCG CCA TCA GAC GAG TGC GTI GTA AAA CGA CGG CCA GT R: CTA TGC GCC TTG CCA GCC CGC TCA GAC GAG TGC GTC AGG AAA CAG CTA TGA CC
MID2	F: CGT ATC GCC TCC CTC GCG CCA TCA GAC GCT CGA CAT GTA AAA CGA CGG CCA GT R: CTA TGC GCC TTG CCA GCC CGC TCA GAC GCT CGA CAT AGG AAA CAG CTA TGA CC
MID3	F: CGT ATC GCC TCC CTC GCG CCA TCA GAG ACG CAC TCT GTA AAA CGA CGG CCA GT R: CTA TGC GCC TTG CCA GCC CGC TCA GAG ACG CAC TCT AGG AAA CAG CTA TGA CC
MID4	F: CGT ATC GCC TCC CTC GCG CCA TCA GAG CAC TGT AGT GTA AAA CGA CGG CCA GT R: CTA TGC GCC TTG CCA GCC CGC TCA GAC CAC TGT AGT AGG AAA CAG CTA TGA CC

Tab. 5: Dizajn primerov použitých na PCR reakciu za účelom inkorporácie špecifických značiek pacientom a pridanie adaptorov k produktom. Každý primer sa skladal z sekvencie komplementárnej k M13 primeru (zvýraznené), špecifickej značky MID (zvýraznené) a adaptoru A (forward) a B (reverse).

Na reakciu som použila 0,25 μl PCR produktu (z kroku 4.2.7.2) a 243 μl vody, čím som získala 972x zriedený produkt. K takto nariadenej DNA som pridala 29 μl reakčnej zmesi: 22,04 μl vody + 3 μl tlmivého roztoku (Thermo Fisher scientific) + 2,4 μl iónov MgCl_2 (Thermo Fisher Scientific) + 0,6 μl dNTP (Promega) + 0,72 μl Taq polymerázy (Thermo Fisher Scientific) + 0,12 μl MID značiek s koncentráciou 50 μM . Použila som prístroj MyCycler (Bio-Rad Laboratories) a nasledovný program: počiatočná denaturácia 95°C/5 min; následne 35 cyklov 95°C/30 s, 65°C/30 s, 72°C/1 min; záverečná polymerizácia 72°C/7 min.

Výsledné produkty som skontrolovala elektroforézou, empiricky som zhodnotila intenzitu signálu jednotlivých exónov a na základe zhodnotenia som si stanovila aký objem jednotlivých produktov (príklad uvádzam v tab. 7) budem dávať do nasledujúceho kroku miešania génovej knižnice. Z exónov kratšej dĺžky som pridávala do génovej knižnice menší objem, naopak z exónov, ktoré boli dlhšieho rozsahu som pridávala väčší objem.

4.2.7.3 Miešanie a prečisťovanie knižnice

V tomto kroku bolo dôležité odstrániť zbytky tlmiacich roztokov z PCR reakcie a nedoamplifikované reťazce DNA. Na začiatok som si pripravila podľa tab. 6 génovú knižnicu zmiešaním PCR produktov daného pacienta (s rovnakou MID značkou). Týmto som získala jednu skúmavku, v ktorej boli zmiešané všetky exóny génu HNF1B jedného pacienta.

Exón	Koľko μl som brala na zmiešanie génovej knižnice
1	5 μl
2	3 μl
3, 4, 5	4 μl
6,7,8,9	4 μl

Tab. 6: Príklad objemov jednotlivých exónov, ktoré som používala pri miešaní génovej knižnice daného pacienta.

Následne som knižnice jednotlivých pacientov prečisťovala s použitím kitu Agentcourt® AmPure® XP (Beckman Coulter). Pripravila som si 30 μl guličiek ku ktorým som pripipetovala k 25 μl zmiešanej génovej knižnice (u každého pacienta samostatne). Premiešala som 10x pipetou a nechala 5 min inkubovať pri laboratórnej teplote. Následne som skúmavky presunula na magnetický stojan DynaMag™ (Invitrogen) a nechala 2 min nachytávať guličky.

Odstriekla som supernatant, pridala 200 μl 70% etanolu, nechala 30 s na magnetickom stojane a opäť odstránila supernatant. Tento krok som zopakovala ešte 1x. Následne som nechala peletu vysušiť na magnetickom stojane približne 10 min (popraskaný povrch bol znakom optimálneho presušenia). K vysušeným guľičkám som pridala 20 μl vody a rozsuspendovala pipetovaním. Umiestnila som na magnetický stojan a nechala nachytať, supernatant som preniesla do čistých skúmaviek.

4.2.7.4 Kvatifikácia a riedenie knižnice

Na meranie koncentrácie DNA som používala Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Invitrogen). Pripravila som si kalibračnú krivku podľa rozpisu uvedeného v tab. 7 a DNA vzorky som pripravila pridaním 2 μl DNA do 48 μl 1xTE tlmivého roztoku. Tesne pred meraním (picogreen na svetle rýchlo degraduje) som si pripravila roztok zmiešaním 1xTE tlmivého roztoku s reagensiou picogreen tak, aby bol zachovaný pomer reagensie picogreen 0,5 μl /100 μl 1xTE roztoku. Z tohto roztoku som pridávala k meraniu rovnaký objem, aký bol v skúmavke (t.j. kalibračná krivka 45 μl a vzorky 50 μl).

Samotné meranie som robila na fluorimetri DQ 300 (Hoefer) , najprv som si nastavila kalibračný rozsah prístroja s použitím vopred pripravených roztokov na vytvorenie kalibračnej krivky. Následne som zmerala koncentráciu jednotlivých vzoriek. Je potrebné si uvedomiť, že DNA bola 50x nariadená (dávala som 2 μl do 48 μl 1xTE roztoku a pred samotným meraním som pridala 50 μl TE s picogreen reagensiou).

Vzorka	Koncentrácia	Riedenie
1	1000	49 μl 1xTE + 1 μl lambdy
2	100	45 μl 1xTE + 5 μl z 1. vzorku (konc. 1000)
3	10	45 μl 1xTE + 5 μl z 2. vzorku (konc. 100)
4	1	45 μl 1xTE + 5 μl z 3. vzorku (konc. 10), odobrať 5 μl tak, aby bol výsledný objem 45 μl
5	0	45 μl 1xTE

Tab. 7: Rozpis namiešania roztokov potrebných na kalibráciu fluorimetra.

Namerané hodnoty som dosadzovala do rovnice regresie:

$$y = ax + b$$

(y – hodnota fluorescencie; a - vypočítaná hodnota sklonu krivky;

x – hodnota koncentrácie; b – konštanta)

Pri týchto výpočtoch som používala program Excel s funkciou lineárnej regresie. S pomocou tejto funkcie som po zadaní nameranej hodnoty fluorescencie automaticky získala hodnotu koncentrácie DNA daného vzorku. Z hodnoty koncentrácie som ďalej vypočítala koľko μl DNA mám použiť na nasledujúcu PCR reakciu tak, aby som do reakcie dala 20 - 50 ng DNA.

Na základe nameraných hodnôt koncentrácie som vypočítala koľko mám pridať μl 1xTE tlmivého roztoku k 1 μl DNA jednotlivých vzoriek tak, aby bola výsledná koncentrácia knižnice 1×10^9 molekúl/ μl . Takto pripravené vzorky som zmiešala v pomere 1:1 – od každého pacienta som brala 2 μl DNA knižnice, čím som získala jednu skúmavku s rovnakým podielom jednotlivých pacientov (MIDov) v koncentracii 1×10^9 molekúl/ μl . Z tejto skúmavky som odobrala 2 μl knižnice a zmiešala s 198 μl vody, čím som získala výslednú génovú knižnicu s koncentraciou 1×10^7 molekúl/ μl a rovnakým podielom zastúpenia jednotlivých pacientov.

4.2.7.5 Emulzná PCR reakcia (emPCR)

Každá jedna guľička vytvárala samostatný replikon, ktorý obsahoval práve jeden konkrétny fragment DNA. Pri amplifikácii fragmentov bolo preto potrebné zabezpečiť optimálne mikroprostredie. Na tento účel som použila emulzný olej, ktorý pokrýval povrch jednotlivých guľičiek a tým bránil úniku fragmentov na susedné guľičky.

Na prípravu emPCR som používala GS Junior Titanium emPCR (Lib-A) kit (Roche Applied Science). Kit obsahoval 3 balenia, ktoré som používala na odlišné medzikroky v rámci prípravy emPCR. Oil and Breaking Kit som použila na prípravu emulzie: 1,72 ml vody som dôkladne rozmiešala s 430 μl Mock Mixu, následne som z tejto zmesi odobrala 2 ml a pridala do falkonky k emulznému oleju a s použitím prístroja IKA Ultra Turrax (Sigma-Aldrich) som zmes homogenizovala 5 min/4 000 rpm. Na prípravu PCR reakčnej zmesi som použila balenie emPCR Reagents, Lib-A. Pripravila som si 2 zmesi (Amp mix A + Amp mix B), pričom ich zloženie bolo objemovo rovnaké: 205 μl vody + 260 μl aditív + 135 μl Amp Mix (mix A a B) + 40 μl Amp Primer (mix A a B mali odlišné primery) + 35 μl Enzyme mix + 1 μl Ppiase. Na prípravu guľičiek som použila Bead Recovery Reagents. Pripravila som si roztok 4,5 ml vody + 0,5 ml Wash buffer, ktorým som 2x premyla guľičky A a B (1 ml do skúmavky A i B, krátke premiešanie, stočiť – otočiť vzorku o 180° – stočiť (SOS), odstriechnúť supernatant). Následne som si pripravila génovú knižnicu tak, že som zobrala 1 μl knižnice (s koncentraciou 1×10^9 molekúl/ μl) a pridala 99 μl 1xTE – čím som získala DNA knižnicu zriedenú na 1×10^7 molekúl/ μl . Z takto zriedenej knižnice som odobrala 0,5 μl a pridala k 29,5 μl vody, krátko

premiešala a z tejto zmesi som 10 μ l pridala do skúmavky s guličkami A a 10 μ l do skúmavky s guličkami B. Týmto spôsobom som do jednej reakcie dávala 0,5 μ l nariadenej knižnice (1×10^7 molekúl/ μ l), čo je 1 molekula na guľičku. Ku guľičkám A som pridala 600 μ l Amp Mixu A, zmes pridala do falkonky k emulznému oleju a homogenizovala 5 min/2 000 rpm s použitím IKA Ultra Turrax. Rovnaký postup som opakovala s guľičkami B, ku ktorým som pridávala Amp Mix B. Takto pripravenú emulziu som rozpipetovala po 80 μ l do stripov. emPCR prebiehala na prístroji MyCycler (Bio-Rad Laboratories) s použitím programu: počiatočná denaturácia 94°C/4 min a následne 50 cyklov 94°C/30 s, 58°C/4 min 30 s, 68°C/30 s; záverečná polymerizácia v tomto programe nebola doporučená.

4.2.7.6 Premývanie a obohacovanie guľičiek

Premývaním guľičiek som odstránila olej a izolovala guľičky s naviazanými fragmentami DNA. Guľičky bez naviazaných fragmentov DNA („prázdne“) by nepriaznivo ovplyvnili efektivitu sekvenovania, preto bolo potrebné ich odstrániť. V tomto kroku som opäť používala GS Junior Titanium emPCR (Lib-A) kit (Roche Applied Science) a to konkrétne balenie Bead Recovery Reagents a emPCR Reagents, Lib-A.

Emulziu som zo stripov preniesla do falkonky a stripy následne 2x prečistila 100 μ l izopropanolu, výslednú falkonku som doplnila izopropanolom do 35 ml, premiešala a stočila 5 min/930 g. Supernatant som odstriedla a k pelete som pridala 10 ml Enhancing Buffer, v ktorom som peletu dôkladne rozsuspendovala. Doplnila som izopropanolom do 40 ml, stočila 5 min/930 g a supernatant som zliala cez odpadnú falkonku. Peletu som doplnila izopropanolom do 35 ml a opakovala predošlý postup. Následne som doplnila peletu 96% etanolom do 35 ml a opakovala postup. Na záver prečistenia som doplnila do 35 ml Enhancing Buffer, stočila 5 min/930 g a supernatant zliala cez odpadnú falkonku tak, aby mi v pôvodnej falkonke ostali približne 2 ml. Tie som preniesla do novej skúmavky, pridala 1 ml Enhancing Buffer, krátko premiešala a stočila spôsobom SOS, odstriednúť supernatant. Týmto jednotlivými premývaniami som odstránila zo vzorky zvyšky olejových častíc. Ďalším krokom bolo obohacovanie guľičiek. Pripravila som si „melt solution“ (9,875 ml vody + 125 μ l hydroxidu sodného), z ktorého som 1 ml pridala k pelete, nechala 2 min odstáť pri laboratórnej teplote a stočila spôsobom SOS, stiahla supernatant a celý postup opakovala ešte 1x. K pelete som následne pridala 1 ml Annealing Buffer, stočila spôsobom SOS, stiahla supernatant a postup opakovala ešte 2x. Následne som pridala 45 μ l Annealing Buffer, 15 μ l Enrich Primer A a 15

μl Enrich Primer B, premiešala, dala na 5 min/ 65°C inkubovať na termoblok a potom schladila po dobu 2 min v zamrazovacom bločku. Pridala som 1 ml Enhancing Buffer, premiešala, stočila spôsobom SOS, stiahla supernatant a celý krok opakovala ešte 3x. Medzitým som si pripravila Enrichment Beads (z kitu emPCR Bead Recovery Reagents), ktoré som premiešala, dala na magnetický stojan, nechala nachytať, supernatant stiahla a následne pridala 500 μl Enhancing Buffer, opäť premiešala a dala nachytať na magnetický stojan. Tento krok som opakovala ešte 1x. Stiahla som supernatant a pridala 80 μl Enhancing Buffer, premiešala a pridala k pelete, ktorá mi ostala po prečisťovaní a obohacovaní guľičiek z emPCR. Po dôkladnom premiešaní som dala vzorku točiť na rotátor po dobu 5 min (vzorka by mala nadobudnúť farbu podobnú caffè latte, hnedé zafarbenie spôsobujú Enrichment Beads, ktoré sú hnedé). Skúmavku som preniesla na magnetický stojan, premiešala preklepaním a nechala 3-5 minút nachytávať na okraj skúmavky. Supernatant som preniesla do novej skúmavky, pridala som 1 ml Enhancing Buffer, premiešala a nechala opäť nachytať na magnetickom stojánku, Supernatant som stiahla do novej skúmavky a posledný krok som opakovala 6-10x, až kým výsledný supernatant nebol číry (zakaždým som supernatant sťahovala do novej skúmavky). Pri poslednom nachytávaní guľičiek som pridala 500 μl Melt solution, čím som docielila, že guľičky s naviazanou DNA sa uvoľnili do supernatantu, pričom hnedé guľičky ostali nachytané na magnetickom stojánku. Supernatant zmenil zafarbenie z čirej na bielu farbu, preniesla som ho do novej skúmavky. Do pôvodnej skúmavky na magnetickom stojane som pridala opäť 500 μl Melt solution a opakovala postup nachytávania. Supernatant som pridala do skúmavky k predošlému a ešte raz opakovala pridanie 500 μl Melt solution. Výsledný supernatant som stočila metódou SOS, supernatant odstriedla a k pelete pridala 1 ml Annelling Buffer. Opakovala som stočenie a pridanie 1 ml Annelling Buffer ešte 2x. Nakoniec som k výslednej pelete pridala 100 μl Annelling Buffer a dôkladne rozmiešala. Vizuálne som skontrolovala, či sa v roztoku nenachádzajú žiadne hnedé guľičky. Do roztoku som pridala 15 μl Seq Primer A + 15 μl Seq Primer B, nechala odpočívať 5 min v termobloku pri teplote 65°C a potom rýchlo schladila na 2 min v zamrazovacom bločku. Následne pridala 1 ml Annelling Buffer, premiešala, stočila metódou SOS, stiahla supernatant a opakovala pridanie 1 ml Annelling Buffer ešte 2x. Na záver som pridala k pelete 1 ml Annelling Buffer, stočila SOS spôsobom a kvantifikovala počet guľičiek pomocou počítadla guľičiek – hladina sa nachádzala medzi rýskami, čo naznačovalo primeraný počet guľičiek potrebných pre úspešnosť sekvenovania.

4.2.7.7 Príprava pikotitračnej doštičky

Doštička na sekvenovanie má charakter čipu zloženého z optických vlákien. Nachádza sa na nej približne 3,2 milióna jamiek o veľkosti niekoľko desiatok μm a sú veľkostne dizajnované práve pre jednu guľičku s naviazanými amplikónmi a sekvenačným primerom.

Pri príprave pikotitračnej doštičky som používala reagentie od spoločnosti Roche: PicoTiterPlate kit a GS Junior Sequencing kit, ktorý obsahoval 3 balenia – Buffers, Reagents and Enzymes a Packing Beads and Supplement (CB). Príprava doštičky spočívala v postupnom pridávaní vrstiev – najprv som naniesla guľičky s amplifikovanými DNA fragmentami, následne som pridala sekvenačné reagentie, prevrstvila guľičkami obsahujúcimi ATP sulfurylázu a luciferázu a nakoniec pridala tzv. utesňovacie guľičky. Pri príprave som postupovala jednotlivými krokmi dodržiavajúc nižšie popísaný protokol.

Z reagentie Supplement CB som odobrala 6,6 ml a pridala do fľaše s roztokom Titanium buffer CB, opatrne som zmes premiešala prevracaním tak, aby nevznikla pena. Následne som zo zmesi odobrala 40 ml do čistej falkonky a tento roztok označila popisom BB2. Do roztoku BB2 som pridala 6,5 μl apyrázy a jemne premiešala, počas celého trvania prípravy som BB2 držala na chlade. Na premytie držiaku na doštičku som použila Pre Wash Buffer, osušila gázou a dôkladne otrela vreckovkou Kimwipes (súčasťou balenia). Pikotitračnú doštičku (BDD – Beads Deposition Device) som preliala 370 μl BB2 roztoku, zalepila otvory páskou a centrifugovala 5 min/4013 rpm. Medzitým som si pripravila guľičky z emPCR – do reakcie som použila približne 500 000 guľičiek (mne sa podarilo v predchádzajúcom kroku získať podľa nameranej hodnoty z počítadla približne 2 000 000 guľičiek, preto som použila do reakcie 500 μl). Guľičky som preniesla do čistej skúmavky, stočila metódou SOS a odsala časť supernatantu tak, aby v skúmavke ostalo približne 100 μl . K nim pridala na obohatenie 6 μl Control Beads a 500 μl roztoku BB2, premiešala a nechala 20 min točiť na rotátore Mini Labroller (Labnet) pri laboratórnej teplote. Medzitým som si pripravila utesňovacie guľičky (k 2 ml roztoku Packing Beads som pridala 1 ml roztoku BB2, premiešala, centrifugovala 5 min/10 000 rpm a supernatant stiahla, opäť pridala 1 ml roztoku BB2 a opakovala postup celkom 3x). Ten istý postup som opakovala aj s Enzymes Beads a Ppiase Beads. Nakoniec som pridala k jednotlivým guľičkám roztok BB2 podľa tab. 8, premiešala a odložila do chladu. Skúmavku s Enzyme Beads som si rozdelila na 2 časti: tzv. PRE mix (300 μl BB2 + 110 μl Enzyme Beads) a POST mix (180 μl BB2 + 230 μl Enzyme Beads).

Packing Beads (utesňovacie guľičky)	200 µl BB2
Ppiase Beads	410 µl BB2
Enzyme Beads	400 µl BB2

Tab. 8: Finálny krok prípravy guľičiek pred nalieváním pikotitračnej doštičky.

Zatiaľ sa na rotátore dotočili DNA guľičky, ktoré som na 10 s stočila a stiahla zostávajúci objem 50 µl. K týmto 50 µl som pridala 40 µl polymerázy, 20 µl polymerázového kofaktoru a 65 µl BB2 roztoku. Po premiešaní som nechala zmes 10 min točiť na rotátore, potom som pridala 175 µl utesňovacích guľičiek (Packing Beads), premiešala a opäť dala točiť na rotátor. S takto pripravenými guľičkami som sa pustila do samotného nalievania doštičky, ktorú som si v predchádzajúcom kroku stočila s BB2 roztokom. Ten som odsala pipetou a v ďalšom kroku pomaly vliala 350 µl PRE mixu, zalepila otvory a centrifugovala 5 min/4013 rpm. Doštičku som naklonila, odsala tekutinu a pridala 350 µl DNA guľičiek, točila 10 min/4013 rpm. Opäť som odsala tekutinu, pridala POST mix a točila 10 min/4013 rpm. Odsala som tekutinu a ako posledné som pridala 350 µl Ppiase Beads, točila 5 min/4013 rpm. Naposledy som naklonením doštičky odsala tekutinu a takto pripravenú doštičku priniesla k prístroju. Do fľaše s roztokom Titanium Buffer CB som pridala 1 ml DTT reagentie a 44 ml TW substrátu, zmes som premiešala a vložila na určené miesto do prístroja. Miesto v prístroji pre pikotitračnú doštičku som pripravila omytím 50% etanolom, utesnila a zacvakla do držiaku pripravenú doštičku. Držiak som otrela vreckovkou s 10% Tween roztokom. Kameru na snímanie signálu ako i doštičku som pretrala vlhčenou utierkou Tissue Zeis Moistened, aby ani na jednom neboli čmuhu. Takto opatrený prístroj s pikotitračnou doštičkou bol pripravený na iniciáciu sekvenácie.

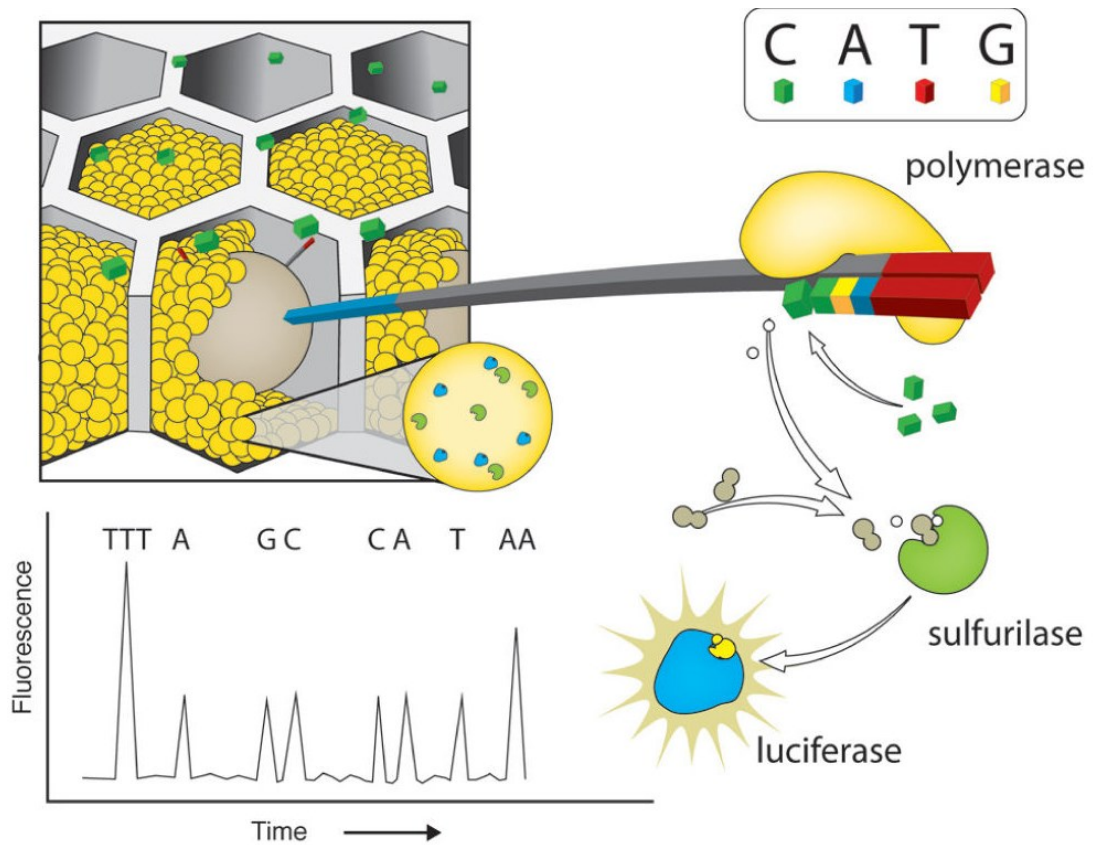
4.2.7.8 Sekvenovanie

Samotná sekvenácia prebiehala na prístroji GS Junior (454 Life Sciences, Roche).

Princíp pyrosekvenácie (obr. 19) je založený na chemickej reakcii, ktorá nastáva zaradením komplementárneho nukleotidu – vzniká pyrofosfát, ktorý následne spotrebuje ATP sulfyráza na tvorbu ATP z APS. ATP dodáva energiu do reakcie premeny luciferínu na oxyluciferín (reakciu katalyzuje luciferáza). Oxyluciferín vydáva svetelné žiarenie, ktoré prístroj detekuje ako signál. Intenzitu signálu určuje množstvo vzniknutého ATP, t.j. počet pripojených nukleotidov daného typu. Celý cyklus zakončuje enzým apyráza, ktorá degraduje ATP

a nepotrebované nukleotidy. Degradáciou dochádza k zániku signálu a celý cyklus sa znovu opakuje inkorporáciou nového nukleotidu.

Vzorky som vyhodnocovala použitím zakúpeného programu Sequence Pilot (JSI Medical systems).



Obr. 19: Schématicky znázornený princíp pyrosekvenovania využívaný platformou 454 Life Science. Prevzaté z ESCALANTE *et al.* 2014.

4.2.8 Použité programy a databázy

Použité primery boli nadizajnované pomocou programu Primer-BLAST, pričom som používala referenčné sekvencie génu HNF1B NG_013019.2 a NM_000458.3 v databáze NCBI.

Primer-BLAST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

Referenčná sekvencia génu HNF1B:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_013019.2?from=5029&to=63676&report=genbank

Na kontrolu sekvenácií vzoriek som používala dostupnú skúšobnú verziu programu CodonCode Aligner, ale majoritnú väčšinu vzoriek som analyzovala manuálne odčítaním sekvencií. Ako prvý nukleotid cDNA sekvencie som počítala 1. metionín (ATG kodón). Na popis nájdených sekvenčných zámien som používala ustálenú nomenklatúru zavedenú inštitúciou Human Genome Variation Society.

Nomenklatúra zámien: <http://www.hgvs.org/mutnomen/>

Program CodonCode Aligner: <http://www.codoncode.com/aligner/>

Nájdené sekvenčné zmeny som overovala v databáze Mutation Database Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease (Aachen PKHD1 databáza) a používala som platenú verziu Human Gene Mutation Database (HGMD). Potencionálny patogenický dopad objavených mutácií som overovala použitím programov PolyPhen-2 a Mutation Taster. Na hľadanie bežných polymorfizmov som používala NCBI SNP databázu.

Aachen PKHD1 databáza: <http://www.humgen.rwth-aachen.de/index.php>

HGMD: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>

NCBI SNP databáza: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>

PolyPhen-2: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>

MutationTaster: <http://www.mutationtaster.org/>

SWISS-MODEL: <https://swissmodel.expasy.org>

5. Výsledky

V súbore 28 vyšetrovaných pacientov som identifikovala 5 mutácií a 1 intrónový variant. Celková miera detekcie mutácií bola 14% (n=4). Metódou priameho sekvenovania som identifikovala 1 jednobodovú zámenu missense vedúcu k zmene AMK, 2 jednobodové zámeny nonsense vedúce k vytvoreniu predčasného STOP kodónu a k predčasnej terminácii translácie, čo vedie ku skráteniu výsledného proteínového produktu. U 4 pacientov som identifikovala totožnú intrónovú variantu, ktorá sa v mojom súbore pacientov vyskytovala s frekvenciou výskytu 14%. Metódou MLPA som identifikovala alelickú deléciu celého génu HNF1B. Pomocou NGS prístupu som identifikovala jednobodovú inzerciu vedúcu k zmene AMK a následne k vytvoreniu predčasného STOP kodónu - detekovanú mutáciu som overila priamym sekvenovaním, aby som predišla falošnej pozitívite výsledku NGS. Všetky identifikované sekvenčné varianty uvádzam v tab. 9 spolu s vyvolanými zmenami na úrovni DNA a proteínu.

Pacient	Zmena na úrovni cDNA	Zmena na úrovni proteínu	Charakter mutácie	Génova lokalizace
1608/12	c. 1653 + 47_ c.1653 + 48 insC	rs 35913775	polymorfizmus	intrón 8
886/12	c. 1653 + 47_ c.1653 + 48 insC	rs 35913775	polymorfizmus	intrón 8
1360/12	c. 523 A>T c. 1127 C>T	STOP kodón (K175*) zmena AMK (T376I)	patogénna patogénna	exón 2 exón 5
889/12	c. 1653 + 47_ c.1653 + 48 insC	rs 35913775	polymorfizmus	intrón 8
467/15	c. 1653 + 47_ c.1653 + 48 insC	rs 35913775	polymorfizmus	intrón 8
701/14	c. 826 C>T	STOP kodón (R276*)	patogénna	exón 4
1439/15	c.45_46 insC	zmena AMK (L16Pfs*72)	patogénna	exón 1
1178/12	alelická delécia celého génu	polovičné množstvo funkčného proteínu	patogénna	chromozóm 17q12

Tab. 9: Nájdené sekvenčné varianty u jednotlivých pacientov. Na určenie cDNA som používala referenčnú sekvenciu NM_000458.3. Popísané mutácie značené zvyraznením.

Všetky nájdené sekvenčné zmeny som overovala v databáze HGMD, použitím predikčných programov a v databáze NCBI SNP. Objavila som 3 nové mutácie, ktoré doposiaľ neboli popísané v literatúre. Pri overovaní použitím predikčných programov som odhalila, že sa jedná o potenciálne patogénne mutácie.

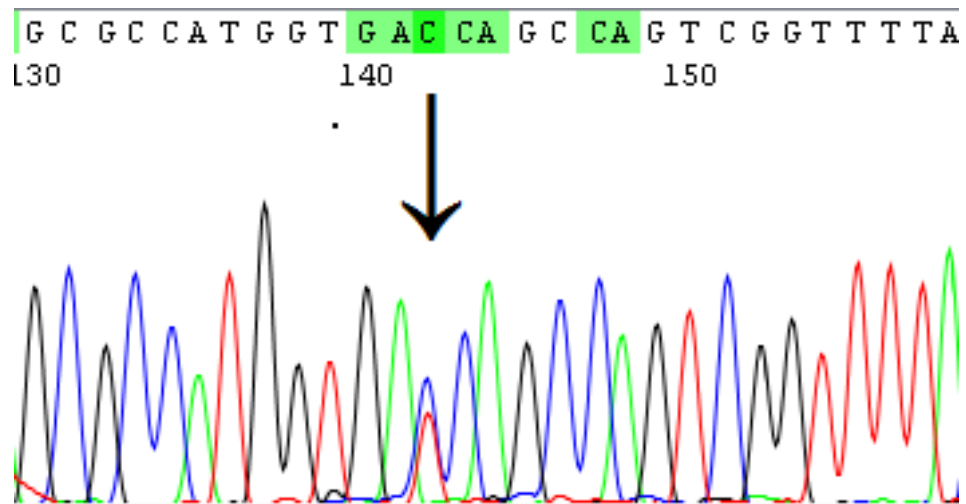
5.1 Bodové substituce missense

c. 1127 C>T, T376I

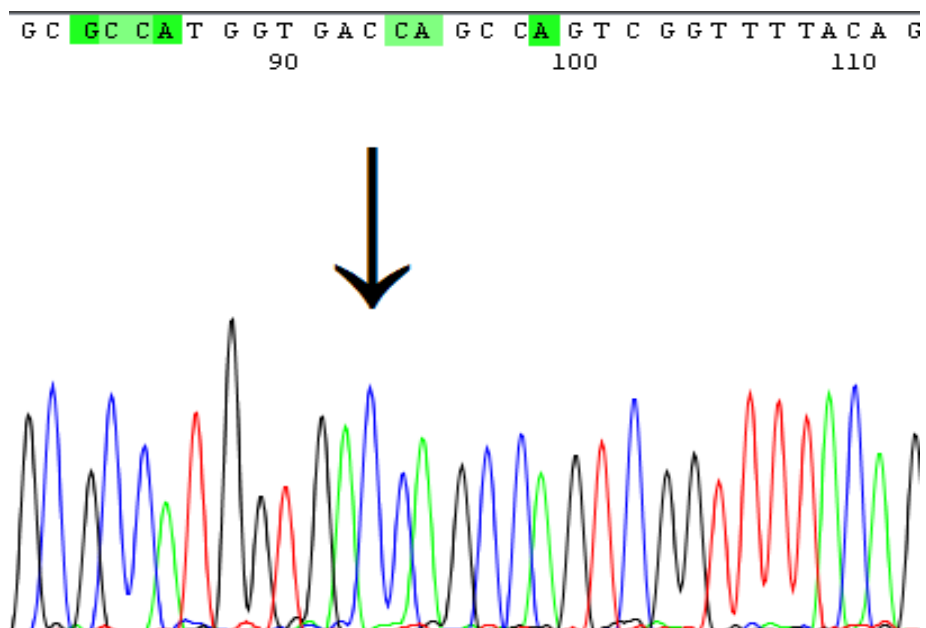
U pacienta 1360/12 som detekovala jednobodovú substitúciu c.1127 C>T meniacu aminokyselinu treonín na izoleucín v pozícii 376 (chromozomálna pozícia 36070590) v 5. exóne génu *HNF1B*. Pri tejto zámene nedochádza k posunu čítacieho rámca ani ku skráteniu syntetizovaného proteínu.

Jedná sa o doposiaľ nepopísanú jednonukleotidovú zámenu. Pri overovaní jej možného účinku na fenotyp jedinca som nezávisle od seba s použitím dvoch predikčných programov dospela k výsledku, že sa pravdepodobne jedná o patogénnu zmenu. Touto substitúciou síce nedochádza ku skráteniu proteínu, avšak zámena AMK môže mať na zloženie proteínu závažne dôsledky. Kým treonín je polárna nenabitá AMK s postranným reťazcom obsahujúcim –OH skupinu, izoleucín je neplárna, neutrálna alifatická AMK, ktorej postranný reťazec sa uplatňuje v hydrofóbných interakciách. Obe AMK majú teda odlišné povahové vlastnosti a preto predkladáme, že ich vzájomnou zámennou môže dôjsť k pozmeneniu biologického charakteru daného úseku a k zmene vo funkcii proteínu. Pozícia 376 sa nachádza blízko aktivačnej domény proteínu (388-471), pričom výskum skupiny HIESBERGER *et al.* (2005) poukázal na kritický faktor integrity tohto úseku.

Na obr. 20a uvádzam vizualizovanú sekvenčnú zámenu, ktorú som detekovala použitím programu Codon Code Aligner. Na obr.20b môžeme pre porovnanie vidieť ten istý úsek sekvencie u zdravého jedinca bez sekvenčných zmien.



Obr. 20a: Záznam sekvenácie časti 5. exónu pacienta 1360/12 s označeným miestom zámény c. 1127 C>T (sekvenované v smere forward).



Obr. 20b: Vizuálny záznam sekvenácie miesta c. 1127 v 5. exóne u zdravého jedinca (sekvenované v smere forward).

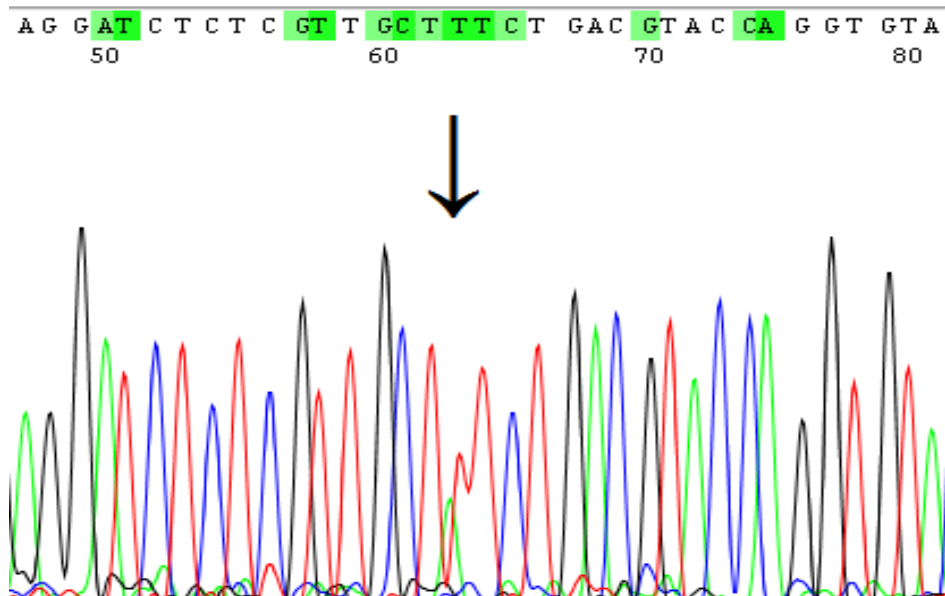
5.2 Bodové substituce nonsense

c. 523 A>T, K175*

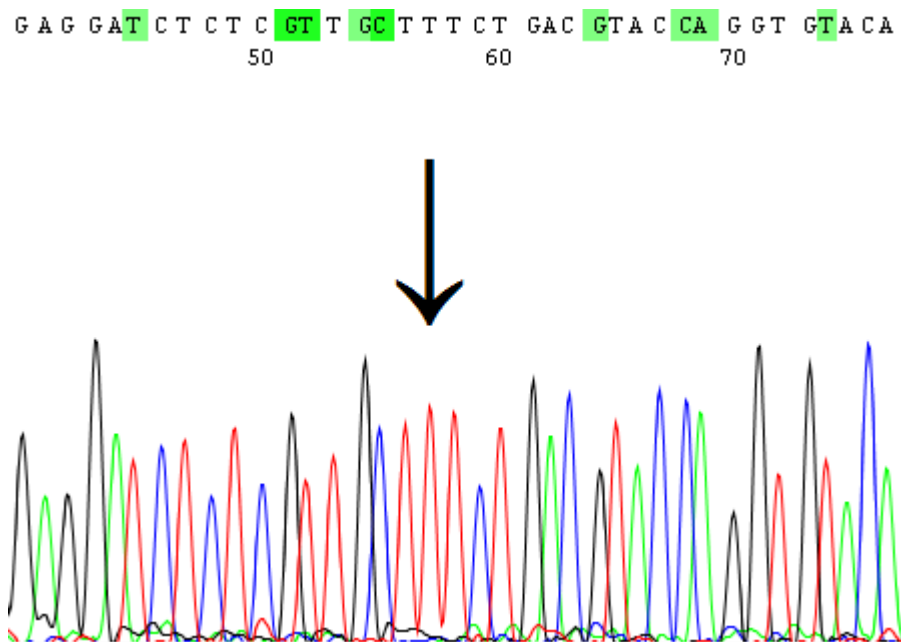
U pacienta 1360/12 som detekovala jednonukleotidovú substitúciu c. 523 A>T, ktorá zapríčiňuje zmenu aminokyseliny lyzín na STOP kodón v pozícii 175 (chromozomálna pozícia 36099452) v 2.exóne génu HNF1B. Vznik STOP kodónu má za následok predčasnú termináciu

translácie, pričom je výsledný proteínový produkt dlhý 175 AMK namiesto 558 AMK (wt). Jedná sa pravdepodobne o patogénnu jednobodovú mutáciu, ktorá doposiaľ nebola popísaná.

Na obr. 21a uvádzam vizualizovaný sekvenčný záznam, na ktorom môžeme vidieť substitúciu A>T v pozícii c. 523. Na obr.21b môžeme pre porovnanie vidieť ten istý úsek sekvencie u zdravého jedinca bez sekvenčných zmien.



Obr. 21a: Záznam sekvenácie časti 2. exónu pacienta 1360/12 s označeným miestom zámény c. 523 A>T (sekvenované v smere forward).



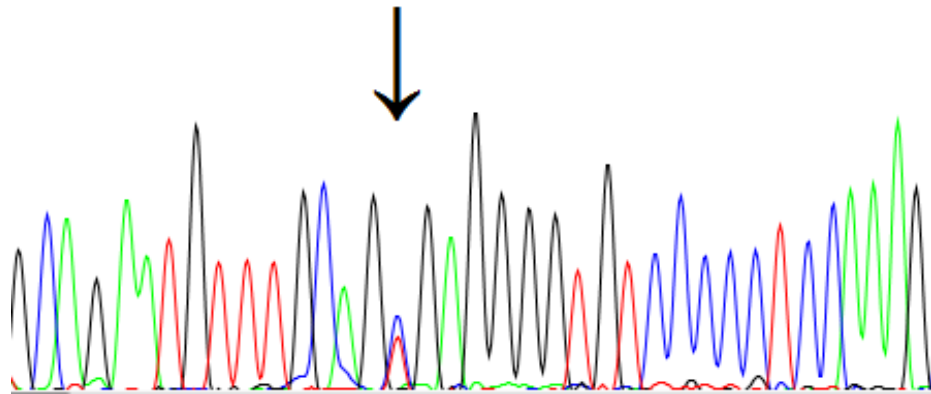
Obr. 21b: Vizualný záznam sekvenácie miesta c. 523 v 2. exóne u zdravého jedinca (sekvenované v smere forward).

c. 826 C>T, R276*

U pacienta 701/14 som detekovala v 4. exóne jednonukleotidovú zámenu c. 826 C>T, ktorá vedie k zmene aminokyseliny arginín na STOP kodón v pozícií 276 (chromozómová pozícia 36091805). Touto zmenou dochádza k predčasnej terminácii translácie a vzniká skrátenejší proteín s dĺžkou 276 AMK. Jedná sa o popísanú patogénnu zámenu, ktorá spôsobuje výrazné zmeny v post-transkripčnej zostrihovej úprave produktu (Xiong *et al.* 2015).

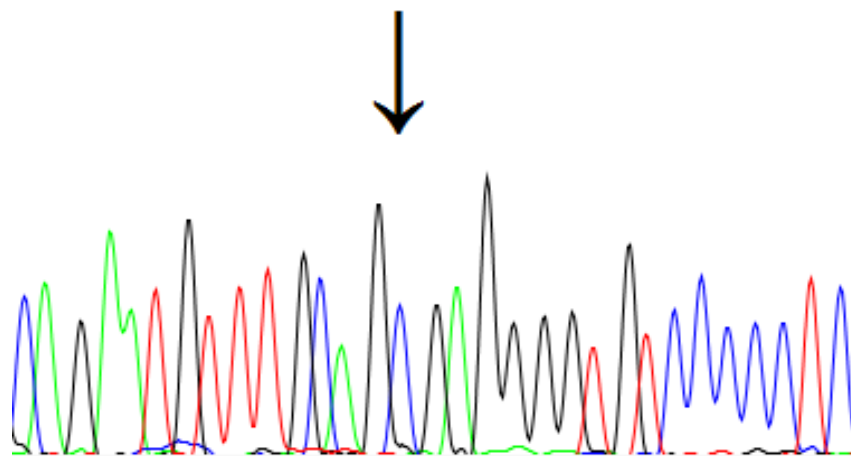
Na obr. 22a uvádzam vizualizovaný sekvenčný záznam, na ktorom môžeme vidieť substitúciu C>T v pozícií c. 826. Na obr.22b môžeme pre porovnanie vidieť ten istý úsek sekvencie u zdravého jedinca bez sekvenčných zmien.

G C A G A A T G T T T G C A G C G A G G G G T G T C C C C C T C C A A A G
80 90 100



Obr. 22a: Záznam sekvenácie časti 4. exónu pacienta 701/14 s označeným miestom zámény c. 826 C>T (sekvenované v smere forward).

C A G A A T G T T T G C A G C G A G G G G T G T C C C C C T C
70 80 90



Obr.22b: Vizualný záznam sekvenácie miesta c. 826 v 4. exóne u zdravého jedinca (sekvenované v smere forward).

5.3 Bodové inzercie

c.45_46 insC, L16Pfs*72

U pacienta 1439/15 som detekovala doposiaľ nepopísanú jednobodovú inzerciu c.45_46 insC vedúcu k posunu čítacieho rámca a k zmene aminokyseliny leucín na prolín v pozícií 16 (chromozomálna pozícia 36104830/36104831) v 1. exóne génu *HNF1B*. Túto mutáciu som prvotne identifikovala použitím metódy NGS a analyzovaním výsledkov programom Sequence Pilot (JSI Medical Systems).

Location	Barcode	Processing	Distinct Coverage	Ignore Coverage	Min Absolute Coverage	Min Coverage Line	Auto Remove Primer	Set Fragmen Unique
	ACGAGTGCGT	separated	25%	15%	0	30		no
Region	Average Coverage	Called / Total Bases	Variation					
HNF1B								
E1	-20..20	0/2	487 / 578	X				
E2	-15..20	28/22	235 / 235					
E3	-20..20	65/70	305 / 305					
E4	-20..20	6/3	276 / 276					
E5	-20..20	53/55	201 / 201					
E6	-20..20	24/17	173 / 173					
E7	-20..20	27/32	235 / 235					
E8	-20..20	114/139	159 / 159	X				
E9	-20..20	5/4	122 / 1002					

Obr. 23: Výstup analýzy programu Sequence Pilot, ktorým som analyzovala dáta získané pyrosekvenovaním.

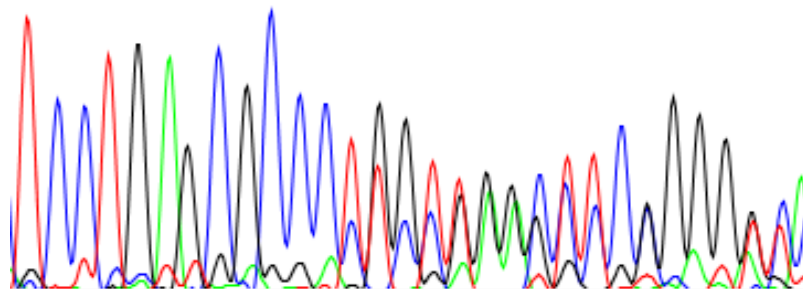
Ako môžeme vidieť na obr. 23, výstup analýzy NGS poukázal na nezrovnalosti v exóne 1 a 8. Oba exóny som preto kontrolovala priamou sekvenáciou (exón 8 bol bez zámen, systém pyrosekvenovania má limity v oblasti homopolymérov). Tento príklad je názornou ukážkou toho, že nie vždy sa dá na výsledky masívneho paralelného sekvenovania plne spoľahnúť a vždy je dobré výsledok overiť priamou sekvenáciou.

Pri tejto zámene dochádza k vytvoreniu predčasného STOP kodónu v pozícií (c. 261), čo má za následok termináciu translácie a vznik výrazne skráteného proteínu. V prípade wt vzniká výsledný proteín s dĺžkou 558 AMK, pričom vplyvom tejto mutácie má vzniknutý proteín dĺžku len 87 AMK. Jedná sa o zatiaľ nepopísanú inzerciu, ktorá by však podľa predikčných programov mohla mať patogénny účinok, najmä vzhľadom na významné skrátenie výsledného proteínového produktu.

Na obr. 24a uvádzam vizualizovaný sekvenčný záznam, na ktorom môžeme vidieť inzerciu C v pozícií c. 45_46. Na obr. 24b môžeme pre porovnanie vidieť ten istý úsek sekvencie u zdravého jedinca bez sekvenčných zmien.

T C C T G **A G** C G C **C C T G G T T G G C T T C C G G G G C A**

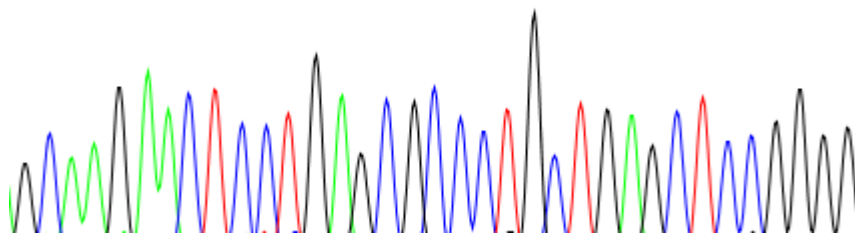
140 150 160



Obr. 24a: Záznam sekvenácie časti 1. exónu pacienta 1439/15 s označeným miestom zámény c.45_46, kde nastala inzercia C (sekvenované v smere forward).

G C A A G A A C T C C T G A G C G C C C T G C T G A G C T C C G G G G

150 160

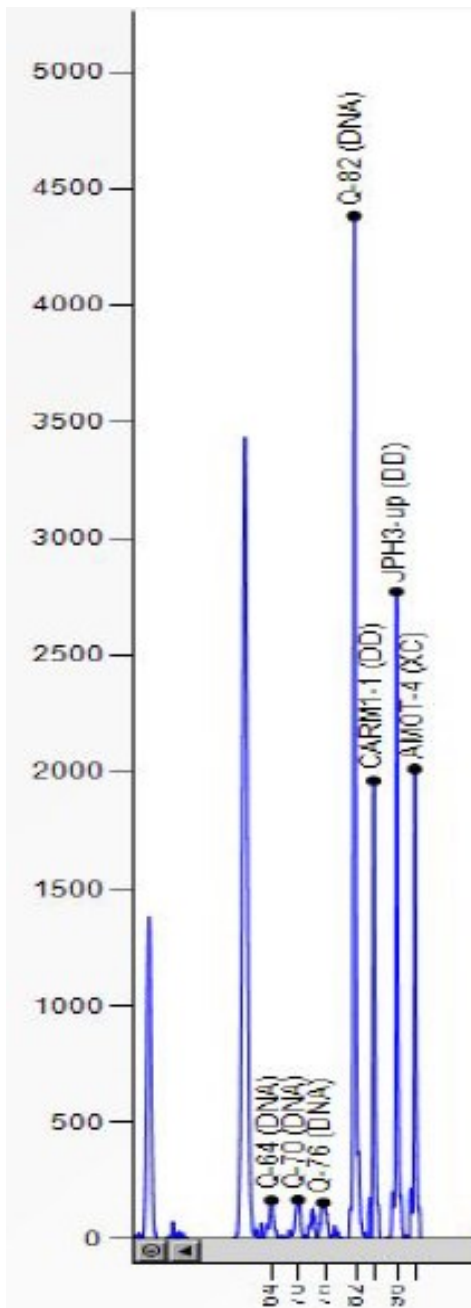


Obr. 24b: Vizualný záznam sekvenácie miesta c. 45 v 1. exóne u zdravého jedinca (sekvenované v smere forward).

5.4 Rozsiahle delécie

Použitím metódy MLPA som u pacienta 1178/12 detekovala deléciu celého génu HNF1B na jednej alele. Výsledky fragmentačnej analýzy (obr. 25) som spracovala prostredníctvom programu Coffalyser, ktorý automaticky spracoval výpočty plôch jednotlivých peakov a výsledné dáta vizuálne znázornil do obr. 26. Pri analýze génu HNF1B som používala kit SALSA MLPA probemix P241-D2 MODY mix 1, ktorý obsahuje 42 prób pre 4 gény: *GCK*, *HNF1A*, *HNF1B* a *HNF4A*. Okrem týchto prób obsahuje aj tzv. kontrolných 9 prób, ktorých nasadnutím a ligáciou vznikajú produkty amplifikácie menšie ako 120 bp –

napr. X-fragment (100 bp), Y-fragment (105 bp), 4 Q-fragmenty (DNA Quantity fragments) a 3 D-fragmenty (DNA Denaturation control fragments). X a Y fragmenty slúžia na kontrolu zámieny vzoriek z nepozornosti, príliš nízke peaky D-fragmentov poukazujú na nedostatočnú denaturáciu DNA a príliš vysoké peaky Q-fragmentov naznačujú nedostatočné množstvo vstupného DNA materiálu alebo zlyhanie ligácie počas reakcie.



Na obr. 27 môžeme vidieť na základe prítomných peakov poznať, že pacient 1178/12 bol ženského pohlavia, DNA denaturácia prebehla v poriadku a výška peakov Q-fragmentov dokumentuje vhodné množstvo DNA a úspešnú ligáciu. U pacienta 1178/12 došlo pri vyhodnocovaní amplifikovaných produktov HNF1B k zníženiu peakov o 50%, čo sa na vizuálnom zobrazení výsledku (obr. 26) prejavilo znížením miery signálu všetkých exónov génu HNF1B na hodnotu 0,5. Tieto výsledky sú dôkazom prítomnosti alelickej delécie celého génu. Keby bol gén HNF1B prítomný na oboch alelách, signály by boli v úrovni hodnoty 1 (ako vidíme na obr. 26 pri génoch HNF1A, GCK a HNF4A). U pacienta 1178/12 však na jednej alele došlo ku génovej delécii a preto sa počas MLPA reakcie amplifikovalo polovičné množstvo DNA a teda aj signály z kapilárnej elektroforézy boli o polovicu slabšie. V prípade alelickej duplikácie by naopak boli signály na úrovni hodnoty 1,5. V prípade delécie génu na oboch alelách by sme teoreticky nemali vidieť žiaden signál, avšak homozygótna delécia génu HNF1B nie je zlučiteľná so životom.

Obr. 27: Kontrolné fragmenty, ktoré dokumentujú vyhovujúce množstvo DNA materiálu a úspešnosť ligácie (Q fragmenty), mieru denaturácie (D fragmenty) a pohlavie pacienta (v prípade pacienta 1178/12 vidíme prítomný X fragment).

5.5 Intronické varianty

c. 1653 + 47_c. 1653 +48 insC (rs 35913775)

U štyroch pacientov som detekovala prítomnosť sekvenčnej varianty jednonukleotidovej inzercie C v intrónovej oblasti downstream za exómom 8 v pozícií c. 1653 + 47_c. 1653 + 48. Sekvenčnú variantu som overila použitím databázy NCBI SNP (obr. 27) a odhalila, že sa jedná o popísaný polymorfizmus, vyskytujúci sa v populácii zdravých jedincov s frekvenciou 15%.

Hodnota alelickej frekvencie 15% vychádzala z populačných štúdií z troch na sebe nezávislých databáz:

- ❖ Exome Aggregation Consortium (ExAC) - dokumentuje sekvenčné varianty exómových sekvencií nazbieraných z rôznych sekvenčných projektov u viac ako 60 000 nepríbuzných jedincov z populačných štúdií (v súbore jedincov sa nachádzajú nielen zdraví, ale i postihnutí jedinci)
- ❖ 1000 Genome Project – dokumentuje sekvenčné varianty len zdravých jedincov populácie, avšak toto tvrdenie je diskutabilné
- ❖ NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP) – dokumentuje proteín-kódujúce sekvencie, v databáze viac ako 200 000 jedincov s dobre popísaným fenotypom; dáta sú zozbierané v centrách pre pľúcne, srdečné a hematologické ochorenia.

V mojej vzorke pacientov sa tento polymorfizmus vyskytoval s frekvenciou 14%, čo súhlasí s hodnotou alelickej frekvencie udávanou v databáze NCBI SNP.

The screenshot shows the NCBI dbSNP interface. At the top, there is a search bar with 'dbSNP' selected and a 'Go' button. Below the search bar, the 'Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs35913775' is displayed. The report is organized into three main columns: RefSNP, Allele, and HGVS Names. The RefSNP column includes details like 'Organism: human (Homo sapiens)', 'Molecule Type: Genomic', and 'Map to Genome Build: 108/Weight 1'. The Allele column shows 'Variation Class: deletion/insertion variation', 'RefSNP Alleles: -/G (FWD)', and 'Allele Origin: Ancestral Allele: A'. The HGVS Names column lists various genomic coordinates and their corresponding variant descriptions, such as 'NC_000017.10:g.36059034_36059035insG' and 'NM_001165923.3:c.1575+47_1575+48insC'. A 'Validation Status' section is also visible, showing 'G=0.1580/19155 (ExAC)', 'G=0.1571/787 (1000 Genomes)', and 'G=0.1670/2091 (GO-ESP)'. A 'MAF/MinorAlleleCount' section is also present.

Obr.27: Ukážka výsledku vyhľadávania intrónového variantu c. 1653 + 47_48 v databáze NCBI SNP.

7. Diskusia

Snaha o diagnostikovanie ARPKD predstavuje z hľadiska molekulárnej genetickej analýzy náročnú výzvu. Široká klinická variabilita ARPKD fenotypov, od ťažko postihnutých plodov až po dospelých pacientov s ľahkými pečenevými komplikáciami, ako aj veľkosť génu *PKHD1* komplikujú možnosť použitia mutačného screeningu ako súčasť rutínnej diagnostiky. OBEIDOVA *et al.* (2015) zaviedli metódu molekulárnej genetickej analýzy génu *PKHD1* použitím NGS prístupu. V skupine súboru pacientov, ktorí spĺňali všetky klinické prejavy ARPKD (renálne komplikácie spolu s CHF či inými pečenevými komplikáciami) bola MDR až 90%, avšak toto číslo sa rapídne znížilo začlenením pacientov, ktorí nespĺňali obe kritéria. Úskalím súboru analyzovaných pacientov boli ARPKD suspektné plody, u ktorých bola MDR veľmi nízka. Na potvrdenie diagnózy ARPKD bolo potrebné u pacienta detekovať 2 *PKHD1* mutácie. Fenotyp ARPKD však môže byť zapríčinený aj mutáciami v iných génoch, ktoré sa spájajú s inými polycystickými ochoreniami obličiek. Ja som sa vo svojej práci zamerala na štúdium génu *HNF1B*, ktorý je jedným z možných génov, ktorého mutácie napodobňujú ARPKD. *HNF1B* je transkripčným faktorom priamo regulujúcim promótor *PKHD1* a preto sa domnievam, že mutácie *HNF1B* môžu byť v úzkom prepojení s fenotypom ARPKD vďaka ovplyvneniu expresie *PKHD1*.

Cieľom tejto diplomovej práce bolo nadviazať na výskum v rámci grantového projektu IGA MZ ČR NT13090-4 (OBEIDOVA *et al.* 2015) a vytvoriť súbor pacientov, u ktorých bola identifikovaná jedna alebo žiadna mutácia v géne *PKHD1*. U týchto pacientov som podrobila mutačnej analýze gén *HNF1B*, pričom som na tento účel zaviedla a optimalizovala metódy molekulárnej genetickej analýzy.

Analyzovala som súbor 28 pacientov, u ktorých bola detekovaná jedna alebo žiadna *PKHD1* mutácia. U dvoch pacientov gén *PKHD1* nebol analyzovaný – jednalo sa o zdravú matku pacienta 1439/15, u ktorého som detekovala mutáciu c.45_46 insC, a u zdravého otca ARPKD suspektného plodu, u ktorého bol výsledok *PKHD1* analýzy negatívny.

Na detekciu jednobodových sekvenčných zámen som použila priame Sangerovo sekvenovanie a pyrosekvenovanie. Na detekciu rozsiahlejších génových duplikácií a delécií som použila metódu MLPA, pri ktorej som postupovala podľa protokolu výrobcu a dosahovala som optimálne výsledky. Väčšinu vzoriek som analyzovala priamym sekvenovaním, pričom jednotlivé kroky postupu som musela optimalizovať pre jednotlivé exóny samostatne. Pri

tvorbe génovej knihovny som optimalizovala podmienky PCR reakcie pre exóny 1, 3 a 9, kde som zvýšila anelačnú teplotu a pridala do reakčnej zmesi DMSO. DMSO sa viaže na DNA v oblasti cytozínových zvyškov, čo má za následok lepšie rozvoľnenie DNA pri denaturácii a zlepšenie amplifikácie v GC bohatých oblastiach. Vo výsledku som dosiahla pomerne čisté produkty bez nešpecifických zvyškov, ktoré som použila do sekvenačnej reakcie a sekvenáciou som získala dobre odčítateľné záznamy. Praxou som sa naučila, ktoré exóny je výhodnejšie sekvenovať v smere forward či reverse, v snahe minimalizovať použité reagenty a náklady na sekvenovanie. Niektorých pacientov som analyzovala technikou NGS, čo predstavovalo značné výhody oproti Sangerovmu sekvenovaniu - masívne paralelné sekvenovanie, dĺžka čítania až 1000 bp, 99,9% presnosť sekvenácie pri sekvenácii jednej oblasti min. 15x, časová úspora z hľadiska sekvenácie viacerých pacientov v jednej reakcii. Technológia 454 Life Sciences však mala limity v oblastiach homopolymérov, kde dochádzalo k nepresnému vyhodnoteniu výstupu. Intenzita signálu je totiž podmienená množstvom ATP, ktoré vznikne inkorporáciou dNTP. Ak po sebe nasledujú 2 rovnaké bázy, inkorporuje sa dvojnásobné množstvo dNTP, tým sa zdvojnásobí množstvo ATP a i výsledný signál, ktorý pozorujeme na pyrograme ako dvojnásobne vysoký peak. V oblastiach, kde po sebe nasleduje viac ako 5 rovnakých nukleotidov môže byť signál nedôveryhodný. Preto som všetky potencionálne mutácie detekované použitím NGS overovala priamou sekvenáciou. Pri géne ako je *PKHDI*, ktorý má 67 exónov, je použitie NGS časovo výhodné. Avšak *HNFB* je pomerne malý gén s 9 exónmi, čo umožňuje relatívne jednoduché priame sekvenovanie.

Použitím týchto metód som detekovala 5 mutácií a 1 sekvenčnú zmenu u 8 pacientov, a to konkrétne u 2 plodov, 5 pacientov v detskom veku a u 1 dospelaj ženy. Identifikované mutácie sa nachádzali u 4 pacientov – 2 diagnostikovaných v detskom veku a 2 diagnostikovaných prenatálne. Celková hodnota MDR bola 14%, pričom BOECKENHAUER a JAUREGUIBERRY (2016) v súbore detských pacientov s renálnymi abnormalitami popísali dosiahnutú MDR 30%. Mnou pozorovaná hodnota MDR bola 14%, čo je o polovicu menej ako som na základe literatúry predpokladala. S cieľom zvýšiť MDR by bolo vhodné v budúcnosti stanoviť presnejšie kritéria na zaradenie pacientov do súboru – mieru záchytu mutácií by pozitívne ovplyvnil výber len detských pacientov, s určitými renálnymi komplikáciami a s včasným prejavom ochorenia.

U pacienta 1360/12 bola prenatálne pozorovaná mikrocystická degenerácia oboch obličiek a RCAD syndróm. Mutačnou analýzou som detekovala 2 patogénne mutácie v exónoch 2 a 5,

pričom jedna spôsobovala vytvorenie predčasného STOP kodónu a skrátenie proteínového produktu na 175 AMK (namiesto 558).

U pacienta 1608/12 boli vo veku 4 rokov diagnostikované bilaterálne cystické obličky, diagnostikované ako neurčená forma PKD. Obličky boli obojstranne symetrické s mostíkom parenchýmu, s prítomnými obojstranne drobnými anechogenitými cýstami do 12-12 mm, nález sa nezhoršuje. Pacient je pod lekárskej dohľadom kvôli intermitentnej mikroskopickej hematúrii, hraničnej hypertenzii, často sa u neho vyskytujú infekcie močových ciest. U tohto pacienta som detekovala intrónovú variantu c.1653 + 47_c.1653 + 48 popísanú ako polymorfizmus. U pacienta 889/12 s totožným polymorfizmom došlo k chronickému zlyhaniu obličiek, vo veku 10 rokov pacient podstúpil transplantáciu obličky. Rovnaký polymorfizmus som detekovala aj u dospelaj ženy 467/15, ktorá v minulosti podstúpila 2x umelé prerušenie tehotenstva z dôvodu ARPKD suspektného plodu. U tejto pacientky bola zároveň identifikovaná aj bodová mutácia v géne *PKHD1*.

Intrónová varianta c. 1653 + 47_c. 1653 + 48 je popísaná ako polymorfizmus vyskytujúci sa s frekvenciou 15% u zdravej populácie. V mojom súbore pacientov bola frekvencia výskytu c. 1653 + 47_c. 1653 + 48 polymorfizmu 14%, čo koreluje s hodnotami uvedenými v databáze NCBI SNP. Klinické prejavy u pacientov nesúcich tento polymorfizmus sú pravdepodobne fenotypovým prejavom mutácie asociovanej s iným génom.

U pacienta 701/14 bola po narodení zistená polycystická choroba obličiek s prítomnosťou progredujúcich cýst o veľkosti do 7 mm. Krvné testy odhalili vyššiu hladinu urey a kreatinínu, pacient trpí renálnou hypertenziou a chronickou renálnou insuficienciou V. stupňa. Rodinná anamnéza je PKD negatívna. U pacienta bol pozorovaný normálny neurologický vývoj bez nálezu cýst v iných orgánoch. U pacienta som identifikovala v exóne 4 bodovú mutáciu spôsobujúcu skrátenie proteínového produktu na 276 AMK. Z hľadiska fenotypových prejavov je renálna hypertenzia veľmi častým sprievodným prejavom ARPKD fenotypu.

Zaujímavým prípadom z hľadiska genotypovo-fenotypovej korelácie bol pacient 1439/15, u ktorého bola v 2. trimestri tehotenstva zistená forma multicystickej dysplázie obličiek, dysplázia bola potvrdená ihneď po narodení. Avšak i napriek nepriaznivej prognóze pacient prospieva bez klinických potiaží. V 1. exóne som detekovala jednobodovú inzerciu c.45_46 insC, ktorá spôsobovala zmenu AMK a skrátenie finálneho proteínového produktu na dĺžku 87 AMK. Nakoľko sa jedná o signifikantné skrátenie proteínu (558 wt/87 mut), dalo by sa predpokladať, že klinické prejavy budú závažné. Avšak pacient prospieva zatiaľ bez

problémov. Analýzu génu podstúpila aj matka pacienta 1439/15, avšak s negatívnym výsledkom –u génu *HNF1B* sa stretávame s 50% výskytom mutácií *de novo* (CLISSOLD *et al.* 2016). Negatívna rodinná anamnéza preto nezohráva úlohu ako podstatný faktor pri zvažovaní genetickej analýzy *HNF1B*.

Najdôležitejším kritériom pri rozhodovaní, či pacienta zaradiť na genetickú analýzu *HNF1B*, by jednoznačne mali byť klinické prejavy pacienta. Odlíšenie prejavov poukazujúcich na mutácie *HNF1B* namiesto *PKHD1* mutácií nie je jednoduché. U pacientov s *HNF1B* mutáciami je častým sprievodným javom hypomagnezémia (prípadne hypokalcémia), ktorá u ARPKD pacientov býva len ojedinele. Naopak u ARPKD pacientov sa často stretávame s renálnou/pečeňovou hypertenziou. ARPKD suspektné plody s normálnym prietokom amniovej tekutiny sú vhodnými kandidátmi na *HNF1B* mutačný screening. Prenatálne pozorované bilaterálne symetricky zväčšené obličky bez prítomnosti malformácie žlčovodu so zvýšenou koncentráciou β -mikroglobulínu vo fetálnom sére (DECRAMER *et al.* 2007) sú indikáciou na genetickú analýzu *HNF1B*. Zväčšenie obličiek môže byť spôsobené mikrocystami, ale taktiež aj tubulárnou dilatáciou či renálnou dyspláziou. U prenatálnych vzoriek je hodnota MDR v analýzach *PKHD1* génu nízka, naopak u *HNF1B* bola miera detekcie 14%. V súbore pacientov som mala 3 DNA vzorky plodov a z toho 2 boli *HNF1B* pozitívne, MDR je teda v hodnote 67%. Mutácie asociované s *HNF1B* sú príčinou 10-30% zo všetkých prenatálne diagnostikovaných CAKUT prípadov. Preto je efektívnejšie v prípade odhalenia ARPKD podobných príznakov v 2. trimestri tehotenstva analyzovať najprv gén *HNF1B*, ktorý môže byť pravdepodobnejšou príčinou výskytu prenatálnych renálnych cýst a komplikácií ako *PKHD1* mutácie. Vzhľadom na najčastejší charakter *HNF1B* mutácií je optimálne iniciovať mutačný screening metódou MLPA na detekciu delécií a duplikácií. Možnosť pozitívneho výsledku je totiž až 50%, polovicu detekovaných mutácií tvoria delécie väčšieho rozsahu (CLISSOLD *et al.* 2016). Vo svojej práci som však detekovala metódou MLPA len 20% podiel mutácií typu delécie väčšieho rozsahu. Majoritný podiel detekovaných mutácií (80%) tvorili jednobodové zámeny.

V súčasnosti čoraz viac gynekologických pracovísk uvádza do praxe screening obličiek na odhalenie prítomnosti cýst, ktorý sa robí v perinatálnom období. Pokiaľ sa pri screeningu potvrdí prítomnosť ARPKD podobných renálnych príznakov, je pravdepodobnejšie, že príčinou bude mutácia asociovaná s *HNF1B*.

Pre efektívne fungujúci proces molekulárnej genetickej analýzy génov *PKHD1* a *HNF1B* je esenciálna spolupráca klinických pracovísk/odborných lekárov s genetickým laboratóriom. Komunikácia, zdieľanie informácií a dôslednosť na oboch stranách sú predpokladmi na stanovenie správnej diagnózy v čo možno najkratšom čase. Ako príklad uvediem spoluprácu s patológom pri umelo prerušených tehotenstvách – nález z pitvy plodu z umelo prerušeného tehotenstva môže na základe histologického usporiadania cýst predikovať, či sa jedná o ARPKD podozrenie alebo je vhodné testovať iný gén. Avšak v realite sa stáva, že genetické laboratórium obdrží správu z pitvy aj niekoľko mesiacov po uskutočnení mutačnej analýzy génu.

Technický pokrok v oblasti sekvenačných metód so sebou prináša možnosti rýchlejšie a kvantitatívnejšie preskúmať génové varianty a na základe klinických prejavov pacienta vyvodit' genotypovo-fenotypovú koreláciu. Pokiaľ však chceme čo najpresnejšie predikovať fenotypový variant spôsobený detekovanou mutáciou, je potrebné poznať, čo daná mutácia spôsobí. Mutačný screening je z hľadiska diagnostiky postačujúcim nástrojom s ohľadom na potreby pacienta. Z hľadiska výskumu a posúvania nových poznatkov dopredu by bolo určite zaujímavé pozrieť sa na samotný vzťah identifikovaných mutácií *HNF1B* k expresii *PKHD1*. Na základe literatúry vieme, že *HNF1B* má ako DNA-väzobnú doménu, tak i aktivačnú doménu na C terminálnom konci. Aktivačná doména je esenciálnym faktorom aktivácie *PKHD1* promótoru. Pokiaľ dochádza k delícii aktivačnej domény, *HNF1B* je aj naďalej schopný viazať sa na špecifické väzobné miesto na *PKHD1* promótoře, avšak nedochádza k aktivácii promótoru a iniciácii transkripcie. Podľa HIESBERGER *et al.* (2005) je k aktivácii promótoru *PKHD1* potrebná prítomnosť aktivačnej domény na C konci a dimerizácia proteínu.

V mojom súbore pacientov som identifikovala 3 mutácie, pri ktorých došlo k predčasnej terminácii translácie - pričom výsledný proteínový produkt bol skrátený natoľko, že nedisponoval aktivačnou doménou na C konci. V prípade alelickej delécie celého génu *HNF1B* chýbala jednak aktivačná doména a proteín bol vo forme monoméru. V prípade identifikovanej missense mutácie došlo k zámene AMK na pozícii 376, pričom k správnej funkcii aktivačnej domény je potrebná integrita oblasti 388 – 471 AMK. Identifikovaná zámena treonínu na izoleucín sa teda nachádza pomerne blízko kritickej oblasti. Bolo by zaujímavé pozrieť sa ako vplývajú tieto proteínové formy *HNF1B* na expresiu *PKHD1*. Na tento účel by sme mohli použiť napr. jednohybridný kvasinkový test pomocou ktorého môžeme sledovať nezávisle od seba aktivitu väzobnej domény a aktivačnej domény. Na overenie väzby *HNF1B* na promótor sa dajú použiť rôzne metódy, napr. stopovanie DNázou I alebo gélová

spomaľovacia analýza. Aktiváciu transkripcie by bolo možné overiť použitím reportérových génov. Ak by sme si pripravili konštrukt pozostávajúci z proximálnej časti *PKHDI* promótoru a pripojeného génu napr. pre GFP, po vnesení do organizmu by bolo možné detekovať mieru transkripcie. V prípade, že by sme mali k dispozícii vzorku tkaniva daného pacienta, bolo by možné detekovať expresiu *PKHDI* prostredníctvom real-time PCR. V tomto bode treba podotknúť, že práca s ľudským DNA materiálom je v istých ohľadoch náročnejšia na organizáciu a design experimentov. Diagnostické laboratórium plní prvotný účel diagnostikovania ochorenia vďaka mutačnému screeningu. Vyššie zmienené kroky sú skôr podnetom na zamyslenie. Ako optimálne riešenie vidím spoluprácu genetického laboratória s iným vedeckým pracoviskom. Efektívna spolupráca by zaiste mohla priniesť lepšie porozumenie transkripčnej komplexity ARPKD.

Súčasný trend molekulárnej diagnostiky sa uberať smerom od Sangerovho sekvenovania k NGS. Mnou používanú techniku NGS na princípe pyrosekvenovania firma Roche prestala k 31. 12. 2015 podporovať a v súčasnosti pracuje na vývoji sekvenačnej technológie 3. generácie. Prevalentná väčšina diagnostických laboratórií v súčasnosti používa NGS techniku podporovanú firmou Illumina, ktorej princípom je tzv. „sekvenovanie syntézou“. Tento spôsob so sebou prináša početné výhody s porovnaním voči pyrosekvenovaniu - mnohonásobne vyššiu kapacitu, kratšie čítania, nižšiu cenu prepočítanú na 1 osekvenovanú bázu či kratšiu dobu trvania sekvenačnej reakcie.

Využívanie NGS techník v molekulárnej diagnostike dedičných ochorení sa teší posledné obdobie čoraz väčšej obľube vďaka výhodám, ktoré so sebou prináša. Práve v oblasti cíliopatií, kde sa jednotlivé fenotypové prejavy prekrývajú a ťažko sa dá na základe klinických príznakov jednoznačne určiť gén zodpovedný za klinický stav, je prístup NGS efektívnym riešením. Najmä u génov ako napr. *PKHDI*, *PKDI* a *PKD2*, kde je priame sekvenovanie zdĺhavé a obtiažne (veľkého počtu exónov u *PKHDI* alebo prítomnosť pseudogénov u *PKDI*), je možnosť umiestnenia génu na panel spolu s ostatnými génmi výhodná. Na druhej strane, u génu ako je *HNF1B*, s malým počtom exónov, je niekedy výhodnejšie pristúpiť k priamej sekvenácii ako ísť cestou NGS. Vzhľadom na cenu jednej sekvenačnej reakcie s použitím NGS prístupu nie je možné sekvenovať jednotlivých pacientov po jednom v priebehu času. Je potrebné počkať, kým súbor pacientov dosiahne dostatočný počet a potom naraz pripraviť potrebné kroky k NGS. Úskalím situácie je fakt, že vzorky z odborných pracovísk prichádzajú do genetického laboratória postupne v priebehu mesiacov – rokov. S ohľadom na pacienta je preto niekedy výhodnejšie použiť priame sekvenovanie, z ktorého získame výsledok

do 24 hod. Vzhľadom na nízky počet exónov a dobre optimalizovaný proces prípravy génovej knižnice a samotnej sekvenácie preto zastávam názor, že v prípade *HNFB* je stále Sangerovo sekvenovanie efektívnejším nástrojom za účelom priamej diagnostiky.

8. Súhrn

V tejto práci som sa venovala problematike komplexity autozomálne recesívnej polycystickej choroby obličiek, ktorá sa vyznačuje cystickými obličkami s dilatovanými zbernými kanálkami, vrodenou pečevnou fibrózou a dilatáciou žľčovodov. V rámci experimentálnej časti som analyzovala gén *HNF1B* u 28 pacientov použitím metód molekulárnej genetickej analýzy. U týchto pacientov už bola predtým vykonaná analýza *PKHD1* génu, avšak neboli u nich identifikované 2 mutácie potrebné na stanovenie diagnózy.

Výsledky mojej práce sa dajú zhrnúť do nasledujúcich bodov:

- ❖ v teoretickej časti som vytvorila komplexný prehľad toho, čo sa v súčasnosti vie o autozomálne recesívnej polycystickej chorobe obličiek
- ❖ naväzujúc na predchádzajúci mutačný screening *PKHD1* vykonaný Mgr. Lenou Obeidovou som zostavila súbor pacientov, u ktorých bola *PKHD1* analýza negatívna a spravila som genetickú analýzu génu *HNF1B*, ktorý je najčastejšou monogénnou príčinou vývojových abnormalít obličiek
- ❖ zaviedla som a optimalizovala spôsob detekcie jednobodových zámen génu *HNF1B*
- ❖ navrhla som set primerov pre všetky exóny génu *HNF1B* vrátane hraničných oblastí medzi exómom a intrónom tak, aby vyhovovali k účelom priameho sekvenovania i na pyrosekvenovanie
- ❖ analyzovala som súbor 28 pacientov, u ktorých som našla 1 nepopísanú missense mutáciu, 1 popísanú deléciu veľkého rozsahu, 1 nepopísanú bodovú inzerciu, 2 nonsense mutácie (1 popísanú a 1 nepopísanú) a 1 popísaný polymorfizmus
- ❖ na základe výsledkov mojej práce je možné uvažovať o zavedení prednostného mutačného screeningu génu *HNF1B* v prípadoch prenatálneho výskytu hyperechogenických (cystických) obličiek a v prípade detských pacientov s renálnymi komplikáciami podobnými ARPKD renálneho fenotypu.

9. Zoznam použitej literatúry

- Adalat, S., Woolf, A. S., Johnstone, K. A., Wirsing, A., Harries, L. W., Long, D. A., Hennekam, R. C., Ledermann, S. E., Rees, L., Van't Hoff, W., Marks, S. D., Trompeter, R. S., Tullus, K., Winyard, L., Cansick, J., Mushtaq, I., Dhillon, H. K., Bingham, C., Edghill, E. L., Shroff, R., Stanescu, H., Ryffel, G. U., Ellard, S., Bockenhauer, D. (2009). HNF1B Mutations Associate with Hypomagnesemia and Renal Magnesium Wasting. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20: 1123-1131.
- Adeva, M., El-Youssef, M., Rossetti, S., Kamath, P. S., Kubly, V., Consugar, M. B., Milliner, D. M., King, B. F., Torres, V. E., Harris, P. C. (2006). Clinical and molecular characterization defines a broadened spectrum of autosomal polycystic kidney disease (ARPKD). *Medicine*, 85: 1-21.
- Aggarwal, V., Krishnamurthy, S., Seth, A., Bingham, C., Ellard, S., Mukherjee, S. B., Aneja, S. (2010). The renal cysts and diabetes (RCAD) syndrome in a child with deletion of the hepatocyte nuclear factor-1 β gene. *Indian Journal of Pediatrics*, 77(12): 1429-1431.
- Badano, J. L., Mitsuma, N., Beales, P. L., Katsanis, N. (2006). The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 7: 125-148.
- Bai, Y., Pontoglio, M., Hiesberger, T., Sinclair, A. M., Igarashi, P. (2002). Regulation of kidney-specific Ksp-cadherin gene promoter by hepatocyte nuclear factor-1beta. *American Journal of Physiology*, 283(4): F839-F851.
- Barbacci, E., Reber, M., Ott, M. O., Breillat, C., Huetz, F., Cereghini, S. (1999). Variant hepatocyte nuclear factor 1 is required for visceral endoderm specification. *Development*, 126: 4795-4805.
- Bergmann, C., Bothmer, J. V., Bru, N. O., Frank, V., Fehrenbach, H., Hampel, T. (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.
- Bergmann, C., Kupper, F., Dornia, Ch., Chneider, F., Senderek, J., Zerres, K. (2005). Algorithm for Efficient *PKHD1* Mutation Screening in Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease (ARPKD). *Human Mutation*, 25: 225-231.
- Bergmann, C., Senderek, J., Kupper, F., Schneider, F., Dornia, Ch., Windelen, E., Eggermann, T., Rudnik-Schoneborn, S., Kirfel, J., Furu, L., Onuchic, L. F., Rossetti, S., Harris, P. C., Somlo, S., Guay-Woodford, L., Germino, G. G., Moser, M., Buttner, R., Zerres, K. (2004). *PKHD1* Mutations in Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease (ARPKD). *Human Mutation*, 23: 453-463.
- Bergmann, C., Senderek, J., Sedlacek, B., Pegiazoglou, I., Puglia, P., Eggermann, T., Rudnik-Schoneborn, S., Furu, L., Onuchic, L. F., De Baca, M., Germino, G. G., Guay-Woodford, L., Somlo, S., Moser, M., Buttner, R., Zerres, K. (2003). Spectrum of Mutations in the Gene for Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease (ARPKD/PKHD1). *Journal of the American Society of Nephrology*, 13: 76-89.
- Blyth, H., Ockenden, B. G. (1971). Polycystic disease of kidney and liver presenting in childhood. *Journal of Medical Genetics*, 8: 257-284.
- Bockenhauer, D., Jaureguierry, G. (2016). HNF1B-associated clinical phenotypes: the kidney and beyond. *Pediatric Nephrology*, 31: 707-714.
- Boddu, R., Yang, Ch., O'Connor, A. K., Hendrickson, R. C., Boone, B., Cui, X., Garcia-Gonzales, M., Igarashi, P., Onuchle, L. F., Germino, G. G., Guay-Woodford, L. M. (2014). Intragenic motifs regulate the transcriptional complexity of *Pkhd1*/PKHD1. *Journal of Molecular Modeling*, 92(10): 1045-1056.
- Brunskill, E. W., Aronow, B. J., Georgeas, K., Rumballe, B., Valerius, M. T., Aronow, J., Kaimal, V., Jegga, A. G., Yu, J., Grimmond, S., McMahon, A. P., Patterson, L. T., Little, M. H., Potter, S. S. (2008).

- Atlas of gene expression in the developing kidney at microanatomic resolution. *Developmental Cell*, 15: 781-791.
- Calvet, J. P. (2002). Cilia in PKD-letting it all hang out. *Journal of the American Society of Nephrology*, 13: 2614-2616.
- Cardenas-Rodriguez, M., Badano, J. L. (2009). Ciliary Biology: Understanding the Cellular and Genetic basic of Human Ciliopathies. *American Journal of Medical Genetics*, 151C: 263-280.
- Cartegni, L., Chew, S. L., Krainer, A. R. (2002). Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nature Reviews*, 3:285-296.
- Clissold, R. L., Shaw-Smith, CH., Turnpenny, P., Bunce, B., Bockenhauer, D., Kerecuk, L., Waller, S., Bowman, P., Ford, T., Ellard, S., Hattersley, A., Bingham, C. (2016). Chromosome 17q12 microdeletions but not intragenic HNF1B mutations link developmental kidney disease and psychiatric disorder. *Kidney International*, 90: 203-211.
- Coffinier, C., Barra, J., Babinet, C., Yaniv, M. (1999). Expression of the vHNF1/HNF1beta homeoprotein gene during mouse organogenesis. *Mechanisms of Development*, 89 (1-2): 211-213.
- Coffinier, C., Gresh, L., Fiette, L., Tronche, F., Schutz, G., Babinet, C., Pontoglio, M., Yaniv, M., Barra, J. (2002). Bile system morphogenesis defects and liver dysfunction upon targeted deletion of HNF1beta. *Development*, 129: 1829-1838.
- Čihák, R. (2008). Anatomie 1. vyd. 2. Praha : Grada Publishing, ISBN 80-7169-970-5.
- Decramer, S., Parant, O., Beaufile, S., Clauin, S., Guillou, C., Kessler, S., Aziza, J., Bandin, F., Schanstra, J. P., Bellane-Chantelot, C. (2007). Anomalies of the *TCF2* Gene Are the Mains Cause of Fetal Bilateral Hyperechogenic Kidneys. *Journal of Molecular Modeling*, 18: 923-933.
- Denamur, E., Delezoide, A., Alberti, C., Bourillon, A., Gubler, M., Bouvier, R., Pascaud, O., Elion, J., Grandchamp, B., Michel-Calemard, L., Missy, P., Zaccaria, I., Le Nagard, H., Gerard, B., Loirat, Ch., the Société Française de Foetopathologie (2010). Genotype-phenotype correlations in fetuses and neonates with autosomal recessive polycystic kidney disease. *Kidney International*, 77: 350-358.
- Dubois-Laforgue, D., Bellanné-Chantelot, C., Charles, P., Jacqueline, A., Larger, E., Ciangura, C., Saint-Martin, C., Rastel, C., Keren, B., Timsit, J.; Monogenic Diabetes Study Group of the Société Francophone du Diabète (SFD). (2017). Intellectual disability in patients with MODY due to hepatocyte nuclear factor 1B (HNF1B) molecular defects. *Diabetes&Metabolism*, 43(1): 89-92.
- Duval, H., Michel-Calemard, L., Gonzales, M., Loget, P., Beneteau, C., Buenerd, A., Joubert, M., Denis-Musquer, M., Clemenson, A., Chesnais, A. L., Blesson, S., De Pinieux, I., Delezoide, A. L., Bonyhay, G., Bellanné-Chantelot, C., Heidet, L., Dupré, F., Collardeau-Frachon, S.(2016). Fetal anomalies associated with HNF1B mutations: report of 20 autopsy cases. *Prenatal Diagnostics*, 36(8): 744-751.
- Escalante, A. E., Barbolla, L. J., Ramírez-Barahona, S., Eguiarte, L. E. (2014). The study of biodiversity in the era of massive sequencing. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85:1249-1264.
- Faguer, S., Chassaing, N., Bandin, F., Prouheze, C., Arveiler, B., Rooryck, C., Nogier, M., Chauveau, D., Calvas, P., Decramer, S. (2011). A 17q12 chromosomal duplication associated with renal disease and esophageal atresia. *European Journal of Medical Genetics*, 54: e437-440.
- Fischer, D., Jacoby, U., Pape, L., Ward, Ch. J., Kuwertz-Broeking, E., Renken, C., Nizze, H., Querfeld, U., Rudolph, B., Mueller-Wiefel, D. E., Bergmann, C., Haffner, D. (2009). Activation of the AKT/mTOR pathway in autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Nephrology Dialysis Transplantation*, 24: 1819-1827.
- Frank, V., Zerres, K., Bergmann, C. (2014). Transcriptional Complexity in Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 9: 1729-1736.

- Gega, A., Kozal, M. J. (2011). New technology to detect low-level drug-resistant HIV variants. *Future Virology*, 6: 1-26.
- Glazer, A. M., Wilkinson, A. W., Backer, Ch. B., Lapan, S. W., Gutzman, J. H., Cheeseman, I. M., Reddien, P. W. (2010). The Zn Finger protein Iguana impacts Hedgehog signaling by promoting ciliogenesis. *Developmental Biology*, 337: 148-156.
- Gondra, L., Décramer, S., Chalouhi, G. E., Muller, F., Salomon, R., Heidet, L. (2016). Hyperechogenic kidneys and polyhydramnios associated with HNF1B gene mutation. *Pediatric Nephrology*, 31(10): 1705-1708.
- Gooz, M. B., Maldonado, E. N., Dang, Y., Amria, M. Y., Higashiyama, S., Abboud, H. E., Lemasters, J. J., Bell, P. D. (2014). ADAM17 promotes proliferation of collecting duct kidney epithelial cells through ERK activation and increased glycolysis in polycystic kidney disease. *American Journal of Physiology – Renal Physiology*, 307: F551-F559.
- Gresh, L., Fischer, E., Reimann, A., Tanguy, M., Garbay, S., Shao, X., Hiesberger, T., Fiette, L., Igarashi, P., Yaniv, M., Pontoglio, M. (2004). A transcriptional network in polycystic kidney disease. *The EMBO Journal*, 23: 1657-1668.
- Guay-Woodford, L. M. (2014). Autosomal recessive polycystic kidney disease: the prototype of the hepato-renal fibrocystic diseases. *Journal of Pediatric Genetics*, 3(2): 89-101.
- Guay-Woodford, L. M., Muecher, G., Hopkins, S. D., Avner, E. D., Germino, G. G., Guillot, A. P. (1995). The severe perinatal form of autosomal recessive polycystic kidney disease maps to chromosome 6p21.1-p12: implications for genetic counseling. *American Journal of Medical Genetics*, 56: 1101-1107.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1): 57-70.
- Harris, P. C., Rossetti, S. (2004). Molecular genetics of autosomal recessive polycystic kidney disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, 81: 75-85.
- 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.
- Hiesberger, T., Shao, X., Gourley, E., Reimann, A., Pontoglio, M., Igarashi, P. (2005). Role of the Hepatocyte Nuclear Factor-1 β (HNF1 β) C-terminal Domain in *Pkhd1* (ARPKD) Gene Transcription and Renal Cystogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 280 (11): 10578-10586.
- Horikawa, Y., Iwasaki, N., Hara, M., Furuta, H., Hinokio, Y., Cockburn, B. N., Lindner, T., Yamagata, K., Ogata, M., Tomonaga, O., Kuroki, H., Kasahara, T., Iwamoto, Y., Bell, G. I. (1997). Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (*TCF2*) associated with MODY. *Nature Genetics*, 17: 384–385.
- Cheret, C., Doyen, A., Yaniv, M., Pontoglio, M. (2002). Hepatocyte nuclear factor 1 alpha controls renal expression of the Npt1-Npt4 anionic transporter locus. *Journal of Molecular Biology*, 322(5): 929-941.
- Igarashi, P., Shao, X., McNally, B. T., Hiesberger, T. (2005). Roles of HNF-1 β in kidney development and congenital cystic diseases. *Kidney International*, 68: 1944-1947.
- Ilic, D., Kovacic, B., McDonagh, S., Jin, F., Baumbusch, C., Gardner, D. G., Damsky, C. H. (2003). Focal adhesion kinase is required for blood vessel morphogenesis. *Circulation Research*, 92: 300-307.
- Jeong, T. K., Yoon, J. H., Jee, M. P., Myung J. K., Young, N. P., Jae, S. L. (2006). Caroli's Syndrome with Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease in a Two Month Old Infant. *Yonsei Medical Journal*, 47 (1): 131-134.
- Kaplan, B. S. (1988). Variable expression of autosomal recessive polycystic kidney disease and congenital hepatic fibrosis within a family. *American Journal of Medical Genetics*, 29: 639-647.

- Kim, I., Fu, Y., Hui, K., Moeckel, G., Mai, W., Li, C., Liang, D., Zhao, P., Ma, J., Chen, X., George Jr., A. L., Coffey, R. J., Feng, Z., Wu, G. (2008). Fibrocystin/Polyductin Modulates Renal Tubular Formation by Regulating Polycystin-2 Expression and Function. *Journal of the American Society of Nephrology*, 19: 455-468.
- Lens, X. M. (1997). An integrated genetic and physical map of the autosomal recessive polycystic kidney disease region. *Genomics*, 41: 463-466.
- Liu, H. X., Cartegni, L., Zhang, M. Q., Krainer, A. R. (2001). A mechanism for exon skipping caused by nonsense or missense mutations in BRCA1 and other genes. *Nature Genetics*, 27: 55-58.
- Lu, H., Galeano, M. C. R., Ott, E., Kaeslin, G., Kausalya, P. J., Kramer, C., Ortiz-Bruchle, N., Hilger, N., Metzis, V., Hiersche, M., Tay, S. Y., Tunningley, R., Vij, S., Courtney, A. D., Whittle, B., Wuhl, E., Vester, U., Hartleben, B., Neuber, S., Frank, V., Little, M. H., Epting, D., Papathanasiou, P., Perkins, A. C., Wright, G. D., Hunziker, W., Gee, H. Y., Otto, E. A., Zerres, K., Hildebrandt, F., Roy, S., Wicking, C., Bergmann, C. (2017). Mutations in DZIP1L, which encodes a ciliary-transition-zone protein, cause autosomal recessive polycystic kidney disease. *Nature Genetics*, ePub ahead of print.
- Lubarsky, B., Krasnow, M. A. (2003). Tube morphogenesis: making and shaping biological tubes. *Cell*, 112: 19-28.
- Madariaga, L., Morinie`re, V., Jeanpierre, C., Bouvier, R., Loget, P., Martinovic, J., Dechelotte, P., Leporrier, N., Thauvin-Robinet, Ch., Jensen, U. B., Gaillard, D., Mathieu, M., Turlin, B., Attie-Bitach, T., Salomon, R., Gubler, M., Antignac, C., Heidet, L. (2013). Severe Prenatal Renal Anomalies Associated with Mutations in HNF1B or PAX2 Genes. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 8: 1179-1187.
- Mai, W., Chen, D., Ding, T., Kim, I., Park, S., Cho, S., Chu, J., Liang, D., Wang, N., Wu, D., Li, S., Zhao, P., Zent, R., Wu, G. (2005). Inhibition of Pkhd1 Impairs Tubulomorphogenesis of Cultured IMCD Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 16: 4389-4409.
- Mefford, H. C., Clauin, S., Sharp, A. J., Moller, R. S., Ullmann, R., Kapur, R., Pinkel, D., Cooper, G. M., Ventura, M., Ropers, H. H., Tommerup, N., Eichler, E. E., Bellanne-Chantelot, C. (2007). Recurrent reciprocal genomic rearrangements of 17q12 are associated with renal disease, diabetes, and epilepsy. *The American Journal of Human Genetics*, 81: 1057-1069.
- Missler, M., Sudhof, T. C. (1998). Neurexins: three genes and 1001 products. *Trends Genetics*, 14:20-26.
- Modrek, B., Lee, C. J. (2003). Alternative splicing in the human, mouse and rat genomes is associated with an increased frequency of exon creation and/or loss. *Nature genetics*, 34: 177-180.
- Moser, M., Matthiesen, S., Kirfel, J., Bergmann, C., Senderek, J., Rudnik-Schoneborn, S., Zerres, K., Buettner, R. (2005). A Mouse Model for Cystic Biliary Dysgenesis in Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease (ARPKD). *Hepatology*, 41: 1113-1121.
- Nagamani, S. C., Erez, A., Shen, J., Li, C., Roeder, E., Cox, S., Karaviti, L., Pearson M., Kang, S. H., Sahoo, T., Lalani, S. R., Stankiewicz, P., Sutton, V. R., Cheung, S. W. (2010). Clinical spectrum associated with recurrent genomic rearrangements in chromosome 17q12. *European Journal of Human Genetics*, 18: 278-284.
- Nagasawa, Y., Matthiesen, S., Onuchic, L. F. (2002). Identification and characterization of Pkhd1, the mouse orthologue of the human ARPKD gene. *Journal of the American Society of Nephrology*, 13: 2246-2258.
- Nakanishi, K., Sweeney Jr., W. E., Macrae Dell, K., Cotton, C. U., Avner, E. D. (2001). Role of CFTR in autosomal recessive polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 12: 719-725.

- Nakanishi, K., Sweeney, W. E. Jr., Zerres, K., Guay-Woodford, L. M., Avner, E. D. (2000). Proximal tubular cysts in fetal human autosomal recessive polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 11: 760-763.
- Naylor, R. W., Przepiorski, A., Ren, Q., Yu, J., Davidson, A. J. (2013). *HNF1B* Is Essential for Nephron Segmentation during Nephrogenesis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 24: 77-87.
- Obeidová, L. (2011). Mutační analýza genu TRPC6 u pacientů s nefrotickým syndromem. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze. Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce: doc. MUDr. Jana Reiterová PhD.
- Obeidova, L., Seeman, T., Elisakova, V., Reiterova, J., Puchmajerova, A., Stekrova, J. (2015). Molecular genetic analysis of *PKHD1* by next-generation sequencing in Czech families with autosomal recessive polycystic kidney disease. *BMC Medical Genetics*, 16:116.
- Onuchic, L. F., Furu, L., Nagasawa, Y., Hou, X., Eggermann, T., Ren, Z., Bergmann, C., Senderek, J., Esquivel, E., Zeltner, R., Rudnik – Schoneborn, S., Mrug, M., Sweeney, W., Avner, E. D., Zerres, K., Guay-Woodford, L. M., Somlo, S., Germino, G. G. (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. *American Journal of Human Genetics*, 70: 1305-1317.
- Pazour, G. J. (2004). Intraflagellar Transport and Cilia-Dependent Renal Disease: The Ciliary Hypothesis of Polycystic Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15: 2528-2536.
- Pazour, G. J., Rosenbaum, J. L. (2002). Intraflagellar transport and cilia-dependent diseases. *Trends in Cell Biology*, 12:551-555.
- Pazour, G. J., Witman, G. B. (2003). The vertebrate primary cilium is a sensory organelle. *Current Opinion in Cell Biology*, 15: 105-110.
- Pontoglio, M., Prié, D., Cheret, C., Doyen, A., Leroy, Ch., Froquel, P., Velho, G., Yaniv, M., Friedlander, G. (2000). HNF1 α controls renal glucose reabsorption in mouse and man. *EMBO reports*, 1(4): 359-365.
- Priolo, C., Henske, E. P. (2013). Metabolic reprogramming in polycystic kidney disease. *Nature Medicine*, 19: 407-409.
- Raaijmakers, A., Corveleyn, A., Devriendt, K., van Tienen, T. P., Allegaert, K., Dyck, M. V., van den Heuvel, L., Kuypers, D., Claes, K., Mekahli, D., Levtchenko, E. (2015). Criteria for HNF1B analysis in patients with congenital abnormalities of kidney and urinary tract. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 30: 835-842.
- Rebouissou, S., Vasiliu, V., Thomas, C., Bellane-Chantelot, C., Bui, H., Chrétien, Y., Timsit, J., Rosty, C., Laurent-Puig, P., Chauveau, D., Zucman-Rossi, J. (2005). Germline hepatocyte nuclear factor 1alpha and 1beta mutations in renal cell carcinomas. *Human Molecular Genetics*, 14(5): 603-614.
- Rohatgi, R., Zamilowicz, B., Vergara, M., Woda, C., Kim, P., Satlin, L. M. (2004). Cyst fluid composition in human autosomal recessive polycystic kidney disease. *Pediatric Nephrology*, 20: 552-553.
- Rossetti, S., Harris, P. C. (2007). Genotype-Phenotype Correlations in Autosomal Dominant and Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18: 1374-1380.
- Roux, P. P., Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68(2): 320-344.

- Rowe, I., Boletta, A. (2014). Defective metabolism in polycystic kidney disease: potential for therapy and open questions. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 29: 1480-1486.
- Rowe, I., Chiaravalli, M., Mannella, V., Ulisse, V., Quilici, G., Pema, M., Song, X. W., Xu, H., Mari, S., Qian, F., Pei, Y., Musco, G., Boletta, A. (2013). Defective glucose metabolism in polycystic kidney disease identifies a new therapeutic strategy. *Nature Medicine*, 19(4): 488-493.
- Ryffer, G. U. (2012). HNF1b. In Yusuf D *et al.*: The Transcription Factor Encyclopedia, *Genome Biology*, 13:R24.
- Sato, Y., Harada, K., Kizawa, K., Sanzen, T., Furubo, S., Yasoshima, M., Ozaki, S., Ishinashi, M., Nakunuma, Y. (2005). Activation of the MEK/ERK5 cascade is responsible for biliary dysgenesis in a rat model of Caroli's disease. *American Journal of Pathology*, 166: 49-60.
- Sekimizu, K. (2004). The zebrafish iguana locus encodes Dzip1, a novel zinc-finger protein required for proper regulation of Hedgehog signalling. *Development*, 131: 2521-2532.
- Sweeney Jr., W. E., Avner, E. D. (2006). Molecular and cellular pathophysiology of autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Cell and Tissue Research*, 326: 671-685.
- Šmarda, J. (2007). Biologie pro psychology a pedagogy. Vyd. 2. Praha: Portál. ISBN 978-80-7367-343-347.
- Thomas, R., Sanna-Cherchi, S., Warady, B. A., Furth, S. L., Kaskel, F. J., Gharavi, A. G. (2011). HNF1B and PAX2 mutations are a common cause of renal hypodysplasia in the CKiD cohort. *Pediatric Nephrology*, 26(6): 897-903.
- Toriyama, M., Lee, C., Taylor, S. P., Duran, I., Cohn, D. H., Bruel, A.-L., Tabler, J. M., Drew, K., Kelley, M. R., Kim, S., Park, T. J., Braun, D., Pierquin, G., Biver, A., Wagner, K., Malfroot, A., Panigrahi, I., Franco, B., Al-lami, H. A., Yeung, Y., Choi, Y. J., University of Washington Center for Mendelian Genomics, Duffourd, Y., Faivre, L., Rivière, J.-B., Chen, J., Liu, K. J., Marcotte, E. M., Hildebrandt, F., Thauvin-Robinet, Ch., Krakow, D., Jackson, P. K., Wallingford, J. B. (2016). The ciliopathy-associated CPLANE proteins direct basal body recruitment of intraflagellar transport machinery. *Nature Genetics*, 48(6): 648-656.
- Tran, P. V., Sharma, M., Li, X., Calvet, J. P. (2014). Developmental Signaling: Does It Bridge the Gap Between Cilia Dysfunction and Renal Cystogenesis? *Birth Defects Research*, 102: 159-173.
- Trojan, S., Langmeier, M. (2003). Lékařská fyziologie, vyd. 4., přeprac. a dopl. Praha: Grada Publishing, ISBN 80-247-0512-5.
- Tu, M., Perkins, R., Valentine, C. R. (2000). Predicted changes in pre-mRNA secondary structure vary in their association with exon skipping for mutations in exons 2,4 and 8 of the Hprt gene and exon 51 of the fibrillin gene. *Mutation Research*, 432: 15-32.
- Vander, A. J., Sherman, J. H., Luciano, D. H. (1990). Human Physiology: The mechanisms of body function. 5. ed. New York: McGraw-Hill Publishing Company, ISBN 0-07-066969-4.
- Veizis, I. E., Cotton, C. U. (2005). Abnormal EGF-dependent regulation of sodium absorption in ARPKD collecting duct cells. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 288: F474-F482.
- Wallace, D. P. (2011). Cyclic AMP-mediated cyst expansion. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1812 (10): 1291-1300.
- Wang, S., Zhang, J., Nauli, S. M., Li, X., Starremans, P. G., Luo, Y., Roberts, K. A., Zhou, J. (2007). Fibrocystin/polyductin, Found in the Same Protein Complex with Polycystin-2, Regulates Calcium Responses in Kidney Epithelia. *Molecular and Cellular Biology*, 27(8): 3241-3252.
- Warburg, O. (1956). On the Origin of Cancer Cells. *Science*, 123: 309-314.

- Ward, C. J., Hogan, M. C., Rossetti, S., Walker, D., Sneddon, T., Wang, X., Kubly, V., Cunningham, J. M., Bacallao, R., Ishibashi, M., Milliner, D. S., Torres, V. E., Harris, P. C., (2002). The gene mutated in autosomal recessive polycystic kidney disease encodes a large, receptor-like protein. *Nature Genetics*, 30: 259-269.
- Ward, Ch. J., Yuan, D., Masyuk, T. V., Wang, X., Punyashthiti, R., Whelan, S., Bacallao, R., Torra, R., LaRusso, N. F., Torres, V. E., Harris, P. C. (2003). Cellular and subcellular localization of the ARPKD protein; fibrocystin is expressed on primary cilia. *Human Molecular Genetics*, 12 (20): 2703-2710.
- Weber, S., Moriniere, V., Knüppel, T., Charbit, M., Dusek, J., Ghiggeri, G. M., Jankauskienė, A., Mir, S., Montini, G., Peco-Antic, A., Wühl, E., Zurowska, A.M., Mehls, O., Antignac, C., Schaefer, F., Salomon, R. (2006). Prevalence of mutations in renal developmental genes in children with renal hypodysplasia: results of the ESCAPE study. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(10): 2864-2870.
- Welling, L. W., Grantham, J. J. (1991). Cystic and developmental diseases of the kidney. In: Brenner BMR, Rector FC (eds) *The kidney*. Saunders, Philadelphia, 1657-1694.
- Xiong, H. Y., Alipanahi, B., Lee, L. J., Bretschneider, H., Merico, D., Yuen, R. K., Hua, Y., Gueroussov, S., Najafabadi, H. S., Hughes, T. R., Morris, Q., Barash, Y., Krainer, A. R., Jovic, N., Scherer, S. W., Blencowe, B. J., Frey, B. J. (2015). RNA splicing. The human splicing code reveals new insights into the genetic determinants of disease. *Science*, 347(6218): 1254806.
- Yamaguchi, T., Hempson, S. J., Reif, G. A., Hedge, A. M., Wallace, D. P. (2006). Calcium restores a normal proliferation phenotype in human polycystic kidney disease epithelial cells. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17: 178-187.
- Yamaguchi, T., Nagao, S., Wallace, D. P., Belibi, F. A., Cowley, B. D., Pelling, J. C., Grantham, J. J. (2003). Cyclic AMP activates B-Raf and ERK in cyst epithelial cells from autosomal-dominant polycystic kidneys. *Kidney International*, 63: 1983-1994.
- Yamaguchi, T., Wallace, D. P., Magenheimer, B. S., Hempson, S. J., Grantham, J. J., Calvet, J. P. (2004). Calcium restriction allows cAMP activation of the B-Raf/ERK pathway, switching cells to a cAMP-dependent growth-stimulated phenotype. *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 40419-40430.
- Zerres, K., Mucher, G., Bachner, L., Deschenes, G., Eggermann, T., Kääriäinen, H., Knapp, M., Lennert, T., Misselwitz, J., Von Muhldahl, K. E., Neumann, H. P. H., Pirson, Y., Rudnik – Schoneborn, S., Steinbicker, V., Wirth, B., Schäfer, K. (1994). Mapping of the gene for autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD) to chromosome 6p21-cen. *Nature Genetics*, 7: 429-432.
- Zerres, K., Mucher, G., Becker, J., Steinkamm, C., Rudnik-Schoneborn, S., Heikkilä, P., Rapola, J., Salonen, R., Germino, G. G., Onuchic, L., Somlo, S., Avner, E. D., Harman, L. A., Stockwin, J. M., Guay-Woodford, L. M. (1998). Prenatal Diagnosis of Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease (ARPKD): Molecular Genetics, Clinical Experience, and Fetal Morphology. *American Journal of Medical Genetics*, 76: 137-144.
- Zerres, K., Senderek, J., Rudnik-Schoneborn, S., Eggermann, T., Kunze, J., Mononen, T., Kääriäinen, H., Kirfel, J., Moser, M., Buettner, R., Bergmann, C. (2004). New options for prenatal diagnosis in autosomal recessive polycystic kidney disease by mutation analysis of the *PKHD1* gene. *Clinical Genetics*, 66: 53-57.
- Zhang, M. Z., Guan, K. L. (2000). Activation of B-Raf kinase requires phosphorylation of the conserved residues Thr598 and Ser601. *EMBO Journal*, 19: 5429-5439.