

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra genetiky a mikrobiologie

**Autozomálně dominantní polycystická choroba ledvin a mutační  
analýza genu PKD1**

Stanislava Svobodová

Bakalářská práce

Praha, letní semestr 2006

Školitel: Ing. Jitka Štekrová

# Obsah

ABSTRAKT.....	2
1. ÚVOD.....	3
2. PROJEVY ADPKD.....	3
3. GEN.....	4
3.1. Gen PKD1.....	4
3.2. Gen PKD2.....	4
4. PROTEINOVÉ PRODUKTY GENU PKD1 A PKD2.....	5
4.1. Polycystin-1.....	5
4.2. Polycystin-2.....	6
5. FUNKCE POLYCYSTINŮ.....	7
5.1. Polycystinový komplex.....	7
5.2. Polycystin-2 jako intracelulární vápníkový kanál.....	8
5.3. Interakce buňka-buňka / buňka-matrix.....	9
5.4. Signální dráhy.....	9
5.5. Cíle.....	10
6. CYTOGENEZE.....	11
6.1. Proliferace a apoptóza.....	11
6.2. Sekrece.....	13
7. FENOTYPOVÁ HETEROGENITA ONEMOCNĚNÍ.....	14
7.1. Modifikující faktory.....	15
7.2. Teorie druhého úderu.....	16
8. VLASTNÍ PRÁCE.....	17
8.1. Vyšetřený soubor osob.....	17
8.2. Detekce mutací.....	17
8.3. Výsledky.....	18
8.4. Diskuze.....	19
8.5. Závěr.....	20
9. PODĚKOVÁNÍ.....	20
10. TABULKY A OBRÁZKY.....	21
11. POUŽITÁ LITERATURA.....	35

## ABSTRAKT

Autozomálně dominantní polycystická choroba ledvin (autosomal dominant polycystic kidney disease-ADPKD) je jedno z nejčastějších dědičných renálních onemocnění, jehož hlavním projevem je tvorba cyst v ledvinách. Tato nemoc může být zapříčiněna mutací v genu PKD1 či v genu PKD2. Gen PKD1 se nalézá na 16. chromozomu a je zodpovědný za 85-90% případů. Gen PKD2 je lokalizovaný na 4. chromozomu. Proteinové produkty těchto dvou genů polycystin-1 (PC-1) a polycystin-2 (PC-2) se nalézají převážně na ledvinovém tubulárním epitelu. PC-1 je membránový glykoproteinový receptor, který se účastní signalizace na bazálním povrchu ve fokálních adhezích, na laterálním povrchu v buněčných adhezních spojeních a na membráně primárního cília. Je schopen interagovat s mnoha proteiny, karbohydráty a lipidy. PC-2 je transmembránový protein, který může fungovat jako kationtový kanál. Tyto dva proteiny se mohou účastnit stejné signální dráhy a tvořit polycystinový komplex. Jejich mutace vedou ke stejnému fenotypu, ale s různým stupněm poškození. Detekce mutací je velmi důležitý krok pro porozumění molekulárních mechanismů ADPKD. V neduplikované oblasti genu PKD1 byla u 12 nepříbuzných rodin s ADPKD provedena mutační analýza metodou DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) s následnou sekvenací. Byly detekovány 3 mutace a 4 polymorfizmy.

# 1. ÚVOD

Polycystické choroby ledvin jsou jednou z hlavních příčin renálního selhání (end-stage renal disease-ESRD). Vyznačují se přítomností mnohočetných cyst v ledvinách. Mohou vzniknout sporadicky jako vývojová abnormalita nebo mohou být získány v dospělosti. Nejčastější jsou formy dědičné. Trpí jimi asi 6,5 milionů lidí na celém světě (Bissler JJ, Dixon BP 2005). Dědičné formy jsou způsobeny germinální mutací v jednom genu a dědí se podle Mendelových zákonů. Patří mezi ně autozomálně dominantní (AD) a autozomálně recesivní (AR) polycystické choroby ledvin, dřevňová cystická choroba a nefronoftíza. Vůbec nejčastějším dědičným onemocněním ledvin je polycystická choroba AD typu (autosomal dominant polycystic kidney disease-ADPKD). Je to pomalu postupující porucha, která se vyskytuje v populaci s frekvencí 1:500-1:1000 živě narozených dětí (Manno M 2005, Merta M, Reiterová J et al. 2004, Pei Y 2005). Je důvodem pro hemodialýzu u 7 až 10% pacientů (Wilson PD 2004). Věk začátku nemoci, vážnost symptomů, podíl postižených, u kterých dojde k ESRD, či smrt jsou v této skupině nemocí velmi proměnlivé.

Dnešní postupy se snaží vysvětlit mechanismus, který vede k těmto onemocněním, a navrhnout nové postupy léčby.

## 2. PROJEVY ADPKD

Mutace v genu PKD1 a PKD2 mají podobné patologické projevy. U pacientů s vazbou onemocnění na gen PKD2 se symptomy nemoci objeví později a tudíž k ESRD ledvin dojde u menšího počtu postižených. Předpokládaná délka života je u těchto pacientů delší (69 let) než u pacientů s vazbou onemocnění na gen PKD1 (53 let) (Pei Y 2005). Průměrná závažnost onemocnění u pacientů s mutací v genu PKD1 je stejná jak u mužů tak u žen. Ženy s poškozeným genem PKD2 mají lepší prognózu než muži (věk nástupu ESRD u mužů je 68 let a u žen 76 let) (Albert CM, Harris PC 2005). U 77% pacientů s ADPKD dojde k ESRD nebo zemřou do 70 let (Merta M, Reiterová J et al. 2004).

Byly zaznamenány případy, kdy onemocnění v rodině s ADPKD nemělo vazbu ani na gen PKD1 ani na gen PKD2. To poukazuje na možnost vazby této nemoci na gen PKD3-asi 5% ze všech ADPKD případů (Jauregui AR, Barr MM 2005). Gen PKD3 ještě zatím nebyl identifikován (Manno M 2005). Pacienti s mutací jak v PKD1 genu tak v PKD2 genu (transheterozygoti) mají horší průběh onemocnění než pacienti s mutací pouze v jednom genu (Wilson PD 2004).

Pro ADPKD je typické extrémně velké cystické zvětšení obou ledvin (obrázek 1). Vedle přítomnosti sta až tisíce ledvinových cyst od 10 do 20 centimetrů v průměru jsou klinicky signifikantní i cysty v játrech (hlavně u žen), jícnu, pankreatu, slezině, vaječnících, varlatech, nadvarleti, prostatě, štítné žláze, močovém měchýři, děloze, mozku i v seminálních váčcích, což může být u mužů spojováno s neplodností (Peces R, Venegas JL 2005). Pacienti často trpí hypertenzí, hematurií, polyurií, akutními či chronickými bolestmi beder nebo břicha, anémií, nefrolitiázou (Merta M, Reiterová J et al. 2004), bolestmi hlavy, prolapsí mitrální chlopně (Sessa A 2004) a jsou náchylní k opakovaným infekcím močových cest a k ledvinovým kamenům (Wilson PD 2004). U těchto pacientů se až 5x častěji než u normální populace objevuje intrakraniální aneurizma a až o deset let dříve u nich nastane subarachnoidální krvácení způsobené prasknutím aneurizma (Kanne JP, Talner LB 2004). ADPKD může být

také spojena s rakovinou pankreatu (Naitoh H 2005) a s různými vaskulárními nemocemi. Kardiovaskulární komplikace jsou vůbec hlavní příčinou smrti u pacientů s ADPKD (Kip SN et al. 2005).

### 3.GEN

Polycystická choroba AD typu může být způsobena celou řadou různých mutací v genech PKD1 a PKD2, které jsou rozšířeny po celé jejich sekvenci. Zahrnují delece, inserce, posuny čtecích rámců, poruchy v sestřihu mRNA, nonsense či missense mutace. Většina mutací jsou nonsense mutace, které vedou k syntéze zkráceného proteinu. Mutace v genech PKD1 a PKD2 jsou převážně jedinečné pro jednotlivé rodiny.

#### 3.1.Gen PKD1

Gen PKD1 (MIM 601313), zodpovědný za ADPKD u 85 % rodin, se nalézá na krátkém raménku chromozomu 16 (16p13.3). Obsahuje 46 exonů a pokrývá 52kb genomové DNA, která kóduje 14kb mRNA transkript z 12 909 nukleotidů. Vykazuje alelickou heterogenitu s více než 200 různými dosud identifikovanými mutacemi. Většina z nich je unikátní pro jednu rodinu, což ilustruje komplexní, na genu založenou diagnózu této nemoci. Více mutací zatím bylo nalezeno v 3' části PKD1 genu. Mutace v 5'oblasti jsou spojovány se závažnějším průběhem nemoci (průměrný věk nástupu ESRD v 5'oblasti je 53 let a v 3' 56 let). Tato asociace není vztažena k typu mutace, ale pravděpodobně ke štěpení proteinového produktu genu PKD1, polycystinu-1, na dva různé proteiny, kde mutace má na každou polovinu proteinu potenciálně různé fenotypické následky (Albert CM, Harris PC 2005).

Dvě třetiny PKD1 genu mají minimálně 6 duplikátů proximálně na 16. chromozomu, což velmi dlouhou dobu komplikovalo mutační analýzu. Pro mutační analýzu exonů 1-33 se využívá dlouhé polymerázové řetězové reakce (long-range PCR) s jedním primerem v duplikované oblasti a jedním v neduplikované oblasti s následným použitím hnízdové (nested) PCR a detekčních metod DGGE (denaturing gradient gel electroforesis) nebo PTT (protein truncation test). Pro amplifikaci úseku obsahující exony 34-46, které jsou jedinečné, se používá standardní PCR.

#### 3.2.Gen PKD2

Gen PKD2 (MIM 173910) na 4. chromozomu (4q21-23) má 15 exonů. Jeho genomová sekvence zabírá 68 kb a přepisuje se do 5,4 kb mRNA, která obsahuje 2 904 nukleotidů. Bylo v něm nalezeno více než 75 mutací (Wilson PD 2004). Detekce mutací v PKD2 genu není ztížena přítomností duplikátů a k detekci mutací se nejčastěji používá metoda SSCP (single strand conformation polymorphism), heteroduplexní analýza anebo přímá sekvenace. Jako spolehlivá detekční metoda pro oba PKD geny byla již také použita DHPL (denaturing high-performance liquid) chromatografie. Mutace jsou rozšířeny po celém PKD2 genu. Zatím nebylo popsáno žádné místo, kde by se mutace vyskytovaly nejčastěji (tzv. hot spot). Avšak velmi často jsou popisovány mutace v oblasti CpG dinukleotidů (hlavně v exonu 1), která přispívá možnou metylací a následnou spontánní deaminací cytozinu na thymin k substitucím aminokyselin (Merta M, Reiterová J et al. 2004). Protože mutace v první velké extracelulární

smyčce způsobují největší postižení fenotypu, předpokládá se, že tato část polycystinu-2, proteinového produktu genu PKD2, má důležitou roli v interakcích s jinými proteiny (Štekrová J et al. 2004). Mutace v genu PKD2 jsou zodpovědné za onemocnění asi u 14% rodin (Merta M, Reiterová J et al. 2004).

## 4.PROTEINOVÉ PRODUKTY GENU PKD1 a PKD2

### 4.1.Polycystin-1 (PC-1)

Jde o protein složený z 4 302 aminokyselin o předpokládané molekulové hmotnosti 460 kDa s dlouhou extracelulární N-terminální doménou (3 000 aminokyselin), 11 transmembránovými doménami (1 000 aminokyselin) a C-terminálním intracelulárním koncem (225 aminokyselin) (obrázek 2).

V extracelulární části PC-1 se nalézá mnoho různých domén. Jedná se například o 2 repetice bohaté na leucin, které jsou schopné vázat kolagen, fibronektin a laminin, WSC (a cell-wall integrity and stress-response component) homologní doménu, která podporuje domněnku, že tento protein je schopný vázat karbohydráty, prvních 16 imunoglobulinových repetic (unikátní PKD domény), které váží receptor protein tyrozin fosfatázy, doménu LDL-A (low-density lipoprotein-A), C-typ lektinové domény, jejíž vazba na karbohydráty je závislá na vápníku, 15 dalších imunoglobulinových domén s  $\beta$  listy a schopností vázat zatím nedefinované ligandy, REJ doménu (receptor for egg jelly homology domain) a potenciální proteolytickou oblast (GPS), která se nachází blíže k membráně a v níž může docházet k rozštěpení PC-1 (Wilson PD 2004; Wilson PD 2001; Igarashi P, Somlo S 2002).

Zanedlouho po zveřejnění sekvence PC-1 vědci, kteří pracovali na fertilizaci ježovky, zjistili významnou sekvenční homologii mezi PC-1 a proteinovým receptorem REJ ze spermatozoa ježovky. Už název tohoto proteinu napovídá, že rozeznává proteiny ve slizovém obalu, který obklopuje vajíčko. Vazbou na svůj cíl aktivuje spermatickou akrozomální reakci, pro níž je charakteristický rychlý vstup kationtů včetně vápníku (Sutters M, Germino GG 2003). Připomíná to na vápníku závislou signalizaci PC-1 (Delmas P et al. 2004).

PLAT (polycystin/lipoxigenasa/alfa-toxin) doména je lokalizována v 1. cytoplazmatické smyčce mezi transmembránovými doménami 1 a 2. Předpokládá se, že je důležitá pro interakce membrána-protein či protein-protein. Bylo dokázáno, že tato doména interaguje s regulační podjednotkou kasein kinázy II (CK2 $\beta$ /KIN-10), která je schopná modulovat funkci a ciliární lokalizaci PKD-2 *C.elegans*, což je homolog lidského PC-2 (Hu et al. 2006).

C-konec polycystinu-1 obsahuje několik potenciálních míst fosforylace, která se pravděpodobně uplatňují v přenosu signálu, a několik míst pro vazbu různých proteinů. Mezi tato místa patří doména svinutého klubka, která zprostředkovává vazbu s PC-2, G-protein-aktivační místo (GPAS), 2 na prolin bohaté oblasti (SH3, WW), specifická tyrozinová místa pro fosforylaci c-src a fokální adhezní kinázou (focal adhesion kinase-FAK), která se nalézá v komplexech fokální adheze, a serinová fosforylační oblast pro proteinkinázu A (PKA) a proteinkinázu X (PRKX). Tyto kinázy mohou fosforylovat PC-1 a tím regulovat jeho signalizaci (Albert CM, Harris PC 2005).

Polycystin-1 může být štěpen působením mechanického stimulu. Tímto štěpením se uvolní C-terminální konec PC-1, který vstupuje do jádra a iniciuje signální dráhy (Chauvet V et al 2004).

Jako potenciální ligandy vázající se na PC-1 by mohly sloužit některé fokál-adhezní proteiny. Například talin, vinculin, paxilin. PC-1 může také interagovat s E-kadheriny, kateniny, PC-1 a PC-2. Bylo by zajímavé zkoumat, zdali heterotypické interakce PC-1 s dalšími adhezními molekulami nebo hemofylní interakce s PC-1 důležité pro prostorovou intercelulární adhezi mohou regulovat polycystinovou signalizaci (Delmas P 2004).

Polycystin-1 je exprimován v dospělých ledvinách méně než během jejich vývoje. V dospělých ledvinách je lokalizován především v oblasti sběrných kanálků na apikální a laterální straně buněk, kde se účastní interakce buňka-buňka. Během vývoje ledvin se vyskytuje nejvíce polycystinu-1 v bazální části buňky a zúčastňuje se hlavně kontaktu buňka-matrix.

## 4.2. Polycystin-2 (PC-2)

Polycystin-2 (obrázek 3) je tvořen 968 aminokyselinami s předpokládanou molekulovou hmotností 110 kDa.

PC-2 se nachází převážně v ledvinách, ve svalech, neuronech, srdci, vaječnicích, varlatech (Igarashi P, Somlo S 2002) a je také hojně exprimován v apikální membráně lidského syncytiotrofoblastu, velmi složité epiteliální tkáň, která je esenciální pro transport látek mezi matkou a fetem (Montalbetti N et al. 2005). V dospělých ledvinách je polycystin-2 exprimován více než polycystin-1, a to hlavně ve vzestupném raménku Henleovy kličky.

Ačkoliv jeho funkce jako neselektivního kationtového kanálu byla demonstrována v mnoha modelových systémech, přesná subcelulární lokalizace polycystinu-2 v tubulárních epiteliálních buňkách ledvin je stále sporná. Existují dvě hypotézy o jeho umístění. Říkají, že PC-2 se nachází na endoplazmatickém retikulu, nebo na plazmatické membráně. Jak je ale obecně známo, jeho COOH konec obsahuje retenční signál pro endoplazmatické retikulum. Mnoho mutovaných genů u pacientů s cystickou chorobou ledvin (mezi nimi i PKD2) kóduje proteiny, které byly detekované na primárních cílích. Protože ještě nebylo prokázáno, jestli endoplazmatické retikulum zasahuje do primárních cílů, je s velkou pravděpodobností polycystin-2, alespoň v tomto případě, přítomen na membráně (Witzgall R 2005).

Transport PC-2 mezi endoplazmatickým retikulem a Golgiho aparátem může být směřován transportními proteiny PACS-1 a PASC-2 (phosphofurin acid cluster proteins), které se vážou na kyselý klastr v C terminální doméně PC-2. Vázat se mohou pouze v tom případě, když PC-2 je fosforylován kasein kinázou 2 (Delmas P 2005; Koettgen M, Walz G 2005).

N-oblast (224 aminokyselin) i C-terminální část (288 aminokyselin) polycystinu-2 je lokalizována intracelulárně. Mezi těmito oblastmi je 6 transmembránových domén. C-terminální část obsahuje doménu svinutého klubka, místo pro fosforylaci a motiv zvaný jako EF ruce, který může vázat vápník. Transmembránové segmenty PC-2 jsou asi z 50% totožné s posledními 6 z 11 transmembránových domén PC-1 (Igarashi P, Somlo S 2002).

Pátá smyčka polycystinu-2 interaguje s proteinem Hax-1, který se váže na F-aktinvazebný protein, kortaktin, v kvasinkovém hybridu (Štekrová J et al. 2004). C-terminální doména interaguje přímo s tropomyozinem-1 (Delmas P 2004) a se srdečním troponinem I (Koettgen M, Walz G 2005). Tato oblast polycystinu-2 se také váže na jiný polycystin-2 (homodimerizace) anebo na doménu svinutého klubka v C-terminální oblasti polycystinu-1. Vazba CD2 proteinu a PC-2 byla zjištěna během vývoje ledvin, kdy CD2 protein přispívá k diferenciaci epitelových buněk v ledvině ve stádiu metanefros (Merta M, Reiterová J et al. 2004). PC-2 interaguje s CD-2 asociovaným proteinem (CD2AP), který reguluje endocytózu receptoru 1 pro vaskulární endoteliální růstový faktor. Další studie budou muset ukázat, zdali se CD2AP účastní endocytózy PC-2 (Koettgen M, Walz G 2005). Polycystin-2 také interaguje s proteinem PIGEA-14 (polycystin-2 interactor, Golgi- a endoplasmatic reticulum- associated

protein s molekulovou hmotností 14 kDa) (Witzgall R 2005). PIGEA-14 má schopnost vázat se na jiný protein PIGEA-14 a na GM130. GM130 je periferní membránový protein, který je přes vazbu s meristylóvaným proteinem GRASP65 asociován s cis-kompartmentem Golgiho aparátu (Hidaka S et al 2004). Tyto interakce mohou reprezentovat důležitou část transpórní dráhy polycystinu-2. Jak N tak i C konec polycystinu-2 asociují s  $\alpha$ -aktininy, což jsou aktinvázející a aktinsvazující proteiny důležité v organizaci cytoskeletu, v buněčné adhezi, proliferaci a migraci. A proto interakce mezi polycystinem-2 a  $\alpha$ -aktininem mohou hrát důležitou roli v abnormální buněčné adhezi, proliferaci a migraci pozorované u polycystické choroby ledvin AD typu (Li Q et al 2005).

Průměr póru polycystin-2-ového kanálu byl zjištěn pomocí procházejících organických iontů se zvyšující se molární hmotností. Jeho minimální rozměr se odhaduje na 11 Å. Vzhledem k této velikosti průměru se předpokládá, že primární stav tohoto kanálu in vivo je zavřený, aby nedošlo k vybití kationtového gradientu přes plazmatickou membránu a k excesivnímu úniku vápníku z endoplazmatického retikula (Anyatonwu GI et al. 2005).

## 5.FUNKCE POLYCYSTINŮ

Polycystiny mají multifunkční roli v různých tkáních a orgánech během embryogeneze a dalšího vývoje. Pro lepší porozumění funkce polycystinů je nezbytné nejprve identifikovat s nimi interagující proteiny.

### 5.1.Polycystinový komplex

Protože ADPKD s vazbou na gen PKD1 či gen PKD2 má podobné patofyziologické projevy, předpokládá se, že polycystin-1 a polycystin-2 jsou součástí multiproteinového receptor/ion-kanálového komplexu. Na druhou stranu odlišná buněčná a subcelulární exprese polycystinů poukazuje na to, že mají i nezávislé funkce (Delmas P. 2005).

Studie funkce polycystinů jsou limitované nízkými hladinami exprese endogenních polycystinů v nativních buňkách a malým úspěchem v experimentech, kde se mají exprimovat celé rekombinantní polycystiny. Tyto problémy opoždily vývoj účinných modelových systémů, ve kterých by polycystinová funkce mohla být posuzována. Aby se předešlo těmto omezením, upřednostňuje se snaha nadměrně exprimovat polycystiny v sympatických neuronech, v nově vyvinutém buněčném expresním systému pro zjištění funkce polycystinů. Tento přístup má výhody nad jinými klasickými heterologními systémy, protože sympatické neurony mohou pojmout dlouhé transkripty (nad 14kb) a poskytnout rozmanité, dobře charakterizované endogenní iontové kanály (Delmas P 2004).

Společná exprese PC-1 a PC-2 v CHO (Chinese hamster ovary) buňkách stimuluje translokaci PC-2 na plazmatickou membránu a produkuje neselektivní kationtový kanál, v kterém polycystiny spolu interagují přes C konce (obrázek 4). Tento kanál je propustný pro bivalentní a trivalentní kationty podobně jako homomerní PC-2 kanál. Zamezí-li se interakci C konců polycystinů, kanálová aktivita není pozorována. To znamená, že spojení PC-1 a PC-2 je potřeba pro transport PC-2 na plazmatickou membránu. Zda-li PC-1 je část kanálového komplexu, anebo působí-li pouze jako chaperon/kotvící partner, není ještě známo (Delmas P 2005).



Uvnitř tohoto komplexu PC-1 a PC-2 na sebe recipročně působí. Zdá se, že asociace PC-1 potlačuje aktivitu PC-2, kterou je nutné kontrolovat, aby nebyla pro buňku škodlivá. Na druhou stranu vazba PC-2 na PC-1 reprimuje schopnost PC-1 aktivovat G-proteiny. Tato vzájemná represe může být zviditelněna použitím protilátek proti extracelulární REJ doméně PC-1. Na základě těchto zjištění je usuzováno, že mutace v PC-1 či PC-2, které ruší tvorbu polycystinového komplexu, iniciují abnormální G-proteinovou signální dráhu v buňkách koexprimující oba polycystiny (Delmas P et al. 2001).

Aktivace PC-2 je další otázkou, na kterou vědci hledají odpověď. Nelze vyloučit možnost, že regulace PC-1 proteinem PC-2 je zprostředkována zatím neznámým ligandem. Bylo zjištěno, že není závislá na G-proteinové signalizaci ani na signalizaci fosfolipázy C. Ve spojitosti s dokázanými interakcemi mezi PC-1 a PC-2 se nabízí řešení, že vztah mezi PC-1 a PC-2 se odehrává přes konformační změnu. To by znamenalo, že shodná aktivace PC-2 a G-proteinu je díky reorientaci C konců PC-1 a PC-2, která vede na jednu stranu k uvolnění vazebného místa pro G-protein a na druhou stranu ke konformační změně PC-2 kanálu. Avšak přesná molekulární stechiometrie polycystinového komplexu není dosud známá (Delmas P 2004).

Celkově se zatím uvažuje o 4 hlavních signálních drahách, ve kterých spolu interagují PC-1 a PC-2 (obrázek 5).

## 5.2. Polycystin-2 jako intracelulární vápníkový kanál

V membráně endoplazmatického retikula PC-2 funguje jako výstupní vápníkový kanál, který zesiluje průchod vápníku iniciovaný receptorem, který interaguje s inozitol 1,4,5-trifosfátem (IP3). PC-2 spolu s ryanodinovými receptory a receptorem vázajícím IP3 působí jako hlavní kanály, které vypouštějí vápník z endoplazmatického retikula v buňkách, kde je důležitá rychlá vápníková signalizace. Proto aktivita PC-2 je esenciální v dráždivých buňkách pro rychlou odpověď na stimuly (Koulen P et al 2005).

Kanál tvořený PC-2 má velkou konduktanci (80-160 pS) a je přímo aktivován cytoplazmatickým vápníkem (Delmas P 2005).

Zatím ještě není známo, zdali doména EF ruce na C konci PC-2, která je schopna vázat vápník, se účastní na vápníku závislé modulaci PC-2. Je však nutné poznamenat, že mutantní PC-2, který díky předčasné terminaci peptidického řetězce postrádá C konec, ztrácí citlivost na vápník (Delmas P 2004).

Fosforylace aminokyseliny serinu v pozici 812 polycystinu-2 kasein kinázou 2 má za následek významné zvýšení citlivosti PC-2 kanálu na vápník. Substituce serinu za alanin (S812A), která vede k ztrátě fosforylace PC-2, posouvá závislost na vápníku tím, že PC-2 S812A má maximální pravděpodobnost otevření v desetinásobně vyšší koncentraci vápníku (3 $\mu$ M) než nativní PC-2. Z toho plyne, že maximální pravděpodobnost otevření PC-2 kanálu divokého typu se odehrává v takových koncentracích vápníku, při kterých nefosforylované formy zůstávají uzavřené. Tento mechanismus regulace představuje esenciální krok pro normální funkci PC-2. Nově nasyntetizované PC-2 v membráně endoplazmatického retikula jsou pravděpodobně citlivější na vápník, protože bývají často fosforylovány. Jejich častější fosforylace je umožněna aktivací kasein kinázy 2 proteinkinázou kasein kinázy 2, která je příležitostně spojena s endoplazmatickým retikulem. Fosforylovaný PC-2 ztrácí schopnost uniknout z tohoto kompartmentu. Pouze defosforylace serinu v pozici 812 usnadní jeho translokaci na membránu. Proto je nepravděpodobné, že by defosforylovaná forma PC-2 byla aktivována intracelulárním vápníkem, když je exprimována na plazmatické či ciliární membráně (Delmas P 2005).

### 5.3. Interakce buňka-buňka / buňka-matrix

Recentní postupy ukazují, že polycystin-1 jako membránový receptor je za a) lokalizován v lumenu na apikálním primárním ciliu (obrázek 6), za b) že snímá morfogenetické signály z extracelulárního prostředí na bazálním povrchu buněk v komplexech fokální adheze (obrázek 7), které zprostředkovávají buňka-matrix adhezi, větvení tubulogenezi a buněčnou migraci (Albert C.M., Harris P.C. 2005), a za c) že spolu s PC-2 se nalézá v komplexech buněčných adhezních spojení na laterálním povrchu buněk (obrázek 8). Dosud není známo, zdali je PC-2 v adhezních spojeních lokalizován v plazmatické membráně anebo v endoplazmatickém retikulu blízko membrány (Delmas P et al. 2004).

Polycystin-1 je důležitý pro tvorbu desmozómů epiteliálních buněk, kde zprostředkovává buněčnou adhezi. Jeho interakce s E-kadherinem v adhezních spojeních s cytoplazmatickými kateniny stabilizuje adhezní spojení a zachovává plně diferenciovaný renální epitel. Četná pozorování ukazují, že v nepřítomnosti PC-1 nemohla být desmozomální spojení řádně sestavena a že se v adhezních spojeních vyskytoval N-kadherin namísto E-kadherinu (Russo RJ et al. 2005; Roitbak T et al. 2004). E-kadheriny jsou důležité v adhezi buňka-buňka během diferenciaci tkání a jsou spojeny s aktinovým cytoskeletem asociací s  $\alpha\beta\gamma$ -kateniny (Sutters M, Germino GG 2003). Z toho plyne, že abnormální exprese polycystinu-1 způsobuje poruchu regulace celulárních adhezních komplexů, což vede ke zvýšené proliferaci, ztrátě polaritě a cytogenezi.

Aktivace PC-1 se odehrává přes tvorbu multiproteinových komplexů a modifikaci fosforylací, které by mohly působit jako molekulový přepínač určující, zdali PC-1 obohatí buňka-buňka či buňka-matrix komplexy. Stimulací intracelulárních transdukčních signálních kaskád a regulací fetální genové transkripce aktivuje PC-1 příslušné buněčné dělení epiteliálních buněk renálních tubulů a normální diferenciaci v ledvinách. Toto je porušeno u pacientů s polycystickými chorobami, což má za následek tvorbu cyst. (Wilson P.D. 2004)

Cystické PKD buňky vykazují zvýšenou přilnavost ke kolagenu typu II, která je zprostředkována integriny ( $\alpha_2\beta_1$ ). Toto zjištění nabízí otázku, jestli by PC-1 a/nebo PC-2 mohl ovlivnit integrinem zprostředkovanou signalizaci (Albert CM, Harris PC 2005).

### 5.4. Signální dráhy

Z pozorování, že mutace v genu PKD1 či PKD2 způsobují prakticky identické klinické symptomy a že PC-1 a PC-2 mohou spolu interagovat, se usuzuje, že společně fungují v jedné signální dráze anebo jako partneři v heteromerním polycystinovém komplexu. Předpokládá se, že tyto komplexy jsou součástí regulační dráhy, která se účastní kontroly membránového transportu iontů v cílových tkáních poškozených u ADPKD pacientů. Charakterizace funkce polycystinových komplexů je pomalá a naše znalosti o interakci mezi rekombinantními PC-1 a PC-2 jsou v současné době limitované. Dosud byla prokázána vzájemná regulace subcelulární lokalizace PC-1 a PC-2 a modulace G-proteinové signalizace polycystinu-1 polycystinem-2 (Delmas P 2004).

Heterologní expresní systémy prokázaly, že celý PC-1 aktivuje 4 hlavní třídy G-proteinů ( $G\alpha_{i/o}$ ,  $G\alpha_{q/11}$ ,  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_{12/13}$ ). Nejběžněji interaguje s  $G\alpha_i$  a  $G\alpha_s$ , které regulují aktivitu adenylát cyklázy (Delmas P 2005). Nenormálně exprimovaný C konec polycystinu-1 může aktivovat i jiné třídy G-proteinů (Rac 1 a cdc42), což má za následek modifikaci aktivity transkripčního faktoru AP-1 (aktivační protein-1) v kultivovaných renálních epiteliálních buňkách (Le NH et al. 2005). Studie C konce PC-1 ukázaly, že C konec také může vázat a

stabilizovat molekulu RGS7 (regulator of G-protein signalling molecule), která je normálně rychle degradována (Delmas P et al 2002).

Exogenní nadměrná exprese celého PC-1 v MDCK buňkách (Madin-Darby canine kidney) má za následek snížení proliferační rychlosti, zvýšenou resistenci k apoptóze a vývoj větviček se tubulů spíše nežli cyst. Tato možná role PC-1 může být spojena s aktivací Janus kinázy (JAK2) a signálních transducerů a aktivátorů transkripce (STAT) jedné třetiny dráhy, která vede k zastavení buněčného cyklu v G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fázi na PC-2 závislým způsobem (Sutters M, Germino GG 2003; Albert CM, Harris PC 2005).

PC-1 stimuluje nukleární translokaci transkripčního faktoru NFAT (nuclear factor of activated T cells) přes G-proteinem zprostředkovanou aktivaci fosfolipázy C a fosfatázy kalcineurin, jejíž aktivita je také závislá na vápníku. Tato dráha spojuje polycystin-1-novou vápníkovou signalizaci s regulací buněčné diferenciaci a apoptózy přes NFAT cílové geny (Delmas P 2005).

Z jiných pokusů na MDCK buňkách vyplývá, že heterologně exprimovaný PC-1 zrychluje pokles buněčné odpovědi k vápníku, která byla vyvolána ATP, zvýšením zpětné absorpce vápníku do endoplazmatického retikula a následným snížením stimulu pro vstup cytoplazmatického vápníku. Je možné, že buněčná dediferenciaci, sekrece tekutin a proliferace mohou proto nastat při ADPKD jako následek poruchy homeostáze endoplazmatického retikula, cytoplazmatické homeostáze a nenormálního vstupu vápníku do buněk (Hooper K et al. 2005).

Polycystin-1 je důležitý pro posílení či udržení Wnt signalizace během důležitých stádií renální tubulogeneze. Jeho C terminální konec aktivuje Wnt signální dráhu, která zahrnuje inhibici glykogensyntázkinázy (GSK)<sup>1</sup> 3β a následnou posttranslační stabilizaci solubilního β-kateninu, která vede k jeho akumulaci v cytoplasmě a v jádře. V jádře β-katenin interaguje se členy TCF/LEF rodiny transkripčních faktorů, které regulují genovou expresi (Kim, E et al. 1999). Toto poukazuje na to, že jemná souhra mezi polycystiny a E-hadherin/β-kateninovým komplexem v laterální membráně je důležitá pro regulaci adheze, diferenciaci a maturace, esenciální kroky pro morfogenezi ledvin.

Intracelulární signální dráhy, které jsou aktivovány PC-1 a PC-2, jsou zobrazeny na obrázku 9.

Genetické změny polycystinů mohou porušit polycystinovou signalizaci, a tím poskytnout pravděpodobný mechanismus patogeneze ADPKD.

## 5.5.Cílie

Cílie jsou komplexní orgány, které jsou vyplněny mikrotubuly. Jsou přítomny na buňkách v primárních smyslových tkáních. Jsou zkoumány na řasách *Chlamydomonas* (Pan J et al. 2005). Ve fyziologických ledvinách má skoro každý buněčný typ 1 nebo 2 solitární primární cílium vypadající jako apikální vlas, který vyčnívá do lumenu tubulů. Defekty v proteinech potřebných pro uspořádání a funkci primárních cílií (cystin, polaris, inverzin, kinezin II) způsobují polycystickou chorobu ledvin (Delmas P et al. 2004). Vůbec první klíčový nález spojující primární cílium s polycystickou chorobou ledvin bylo zjištění, že polaris v orpk myši (Oak Ridge Polycystic Kidney (orpk) mouse - obsahuje mutovaný Tg737 gen, který porušuje expresi proteinu polaris) je ortologní k itraflagelárnímu transpotnímu (IFT) proteinu IFT88 v *Chlamydomonas*. Další poznatky přicházejí ze studií na ortologech ADPKD genů *C. elegans*, *lov-1* a *pkd2* (Albert CM, Harris PC 2005). Pohyblivá cília nejsou normálně exprimována renálními tubulárními buňkami savčích ledvin (Ong AC et al. 2005).

Soudí se, že cílie fungují jako senzor toku, poněvadž se mohou reverzibilně ohýbat podle rychlosti toku v renálních tubulech. Ohyb cília způsobí vstup vápníku do buňky přes

mechanicky senzitivní kanály v ciliární membráně. Tento vápníkový signál je zesílen vstupem dalšího vápníku, který je indukovan inozitol 1,4,5-trifosfátem a/nebo ryanodinovým receptorem, z vápníkových zásobních kompartmentů a rozšířen do sousedních buněk přes vodivé spoje. Podle toho se soudí, že cílie mají roli mechanoreceptorů, které přeměňují energii stimulu do změny v iontové propustnosti. Tento mechanismus mechanotransdukce závisí na integritě celkové cytoskeletární struktury epitelálních buněk (Delmas P 2005).

B Yoder a jeho kolegové dokázali, že polycystin-1 a 2 jsou strategicky umístěny na cílích kulturovaných renálních epitelálních buněk (Ong AC, Wheatley DN 2003). Zdá se, že právě PC-2 je tento mechanosenzitivní kanál, protože mechanotransdukce je zablokována v přítomnosti specifických protilátek proti PC-2 nebo v epitelálních buňkách izolovaných z PKD2 deficientních myší. PC-1 je pravděpodobně potřebný pro správné cílení a translokaci PC-2 na ciliární membránu. Proto se předpokládá, že polycystinový komplex působí jako mechanotransducer, který může reagovat na lumenální rychlost toku ohybem cílů (Delmas P et al. 2004) a tím regulovat velikost renální trubice (Nishio S et al. 2005) (obrázek 10).

Defekt v ciliární mechanosenzitivitě díky mutacím v genu PKD1 nebo PKD2 vede k narušení hladiny vápníku a k ztrátě normální kontroly nad buněčnou proliferací, která vede k tvorbě cyst.

Cílie jsou tvořeny mnohonásobnými ciliárními transportními drahami závislými na kinezinu II, OSM-3 a KLP-6. Tyto dráhy také lokalizují ciliární membránové proteiny jako polycystiny. Předpokládá se, že KLP-6 a polycystiny fungují jako evolučně konzervované ciliární součástky. Budoucí studie KLP-6 slibují nové cesty vedoucí k porozumění funkce cílů a polycystické chorobě ledvin AD typu (Peden EM, Barr MM 2005).

Cílie jsou důležité pro určení levoprávé symetrie během embryonálního vývoje (Praetorius HA, Spring KR 2005).

## 6.CYTOGENEZE

U autozomálně dominantní polycystické choroby ledvin vznikají tisíce sférických cyst různých velikostí v kůře nebo dřeni ledviny dilatací kterékoliv části nefronu. Zpočátku se cysty plní glomerulární filtrací, později ztrácejí napojení na nefron a další růst cyst je způsoben sekrecí tekutiny hyperplastickou epitelální výstelkou převážně přes sekundární chloridový transport (Ruggenenti P et al. 2005). Za expanzi cyst je zodpovědné prodloužení buněk a z větší části zvýšení jejich počtu. V pokročilém stádiu cytogeneze ztrácí 75% cyst spojení s nefronem (Merta M, Reiterová J et al. 2004) (obrázek 11).

### 6.1. Proliferace a apoptóza

Kontrolovaná rovnováha mezi buněčnou proliferací a programovanou buněčnou smrtí (apoptózou) je esenciální pro normální růst a diferenciaci ledvin a pro udržení normální renální struktury po narození. Díky kombinované funkci polycystinů jsou fyziologické tubulární buňky udržovány ve stavu terminální diferenciaci a jejich proliferace je přísně kontrolována. Ztráta funkce jednoho z proteinů zapříčiněná mutací v genu PKD1 či PKD2 způsobí, že tubulární buňky se přemění do méně diferenciovaného stavu, který je více náchylný k proliferaci, což

vede k tvorbě cyst. Naštěstí tento stav není spojen se zvýšeným maligním potenciálem. Cysty se zvětšují v průběhu mnoha desetiletí. Renální parenchyma a renální cévní systém je progresivně ničen a může nastat selhání ledvin ( Al-Bhala L, Akhtar M 2005).

Tato proliferace je spojena se zvýšenou expresí PCNA (proliferating cell nuclear antigen), Ki-67 a protoonkogenů c-myc a c-fos. Pomocí jejich imunoznačení je v cystických epiteliálních buňkách ADPKD pacientů detekována vysoká mitotická rychlost in vitro i in vivo (Nishio S et al. 2005).

Na druhé straně dochází v ADPKD ledvinách během cytogeneze ke zvýšené apoptóze, která může zničit většinu normálního parenchymu, a tak dovolit proliferaci cystického epitelu. Tato abnormální apoptóza je doprovázená aktivací proapoptotické kaspázy-3. (Merta M, Reiterová J et al. 2004). Za použití krysího modelu PKD (Han:SPRD krysí model) bylo zjištěno, že inhibice této kaspázy inhibitorem IDN-8050 snižuje apoptózu a proliferaci v cystických a necystických tubulech, inhibuje zvětšení ledvin a cytogenezi a zmírňuje ztrátu funkce ledvin, čímž zpomaluje průběh nemoci při PKD (Tao Y et al. 2005).

EGF (epidermal growth factor) hraje důležitou roli v expanzi renálních cyst. Epiteliální buňky cyst pacientů s ADPKD vykazují zvýšenou aktivitu ve vztahu k tomuto růstovému faktoru. EGF je ligandem pro EGF receptor (EGFR), což je receptor tyrozin kináza (receptor tyrosine kinase-RTK), která se vyskytuje na bazolaterální části membrány buněk tubulů, ale na buňkách cyst se nalézá na apikální membráně (Sweeney WE Jr et al. 2003; Merta M, Reiterová J et al. 2004; Tong Q, Stockand JD 2005) (obrázek 12). Jeho nadměrná exprese a abnormální lokalizace na apikální (luminální) membráně buněk vytváří soustavný koloběh autokrinní-parakrinní stimulace, která vede k tvorbě cyst (Wilson PD 2004). Zvýšená aktivita EGF receptoru se studuje například na BPK (Balb/C polycystic kidney) myších (Sweeney WE Jr et al. 2003). EGF vazbou na svůj receptor aktivuje ERK (p42/44 extracellular signal-regulated protein kinase/mitogen-activated protein kinase-MAP) dráhu, která snižuje amilorid-senzitivní absorpci sodíku přes ENaC (epiteliální heteromultimerní sodíkový kanál skládající se z  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$  podjednotek ) buněk sběrných kanálků (Veizis IE, Cotton CU 2005). Někteří autoři se domnívají, že EGF snižuje pravděpodobnost otevření tohoto kanálu snížením množství fosfatidylinozitol 4,5-bisfosfátu v membráně (Tong Q, Stockand JD 2005). Jiní zase, že způsobuje inhibici vstupu sodíku zvýšením intracelulárního vápníku (Shen JP, Cotton CU 2003). V protikladu s oběma názory bylo zjištěno, že exprese ENaC je zvýšena v luminální membráně orpk myši. Jeho nadměrná exprese způsobuje hyperabsorpci sodíkového kationtu, která by mohla vysvětlit velmi náhlý nástup závažné hypertenze u většiny osob s ADPKD (Olteanu D et al. 2005). EGF je také schopen stimulovat sekreci chloridového aniontu (Shen JP, Cotton CU 2003). S pomocí myších modelů je v současné době snaha najít inhibitory EGF-receptor tyrozin kináz, které by snížily její aktivitu, a tím by zpomalily expanzi cyst.

Další růstový faktor, jehož exprese je zvýšena ve tkáni ADPKD pacientů je KGF (keratinocyte growth factor), také znám jako FGF-7 (fibroblast growth factor-7) nebo HBGF-7 (heparin-binding growth factor-7). In vitro KGF stimuluje proliferaci epiteliálních buněk, které tvoří výstelku cyst, regulací exprese genů pro cykliny D1a P21(Waf1). Toto ukazuje na možnou roli KGF v patogenezi ADPKD (Mei C et al. 2005).

Proliferativní efekt na epiteliální buňky in vitro mají i další faktory. Cytokininy produkované cystickými buňkami, především prostaglandiny E1 a E2, zvyšují intracelulární hladinu cyklického adenosín monofosfátu (cAMP). (Merta M, Reiterová J et al. 2004). cAMP zvyšuje proliferaci epiteliálních buněk lemující renální cysty tím, že aktivuje PKA (cAMP dependentní proteinkinázu A), která fosforyluje/aktivuje B-Raf (kináza kinázy ERK/MAP kinázy). B-Raf následně fosforyluje MEK (kináza ERK/MAP kinázy) aktivuje ERK (Yamaguchi T et al. 2003). V buňkách z normálních ledvin cAMP růst inhibuje (Yamaguchi T et al. 2006). Ze studií vyplývá, že tuto transformaci cAMP růstového fenotypu z inhibice proliferace na zvýšenou proliferaci způsobuje exprese izolovaného cytozolického C konce PC-

1 (Sutters M, Germino GG 2003) a že tento cAMP citlivý PKD fenotyp podléhá defektům normální funkce PC-1. Recentní data ukazují, že pravděpodobně kombinace snížení hladiny intracelulárního vápníku a zvýšené hladiny cAMP v jinak normálních epiteliálních buňkách může vést k abnormální proliferaci. Možné vysvětlení se hledá v B-Raf, který leží na křižovatce 2 signálních drah, z nichž jedna je regulována vápníkem, který inhibuje MEK/ERK přes PI3K/Akt (protiproliferativní), a druhá může stimulovat MEK/ERK aktivaci přes cAMP/PKA (proliferativní) (obrázek 9). Očekává se, že ztráta signalizace závislé na vápníku, která je kontrolována PC-1, má za následek odblokování B-Raf. To by mohlo vést k B-Raf/ERK aktivaci a buněčné proliferaci v přítomnosti cAMP. Poškození PC-1 by také mohlo mít za následek sníženou  $G\alpha_i$  zprostředkovanou inhibici adenylát cyklázy, což by mohlo vést ke zvýšení hladiny cAMP a k aktivaci proliferativních drah (Delmas P 2005). Na modelech, které jsou ortology lidských cystických chorob ledvin, se zkoumá vliv antagonistů vazopresinového receptoru V2 (VPV2). Zjistilo se, že tyto antagonisté snižují renální hladinu cAMP a inhibují vývoj renálních nemocí, což poukazuje na jejich možné použití v klinických pokusech (Wang X et al. 2005).

Pro tvorbu cyst je také relevantní modifikovaná aktivita transkripčního faktoru AP-1 (aktivačního proteinu-1) způsobená nenormální expresí polycystinu-1 v kultivovaných renálních epiteliálních buňkách (Le NH et al. 2005). Ale i polycystin-2 může aktivovat na AP-1 závislou genovou transkripci. Ledvinová tkáň pacientů s polycystickou chorobou ledvin a hlodavčích modelů vykazuje zvýšenou expresi c-myc, který pozitivně reguluje prothymosin  $\alpha$  (Pro alfa). Tvorbou transgenních myšiček a klinickými studii se hledá, jestli c-myc a Pro  $\alpha$  mohou přispět k vývoji renálních cyst (Li KJ et al. 2005).

Patobiologickou roli v lidské polycystické chorobě ledvin hrají i lyzofosfolipidy, které jsou produkovány mnoha typy savčích buněk, např. krevními destičkami a makrofágy, jejichž receptory jsou asociovány s G-proteiny (Kamanna VS et al. 2005). Také androgeny umocňují proliferaci renálních buněk a zvětšení cyst, a to přes ERK1/2-dependentní a ERK1/2-nezávislý signální mechanismus v modelu Han:SPRD (Nagao S et al. 2005), čímž se mužské pohlaví stává rizikovým faktorem pro ADPKD.

Stále ještě není úplně jasné, zdali za vznik cyst zodpovídá defektní polycystinový komplex jako kanál na primárním cíliu anebo jako adhezní komplex účastnící se zprostředkování buněčné adheze.

## 6.2.Sekrece

Konečné místo renální regulace sodíkových iontů a vody je sběrný kanálek, kde sodík difunduje z urinárního prostoru do jednotlivých buněk přes apikální ENaC a z nich je transportován  $Na^+/K^+$ ATPázou přes bazolaterální membránu výměnou za  $K^+$  (Rohatgi R et al. 2003).

Tato elektrogenní pumpa je důležitá pro tvorbu sodíkového gradientu. Sodíkový gradient reguluje další iontové pohyby, které jsou spojené s transportem sodíku, a resorpci osmotické tekutiny. V ADPKD ledvinách se plně funkční  $Na^+/K^+$ ATPáza nalézá na apikální straně tubulárních epiteliálních buněk (obrázek 12) a  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $2Cl^-$  symportér je abnormálně lokalizován na bazální membráně epitelu (Wilson PD 2004). To znamená, že vektorový transport sodíku je zde obrácen. Sodík je transportován od bazální k apikální membráně, což

vede k akumulaci lumenální tekutiny s následnou tvorbou cyst (Wilson PD et al. 2000). U zdravých dospělých jedinců je Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPáza heterodimerický, integrální membránový protein složený z α1β1 komplexů na bazolaterální membráně. Jak ve fetálních ledvinách tak i v ledvinách pacientů s ADPKD je tato pumpa lokalizována na apikální membráně renálních tubulů a skládá se z α1β2 komplexů. Podle tohoto faktu je usuzováno, že u pacientů s ADPKD dochází k perzistentní expresi β2 izoformem. Specifický mechanismus pro třídění a polarizaci Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPázy není ještě zcela objasněn. Velkou roli hraje asi jak přímé cílení tohoto proteinu do bazolaterální membrány, tak i nepřímé cílení s následnou stabilizací s nerozpustnými komponentami membránového cytoskeletu, ankirinem a fodrinem (Wilson PD et al. 2000).

V proximálních tubulech a v tenké části sestupného raménka Henleovy kličky jsou přítomny vodní kanály aquaporiny AQP1, které umožňují velkou propustnost pro vodu. Na buňkách sběrných kanálek jsou lokalizovány AQP2 (Bachinsky DR et al. 1995). Oba tyto kanály se nalézají v cystickém epitelu pacientů s ADPKD, ale nebylo shledáno, že by oba byly lokalizovány v jedné cystě současně (Devuyst O 1996).

Zásadní roli v sekreci tekutin pravděpodobně hraje transport chloridových iontů přes CFTR kanál (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), který je regulován cAMP. cAMP stimuluje jeho membránovou expresi a fosforylaci proteinkinázou A. Zvýšená sekrece chloridových iontů poskytuje elektrochemickou hnací sílu, která zprostředkovává sekreci tekutin v cystickém epitelu. CFTR je exprimován ve fetálních ledvinách ve velkém množství. V dospělosti je jeho tvorba snížena a nachází se v nízkých hladinách na lumenálních membránách proximálních a distálních tubulů. Studie s primárními epiteliálními kulturami z ADPKD cyst demonstrují, že CFTR je exprimován na apikální membráně cystického epitelu (Nakanishi K et al. 2001).

U ADPKD pacientů mohou k sekreci přispívat vysoké hladiny ATP produkované ATPsyntázou, která je lokalizována na apikální membráně buněk cílií. ATP-2 (β podjednotka ATPsyntázy) asociuje s PLAT doménou PC-1, čímž může hrát určitou roli v polycystinové signální dráze (Hu J, Barr MM 2005). ATP se váže na P2Y<sub>2/4</sub> purinergní receptory, které aktivují fosfolipázu C, zvyšují koncentraci intracelulárního vápníku a aktivují kanály, které jsou regulovány vápníkem. Tímto způsobem může ATP stimulovat sekreci chloridových aniontů a přispívat k sekreci tekutin do cyst (Wildman SS et al. 2003).

Pokus na oocytech drápatky ukázal, že C konec PC-1 může stimulovat aktivitu chloridového kanálu a tím zvyšovat sekreci chloridových aniontů (Chernova MN et al. 2005).

## 7.FENOTYPOVÁ HETEROGENITA ONEMOCNĚNÍ

ADPKD vykazuje individuální průběh onemocnění, a to jak mezi rodinami, tak i v rámci jedné rodiny. Věk ESRD se pohybuje od 2 do 80 let věku (Kyu-Beck Lee et al. 2000). Interfamiliární variabilita může být částečně vysvětlena vazbou onemocnění na gen PKD1 nebo na PKD2. Přestože fenotypový projev mutací v obou genech je shodný, pacienti s mutací v genu PKD1 mívají horší průběh nemoci - dožívají se nižšího věku (v průměru 53 let) než pacienti s mutací v genu PKD2 (69 let) (Pei Y 2005).

Důležitý indikátor závažnosti nemoci je také přesná lokalizace mutace. Bylo zjištěno, že mutace nacházející se od 0 do 7812 nukleotidu genu PKD1 způsobovaly signifikantně závažnější průběh onemocnění (Rossetti S et al. 2002). Aby se mohl objevit mechanismus, pomocí něhož 5' a 3' mutace mají rozdílný fenotyp, bude nezbytné použít různé experimentální přístupy a další epidemiologická data.

To, že závažnost onemocnění je rovněž velmi variabilní u pacientů s identickou mutací, v rámci jedné rodiny i u neidentických dvojčat, odráží vliv modifikujících faktorů, prostředí, anticipace (časnější nástup onemocnění u potomků postižených rodičů) a imprintingu (rozdílná exprese genu v závislosti na přenosu od matky nebo od otce) na průběh onemocnění (Merta M, Reiterová J et al. 2004). Příčinou by také mohla být teorie dvojího úderu. U PKD2 genu byla nalezena korelace závažnosti onemocnění s pohlavím (Rossetti S at al. 2002).

Za nejpravděpodobnější genetický mechanismus individuální manifestace onemocnění je v současné době považována segregace modifikujícího genu (přenos faktoru ve vazbě s postiženým genem), který má u časnější manifestace sníženou schopnost oprav chyb v genomu po replikaci. Může to mít za následek častější vznik somatické mutace i v druhé, původně nepoškozené alele (Merta M, Reiterová J et al. 2004). Alternativně by také tyto faktory mohly poskytnout ochranný či škodlivý efekt na renální fenotyp ovlivněním polycystinových signálních transdukčních drah, akumulací tekutin v cystách nebo dalšími mechanismy, které se účastní vývoje ADPKD (Devuyst O 2003).

## 7.1. Modifikující faktory

Modifikující genetické faktory, které se studují na myších modelech, jsou mimo jiné polymorfizmy genů, které se uplatňují v patogenezi hypertenze u ADPKD. Jsou to polymorfizmy genu ACE (angiotensin converting enzyme), který kóduje enzym přeměňující angiotenzin I na angiotenzin II, syntázy oxidu dusnatého (endothelial nitric oxide synthase - eNOS) a adducin. Potenciální modifikační role se také přisuzuje genu CF kódující CFTR. Jeho ztráta by zřejmě vedla ke zpomalení růstu cyst a zmírnění ADPKD fenotypu (Persu A et al. 2000).

Hypertenze je velmi častá komplikace pacientů s ADPKD způsobená aktivací RAS (renin-angiotenzinový systém). Zvětšené cysty u ADPKD pacientů stlačují renální arterie a tím aktivují RAS (Kyu-Beck Lee et al. 2000). Aktivace RAS v rané fázi patogeneze ADPKD může podpořit renální poškození a růst cyst přes intrarenální vaskulární nemoc i přes schopnost angiotenzinu II potenciovat růst tubulárních epiteliálních buněk. Proto je důležité objevit existenci korelace mezi I/D (Alu inserce/delece) polymorfismem v intronu genu ACE na 17. chromozomu (Dijk MAV et al. 2000) a průběhem onemocnění. Některé studie prokázaly zvýšené riziko ESRD u pacientů homozygotních pro alelu D. Jiné žádnou korelaci nenašly (Schiavello T et al. 2001).

ADPKD je spojována s omezením vazodilatace cév, která je připisována snížené produkci oxidu dusnatého (NO) z L-argininu endoteliální NO syntázou (eNOS). eNOS je kódována genem ENOS (NOS3), který se skládá z 26 exonů a je situovaný na 7q36. Její aktivita je kontrolována hladinami vápníku a dalšími kofaktory. Například estrogeny stimulují její expresi a tím i produkci NO. To by vysvětlovalo fakt, že i malé změny v hladinách NO mohou být důležité v progresi renální nemoci u mužů. Podle již zdokumentované role polycystinů v regulaci intracelulární vápníkové hladiny se navrhuje účast polycystinů na komplexní regulaci eNOS. V současné době se nejvíce studuje vliv 3 polymorfizmů. 1) glutamová kyselina versus asparagová kyselina v pozici 298 (Glu298Asp), 2) v intronu 4VNTR (variable number tandem repeats) a 3) v promotoru T-786. Vlastnictví alely, která nese kyselinu asparagovou v pozici 298, je spojeno se sníženou aktivitou eNOS a/nebo jejím rozštěpením v renálních arteriích mužů s ADPKD. eNOS kódovaná touto alelou produkuje méně NO, což vede ke zvýšení endoteliální dysfunkce. Předpokládá se, že tato snížená aktivita eNOS je způsobena postranlační modifikací a větší citlivostí k hydrolýze v přítomnosti Asp na 298. pozici (Persu A et al. 2002). V intronu 4 byly zjištěny 2 alely: delší alela b a alela a. V některých studiích byl popsán ochranný efekt alely a na průběh ADPKD. Avšak v jiných



studiích nebyl nalezen žádný vliv polymorfizmu ani ve 4. intronu ani v promotoru T-786C (Devuyt O 2003).

Adducin je heterodimerický membránový protein, který je asociován s cytoskeletem a který podporuje vazbu spektrinu k aktinu na vápník/kalmodulinu závislým způsobem. Tento protein se skládá ze dvou podobných podjednotek,  $\alpha$ -adducinu (103kd) a  $\beta$ -adducinu (97kd), které spolu tvoří dimery a tetramery. Protože ovlivňuje buněčnou signalizaci a výskyt  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasy, zdá se, že by tento protein mohl hrát důležitou roli v procesu hypertenze. <http://www.bms.ed.ac.uk/research/others/smaciver/Encyclop/ABPA/adducin.htm>. Vliv jeho polymorfizmu na průběh ADPKD zatím nebyl zjištěn.

Byly zaznamenány mírnější fenotypové projevy v ADPKD rodinách vlastníci dvě vzácné mutace v CF genu kódující CFTR. Avšak detailní studie nejčastějších mutací,  $\Delta F508$  a polymorfního TN lokusu v intronu 8, neukázaly žádný vliv na renální progresi ADPKD (Persu A et al. 2002; Devuyt O 2003).

Hlavní TSC (tuberous sclerosis) gen, TSC2, který kóduje protein tuberin, leží hned vedle genu PKD1 na 16. chromozomu. Analýzy TSC pacientů se závažnou ADPKD ukázaly, že mnozí mají delece, které narušují gen PKD1 a gen TSC2, anebo úplně deletovaný PKD1. Proto se předpokládá synergistická role těchto dvou genů při vývoji cyst (Harris PC 1999) a možnost ovlivnění transportu PC-1 na laterální buněčnou membránu tuberinem (Albert CM, Harris PC 2005).

Identifikace jednotlivých polymorfizmů genů, které se účastní patogeneze hypertenze a i přímo cytogeneze, může mít terapeutický potenciál při léčbě ADPKD.

## 7.2. Teorie druhého úderu

Typické u ADPKD pacientů je, že v prvních dvou dekádách života je detekováno pouze několik renálních cyst, ale v páté dekádě již jich může být nalezeno sto až tisíce se signifikantní fenotypovou variabilitou. Byla také demonstrována ztráta heterozygoty pro gen PKD1 v cystách, jejichž výstelka byla monoklonálně odvozena. Podle těchto nálezů se usuzuje, že germinální mutace je nezbytná, ale nedostačující pro tvorbu cyst. A proto je potřeba druhá, somatická mutace v epiteliální buňce, aby této buňce poskytla růstovou výhodu a aby mohla proliferovat klonálně do cysty. Z tohoto důvodu je ADPKD popisována jako celulární recesivní nemoc (Pei Y 2001; Pei Y 1999).

Aby teorie druhého úderu mohla fungovat, k druhým somatickým mutacím by muselo docházet velmi často. Možné vysvětlení se nalézá v intronu 21 genu PKD1. Tento intron obsahuje neobvykle dlouhou (~2,5 kb) polypyrimidinovou sekvenci, která je zodpovědná za nestabilitu a /nebo náchylnost k somatickým mutacím v genu PKD1 a okolní chromozomální oblasti (Calvet JP 1998).

Zbývá objasnit, zdali je tento mechanismus druhého úderu jediná možnost pro generování cyst a jestli jsou somatické mutace více důležité pro expanzi cyst než pro iniciaci jejich tvorby.

## 8. VLASTNÍ PRÁCE

### 8.1. Vyšetřený soubor osob

Mutační analýza neduplikované oblasti genu PKD1 (exon 34-46) byla provedena na souboru probandů z 12 nepříbuzných rodin s ADPKD. Jednalo se o anonymizované vzorky osob z rodin, které byly vyšetřeny vazebnou analýzou genu PKD1 a PKD2 v rámci rutinně prováděné molekulárně genetické diagnostiky v laboratoři Ústavu biologie a lékařské genetiky 1.LF UK a VFN v Praze. Molekulárně genetickému vyšetření vždy předchází genetická konzultace klinickým genetikem, v rámci které je podepsán poučený souhlas s vyšetřením DNA. V 6 rodinách (č.1,2,4,5,11,12) byla vazebnou analýzou jednoznačně prokázána vazba onemocnění na gen PKD1 a 6 rodin (č.3,6,7,8,9,10) bylo vybráno na základě těžšího klinického průběhu onemocnění. U těchto rodin nebyla vazba na gen PKD1 prokázána, protože se jednalo o rodiny s malým počtem vyšetřených osob.

### 8.2. Detekce mutací

PCR amplifikace vyizolované genomové DNA byla provedena na přístroji MyCycle (Biorad) v celkovém objemu reakce 50  $\mu$ l, za použití 50 pmol každého primeru, 200  $\mu$ M každého dNTP, komerčního PCR pufru s  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 1,0 jednotky Taq DNA polymerázy (MBI Fermentas) ve 40 cyklech. Vzorky byly amplifikovány při anelační teplotě od 60 do 68°C v závislosti na amplifikované sekvenci. Hodnoty použité koncentrace  $\text{MgCl}_2$ , DMSO a anelační teploty pro amplifikaci jednotlivých úseků jsou uvedeny v tabulce 1.

Použité sekvence primerů jsou uvedeny v tabulce 2. Aby se zvýšila citlivost zvolené metody, byl vždy připojen GC-clamp k jednomu z páru primerů na 5' konec. Pro exony 34 až 42 a exony 44 a 45 je navržen vždy jeden pár primerů, který je komplementární k příslušným intronickým sekvencím. Pro mutační analýzu exonů 43 a 46, které jsou delší, jsou navrženy vždy dva páry primerů a jednotlivé amplifikované úseky se překrývají. Část A reprezentuje 5' oblast exonu a část B oblast 3'.

Po provedení kontrolní elektroforézy v agarózovém gelu, bylo k PCR produktům přidáno 0,5  $\mu$ l 0,5M EDTA. Následovala denaturace (95°C/10 minut) a příprava heteroduplexů (65°C/60 minut).

Heteroduplexy PCR produktů byly analyzovány metodou DGGE s použitím 6% polyakrylamidového gelu. Lineární gradient denaturantů byl použit v rozmezí od 50% do 100% v závislosti na analyzovaném fragmentu. 100% denaturační polyakrylamid obsahoval 7M močovinu a 40% formamid. 10-20  $\mu$ l každého vzorku (heteroduplexu) podle množství naamplifikované DNA bylo separováno s elektroforetickou barvou na gradientovém gelu při konstantní teplotě lázně 60°C po dobu 4 až 6 hodin při 160V. Hodnoty rozmezí použitého gradientu a čas elektroforézy jsou rovněž uvedeny v tabulce 1. Po elektroforéze 16cm dlouhý gel byl obarven ethidium bromidem (10 minut) a fotografován při UV detekci na přístroji UVP ImageStore7500.

Vzorky, ve kterých byla separační metodou DGGE zjištěna přítomnost abnormálního PCR produktu, byly následně sekvenovány. Sekvence všech abnormálních produktů a k nim příslušných negativních kontrol byla provedena po přečištění PCR produktů získaných nezávislou PCR reakcí purifikačním kitem QIAquick (QIAGEN). Sekvence v obou směrech

byla provedena s využitím sekvenačního kitu BigDye Terminátor (PE Applied Biosystems) na genetickém analyzátoru ABI Prism™ 310 (PE Applied Biosystems).

Segregace detekované mutace/polymorfizmu s onemocněním v rodině byla provedena DGGE metodou, restrikcí či sekvenací. Aby se zjistilo, zda se domnělé missense mutace v PKD1 nacházejí v konzervované oblasti, byla místa těchto nově nalezených mutací porovnána s příslušnými místy v genomu myši *Mus musculus* a krysy *Rattus norvegicus* použitím BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. BLAST je program, který vyhledává identické sekvence u různých organizmů.

### 8.3. Výsledky

Systematicky byla analyzována 3' neduplikovaná oblast genu PKD1 (exony 34-46) u 12 probandů metodou DGGE. Nalezla jsem 7 záměn, pravděpodobně 3 mutace a 4 polymorfizmy, které jsou uvedeny v tabulce 3 a 4. Lokalizace mutací je znázorněna na modelu polycystinu-1 na obrázku 13.

#### 8.3.1. missense mutace

U pacienta č.12 byla objevena substituce T za C (CTG>CCG) v nukleotidu 10 847 v exonu 37, která vede k záměně nepolární aminokyseliny leucinu za nepolární cyklickou  $\alpha$ -iminokyselinu prolin v kodónu 3 616 (Leu3616Pro) (obrázek 14a).

Segregace v rodině byla provedena DGGE metodou a onemocnění segreguje s nalezenou substitucí (obrázek 14b). Porovnání sekvencí genu PKD1 člověka, myši a krysy ukázalo, že aminokyselina leucin je konzervována u těchto 3 druhů.

U pacienta č.8 byl nukleotid v pozici 11 255 v exonu 39 změněn z G na A (CGG>CAG). Tato záměna vede k zabudování aminokyseliny glutaminu místo argininu v kodónu 3 752 (Arg3752Gln), a proto kyselá aminokyselina je vyměněna za nepolární (obrázek 15a).

V důsledku jednobodové substituce vzniklo nové restrikční místo pro restrikční endonukleázu PvuII, která štěpí palindromickou sekvencí CAG/CTG, a s jejímž využitím byla provedena segregace v rodině. Vzniklá substituce jednoznačně segreguje s onemocněním v rodině (obrázek 15b). Arginin je konzervován v PKD1 genu člověka, myši a krysy.

#### 8.3.2. nonsense mutace

Objevená substituce T za G (TTA>TGA) u pacienta č.6 v nukleotidu 12 053 v exonu 44 má za následek vytvoření stop kodónu namísto zabudování aminokyseliny leucinu v pozici 4 018 (Leu4018X) (obrázek 16). Takto vzniklý protein bude o 285 aminokyselin kratší než divoký typ.

Segregace v rodině byla provedena sekvenací a onemocnění segreguje s nalezenou substitucí. Tato mutace byla také nalezena u pacientova otce, u kterého bylo rovněž klinicky potvrzeno polycystické onemocnění ledvin.

#### 8.3.3. polymorfizmy

V genu PKD1 byly detekovány 4 další substituce (tabulka 4). Tři z těchto substitucí, 10532 C>T (Ala3511Val) u probanda č.6, 12130 A>G (Ile4044Val) u probanda č.7 a 12001-34 C>A v intronu 43 u probanda č.5, už byly dříve popsány jako běžně se vyskytující polymorfizmy.

Změna báze v intronu 41, 11535-32 C>T, detekovaná u probanda č.9 dosud nebyla popsána. Segregace v rodině č.9 byla provedena DGGE metodou. Vzhledem k tomu, že onemocnění neselegovalo s nalezenou substitucí a že tato substituce je příliš daleko od stříhového místa, se předpokládá, že daná záměna je polymorfismus.

#### 8.4.Diskuze

V souboru 12 nepříbuzných pacientů s ADPKD byla provedena analýza mutací v neduplikované oblasti genu PKD1. Zatím všechna dostupná data poukazují na to, že až na některé výjimky každá rodina má vlastní unikátní mutaci a že mutace jsou rozšířeny po celém genu PKD1 bez „hot spotů“ (Ariyurek Y et al. 2003).

Detekce mutací byla provedena screeningovou metodou denaturační gradientové elektroforézy (DGGE), která má velmi vysokou citlivost (až 99%). Metodou DGGE lze však detekovat pouze jednobodové substituce, krátké delece a inserce v exonech a přilehlých oblastech intronů. Rozsáhlé delece celých exonů, případně více exonů či celého genu a další intronické variace nelze zvolenou metodou detekovat; detekce těchto mutací nebyla v řešeném projektu plánována.

V tomto souboru pacientů byly nalezeny 3 dosud nepopsané mutace. 2 z těchto mutací (u pacienta č.8 a 12) jsou missense mutace, jednobodové substituce, v jejichž důsledku je v nezkráceném proteinu nahrazena jedna aminokyselina aminokyselinou jiného typu. U pacienta č.8 je kyselá aminokyselina arginin vyměněna za nepolární aminokyselinu glutamin v intracelulární smyčce mezi 5. a 6. transmembránovou doménou. U pacienta č.12 je nepolární aminokyselina leucin nahrazena nepolární cyklickou  $\alpha$ -iminokyselinou prolinem v extracelulární smyčce mezi 6. a 7. transmembránovou doménou. Cyklická  $\alpha$ -iminokyselina prolin má konformační omezení vyplývající z kruhové struktury pyrrolidinové postranní skupiny, které je mezi 20 základními aminokyselinami unikátní (Voet D, Voetová JG 1995). V rodinách (8 a 12) detekované mutace plně segregují s onemocněním. Pro publikaci nových, dosud nepopsaných missense mutací, je důležité ověřit, že se tato mutace nevyskytuje jako varianta u zdravé populace (kontrolní soubor - alespoň 100 zdravých nepříbuzných osob). Tyto jednobodové substituce ve vysoce konzervované oblasti genu tvoří přibližně 1/3 mutací uvedených v databázi HGMD <http://www.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0.html>.

Jediná nalezená nonsense mutace, jednobodová záměna, která vede k předčasnému stop kodónu a ke vzniku zkráceného proteinu se ztrátou funkce, byla Leu4018X u pacienta č.6 v intracelulární smyčce mezi 9. a 10. transmembránovou doménou. Vede ke zkrácení polycystinu-1 o 285 aminokyselin. Takto zkrácený protein postrádá 2 poslední transmembránové domény a intracelulární C-konec, který normálně obsahuje několik potenciálních míst fosforylace, uplatňujících se pravděpodobně v přenosu signálu, několik míst pro vazbu různých proteinů, doménu svinutého klubka, která zprostředkovává vazbu s polycystinem-2, a G-protein-aktivační místo (GPAS). Nonsense mutace tvoří zhruba 60% mutací uvedených v databázi HGMD <http://www.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0.html>.

## 8.5.Závěr

Detekce mutací v genu PKD1 je velmi důležitá, protože nám umožňuje proniknout do patogeneze onemocnění a poskytuje nám více informací o funkci polycystinu-1. Do budoucnosti může přispět ke kauzální léčbě autozomálně dominantní polycystické choroby ledvin. V současnosti detekce mutací jednoznačně zpřesňuje diagnostiku v rámci jednotlivých rodin.

V souboru 12 nepříbuzných pacientů s ADPKD byly nalezeny 3 mutace a 4 polymorfizmy. Všechny 3 mutace jsou nové a pravděpodobně unikátní pro danou rodinu.

## 9.PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala své školitelce paní Ing. Jitce Štekrové za pomoc a vytvoření optimálních podmínek pro práci. Panu Doc. RNDr Petru Pikálkovi, CSc. bych ráda vyjádřila dík za laskavý dohled nad touto prací. Má bakalářská práce byla financována IGA MZ ČR NE7633.

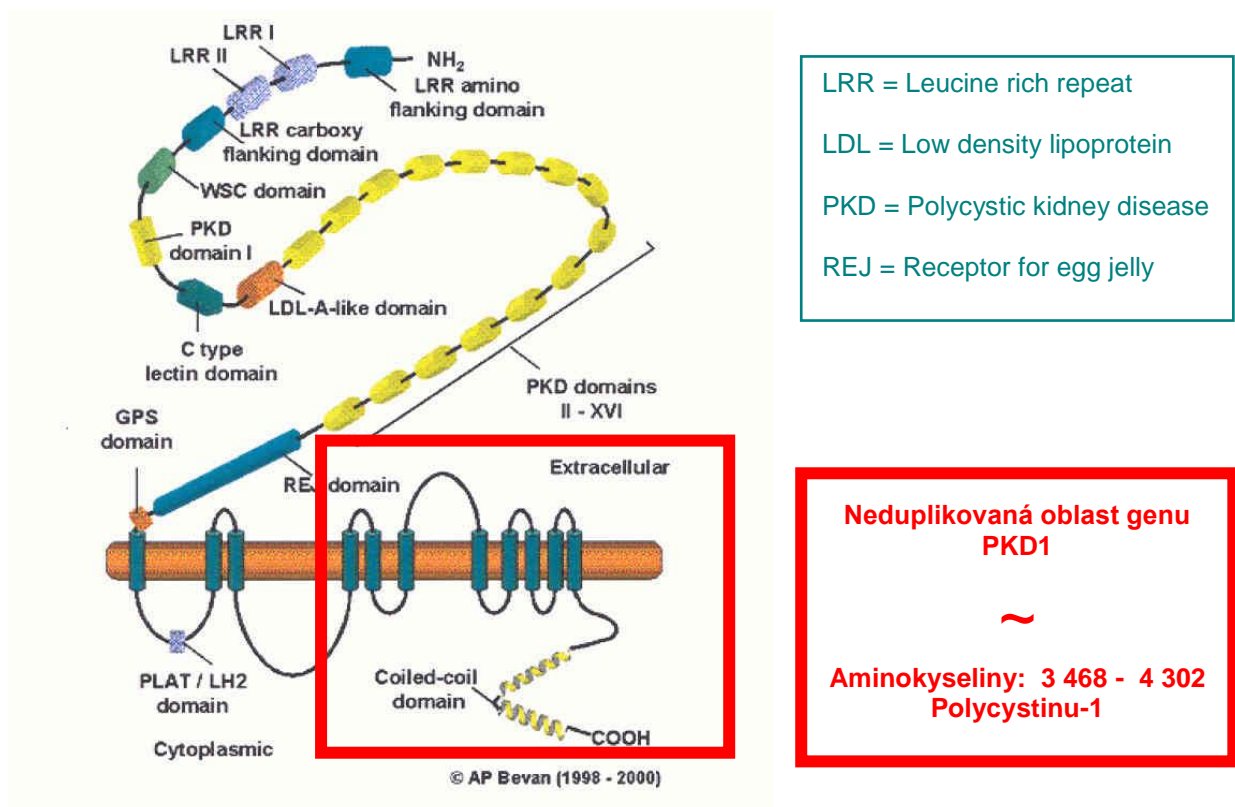
## 10.TABULKY A OBRÁZKY

**Obrázek 1.** Polycystické ledviny – mnohočetné cysty nahradily funkční renální parenchym (Merta M, Reiterová J et al. 2004).

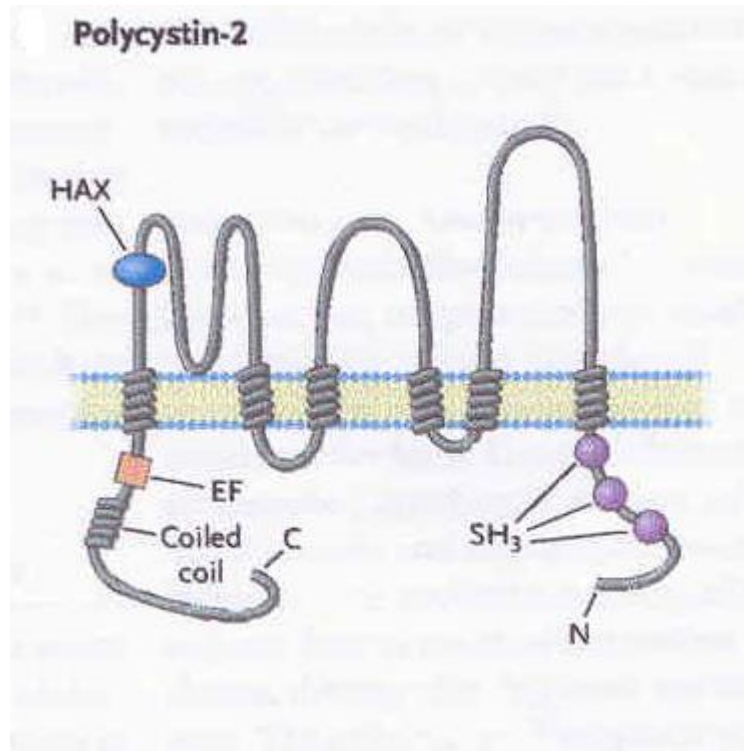


**Obrázek 2.** Struktura polycystinu-1; červeným obdelníkem je vyznačena oblast polycystinu-1 odpovídající neduplikované oblasti genu PKD1.

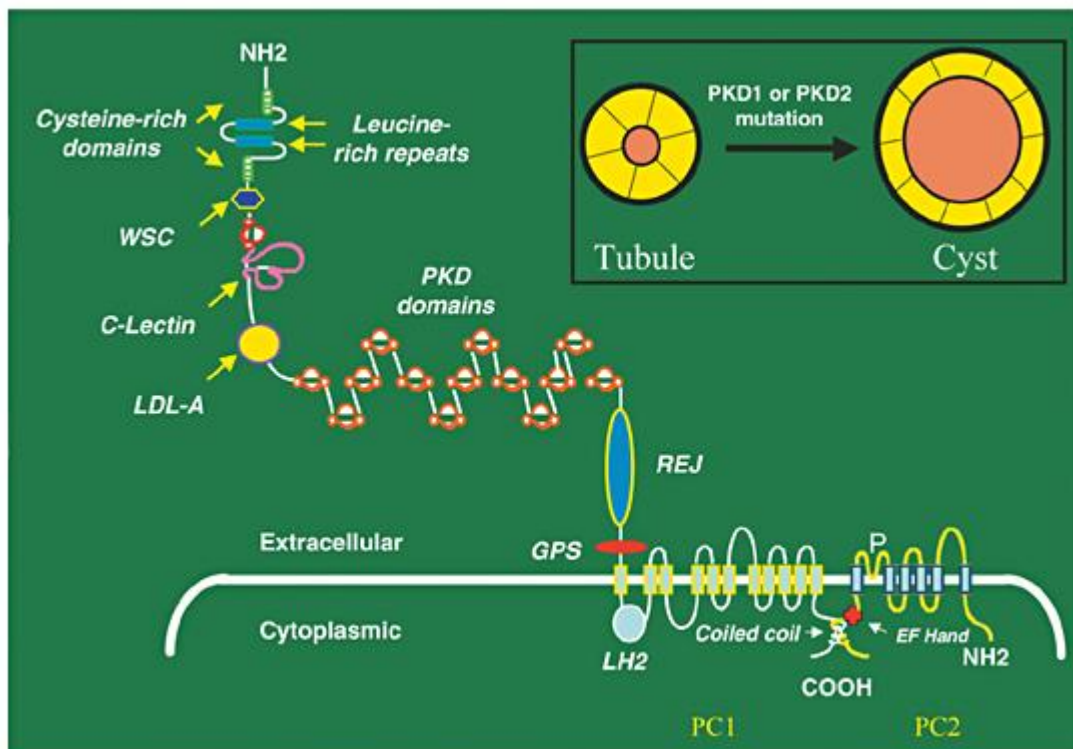
<http://www.cimr.cam.ac.uk/medgen/pkd/pkd1/pkd1pic.htm>



**Obrázek 3.** Struktura polycystinu-2 (Wilson PD 2004).

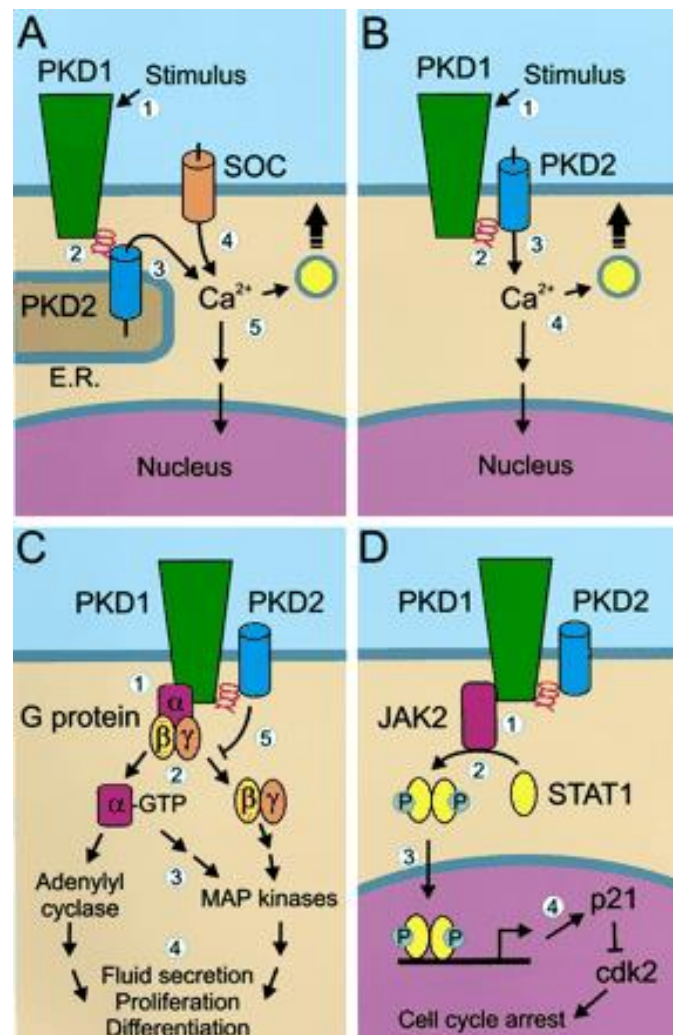


**Obrázek 4.** Vzájemná asociace polycystinu-1 a 2 přes jejich C-terminální oblasti (Lakkis M, Zhou J 2003).





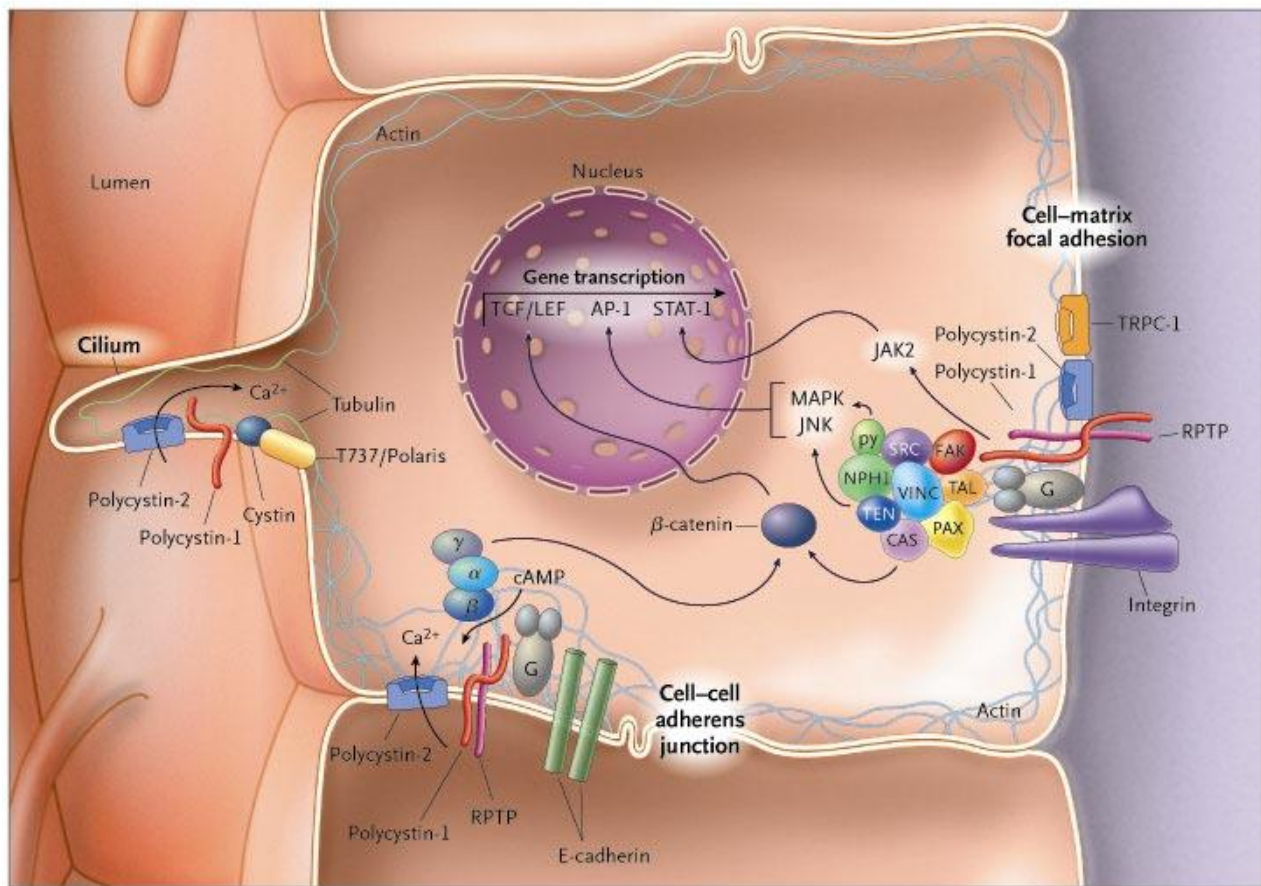
**Obrázek 5.** Modely signalizace polycystinu-1 a 2 (Igarashi P, Somlo S 2002).



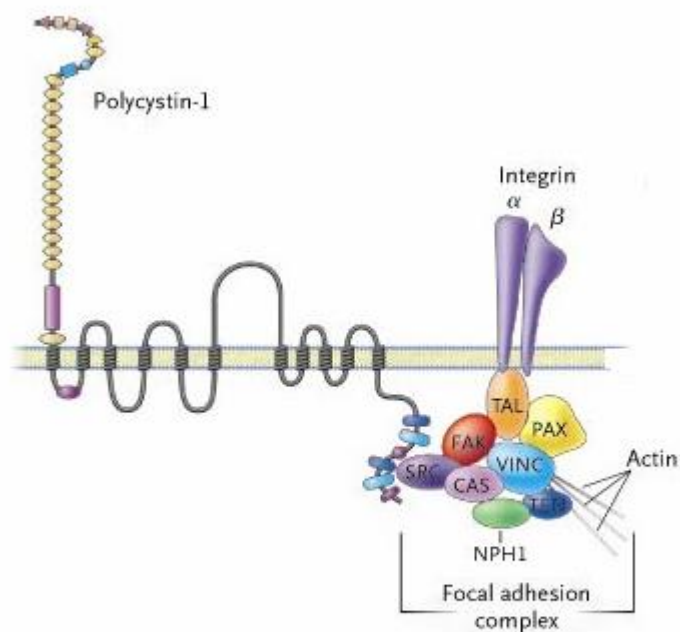
Na obrázku A je PC-1 umístěn v plazmatické membráně a interaguje s PC-2, který je lokalizován na endoplazmatickém retikulu. PC-1 zde pravděpodobně funguje jako receptor dosud ještě neidentifikovaného extracelulárního stimulu a předává signál do intercelulárního prostoru buňky přes PC-2. Tato signalizace má za následek aktivaci vápníkových kanálů a zvýšení koncentrace cytozolického vápníku, které spouští exocytózu a změny v genové expresi. Na obrázku B jsou oba polycystiny umístěny na plazmatické membráně. Aktivace PC-1 vede k aktivaci PC-2, která zprostředkovává vstup extracelulárního vápníku a tím zvyšuje koncentraci cytozolického vápníku. Obrázek C ukazuje PC-1, který působí jako GPCR (G protein-coupled receptor) a aktivuje G $\alpha$  a uvolňuje G $\beta\gamma$  podjednotku. Aktivace G proteinové signalizace může regulovat sekreci tekutin, proliferaci, buněčnou polaritu a diferenciaci. Na obrázku D je zobrazena aktivace PC-1, která vede k aktivaci JAK-STAT signální dráhy a která vyžaduje PC-2. Aktivace STAT1 způsobí zvýšenou transkripci p21<sup>CIP1/WAF1</sup>, inhibici Cdk2 (cyklin-dependent kinase) a zástavu buněčného cyklu v G0/G1 fázi (Igarashi P, Somlo S 2002).



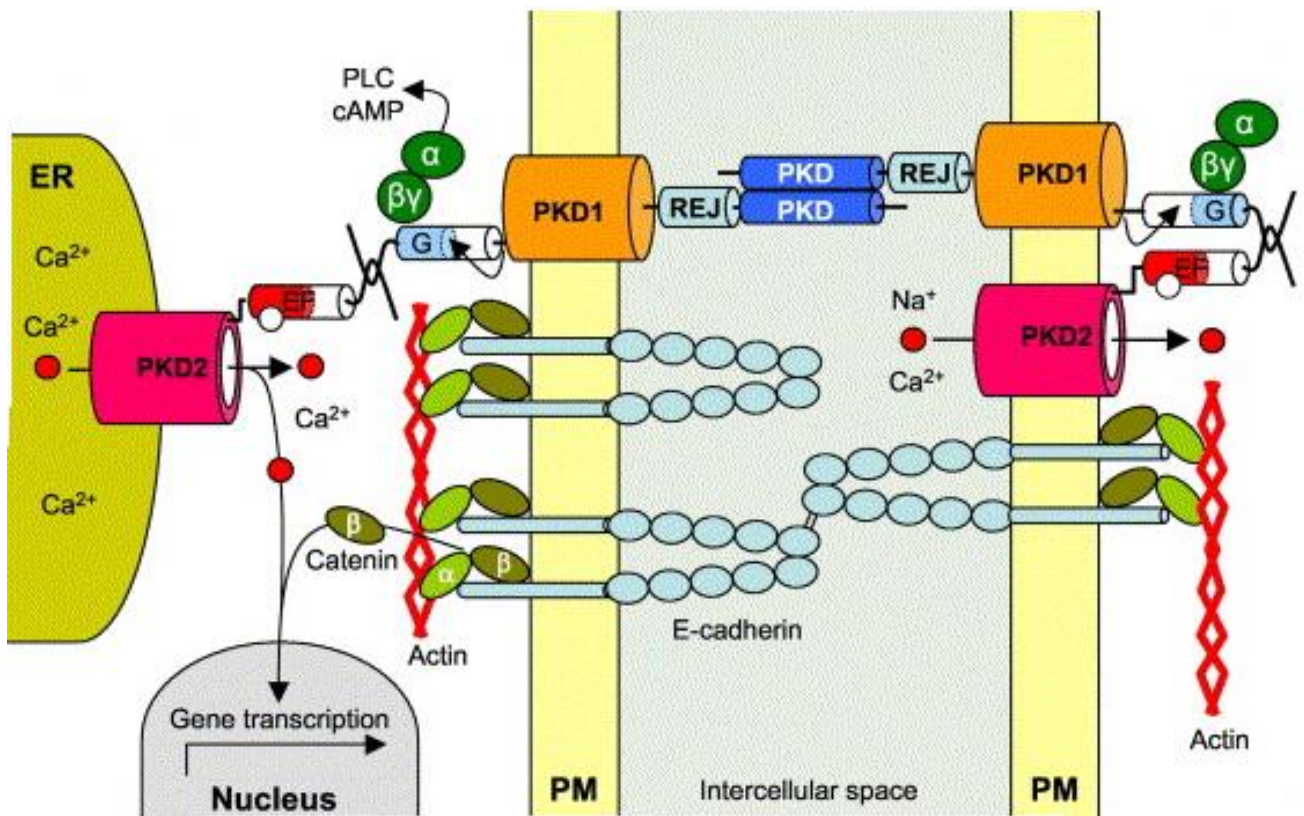
**Obrázek 6.** Komplexy polycystinu-1 (Wilson PD 2004).



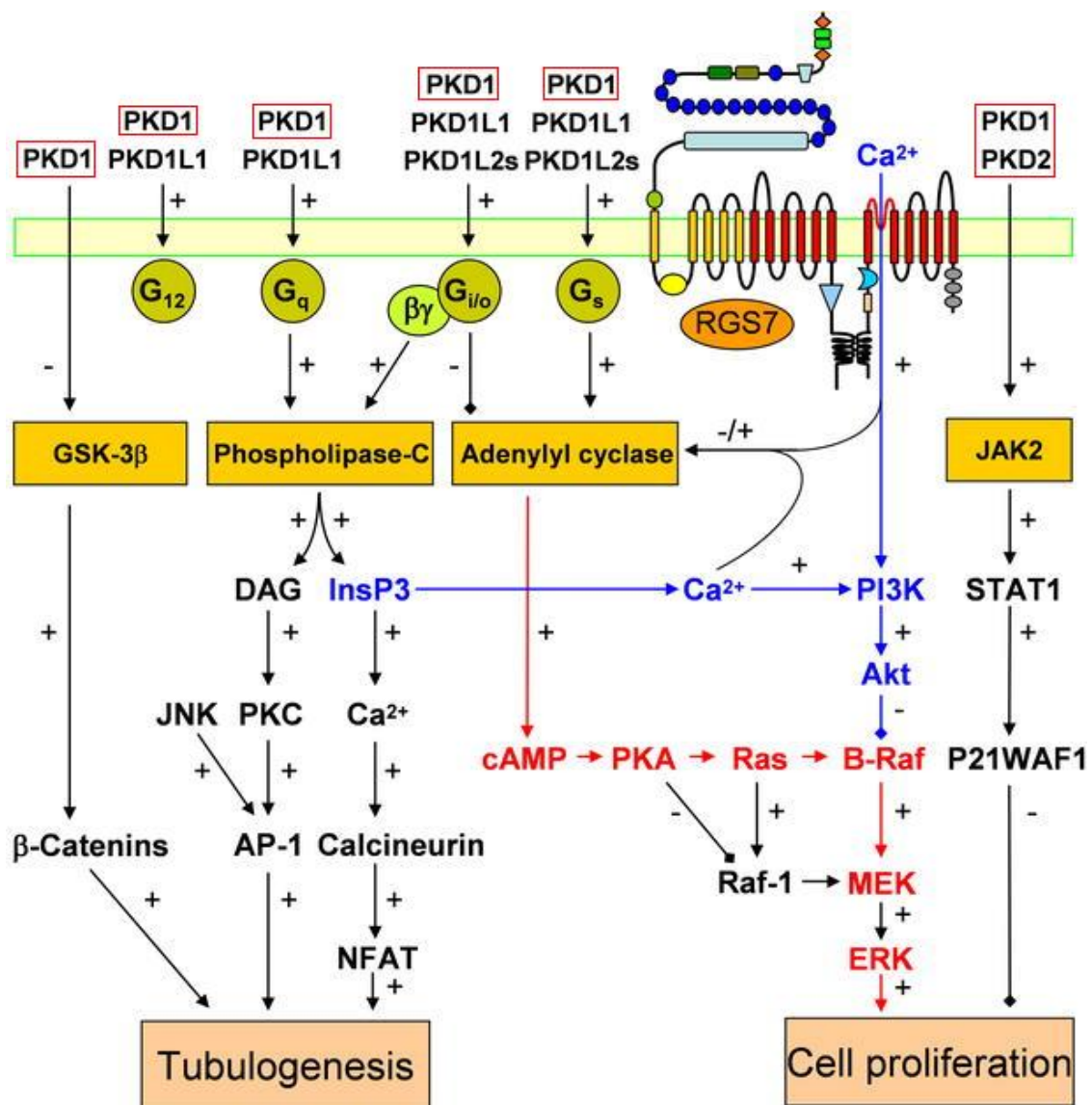
**Obrázek 7.** Polycystin-1 v komplexu fokální adheze (Wilson PD 2004).



Obrázek 8. Polycystin-1 v adhezním spojení (buňka-buňka) (Delmas P et al. 2004).

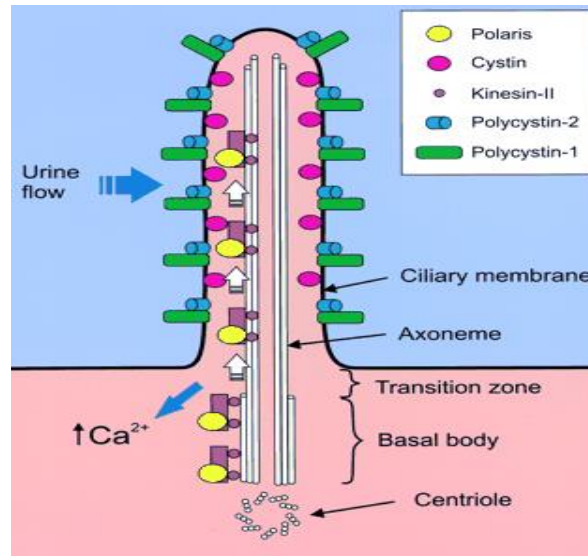


**Obrázek 9.** Intracelulární signální dráhy aktivované PC-1 a PC-2. Červené dráhy představují dráhy proliferativní, modré dráhy dráhy antiproliferativní (Delmas P 2005).

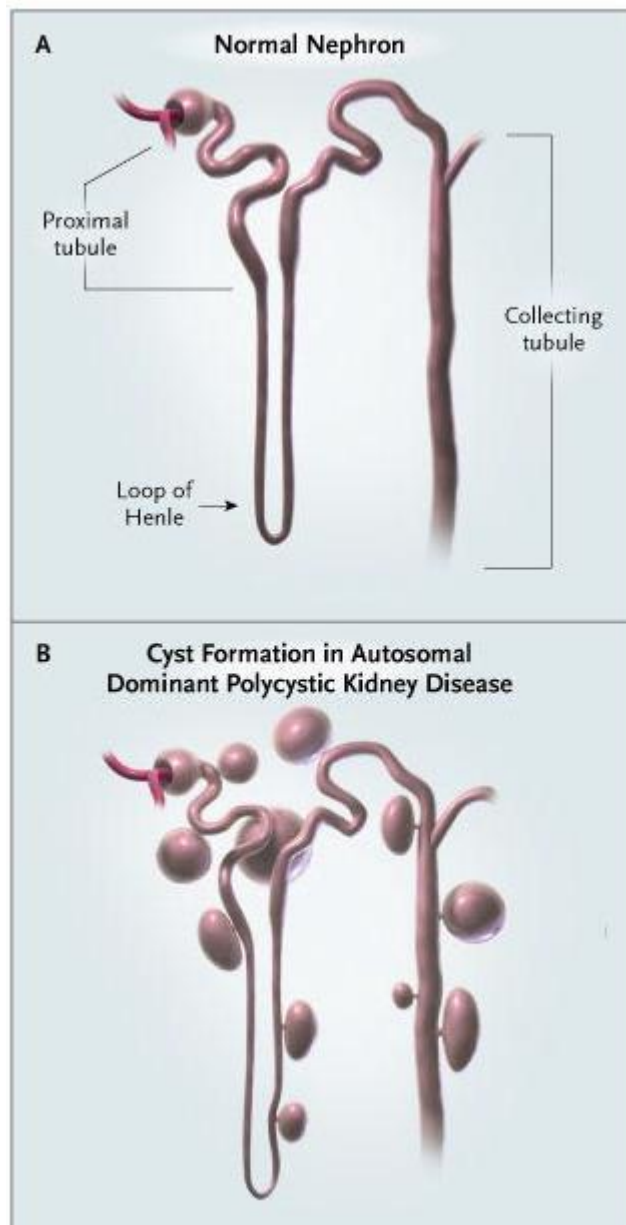


**GSK3b**- Glycogen synthase kinase 3b, **PKC**-protein kinase C, **STAT1**-signal transducer and activators of transcription-1, **NFAT**-nuclear factor of activated T cells, **PI3K**- phosphatidylinositol 3-kinase, **MEK**-mitogen-activated protein kinase/ERK kinase, **ERK**- extracellular signal-regulated kinase, **PAK**-cAMP-dependent protein kinase, **P21WAF1**-supresor tumorů, **JNK**- c-Jun Nterminal kinase, **PKD1L2s**-krátká forma PKD1L2

**Obrázek 10.** Polycystiny v cílích savčích renálních epiteliálních buněk (Igarashi P, Somlo S 2002).

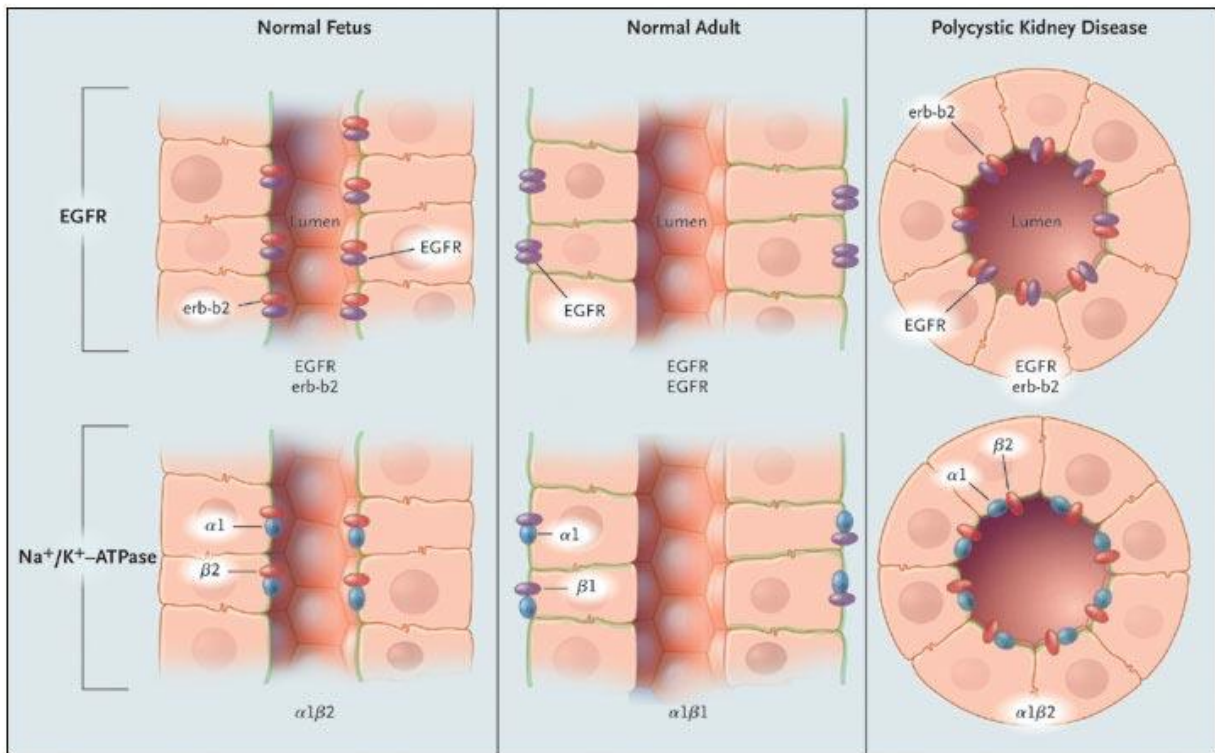


**Obrázek 11.** Mechanismus tvorby cyst u ADPKD (Wilson PD 2004).

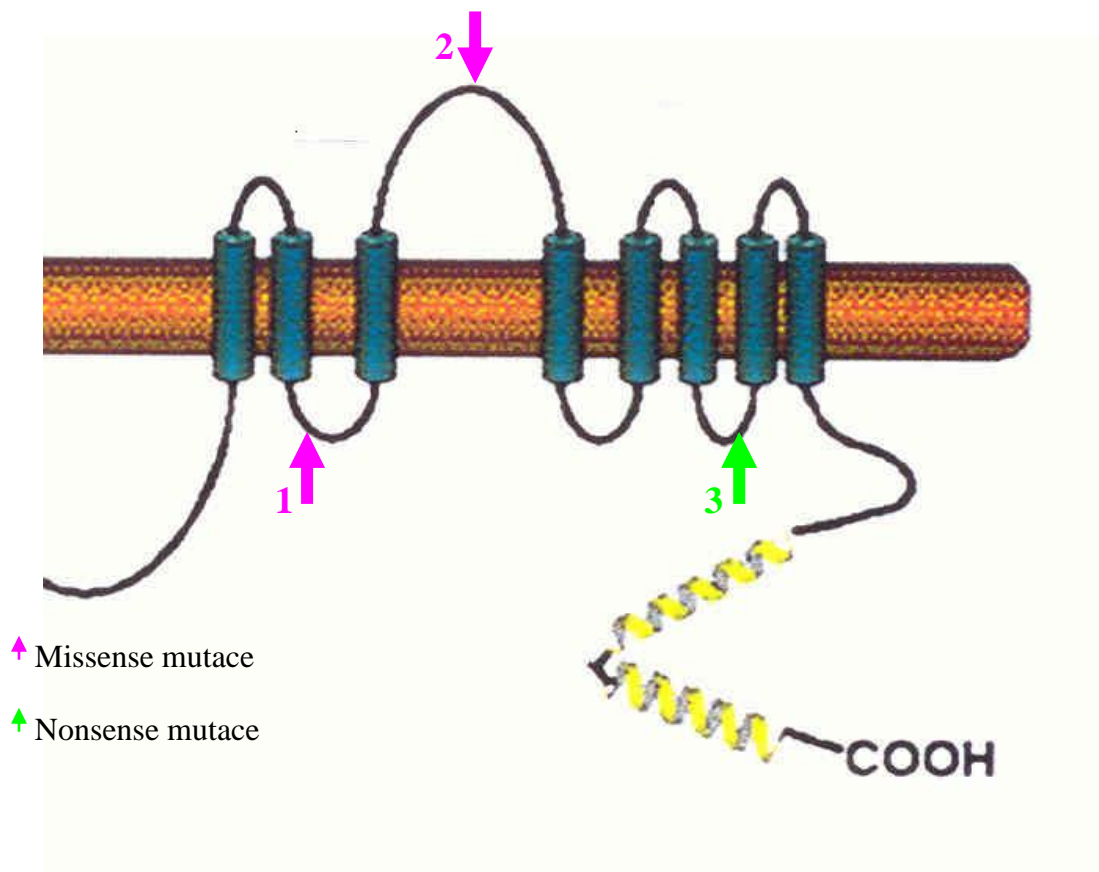




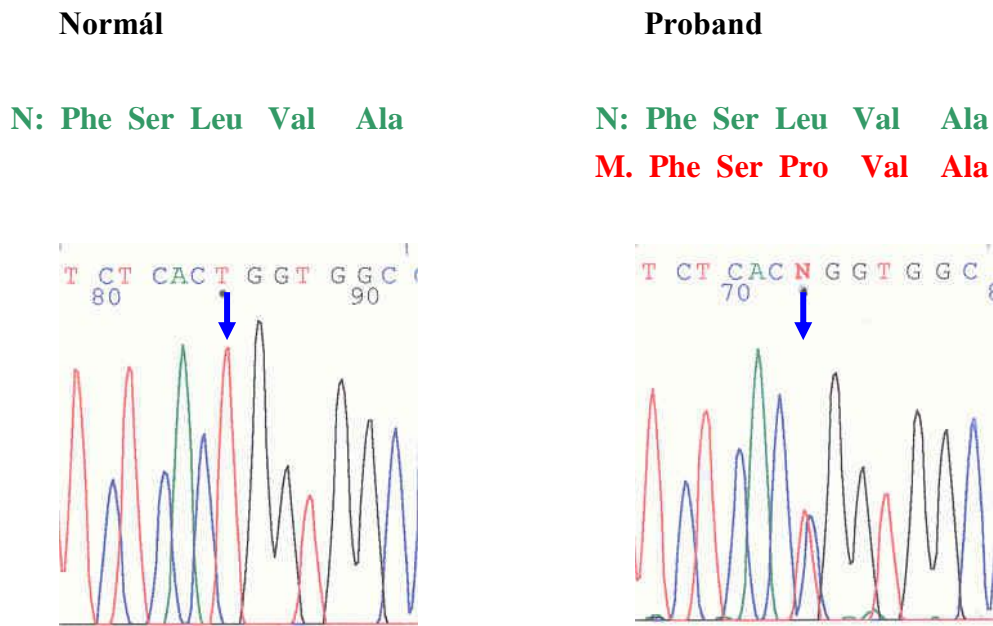
**Obrázek 12.** Polarizace receptoru pro epidermální růstový faktor (Epidermal Growth Factor Receptor-EGFR) a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPázy v epitelu zdravého plodu, zdravého dospělého člověka a pacienta s ADPKD (Wilson PD 2004).



**Obrázek 13.** Lokalizace mutací identifikovaných v neduplikované oblasti genu PKD1; znázorněno na modelu polycystinu 1. <http://www.cimr.cam.ac.uk/medgen/pkd/pkd1/pkd1pic.htm>

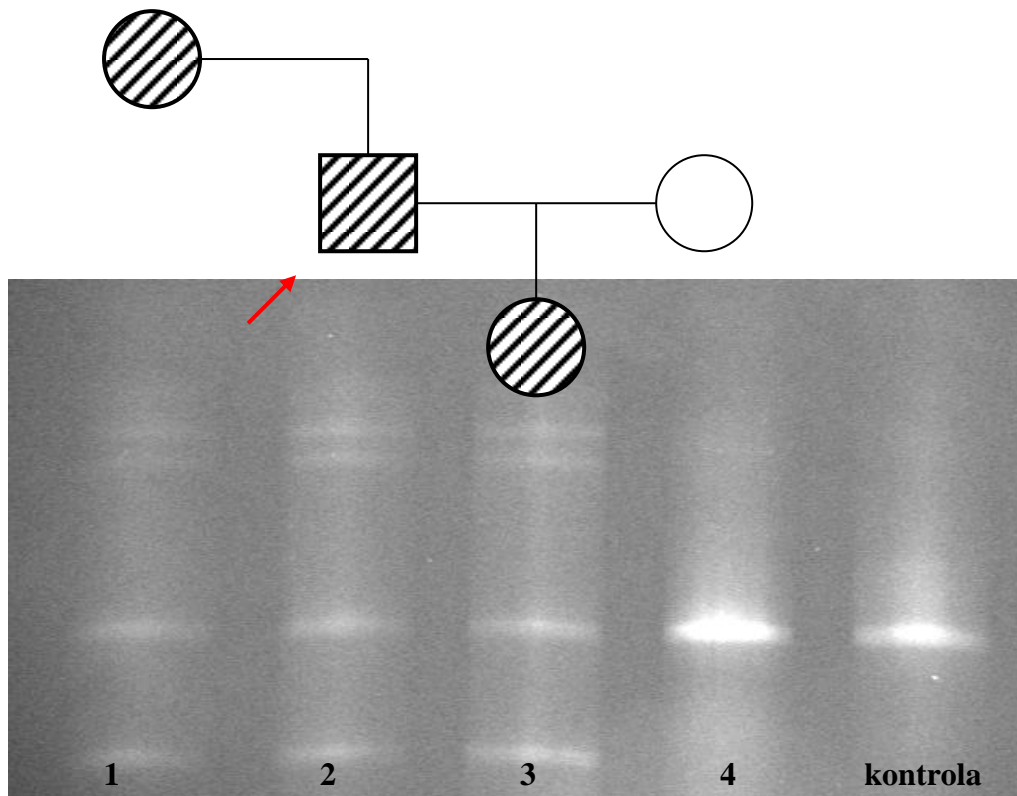





**Obrázek 14a.** Sekvence mutace **c.10847T>C** identifikované v exonu 37 genu PKD1 v rodině 12. Mutace mění kodón pro leucin v poloze 3616 na kodón pro prolin.



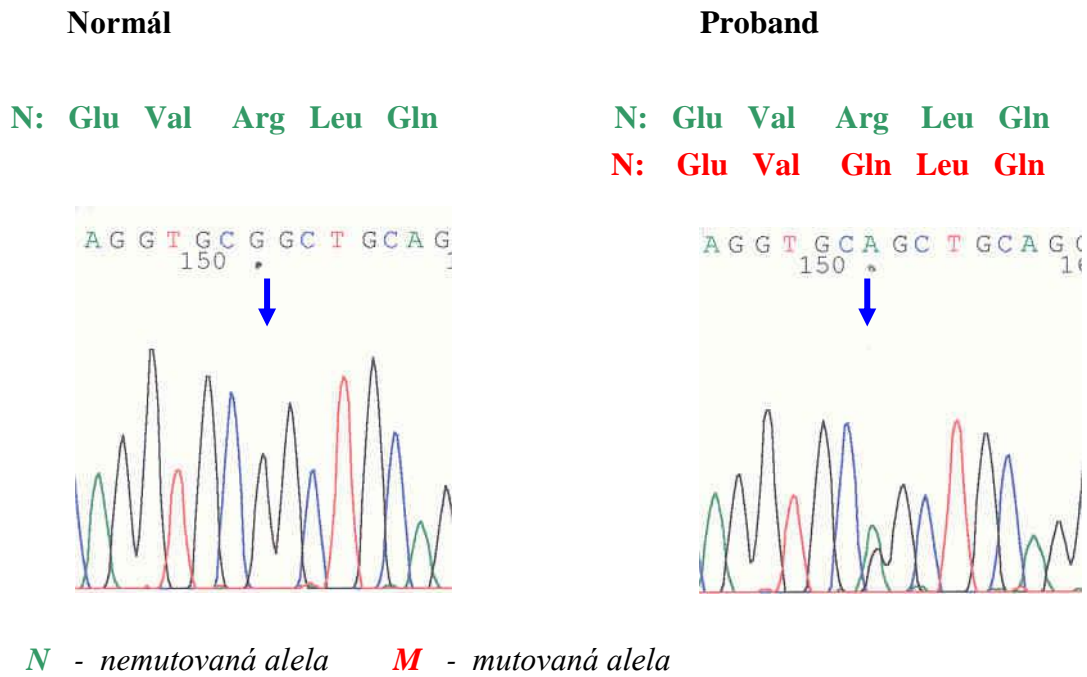
*N* - nemutovaná alela      *M* - mutovaná alela

**Obrázek 14b.** Segregace mutace **c.10847T>C** identifikované v exonu 37 genu PKD1 s onemocněním v rodině 12 metodou DGGE.

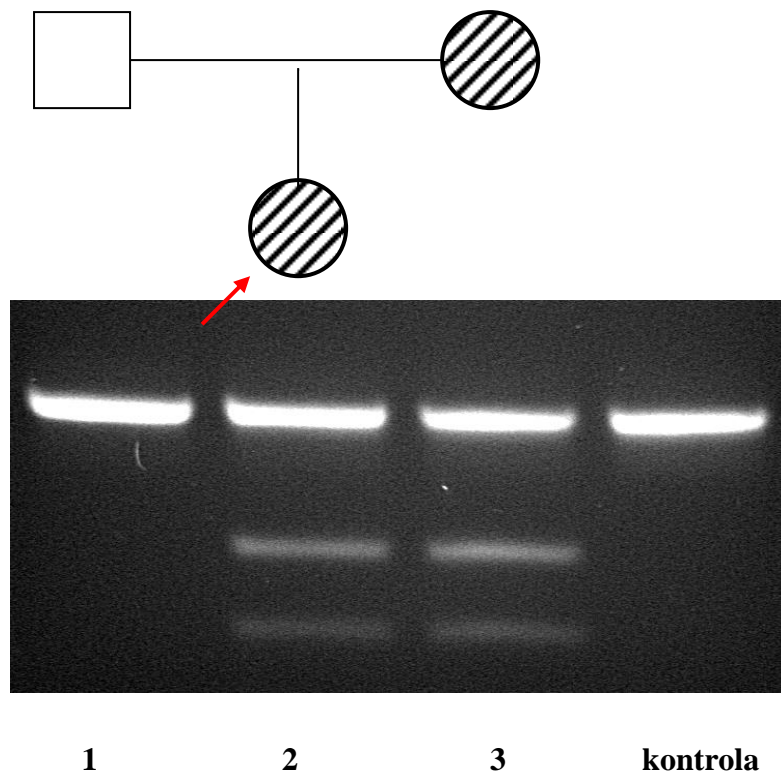







-  - osoby s klinicky prokázaným polycystickým onemocněním ledvin
-  - osoby s vyloučeným polycystickým onemocněním ledvin
-  - probandka

**Obrázek 15a.** Sekvence mutace **c.11255G>A** identifikované v exonu 39 genu PKD1 v rodině 8. Mutace mění kodón pro arginin v poloze 3752 na kodón pro glutamin.



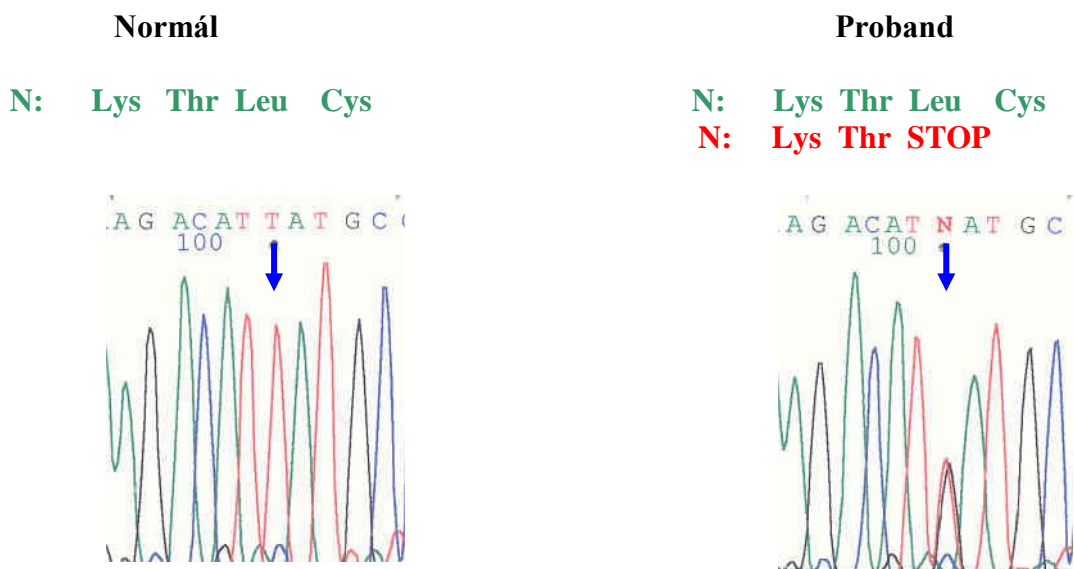
**Obrázek 15b.** Segregace mutace [c.11255G>A](#) identifikované v exonu 39 genu PKD1 s onemocněním v rodině 8 restrikcí restrikčním enzymem PvuII.



-   - osoby s klinicky prokázaným polycystickým onemocněním ledvin
-   - osoby s vyloučeným polycystickým onemocněním ledvin
-  - probandka



**Obrázek 16.** Sekvence mutace **c.12053T>G** identifikované v exonu 44 genu PKD1 v rodině 6. Mutace mění kodón pro leucin v poloze 4018 na stopkodón.



*N* - nemutovaná alela      *M* - mutovaná alela

**Tabulka 1.** Podmínky PCR a DGGE k detekci mutací v exonech 34 až 46 genu PKD1.

Exon	PCR anelační teplota	PCR koncentrace MgCl <sub>2</sub>	PCR koncentrace DMSO	DGGE rozmezí gradientu	DGGE čas elektroforézy
34	62°C	1,5 mM	10%	50 – 90%	5 hod.
35	68°C	1,5 mM	10%	60 – 100%	4 hod.
36	62°C	1,5 mM	10%	60 – 90%	6 hod.
37	68°C	1,5 mM	10%	60 – 90%	5 hod.
38	62°C	1,5 mM	10%	50 – 90%	4 hod.
39	60°C	1,5 mM	0	60 – 100%	5 hod.
40	62°C	1,5 mM	10%	60 – 100%	5 hod.
41	62°C	1,5 mM	10%	60 – 100%	4 hod.
42	60°C	2,0 mM	10%	60 – 100%	4,5 hod.
43A	60°C	1,5 mM	10%	60 – 100%	6 hod.
43B	65°C	1,5 mM	10%	60 – 100%	6 hod.
44	65°C	1,5 mM	10%	60 – 100%	4,5 hod.
45	65°C	1,5 mM	10%	60 – 100%	5 hod.
46A	65°C	2,0 mM	10%	60 – 100%	5 hod.
46B	65°C	1,5 mM	10%	60 – 100%	4 hod.

**Tabulka 2.** Sekvence primerů k detekci mutací v neduplikované oblasti genu PKD 1.

Primer	Sekvence 5' → 3'
E34F E34R - GC	Agg Agg ggg CTC TgA AgC TCA CCC TT AAC CAC ggC TgC CTg gCC TgA gTC CC
E35F E35R - GC	ACT gCC CgC CCA ggT TAA CAT ggg CTT CAg Agg CAg CTC ACA ggg Agg ggC TA
E36F - GC E36R	CgC CTC TCA CAg gTC TgT CTC T gAg ggg gTg gCT TCA gAg ggg TC
E37F E37R - GC	ggC TgC CAg ggg TAg gCT ACA ggC CgA gAC ggA ggT ggC Agg ggC ACA gg
E38F - GC E38R	TTg CCA AAg CCC TgC TgT CAC TgT ggg CTg CCT Agg gTC Tgg CTg gAC TAA Agg CAA AAC T
E39F E39R - GC	gTC TCT ggT ggC CgC TCA CT gCT gCT CTC TCA ACA AgA ggA
E40F E40R - GC	gCC gAA CCA gAg CTC Agg CgA gCT g CgT AgA CgC CCg ggg CCC TCg CTC TgC
E41F - GC E41R	Cgg CCT CCT gAC CAg CCT ggC TC TAg gCC AgC ggg ggC Cgg Agg AgT g
E42F E42R - GC	CAg CTg CAC AAC Tgg CTg gAC AAC A CCg gTg ggA ggC gCg ggg TCT ggC C
E43AF E43AR - GC	CAg CgT CTC ACC CCT CgC AgC gC CgT ggC CgC CgT CAg CgC CaC CAg C
E43BF - GC E43BR	gCg TgC TgC ggC TCg gAg CCT ggg TCT gTC TgC TTg CAg CCC Tgg ggT gTg
E44F - GC E44R	Cgg Tgg gCg Cgg ggC Tgg gCg CA CgA CAC CAg TgA ggg CgT ACA gCT gA
E45F - GC E45R	Cg Cgg CCg ggg Agg gCg TCT TAg CTC CTC AgT CAg TCC ggC TgC ACC CTg g
E46AF - GC E46AR	gAg Agg gAC ACg CCC Tgg gCT CTg C ggC AAg gCg gCT ggg CAg TgC Tgg
E46BF - GC E46BR	CCC gTg gCC CAT CCC Cgg gCC TgC gg TAC gTg CAg CCA TTC TgC CTg gCC C

Na 5' konci primeru je připojen CG clamp o sekvenci: CgC gCC gCC gCg CCC CgC gCC  
CgT CCC gCC gCC CCC gCC CCg ggC CCC gC

**Tabulka 3.** Identifikované mutace v neduplikované oblasti genu PKD1. Lokalizace mutací v proteinu je znázorněna v obrázku 13.

Mutace	Proband	Exon	Záměna báze	Změna v kodónu	Reference
1	12	E37	c.10847 T>C	p.Leu 3616Pro	nepopsáno
2	8	E39	c.11255 G>A	p.Arg3752Gln	nepopsáno
3	6	E44	c.12053 T>G	p.Leu4018X	nepopsáno

**Tabulka 4.** Identifikované polymorfizmy v neduplikované oblasti genu PKD1.

Polymorfizmus	Proband	Exon	Záměna báze	Změna v kodónu	Reference
1	6	E35	c.10532 C>T	p.Ala3511Val	Peral B et al. 1997
2	7	E44	c.12130 A>G	p.Ile4044Val	Rossetti et al. 1996
3	9	IVSE41	c.11535-32 C>T	---	nepopsáno
4	5	IVSE43	c.12001-34 C>A	---	Daniels et al. 1998

## 11. POUŽITÁ LITERATURA

- Albert C.M., Harris P.C., 2005, Perspectives in basic science-Molecular pathogenesis of ADPKD: The polycystin complex gets complex, *Kidney Int.* 67: 1234-1247
- Al-Bhalal L., Akhtar M., 2005, Molecular basis of autosomal dominant polycystic kidney disease, *Adv Anat Pathol.* 12: 126-33
- Anyatonwu G.I., Ehrlich B.E., 2005, Organic Cation Permeation through the Channel Formed by Polycystin-2, *J Biol Chem.* 280: 29488-93
- Ariyurek Y., Lantinga-van Leeuwen I., Spruit L., Ravine D., Breuning M. H., Peters D. J. M., 2004, Large Deletions in the Polycystic Kidney Disease 1 (PKD1) Gene, *Hum Mutat.* 23: 99
- Bachinsky D.R., Sabolic I., Emmanouel D.S., Jefferson D.M., Carone F.A., Brown D., Perrone R.D., 1995, Water channel expression in human ADPKD kidneys, *Am J Physiol.* 268: 398
- Bissler J.J., Dixon B.P., 2005, A mechanistic approach to inherited polycystic kidney disease, *Pediatr Nephrol.* 20: 558-66
- Calvet J.P., 1998, Molecular genetics of polycystic kidney disease, *J Nephrol.* 11: 24-34
- Delmas P., 2004, Polycystins: From Mechanosensation to Gene Regulation, *Cell* 118: 145-148
- Delmas P., 2004, The Gating of Polycystin Signaling Complex, *Biol. Res.* 37: 681-691
- Delmas P., 2005, Polycystins: polymodal receptor/ion-channel cellular sensors, *Eur J Physiol.* 451: 264-276
- Delmas P., Nomura H., Li X., Lakkis M., Luo Y., Segal Y., Fernández- Fernández J.M., Harris P., Frischauf A.M., Brown D.A., Zhou J., 2002, Constitutive Activation of G-proteins by Polycystin-1 Is Antagonized by Polycystin-2, *J of Biol Chem.* 277: 11276-11283
- Delmas P., Padilla F., Osorio N., Coste B., Raoux M., Crest M., 2004, Polycystin, calcium signaling, and human diseases, *BBRC* 322: 1374-1383
- Devuyst O., 2003, Variable renal disease progression in autosomal dominant polycystic kidney disease: A role for nitric oxide? *J Nephrol.* 16: 449-452
- Devuyst O., 1996, Expression of aquaporins-1 and -2 during nephrogenesis and in autosomal dominant polycystic kidney disease, *Am J Physiol.* 271: 169-83
- Dijk M.A.V., Breuning M.H., Peters D.J.M., Chang P.C., 2000, The ACE insertion/deletion polymorphism has no influence on progression of renal function loss in autosomal dominant polycystic kidney disease, *Nephrol Dial Transplant.* 15: 836-839
- Harris, P. C., 1999, Autosomal dominant polycystic kidney disease: clues to pathogenesis, *Hum Mol Genet.* 8: 1861-1866

Hidaka S., Konecke V., Osten L., Witzgall R., 2004, PIGEA-14, a novel coiled-coil protein affecting the intracellular distribution of polycystin-2, *J Biol Chem.* 279: 35009-16

Hooper K., Boletta A., Germino G., Hu Q., Ziegelstein R., Sutters M., 2005, Expression of polycystin-1 enhances endoplasmic reticulum calcium uptake and decreases capacitative calcium entry in ATP-stimulated MDCK cells, *Am J Physiol Renal Physiol.* 289: 521

Hu and Barr , 2005, ATP-2 Interacts with the PLAT Domain of LOV-1 and Is Involved in *Caenorhabditis elegans* Polycystin Signaling, *Mol Biol Cell.* 16: 458-469

Chauvet V., Tian X., Husson H., Grimm D.H., Wang T., Hieseberger T., Igarashi P., Bennett A.M., Ibraghimov-Beskrovnaya O., Somlo S., Caplan M.J., 2004, Mechanical stimuli induce cleavage and nuclear translocation of the polycystin-1 C terminus, *J Clin Invest.* 114: 1433-1443

Chernova M.N., Vandorpe D.H., Clark J.S., Alper S.L., 2005, Expression of the polycystin-1 C-terminal cytoplasmic tail increases Cl channel activity in *Xenopus* oocytes, *Kidney Int.* 68: 632-41

Igarashi P., Somlo S., 2002, Genetics and Pathogenesis of Polycystic Kidney Disease, *J Am Nephrol.* 13: 2384-2398

Jauregui A.R., Barr M.M., 2005, Functional characterization of the *C. elegans* nephrocystins NPHP-1 and NPHP-4 and their role in cilia and male sensory behaviors, *Exp Cell Res.* 305: 333-42

Kamanna V.S., Bassa B.V., Ganji S.H., Roh D.D., 2005, Bioactive lysophospholipids and mesangial cell intracellular signaling pathways: role in the pathobiology of kidney disease, *Histol Histopathol.* 20: 603-13

Kanne J.P., Talner L.B., 2004, Autosomal dominant polycystic kidney disease presenting as subarachnoid hemorrhage, *Emerg Radiol.* 11: 110-2

Kim, E, Walz, G. et al., 1999, The Polycystic Kidney Disease 1 Gene Product Modulates Wnt Signaling, *J Biol Chem.* 274: 4947-4953

Kip S.N., Hunter L.W., Ren Q., Harris P.C., Somlo S., Torres V.E., Sieck G.C., Qian Q., 2005, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> reduction increases cellular proliferation and apoptosis in vascular smooth muscle cells: relevance to the ADPKD phenotype, *Circ Res.* 96: 873-80

Kottgen M., Walz G., 2005, Subcellular localization and trafficking of polycystins, *Pflugers Arch.* 451: 286-93

Koulen P., Duncan R.S., Liu J., Cohen N.E., Yannazzo J.A., McClung N., Lockhart C.L., Branden M., Buechner M., 2005, Polycystin-2 accelerates Ca<sup>2+</sup> release from intracellular stores in *Caenorhabditis elegans*, *Cell Calcium.* 37: 593-601

Kyu-Beck Lee et al., 2000, Association of the ACE Gene Polymorphism with the Progression of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease, *J Korean Med Sci.* 15: 431-5

Lakkis M., Zhou J., 2003, Molecular Complexes Formed with Polycystins, *Nephron Exp Nephrol.* 93: 3-8

Le N.H., van der Wal A., van der Bent P., Lantinga-van Leeuwen I.S., Breuning M.H., van Dam H., de Heer E., Peters D.J., 2005, Increased Activity of Activator Protein-1 Transcription Factor Components ATF2, c-Jun, and c-Fos in Human and Mouse Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease, *J Am Soc Nephrol.* 16: 2724-31

Li K.J., Shiao A.L., Chiou Y.Y., Yo Y.T., Wu C.L., 2005, Transgenic overexpression of prothymosin alpha induces development of polycystic kidney disease, *Kidney Int.* 67: 1710-22

Li Q., Montalbetti N., Shen P.Y., Dai X.Q., Cheeseman C.I., Karpinski E., Wu G., Cantiello H.F., Chen X.Z., 2005, Alpha-actinin associates with polycystin-2 and regulates its channel activity, *Hum Mol Genet.* 14: 1587-603

Manno M., Marchesan E., Tomei F., Cicutto D., Maruzzi D., Maieron A., Turco A., 2005, Polycystic kidney disease and infertility: case report and literature review, *Arch Ital Urol Androl.* 77: 25-8

Mei C., Mao Z., Shen X., Wang W., Dai B., Tang B., Wu Y., Cao Y., Zhang S., Zhao H., Sun T., 2005, Role of keratinocyte growth factor in the pathogenesis of autosomal dominant polycystic kidney disease, *Nephrol Dial Transplant.* 20: 2368-75

Merta M., Reiterová J. et al., 2004, Dědičná onemocnění ledvin, *Triton Praha,* 62-78

Montalbetti N., Li Q., Gonzalez-Perrett S., Semprine J., Chen X.Z., Cantiello H.F., 2005, Effect of hydro-osmotic pressure on polycystin-2 channel function in the human syncytiotrophoblast, *Pflugers Arch.* 451: 294-303

Nagao S., Kusaka M., Nishii K., Marunouchi T., Kurahashi H., Takahashi H., Grantham J., 2005, Androgen receptor pathway in rats with autosomal dominant polycystic kidney disease, *J Am Soc Nephrol.* 16: 2052-62

Naitoh H., Shoji H., Ishikawa I., Watanabe R., Furuta Y., Tomozawa S., Igarashi H., Shinozaki S., 2005, Intraductal papillary mucinous tumor of the pancreas associated with autosomal dominant polycystic kidney disease, *J Gastrointest Surg.* 9: 843-5

Nakanishi K. et al., 2001, Role of CFTR in Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease, *J Am Soc Nephrol.* 12:719-725

Nishio S., Hatano M., Nagata M., Horie S., Koike T., Tokuhisa T., Mochizuki T., 2005, Pkd1 regulates immortalized proliferation of renal tubular epithelial cells through p53 induction and JNK activation, *J Clin Invest.* 115: 910-8

Ong A.C., Wagner B., 2005, Detection of proximal tubula motile cilia in a patient with renal sarcoidosis associated with hypercalcemia, *Am J Kidney Dis.* 45: 1096-9

Ong A.C., Wheatley D.N., 2003, Polycystic kidney disease--the ciliary connection, *Lancet.* 361: 774-6

- Pan J., Wang Q., Snell W.J., 2005, Cilium-generated signaling and cilia-related disorders, *Lab Invest.* 85: 452-63
- Peces R., Venegas J.L., 2005, Seminal vesicle cysts and infertility in autosomal dominant polycystic kidney disease, *Nefrologia* 25: 78-80
- Peden E.M., Barr M.M., 2005, The KLP-6 kinesin is required for male mating behaviors and polycystin localization in *Caenorhabditis elegans*, *Curr Biol.* 15: 394-404
- Pei Y., 1999, Somatic PKD2 Mutations in Individual Kidney and Liver Cysts Support a "Two-Hit" Model of Cystogenesis in Type 2 Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease, *J Am Soc Nephrol.* 10: 1524-1529
- Pei Y., 2005, Nature and nurture on phenotypic variability of autosomal dominant polycystic kidney disease, *Kidney Inter.* 67: 1630-1631
- Pei Y., 2001, A "two-hit" model of cystogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease?, *Trends Mol Med.* 7:151-6
- Peral, B., Gamble, V. et al., 1997, Identification of mutation in the duplicated region of the PKD1 gene by a novel approach. *Am J Hum Genet.* 60: 1399-1410
- Persu A., Devuyst O., 2002, Modifier effect of ENOS in autosomal dominant polycystic kidney disease, *Hum Mol Genet.* 11: 3 229-241
- Persu A., Verellen-Dumoulin C. et al., 2000, CF Gene and Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Expression in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease, *J Am Soc Nephrol.* 11:2285-2296
- Praetorius H.A., Spring K.R., 2005, A physiological view of the primary cilium, *Annu rev Physiol.* 67: 515-29
- Rohatgi R. et al., 2003, Na Transport in Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease (ARPKD) Cyst Lining Epithelial Cells, *J Am Soc Nephrol.* 14:827-836
- Roibak T., Ward C.J., Harris P.C., Bacallao R., Ness S.A. Wandinger-Ness A., 2004, A Polycystin-1 Multiprotein Complex Is Disrupted in Polycystic Kidney Disease Cells, *Mol Biol Cell.* 15: 1334-1346
- Rossetti S. et al., 2002, The Position of the Polycystic Kidney Disease 1 (PKD1) Gene Mutation Correlates with the Severity of Renal Disease, *J Am Soc Nephrol.* 13:1230-1237
- Rossetti, S., Bresin, E. et al., 1996, Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) in an Italian family carrying a novel nonsense mutation and two missense changes in exons 44 and 45 of the PKD1 gene. *Am J Med Genet.* 65: 155-159
- Ruggenenti P., Remuzzi A., Ondei P., Fasolini G., Antiga L., Ene-Iordache B., Remuzzi G., Epstein F.H., 2005, Safety and efficacy of long-acting somatostatin treatment in autosomal-dominant polycystic kidney disease, *Kidney Int.* 68: 206-16

Russo R.J., Husson H., Joly D., Bukanov N.O., Patey N., Knebelmann B., Ibraghimov-Beskrovnaya O., 2005, Impaired formation of desmosomal junctions in ADPKD epithelia, *Histochem Cell Biol.*124: 487-97

Shen, J.-P, Cotton, C. U, 2003 Epidermal growth factor inhibits amiloride-sensitive sodium absorption in renal collecting duct cells, *Am J Physiol Renal Physiol.* 284: 57-64

Schiavello T. et al., 2001, Angiotensin-converting enzyme activity and the ACE Alu polymorphism in autosomal dominant polycystic kidney disease, *Nephrol Dial Transplant.* 16: 2323-2327

Sutters M.,Germino G.G., 2003, Autosomal dominant polycystic kidney disease: Molecular genetics and pathophysiology, *J Lab Clin Med.* 141: 91-101

Sweeney W.E. Jr., Hamahira K., Sweeney J., Garcia-Gatrell M., Frost P., Avner E.D., 2003, Combination treatment of PKD utilizing dual inhibition of EGF-receptor activity and ligand bioavailability, *Kidney Int.* 64:1310-9

Štekrová J., Reiterová J., Merta M., Damborský J., Židovská J., Kebrdlová V., Kohoutová M., 2004, PKD2 mutations in a Czech population with autosomal dominant polycystic kidney disease, *Nephrol Dial Transplant.* 19: 1116-1122

Tao Y., Kim J., Faubel S., Wu J.C., Falk S.A., Schrier R.W., Edelstein C.L., 2005, Caspase inhibition reduces tubular apoptosis and proliferation and slows disease progression in polycystic kidney disease, *Proc Natl Acad Sci USA.* 102: 6954-9

Tong Q., Stockand J.D., 2005, Receptor tyrosine kinases mediate epithelial Na(+) channel inhibition by epidermal growth factor, *Am J Physiol Renal Physiol.* 288: 150-61

Veizis I.E., Cotton C.U., 2005, Abnormal EGF-dependent regulation of sodium absorption in ARPKD collecting duct cells, *Am J Physiol Renal Physiol.*: 474-82

Voet D., Voetová J.G., 1995, *Biochemie*, Victoria Publishing, 66

Wang X., Gattone V. 2nd, Harris P.C., Torres V.E., 2005, Effectiveness of vasopressin V2 receptor antagonists OPC-31260 and OPC-41061 on polycystic kidney disease development in the PCK rat, *J Am Soc Nephrol.*16: 846-51

Wildman S.S. et al., 2003, The isolated polycystin-1 cytoplasmic COOH terminus prolongs ATP-stimulated Cl<sup>-</sup> conductance through increased Ca<sup>2+</sup> entry, *AJP-Renal.* 285: 1168-1178

Wilson P. D. et al., 2000, Apical Plasma Membrane Mispolarization of NaK-ATPase in Polycystic Kidney Disease Epithelia Is Associated with Aberrant Expression of the  $\beta$ 2 Isoform, *Am J Pathol.* 156: 253-268

Wilson P.D., 2001, Polycystin: New Aspects of Structure, Function, and Regulation, *J Am Soc Nephrol.* 12: 834-845

Wilson P.D., 2004, Mechanisms of disease Polycystic Kidney Disease, *N Engl J Med.* 350: 151-164



Wilson P.D., 2004, Polycystic kidney disease: new understanding in the pathogenesis, *IJBCB* 36: 1868-1873

Witzgall R., 2005, Polycystin-2 - an intracellular or plasma membrane channel?, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 371: 342-347

Yamaguchi T, Hempson SJ, Reif GA, Hedge AM, Wallace DP, 2006, Calcium restores a normal proliferation phenotype in human polycystic kidney disease epithelial cells, *J Am Soc Nephrol.*17: 178-87

Yamaguchi T., Nagao S., Wallace D.P., Belibi F.A., Cowley B.D., Pelling J.C., Grantham J.J., Yamaguchi T., 2003, Cyclic AMP activates B-Raf and ERK in cyst epithelial cells from autosomal-dominant polycystic kidneys, *Kidney Int.* 63: 1983-94