



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

Detekce mutace způsobující polycystózu ledvin

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: [SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ](#)

Autor: Nikola Sládková

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

České Budějovice 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „**Detekce mutace způsobující polycystózu ledvin**“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne 11.8.2020

.....
Nikola Sládková

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat své vedoucí bakalářské práce Ing. Ireně Hoštičkové, Ph.D. za vedení práce, za odbornou pomoc a cenné rady, a v neposlední řadě i za poskytnutí použitého materiálu a navržení nových prumerů. Dále bych chtěla poděkovat i ostatním pracovníkům zemědělské fakulty za jejich ochotu a poskytnutí pomoci.

Detekce mutace způsobující polycystózu ledvin

Abstrakt

Ve své bakalářské práci jsem se zabývala detekcí mutace v PKD2 genu, která způsobuje polycystické onemocnění ledvin. Toto onemocnění je zajímavé tím, že ho nezpůsobuje pouze jedna konkrétní mutace, která by postihovala určitý gen, ale onemocnění je velice variabilní, a může ho způsobovat vícero mutací, které jsou na odlišných chromozomech, a dokonce i na různých místech v daném exonu.

Předmětem mého výzkumu byla čtyřčlenná rodina. U jednoho ze členů této rodiny byla již dříve potvrzena polycystická choroba ledvin na základě klinické diagnostiky. Cílem této práce bylo u členů rodiny odhalit případnou mutaci v genu PKD2, a tedy prokázat polycystické onemocnění ledvin. Dalším cílem bylo provést optimalizaci navržených primerů pro PCR reakci.

V teoretické části této práce jsem se zaměřila na problematiku polycystické choroby ledvin, na dělení tohoto onemocnění podle typu dědičnosti a na proteinové produkty genu PKD2 i PKD1. Dále jsem se zmínila o anatomii ledvin, jejich funkci a také stavbě nefronu. Věnovala jsem se i zdravotním komplikacím, které chorobu doprovázejí, a také její diagnostice a následné léčbě.

V praktické části této práce jsem popisovala průběh laboratorní diagnostiky při hledání mutace v genu PKD2, a to konkrétně v jeho prvních pěti exonech. Diagnostika sestávala z izolace DNA, PCR reakce, gelové elektroforézy a následného Sangerova sekvenování. Kvůli omezené kapacitě laboratoře jsem však Sangerovo sekvenování osobně neprováděla. Připravené vzorky k sekvenování byly zaslány firmě SEQme.

Nakonec jsem vyhodnotila elektroforeogramy a výsledky ze získaných sekvencí. Pro vyhodnocení výsledků jsem měla celkem 20 osekvenovaných vzorků, vždy 4 vzorky pro každý exon. Ani u jednoho z nich se mi nepodařilo případnou mutaci prokázat. Pro úplnou diagnostiku onemocnění by bylo zapotřebí vyšetřit i zbývající exony.

Klíčová slova

Polycystická choroba ledvin; PKD2; polycystin; geny; dědičnost; PCR

Detection of mutation causes polycystic kidney disease

Abstract

In my bachelor's thesis, I dealt with the detection of the mutation in the PKD2 gene, which causes polycystic kidney disease. The disease is interesting because it is not only caused by a single specific mutation that affects a particular gene, but the disease is highly variable and can be caused by several mutations located on different chromosomes and even at different sites in a given exon.

The subject of my research was a family of four. Based on the results of using clinical diagnostics, one member of the family was confirmed to have polycystic kidney disease. The aim of this thesis was to detect the possible PKD2 mutation in the family members, and thus to confirm the presence of polycystic kidney disease. The next aim was the optimization of the designed primers for the PCR reaction.

In the theoretical section of this thesis, I focused on the issue of polycystic kidney disease, classification of polycystic kidney disease based on the inheritance type, and the protein products of the PKD2 and PKD1 genes. I also mentioned the anatomy of the kidneys, their function, and also the structure of a nephron. I also dealt with the health problems that accompany the disease, as well as its diagnostics and subsequent treatment.

In the practical section of this thesis, I described the process of the laboratory diagnostics used to search for a mutation in the PKD2 gene, specifically in its first five exons. The diagnostics consisted of the DNA isolation, PCR reaction, gel electrophoresis, and subsequent Sanger sequencing. However, due to limited laboratory capacity, I did not personally perform the Sanger sequencing. The samples prepared for sequencing were sent to the SEQme company.

In the end, I examined the electrophoreograms and the results from the obtained sequences. I had a total of 20 sequenced samples for the evaluation, always 4 samples for each exon. I was not able to prove the possible mutation in any of them. The remaining exons would also need to be examined for a complete diagnostics of the disease.

Key words

Polycystic kidney disease; PKD2; polycystin; gens; inheritance pattern; PCR

Obsah

1. Úvod.....	7
2. Teoretická část	8
2.1 Anatomie a funkce ledvin	8
2.1.1 Anatomie ledvin.....	8
2.1.2 Nefron	10
2.1.3 Funkce ledvin.....	11
2.2 Polycystická choroba ledvin	11
2.2.1 Polycystická choroba ledvin autozomálně dominantního typu	11
2.2.2 Proteinové produkty genu PKD1 a PKD2	12
2.2.3 Polycystická choroba ledvin autozomálně recesivního typu	13
2.2.4 ADPKD způsobená mutací genu GANAB a DNAJB11	14
2.3 Klinické projevy polycystické choroby ledvin	14
2.4 Diagnostika polycystické choroby ledvin	16
2.5 Laboratorní vyšetření polycystické choroby ledvin.....	17
2.6 Léčba polycystické choroby ledvin.....	17
3. Cíl práce.....	18
4. Metodika	19
4.1 Materiál	19
4.2 Metody	19
4.2.1 Izolace DNA	19
4.2.2 Polymerázová řetězová reakce.....	20
4.2.3 Elektroforéza.....	23
4.2.4 Sangerova metoda sekvenování.....	23
5. Výsledky	25
5.1 Optimalizace primerů.....	25
5.2 Vlastní vyšetření vzorků DNA.....	31
6. Diskuze	35
7. Závěr	37
8. Seznam literatury	38
9. Seznam tabulek a obrázků	43
10. Seznam zkratk	45

1. Úvod

Polycystická choroba ledvin je vrozené, geneticky podmíněné onemocnění, které se vyznačuje především tvorbou cyst v ledvinách. Onemocnění však přináší pacientovi i další závažné zdravotní komplikace, jako je vysoký krevní tlak, bolesti v zádech a bocích, opakující se infekce močových cest a další.

Rozlišují se dva typy dědičnosti tohoto onemocnění, a to autozomálně dominantního typu, který je způsobený mutací genu PKD1 nebo PKD2, a autozomálně recesivního typu, způsobeného mutací genu PKHD1. Mutace genu PKD1 představuje většinu všech případů autozomálně dominantní polycystické choroby ledvin, a je považována za nositele závažnější formy onemocnění, než je tomu u mutace genu PKD2. Autozomálně recesivní varianta dědičnosti polycystické choroby ledvin je mnohem vzácnější a často smrtelná již v útlém věku.

Jednou z možných způsobů diagnostiky při podezření na autozomálně dominantní polycystické onemocnění ledvin je klinická diagnostika využívající vyšetření pomocí ultrazvuku a magnetické rezonance. U osob mladších čtyřiceti let však nemusí dojít k výskytu cyst. Cysty, stejně tak jako i jiné další symptomy onemocnění, se mohou začít objevovat až později, a tak nelze onemocnění v dřívějším věku ihned vyloučit. Z tohoto důvodu je nutné provést molekulární diagnostiku, která odhalí konkrétní genovou mutaci. Ta však nepatří k běžným postupům při diagnostice nemoci, a pro samoplátce je velmi nákladná. To bývá příčinou nevědomého zhoršování stavu pacienta.

V případě, že žena je nositelkou mutace pro autozomálně dominantní polycystickou chorobu ledvin, a chtěla by mít potomka, je lékaři doporučováno, aby daný pár využil služeb asistované reprodukce a podstoupil umělé oplodnění s preimplantačním vyšetřením embryí. Díky preimplantačnímu vyšetření je možné vybrat takové embryo, které mutovaný gen nenese.

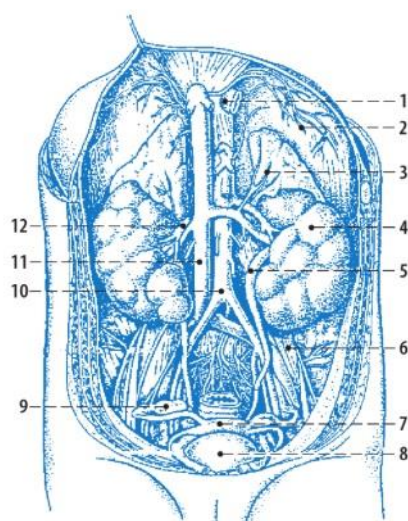
2. Teoretická část

2.1 Anatomie a funkce ledvin

2.1.1 Anatomie ledvin

Ledviny jsou párovým orgánem typického fazolovitého tvaru (Merkunová a Orel, 2008). Jsou uloženy v dutině břišní po stranách bederní páteře, v prostoru mezi pobřišnicí a zadní stěnou břišní (Naňka a Elišková, 2009).

U ledvin lze rozlišit horní a dolní pól, mediální a laterální okraj a přední a zadní plochu (Naňka a Elišková, 2009). V blízkém kontaktu s ledvinami jsou nadledviny. Nasedají na horní pól obou ledvin (Dylevský, 2009). Na mediálním okraji se nachází branka (hilus), která je z přední i zadní strany ohraničena valem. Prochází jí cévy ledviny a odstupuje zde pánvička ledvinná (Naňka a Elišková, 2009). Pánvička ledvinná na několika místech vybíhá do ledvinové dřene v podobě ledvinových kalichů a na opačné straně se zužuje v močovod (Merkunová a Orel, 2008). Kromě nadledvin jsou ledviny velmi blízko jater, dvanáctníku, pravého ohybu tračníku a kličky tenkého střeva, a dotýkají se jich přední plochy pravé ledviny přes nástěnné peritoneum. U levé ledviny jsou přední plochy v kontaktu se slezinou, slinivkou břišní, žaludkem, tenkým střevem a levým ohybem tračníku. Naopak zadní plocha ledvin se opírá o dvanácté žebro, bránici, m. quadratus lumborum a o m. transversus abdominis (Dylevský, 2009) (obr. 1).

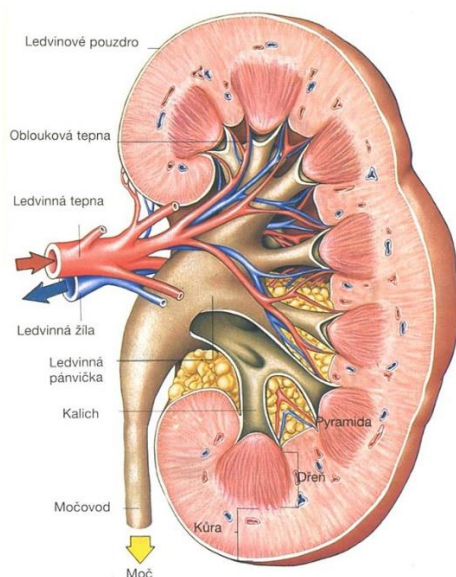


(dvouleté dítě, renkulinizované ledviny)
1 - jícen, 2 - brániční klenba, 3 - levá nadledvina, 4 - levá ledvina, 5 - levý močovod, 6 - m. psoas major, 7 - děložní dno, 8 - močový měchýř, 9 - pravý vaječník, 10 - dolní dutá žíla, 11 - břišní aorta, 12 - pravá renální žíla

Obr. 1: Retroperitoneální prostor (převzato z Dylevský, 2009)

Ledvina dospělého člověka váží zhruba 150 g a je přibližně 9-12 cm dlouhá, 6-7,5 cm široká a asi 3 cm hluboká (Haluzíková et al., 2019). Velikost a hmotnost ledvin však závisí na pohlaví jedince, poněvadž ženy mají obvykle menší ledviny než muži (Čihák a Grim, 2013). Konzistence ledvin je elastická, má červenohnědou barvu, a pravá ledvina bývá uložena níže než levá. Povrch ledviny je krytý vazivovým pouzdrem. Díky tuku, který je okolo ledvin, jsou ledviny chráněny a podpírány (Merkunová a Orel, 2008). Kromě tuku jsou ledviny fixovány také pomocí fascia renalis a úponu mesocolon transversum (Naňka a Elišková, 2009).

Při frontálním řezu ledvinou můžeme pozorovat ledvinovou pánvičku a funkční tkáň (parenchym), která je tvořena řídkým vazivem (intersticiem) prostoupeným cévami a nefrony. Tento parenchym můžeme rozdělit na zevní část, tj. kůru (cortex renalis), a vnitřní část, tj. dřev (medulla renalis) (Merkunová a Orel, 2008). Kůra je světlejší a vytváří tlustou zónu po obvodu ledviny, dřev je tmavší a uspořádaná do pyramid převrácených svým okrajem k hilu. Vrcholky papil (papilla renalis), zaoblených vrcholků pyramid, jsou obemknuty kalichy ledvin, calices renales (Naňka a Elišková, 2009) (obr. 2).

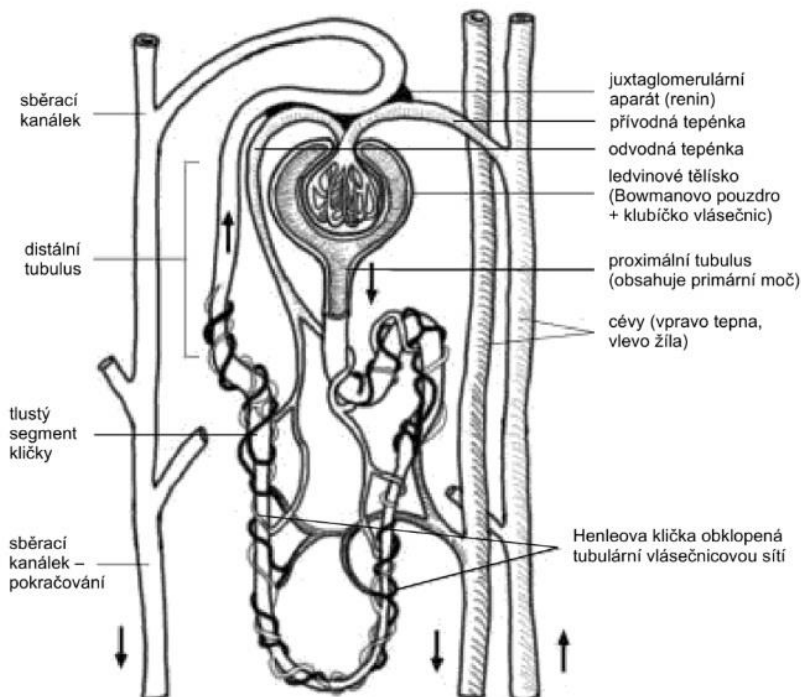


Obr. 2: Frontální řez ledvinou (převzato z <https://www.centrumzdravibrno.cz/grafika/ledviny.jpg>)

2.1.2 Nefron

Základní morfologickou a funkční jednotkou ledvinové tkáně je útvar zvaný nefron. Ten se skládá z Malpighiho tělíska (sculum renale), proximálního tubulu, Henleovi kličky, distálního tubulu a sběracího kanálku (Naňka a Elišková, 2009). Malpighiho tělísko je první částí nefronu a skládá se z glomerulu, klubička kapilár, které vzniká větvením přívodné tepénky a dvojitého Bowmanova pouzdra obklopujícího klubičko. Bowmanovo pouzdro pak pokračuje v proximální tubulus. Henleova klička má tenkou sestupnou část, část vzestupnou končící tzv. tlustým segmentem, a tvoří spojení mezi proximálním a distálním tubulem. Distální tubuly se vyprazdňují do sběracího kanálku ústícího do kalichu pánvičky na ledvinové papile. Kromě těchto částí nefron obsahuje také juxtaglomerulární aparát, který produkuje hormon renin (obr. 3) (Merkunová a Orel, 2008).

Každý člověk se narodí s určitým počtem nefronů (asi 1 milion v jedné ledvině) a v průběhu života se již nové nefrony netvoří, pouze se zvětšují v období růstu nebo při omezeném počtu způsobeném poškozením nebo odstraněním jedné ledviny. Za fyziologických podmínek nejsou všechny nefrony funkční najednou, ale ve své funkci se střídají (Merkunová a Orel, 2008).



Obr. 3: Stavba nefronu (převzato z Merkunová a Orel, 2008)

2.1.3 Funkce ledvin

Společně s trávicím traktem, plicemi a kůží, patří ledviny k hlavním orgánům ve vylučování odpadních látek z organismu (Haluzíková et al., 2019). Tyto odpadní látky mohou být i často toxické, jako je tomu například u dusíkatých sloučenin. Hlavní funkcí močového systému, a tedy i ledvin, je udržení homeostázy organismu, tj. stálosti tělesných pochodů a mechanismů které ji udržují. Mezi neméně důležité funkce ledvin patří i zabezpečení a regulace složení a objemu krve, tvorby červených krvinek v kostní dřeni prostřednictvím syntézy hormonu erythropoetinu, výšky krevního tlaku a aktivace vitamínu D (Dylevský, 2009).

2.2 Polycystická choroba ledvin

Polycystická choroba ledvin je geneticky podmíněné onemocnění, které postihuje především ledviny, ale mohou být zasaženy i další orgány (Igarashi a Samlo, 2002). V ledvinách se vytvářejí cysty naplněné tekutinou (Bergmann et al., 2018). Cysty se také mohou vyvinout v jiných orgánech, zejména v játrech. Onemocnění se neprojevuje pouze tvorbou cyst, ale postižení jedinci trpí i dalšími patologickými změnami (Halvorson et al., 2010).

Rozlišují se dvě hlavní formy polycystické choroby ledvin – autozomálně dominantního typu (ADPKD) a autozomálně recesivního typu (ARPKD) (Eccles a Stayner, 2014).

Kromě těchto dvou genových mutací existují ještě další genové mutace způsobující polycystickou chorobu ledvin. Jsou to mutace genu GANAB a DNAJB11. Obě tyto mutace způsobují ADPKD (Harris et al., 2002).

2.2.1 Polycystická choroba ledvin autozomálně dominantního typu

Autozomálně dominantní forma polycystické choroby ledvin je nejčastější dědičné onemocnění s frekvencí výskytu až 1:500. Je způsobena buď mutací genu PKD1 na krátkých raménkách 16. chromozomu, nebo genu PKD2 na dlouhých raménkách 4. chromozomu (Merta et al., 2007). Tedy kromě mutací v genech GANAB a DNAJB11, které jsou popsány níže.

Gen PKD1 obsahuje 46 exonů a kóduje velký transmembránový protein zvaný polycystin-1, který se skládá ze 4303 aminokyselin. Narozdíl od genu PKD1, gen PKD2

má 15 exonů, a jeho produktem je integrální membránový protein polycystin-2 složený z 968 aminokyselin (Obeidová et al., 2014).

Mutace genu PKD1 tvoří přibližně 85 % všech případů autozomálně dominantní polycystické choroby ledvin a jsou odpovědné za závažnější formu onemocnění. Zbýlých 15 % případů s mírnějšími klinickými projevy nese mutaci v genu PKD2 (Obeidová et al., 2014).

Asi 95 % lidí s ADPKD zdědilo onemocnění od svého rodiče autozomálně dominantním způsobem. Každé dítě má 50 % šanci na zdědění právě této mutované formy genu. Však nejméně u 10 % případů dochází k de novo patogenní variantě, tzn. dochází k nově vzniklé mutaci, která se nevyskytuje ani u jednoho z rodičů (Harris et al., 2002).

2.2.2 Proteinové produkty genu PKD1 a PKD2

Jak jsem již zmínila, proteinovými produkty genů PKD1 a PKD2 jsou polycystin-1 (PC1) a polycystin-2 (PC2). PC1 a PC2 tvoří komplex, receptor-iontový kanál, umístěný v primárních ciliích. Funkce tohoto komplexu, a zejména úloha PC1, není zatím zcela známá, z důvodu nedostatku spolehlivého funkčního testu (Wang et al., 2019).

Polycystin-1 byl zjištěn na povrchu ureterálního pupenu. Ureterální pupen má význam ve vývoji ledvin a vývodných cest močových. Během vývoje ledvin je PC1 exprimován více než v dospělých ledvinách a účastní se hlavně kontaktu buňka-matrix, kdy se v bazální části buňky nachází nejvíce polycystinu. N-terminální oblast PC1 hraje důležitou roli v kontaktu s dalšími proteiny, zatímco jeho C-konec obsahuje několik potenciálních míst fosforylace, které se uplatňují v přenosu signálu. Prostřednictvím aktivace transkripčního faktoru ovlivňuje tento C-konec diferenciaci, proliferaci, i apoptózu buněk. Podle prokázaných studií se údajně celý PC1 chová jako G-protein uvolňující β - a γ -podjednotku a aktivující α -podjednotku. Polycystiny vytvářejí komplexy s adhezivními proteiny E-kadherinem a kateniny, a jsou intracelulárně ve spojení s aktinem, vimentinem, cytokeratinem, troponinem a tropomyozinem. PC1 také přímo reguluje buněčný cyklus a reaguje svou intracelulární oblastí s polycystinem-2 (Tesař et al., 2015).

V ledvinách dospělého člověka je polycystin-2 exprimován více než polycystin-1. Polycystin-2 je exprimován hlavně ve vzestupném raménku Henleovy kličky a v distálních a sběrných tubulech. Je také exprimován v membráně endoplazmatického retikula. Polycystin-2 je v kontaktu s neselektivním kalcium-vázajícím iontovým

kanálem (TRPC-1), kterému je strukturálně podobný. Působením hormonálních stimulů, PC2 také zvyšuje uvolňování vápníku z intracelulárních zásob. Oba polycystiny hrají určitou roli i při ciliogenezi (Tesař et al., 2015). Cilogeneze je podle Vejnera et al. (2012) proces diferenciaci řasinkové buňky, který probíhá v řasinkových buňkách synchronně, za vzniku ciliárního aparátu.

2.2.3 Polycystická choroba ledvin autozomálně recesivního typu

Autozomálně recesivní polycystická choroba ledvin je významnou příčinou onemocnění ledvin u novorozenců a dětí s typickým projevem výrazně zvětšených ledvin, které lze detekovat již v prenatálním období (Adeva et al., 2016). Již v první dekádě života se více jak polovina jedinců s ARPKD postupně dostává do konečného stádia onemocnění ledvin (ESRD). V této fázi onemocnění může být nezbytná transplantace ledvin pacientů (Sweeney et al., 2001). Kromě zvětšených ledvin mají pacienti s ARPKD také vrozenou jaterní fibrózu, která může vést k portální hypertenzi. Péče o pacienty tedy zahrnuje nejen pozornost nefrologů, ale také pečlivé sledování pediatrických gastroenterologů (Hartung a Guay-Woodford, 2014).

K tomu, aby se autozomálně recesivní typ dědičnosti klinicky projevil, musí být zmutovaná alela na každém z homologních chromozomů. Projeví se tedy pouze v homozygotním stavu, přičemž postiženy mohou být jak dívky, tak i chlapci (Teplan et al., 2006).

ARPKD způsobuje mutace genu PKHD1. Produktem genu PKHD1 je protein fibrocystin, někdy také nazývaný jako polyductin. Fibrocystin je velký receptorový integrální membránový protein, který obsahuje více než 4000 aminokyselin, signální peptid, velkou N-koncovou extracelulární oblast, transmembránovou doménu, a krátkou intracelulární cytoplazmatickou doménu (Zhang et al., 2010). Předpokládá se, že nížená nebo nedostatečná funkce fibrocystinu by mohla být příčinou onemocnění ARPKD (Sweeney et al., 2001).

2.2.4 ADPKD způsobená mutací genu GANAB a DNAJB11

Gen GANAB kóduje katalytickou alfa podjednotku glukosidázy II (Porath et al., 2016) a člena rodiny proteinů glykosyl hydrolázy 31. Glykosydáza II je enzym, který se podílí na skládání proteinů a kontrole kvality štěpením zbytků glukózy z nezralých glykoproteinů v endoplazmatickém retikulu. V tkáni plicního nádoru je exprese kódovaného proteinu zvýšená. Zvýšená exprese kódovaného proteinu je i při reakci na UV záření (GANAB glucosidase II alpha subunit, 2016).

Mutace v tomto genu je spojována jak s ADPKD, tak s autozomálně dominantní polycystickou chorobou jater (ADPLD) (Harris et al., 2002). Ta byla v roce 1996 popsána i jako samostatné onemocnění jater, u kterého nedocházelo k poškození ledvin (Hůlek, 2018). Patogenní varianta GANAB genu způsobuje mírné cystické onemocnění ledvin, přičemž obvykle nedochází k poklesu renální funkce. U většiny postižených jedinců se vyskytují také jaterní cysty. Někteří jedinci mají fenotyp autozomálně dominantní polycystické choroby jater, který se projevuje těžkou cystickou chorobou jater a tvorbou malého počtu ledvinných cyst (Harris et al., 2002).

Gen DNAJB11 kóduje ko-chaperonový protein, který je zapojený do zpracování proteinu endoplazmatického retikula (Allison, 2018). Mutace tohoto genu způsobuje autozomálně dominantní polycystickou ledvinovou chorobu, přičemž fenotypově se liší od klasických forem ADPKD. Vytvořené cysty jsou sice menší a ledviny zůstávají nezvětšené, ale dochází k vývoji chronické intersticiální fibróze. Proto bývá označován jako fenotypový hybrid ADPKD a autozomálně dominantního tubulointersticiálního onemocnění ledvin (ADTKD) (Cornec-Le Gall et al., 2018).

2.3 *Klinické projevy polycystické choroby ledvin*

Jak již název onemocnění prozrazuje, hlavním projevem nemoci je výskyt mnoha cyst, zejména v ledvinách (obr. 4). Pacienti trpí bilaterálními renálními cystami i jaterními cystami. Cysty se mohou tvořit také v pankreatu (Harris et al., 2002).



Obr. 4: Patologicko-anatomický obraz ledviny u ADPKD (převzato z Merta et al., 2007)

Mezi další časté komplikace polycystické choroby ledvin patří nebezpečně vysoký krevní tlak (hypertenze), jednostranná nebo oboustranná bederní bolest, krev v moči (hematurie), opakující se infekce močových cest, nefrolitiáza, nefromegalie, renální adenomy či abnormality srdečních chlopní. Dále mají lidé s polycystickou chorobou ledvin i zvýšené riziko rozvoje intrakraniálního aneurysmatu (Li, 2015).

Přestože se u všech jedinců s ADPKD objevují v ledvinách cysty, existuje určitá variabilita závažnosti onemocnění ledvin a dalších projevů nemoci, a to i v jedné rodině (Harris et al., 2002).

ADPKD je příčinou významné morbidity a mortality související s ledvinami a játry u dětí. Příznaky onemocnění jsou obvykle patrné už při narození. Více než polovina takto postižených jedinců postupuje do konečné fáze onemocnění ledvin v první dekádě života, kdy zdravotní stav dětí může být natolik vážný, že je nutné podstoupit transplantaci ledvin. Přibližně 30 % dětí s plicní hypoplazií způsobenou ADPKD zemře do prvního roku života na respirační nedostatečnost nebo na sebe navazující plicní infekce. Díky novorozenecké respirační podpoře a renální substituční terapií se dlouhodobější přežití těchto dětí velmi zlepšilo (Sweeney et al., 2001). Častou doprovodnou komplikací ADPKD je Caroliho syndrom. Jedná se o velmi vzácné onemocnění, které zahrnuje vrozenou jaterní fibrózu a postihuje žlučovody (Kim et al., 2006).

2.4 Diagnostika polycystické choroby ledvin

Diagnostika při podezření na ADPKD u probandu (zkoumaného) se provádí pomocí klinické diagnostiky nebo molekulárně genetických testů. Klinická diagnostika zahrnuje vyšetření pomocí ultrazvuku a magnetickou rezonanci (Harris et al., 2002).

Absence renálních cyst při vyšetření ultrazvukem prakticky vylučuje diagnózu ADPKD způsobenou mutovanou patogenní variantou genu PKD1, která předpovídá zkrácený polycystin-1 u rizikového člověka ve věku 15-30 let nebo více. To, že se renální cysty na ultrazvuku neobjevují, však nemusí vždy vylučovat diagnózu u osob mladších čtyřiceti let, kteří jsou ohroženi ADPKD způsobené variantami genu PKD1 nebo patogenními variantami v jiných genech souvisejících s ADPKD. Lze také použít moderní ultrazvukové skenery s vysokým rozlišením, které dokážou rozeznat malé cysty o velikosti 1-2 mm (Harris et al., 2002).

Magnetická rezonance (MRI) je užitečná hlavně v případě, pokud je výsledek vyšetření ultrazvukem nejednoznačný. U těch, kteří jsou ve věkovém rozmezí 16-40 let, a mají v rodině příbuzného postiženého ADPKD, a tudíž i 50 % riziko onemocnění, je pro diagnózu dostatečná přítomnost více jak deseti cyst (Harris et al., 2002).

Molekulární diagnostika má své uplatnění v oblasti presymptomatické diagnostiky, v oblasti prenatální diagnostiky, a také v oblasti příbuzenských transplantací ledvin. Přínosem presymptomatické diagnostiky je zaručení jednoznačného výsledku kdy pacient nemusí být stále sledován a vyšetřován ultrazvukem. Prenatální diagnostika se provádí jen výjimečně, a to například u rodin, které by při zjištění pozitivního výsledku žádali o přerušování těhotenství (Tesař et al., 2015).

Genetické testy zahrnují jak přímou, tak nepřímou diagnostickou metodu. Vazebná analýza je základní nepřímá diagnostická metoda, která využívá vysoce polymorfní mikrosatelitní markery, a umožňuje stanovení vazby onemocnění na gen PKD1 nebo PKD2. Tato metoda však vyžaduje minimálně dvě postižené osoby ve vyšetřované rodině. Přímou diagnostikou lze detekovat konkrétní mutaci. Velkou nevýhodou přímé diagnostiky je její vyšší cena a také časová náročnost (Tesař et al., 2015).

Při vyšetření je nutné mít na paměti i jiná cystická onemocnění a odlišit je od polycystické choroby ledvin. Dalšími takovými nemocemi postihující ledviny jsou například solitární benigní cysty či tvorba cyst v důsledku vrozené tuberózní sklerózy (Stožický et al., 2015).

2.5 Laboratorní vyšetření polycystické choroby ledvin

Polycystická choroba ledvin se laboratorně vyšetřuje pomocí molekulární diagnostiky. Je užitečným nástrojem pro stanovení a potvrzení diagnózy (Obeidová et al., 2014). Své uplatnění má zejména pokud je vyžadována jednoznačná diagnóza u mladých jedinců, u jedinců s negativní rodinnou anamnézou PKD a pro usnadnění preimplantační genetické diagnostiky (Harris a Rossetti, 2010). Molekulární diagnostika zahrnuje tradiční analýzu vazeb a přímý mutační screening (Obeidová et al., 2014).

ADPKD vykazuje vysokou variabilitu alelické heterogenity, a tak je nutné provést úplný screening jak genu PKD1, tak genu PKD2. Až u 91 % případů screening dokáže detekovat mutaci u jedince s ADPKD, však pouze u 65 % screening odhalí určité mutace. U 26 % jedinců se potvrdí nedefinované změny, které vyžadují další vyhodnocení (Harris a Rossetti, 2010).

2.6 Léčba polycystické choroby ledvin

V současné době je léčba ADPKD zaměřená na snížení mortality a morbiditativy z důvodu renálních a extrarenálních komplikací (Harris et al., 2002). Jednou z možností léčby je snaha o blokádu vazopresinu, díky jehož účinku na adenylyl cyklázu vzniká tvorba cyst. Další možné experimentální léčebné postupy jsou zaměřené na útlum cystogeneze za použití antiproliferativních látek, látek inhibujících tyrozin-kinázy receptoru pro epidermální růstový faktor. U pacientů s ADPKD lze prodloužit život léčbou systémové a portální hypertenze a náhradou funkce ledvin. Pacienty je nutné sledovat. Mezi zákroky, které by lidem s ADPKD měli pomoci, patří například sklerotizace varixů, vytvoření porto-kaválních či splerorenálních zkratů, nebo také zavedení transjugulárních intrahepatálních portosystémových shuntů a splenektomii. U dětí je nezbytné se zaměřit na pečlivou kontrolu arteriálního krevního tlaku a léčbu dalších symptomů (Merta et al., 2007).

3. Cíl práce

Cílem této práce byla detekce mutace genu PKD2 způsobující autozomálně dominantní polycystickou chorobu ledvin a optimalizace navržených primerů. Vzorke DNA byly odebrány čtyřčlenné rodině (rodičům a jejich dvěma dětmi). Autozomálně dominantní polycystická choroba ledvin se v této rodině objevila již dříve, a to u tety otce, která trpěla vážným poškozením ledvin a musela podstoupit jejich transplantaci. Matka dětí nevykazuje žádné příznaky nemoci, u otce však byla provedena klinická diagnostika s pozitivním nálezem. Vzhledem k nízkému věku obou dětí se doposud neprojevily žádné klinické příznaky, které by ukazovaly na potenciální onemocnění zděděné od otce. Z tohoto důvodu bylo zapotřebí provést analýzu genu PKD2 pomocí molekulárně genetických metod k odhalení případné genové mutace u zkoumaných dětí.

4. Metodika

Praktickou část této bakalářské práce jsem vykonávala v laboratoři Zemědělské fakulty Jihočeské Univerzity v Českých Budějovicích. K dispozici jsem měla čtyři vzorky DNA, u kterých bylo mým úkolem detekovat případnou mutaci PKD2 genu. Prvním bodem praktické části byla izolace DNA z odebraných bukalních stěrů od probandů. Poté následovala optimalizace navržených primerů pro prvních pět exonů vyšetřovaného genu. Po provedené optimalizaci bylo možné tyto ověřené primery použít pro PCR reakci a k následnému sekvenování.

4.1 Materiál

Zásadním použitým materiálem pro genetické laboratorní vyšetření byly vzorky obsahující DNA odebrané pomocí bukalních stěrů, které zajistila má vedoucí bakalářské práce. Vzorky byly odebrány všem členům vyšetřované rodiny. Obvykle se pro vyšetření mutací genů, které způsobují polycystické onemocnění ledvin, používají vzorky krve. Odběr periferní krve však může být pro mnohé lidi stresující a nepříjemný. Z tohoto důvodu byla zvolena méně invazivní metoda (odběry DNA bukalními stěry), při které by nemělo nedocházet ke snížení kvality odebraného materiálu. Následně bylo zapotřebí ze vzorku vyizolovat DNA pro její další zpracování molekulárními metodami.

4.2 Metody

4.2.1 Izolace DNA

DNA byla izolována kitem Buccal Swab DNA Mini Kit od firmy Geneaid. Tento kit je určen pro extrakci genomické, mitochondriální i virové DNA z bukalních buněk. Využívá proteinázy K a chaotropických solí k lýze buněk a degradaci proteinů. Dále umožňuje vazbu DNA na matrici ze skleněných vláken v plastové kolonce, a pomocí promývacích pufřů odstraňuje kontaminující látky.

Nejprve bylo do čtyř centrifugačních zkumavek napipetováno 500 μ l pufřu S1 a 20 μ l proteinázy K. Vše se zvortexovalo. Do takto připraveného roztoku byly vmíchány buňky probandů z odběrových kartáčků. Každá zkumavka obsahovala pouze jeden vzorek od jednoho probandu. Rukojeti kartáčků byly odstraněny a zkumavky s kartáčky byly zavřeny a znovu zvortexovány. Následovala desetiminutová inkubace při teplotě 60°C. Pomocí sterilizované pinzety byly poté kartáčky přemístěny do Filter Column

kolonek. Kolonky se centrifugovaly při maximální rychlosti dvě minuty. Získaný eluát byl přepipetován k inkubovaným vzorkům. Kolonek s kartáčky už nebylo v dalších krocích třeba. Do kádinky bylo napipetováno 500 μ l pufru S2 a 1 μ l roztoku s Carrier RNA pro každý vzorek (celkem 2000 μ l pufru S2 a 4 μ l roztoku s Carrier RNA). Připravený mix byl přidán k inkubovaným vzorkům a vše bylo ihned zvortexováno. Vzorky byly poté inkubovány 5 minut při teplotě 60°C. Po uplynulé době se opět vše zvortexovalo a inkubovalo dalších 5 minut při stejné teplotě. Do nové mikrozkušavky bylo přidáno 400 μ l elučního pufru. Mikrozkušavka s elučním pufrem pak byla předehřívána na 60°C. K inkubovaným vzorkům bylo přidáno 500 μ l absolutního ethanolu. Následovalo další zvortexování po dobu 10 sekund. Do čtyř GD kolonek umístěných ve sběrných zkumavkách bylo přepipetováno 750 μ l vzorku, který byl následně centrifugován na maximální rychlost 1 minutu. To, co proteklo přes kolonky, bylo odstraněno, zbytek vzorků byl přepipetován na kolonky, a opakovala se centrifugace po dobu 1 minuty. Kolonky byly přemístěny do nových sběrných zkumavek a ke každé bylo přidáno 400 μ l pufru W1. Opět se vzorky centrifugovaly na maximální rychlost 30 sekund a protečená tekutina byla odstraněna. Na kolonky bylo přidáno 600 μ l Wash pufru a proběhla další centrifugace na maximální rychlost po dobu 30 sekund. Znova se odstranila tekutina, která protekla kolonkami, a vzorky se centrifugovaly na maximální rychlost 3 minuty, aby se kolonky vysušily. Kolonky byly po centrifugaci umístěny do nových mikrozkušavek a na střed kolonek bylo napipetováno 100 μ l předehřátého elučního pufru. Nakonec byly vzorky centrifugovány na maximální rychlost 1 minutu (Buccal swab gDNA extraction kit, 2017).

4.2.2 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metoda, která byla zavedena v roce 1985, a využívá mimobuněčné prostředí k množení definovaných fragmentů DNA. Metoda je velmi rychlá, citlivá, a plně automatizovaná. Je vhodná k amplifikaci (namnožení) úseků DNA i v případě velmi malého vstupního množství. Citlivost metody je natolik vysoká, že je nutné dodržovat jistá opatření k zabránění kontaminaci vzorku nežádoucí DNA (Passarge, 2019).

PCR amplifikace byla provedena u všech vzorků vyizolované DNA za pomoci přístroje Mastercycler EP 384 Thermal Cycler od firmy Eppendorf. Použitá reakční PCR směs byla téměř vždy stejná, ale obsahovala různé kombinace navržených primerů pro

každý ze zkoumaných exonů (exony 1-5) genu PKD2, a různé DNA probandů. Směs obsahovala 10 µl PPP Master Mix od firmy Top-Bio; 0,5 forward primeru; 0,5 µl reverse primeru; 1 µl DNA a 8 µl PCR Ultra H₂O (také od firmy Top-Bio) pro každý vzorek. Dohromady bylo připraveno 120 µl směsi (pro 5 vzorků + rezerva).

V první řadě byla provedena optimalizace navržených primerů pouze s jedním vzorkem DNA, a to se vzorkem odebraným od matky dětí, tedy se vzorkem bez mutovaného genu. Každou kombinaci forward a reverse primeru jsem testovala pomocí gradientové PCR (tabulka 1).

Tabulka 1: Teploty amplifikací vzorků použitých pro gradientovou PCR

Vzorek	Teplota amplifikace
1	52 °C
2	54 °C
3	56 °C
4	58 °C
5	60 °C

Reakce probíhala v 6 cyklech za následujících podmínek:

1. 95 °C / 5 min
 2. 95 °C / 45 s
 3. 52-60 °C / 45 s
 4. 72 °C / 1 min
 5. 72 °C / 5 min
 6. 4 °C
- } x 35

Teprve po optimalizaci jsem mohla primery aplikovat na všechny vyšetřované vzorky DNA. Vzorky byly označené zkratkami NK, PK, AJ a IJ. Vzorek označený jako NK obsahoval DNA od matky dětí a neobsahoval mutaci PKD2 genu, vzorek s označením PK byl odebrán od otce dětí a nesl genovou mutaci, a vzorky s DNA dětí byly označené jako IJ a AJ. Z celkového počtu 22 navržených primerů bylo použito k sekvenování 8 primerů, které byly validované. Sekvence všech použitých primerů jsou uvedené v tabulce 2. Validní primery použité k sekvenování jsou zvýrazněné modře. Pro každý exon jsem celkem připravovala pět vzorků, které obsahovaly určitou kombinaci primerů, přičemž z celkového počtu patnácti exonů jsem vyšetřovala pouze prvních pět.

Čtyři vzorky z pěti pro daný exon obsahovaly DNA probandů (jeden vzorek, jedna DNA) a pátý vzorek sloužil jako kontrola (neobsahoval žádnou DNA, pouze reakční směs). Takto zhotovené vzorky byly následně zpracovány v cycleru.

Tabulka 2: Použité primery (primery použité k sekvenování jsou zvýrazněné modře)

Primer	Exon	Směr	Sekvence	Teplota nasedání primeru
E1F1	1	5'3'	GATGGGCGAGGCGGGGCGAGGCCA	
E1F2	1	5'3'	TATCTCAGCGTCGGGCAGGCATCG	
E1R1	1	3'5'	CTTGGAAGCGCATTCCCCACCTCC	
E1R2	1	3'5'	GGATACCTCCTTCTTCAGGAT	
E2F1	2	5'3'	CATTGGAGCCAGATGTACTCT	60°C
E2F2	2	5'3'	CCCTTTTGCCATTCATGAGAT	
E2R1	2	3'5'	GCACCAGAGGGGCAACTGGGAAG	
E2R2	2	3'5'	GAGAAGGGACGTGATTTGTTC	60°C
E3F2	3	5'3'	GTGAAGGCTGCTGGTATGTG	60°C
E3F4	3	5'3'	CAGAGATGTGGTGGGGTTAAG	
E3F5	3	5'3'	TCGAGTAGGCATGTTGGTAG	
E3R1	3	3'5'	GAGTATCGACAGGACCTGCT	
E3R2	3	3'5'	GAGAACTTTGCTGTGCCTTGC	60°C
E3R3	3	3'5'	GTGCTGAGTGTTTCATATCT	
E4F1	4	5'3'	ACAAATGATGGGGCAAGATGC	
E4F2	4	5'3'	GTTGCCAAATGCTTGGTTATGC	60°C
E4R1	4	3'5'	CAGGTGCAGTAACATCATCC	
E4R2	4	3'5'	TGTGTATTAAGGGAGGTCCT	60°C
E5F1	5	5'3'	CCAGGTCAGGCACAGTACCCAGC	
E5F2	5	5'3'	CAGTACCCAGCTTGATAGGCC	60°C
E5R1	5	3'5'	GGATGCCAAGGACCCAGACGGA	
E5R2	5	3'5'	TGAGGAAGGGAGTTGGGATC	60°C

Nastavený program cycleru obsahoval 6 cyklů a měl následující průběh:

1. 95 °C / 2 min
 2. 95 °C / 45 s
 3. 60 °C / 30 s
 4. 72 °C / 1 min
 5. 72 °C / 10 min
 6. 4 °C
- } x 30

Pro vizuální zobrazení amplifikovaného úseku DNA ve vzorcích byla poté použita gelová elektroforéza.

4.2.3 Elektroforéza

Elektroforéza je jednou z nejpoužívanější separační techniky při izolaci a analýze nukleových kyselin, a složí k oddělení látek na základě jejich rozdílné pohyblivosti v elektrickém poli. Nejčastěji se provádí gelová elektroforéza, při které se využívá agarózového gelu (Drnková, 2019).

Dalším krokem po proběhlé PCR reakci bylo použití gelové elektroforézy (ELFO). Byl použit 1,5 % agarózový gel, který byl vytvořen smícháním 125 ml TBE pufru a 1,85 g agarózy v Erlenmeyerově baňce. Baňku bylo potřeba do vzniku gelu zahřívat v mikrovlnné troubě a poté lehce zchladit pod tekoucí vodou. Pro vizualizaci DNA bylo do nevychládlého tekutého gelu napipetováno 6,5 μ l ethidia bromidu a vše bylo promícháno. Ještě nevychládlý gel byl nalit do vaničky s vloženými hřebeny, které slouží pro vytvoření jamek k napipetování vzorků. Po vychladnutí gelu byl gel i s vaničkou (bez hřebenů) přemístěn do elektroforézy. Do jednotlivých jamek bylo pipetováno 10 μ l vzorků. Na první a poslední pozici řádku použitých jamek bylo pipetováno stejné množství 100 bp ladderu pro posouzení délky získaných PCR produktů. Elektroforéza byla zapnuta na 90 V a 45 minut.

4.2.4 Sangerova metoda sekvenování

Sangerova metoda sekvenování, neboli také dideoxy sekvenování DNA, je metoda založená na principu ukončení syntézy DNA v okamžiku, kdy se dideoxynukleotid zařadí na místo normálního deoxynukleotidu. Dideoxynukleotid se liší od deoxynukleotidu tím, že postrádá hydroxylovou skupinu na 3' pozici uhlíku. Zařazování nukleotidů se ukončí ve chvíli, kdy se v průběhu syntézy DNA zařadí ddNTP. Na počátku syntézy se používají čtyři paralelně rozdělené zkumavky, které obsahují primer, sekvenční směs, a jeden ze čtyř fluorescenčně značených ddNTP. Syntéza je zablokována za tím nukleotidem, který je obsažený ve zkumavce. Je důležité, aby byl ve směsi správný poměr ddATP a dATP pro získání fragmentů všech možných délek v rámci sekvenovaného templátu. Nukleotid ddATP by měl být v nízké koncentraci, zatímco aATP by měl být v nadbytku. Každá ze čtyř zkumavek obsahuje získané fragmenty s odlišným nukleotidem (A, T, G, nebo C), který je 3' konci. V každé zkumavce je tedy jiný nukleotid. Všechny fragmenty mají stejný 5' konec, ale liší se délkou na 3' konci. Získané fragmenty je možné seřadit podle délky a odečíst jejich sekvenci pomocí gelové elektroforézy, však nyní se spíše používají automatizované kapilární elektroforézy (Passarge, 2019).

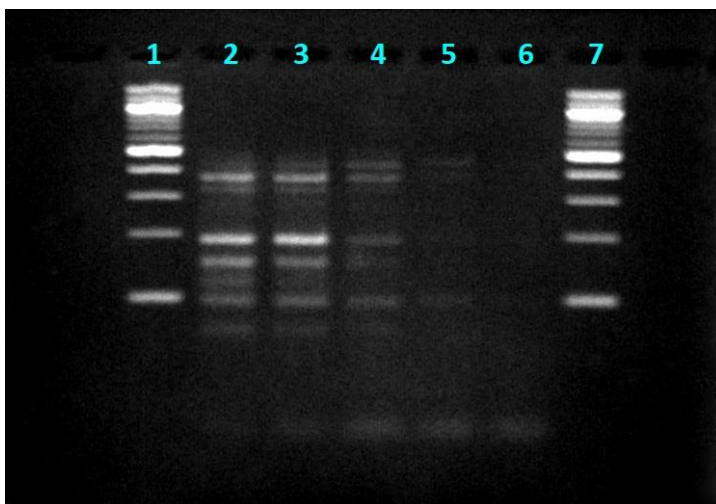
Sangerovo sekvenování jsem neprováděla já, ale firma SEQme. Před odesláním vzorků firmě bylo nutné provést pár kroků pro zajištění požadovaného výsledku sekvenování. Po předešlé gelové elektroforéze klesl objem vzorků z původních 20 μ l na 12 μ l. Do tohoto množství byly přidány 2 μ l látky ExoSap, vše se pomocí laboratorní třepačky promíchalo, a poté byly vzorky krátce centrifugovány. Následně se vzorky daly do cycleru, kde 30 minut probíhalo enzymatické přečištění amplifikovaných fragmentů při 37 °C a dalších 15 minut při 80 °C proběhla deaktivace enzymu. Po proběhlé reakci bylo do vzorků přidáno 5 μ l odpovídajícího forward primeru, který byl použit pro PCR. Takto přichystané vzorky pak bylo možné sekvenovat.

5. Výsledky

5.1 Optimalizace primerů

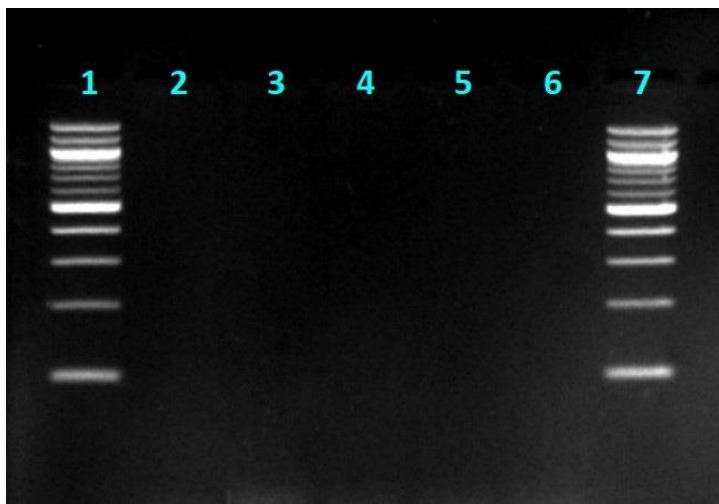
Po izolaci DNA byla mým úkolem optimalizace navržených primerů z důvodu ověření jejich správné funkčnosti při PCR reakci. Pro přípravu PCR reakčních směsí byly použity již výše popsané primery pro každý ze zkoumaných exonů (tabulka 2). Analyzovaný gen obsahuje celkem 15 exonů, přičemž v rámci této práce bylo vyšetřováno prvních pět. K amplifikaci všech vyšetřovaných vzorků byla použita pouze DNA od matky dětí, která nenesla mutaci PKD2 genu. Tento vzorek DNA byl označený jako negativní kontrola (NK). Průběh gradientové PCR reakce a teploty amplifikací vzorků jsou popsány na straně 21. Výsledky průběhu reakcí zobrazují níže přidané elektroforeogramy (obr. 5-13), na kterých je patrné, zda použití dané kombinace primerů splnilo svůj požadovaný účel či nikoliv.

Na obrázku 5 můžeme vidět elektroforeogram pořízený z gelové elektroforézy. Agarózový gel obsahoval 7 vzorků, přičemž do první a poslední jamky byl pipetován 100 bp ladder, díky kterému dokážeme rozeznat velikost jednotlivých bandů (proužků). Mezi tyto laddery byly pipetovány vzorky amplifikované DNA po proběhlé PCR reakci. Směs pro PCR reakci obsahovala primery E1F1 a E1R1, které byly určeny pro 1. exon PKD2 genu. U sloupců 2-6 došlo k rozložení DNA na jednotlivé fragmenty o různých velikostech, přičemž u sloupců 5 a 6 nebylo vzniklé pruhování příliš výrazné.



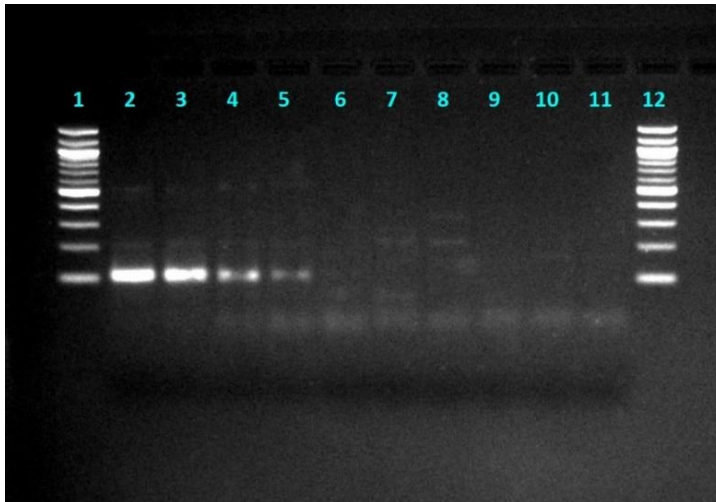
Obr. 5: Elektroforeogram gradientové PCR pro testování primerového páru E1F1+E1R1. Sloupec č. 1 a 7 – 100 bp ladder, 2 – annealing 52°C, 3 – 54°C, 4 – 56°C, 5 – 58°C, 6 – 60°C.

Obrázek 6 zobrazuje výsledek proběhlé elektroforézy, při které byly použity vzorky obsahující kombinaci primerů E1F1 a E1R2. Sloupec 1 a 7 obsahoval pouze 100 bp ladder, stejně tak jak tomu bylo u předešlého obrázku 5. Na rozdíl od obrázku 5 však nejsou u sloupců 2-6 patrné žádné bandy, ani zbytky fragmentů.



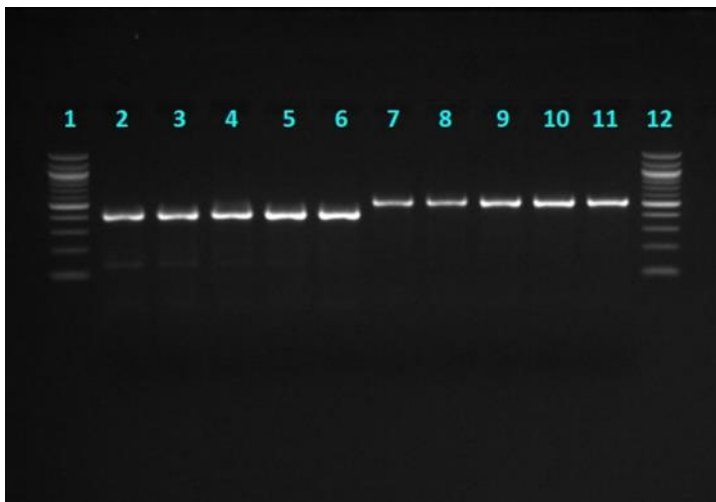
Obr. 6: Elektroforeogram gradientové PCR pro testování primerového páru E1F1+E1R2. Sloupec č. 1 a 7 – 100 bp ladder, 2 – annealing 52°C, 3 – 54°C, 4 – 56°C, 5 – 58°C, 6 – 60°C.

Dále byly použity dvě kombinace primerů (obr. 7). Vzorky ve sloupcích 2-6 obsahovaly primery E1F2 a E1R1, a ve sloupci 7-11 byly obsaženy primery E1F2 a E1R2. Tyto primery byly také určeny pro první exon. U sloupce 2 a 3 je vidět výrazný band o velikosti 100 bp, zatímco u dalších dvou sloupců této kombinace primerů nejsou bandy tolik patrné. Kromě těchto výrazných bandů se ve sloupci 2 a 3 vyskytují ještě další fragmenty o velikosti 200 bp a 500 bp. Ve sloupcích 7-11 se neobjevily žádné bandy, pouze ve spodní části lze vidět zbytky fragmentů. Podobně tomu tak je u sloupce 6 předešlé kombinace (u kombinace E1F2 a E1R1).



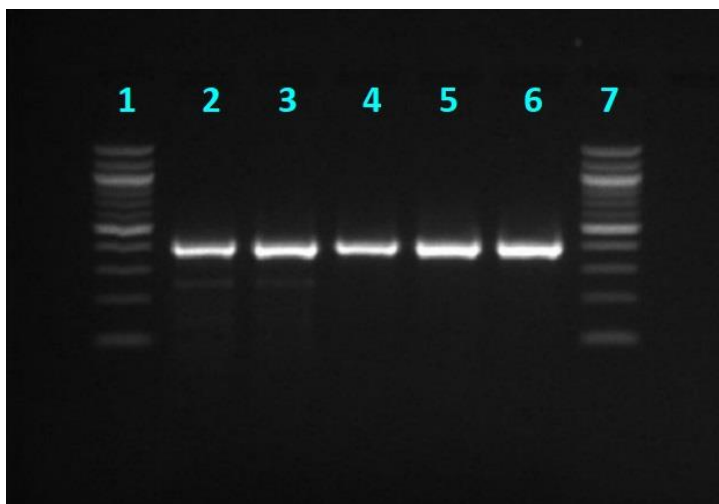
Obr. 7: Elektroforeogram gradientové PCR pro testování primerového páru EIF2+E1R1 a EIF2+E1R2. Sloupec č. 1 a 12 – 100 bp ladder, 2 a 7 – annealing 52°C, 3 a 8 – 54°C, 4 a 9 – 56°C, 5 a 10 – 58°C, 6 a 11 – 60°C.

Následně jsem optimalizovala kombinace primerů pro druhý exon (obr. 8), a to konkrétně kombinaci E2F1 a E2R1 (sloupce 2-6) spolu s druhou kombinací E2F1 a E2R2 (sloupce 7-11). Zde lze v obou případech vidět jeden velmi výrazný band ve všech sloupcích. Pod bandem se u sloupců 2-6 dále objevují i náznaky jiných fragmentů. Velikost bandů první kombinace primerů je 400 bp, u druhé kombinace je to 500 bp. Do sloupce 1 a 12 byl opět pipetován jen ladder bez jakékoliv další příměsi či DNA.



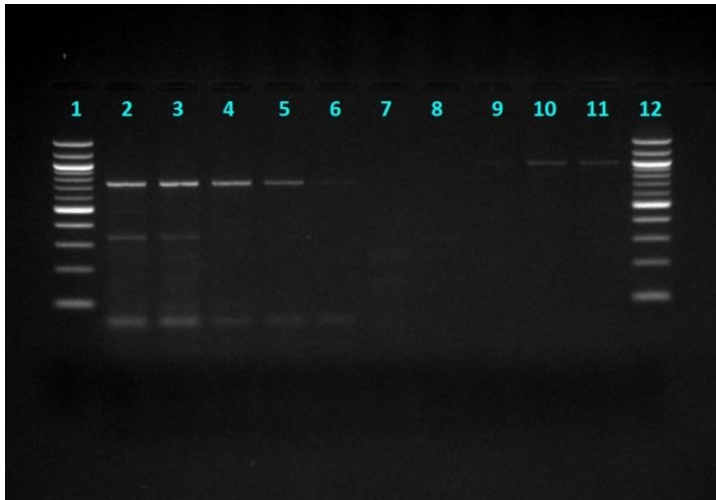
Obr. 8: Elektroforeogram gradientové PCR pro testování primerového páru E2F1+E2R1 a E2F1+E2R2. Sloupec č. 1 a 12 – 100 bp ladder, 2 a 7 – annealing 52°C, 3 a 8 – 54°C, 4 a 9 – 56°C, 5 a 10 – 58°C, 6 a 11 – 60°C.

Na obrázku 9 byla použita kombinace primerů E3F2 a E3R2, která byla určena pro amplifikaci třetího exonu. U sloupců 2-6 můžeme vidět jeden jasný band o velikosti 400 bp, přičemž u druhého a třetího sloupce se pod tímto výrazným fragmentem nacházejí ještě dva kratší a méně viditelné fragmenty. Do první a poslední jamky byl opět pipetován ladder.



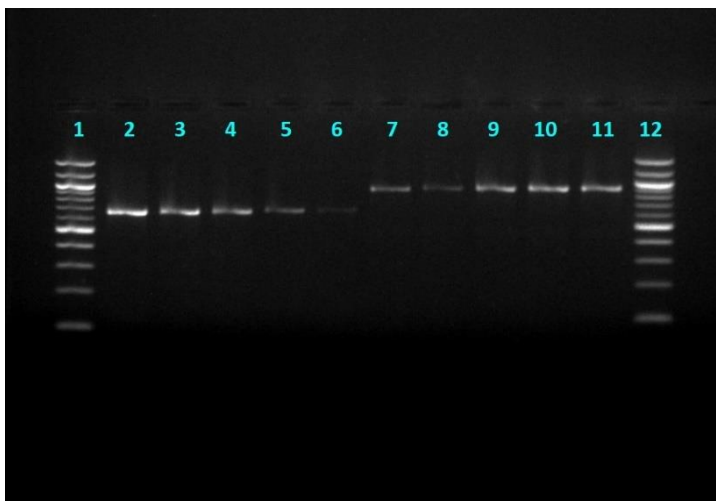
Obr. 9: Elektroforeogram gradientové PCR pro testování primerového páru E3F2+E3R2. Sloupec č. 1 a 7 – 100 bp ladder, 2 – annealing 52°C, 3 – 54°C, 4 – 56°C, 5 – 58°C, 6 – 60°C.

Předposledním vyšetřovaným exonem byl čtvrtý exon. K jeho amplifikaci byly využity celkem čtyři kombinace primerů. Výsledek amplifikace s použitím prvních dvou kombinací zobrazuje obrázek 10. Sloupce 2-6 obsahovaly primery E4F1 a E4R1. Podobně jako na obrázku 5 byla v tomto případě DNA rozdělena na více fragmentů. U druhé kombinace primerů byly použity primery E4F1 a E4R2 (sloupce 7-11). V tomto případě můžeme pozorovat, že k amplifikaci vzorků došlo pouze při teplotě 58°C a 60°C (sloupce 10 a 11), přičemž vzniklé bandy o velikosti 1000 bp nejsou příliš výrazné. Sloupec 1 a 12 obsahoval 100 bp ladder.



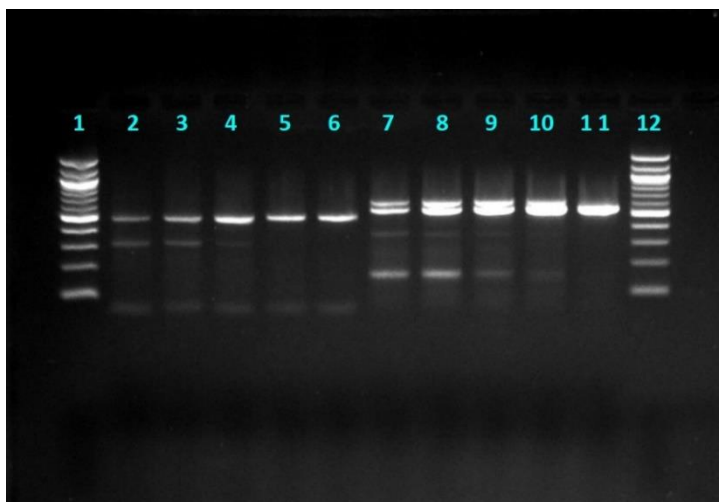
Obr. 10: Elektroforeogram gradientové PCR pro testování primerového páru E4F1+E4R1 a E4F1+E4R2. Sloupec č. 1 a 12 – 100 bp ladder, 2 a 7 – annealing 52°C, 3 a 8 – 54°C, 4 a 9 – 56°C, 5 a 10 – 58°C, 6 a 11 – 60°C.

Do druhých dvou kombinací pro čtvrtý exon byly použity primery E4F2 a E4R1 (sloupce 2-6), a také E4F2 spolu s primerem E4R2 (sloupce 7-11) (obrázek 11). V obou případech je u všech sloupců jasně vidět vzniklé bandování. Velikost bandů u první kombinace primerů je necelých 700 bp, u druhé kombinace velikost odpovídá téměř 1000 bp. Jako již u předešlých obrázků, v prvním a posledním sloupci byl obsažen ladder sloužící k určení velikosti vzniklého pruhování.



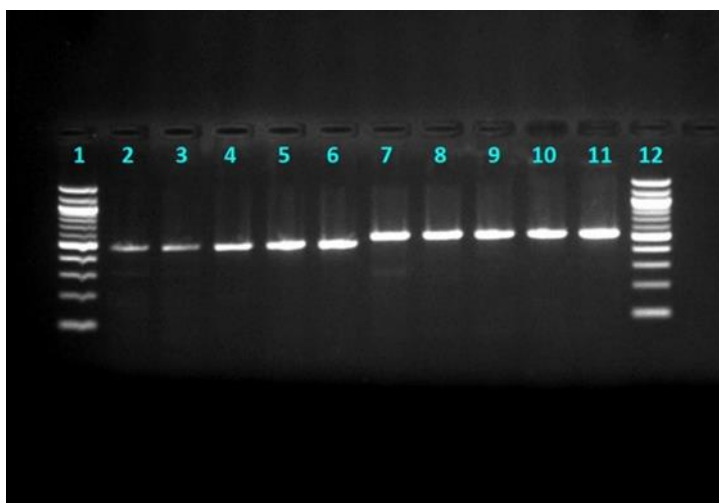
Obr. 11: Elektroforeogram gradientové PCR pro testování primerového páru E4F2+E4R1 a E4F2+E4R2. Sloupec č. 1 a 12 – 100 bp ladder, 2 a 7 – annealing 52°C, 3 a 8 – 54°C, 4 a 9 – 56°C, 5 a 10 – 58°C, 6 a 11 – 60°C.

Posledními optimalizovanými primery byly primery pro pátý exon. Na obrázku 12 byly u sloupců 2-6 použity primery E5F1 a E5R1. Vzniklé bandy o velikosti 500 bp jsou výrazné, přičemž nejvíce výrazné jsou z této kombinace u sloupců 4-6. U sloupců 7-11 byly aplikovány primery E5F1 a E5R2. Při použití této kombinace vznikly dvě řady bandů těsně nad sebou. Kromě výrazných bandů se zde objevují i jiné fragmenty.



Obr. 12: Elektroforeogram gradientové PCR pro testování primerového páru E5F1+E5R1 a E5F1+E5R2. Sloupec č. 1 a 12 – 100 bp ladder, 2 a 7 – annealing 52°C, 3 a 8 – 54°C, 4 a 9 – 56°C, 5 a 10 – 58°C, 6 a 11 – 60°C.

Na závěr všech provedených optimalizací byly optimalizovány primery v kombinaci E5F2 a E5R1 (sloupec 2-6), a E5F2 a E5R2 (sloupec 7-11). U všech sloupců můžeme pozorovat jen jeden velmi výrazný band.

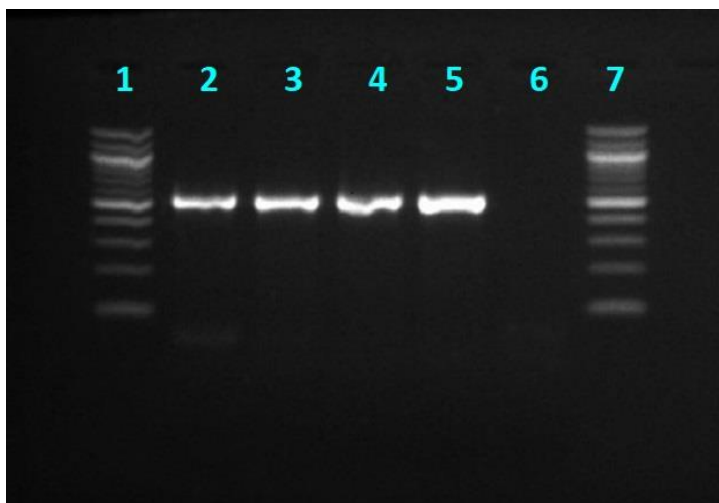


Obr. 13: Elektroforeogram gradientové PCR pro testování primerového páru E5F2+E5R1 a E5F2+E5R2. Sloupec č. 1 a 12 – 100 bp ladder, 2 a 7 – annealing 52°C, 3 a 8 – 54°C, 4 a 9 – 56°C, 5 a 10 – 58°C, 6 a 11 – 60°C.

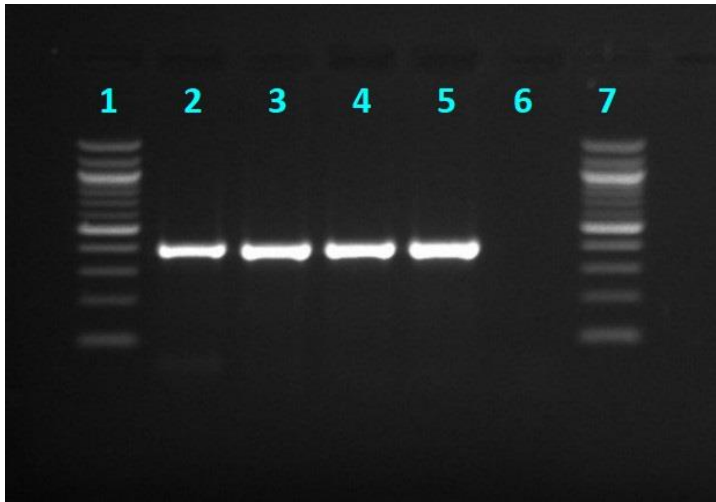
5.2 Vlastní vyšetření vzorků DNA

Po optimalizaci primerů následovala příprava vzorků na sekvenování. Postup byl téměř totožný jako u optimalizace primerů. Rozdílné však bylo to, že tentokrát byly použity všechny čtyři vzorky DNA namísto jen jednoho vzorku označeného jako NK. Každý pátý vzorek (kromě obrázku 17 je tento vzorek na obrázcích vedený pod číslem 6) neobsahoval žádnou DNA a sloužil pouze jako kontrola v případě kontaminace vzorků. Průběh cyklů PCR reakce je popsán na straně 22. Použité teploty, při kterých docházelo k nejlepšímu nasedání primerů, jsou uvedené v tabulce 2.

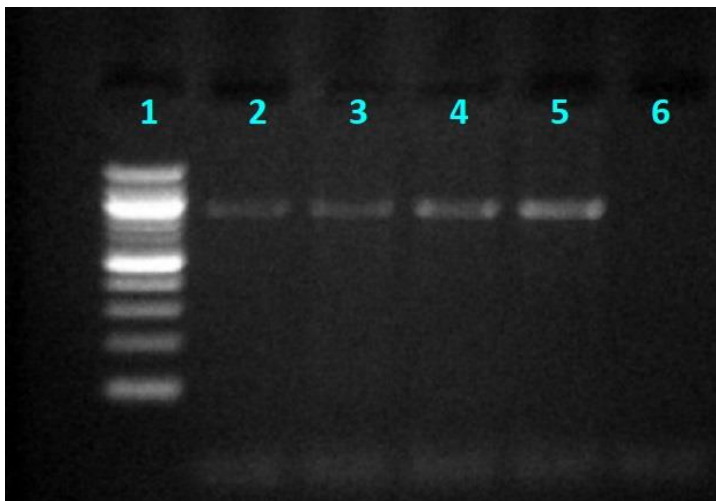
Obrázek 14 představuje vyfocený gel z gelové elektroforézy, při které byly použity vzorky připravené pomocí PCR reakce. Vzorky na tomto obrázku obsahovaly primerový pár E2F1 a E2R2. Na obrázku 15 je znázorněný výsledek amplifikace vzorků obsahujících kombinaci primerů E3F2 a E3R2, předposlední obrázek (obrázek 16) zobrazuje amplifikaci fragmentu pomocí primerů E4F2 a E4R2, a u posledního obrázku (obrázek 17) probíhala amplifikace pomocí kombinace primerů E5F2 a E5R2. Na všech těchto obrázcích, kromě obrázku 16, se vyskytuje velmi výrazné pruhování.



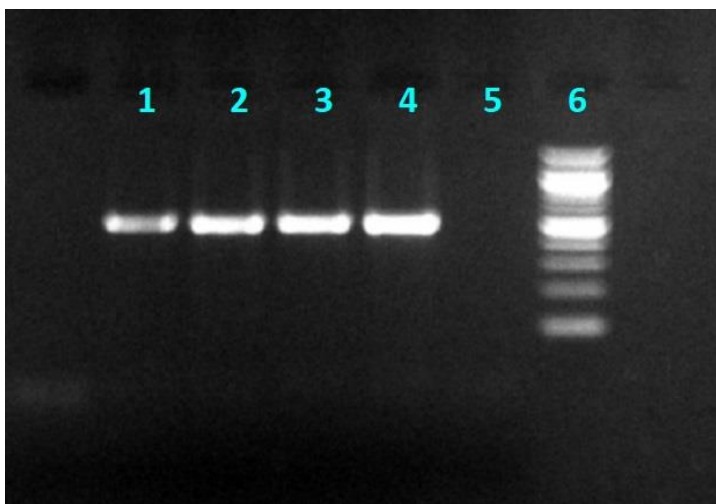
Obr. 14: Elektroforeogram PCR pro amplifikaci fragmentu pomocí primerů E2F1+E2R2. Sloupec č.1 a 7 – 100 bp ladder, 2 – vzorek NK, 3 – PK, 4 – AJ, 5 – IJ, 6 – kontrola.



Obr. 15: Elektroforeogram PCR pro amplifikaci fragmentu pomocí primerů E3F2+E3R2. Sloupec č.1 a 7 – 100 bp ladder, 2 – vzorek NK, 3 – PK, 4 – AJ, 5 – IJ, 6 – kontrola.

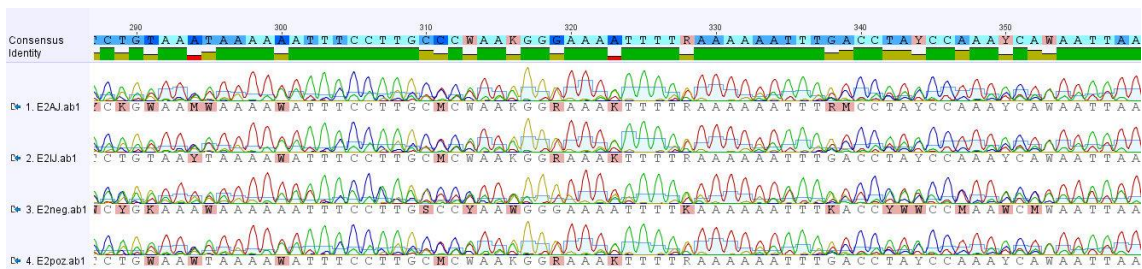


Obr. 16: Elektroforeogram PCR pro amplifikaci fragmentu pomocí primerů E4F2+E4R2. Sloupec č.1 – 100 bp ladder, 2 – vzorek NK, 3 – PK, 4 – AJ, 5 – IJ, 6 – kontrola.

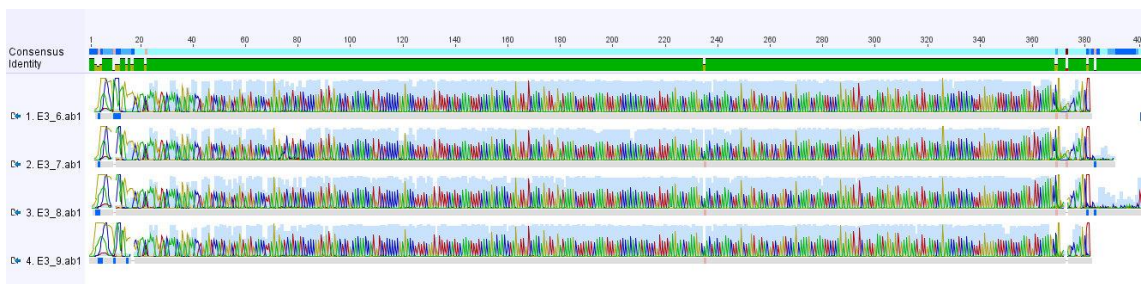


Obr. 17: Elektroforeogram PCR pro amplifikaci fragmentu pomocí primerů E5F2+E5R2. Sloupec č.1 – vzorek NK, 2 – PK, 3 – AJ, 4 – IJ, 5 – kontrola, 6 – 100 bp ladder.

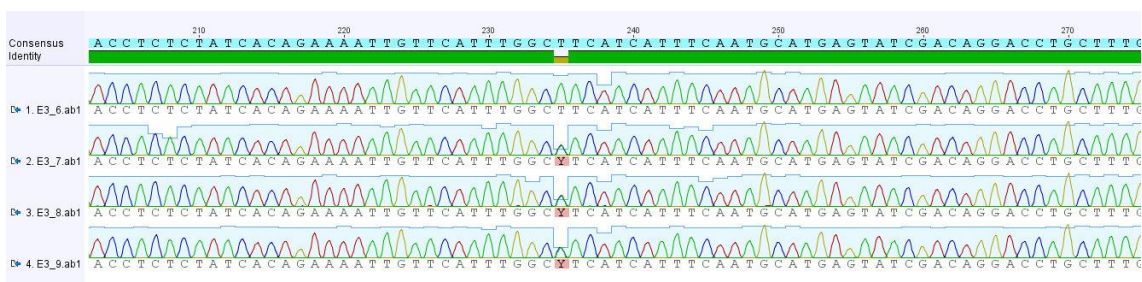
Pomocí metody PCR a následného sekvenování byly analyzovány vzorky obsahující DNA probandů. Výsledky sekvenování znázorňují obrázky 18-24. Na obrázku 18 jsou zaznamenané sekvence druhého exonu všech použitých vzorků DNA. Na tomto obrázku se střídají vysoké a špičaté píky s nízkými píky. Značně se překrývají, a nejsou dobře viditelné. Z důvodu toho, že se píky překrývají a nejsou dobře čitelné, nebylo možné tyto sekvence vyhodnotit. Obrázky 19 a 20 zobrazují sekvence třetího exonu. V tomto případě jsou vzniklé píky spíše vysoké a špičaté, ale také velmi dobře čitelné. Nedochozí k žádnému překrývání píků a všechny sekvence jsou stejné. U čtvrtého exonu (obr. 21-23) dochází k mírnému překrývání píků. Tyto píky nejsou příliš vysoké a jsou hodně zakulacené. Sekvence pátého exonu byly u všech vzorků stejné (obr. 24). Píky byly vysoké a špičaté a nevyskytovala se zde žádná odchylka mezi jednotlivými vzorky. Souhrnné výsledky detekce mutace jsou zaznamenané v tabulce 3.



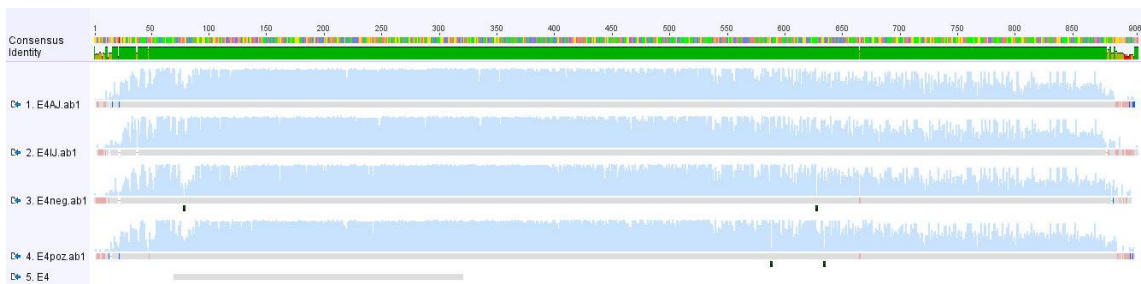
Obr. 18: Sekvence druhého exonu. Řádek č. 1 – vzorek AJ, 2 – IJ, 3 – NK, 4 – PK.



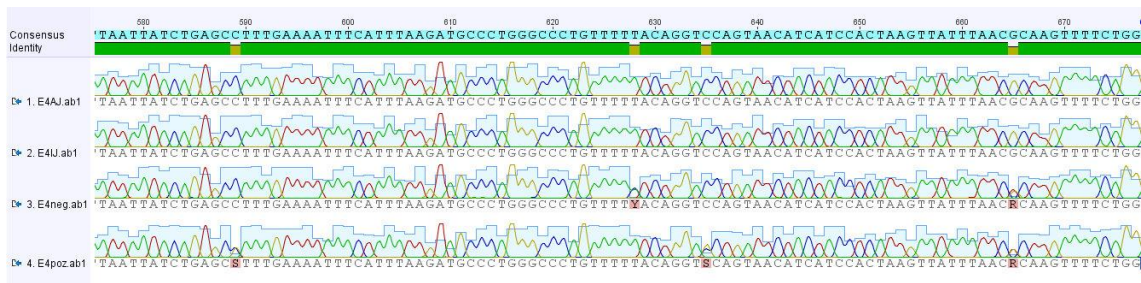
Obr. 19: Sekvence třetího exonu. Řádek č. 1 – vzorek NK, 2 – PK, 3 – AJ, 4 – IJ.



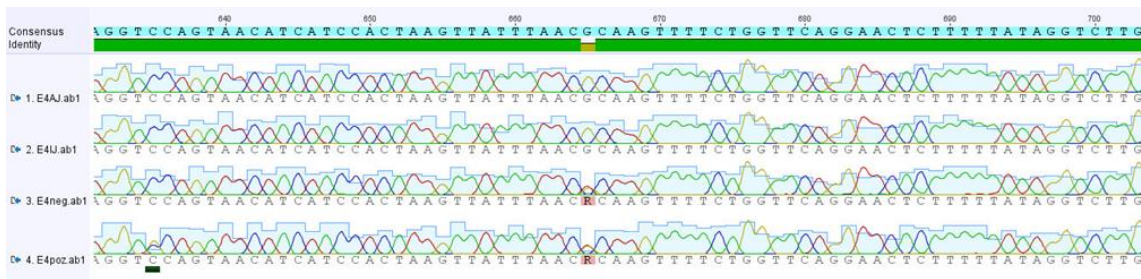
Obr. 20: Sekvence třetího exonu. Řádek č. 1 – vzorek NK, 2 – PK, 3 – AJ, 4 – IJ.



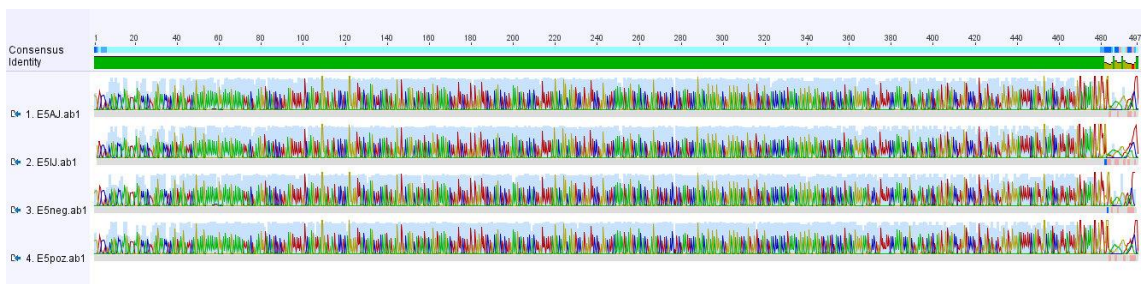
Obr. 21: Sekvence čtvrtého exonu. Řádek č. 1 – vzorek AJ, 2 – IJ, 3 – NK, 4 – PK.



Obr. 22: Sekvence čtvrtého exonu. Řádek č. 1 – vzorek AJ, 2 – IJ, 3 – NK, 4 – PK.



Obr. 23: sekvence čtvrtého exonu. Řádek č. 1 – vzorek AJ, 2 – IJ, 3 – NK, 4 – PK.



Obr. 24: Sekvence pátého exonu. Řádek č. 1 – vzorek AJ, 2 – IJ, 3 – NK, 4 – PK.

Tabulka 3: Souhrnné výsledky detekce mutace

Exon	Primerový pár	Sekvenováno	Nalezená mutace
2	E2F1+E2R2	ano	ne
3	E3F2+E3R2	ano	ne
4	E4F2+E4R2	ano	ne
5	E5F2+E5R2	ano	ne

6. Diskuze

Diagnostika ADPKD se provádí pomocí klinické diagnostiky nebo molekulárně genetických testů (Harris et al., 2002). Molekulární diagnostika má své uplatnění zejména pokud je vyžadována jednoznačná diagnóza (Harris a Rossetti, 2010). Mutace genu PKD2 je velice variabilní a v každé rodině se může vyskytovat na jiném místě. Vzhledem k tomu, že je tento gen rozsáhlý, je velmi obtížné tuto mutaci najít.

Gen PKD2 celkem obsahuje 15 exonů, přičemž účelem této bakalářské práce byla detekce mutace v prvních pěti exonech. Pro každý exon jsem testovala více primerových párů, a vybírala jsem ty z nich, které dokázali amplifikovat pouze jeden konkrétní úsek genu. Ty jsem poté mohla použít k vyšetřování všech vzorků DNA a následnému sekvenování. V případě, kdy jsem objevila vhodný primerový pár pro určitý exon, nebylo dále nutné, abych testovala i další primery pro amplifikaci stejného exonu. Z tohoto důvodu nebyly použity veškeré navržené primery.

V ideálním případě by se měl na gelu objevit jen jeden výrazný vodorovný proužek u všech sloupců elektroforeogramu, a tyto proužky by měly být uspořádané v jedné řadě vedle sebe. Tak je tomu například při použití primerového páru E2F1 a E2R2 (obrázek 8), kdy můžeme vidět ve sloupcích 7-11 výrazné pruhování bez známek jiných fragmentů. Vzhledem k tomu, že gradientová PCR vyšla u této kombinace primerů specificky ve všech zkoušených teplotách (52-60°C), zvolila jsem pro amplifikaci fragmentu před sekvenováním teplotu 60°C. Při této teplotě by dle mého názoru měla být specifita tohoto primerového páru nejvyšší, aniž by to mělo vliv na účinnost reakce. Ta totiž může při příliš vysokých teplotách nasedání primerů klesat. Tímto způsobem jsem postupovala i v případě primerových párů E3F2 a E3R2, E4F2 a E4R2, a E5F2 a E5R2. Tyto čtyři primerové páry jsem poté použila k sekvenování všech vzorků DNA.

Místo jednoho proužku se však u některých sloupců objevilo proužků hned několik. V takové situaci to znamená, že nebyly použity vhodné primery, protože nebyly dostatečně specifické a amplifikovaly více fragmentů. Těchto kombinací primerů tedy nebylo možné využít pro sekvenování. Vzniklé píky by se překrývaly a sekvence by nebyly čitelné. Při použití primerového páru E1F2 a E1R1 sice došlo k výskytu dvou výrazných bandů, ale sloupce také obsahovaly i jiné fragmenty, které by byly rušivým elementem při sekvenování. Stejně tak jsem nemohla použít i kombinace E2F1 a E2R1, E4F1 a E4R1, E4F1 a E4R2, E5F1 a E5R1, a E5F1 a E5R2. Některé primerové páry

dokonce neamplifikovaly žádné proužky. Z těchto důvodů jsem nemohla použít ani jednu kombinaci primerů pro první exon.

Z výsledku sekvenování vyplynulo několik jednonukleotidových odlišností mezi jednotlivými vzorky. Však vzhledem k tomu, že se tyto odlišnosti vždy vyskytovaly u obou rodičů, nemůže být žádná z nich kauzální mutací způsobující polycystózu ledvin u testované rodiny.

Kvůli velkému množství překrývajících se píků nebylo možné detekovat případnou mutaci v druhém exonu. Zdvojené píky na konci sekvence mohly být způsobené Taq polymerázou. Ta totiž není příliš procesivní, protože po polymerizaci krátkého úseku DNA dochází k disociaci enzymu od templátu, a 3' konec vznikajícího řetězce se z templátu uvolní. Pokud by k tomu došlo v homopolymerní oblasti a 3' konec následně nasedne zpět na templát, může dojít k tomu, že nasedne o bázi vpřed nebo zad. Při následné extenzi produktu za homopolymerním úsekem pak dostaneme směs produktů lišících se o bázi, ale i o více bází. Sekvenční elektroforéza dokáže tuto směs rozdělit. Až k homopolymeru tak vznikne čistá sekvence, za kterou následuje směs. Velikost vzniklé směsi je závislá na délce homopolymerní oblasti (Znamé neznámé DNA sekvenování..., 2012-2020).

7. Závěr

Účelem této bakalářské práce byla optimalizace navržených primerů a následná detekce genové mutace, která by v případě pozitivního nálezu způsobovala autozomálně dominantní polycystickou chorobu ledvin. Konkrétně jsem se zaměřila na gen PKD2. Pro optimalizaci jsem měla k dispozici 22 primerů, které jsem testovala metodou gradientové PCR. Pomocí gelové elektroforézy a následného použití počítače jsem vyhodnotila výsledky amplifikovaných fragmentů a vybrala jsem takové páry primerů, které byly vhodné pro sekvenování vzorků. Tímto krokem jsem splnila jeden z cílů. Porovnávala jsem také sekvence exonů a hledala jsem genovou mutaci mezi jednotlivými vzorky. Na konci výzkumu jsem došla k závěru, že se u vzorků nenacházejí žádné mutace. Objevilo se jen několik jednonukleotidových odlišností. Tyto odlišnosti se však vyskytovaly vždy jen u obou rodičů. Znamená to tedy, že se nemohlo jednat o kauzální mutaci, která by způsobovala onemocnění.

V rámci této práce jsem testovala primerové páry pouze pro prvních pět exonů genu PKD2. Pro úplnou diagnostiku je však potřeba testovat i zbylé exony. Toto vyšetření je však finančně nákladnější a nepatří mezi rutinně prováděné úkony, díky čemuž dochází k pozdějšímu záchytu onemocnění u pacientů.

Kromě samotného výzkumu jsem se také v rámci vypracování odborné rešerše seznámila s problematikou spojenou s tímto závažným onemocněním, a také se způsoby diagnostiky a léčby.

8. Seznam literatury

1. ADEVA, M. et al., 2016. Clinical and molecular characterization defines a broadened spectrum of autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Medicine (Baltimore)* [online]. 85(1), 1-21 [cit. 2020-06-09]. doi: 10.1097/01.md.0000200165.90373.9a. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16523049/>
2. ALLISON, S. J., 2018. DNAJB11: another player in ADPKD. *Nature Reviews Nephrology* [online]. 14(476) [cit. 2020-04-09]. doi: <https://doi.org/10.1038/s41581-018-0024-4>. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/s41581-018-0024-4>
3. BERGMANN, C. et al., 2018. Polycystic kidney disease. *Nature Reviews Disease Primers* [online]. 4(1) [cit. 2020-03-01]. doi: 10.1038/s41572-018-0047-y. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6592047/>
4. Buccal swab gDNA extraction kit, 2017. [online]. Geneaid Biotech Ltd. [cit. 2020-07-29]. Dostupné z: <http://www.geneaid.com/sites/default/files/GSK14.pdf>
5. CORNEC-LE GALL, E. et al., 2018. Monoallelic Mutations to DNAJB11 Cause Atypical Autosomal-Dominant Polycystic Kidney Disease. *The American Journal of Human Genetics* [online]. Cell Press. 102(5), 715-1008 [cit. 2020-05-09]. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.03.013>. Dostupné z: [https://www.cell.com/ajhg/fulltext/S0002-9297\(18\)30102-2](https://www.cell.com/ajhg/fulltext/S0002-9297(18)30102-2)
6. ČIHÁK, R., GRIM, M., 2013. *Anatomie 2*. 3. vydání. Praha: Grada. 512 s. ISBN 978-80-247-4788-0.
7. DRNKOVÁ, B., 2019. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie a hygiena: pro zdravotnické obory*. Praha: Grada. 140 s. ISBN 978-80-271-0693-6.

8. DYLEVSKÝ, I., 2009. Funkční anatomie. Praha: Grada. 544 s. ISBN 978-80-247-3240-4.
9. ECCLES, M. R., STAYNER, C. A., 2014. Polycystic kidney disease – where gene dosage counts. *F1000Prime Reports* [online]. 6(24) [cit. 2020-05-09]. doi: 10.12703/P6-24. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3974567/>
10. GANAB glucosidase II alpha subunit, 2016. [online]. NCBI. [cit. 2020-04-010]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23193>
11. HALUZÍKOVÁ, J. et al., 2019. Ošetřovatelství v nefrologii. Praha: Grada. 252 s. ISBN 978-80-247-5329-4.
12. HALVORSON, C. R. et al., 2010. Polycystic kidney disease: inheritance, pathophysiology, prognosis, and treatment. *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease* [online]. 3, 69-83 [cit. 2020-04-09]. doi: 10.2147/ijnrd.s6939. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3108786/>
13. HARRIS, P. C., ROSSETTI, S., 2010. Molecular diagnostics for autosomal dominant polycystic kidney disease [online]. *Nature Reviews Nephrology* 6, 197-206 [cit. 2020-05-14]. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/nrneph.2010.18>
14. HARRIS, P. C. et al., 2002. Polycystic Kidney Disease, Autosomal Dominant [online]. *GeneReviews*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle [cit. 2020-07-12]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1246/>

15. HARTUNG, E. A., GUAY-WOODFORD, L. M., 2014. Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease: A Hepatorenal Fibrocystic Disorder With Pleiotropic Effects. *Pediatrics* [online]. 134(3), 833-845 [cit. 2020-06-06]. doi: <https://doi.org/10.1542/peds.2013-3646>. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4143997/>
16. HŮLEK, P. et al., 2018. *Hepatologie*. 3. vydání. Praha: Grada. 768 s. ISBN 978-80-271-0394-2.
17. IGARASHI, P., SAMLO, S., 2002. Genetics and Pathogenesis of Polycystic Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology* [online]. 13(9), 2384-2398 [cit. 2020-05-04]. doi: <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000028643.17901.42>. Dostupné z: <https://jasn.asnjournals.org/content/13/9/2384.long>
18. KIM, J. T. et al., 2006. Caroli's Syndrome with Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease in a Two Month Old Infant [online]. *Yonsei Medical Journal* 47(1), 131-134 [cit. 2020-04-04]. doi: 10.3349/ymj.2006.47.1.131. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2687570/>
19. LI, X., 2015. *Polycystic Kidney Disease* [online]. Brisbane: Codon Publications. 514 p. [cit. 2020-06-07]. ISBN 978-0-9944381-0-2. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK373386/>
20. MERKUNOVÁ, A., OREL, M., 2008. *Anatomie a fyziologie člověka pro humanitní obory*. Praha: Grada. 304 s. ISBN 978-80-247-1521-6.
21. MERTA, M. et al., 2007. Polycystická choroba ledvin [online]. *Interní medicína pro praxi* 9(6), 283-287 [cit. 2020-05-12]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2007/06/08.pdf>
22. NAŇKA, O., ELIŠKOVÁ, M., 2009. *Přehled anatomie*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén. 416 s. ISBN 978-80-7262-612-0.

23. OBEIDOVÁ, L. et al., 2014. Novel mutations of PKD genes in the Czech population with autosomal dominant polycystic kidney disease [online]. BMC Medical Genetics 15(41) [cit. 2020-05-12]. Dostupné z: <https://bmcmmedgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2350-15-41>
24. PASSARGE, E., 2019. Barevný atlas genetiky. Praha: Grada. 472 s. ISBN 978-80-247-3099-8.
25. PORATH, B. et al., 2016. Mutations in GANAB, Encoding the Glucosidase II α Subunit, Cause Autosomal-Dominant Polycystic Kidney and Liver Disease. The American Journal of Human Genetics [online]. Cell Press. 98(6), 1047-1272 [cit. 2020-06-08]. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.05.004>. Dostupné z: [https://www.cell.com/ajhg/fulltext/S0002-9297\(16\)30138-0](https://www.cell.com/ajhg/fulltext/S0002-9297(16)30138-0)
26. STOŽICKÝ, F. et al., 2015. Základy dětského lékařství. 2. vydání. Univerzita Karlova v Praze: Karolinum. 472 s. ISBN 978-80-246-2997-1.
27. SWEENEY, W. E. et al., 2001. Polycystic Kidney Disease, Autosomal Recessive [online]. GeneReviews. Seattle (WA): University of Washington, Seattle [cit. 2020-07-12]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1326/>
28. TEPLAN, V. et al., 2006. Praktická nefrologie: 2., zcela přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada. 536 s. ISBN 80-247-1122-2.
29. TESAŘ, V. et al., 2015. Klinická nefrologie. 2. vydání. Praha: Grada. 560 s. ISBN 978-80-247-4367-7.
30. VAJNER, L. et al., 2012. Lékařská histologie II.: Mikroskopická anatomie. Praha: Karolinum. 174 s. ISBN 978-80-246-2165-4.

31. WANG, Z. et al., 2019. The ion channel function of polycystin-1 in the polycystin-1/polycystin-2 complex [online]. EMBO reports [cit. 2020-05-07]. doi: 10.15252/embr.201948336. Dostupné z: <https://www.embopress.org/doi/full/10.15252/embr.201948336>
32. ZHANG, J. et al., 2010. Polycystic kidney disease protein fibrocystin localizes to the mitotic spindle and regulates spindle bipolarity. Human molecular genetics [online]. 19(17), 3306–3319 [cit. 2020-06-01]. doi: 10.1093/hmg/ddq233. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2916704/>
33. Známé neznámé DNA sekvenování - Část III: Příliš mnoho signálů – zdvojené píky (= směsné sekvence), 2012-2020. [online]. [cit. 2020-06-11]. Dostupné z: <https://www.seqme.eu/cs/magazine/sanger-troubleshooting-part-three>

9. Seznam tabulek a obrázků

Tabulka 1: Teploty amplifikací vzorků použitých pro gradientovou PCR (zdroj vlastní)

Tabulka 2: Použité primery (zdroj vlastní)

Tabulka 3: Souhrnné výsledky detekce mutace (zdroj vlastní)

Obr. 1: Retroperitoneální prostor (převzato z Dylevský, 2009)

Obr. 2: Frontální řez ledvinou

(převzato z <https://www.centrumzdravibrno.cz/grafika/ledviny.jpg>)

Obr. 3: Stavba nefronu (převzato z Merkunová a Orel, 2008)

Obr. 4: Patologicko-anatomický obraz ledviny u ADPKD (převzato z Merta et al., 2007)

Obr. 5: Elektroforeogram gradientové PCR pro testování primerového páru E1F1+E1R1 (zdroj vlastní)

Obr. 6: Elektroforeogram gradientové PCR pro testování primerového páru E1F1+E1R2 (zdroj vlastní)

Obr. 7: Elektroforeogram gradientové PCR pro testování primerového páru E1F2+E1R1 a E1F2+E1R2 (zdroj vlastní)

Obr. 8: Elektroforeogram gradientové PCR pro testování primerového páru E2F1+E2R1 a E2F1+E2R2 (zdroj vlastní)

Obr. 9: Elektroforeogram gradientové PCR pro testování primerového páru E3F2+E3R2 (zdroj vlastní)

Obr. 10: Elektroforeogram gradientové PCR pro testování primerového páru E4F1+E4R1 a E4F1+E4R2 (zdroj vlastní)

Obr. 11: Elektroforeogram gradientové PCR pro testování primerového páru E4F2+E4R1 a E4F2+E4R2 (zdroj vlastní)

Obr. 12: Elektroforeogram gradientové PCR pro testování primerového páru E5F1+E5R1 a E5F1+E5R2 (zdroj vlastní)

Obr. 13: Elektroforeogram gradientové PCR pro testování primerového páru E5F2+E5R1 a E5F2+E5R2 (zdroj vlastní)

Obr. 14: Elektroforeogram PCR pro amplifikaci fragmentu pomocí primerů E2F1+E2R2 (zdroj vlastní)

- Obr. 15:** Elektroforeogram PCR pro amplifikaci fragmentu pomocí primerů E3F2+E3R2 (zdroj vlastní)
- Obr. 16:** Elektroforeogram PCR pro amplifikaci fragmentu pomocí primerů E4F2+E4R2 (zdroj vlastní)
- Obr. 17:** Elektroforeogram PCR pro amplifikaci fragmentu pomocí primerů E5F2+E5R2 (zdroj vlastní)
- Obr. 18:** Sekvence druhého exonu (zdroj vlastní)
- Obr. 19:** Sekvence třetího exonu (zdroj vlastní)
- Obr. 20:** Sekvence třetího exonu (zdroj vlastní)
- Obr. 21:** Sekvence čtvrtého exonu (zdroj vlastní)
- Obr. 22:** Sekvence čtvrtého exonu (zdroj vlastní)
- Obr. 23:** Sekvence čtvrtého exonu (zdroj vlastní)
- Obr. 24:** Sekvence pátého exonu (zdroj vlastní)

10. Seznam zkratek

ADPKD	autozomálně dominantní polycystická choroba ledvin
ARPKD	autozomálně recesivní polycystická choroba ledvin
ADTKD	autozomálně dominantní tubulointersticiální onemocnění ledvin
PC1	polycystin-1
PC2	polycystin-2
MRI	magnetická rezonance
PKD	polycystická choroba ledvin
ELFO	elektroforéza
PKHD1	polycystické onemocnění ledvin a jater 1
TRPC-1	neselektivní kalcium-vázající iontový kanál
ESRD	konečné stádium onemocnění ledvin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
PCR	polymerázová řetězová reakce
ddNTP	dideoxynukleotid trifosfát
ddATP	dideoxyadenosin trifosfát
dATP	deoxyadenosin trifosfát
TBE	tris-bonát-EDTA
bp	párů bází (base pair)