

POLIQUISTOSIS RENAL AUTOSOMICA DOMINANTE

DETECCION DE UNA NUEVA MUTACION EN EL GEN PKD1

DIANA M. IGLESIAS^{1,2}, MARIANA MANRIQUE¹, ELVIRA E. ARRIZURIETA¹, ALBERTO R. KORNBLIHTT²,
MARIANA HERRERA³, RODOLFO S. MARTIN¹, VIVIANA A. BERNATH³

¹ Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina; ² Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires; ³ Biología Molecular Diagnóstica SA, Buenos Aires

Resumen La poliquistosis renal autosómica dominante (ADPKD) es una enfermedad hereditaria que presenta heterogeneidad genética. Al menos tres genes son responsables del desarrollo de la enfermedad: PKD1 en el cromosoma 16p13.3, PKD2 en 4q21 y PKD3, aún no localizado. A partir de la descripción de la secuencia del gen PKD1, el interés general se volcó a la búsqueda de mutaciones causantes de la enfermedad. La mayoría de las mutaciones halladas es de diverso origen y se localiza a lo largo del gen, no pudiendo hallarse correlación fenotípica alguna. En este trabajo se describe el hallazgo de una mutación en el exón 44 del gen PKD1 en una familia previamente caracterizada por análisis de ligamiento. La mutación consiste en una sustitución de una base C por una T en la posición 12220 originando un codón stop donde se produce la mutación. Esto llevaría a una terminación prematura en la traducción produciendo una proteína en la cual estaría ausente parte del extremo carboxílico.

Abstract *Autosomal dominant polycystic kidney disease: detection of a novel mutation in the PKD1 gene.*

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is an inherited disorder characterized by genetic heterogeneity. Up to three loci are involved in this disease, PKD1 on chromosome 16p13.3, PKD2 on 4q21, and a third locus of unknown location. Since the identification of the PKD1 gene, the interest was centered in the characterization of the mutations responsible for the disease. Most mutations found were diverse and situated throughout the gene with no phenotypic correlation. Here we describe a new mutation in exon 44 from PKD1 gene in a family previously characterized as PKD1 by linkage analysis. The mutation is a single base substitution from a C to a T at position 12220 originating a stop codon at the mutation site. This would lead to premature termination and the formation of a truncated protein lacking part of the carboxy-terminus.

Key words: mutational analysis, polycystic kidney disease type 1, PKD1, novel PKD1 mutation.

La poliquistosis renal autosómica dominante (ADPKD) es una enfermedad genética heterogénea con una incidencia de uno en mil en la población. Al menos tres genes serían responsables de esta patología. El gen PKD1 se encuentra en el cromosoma 16p13.3 y es responsable del 85% de los casos¹. El gen PKD2 se encuentra en el cromosoma 4q21-23 y daría origen a un 15% de los casos aproximadamente^{2,3}. Existe un tercer grupo de pacientes sin ligamiento a los cromosomas 16 y 4⁴ para el

cual aún no ha sido localizado el o los genes responsables. La enfermedad se caracteriza por la formación de quistes renales bilaterales y eventualmente en otros órganos como hígado, páncreas y bazo. Se relacionan también a esta patología aneurismas e hipertensión arterial⁵. En Argentina, la poliquistosis es la causa de insuficiencia renal en 7.2% de pacientes con insuficiencia renal crónica terminal (IRCT)⁶. La edad promedio aproximada de entrada en IRCT es de 56 años para PKD1⁷.

En los últimos años, se han descrito las secuencias de los genes PKD1 y PKD2⁸⁻¹⁰. El gen PKD1 codifica para una proteína denominada policistina de 4302/3 aminoácidos. La policistina sería una proteína integral de membrana con múltiples dominios extracelulares y una región carboxiterminal asociada a membrana. Esta proteína estaría involucrada en interacciones célula-célula y/o célula-matriz. La policistina aún no ha sido aislada.

Recibido: 15-XII-1998

Aceptado: 17-III-1999

Dirección postal: Dr. Rodolfo S. Martín, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Combatientes de Malvinas 3150, 1427 Buenos Aires, Argentina
Fax: (54-11)4543-8293; E-mail: rsmartin@mail.retina.ar

A partir de la descripción de la secuencia del gen PKD1, el interés general se centró en la búsqueda de mutaciones causantes de la enfermedad. Esto se vio dificultado por el hecho de que 3/4 partes del gen se hallan repetidas en una zona cercana al mismo. Por lo tanto este estudio se realizó en un principio en los exones presentes en copia única ubicados en el extremo 3' del gen.

Las técnicas elegidas para la detección de mutaciones fueron en un principio la amplificación por PCR de cada exón y el posterior análisis por medio de la técnica de Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP). Se ha descrito una gran variedad de mutaciones en la región en copia única¹¹. Estas mutaciones son de diverso origen y se localizan a lo largo de la región y no es posible establecer ningún tipo de correlación entre el origen de la mutación, su localización y el fenotipo observado en los pacientes.

En este trabajo se analizaron algunos exones de la región en copia única del gen PDK1 en un grupo de pacientes pertenecientes a familias afectadas previamente analizadas y caracterizadas como afectadas con la forma PKD1 por análisis de ligamiento¹². En un paciente se encontraron en el análisis del exón 44 alteraciones en el patrón de corrida. Este patrón segregaba junto con el haplotipo afectado caracterizado para el grupo familiar. Se procedió al análisis de los fragmentos por secuenciación directa por PCR. Los miembros afectados presentaron un cambio de una base C por una T en el nucleótido 12220. Este cambio origina un codón stop en el mismo sitio donde se produjo la mutación, lo cual llevaría a la formación de una proteína carente de parte del extremo carboxiterminal.

Material y métodos

Pacientes

Los pacientes fueron evaluados clínicamente en el Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Universidad de Buenos Aires. Todas las familias que aceptaron participar en el estudio expresaron su consentimiento y accedieron a extracciones de ADN y estudios ultrasonográficos. Los protocolos fueron aprobados por el comité de ética local. Se consideraron afectados a aquellos individuos que presentaron al menos un quiste en un riñón y dos en el otro de acuerdo al criterio definido por Bear et al.¹³.

Análisis de ADN, screening mutacional y secuenciación

El ADN genómico fue extraído de leucocitos periféricos de acuerdo a procedimientos estándar. Las familias fueron tipificadas para 4 marcadores microsatélite ligados al gen PKD1: 3 de ellos proximales al gen (D16S283¹⁴, D16S291¹⁵, D16S663¹⁶ y uno distal (D16S521). Las condiciones para amplificación por PCR y corrida de los productos en geles de poliacrilamida fueron las recomendadas en las referencias correspondientes¹².

Los exones fueron amplificados por PCR con los *primers* 3AC1 y 3AC2, diseñados a partir de la secuencia publicada (Genbank accession number L39891)¹. Las condiciones de amplificación y corrida en geles fueron puestas a punto para cada caso en particular. Básicamente los productos de amplificación fueron desnaturalizados y corridos en geles de poliacrilamida en presencia o ausencia de glicerol y a diferentes temperaturas. Los geles fueron posteriormente teñidos con plata y secados al vacío para su conservación¹⁷.

La secuenciación directa de los productos de PCR fue realizada con el kit de secuencia *fmoI*TM (Promega). El producto de amplificación de cada exón a ser analizado fue purificado previamente por medio del kit WizardTM PCR Preps DNA Purification System (Promega) siguiendo el protocolo provisto por el fabricante.

Procesamiento de datos

El análisis de ligamiento se realizó calculando el *lod score* por medio de las opciones ILINK y MLINK del programa LINKAGE package version 5.1^{18, 19} provisto por el Dr. Ott. Se asumió una frecuencia génica de 0.001 para PKD1 y se definieron 3 clases susceptibles a la aparición de la enfermedad considerando nuestros datos y los publicados previamente^{7, 13, 15}. Las penetrancias génicas definidas fueron 0.64, 0.92 y 0.99 para los grupos de edades de 0 a 10, 10 a 30, y más de 30 años respectivamente.

Resultados

Al analizar mediante SSCP algunos exones en copia única del gen PKD1 (exones 35, 36, 38, 39, parte del 43, 44, 45 y parte del 46) encontramos un patrón de corrida anómalo en un individuo para el exón 44 y parte del 43 (amplificados con los primers 3AC en un único fragmento de 416 pares de bases) (Fig. 1a). El análisis de todos los miembros de su familia (incluyendo sanos y afectados; ver Fig. 2) mostró que este patrón anómalo está presente en los individuos afectados y no en los sanos (ver Fig. 1b) lo cual indicaría la posibilidad de una mutación. Para certificarla se procedió a secuenciar el fragmento amplificado por PCR en algunos de los individuos que mostraron el patrón anómalo de corrida. El análisis de la secuencia (Fig. 3) muestra que en los individuos que presentan el patrón anómalo de SSCP se da un cambio de una base C por una T. Esta mutación puntual no fue observada en los individuos controles (sanos) tomados como referencia. El individuo III3 se encuentra afectado por la enfermedad y posee diagnóstico positivo por ecografías. IV4 tiene 23 años de edad y a la fecha presenta ecografías negativas para la presencia de quistes. Sin embargo se corrobora lo que se observa en el análisis de SSCP: este individuo es portador de la mutación que originó la enfermedad en esta familia. Esta mutación puntual genera un codón stop en el sitio donde se produce, lo cual llevaría a una interrupción prematura en la traducción generándose así una proteína truncada. Un hecho interesante para destacar es que esta modificación generó en esta familia una secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *MaeI* (Fig. 4).

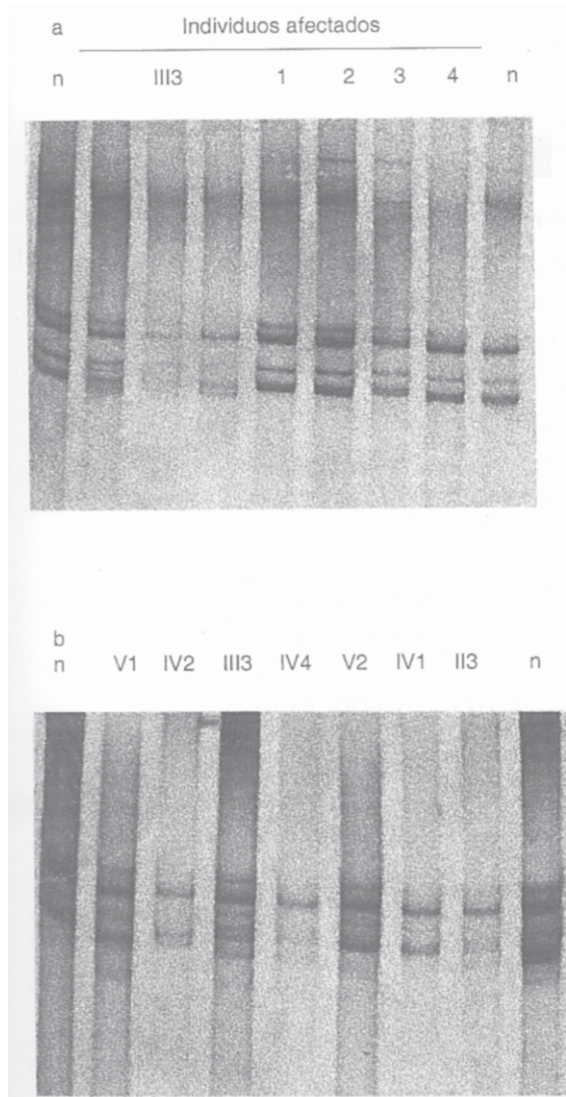


Fig. 1.- Análisis de los exones 43-44 por medio de SSCP.

En **a** se muestra el análisis de SSCP del producto amplificado para los exones 43-44 a partir de ADN de individuos de la población afectada. Los individuos denotados con **n** son individuos sanos de la población normal, utilizados como control. Las calles indicadas como III3 muestran el patrón presentado por un individuo perteneciente a una familia afectada (ver figura 2 para posición del enfermo en el árbol familiar). Todo los demás individuos pertenecen a distintas familias afectadas (no se muestran todas las familias analizadas en este trabajo). **b** Análisis de los miembros pertenecientes a la familia de III3. Los individuos denotados como **n** son individuos sanos pertenecientes a la población normal. Se observa un patrón de corrida diferente en los individuos V1, III3, IV4 y II3 (ver figura 2) respecto a los individuos sanos control e individuos pertenecientes a la familia.

Discusión

Hasta el momento hemos analizado varias familias afectadas con poliquistosis renal autosómica dominante por análisis de ligamiento¹². A partir de las secuencias ya publicadas de PKD1 y PKD2 hemos comenzado a buscar mutaciones en los pacientes ya caracterizados. Se comenzó con el estudio de los exones en copia única del gen PKD1 por medio de SSCP en pacientes poliquísticos. Los productos de amplificación de los exones son analizados (para cada paciente) en geles de poliacrilamida nativos. Esta técnica permite analizar, en forma rápida y sencilla y con gran sensibilidad, un gran número de individuos. En la familia presentada hemos podido detectar una mutación presente en varios individuos afectados, determinando por secuenciación que se trataba de una mutación puntual: un cambio de una base C por una T en la posición 12220, generando un codón stop prematuro. El producto de la traducción sería una proteína carente del extremo carboxi-terminal. Existen evidencias de que la policistina 1 y la policistina 2, los productos proteicos de PKD1 y PKD2 respectivamente, podrían interactuar directamente a través de sus dominios C-terminales citoplasmáticos²⁰. La ausencia de alguno de estos extremos podría ser la causa de la patología. En particular, en el caso aquí presentado, los pacientes portadores de la enfermedad carecerían del extremo carboxílico en la policistina 1.

Es interesante destacar que la mutación encontrada genera una secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *MaeI*. La visualización de los productos de restricción en un gel de agarosa permitiría un diagnóstico presintomático rápido en este grupo familiar. En caso de obtenerse un único fragmento, estaríamos ante la presencia de una secuencia normal. En caso de obtenerse tres fragmentos, estaríamos ante una secuencia portadora de la mutación. Los tres fragmentos corresponderían a la cadena portadora de la secuencia normal y a la cadena que ha sido cortada en dos fragmentos. Esto es así debido a que la mutación aparece en uno solo de los cromosomas mientras que el otro se mantiene normal.

Hasta el momento se ha descrito una gran variedad de mutaciones en la región en copia única de este gen: 8 mutaciones nonsense, 6 mutaciones que originan alteraciones en el *splicing*, 4 mutaciones missense, 6 deleciones y una inserción. Estos 2 últimos tipos de mutaciones provocan corrimientos del marco de lectura

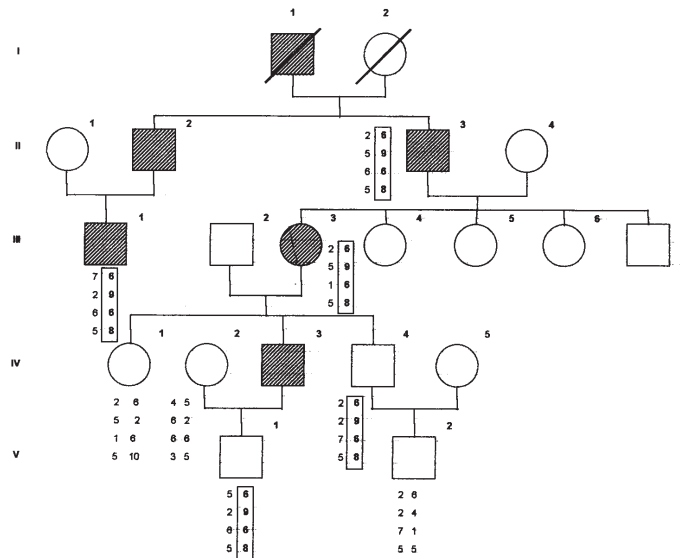


Fig. 2.- Arbol genealógico de la familia analizada por SSCP. Se representan los haplotipos determinados en esta familia para el siguiente orden de marcadores ligados al cromosoma 16p13.3: D16S521-PKD1-D16S663-D16S283. El haplotipo ligado a la enfermedad en esta familia se encuentra enmarcado. Los individuos IV1, IV4, V1 y V2 son menores de 30 años y hasta la fecha presentan ecografías negativas, sin embargo IV4 y V1 son portadores del haplotipo que segrega con la enfermedad.

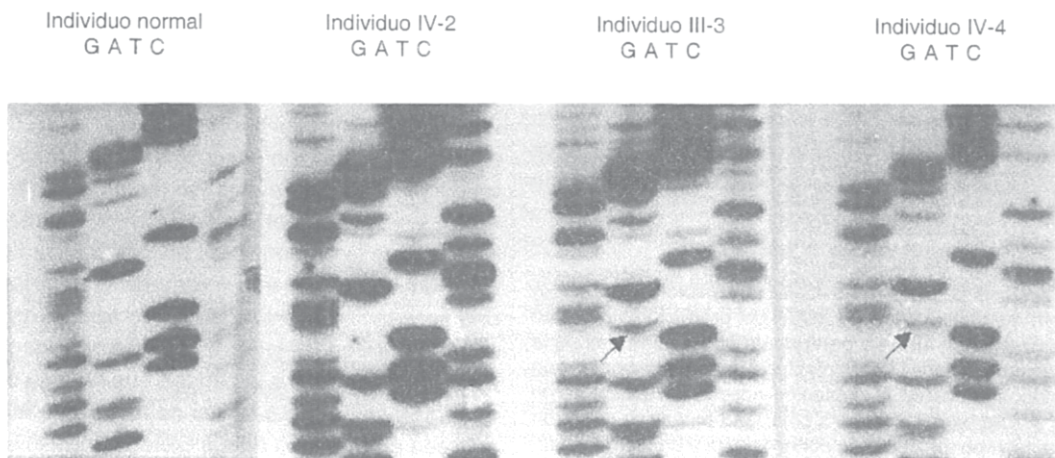


Fig. 3.- Secuenciación del producto de PCR. En la figura se muestra un fragmento de la secuenciación del producto de amplificación por PCR (que incluye parte del exón 43 y el exón 44 completo). Se analizó la secuencia presente en un individuo normal tomado como control y en individuos sanos y afectados pertenecientes a la familia. La cadena secuenciada es la cadena complementaria a la codificante. La mutación se indica con una flecha.

en la traducción²¹. Todas estas mutaciones se ubican en distintas partes de la región en copia única y no existe prevalencia de alguna de ellas ni regiones más susceptibles a las mutaciones. Tampoco se ha detectado asociación de un fenotipo dado a una determinada mutación.

Agradecimientos: Deseamos agradecer a las familias que colaboraron en este estudio, al Dr. Carlos Triay por su colaboración en el diagnóstico clínico de la familia presentada y al Dr. Ott por habernos cedido gentilmente el programa LINKAGE versión 5.1. Este trabajo ha sido solventado por medio de un subsidio otorgado por la Secretaría de Ciencia y Técnica (PID: PMT-SID 0262).

50401 tgaccgcgcc cccacaggt gtgctgctg ctgttcgccg tgcaacttcgc cgtggccgag
 50461 gcccgtactt ggcacagga agggcgctgg cgcgtgctgc ggctcggagc ctgggcgagg
 50521 tggctgctgg tggcgctgac ggcggccacg gcaactggtac gcctcggcca gctgggtgcc
 50581 gctgaccgcc agtggaccgc tttcgtgctg ggcggccgc gcccgttcac tagcttcgac
 50641 caggtggcgc agctgagctc cgcagcccgt ggcttgccgc cctcgtgctt cttcctgctt
 50701 ttggtcaagg tgaggctgg gccggtggg gcggggctgg gcgcacacc cagggtgca
 50761 agcagacaga tttctcgtcc gcaggctg **ccagcagctac** gcttcgtgcg ccagtggctc
 50821 gtctttggca agacattatg ccgagctctg ccagagctcc tgggggtcac cttgggctg
 50881 gtggtgctcg gggtagccta cggccagctg gccatcctgg taggtgactg cgcggccggg
 50941 gagggcgtct tagctcagct cagctcagct gtacgccctc actggtgctg cttccccgc
 51001 agctcgtgtc ttcctgtgtg gactccctct ggagcgtggc ccaggccctg ttggtgctgt
 51061 gccctgggac tgggctctct accctgtgtc ctgccgagtc ctggcacctg tcaccctgc
 51121 tgtgtgtggg gctctgggca ctgcggctgt ggggcgccct acggctgggg gctgttattc

Fig. 4.- Secuencia de parte del gen *pkd1*. En la secuencia aquí representada se incluyen los exones 43, 44 y parte del exón 45. La secuencia subrayada corresponde a los primers utilizados para amplificar el fragmento analizado luego por SSCP. En mayúscula se marca el nucleótido que cambia por una base T (timina) en los individuos afectados. En letra negra y subrayada se denota la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción *MaeI* cuando la base C cambia por una T.

Bibliografía

1. The European Polycystic Kidney Disease Consortium: The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. *Cell* 1994; 77: 881-94.
2. Kimberling WJ, Kumar S, Gabow PA, Kenyon JB, Connolly CJ, Somlo S: Autosomal dominant polycystic kidney disease: localization of a second gene to chromosome 21-23. *Genomics* 1993; 18: 467-72.
3. Peters DJ, Spruit I, Saris JJ, Ravine D, Sandkuijl LA, Fossdal R, et al. Chromosome 4 localization of a second gene for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Genet* 1993; 5: 359-62.
4. Daoust MC, Reynolds DM, Bichet DG, Somlo S: Evidence for a third genetic locus for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Genomics* 1995; 25: 733-6.
5. Gabow PA: Autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 1993; 329: 332-42.
6. Registro Latinoamericano de Diálisis y Trasplante Renal. Sociedad Latinoamericana de Nefrología, Comité de Registro, Montevideo, Uruguay, 1994.
7. Parfrey PS, Bear JC, Morgan J, et al. The diagnosis and prognosis of autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 1990; 323: 1085-90.
8. Hughes J, Ward CJ, Peral B, et al. The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nat Genetic* 1995; 10: 151-60.
9. The International Polycystic Kidney Disease Consortium: Polycystic kidney disease: The complete structure of the PKD1 gene and its protein. *Cell* 1995; 81: 289-98.
10. Mochizuki T, Wu G, Hayashi T, et al. PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* 1996; 272: 339-42.
11. Peral B, San Millán JL, Ong ACM, et al. Screening the 3' region of the polycystic kidney disease PKD1 gene reveals six novel mutations. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 86-96.
12. Iglesias DM, Martin RS, Fraga A, et al. Genetic heterogeneity of autosomal dominant polycystic kidney disease in Argentina. *J Med Genet* 1997; 34: 827-30.
13. Bear JC, McManamon P, Morgan J, et al. Age at clinical onset and at ultrasonographical detection of adult polycystic kidney disease: data for genetic counselling. *Am J Med Genet* 1984; 18: 45-53.
14. Harris PC, Thomas S, Ratcliffe PJ, Breuning MH, Coto E, Lopez-Larrea C. Rapid genetic analysis of families with polycystic kidney disease 1 by means of a microsatellite marker. *Lancet* 1991; 338: 1484-7.
15. Thompson AD, Shen Y, Holman K, Sutherland GR, Callen DF, Richards RI. Isolation and characterisation of (AC)_n microsatellite genetic markers from human chromosome 16. *Genomics* 1992; 13: 402-8.
16. Peral B, Ward CJ, San Millán JL, et al. Evidence of linkage disequilibrium in the Spanish polycystic kidney disease 1 population. *Am J Hum Genet* 1994; 54: 899-908.
17. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2766-70.
18. Lathrop GM, Lalouel JM, Julier C, Ott J. Strategies for multilocus linkage analysis in humans. *Proc Natl Acad Sci* 1984; 81: 3443-6.
19. Terwilliger JD, Ott J. Handbook of Human genetic linkage. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, London, 1994.
20. Qian F, Germino F, Cai Y, Zhang X, Somlo S, Germino GG. PKD1 interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain. *Nat Genet* 1997; 16: 179-83.
21. Peral B, Gamble V, Strong C, et al. Identification of mutations in the duplicated region of the polycystic kidney disease 1 gene (PKD1) by a novel approach. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 1399-410.