



## ORIGINALES

# *Estudio de pérdidas de heterozigosidad y mutaciones somáticas en la poliquistosis renal autosómica dominante tipos I y II: demostración de un mecanismo recesivo a nivel celular en la cistogénesis*

L. Pérez-Oller\*, R. Torra\*, C. Badenas\*\*, J. L. San Millán\*\*\* y A. Darnell\*

\*Servicios de Nefrología y \*\*Genética. Hospital Clínic. Barcelona. \*\*\*Unidad de Genética Molecular. Hospital Ramón y Cajal. Madrid.

### RESUMEN

*La poliquistosis renal autosómica dominante (PQRAD) es una enfermedad sistémica caracterizada por la formación de quistes renales. La enfermedad muestra una expresión focal, dado que los quistes renales derivan de menos del 1% de todas las nefronas. Se ha propuesto un modelo de cistogénesis que se iniciaría con la inactivación del alelo normal del gen por una segunda mutación producida a nivel somático. Cuando esta segunda mutación es una delección amplia que elimina la zona donde se encuentra el microsatélite utilizado como marcador, al amplificar el DNA por reacción en cadena de la polimerasa no obtenemos ningún producto y se visualizará una única banda correspondiente al alelo que contiene la mutación germinal; esto se conoce como pérdida de heterozigosidad (LOH, loss of heterozygosity).*

*En este estudio hemos analizado el DNA extraído de células epiteliales procedentes de 164 quistes de ocho riñones de pacientes con PQRAD tipo PKD1 y 30 quistes de un riñón procedente de un paciente con PQRAD tipo PKD2. Se ha demostrado la presencia de LOH en el 20,1% de los quistes PKD1 y en el 10% de los quistes PKD2. Asimismo, en el resto de quistes PKD2 hemos detectado ocho mutaciones diferentes que no cursan como LOH, con lo que el porcentaje total de mutaciones somáticas en el riñón PKD2 ha sido del 36,6%.*

*En conclusión, estos datos sugieren que un mecanismo recesivo a nivel molecular está implicado en el proceso de cistogénesis tanto en PKD1 como en PKD2. La pérdida de ambas copias del gen provoca la proliferación a partir de una célula determinada resultando en la formación de un quiste.*

**Palabras clave:** Autosómica dominante. Poliquistosis renal. Quistes renales. Pérdidas de heterozigosidad. Mutación. PKD1-PKD2.

Recibido: 2-VI-99.

En versión definitiva: 6-IX-99.

Aceptado: 9-IX-99.

**Correspondencia:** Dra. Roser Torra  
Servicio de Nefrología  
Hospital Clínic  
Villarroel, 170  
08036 Barcelona

**LOSS OF HETEROZYGOSITY AND SOMATIC MUTATIONS IN AUTOSOMAL  
DOMINANT POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE TYPES I AND II.  
DEMONSTRATION OF A RECESSIVE MECHANISM AT THE CELLULAR LEVEL  
IN CYST FORMATION**

**SUMMARY**

*Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is a systemic disorder mainly characterized by renal cyst formation. Cysts in ADPKD are focal in nature, since only a small fraction of nephrons become cystic. The hypothesis that a second hit may be required for cyst formation has been proposed. This hypothesis suggests that inactivation of the inherited wild-type allele by a somatic mutation triggers cyst formation. In some cases, this second hit eliminates the normal allele and the affected cells remain with a single allele, which is the inherited mutated copy, and we only visualize one allele after the amplification by polymerase chain reaction; this is called loss of heterozygosity (LOH).*

*In this study we have analysed the DNA isolated from epithelial cells from 164 cysts of 8 kidneys affected by ADPKD type I and 30 cysts from a kidney affected by ADPKD type II. We have demonstrated the presence of LOH in 20.1% of PKD1 cysts and in 10% of PKD2 cysts. We have also found eight other different mutations in PKD2 cysts without LOH; so the percentage of somatic mutations in the PKD2 kidney reaches 36.6% of cysts.*

*In conclusion, our data suggest that a recessive mechanism at the cellular level is implicated in cyst formation in the PKD1 and the PKD2 disease. The loss of both copies of the gene triggers the proliferation of a single cell, resulting in the cyst formation.*

**Key words: Autosomal dominant. Polycystic kidney. Renal cysts. Loss of heterozygosity. Mutation. PKD1-PKD2.**

**INTRODUCCIÓN**

La poliquistosis renal autosómica dominante (PQRAD) es una de las enfermedades hereditarias más frecuentes en el hombre, afectando a 1 de cada 1.000 individuos. Ésta se caracteriza por la formación y progresivo crecimiento de múltiples quistes en ambos riñones, lo que conduce en último extremo a una insuficiencia renal crónica terminal<sup>1</sup>. Al menos tres genes diferentes han sido involucrados en esta enfermedad: *PKD1*, localizado en el cromosoma 16 (16p13.3)<sup>2,3</sup>, *PKD2*, en el cromosoma 4 (4q13-23)<sup>4,5</sup>, y un tercer locus aún no localizado<sup>6-8</sup>. Se ha demostrado la existencia de variabilidad en la expresión clínica de la enfermedad. La variabilidad interfamiliar puede explicarse parcialmente por la heterogeneidad genética, ya que ha sido ampliamente demostrado que los pacientes *PKD1* tienen una expresión más severa de la enfermedad que los *PKD2*<sup>9</sup>. Pero estos datos no justifican la variabilidad entre miembros de una misma familia, en que podrían influir otros factores genéticos y ambientales.

Aunque se trata de una enfermedad sistémica, la PQRAD muestra una expresión focal dado que los quistes renales derivan de menos del 1% de todas las nefronas<sup>10</sup>. Se ha propuesto una explicación a este hecho basada en el modelo *two-hit*, la cual sugiere que la cistogénesis en *PKD1* se inicia con la inactivación del alelo normal del gen por una segunda mutación producida ya a nivel somático<sup>11-13</sup>. Cuando esta segunda mutación a nivel somático es una delección amplia que elimina la zona donde se encuentra el microsatélite utilizado como marcador, al amplificar el DNA por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) no obtenemos ningún producto y se visualizará una única banda correspondiente al alelo que contiene la mutación germinal; esto se conoce como pérdida de heterozigosis (LOH, *loss of heterozygosity*). Este modelo de cistogénesis ha sido discutido debido a la demostración de una fuerte inmunoreactividad para la poliquistina 1 (proteína codificada por el gen *PKD1*) en el epitelio quístico<sup>14-17</sup>. Algunos experimentos en el ratón también apoyan el modelo *two-hit* como origen de la cistogénesis en *PKD2*<sup>18</sup>.

En este estudio hemos analizado células epiteliales de quistes renales de pacientes con PQRAD tipo *PKD1* y *PKD2* en busca de segundas mutaciones a nivel somático que apoyen el modelo *two-hit*. Para ello, hemos estudiado la presencia de LOH en células quísticas tanto de pacientes *PKD1* como *PKD2*; en los quistes *PKD2* en los que no se ha encontrado LOH también hemos buscado la existencia de otras mutaciones en algunos exones del gen.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Pacientes y muestras

Siete pacientes afectos de PQRAD fueron sometidos a nefrectomía en nuestro centro. En seis de ellos, todos *PKD1*, la intervención se realizó debido a que el gran tamaño renal no dejaba espacio suficiente en la cavidad abdominal para colocar el injerto en el momento de realizarse un trasplante renal; en dos de estos pacientes ambos riñones fueron extraídos. En el caso del séptimo paciente, afecto de PQRAD tipo *PKD2*, se extrajo el riñón durante el acto operatorio de un trasplante renal ortotópico.

Todos los pacientes presentaban una historia familiar compatible con PQRAD. El análisis de ligamiento fue realizado en todos ellos usando tres microsatélites (CA)<sub>n</sub> para *PKD1* (CW2, AC2.5 y KG8-*PKD1*) y cuatro microsatélites (CA)<sub>n</sub> para *PKD2* (D4S1534, D4S1542, D4S1563 y D4S423). La técnica utilizada para el estudio de estos microsatélites ha sido publicada previamente<sup>19</sup>. Todas las familias excepto una presentaron ligamiento genético con el locus *PKD1*. La otra familia presentó un *lod score* de 4 a favor de ligamiento con el locus *PKD2*.

El estudio fue aprobado por el comité ético del Hospital Clínic.

### Preparación de células epiteliales quísticas

Para la obtención de células del epitelio quístico utilizamos el método descrito por Qian, introduciendo algunas modificaciones<sup>11</sup>. Inmediatamente después de ser extraído, cada riñón se colocó en una bandeja con hielo. Inicialmente se lavó la superficie del quiste con PBS. A continuación se puncionó el quiste con una aguja y se extrajo su contenido con una jeringa y se desechó. A través de la misma aguja, la cavidad se lavó entre 4 y 10 veces con PBS sin calcio ni magnesio hasta que el líquido fue claro. En este punto, se llenó el quiste de PBS con EDTA, y sin desconectar la jeringa se introdujo y extrajo el líquido repetidamente y con energía para facilitar el

despegue de células epiteliales de las paredes. Finalmente se aspiró el líquido intraquístico. Sólo los quistes que permanecieron intactos durante el procedimiento fueron incluidos en el estudio. En total se estudiaron 164 quistes procedentes de ocho riñones *PKD1* y 30 quistes de un riñón *PKD2*.

### Extracción de DNA

Las células extraídas de la cavidad quística fueron suspendidas en PBS/2 mM EDTA y centrifugadas a 14.000 rpm durante cinco minutos, siendo desechado el sobrenadante. El sedimento se resuspendió con 600 µl de solución de urea (8 M urea, 0,3 M NaCl<sub>2</sub>, 10 mM EDTA, 10 mM TRIS, 2% SDS) y 12 µl de solución de proteinasa K (10 mg/ml). Se incubó durante toda la noche a 37° C y se procedió a extracción por el método fenol-cloroformo. Posteriormente se añadieron 0,5 µl de glicógeno y 2,5 volúmenes de etanol absoluto, incubándose durante una hora a -80° C. Tras la incubación se centrifugó durante 20 minutos a 14.000 rpm y se descartó el sobrenadante. El sedimento fue secado y resuspendido en 45 µl de 1 x TE pH 7.5.

### PEP PCR (primer extensión pre-amplification)

Dado que el lavado de los quistes se realizó meticulosamente para evitar contaminación por otras células, la cantidad final obtenida de células epiteliales fue escasa. Esto hizo necesario realizar una preamplificación para aumentar la cantidad de DNA a utilizar para el estudio de las LOH y la búsqueda de mutaciones en el gen *PKD2*. La reacción incluyó 1-2 µl de DNA, 6 µl de tampón 10 x (Perkin-Elmer), 4 mM de DTT, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de cada dNTP, 5 U de Taq polimerasa (Perkin-Elmer), 400 µM de cada random primer (oligonucleótidos de 15 bases en los que cualquiera de las cuatro bases puede estar presente en cada posición) y agua destilada hasta completar 60 µl. La amplificación por PCR se realizó del siguiente modo: 5 minutos a 94° C, 50 ciclos de 1 minuto a 94° C, 2 minutos a 37° C y 4 minutos a 55° C.

### Análisis de pérdidas de heterocigosidad

Cada muestra de DNA fue amplificada por PCR usando los microsatélites CW2, AC2,5 y KG8 para *PKD1*, y D4S1534, D4S1542, D4S1563 y D4S423 para *PKD2*. Todos estos marcadores están a una distancia inferior a 1 cM del gen de la PQRAD corres-

pondiente. El marcador D3S1478 fue utilizado como control para valorar si las LOH eran específicas de los genes *PKD1* y *PKD2*, dado que éste se pierde con frecuencia en tumores humanos<sup>12</sup>. Para la reacción se utilizó 1 µl de DNA preamplificado, DMSO 5% y Cl<sub>2</sub>Mg 1,5 mM (KG8, CW2, D4S1534, D4S1563, D4S423, D4S1542 y D3S1478) o 1 mM (AC2,5). Las condiciones de la PCR fueron las previamente descritas<sup>12,19</sup>. Se procedió a la electroforesis en gel de acrilamida con los productos de la PCR, y a la tinción con nitrato de plata<sup>20</sup>. La LOH fue determinada por comparación visual de las bandas obtenidas por amplificación del DNA de las células quísticas y el DNA obtenido a partir de sangre periférica. Todas las PCR que mostraron LOH fueron repetidas y confirmadas al menos en tres ocasiones.

#### Búsqueda de mutaciones en el gen *PKD2*. Secuenciación del DNA y análisis con enzimas de restricción

Decidimos analizar los exones 2, 4, 5, 6, 11 y 12 del gen *PKD2* dado que en ellos se encuentran el 70% de las mutaciones publicadas en este gen<sup>21-26</sup>. Los cebadores utilizados para la amplificación de los exones y las condiciones de la PCR han sido descritos previamente<sup>25,27</sup>.

Los productos de PCR fueron analizados por SSCP. Tres µl de producto desnaturalizado de PCR se combinaron con tampón de carga y fueron cargados en gel de acrilamida al 12,5 (GeneGel Excel-Amersham Pharmacia Biotech). La electroforesis se realizó según las instrucciones del fabricante. Las diferentes migraciones fueron teñidas con nitrato de plata. Las muestras de DNA con migraciones anormales fueron secuenciadas. Para la secuenciación los productos de PCR fueron purificados usando el QIAquick spin PCR purification kit (Qiagen) y secuenciados usando el Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin-Elmer Cetus) y un secuenciador automático (ABI310). Para descartar que las mutaciones fuesen consecuencia del paso de la preamplificación, analizamos el DNA no preamplificado de dos quistes que mostraban mutaciones que alteraban una diana de reconocimiento de una endonucleasa, confirmándose la presencia de las correspondientes mutaciones. También se preamplificaron y secuenciaron por dos veces las otras mutaciones que no abolían ninguna diana de restricción, confirmándose la presencia de los cambios de nucleótidos. Las mutaciones descritas en este estudio fueron designadas de acuerdo con las recomendaciones de Beaudet y Tsui<sup>28</sup>. Los nucleótidos y codones fueron numerados de acuerdo con la secuencia publicada por Mochizuki<sup>21</sup>.

## RESULTADOS

### LOH en cromosoma 16p13.3

El DNA de los 164 quistes fue examinado usando los tres microsatélites de la región 16p13.3. Todos los pacientes estudiados, excepto dos, fueron informativos para los tres microsatélites empleados, uno fue homocigoto para CW2 (riñones 3 y 8, procedentes del mismo paciente) y otro resultó homocigoto para KG8 (riñón 2). Se detectaron LOH en 33 de los 164 quistes (20,1%) (fig. 1). Ningún quiste *PKD2* mostró LOH para ningún marcador de *PKD1*. El alelo perdido fue siempre el mismo para todos los quistes y se demostró que se trataba del alelo normal. Hubo concordancia absoluta entre los estudios utilizando los tres microsatélites; cuando un microsatélite extragénico se perdió, los microsatélites más proximales también se perdieron. La LOH no fue siempre absoluta, ya que en algún quiste el alelo perdido se podía intuir, lo cual puede ser debido a contaminación de la muestra por células no quísticas.

### LOH en cromosoma 4q13-23

Todos los pacientes fueron informativos para los microsatélites de 4q13-23. Un 10% (3/30) de los quistes *PKD2* mostraron LOH (tabla I). Ningún quiste *PKD1* presentó LOH para alguno de estos marcadores. Al igual que en *PKD1*, hubo absoluta concordancia entre los estudios utilizando los cuatro microsatélites. Se demostró para cada microsatélite que el alelo perdido era el normal. Las LOH no resultaron siempre absolutas, lo que sugiere de nuevo contaminación por células no quísticas.

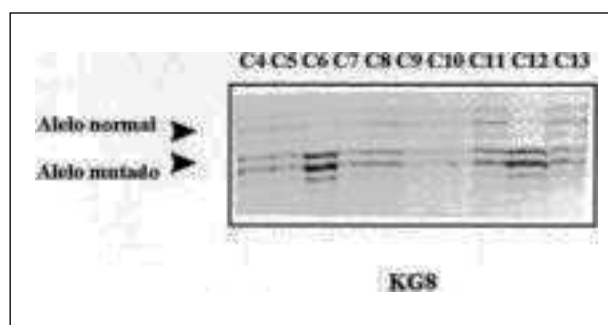


Fig. 1.—Pérdidas de heterocigosidad en el alelo normal en el estudio con el microsatélite KG8 ligado al gen *PKD1* en quistes de un riñón de un paciente con poliquistosis renal autosómica dominante tipo I. La denominación C4 a C13 corresponde a la numeración de los quistes. Los quistes que presentan pérdida de heterocigosidad se han señalado con un asterisco.

**D3S1478 (cromosoma 3p21)**

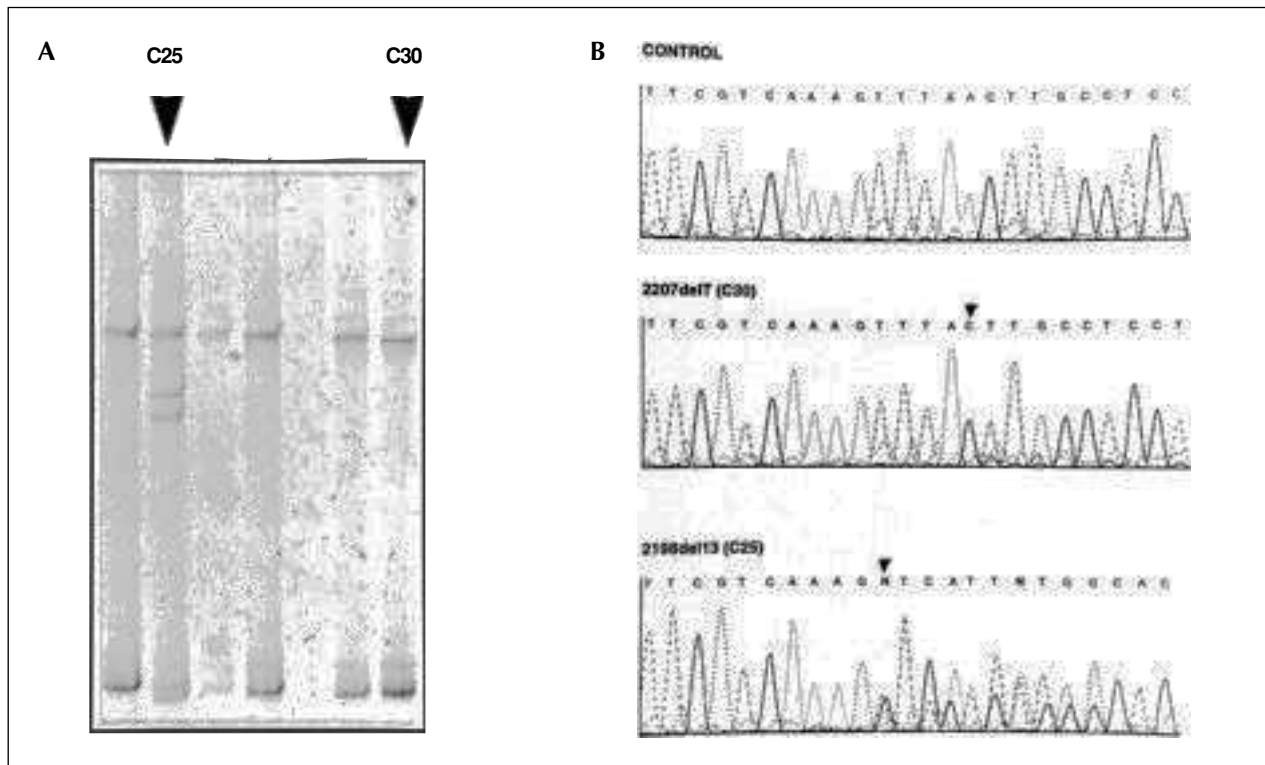
Este microsatélite se pierde con relativa frecuencia en tumores humanos<sup>12</sup>. Analizamos este marcador para valorar si las LOH objetivas en 16p13.3 y 4q13-23 eran específicas de los genes de la PQRAD o podrían ser una consecuencia del estado de proliferación de las células epiteliales. Todos los pacientes fueron informativos para este microsatélite, sin objetivarse LOH en ningún quiste.

**Mutaciones somáticas en PKD2**

Mediante SSCP detectamos 8 quistes *PKD2* sin LOH con un patrón anormal (fig. 2A). La secuenciación reveló 8 mutaciones diferentes (tabla I) (fig. 2B). Todas ellas crean una proteína anómala: seis eran cambios en la pauta de lectura, una creaba un codón de parada prematuro y la última afectaba al lugar de *splicing*.

**Tabla I.** Pérdida de heterocigosidad (LOH) y mutaciones somáticas halladas en quistes de un paciente afecto de poliquistosis renal autosómica dominante tipo II (*PKD2*)

Quiste	Microsatélites <i>PKD2</i>	Mutaciones gen <i>PKD2</i>
1		IVS4 + 1G → A (intrón 4)
3		934insG (exón 4)
5		990delC (exón 4)
6	LOH	
8		2236insA (exón 11)
10	LOH	
17	LOH	
23		Y429X (exón 5)
25		2198del13 (exón 11)
29		1217delT (exón 5)
30		2207del T (exón 11)
<b>TOTAL</b>	<b>3</b>	<b>8</b>



**Fig. 2.**—Demostración de dos mutaciones puntuales en el exón 11 del gen *PKD2* en quistes de un paciente con PQRAD tipo II. A) Análisis por SSCP del exón 11 del gen *PKD2* de los quistes C25 y C30. B) La secuenciación del exón 11 del control y de los quistes C25 y C30 detectó dos mutaciones (2198 del 13 en C25 y 2207 del T en C30) que producen un error en la pauta de lectura. La posición donde se halla la mutación se ha marcado con un triángulo. Dado que en la reacción de secuencia se observa la cadena complementaria, la delección de una T en C30 se visualiza como delección de una A. La secuenciación de C30 sólo detecta un alelo debido a que la mutación germinal en este paciente es una gran delección que abarca el lugar de esta mutación somática. La secuenciación de C25 detecta los dos alelos, lo cual es resultado de la contaminación por células no quísticas.

## DISCUSIÓN

La PQRAD muestra una variabilidad considerable interfamiliar e intrafamiliar, basada no sólo en la severidad de la enfermedad renal, sino también en las manifestaciones extrarrenales<sup>29</sup>. La variabilidad interfamiliar podría explicarse parcialmente por la heterogeneidad genética que presenta la enfermedad, con al menos 2 genes ya identificados<sup>2-5</sup>. Los pacientes *PKD1* muestran una edad más temprana de inicio de insuficiencia renal terminal y de aparición de hipertensión arterial que *PKD2*<sup>9,19</sup>. Pero la variabilidad intrafamiliar es más difícil de entender. Ésta no se hace evidente únicamente en las manifestaciones clínicas, sino también en las alteraciones macroscópicas de los propios riñones. Por otro lado, en menos del 1% de todas las nefronas de un riñón poliquístico se desarrollan quistes<sup>10</sup>. Es difícil comprender este hecho si todas las células epiteliales renales han heredado la mutación germinal.

Dos grupos han demostrado que las células epiteliales aisladas de quistes renales individuales de pacientes con PQRAD tipo 1 son monoclonales, lo cual hace suponer que derivan de una célula inicial que ha ido proliferando de forma anómala<sup>11,12</sup>. A partir de este conocimiento han propuesto un modelo de cistogénesis basado en el modelo *two-hit* descrito por Knudson en procesos tumorales, aplicado a la inactivación de los genes supresores de tumores (originalmente para el retinoblastoma)<sup>30</sup>. La pérdida del alelo normal constituiría un segundo paso necesario para la expresión de la enfermedad en los pacientes portadores de la mutación germinal. Basado en este modelo, sólo las células epiteliales renales que sufren una segunda mutación (a nivel somático) desarrollan quistes. Estos grupos ratificaron esta teoría obteniendo células de diferentes quistes y demostrando que entre el 17% y el 24% de quistes mostraban LOH<sup>11,12</sup>. Nosotros hemos analizado 164 quistes de 8 riñones *PKD1* diferentes y hemos demostrado la presencia de LOH para los diferentes microsatélites en el 20,1%, resultados similares a los previamente publicados. El por qué no todos los quistes presentan LOH se explicaría porque otras mutaciones diferentes y que no se muestran como LOH pueden constituir la segunda mutación. De hecho, Qian y cols. también demostraron en un quiste *PKD1* que la segunda mutación no era una gran delección<sup>11</sup>. Pero la búsqueda de mutaciones en *PKD1* es una tarea difícil, ya que es un gen grande, sin zonas «calientes» donde predominen las mutaciones descritas, y con unas tres cuartas partes del gen repetidas varias veces proximalmente en el mismo cromosoma, lo cual dificulta enormemente el proceso de amplificación. Por otro lado, no puede

descartarse un falso negativo por la presencia de contaminación por células no epiteliales, aunque el método de lavado se sigue estrictamente. Las LOH han sido también demostradas en quistes hepáticos de pacientes *PKD1*<sup>31</sup>. Permanece sin responder si otras manifestaciones extrarrenales de la enfermedad proceden también de una segunda mutación; la naturaleza focal de estos eventos apoya el hecho de que también deriven de una célula inicial que sufre una mutación somática.

A pesar de estas evidencias, la propuesta de esta teoría de las LOH como origen de la cistogénesis es controvertida, dado que diversos estudios han demostrado la presencia de una fuerte inmunoreactividad para la poliquistina 1 en la gran mayoría del epitelio quístico<sup>14-17</sup>. Es difícil conciliar estos datos con el hecho de que ningún alelo del locus *PKD1* sea funcional en algunos quistes, ya que no debería formarse proteína en ellos. La posible explicación ha venido dada por los últimos trabajos en este campo, en que un 20-30% de quistes no expresan la mencionada poliquistina, lo que coincide aproximadamente con el porcentaje de quistes en los que ninguna copia del gen *PKD1* es funcional<sup>17</sup>. Otras explicaciones mencionadas para esta aparente contradicción han sido que las mutaciones que inactivan la proteína pueden prolongar la vida media de la poliquistina formada por las otras células o que la ausencia de poliquistina funcional comporte la pérdida de un mecanismo de retroalimentación negativo, con una síntesis aumentada de la proteína anormal.

Qian y cols. sugirieron que el proceso de cistogénesis en *PKD2* podría basarse también en el modelo *two-hit*, aunque la naturaleza del segundo paso no era conocida<sup>11</sup>. En su trabajo postularon que dado que *PKD1* interacciona con *PKD2*, una mutación germinal inactivadora en *PKD2* y una mutación somática en *PKD1* resultaría en una expansión clonal de una célula epitelial, formando un quiste. La LOH en quistes *PKD2* ha sido demostrada claramente en el ratón; Somlo y cols. introdujeron mutaciones en el locus homólogo a *PKD2* del ratón, demostrando que el ratón homocigoto para la LOH desarrollaba quistes renales a mayor velocidad que los heterocigotos<sup>18</sup>. Recientemente también se ha demostrado la existencia de LOH en un riñón poliquístico tipo 2<sup>32</sup>. La poliquistina 2 también está fuertemente expresada en los riñones poliquísticos, pero, como en el caso de la poliquistina 1, un pequeño porcentaje de quistes no presentan inmunoreactividad<sup>17</sup>. Nosotros hemos analizado 30 quistes de un riñón *PKD2* y hemos encontrado LOH en un 10% de los quistes para los microsatélites de *PKD2*. No hemos encontrado LOH para los marcadores de

*PKD1* en ninguno de estos quistes. En los quistes que no presentaban LOH hemos analizado varios exones en busca de mutaciones en el alelo normal, ya que el gen *PKD2* es más pequeño y sin zonas repetidas en otras partes del cromosoma, por lo que la búsqueda de mutaciones es más rentable que en *PKD1*. Hemos hallado 8 mutaciones diferentes en el gen *PKD2*. Seis son cambios en la pauta de lectura debido a la inserción o deleción de uno o varios nucleótidos, una crea un codon de parada prematura y una afecta al procesamiento o *splicing* del intrón 4. Ninguna de estas mutaciones había sido previamente descrita, y se localizan en los exones 4, 5 y 11. Aunque hemos detectado 3 mutaciones en el exón 11, ninguna de ellas están localizada en el tracto de poliadenosina de este exón. Aunque no todo el gen *PKD2* (incluyendo los intrones) ha sido analizado, hemos encontrado mutaciones en 8/30 quistes y LOH para los microsatélites ligados al gen en 3/30 quistes. La suma de estos dos tipos de eventos supone que en un 36,6% de los quistes de *PKD2* se ha demostrado la presencia de una segunda mutación a nivel somático. El resto pueden tener mutaciones en otras regiones del gen no estudiadas en este trabajo o LOH enmascarada debido a contaminación por células no quísticas.

Este estudio confirma la presencia de mutaciones somáticas en el gen *PKD2* en humanos y, por tanto, sugiere que la PQRAD tipo 2 sucede también a través de un mecanismo recesivo a nivel molecular. Ong y cols., sugieren que la única explicación para conciliar estos hallazgos con los trabajos que demuestran una fuerte inmunoreactividad para la poliquistina 2 en los quistes sería que la mutación somática fuese una mutación de sentido erróneo que no aboliese el epítipo contra el cual va dirigido el anticuerpo utilizado. Pero las mutaciones que nosotros hemos encontrado en el gen *PKD2* como mutación somática causan una pérdida del producto genético o una proteína truncada que pierde el extremo carboxiterminal contra el cual va dirigido el anticuerpo utilizado por Ong y cols.

El hecho de que el ritmo de formación de quistes en *PKD2* sea menor que en *PKD1* se puede explicar porque la incidencia de mutaciones somáticas en este locus es menor que en *PKD1*. En *PKD1* existen 3 trectos de polipirimidina en los intrones 1, 21 y 22, que pueden predisponer a la formación de triple hélice, reparaciones erróneas y mutaciones durante la transcripción. También la presencia de regiones homólogas de *PKD1* puede predisponer a la conversión génica facilitando el desarrollo de nuevas mutaciones. Además, basados en nuestros resultados, surge la hipótesis de que las mutaciones somáticas en *PKD1* son más frecuentemente debidas

a grandes deleciones mientras en *PKD2* son mayormente debidas a mutaciones puntuales.

Martin y cols. han comprobado que las mutaciones somáticas en células epiteliales renales son un hecho relativamente frecuente<sup>33</sup>. Existen varias razones por las que estas células son un buen sustrato para estas alteraciones: son metabólicamente activas y consumen gran cantidad de oxígeno, realizan la mayoría del trabajo de secreción y reabsorción para obtener el filtrado renal, y son mitóticamente competentes (sobre todo si se produce daño renal). Además, eventualmente son el origen de tumores renales primarios. Esto conlleva la posibilidad de que la pérdida de un alelo sea la consecuencia del proceso de hiperplasia que sufre una célula y el consiguiente estado de desdiferenciación en que se encuentran las células que derivan de esta primera. Para comprobar si la LOH es específica para los genes de la PQRAD, hemos tipado un microsatélite de una región en el cromosoma 3 que es frecuentemente delecionada en tumores humanos. Nosotros no hemos encontrado ninguna LOH para este marcador en los quistes estudiados. Además ningún quiste *PKD1* perdió ningún alelo *PKD2*, ni viceversa. Brasier y Henkes también estudiaron marcadores *PKD2* en quistes *PKD1* sin hallar LOH<sup>12</sup>. Estos hechos soportan la teoría de que la LOH constituye un proceso inicial en la cistogénesis, lo cual emparenta aparentemente esta enfermedad con las neoplasias de carácter hereditario desde el punto de vista patogénico.

En conclusión, nuestros datos sugieren que un mecanismo recesivo a nivel molecular está implicado en el proceso de cistogénesis, tanto para *PKD1* como para *PKD2*. La poliquistina puede estar implicada en la regulación del crecimiento de las células epiteliales renales, y la pérdida de ambas copias del gen provocaría una proliferación de una célula determinada resultando en la formación de un quiste. Este hecho tiene importantes implicaciones a la hora de comprender el proceso de cistogénesis y de desarrollar nuevas estrategias para prevenir y enlentecer la progresiva formación y crecimiento de quistes.

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido financiado por las becas FIS 94/0343 y 97/2047, así como con una beca de los laboratorios Esteve-Pensa.

L. Pérez-Oller ha dispuesto de un Premio Fin de Residencia del Hospital Clínic, y actualmente dispone de una beca de la Generalitat (FI99/691).

Agradecemos al Servicio de Urología su total colaboración en este estudio.

El trabajo no hubiera sido posible sin la colaboración de los pacientes y sus familiares.

## BIBLIOGRAFÍA

- Gabow PA: Autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 329: 332-342, 1993.
- Reeders ST, Breuning MH, Davies KE, Nicholls RD, Jarman AP, Higgs RD, Pearson PL, Weatherall DJ: A highly polymorphic DNA marker linked to adult polycystic kidney disease on chromosome 16. *Nature* 317: 542-544, 1985.
- 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* 77: 881-894, 1994.
- Peters DJM, Spruit L, Saris JJ, Ravine D, Sandkuijl LA, Fossdal R, Boersma J, Van Eijk R, Norby S, Constantinou-Deltas CD, Pierides A, Brissenden JE, Frants RR, Van Ommen G-J B, Breuning MH: Chromosome 4 localization of a second gene for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Genet* 5: 359-362, 1993.
- Kimberling WJ, Kumar S, Gabow P, Kenyon JB, Conolly CJ, Somlo S: Autosomal dominant polycystic kidney disease: localization of the second gene to chromosome 4q13-q23. *Genomics* 18: 467-472, 1993.
- Daoust MC, Reynolds DM, Bichet DG, Somlo S: Evidence for a third genetic locus for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Genomics* 25: 733-736, 1995.
- De Almeida S, De Almeida E, Peters DJM, Pinto JR, Tavora I, Lavinha J, Breuning MH, Prata M: Autosomal dominant polycystic kidney disease: evidence for the existence of a third locus in a Portuguese family. *Hum Genet* 96: 83-88, 1995.
- Ariza M, Álvarez V, Marín R, Aguado S, López-Larrea C, Álvarez J, Menéndez MJ, Coto E: A family with a milder form of adult dominant polycystic kidney disease not linked to the PKD1 (16p) or PKD2 (4q) genes. *J Med Genet* 34: 587-589, 1997.
- Hateboer N, Marjan AVD, Bogdanova N, Coto E, Saggarmalik AD, San Millán JL, Torra R, Breuning M, Ravine D, for the European PKD1-PKD2 Study Group: Comparison of phenotypes of polycystic kidney disease types 1 and 2. *Lancet* 353: 103-107, 1999.
- Baert L: Hereditary polycystic kidney disease (adult form): a microdissection study of two cases at an early stage of the disease. *Kidney Int* 13: 519-525, 1978.
- Qian F, Watnick TJ, Onuchic L, Germino GG: The molecular basis of focal cyst formation in human autosomal dominant polycystic kidney disease type I. *Cell* 87: 979-987, 1996.
- Brasier JL, Henske EP: Loss of the polycystic kidney disease (PKD1) region of chromosome 16p13 in renal cyst cells supports a loss-of-function model for cyst pathogenesis. *J Clin Invest* 99: 194-199, 1997.
- Koptides M, Constantinides R, Kyriakides G, Hadjigavriel M, Patsalis PC, Pierides A, Constantinou-Deltas C: Loss of heterozygosity in polycystic kidney disease with a missense mutation in the repeated region of PKD1. *Hum Genet* 103: 709-717, 1998.
- Geng L, Segal Y, Peissel B, Deng N, Pei Y, Carone F, Rennke HG, Glicksman-Kuis AM, Schneider MC, Ericsson M, Reeders ST, Zhou J: Identification and localization of polycystic, the PKD1 gene product. *J Clin Invest* 98: 2674-2682, 1996.
- Ward CJ, Turley H, Ong AC, Comley M, Biddolph S, Chetty R, Ratcliffe PJ, Gattner K, Harris PC: Polycystin, the polycystic kidney disease 1 protein, is expressed by epithelial cells in fetal, adult, and polycystic kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 1524-1528, 1996.
- Ibraghimov-Beskrovnya O, Dackowski WR, Foggensteiner L, Coleman N, Thiru S, Petry LR: Polycystin: *in vitro* synthesis, *in vivo* tissue expression, and subcellular localization identifies a large membrane-associated protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 6397-6402, 1997.
- Ong ACM, Ward CJ, Butler RJ, Biddolph S, Bowker C, Torra R, Pei Y, Harris PC: Coordinate expression of the ADPKD proteins, polycystin-2 and polycystin-1, in normal and cystic tissue. *Am J Pathol* (in press).
- Wu G, D'Agati V, Cai Y, Markowitz G, Hoon Park J, Reynolds DM, Maeda Y, Le TC, Hou H, Kucherlapati R, Edelmann W, Somlo S: Somatic inactivation of PKD2 results in polycystic kidney disease. *Cell* 93: 177-188, 1998.
- Torra R, Badenas C, Darnell A, Nicolau C, Volpini V, Revert L, Estivill X: Linkage, clinical features and prognosis of autosomal dominant polycystic kidney disease type 1 and 2. *J Am Soc Nephrol* 7: 2142-2151, 1996.
- Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM: Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 196: 80-83, 1991.
- Mochizuki T, Wu G, Hayashi T, Xenophontos SL, Veldhuisen B, Saris JJ, Reynolds DM, Cai Y, Gabow PA, Pierides A, Kimberling WJ, Breuning MH, Constantinou-Deltas C, Peters DJM, Somlo S: PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* 272: 1339-1342, 1996.
- Pei Y, He N, Wang K, Kasenda M, Paterson AD, Chan G, Liang Y, Roscoe J, Brissenden J, Hefferton D, Parfrey P, Somlo S, St George-Hyslop P: A spectrum of mutations in the polycystic kidney disease-2 (PKD2) gene from eight canadian kindreds. *J Am Soc Nephrol* 9: 1653-1660, 1998.
- Pei Y, Wang K, Kasenda M, Paterson AD, Liang Y, Huang E, Lian J, Rogovea E, Somlo S, St George-Hyslop P: A novel frameshift mutation induced by an adenosine insertion in the polycystic kidney disease 2 (PKD2) gene. *Kidney Int* 53: 1127-1132, 1998.
- Valdhuisen B, Saris JJ, Haij S, Hayashi T, Reynolds DM, Mochizuki T, Elles R, Fossdal R, Bogdanova N, Dijk MA van, Coto E, Ravine D, Norby S, Verellen-Dumoulin C, Breuning MH, Somlo S, Peters DJM: A spectrum of mutations in the second gene for autosomal dominant polycystic kidney disease (PKD2). *Am J Hum Genet* 61: 547-555, 1997.
- Viribay M, Hayashi T, Tellería D, Mochizuki T, Reynolds DM, Alonso R, Lens XM, Moreno F, Harris PC, Somlo S, San Millán JL: Novel stop and frameshifting mutations in the autosomal dominant polycystic kidney disease 2 (PKD2) gene. *Hum Genet* 101: 229-234, 1997.
- Xenophontos S, Constantinides R, Hayashi T, Mochizuki T, Somlo S, Pierides A, Constantinou-Deltas C: A translation frameshift mutation induced by a cytosine insertion in the polycystic kidney disease 2 gene (PKD2). *Hum Mol Genet* 6: 949-952, 1997.
- Hayashi T, Mochizuki T, Reynolds DM, Wu GQ, Cai Y, Somlo S: Characterization of the exon structure of the polycystic kidney disease 2 gene (PKD2). *Genomics* 44: 131-136, 1997.
- Beaudet A, Tsui LC: A suggested nomenclature for designating mutations. *Hum Mut* 2: 245-248, 1993.
- Torra R, Darnell A, Estivill X, Botey A, Revert L: Interfamilial and intrafamilial variability of clinical expression in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Contrib Nephrol* 115: 97-101, 1995.
- Knudson AG: Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10914-10921, 1993.



31. Watnick TJ, Torres VE, Gandolph A, Qian F, Onuchic L, Klinger KW, Landes G, Germino GG: Somatic mutation in individual liver cysts supports a two-hit model of cystogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Molecular Cell* 2: 248-251, 1998.
32. Koptides M, Hadjimichael C, Koupepidou P, Pierides A, Constantinou-Deltas C: Germinal and somatic mutations in the PKD2 gene of renal cysts in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hum Molec Genet* 8: 509-513, 1999.
33. Martin GM, Ogburn CE, Colgin LM, Gown AM, Edland SD, Monnat RJ: Somatic mutations are frequent and increase with age in human kidney epithelial cells. *Hum Molec Genet* 5: 215-221, 1996.