

Polycystická choroba ledvin autosomálně dominantního typu

Consugar MB, Wong WC, Lundquist PA, Rossetti S, Kubly VJ, Walker DL, Rangel LJ, Aspinwall R, Niaudet WP, Ozen S, David A, Velinov M, Bergstralh EJ, Bae KT, Chapman AB, Guay-Woodford LM, Grantham JJ, Torres VE, Sampson JR, Dawson BD, Harris PC; CRISP Consortium. Characterization of large rearrangements in autosomal dominant polycystic kidney disease and the PKD1/TSC2 contiguous gene syndrome. *Kidney Int* 2008;74:1468–1479.

Polycystická choroba ledvin autosomálně dominantního typu (PCHLAD) je častou příčinou chronického selhání ledvin (CHSL) vyvolaného postupnou tvorbou cyst a zvětšením ledvin. PCHLAD je geneticky heterogenní onemocnění s genem PKD1 (46 exonů; 16p13.3) odpovídajícím přibližně za 85 % případů a PKD2 genem (15 exonů; 4q21) odpovídajícím asi za 15 % případů. V bezprostřední blízkosti genu PKD1 leží gen TSC2, nejčastější gen pro tuberózní sklerózu (TS), dědičné onemocnění autosomálně dominantního typu vyznačující se tvorbou benigních hamartomů v různých orgánech a pestrými symptomy (příznaky neurologické, kožní, renální aj.). Převážná část genu PKD1 (~kb, exony 1–33) leží v oblasti, která je intrachromosomálně, segmentálně duplikovaná se šesti PKD1-like pseudogeny (PKD1P1-P6) lokalizovanými v 16p13.1. Tyto pseudogeny mají 99% sekvenční totož-

nost s PKD1 a z toho důvodu bývají při amplifikaci PKD1 pro potřeby mutační analýzy uplatňovány metody využívající vzácné neshody (mismatche) s PKD1. Ve studii zaměřené na posouzení vývoje změn na ledvinách prostřednictvím zobrazovacích metod u pacientů s PCHLAD (tzv. studie CRISP) se podařilo identifikovat mutace asi u 87 % pacientů metodami založenými na detekci párových bazí, přičemž většina mutací způsobovala zkrácení proteinu, menší část pak byla typu missense. U 2–3 % případů všech mutací PKD1 byly dosud prokázány rozsáhlé delece zahrnující jednu či více exonů (Ariyurek, 2004). Rozsáhlé delece genu PKD1, které rovněž narušují gen TSC2, způsobují tzv. syndrom přilehlého genu (contiguous gene syndrome – CGS). U pacientů s CGS se obvykle časně vyvíjí PCHLAD a navíc různé příznaky TSC. Při screeningu pomocí standardních metod gelové a fluorescenční hybridizace *in situ* mohou některé rozsáhlé genové delece zůstat nerozpoznány. MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) je recentně vyvinutou, vysoce účinnou metodou, umožňující detekci delecí či duplikací exonů, která již byla použita u různých nemocí včetně TSC. V práci jsou popsány výsledky screeningu genů u pacientů s PCHLAD metodou MLPA (esej užívající FlexMAP paprsky a instrumentarium Luminex) se zaměřením na průkaz rozsáhlých narušení genů PCHLAD a detekci CGS.

Materiál a metody: V první fázi byla provedena izolace DNA, následně byl vytvořen design PKD1-specifických prób pro MLPA, dále provedena hybridizace MLPA prób, jejich navázání (ligace) a PCR amplifikace ligovaných prób. Technologie FlexMAP (Luminex) je založena na použití průtokové cytometrie a barevně kódovaných mikrosfér k rychlé identifikaci až 88 různých vzorků v jedné esejí. Počty kopií MLPA prób u jednotlivých nemocných byly porovnány s počty kopií u externích kontrolních genů i zdravé kontrolní populace. Dále byl stanoven počet buněk s delecí a vyhodnocen mozaicismus (tzn. přítomnost dvou či několika buněčných linií v organismu). Detaily metodiky práce jsou uvedeny na <http://www.nature.com/ki>.

Výsledky: Pro potřeby esejí byly koncipovány MLPA próby k zachycení delecí/duplikací u genů PKD1, PKD2 a PKD1/TSC2, včetně přilehlých oblastí. Funkce prób, speciálně těch zaměřených na gen PKD1, byla ověřena na souboru 18 rodin s PKD1/TSC2-CGS a u šesti pacientů s intragenními delecemi PKD1. Metodou MLPA byly ve všech případech potvrzeny delece diagnostikované standardními metodami v dřívějším období. V jedné z rodin s přítomností dříve prokázané delece u probanda byla tato delece ověřena metodou MLPA a navíc prokázán u jeho otce mozaicismus (somatická mozaika asi s 15 % buněk obsahujících delecí v leukocytární DNA) – celkově obraz kompatibilní s představou mutace *de novo*. S cílem odhalit frekvenci výskytu rozsáhlých mutací genů (zvl. delece genu) u nemocných s PCHLAD byli vyšetřeni pacienti ze souboru studie CRISP. Po provedení sekvenční analýzy zůstalo 26 rodin, u kterých nebyla zjištěna mutace, a dalších 53 s nedefinovanou mutací (často missense). Po vyšetření těchto 79 případů metodou MLPA byly prokázány čtyři nové případy rozsáhlého narušení genu (delece PKD1/TSC2) u pacientů, u nichž nebyly v předchozím období mutace prokázány. Mozaiková delece byla nově prokázána u tří pacientů s CGS.

Diskuse: Byl vyvinuta MLPA esej umožňující rychlý screening rozsáhlých narušení genu pacientů s PCHLAD či PKD1/TSC2-CGS, a tím významně zpřesňující diagnostiku těchto onemocnění. Přínos metody u nemocných s PCHLAD lze očekávat zvláště tam, kde genový podklad nebyl standardními metodami prokázán (negativní mutace). U pacientů s TS a cystickým onemocněním ledvin

lze tímto testem odlišit pacienty, u nichž je klinický stav (fenotyp) výsledkem dědičného přenosu nezávislých genů PCHLAD a TS, od situace, kdy je fenotyp výsledkem rozsáhlé delece v rámci PKD12/TSC2-CGS.

■ KOMENTÁŘ

Prof. MUDr. Miroslav Merta, CSc.

*Zatímco na podkladě celogenomových mutačních studií se odhaduje výskyt rozsáhlých delecí obecně na úrovni zhruba 8 % (HGMD, 2008), u pacientů s PCHLAD bylo doposud možno prokázat rozsáhlé mutace v méně než 3 %. Rozsáhlejší delece byly zjištěny nejen v rodinách s genem PKD1, ale v menší míře i u rodin s PKD2 (Velinov, 2005). Metodou MLPA se podařilo významně zvýšit záchyt těchto rozsáhlých narušení genu na úroveň zhruba 4 % všech pacientů. Nově vyvinutá multiplexová, na ligaci závislá, amplifikační metoda (MLPA) začala recentně doplňovat spektrum metod standardně používaných k detekci rozsáhlých genových poruch (gelové a fluorescenční hybridizační metody *in situ*). Metoda MLPA je založena na principu polymerázové řetězové reakce (PCR) ligovaných sond, které jsou hybridizovány k cílovým DNA sekvencím. Specifita je zajištěna dvěma sondami, které hybridizují na DNA těsně vedle sebe a na jejichž konci je vždy stejný pár primerů. MLPA byla zavedena do diagnostiky genetických změn u řady onemocnění (TS, dědičný karcinom prsu – BRCA1 aj.). Umožňuje detekci neobvyklých kopií různých částí genomu (různě velké delece, duplikace, amplifikace), známých mutací a relativní kvantifikaci mRNA. Je rovněž schopna odhalit metylační status regulačních oblastí genů. Výhodou MLPA je rychlost vyšetření (cca dva dny), vysoká citlivost, a relativně nízká cena. V komentované práci se ukázaly některé přednosti MLPA ve srovnání se standardními metodami. Nejen, že byly potvrzeny nálezy dříve popsanych rozsáhlých delecí u PKD1, resp. u PKD1/TSC2-CGS, ale byly také nalezeny rozsáhlé genové poruchy typu delecí dosud nepopsané. Výsledky naznačují, že rozsáhlé genové mutace mohou být nalezeny u ne zcela zanedbatelné části jedinců či rodin s PCHLAD (~1/3) s negativními nálezy při mutační analýze založené na detekci bodových mutací. S ohledem na relativně malý počet pacientů s PCHLAD majících rozsáhlé intragenní delece je třeba hodnotit vztah mezi genotypem a genotypickými projevy opatrně. Zdá se však, že alespoň u části souboru vyšetřených pacientů s rozsáhlými intragenními delecemi se klinický obraz, a zvláště závažnost renálního postižení významně nelišily od nálezů u pacientů s jiným typem mutací. Pozoruhodný byl nález a průkaz genového mozaicismu v jedné rodině s PCHLAD. Přítomnost mozaicismu u vyšetřené osoby byl vázán na přítomnost mutace vzniklé *de novo* a znamenal, že pouze některé kopie konkrétního haplotypu PKD1 předávané potomkovi nesly mutaci PKD1, zatímco další byly normální. Mozaicismus může být zdrojem obtíží při správné interpretaci výsledků mutační analýzy a hodnocení genotypu. Connor a spol. recentně popsali případ rodiny s výskytem PCHLAD, jejíž jeden člen byl vyšetřován metodami DNA pro potenciální dárčovství ledviny (Connor, 2008). Nepřítomnost genu pro PCHLAD, a možnost darovat tak ledvinu bez nebezpečí pozdějšího vývoje cyst v ledvinách, bylo možno spolehlivě vyhodnotit pouze díky tomu, že byla zjištěna mutace *de novo* u matky s genovým mozaicismem. Tato situace ilustruje možnosti potenciálního klinického využití MLPA při presymptomatickém screeningu PCHLAD a dalších nemocí. To platí zvláště o TS a PKD1/TSC2-CGS.*

Závěrem lze uvést, že získané výsledky svědčí pro to, že MLPA významně doplní a rozšíří spektrum metod, které lze použít při molekulárně biologickém vyšetření pacientů s dědičnými nemocemi, tak jak bylo ověřeno a prokázáno na souboru nemocných

s PCHLAD, TS a PKD1/TSC2-SCG. Díky této metodě lze také získat nové informace o genovém podkladu těchto nemocí a jejich patogenezi.

Literatura

Ariyurek Y, Lantinga-van Leeuwen I, Spruit L, et al. Large deletions in the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene. Hum Mutat 2004;23:99.

Connor A, Lunt PW, Dolling C, et al. Mosaicism in autosomal dominant polycystic kidney disease revealed by genetic testing to enable living related renal transplantation. Am J Transplant 2008;8:232–237.

HGMD: Human Gene Mutation Databáze. In: <http://www.hgmd.cf.ac.uk>, 2008.

Velinov M, Kupferman J, Gu H, et al. Polycystic kidneys and del (4)(q21.1q21.3): further delineation of a distinct phenotype. Eur J Med Genet 2005;48:51–55.