

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia**

**Análise mutacional da região 3' do gene *PKD1*
em pacientes com rins policísticos no Sul do Brasil**

Vagner Milani

**Porto Alegre
2006**

Vagner Milani

**Análise mutacional da região 3' do gene *PKD1*
em pacientes com rins policísticos no Sul do Brasil**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos pré-requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas: Nefrologia.

Profº. Dr. Elvino José Guardão Barros

Orientador

M637a Milani, Vagner

Análise mutacional da região 3' do gene PKD1 em pacientes com rins policísticos no Sul do Brasil / Vagner Milani ; orient. Elvino José Guardão Barros. – 2006.

66 f.; il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia. Porto Alegre, BR-RS, 2006.

1. Rim policístico autossômico dominante 2. Brasil 3. Diálise renal 4. Análise mutacional de DNA I. Barros, Elvino José Guardão de II. Título.

NLM: WJ 358

AGRADECIMENTOS

A minha família, alicerce fundamental em todos os momentos, em especial aos meus pais, pelo apoio e incentivo permanentes do qual sempre serei grato.

Aos meus amigos, ombros companheiros que amenizam as dificuldades da vida.

Ao meu orientador, Dr. Elvino Barros, pelas importantes revisões e sugestões durante a elaboração deste trabalho.

Aos professores, pelos ensinamentos, disponibilidade e atenção.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Nefrologia pelas valiosas colaborações e lições de coleguismo.

Às secretárias do Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

À Dr^a. Ane Nunes, pelo notável talento, incentivo e amizade da qual admiro e muito estimo.

A minha esposa, Daiana Benck Porsch, pelo carinho, dedicação e companheirismo em todos os momentos.

Ao fruto desse carinho e amor, mistura de nossos genomas, que vem para colorir e dar sentido às nossas vidas e mudar definitivamente nossa visão sobre o mundo, ao qual dedico em especial este trabalho.

SUMÁRIO

<i>Sumário</i>	IV
<i>Lista de símbolos e abreviaturas</i>	V
<i>Lista de figuras</i>	VI
<i>Lista de tabelas</i>	VII
1 – INTRODUÇÃO	08
1.1 – Aspectos gerais dos rins policísticos e do gene <i>PKDI</i>	08
1.2 – A correlação genótipo/fenótipo.....	10
1.3 – Mecanismos celulares envolvidos na cystogênese.....	12
1.4 – O mapeamento mutacional do gene <i>PKDI</i>	14
1.5 - Estratégias para análise de mutações.....	15
2 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
3 – OBJETIVOS	25
4 – ARTIGO: Análise mutacional da região 3' do gene <i>PKDI</i> em pacientes sul-brasileiros com rins policísticos.....	26
5 – ARTICLE: Mutational screen within 3' region of the <i>PKDI</i> gene in Southern Brazilian polycystic kidney patients.....	44

ANEXOS

- a) Termo de Consentimento Informado
- b) Resolução do Comitê de Ética

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ADPKD	<i>Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease</i> – (autossômica dominante)
ARPKD	<i>Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease</i> – (autossômica recessiva)
pb	Pares de bases
IRCT	Insuficiência renal crônica terminal
PKD1	<i>Polycystic Kidney 1</i> - Gene da policistina 1
PKD2	<i>Polycystic Kidney 2</i> - Gene da policistina 2
PKD3	<i>Polycystic Kidney 3</i> - Gene da policistina 3
PCR	Reação em cadeia da polimerase
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
RNA_m	RNA mensageiro
Kb	Kilobases
cDNA	DNA Complementar
PKD1L1–3	Genes homólogos (1-3) ao <i>PKD1</i> identificados em <i>Caenorhabditis elegans</i>
PKD1Like	Genes homólogos ao <i>PKD1</i> identificados (nomenclatura genérica)
PKDREJ	Gene do receptor espermático (<i>Receptor for Egg-Jelly</i>) - gene homólogo ao <i>PKD1</i> identificado em <i>Echinodermata</i> (Ouriço-do-mar).

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Representação esquemática do gene *PKDI*..... 09
- Figura 2** - Representação esquemática da composição protéica, localização e interação entre a policistina-1 e policistina-2 na membrana celular..... 11
- Figura 3:** Formação do cisto renal através da proliferação celular..... 13
- Figura 4:** Mecanismo de inversão da polaridade do fluxo iônico no epitélio ciliar que altera a função celular, passando de absorvente para secretora..... 14

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados demográficos da amostra selecionada..... 41

Tabela 2: Alterações nucleotídicas encontradas em pacientes com ADPKD... 42

INTRODUÇÃO

A doença renal policística autossômica dominante (ADPKD - *Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease*) tem prevalência de 1/400 a 1/1000 na população em geral [1]. Também conhecida como doença renal policística do adulto, é considerada a nefropatia hereditária mais comum. Estima-se que no mundo aproximadamente 12,5 milhões de pessoas possuam rins policísticos, independente de sexo, idade ou etnia [2].

Dados recentemente publicados nos Estados Unidos mostram que aproximadamente 91.000 pacientes com insuficiência renal crônica terminal são portadores de ADPKD. Nessa população, a ADPKD é considerada a quarta causa de perda da função renal, correspondendo a 5% dos pacientes em tratamento dialítico [2]. Em outras populações da América do Norte e da Europa essa prevalência varia de 6 a 9% entre os pacientes submetidos ao tratamento renal substitutivo [3].

No Brasil, dados epidemiológicos sobre a doença renal policística são escassos. Um estudo realizado por SESSO *et al.* [4], descreveu que 3,3% dos pacientes em tratamento com hemodiálise no Estado de São Paulo possuem rins policísticos. Outro estudo, realizado numa amostra de pacientes submetidos à hemodiálise na cidade de Porto Alegre, indicou que a prevalência de pacientes com diagnóstico de ADPKD corresponde a 7,6% [5].

Aspectos gerais dos rins policísticos e do gene *PKD1*

A base fisiológica para a progressão dos cistos renais não é totalmente conhecida. Sabe-se que a apresentação clínica da doença é bastante variada e que algumas

comorbidades estão comumente associadas, sendo elas: hipertensão arterial, distúrbios cardiovasculares, aneurismas aórticos e cerebrais, hematúria, cistos hepáticos, litíase renal e diverticulose intestinal [6].

A maioria dos casos de rins policísticos no adulto (~85%) envolve mutações no gene *PKDI*. O gene *PKDI* é composto por 46 éxons que correspondem a 53Kb do DNA genômico e apresenta um mecanismo complexo de reparo [7].

Dois terços das seqüências próximas à região 5' do gene *PKDI* (50Kb, incluindo éxons e introns) são duplicados algumas vezes e apresentam cerca de 95% de similaridade com a porção intragênica do gene *PKDI*. O fato destas regiões homólogas recombinarem-se inúmeras vezes torna a detecção de mutações especialmente difícil, podendo comprometer a distinção entre mutações silenciosas e polimorfismos de DNA. Na outra extremidade do gene (região 3'), há uma região de cópia única [8].

O gene *PKDI* produz um RNA mensageiro de 14,5 Kb que codifica um polipeptídeo de 4.303 aminoácidos, a policistina-1 (PC-1) [9]. A figura 1 representa esquematicamente a constituição molecular do gene *PKDI*.

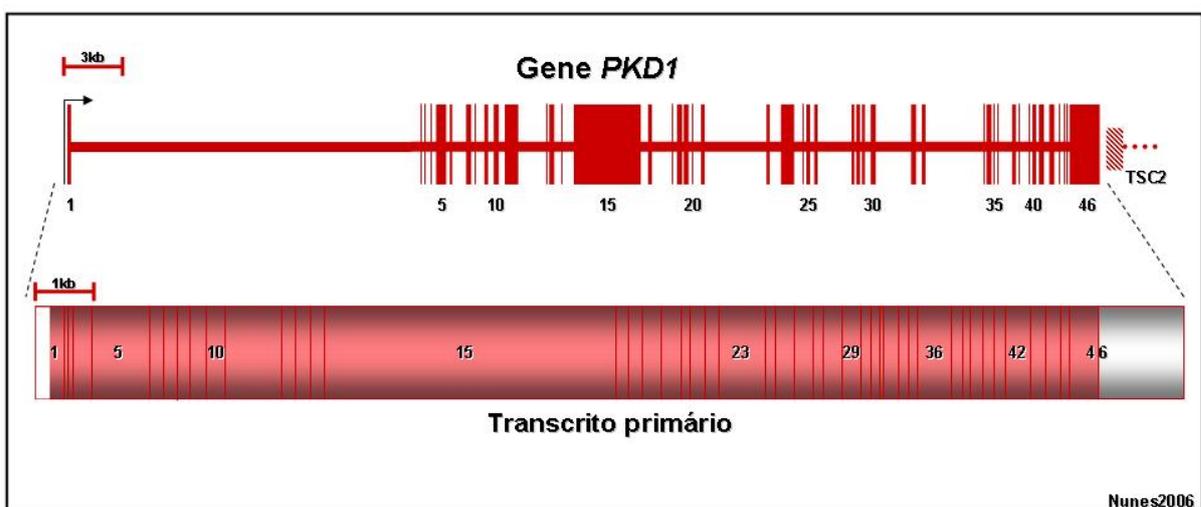


Figura 1: Representação esquemática do gene *PKDI*.

A PC-1 possui um grande domínio extracelular, onze regiões de espaçamento transmembrana e uma terminação carboxi intracelular [10-12]. O domínio extracelular (codificado pela região 5' do gene) apresenta 16 cópias de uma repetição de 80 aminoácidos semelhantes à imunoglobulina, o domínio PKD. Embora a função do domínio PKD seja desconhecida, domínios PKD em diversas outras proteínas estão localizados na superfície extracelular e são altamente glicosilados. O domínio aminoterminal da PC-1 (extracelular) também contém repetições ricas em leucina, um domínio LDL-A, um domínio lectina Ca^{2+} dependente e um domínio REJ [13]. A presença desse domínio REJ é particularmente importante, porque esse domínio parece ter um papel regulatório na molécula [14].

A porção carboxi terminal da PC-1 (codificada pela região 3' do gene) contém diversos sítios de fosforilação [15,16] e um domínio com capacidade de fazer ligações helicoidais, conhecido como “*coiled-coil*”, que demonstrou, *in vitro*, interagir com a porção carboxi terminal do produto protéico do gene *PKD2*, a policistina-2 (PC-2) [17,18]. Essa composição está representada na figura 2.

A correlação genótipo/fenótipo

Alguns estudos tentam correlacionar o genótipo mutado ao fenótipo expresso e a relação de algumas mutações com a progressão e severidade da ADPKD [19-22]. De um modo geral, todos estudos descrevem a alta variabilidade da doença devido às mutações do alelo *PKDI* normal ou à interação com outros genes modificadores. Essa diversidade molecular pode ser considerada como um fator parcial da variabilidade fenotípica para ADPKD. [19,20].

Contudo, ainda não foram descritas mutações típicas em *PKDI* que sejam relacionadas às diferenças na expressão da doença. Desse modo, a ocorrência das mutações não explica isoladamente a variabilidade clínica inter e intrafamiliar [21,22].

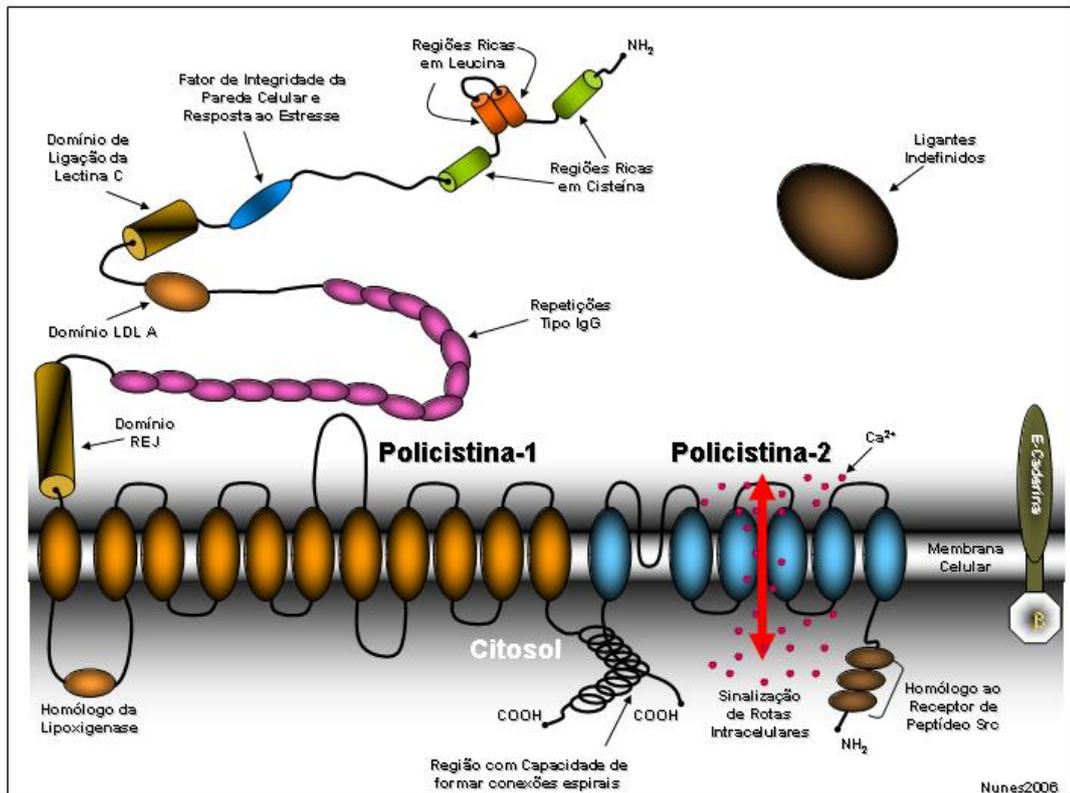


Figura 2: Representação esquemática da composição protéica, localização e interação entre a PC-1 e PC-2 na membrana celular.

Outro fator importante é o comprometimento de regiões adjacentes do gene *PKDI*, como a região *PKDI/TSC2* (relacionada à esclerose tuberosa). A inativação do alelo *PKDI*, combinada com deleções do gene *TSC2*, parece ter um efeito fenotípico característico [23].

Ainda não está definido se a posição da mutação no gene *PKDI* também possui correlação com a severidade da doença renal policística. Os efeitos da posição da mutação podem ser significativos quando relacionado à idade dos indivíduos ao atingirem

insuficiência renal crônica terminal. Dados indicam que há diferenças de dois a cinco anos entre populações com mutações na região 5' (valores médios de 49 anos de idade) e na região 3' do gene (valores médios de 52 anos de idade) em relação a perda total da função renal. Estes dados sustentam a hipótese de que uma mutação localizada numa posição intermediária, ao longo de 7 a 8 Kb do gene, marcaria um ponto determinante da expressão precoce ou tardia e mais severa ou amena da doença [21].

Mecanismos celulares envolvidos na cistogênese

Se por um lado a etiologia dos rins policísticos pode ser explicada por mutações em genes específicos, o mecanismo de expansão dos cistos ou a própria progressão da doença renal policística não podem ser explicados por mutações isoladas nesses genes. Desse modo, diversas hipóteses de interações moleculares são apontadas como possíveis co-participantes desse processo [21]. A figura 3 ilustra o mecanismo básico envolvido na proliferação cística da ADPKD.

Além da PC-1, outras moléculas atuam modulando a progressão dos cistos nos pacientes com rins policísticos. A perda da morfogênese tubular normal em pacientes com ADPKD necessita da atividade coordenada de diferentes elementos, a maioria deles envolvidos no crescimento celular, no remodelamento da matriz extracelular e na secreção de fluídos. As diferentes expressões da doença envolvem os genes *PKD1*, *PKD2* e *PKD3* (apesar deste último ainda ter sido alvo de pouco estudos) e resultam de defeitos na interação de fatores envolvidos em uma mesma rota metabólica, provavelmente atuando como cascatas de sinalização na morfogênese tubular. A combinação destes mecanismos potenciais da cistogênese leva aos diferentes estágios da doença [3].

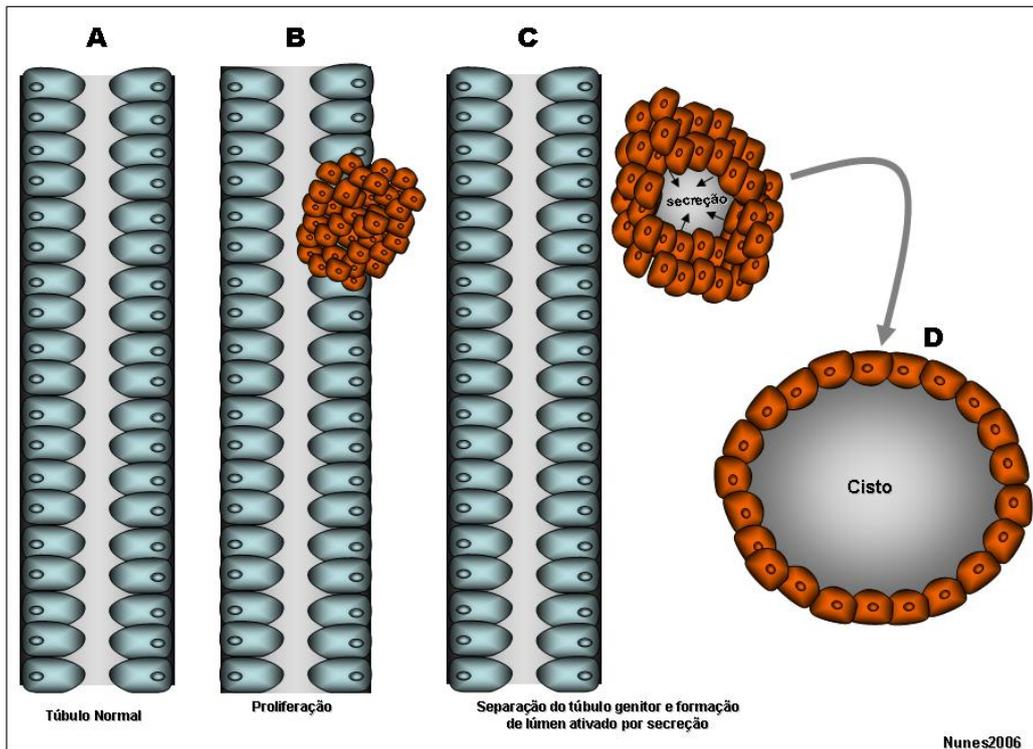


Figura 3: Formação do cisto renal através da proliferação celular. Num túbulo normal (A), uma célula mutante passa a proliferar de forma descontrolada (B). A massa celular se desprende do túbulo e passa a acumular fluido (C). Com a expansão da cavidade forma-se um cisto (D).

Em termos bioquímicos, aparentemente o metabolismo da adenosina monofosfato cíclico (cAMP) é o componente central da formação, estimulação de secreção e acúmulo de fluidos císticos [24,25]. Nas células renais normais a proliferação celular é inibida pelo cAMP, diferentemente nas células ADPKD ocorre estimulação de proliferação celular. Há evidências que o cAMP e fatores de crescimento epiteliais atuam como elementos complementares na progressão da doença [26]. Outro possível mediador na secreção de fluidos e solutos em cistos é a NA^+/K^+ -ATPase. O monitoramento desta enzima nos diferentes estágios de cistogênese em camundongos *Cpk/Cpk* mostrou um aumento circunstancial durante o desenvolvimento de cistos [27]. A figura 4 ilustra o provável mecanismo de inversão da polaridade iônica envolvido na gênese do cisto renal.

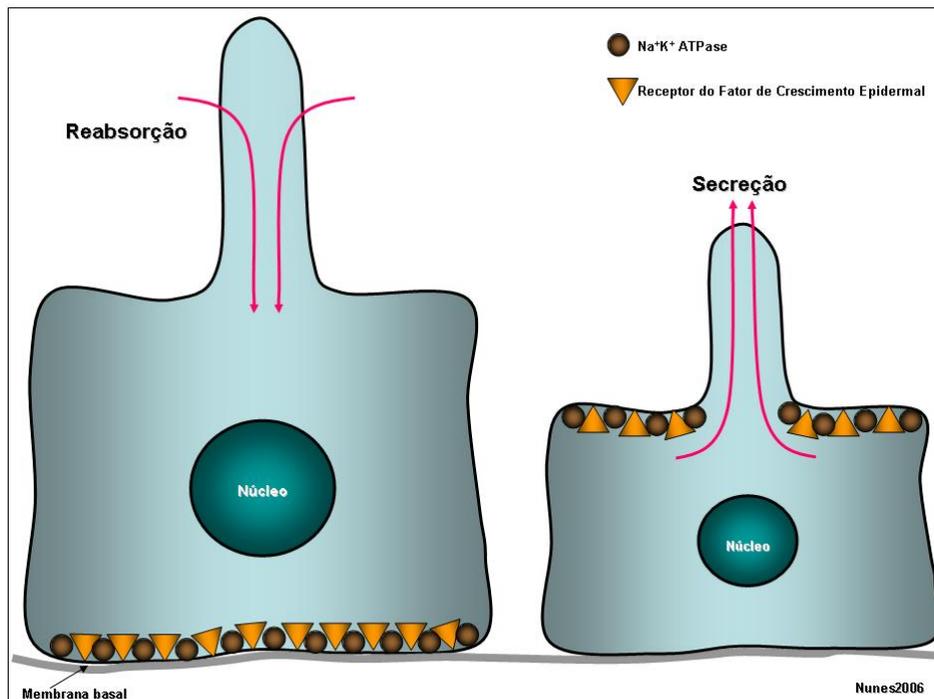


Figura 4: Mecanismo de inversão da polaridade do fluxo iônico no epitélio ciliar que altera a função celular, passando de absorvente para secretora.

O mapeamento mutacional do gene *PKD1*

A substituição de um nucleotídeo que não provoca uma mudança na seqüência de aminoácidos de uma proteína é chamada de mutação silenciosa. Alterações na seqüência de aminoácidos que ocasionam o comprometimento funcional da proteína são chamadas de mutações de sentido alterado (*missense mutation*). Outras substituições de nucleotídeos também podem provocar o surgimento de um códon de terminação prematuro, de maneira que todos os aminoácidos codificados por códons posteriores à mutação não sejam incorporados na proteína mutante, gerando proteínas com baixa ou nenhuma atividade (*nonsense mutation*) [28].

Em termos moleculares, o gene *PKD1* pode ser considerado extenso e isso, além da presença de diversas regiões repetitivas, pode dificultar a sua análise. Até o momento, 212

mutações relacionadas à ADPKD já foram registradas no “Human Gene Mutation Database”, sendo que 110 tratam-se de substituições [29].

Dentre as outras mutações relatadas, 53 são pequenas deleções, 18 são erros no mecanismo de processamento do RNA (*splicing*), 16 são pequenas inserções, 11 são deleções grosseiras, 2 são duplicações/inserções e 2 são rearranjos/inversões [29-36].

Outro aspecto importante relacionado ao gene *PKDI* é a importância da região 3’ desse gene, uma vez que há um domínio capaz de formar ligações helicoidais na porção C-terminal da PC-1 que se liga especificamente com a porção C-terminal da PC-2 [17]. Quando alguma mutação patogênica ocorre em um dos genes esta associação física *in vivo* é comprometida. Outra evidência dessa ligação bastante estável é o grau de conservação da porção final do gene *PKDI* em diversos organismos, indicando que a preservação da região 3’ do gene tem importância evolutiva [37-39].

Estratégias para Análise de Mutações

A detecção de mutações em genes humanos fundamenta-se na comparação entre a sequência de nucleotídeos de um gene em indivíduos afetados e a sequência do mesmo gene em indivíduos com fenótipo normal [28].

A descrição e análise das mutações ADPKD é fundamental para a compreensão dos mecanismos de atuação envolvidos na doença, sua relação com outros fatores de predisposição, estudos de ligação genética evolutiva, aconselhamento genético familiar e no desenvolvimento de novas tecnologias capazes de auxiliar na triagem e seqüenciamento de outras mutações gênicas.

Dependendo do interesse, diferentes plataformas de investigação podem ser aplicadas e os métodos atualmente utilizados baseiam-se no princípio da (1) especificidade, fornecendo uma resposta verdadeiramente positiva para a mutação, (2) sensibilidade, permitindo a identificação de uma mutação a partir de quantidades muito pequenas de determinada amostra, possibilitada pela amplificação de seqüências do DNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR) e (3) simplicidade, tornando um ensaio para mutação eficiente e de baixo custo quando aplicado à rotina laboratorial.

As plataformas mais utilizadas de identificação e caracterização de um gene são: *Transcriptase reverse PCR (RT-PCR)*, *Protein truncation test (PTT)*, *Single-strand conformational polymorphism (SSCP)*, *Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC)*, o seqüenciamento direto do DNA, e o PCR em tempo real. Algumas dessas ferramentas, como a RT-PCR, o PTT e o PCR em tempo real, se aplicam ao estudo funcional do gene e são comumente aplicadas na investigação da expressão gênica.

Outras técnicas se aplicam ao exame descritivo da estrutura gênica. Nesse sentido, é indicado para análise o uso de polimorfismos de DNA relacionados à conformação da molécula de DNA de fita simples - SSCP [28].

Na investigação da etiopatogenia, preconiza-se a análise por cromatografia líquida (DHPLC) que detecta mudanças de bases provocadas por diferentes agentes mutacionais, possuindo um bom nível de reprodutibilidade e sensibilidade e demonstrando ser uma eficiente ferramenta para diagnóstico molecular de ADPKD [28].

Entretanto, nenhum desses métodos é capaz de revelar a natureza e o tipo de mutação. Nesse sentido, a ferramenta que melhor se aplica é o seqüenciamento direto do DNA. Os

ensaios para detecção de mutações identificam os polimorfismos em nucleotídeos simples, que não apresentam efeitos comprometedores, assim como também detectam mutações deletérias. Em geral, os polimorfismos são encontrados em indivíduos afetados e normais, todavia, alguns indivíduos podem ser portadores de uma mutação em um gene que eventualmente poderia ser confundida com um polimorfismo ou vice-versa. Nestes casos, a distinção entre polimorfismo e mutação é feita pelo seqüenciamento do DNA, onde os resultados da substituição do nucleotídeo podem ser avaliados [28].

Existem basicamente dois métodos adotados para o seqüenciamento de DNA, um enzimático, envolvendo a terminação de cadeia com didesoxirribonucleosídeo trifosfato, desenvolvido por Fred Sanger, atualmente o mais utilizado, e o método de degradação química de DNA, desenvolvido por Maxam e Gilbert [28].

O seqüenciamento automatizado possibilitou a otimização da técnica a partir da aplicação de *softwares* especializados que analisam as seqüências de DNA incorporadas. A grande vantagem deste método é que não requer a confecção de géis para eletroforese, geralmente envolvendo produtos tóxicos. A leitura é feita pela fluorescência específica emitida pelo nucleotídeo marcado, podendo analisar fragmentos de 200pb a 500pb [28].

Mesmo sendo importante, a análise isolada do gene *PKDI* não é suficiente para explicar os mecanismos envolvidos na evolução da ADPKD. Entretanto, somente a partir desse tipo de exame descritivo é possível organizar estratégias de investigação para essa doença, quer seja sob aspectos clínicos, bioquímicos ou moleculares.

Diversos autores concordam que a compreensão dos mecanismos envolvidos nos rins policísticos contribuirá não apenas para o entendimento dessa doença, mas também para o esclarecimento de algumas variantes da função renal [21,26,40-45].

Sendo assim, tanto a escolha da plataforma de análise quanto da região de interesse são importantes para o estudo da ADPKD em diferentes grupos de pacientes. A escolha de regiões cuja seqüência de DNA no gene *PKDI* tenha alguma relação direta com a função da PC-1 certamente resulta em dados relevantes, mesmo em estudos cujo tamanho amostral é reduzido ou o perfil fenotípico dos pacientes é variado.

A análise e caracterização de mutações ADPKD através do seqüenciamento do DNA de indivíduos pré-dispostos à formação de rins policísticos pode permitir a compreensão dos mecanismos de atuação envolvidos na doença, sua associação com comorbidades, aconselhamento genético e no diagnóstico precoce de mutações gênicas, constituindo-se em uma importante ferramenta de auxílio na medicina preventiva de patologias moleculares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AFZAL AR, HAND M, PEREIRA ET, MALIK AS, TAYLOR R, JEFFERY S. Novel mutations in the 3' region of the polycystic kidney disease 1 (*PKDI*) gene. *Hum Genet* 105 (Suppl 6): 648-53, 1999.
2. POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE FOUNDATION. Disponível em <http://www.pkdcure.org>
3. PARFREY PS, BEAR JC, MORGAN JC, *et al.* The diagnosis and prognosis of autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med*; Suppl 323:1085-90, 1990.
4. SESSO R, ANÇÃO MS, MADEIRA AS. Aspectos Epidemiológicos do Tratamento Dialítico na Grande São Paulo. *Revista da Associação Médica Brasileira* 40(1):10-14, 1994.
5. NUNES A, ROISENBERG I, PICOLLI E, WEBER R, SATLER F, GRASSELLI F, WAINBERG F, BOHN F, BARROS E. Adult polycystic kidney disease in patients on haemodialysis in the south of Brazil. *Nephrol Dial Transplant Suppl* 18:2686-87, 2003.
6. CALVET JP, GRANTHAM JJ. The genetics and physiology of polycystic kidney disease. *Semin Nephrol*; Suppl 2:107-23, 2001.
7. BACOLLA A, JAWORSKI A, CONNORS TD, WELLS RD. *PKDI* unusual DNA conformations are recognized by nucleotide excision repair. *J Biol Chem* 276(21):18597-604, 2001.
8. SESSA A, GHIGGERI GM, TURCO AE. Autosomal dominant polycystic kidney disease: clinical and genetic aspects. *J Nephrol* 10 (Suppl 6):295-310, 1997.
9. MURCIA NS, WOYCHIK RP, AVNER ED. The Molecular Biology of Polycystic Kidney Disease. *Pediat Nephrol* 12:721-6, 1998.

10. GENG L, SEGAL Y, PEISSEL B, DENG N, PEI Y, CARONE F, RENNKE HG, GLUCKSMANN-KUIS AM, SCHNEIDER MC, ERICSSON M, REEDERS ST, ZHOU J. Identification and localization of polycystin, the PKD1 gene product. *J Clin Invest* 98(12):2674-82, 1996.
11. MALHAS AN, ABUKNESHA RA, PRICE RG, Polycystin-1: immunoaffinity isolation and characterization by mass spectrometry, *FEBS Letters* 505(2):313-6, 2001.
12. NIMS N, VASSMER D, MASER RL. Transmembrane domain analysis of polycystin-1, the product of the polycystic kidney disease-1 (PKD1) gene: evidence for 11 membrane-spanning domains. *Biochemistry* 42(44):13035-48, 2003.
13. GILLESPIE GA, SOMLO S, GERMINO GG, WEINSTAT-SASLOW D, REEDERS ST. CpG island in the region of an autosomal dominant polycystic kidney disease locus defines the 5' end of a gene encoding a putative proton channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(10):4289-93, 1991.
14. MOY GW, MENDOZA LM, SCHULTZ JR, SWANSON JR, GLABE CG, VACQUIRE VC. The sea urchin sperm receptor for egg jelly is a modular protein with extensive homology to the human polycystic kidney disease protein *PKDI*. *J Cell Biol* 133:809-17, 1996.
15. PARNELL SC, CALVET JP. Phosphorilation of PKD1 protein, polycystin-1. *J Am Soc Nephrol* 8:378A, 1997.
16. PARNELL SC, MAGENHEIMER BS, MASER RL, RANKIN CA, SMINE A, OKAMOTO T, CALVET JP. The polycystic kidney disease-1 protein, polycystin-1, binds and activates heterotrimeric G-proteins in vitro. *Bioch Biophys Res Comm* 251(2):625-31, 1998.

17. QIAN F, GERMINO FJ, CAI Y, ZHANG X, SOMLO S, GERMINO GG. *PKD1* interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain. *Nat Genet* 16(2):179-83, 1997.
18. TSIOKAS L, KIM E, ARNOULD T, SUKHATME VP, WALZ G. Homo- and heterodimeric interactions between the gene products of *PKD1* and *PKD2*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(13):6965-70, 1997.
19. ROSSETI S, BURTON S, STRMECKI L, HARRIS PC. The Position of the Polycystic kidney Disease 1 (PKD1) Gene Mutation Correlates with the Severity of Renal Disease. *J Am Soc Nephrol* 13:1230-37, 2002.
20. PASTERNAK, J.J. *Genética Molecular Humana: Mecanismos das Doenças Hereditárias*. 1º ed. (Trad. Ida Cristina Gubert) Ed. Manole. University of Waterloo: Ontário. Canadá; 207-215, 2002.
21. ONG ACM, HARRIS PC. Molecular pathogenesis of ADPKD: The polycystin complex gets complex. *Kidney Int* 67:1234-47, 2005.
22. MAGISTRONI R, HE N, WANG K, ANDREW R, JOHNSON A, GABOW P, DICKS E, PARFREY P, TORRA R, SAN-MILLAN JL, COTO E, VAN DIJK M, BREUNING M, PETERS D, BOGDANOVA N, LIGABUE G, ALBERTAZZI A, HATEBOER N, DEMETRIOU K, PIERIDES A, DELTAS C, ST GEORGE-HYSLOP P, RAVINE D, PEI Y. Genotype-renal function correlation in type 2 autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 14(5):1164-74, 2003.
23. LONGA L, SCOLARI F, BRUSCO A, CARBONARA C, POLIDORO S, VALZORIO B, RIEGLER P, MIGONE N, MAIORCA R. A large TSC2 and PKD1 gene deletion is associated with renal and extrarenal signs of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 12(9):1900-7, 1997.
24. YAMAGUCHI T, PELLING JC, RAMASWAMY NT, EPPLER JW, WALLACE DP, NAGAO S, ROME LA, SULLIVAN LP, GRANTHAM JJ. cAMP stimulates

- the in vitro proliferation of renal cyst epithelial cells by activating the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Kidney Int* 57(4):1460-71, 2000.
25. TORRES VE. Cyclic AMP at the hub of the cystic cycle. *Kidney Int* 66(3):1283-5, 2004.
 26. GRANTHAM JJ, TORRES VE, CHAPMAN AB, GUAY-WOODFORD LM, BAE KT, KING BF JR, WETZEL LH, BAUMGARTEN DA, KENNEY PJ, HARRIS PC, KLAHR S, BENNETT WM, HIRSCHMAN GN, MEYERS CM, ZHANG X, ZHU F, MILLER JP; CRISP INVESTIGATORS. Volume progression in polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 354(20):2122-30, 2006.
 27. CANDIANO G, GUSMANO R, ALTIERI P, BERTELLI R, GINEVRI F, COVIELLO DA, SESSA A, CARIDI G, GHIGGERI GM. Extracellular matrix formation by epithelial cells from human polycystic kidney cysts in culture. *Virch Arch B Cell Pathol* 63:1-9, 1992.
 28. GRIFFITHS AJF, GELBART WM, MILLER JH, LEWONTIN RC. Gene Mutations. In: *Modern Genetics Analysis*. New York: W.H. Freeman and Company, Pp.197-234, 1991.
 29. HUMAN GENE MUTATION DATABASE (HGMD). Disponível em <http://uwcmmlls.uwcm.ac.uk>
 30. BADENAS C, TORRA R, MILLÁN JLS. Mutation analysis within the 3' region of the PKD1 gene. *Kidney Int* 55:1225-33, 1999.
 31. PERAL B, MILLAN JLS, ONG ACM, HARRIS PC. Screening the 3' Region of the Polycystic Kidney Disease 1 (PKD1) Gene Reveals Six Novel Mutations. *Am J Hum Genet* 58:86-96, 1996.
 32. NEOPHYTOU P, CONSTANTINIDES R, LAZAROU A, PIERIDES A, DELTAS CC. Detection of a novel nonsense mutation and an intragenic polymorphism in the PKD1 gene of a Cypriot family with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hum Genet* 98(4):437-42, 1996.

33. PERAL B, GAMBLE V, SAN MILLAN JL, STRONG C, SLOANE-STANLEY J, MORENO F, HARRIS PC. Splicing mutations of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene induced by intronic deletion. *Hum Mol Genet* 4(4):569-74, 1995.
34. PERAL B, GAMBLE V, STRONG C, ONG AC, SLOANE-STANLEY J, ZERRES K, WINEARLS CG, HARRIS PC. Identification of mutations in the duplicated region of the polycystic kidney disease 1 gene (PKD1) by a novel approach. *Am J Hum Genet* 60(6):1399-410, 1997.
35. PHAKDEEKITCHAROEN B, WATNICK TJ, GERMINO GG. Mutation analysis of the entire replicated portion of PKD1 using genomic DNA samples. *J Am Soc Nephrol* 12(5):955-63, 2001.
36. QIAN F, BOLETTA A, BHUNIA AK, XU H, LIU L, AHRABI AK, WATNICK TJ, ZHOU F, GERMINO GG. Cleavage of polycystin-1 requires the receptor for egg jelly domain and is disrupted by human autosomal-dominant polycystic kidney disease 1-associated mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(26):16981-6, 2002.
37. WATNICK TJ, GANDOLPH MA, WEBER H, NEUMANN HP, GERMINO GG. Gene conversion is a likely cause of mutation in *PKD1*. *Hum Mol Genet* 7(8):1239-43, 1998.
38. TSUCHIYA K, KOMEDA M, TAKAHASHI M, YAMASHITA N, CIGIRA M, SUZUKI T, SUZUKI K, NIHEI H, MOCHIZUKI T. Mutational analysis within the 3' region of the PKD1 gene in Japanese families. *Mutat Res Genom* 458:77-84, 2001.
39. RODOVA M, ISLAM MR, PETERSON KR, CALVET JP. Remarkable sequence conservation of the last intron in the PKD1 gene. *Mol Biol Evol* 20(10):1669-74, 2003.
40. COTTON CU, AVNER ED. PKD and CF: an interesting family provides insight into the molecular pathophysiology of polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 32(6):1081-3, 1998.

41. MURCIA NS, SWEENEY WE JR, AVNER ED. New insights into the molecular pathophysiology of polycystic kidney disease. *Kidney Int* 55(4):1187-97, 1999.
42. WILSON PD. Polycystin: new aspects of structure, function, and regulation. *J Am Soc Nephrol* 12(4):834-45, 2001.
43. WILSON PD. Polycystic kidney disease: new understanding in the pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 36(10):1868-73, 2004.
44. HUSSON H, MANAVALAN P, AKMAEV VR, RUSSO RJ, COOK B, RICHARDS B, BARBERIO D, LIU D, CAO X, LANDES GM, WANG CJ, ROBERTS BL, KLINGER KW, GRUBMAN SA, JEFFERSON DM, IBRAGHIMOV-BESKROVNAYA O. New insights into ADPKD molecular pathways using combination of SAGE and microarray technologies. *Genomics* 84(3):497-510, 2004.
45. AL-BHALAL L, AKHTAR M. Molecular basis of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Adv Anat Pathol* 12(3):126-33, 2005.

OBJETIVOS

Geral:

Analisar o perfil molecular do gene *PKDI* em pacientes portadores de ADPKD.

Específicos:

Descrever o perfil molecular de uma seqüência de DNA com 240pb na região 3' do gene *PKDI* em pacientes portadores de ADPKD, em hemodiálise no Estado do Rio Grande do Sul;

Comparar os dados encontrados na nossa população com outros descritos no banco mundial de genes (GenBank).

Análise mutacional da região 3' do gene *PKDI* em pacientes sul-brasileiros com rins policísticos

Vagner Milani¹, Ane Cláudia Fernandes Nunes¹, Nicolas Carlos Hoch², Renato Moreira Rosa², Daiana Benck Porsch³, Cristiane Mattos¹, Liana Rossato¹ e Elvino José Guardão Barros¹.

1. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia - UFRGS
2. Departamento de Biofísica - UFRGS
3. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas - UFRGS

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre - Rio Grande do Sul - Brasil

Endereço para correspondência:

Vagner Milani - Hospital de Clínicas de Porto Alegre –HCPA/UFRGS.

Ramiro Barcelos, 2350 - Serviço de Nefrologia

Santana - Porto Alegre

90035-903, RS - Brasil

Fone: + 55-51-2101-8887

Fax: + 55-51-2101-8121

Celular: +55 -51-8411-2740

E-mail: vagnermilani@yahoo.com.br

Título Resumido: Região 3' do gene *PKDI* em pacientes brasileiros

Unitermos: gene *PKDI* / análise mutacional / doença renal policística / hemodiálise

RESUMO

Introdução: Na maioria dos pacientes com Doença Renal Policística do Adulto (~85%) ocorrem mutações no gene *PKDI* o qual possui diversas regiões repetitivas. Apenas 3.5kb da região 3' do gene é codificado por um segmento de cópia única. O objetivo do presente estudo foi descrever uma seqüência de 240 nucleotídeos da região 3' do gene *PKDI* em uma amostra de pacientes com rins policísticos submetidos à hemodiálise procurando-se identificar possíveis alterações nessa região.

Métodos: Foram selecionados 50 pacientes em serviços de hemodiálise de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, entre os anos de 2001 e 2005. A amplificação do DNA genômico foi feita por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e o seqüenciamento das amostras foi processado seqüenciador automático pelo sistema de análise de DNA capilar, seguido do alinhamento de seqüências de consenso para confirmação de origem no GenBank.

Resultados: Entre os pacientes analisados (52% M e 48% F), a média de idade observada foi de 58±11 anos. As comorbidades associadas mais prevalentes foram infecção do trato urinário (75%) e hipertensão arterial sistêmica (55%). O seqüenciamento das amostras detectou 52 alterações em 18 pacientes (61% M e 39% F), sendo elas: 15 transversões (29%), 13 deleções (25%), 12 inserções (23%) e 12 transições (23%), distribuídas ao longo dos 240 pb amplificados a partir da região 3' não-traduzida do gene *PKDI*. Neste estudo, foi possível observar mudanças nucleotídicas em 67% das amostras analisadas, mesmo considerando uma porção de DNA pequena e um número reduzido de indivíduos avaliados. A composição nucleotídica da seqüência analisada é rica em pares CG e mais de 50% das alterações observadas envolvem esses nucleotídeos, sugerindo a presença de *hot spot* de mutações. A comparação das seqüências analisadas com o GenBank não evidenciou nenhuma mutação nova.

Conclusões: Embora não tenham sido observadas mutações novas, esse tipo de análise descritiva é importante, pois orienta novas investigações em outras populações e em outras regiões do mesmo gene. A amostra pequena de pacientes não é suficiente para conclusões definitivas, sendo necessária a sua ampliação para que seja sustentada a existência de um possível *hot spot* de mutações.

INTRODUÇÃO

A doença renal policística autossômica dominante (ADPKD - *Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease*) é considerada a nefropatia hereditária mais comum com uma prevalência estimada de 1/400 a 1/1000 na população em geral [1,2].

A prevalência de pacientes com diagnóstico de ADPKD em portadores de insuficiência renal terminal em tratamento com diálise, em diferentes populações da América do Norte e da Europa, varia de 6 a 9%. [2,3]. No Brasil, dados epidemiológicos sobre a doença renal policística são escassos. SESSO *et al.* [4], observou uma prevalência, relativamente baixa, de 3,3% dos pacientes em tratamento com hemodiálise no Estado de São Paulo. Mais recentemente, na cidade de Porto Alegre foi descrita uma prevalência de 7,6% de ADPKD em pacientes submetidos à hemodiálise [5].

A maioria dos casos de rins policísticos no adulto (~85%) envolve mutações no gene *PKDI*. Esse gene é composto por 46 éxons que correspondem a 53 Kb do DNA genômico e apresenta um mecanismo complexo de reparo [6,7]. Aproximadamente dois terços das seqüências próximas à região 5' do gene *PKDI* são duplicados algumas vezes e apresentam cerca de 95% de similaridade com a porção intragênica [8]. O fato destas regiões homólogas recombinarem-se inúmeras vezes torna a detecção de mutações especialmente difícil. Na outra extremidade do gene (região 3'), há uma região de cópia única que parece ter importância do ponto de vista molecular, uma vez que alterações nessa região podem afetar a estabilidade entre as policistinas 1 e 2 [8].

O gene *PKDI* produz um RNA mensageiro de 14,5 Kb que codifica um polipeptídeo de 4.303 aminoácidos, a policistina-1 (PC-1) [9]. Ela está ancorada por aproximadamente 7 a 11 domínios transmembrana, sendo sua porção carboxi terminal codificada pela região 3' do gene [10,11]. Contém ainda diversos sítios de fosforilação e

um domínio com capacidade de fazer ligações helicoidais, conhecido como *coiled-coil*, que, *in vitro*, interage com a porção carboxi terminal do produto protéico do gene *PKD2*, a policistina-2 [12,13]. Evidências da diversidade clínica entre os pacientes já foram observadas. Existe uma grande variabilidade na apresentação clínica dos pacientes com *PKDI*, não sendo definida as mutações que possam ser específicas às diferenças de expressão da doença [14]. Desse modo, a ocorrência de determinada mutação não explica isoladamente a variabilidade clínica inter e intrafamiliar [15,16]. Em termos moleculares, o gene *PKDI* pode ser considerado extenso e isso, além da presença de diversas regiões repetitivas, pode dificultar a sua análise. Até o momento, 212 mutações relacionadas à ADPKD já foram registradas no “Human Gene Mutation Database”, sendo que 110 tratam-se de substituições [17].

O objetivo do presente estudo foi descrever uma seqüência de 240 nucleotídeos da região 3’ do gene *PKDI* em uma amostra de pacientes com diagnóstico de ADPKD submetidos à hemodiálise no Rio Grande do Sul, região sul do Brasil, procurando identificar possíveis alterações nessa região do gene.

PACIENTES E MÉTODOS

Os pacientes analisados foram selecionados em serviços de hemodiálise de cinco diferentes regiões do Rio Grande do Sul, entre os anos de 2001 e 2005.

Os critérios de inclusão adotados consideraram a existência de história familiar de rins policísticos e exame de imagem. Pacientes jovens com até 30 anos deveriam ter pelo menos dois cistos em um dos rins; entre 30 e 59 anos os pacientes deveriam ter pelo menos dois cistos em cada rim e pacientes com 60 anos ou mais deveriam ter pelo menos

quatro cistos em ambos os rins [18]. Os pacientes foram avaliados em relação à idade de ingresso em hemodiálise, tempo de diálise em meses, sexo e etnia. Informações clínicas complementares coletadas a partir do prontuário dos pacientes também foram avaliadas, como dados de história pregressa de hematúria macroscópica, infecção do trato urinário, litíase renal, hipertensão, diverticulose, cistos hepáticos e aneurisma.

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, registrado no *Institutional Review Board (IRB)* sob número 0000921. Todos os pacientes convidados a participar foram informados quanto aos objetivos da investigação e a admissão na amostra dependia da assinatura de um consentimento informado.

- Amplificação do DNA Genômico

A amplificação do DNA genômico da região de interesse foi feita pela reação em cadeia da polimerase (PCR). As reações de amplificação foram feitas em um volume final de 25 μ l contendo aproximadamente 250 ng de DNA genômico, 1 μ M de cada oligonucleotídeo, 1,25 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 1 μ L DMSO, 50 mM KCL, 1,5 mM MgCl₂ e 1U *Taq* DNA Polimerase.

As reações foram processadas em termociclador automático (Perkin Elmer) nas seguintes condições: 30 repetições do ciclo 94°C (1 min), 64°C (1 min) e 72°C (1 min). A eficiência da reação foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%. O DNA obtido no PCR foi purificado desnaturando-se a porção protéica com clorofórmio e precipitando o DNA em solução salina saturada e isopropanol. Após a secagem do pellet formado, os

ácidos nucléicos foram ressuspensos em tampão TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8.0) e armazenados a -20° C.

- Seqüenciamento do DNA

As seqüências de oligonucleotídeos descritas por Rossetti *et al.* [19] que foram usadas para flanquear a região 3' do gene *PKDI* analisada nesse estudo são as seguintes:

5' CCCGTGGCCCATCCCCGGGCCTGCGG 3' (senso) e 3'
TACGTGCAGCCATTCTGCCTGGCCC 5' (anti-senso).

Para o preparo das reações de seqüenciamento, duas alíquotas (75-250 ng) do produto de PCR purificado foram combinadas com cada um dos oligonucleotídeos (4,8pmol).

O seqüenciamento das alíquotas foi processado pelo sistema de análise de DNA capilar (ABI PRISM[®]3100 - Applied Biosystems). As reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando o 'DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit' (Thermo Sequenase[™] II DNA Polimerase). O alinhamento de seqüências de consenso para confirmação de origem no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) foi feito pelos softwares Clustal X [20] e Finch Tracer Viewer 1.3.1[®] (Geospiza, Inc.).

- Análise Estatística

As informações descritivas foram apresentadas sob forma de médias \pm desvio padrão (DP). Diferenças entre as variáveis quantitativas com distribuição normal foram avaliadas por ANOVA. As comparações entre os dados qualitativos foram realizadas utilizando o Teste do Qui-quadrado (χ^2), com Correção de Yates, quando necessário. A

análise dos dados foi processada pelo pacote estatístico SPSS 8.0 (SPSS Inc, Chicago, IL). A margem de significância foi estabelecida em 0,05 (bi-caudal).

RESULTADOS

Foram selecionados 50 pacientes (52% M e 48% F). A média de idade observada foi de 58±11 anos e 68% da amostra foi composta por caucasóides (Euro-descendentes). A idade de ingresso em hemodiálise foi de 52±9 anos e o tempo médio em hemodiálise foi de 71±55 meses. As comorbidades associadas mais prevalentes foram infecção do trato urinário (75%) e hipertensão arterial sistêmica (55%). Os dados demográficos da amostra selecionada estão descritos na tabela 1.

A análise do DNA detectou alterações em 18 pacientes sendo 15 transversões (29%), 13 deleções (25%), 12 inserções (23%) e 12 transições (23%), distribuídas ao longo dos 240 pb amplificados a partir da região 3' do gene *PKDI* (nucleotídeos 51727-51962). Os dados dos 18 pacientes (61% M e 39% F) seqüenciados indicam uma faixa etária com média de 60±8 anos. Além disso, a idade média de início da hemodiálise observada foi de 54±9 anos e o tempo em hemodiálise de 48±39 meses.

As alterações observadas estão descritas na tabela 2 e a distribuição das alterações encontradas está representada na figura 1.

Duas regiões apresentaram um número elevado de alterações distintas (figura 1). A primeira abrange o intervalo entre os nucleotídeo 51727 e 51846 (119 pb) onde as mutações mais prevalentes são deleções (43%) e transições (42%); A segunda região (79pb), que compreende o intervalo entre os nucleotídeos 51887 e 51966, apresenta inserções (58%) e transversões (55%).

Observou-se, ainda, que 40% das transversões eram C→G e que 58% das transições eram C→T. Além disso, dentre as deleções observadas, 38% envolviam os

nucleotídeos C e G e o tipo de inserção mais comum foi do nucleotídeo G (58%). Na amostra 18 encontramos uma dupla deleção (posição 51833-51834). Esta amostra apresentou um total de 10 mutações, sendo 7 deleções (3 guaninas e 4 citosinas), 2 transversões e uma transição. Trata-se de uma paciente do sexo feminino, caucasóide com 58 anos de idade em tratamento dialítico desde os 50 anos. Além de rins policísticos e hipertensão arterial essa paciente não possui nenhuma outra comorbidade associada. A amostra 15 é outro caso com 10 mutações, porém mais variável, com uma deleção e uma inserção de citosina, 4 transversões, sendo duas de A→C e 4 transições, em que 3 delas são de C→T. Esta paciente de 70 anos, do sexo feminino e caucasóide também apresenta quadro clínico similar à amostra 18, com rins policísticos associado à hipertensão arterial, além de cistos hepáticos e em tratamento dialítico há 24 meses, evidenciando a grande variabilidade clínica destes pacientes, independentemente do tipo de mutações apresentadas.

DISCUSSÃO

A importância de estudar especificamente a região 3' do gene *PKD1* se justifica pela capacidade dessa porção codificar um segmento protéico que forma *coiled-coil*, o que pode estar associado a perda de estabilidade entre as policistinas 1 e 2 devido à mutações, além de ser uma região codificada por cópia única [1, 12]. De fato, os dados observados neste estudo mostraram uma grande variabilidade alélica nesta porção do gene *PKD1*, semelhante ao que já foi descrito por outros autores [21,22].

Há consenso de que a variabilidade clínica da ADPKD envolve a interação dos genes *PKD1* e *PKD2* em alguma proporção [3]. Essa heterogeneidade pode resultar de falhas na interação entre os fatores envolvidos na morfogênese tubular [3]. Qian *et al.* [12]

descreveram o domínio *coiled-coil* na porção carboxi terminal da PC-1 que se liga especificamente com a porção carboxi terminal da PC-2 [12]. Da mesma forma, relacionaram expressões clínicas mais severas da doença com extensas deleções na região terminal do gene *PKD1*. Essas deleções, que alteram a porção C-terminal da PC-1, podem comprometer a propriedade de adesão da proteína à membrana e a sua interação com componentes intracelulares [12].

A fragilidade das extremidades protéicas da PC-1 também foi avaliada por Chaveut *et al.* [23], que descreveu rotas alternativas e/ou paralelas que atuam a partir de estímulos ciliares e, através de eventos proteolíticos, clivam as porções N-terminal extracelular e C-terminal intracelular da PC-1. O fragmento gerado a partir dessa clivagem (~200 aminoácidos) pode se translocar ao núcleo e ativar rotas de sinalização celular (quinases e fosfatases) e modular a expressão gênica [24]. De um modo geral, mutações patogênicas na região 3' dos genes *PKD1* e *PKD2* podem comprometer, *in vivo*, essa interação física que parece garantir a estabilidade funcional das policistinas [16,25].

A substituição de nucleotídeos e a alteração na seqüência de aminoácidos podem provocar o comprometimento funcional da proteína. Entretanto, a simples detecção e confirmação de uma mutação não determina a distinção entre polimorfismos raros e/ou mutações silenciosas. Nesse estudo, dentre as 13 deleções encontradas 5 são de guaninas e 5 de citosinas. Embora a amostra 18 tenha apresentado um grande número de deleções, isso parece não ter maiores conseqüências clínicas.

Dentre as transições, a maioria delas são C→T. Três transições são do tipo G→A e duas A→G.

Não foram observadas quaisquer diferenças relacionadas à composição étnica da amostra. A maioria dos pacientes avaliados nesse estudo descende de grupos étnicos

européus (68%). Outros 32% da amostra foram identificados como afro-descendentes e nenhum paciente de origem asiática foi encontrado. A falta de diferença pode ser atribuída à semelhança entre o modelo padrão de genoma disponibilizado no GenBank e a distribuição étnica da nossa amostra. Outras análises, na mesma região-alvo deste estudo, já foram publicados em diferentes populações caucasóides (européias e norte-americanas), além de grupos asiáticos (japoneses e coreanos) [26-31]. Da mesma forma, não encontramos diferenças entre esses grupos e nossa amostra.

A composição nucleotídica dos 240pb analisados neste estudo é rica em pares CG e mais de 50% das alterações observadas envolvem esses nucleotídeos. Muitas mutações podem ocorrer isoladamente em um determinado gene. Contudo, existem alguns sítios onde a probabilidade de ocorrência de um evento mutacional é maior que o esperado para uma distribuição aleatória [21,32]. O elevado nível de dinucleotídeos C e G favorece, devido a metilação da citosina e a desaminação da timina, a presença de sítios de mutação conhecidos como *hot spots*. Nestes dinucleotídeos, a citosina é metilada no carbono 5' e a 5-metilcitosina é suscetível à desaminação espontânea originando timina.

Neste estudo observamos um número considerável de alterações C→G (40%) dentre as transversões e C→T (58%) dentre as transições. Do mesmo modo, as deleções mais frequentes envolvem os nucleotídeos C (38%) e G (38%) e o tipo de inserção mais comum foi do nucleotídeo G (58%). Ainda que não possamos afirmar a existência de *hot spot* nessa região, chama a atenção o fato de que as mutações mais frequentes envolvem os nucleotídeos C e G. Outros estudos, realizados na mesma região e em outras populações, poderiam colaborar na elucidação dessa hipótese.

Os achados observados neste estudo são relevantes, pois foi possível descrever mudanças nucleotídicas em 67% das amostras analisadas, mesmo considerando uma pequena porção de DNA e um número reduzido de indivíduos avaliados.

Não observamos mutações novas e o tamanho amostral reduzido deste estudo não é suficiente para afirmar a presença de um *hot spot* de mutação na região 3' do gene *PKD1*. Entretanto, a composição da seqüência analisada, que é rica em pares CG, sugere a existência desse tipo de região de predisposição a mutações, sendo necessários mais estudos com um número maior de pacientes.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a todos os centros de hemodiálise e suas equipes médicas pela colaboração assim como a todos os pacientes que concordaram em participar deste estudo. Agradecemos também aos professores pesquisadores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia. Este estudo foi financiado pelo CNPq (Ministério da Ciência e Tecnologia) e FIPE (Hospital de Clínicas de Porto Alegre).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AFZAL AR, HAND M, PEREIRA ET, MALIK AS, TAYLOR R, JEFFERY S. Novel mutations in the 3' region of the polycystic kidney disease 1 (*PKDI*) gene. Hum Genet; 105 (Suppl 6): 648-53, 1999.
2. POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE FOUNDATION. Disponível em <http://www.pkdcure.org>
3. PARFREY PS, BEAR JC, MORGAN JC, *et al.* The diagnosis and prognosis of autosomal dominant polycystic kidney disease. N Engl J Med; (Suppl 323):1085-90, 1990.
4. SESSO R, ANÇÃO MS, MADEIRA AS. Aspectos Epidemiológicos do Tratamento Dialítico na Grande São Paulo. Revista da Associação Médica Brasileira 40(1):10-14, 1994.
5. NUNES A, ROISENBERG I, PICOLLI E, WEBER R, SATLER F, GRASSELLI F, WAINBERG F, BOHN F, BARROS E. Adult polycystic kidney disease in patients on haemodialysis in the south of Brazil. Nephrol Dial Transplant; (Suppl 18):2686-87, 2003.
6. CALVET JP, GRANTHAM JJ. The genetics and physiology of polycystic kidney disease. Semin Nephrol, Suppl 2:107-23, 2001.
7. BACOLLA A, JAWORSKI A, CONNORS TD, WELLS RD. *PKDI* unusual DNA conformations are recognized by nucleotide excision repair. J Biol Chem 276(21):18597-604, 2001.
8. SESSA A, GHIGGERI GM, TURCO AE. Autosomal dominant polycystic kidney disease: clinical and genetic aspects. J Nephrol 10 (Suppl 6):295-310, 1997.
9. MURCIA NS, WOYCHIK RP, AVNER ED. The Molecular Biology of Polycystic Kidney Disease. Pediat Nephrol 12:721-6, 1998.

10. PARNELL SC, CALVET JP. Phosphorilation of PKD1 protein, polycystin-1. *J Am Soc Nephrol* 8:378A, 1997.
11. PARNELL SC, MAGENHEIMER BS, MASER RL, RANKIN CA, SMINE A, OKAMOTO T, CALVET JP. The polycystic kidney disease-1 protein, polycystin-1, binds and activates heterotrimeric G-proteins in vitro. *Biochem Biophys Res Comm* 251(2):625-31, 1998.
12. QIAN F, GERMINO FJ, CAI Y, ZHANG X, SOMLO S, GERMINO GG. *PKDI* interacts with *PKD2* through a probable coiled-coil domain. *Nat Gen* 16(2):179-83, 1997.
13. TSIOKAS L, KIM E, ARNOULD T, SUKHATME VP, WALZ G. Homo- and heterodimeric interactions between the gene products of *PKDI* and *PKD2*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(13):6965-70, 1997.
14. ROSSETI S, BURTON S, STRMECKI L, HARRIS PC. The Position of the Polycystic kidney Disease 1 (PKD1) Gene Mutation Correlates with the Severity of Renal Disease. *J Am Soc Nephrol* (13):1230-37, 2002.
15. ONG ACM, HARRIS PC. Molecular pathogenesis of ADPKD: The polycystin complex gets complex. *Kidney Int* (67):1234-47, 2005.
16. MAGISTRONI R, HE N, WANG K, ANDREW R, JOHNSON A, GABOW P, DICKS E, PARFREY P, TORRA R, SAN-MILLAN JL, COTO E, VAN DIJK M, BREUNING M, PETERS D, BOGDANOVA N, LIGABUE G, ALBERTAZZI A, HATEBOER N, DEMETRIOU K, PIERIDES A, DELTAS C, ST GEORGE-HYSLOP P, RAVINE D, PEI Y. Genotype-renal function correlation in type 2 autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 14(5):1164-74, 2003.
17. HUMAN GENE MUTATION DATABASE (HGMD). Disponível em <http://uwcmm1s.uwcm.ac.uk>

18. U.S. Renal Data System, USRDS 2005 Annual Data Report: Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2005. Disponível em <http://www.usrds.org/>
19. ROSSETTI S, CHAUVEAU D, WALKER D, MALIK AS, WINEARLS CG, TORRES VE, HARRIS PC. A complete mutation screen of the ADPKD genes by DHPLC. *Kidney Int* (61): 1588-1599, 2002.
20. THOMPSON JD, PLEWNIAK F, POCH O. A comprehensive comparison of multiple sequence alignment programs. *Nucleic Acids Res* (27):2682-2690, 1999.
21. PERAL B, MILLAN, JLS, ONG ACM, GAMBLE V, WARD CJ, STRONG C, HARRIS PC. Screening the 3' Region of the Polycystic Kidney Disease 1 (PKD1) Gene Reveals Six Novel Mutations. *Am J Hum Genet* (58): 86-96, 1996.
22. BADENAS C, TORRA R, MILLÁN JLS. Mutation analysis within the 3' region of the PKD1 gene. *Kidney Int* (55):1225-33, 1999.
23. CHAUVET V, TIAN X, HUSSON H, *et al.* Mechanical stimuli induce cleavage and nuclear translocation of the polycystin-1 C terminus. *J Clin Invest* (114):1433-43, 2004.
24. GUAY-WOODFORD, LM. RIP-ed and ready to dance: new mechanisms for polycystin-1 signaling. *J Clin Invest* (114):1404-06, 2004.
25. QIAN F, BOLETTA A, BHUNIA AK, XU H, LIU L, AHRABI AK, WATNICK TJ, ZHOU F, GERMINO GG. Cleavage of polycystin-1 requires the receptor for egg jelly domain and is disrupted by human autosomal-dominant polycystic kidney disease 1-associated mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(26):16981-6, 2002.
26. TURCO AE, ROSSETTI S, BRESIN E, CORRA S, GAMMARO L, MASCHIO G, PIGNATTI PF. A novel nonsense mutation in the PKD1 gene (C3817T) is associated with autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) in a large three-generation Italian family. *Hum Mol Genet* 4(8):1331-5, 1995.

27. NEOPHYTOU P, CONSTANTINIDES R, LAZAROU A, PIERIDES A, DELTAS CC. Detection of a novel nonsense mutation and an intragenic polymorphism in the PKD1 gene of a Cypriot family with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hum Genet* 98(4):437-42, 1996.
28. PELTOLA P, LUMIAHO A, MIETTINEN R, PIHLAJAMAKI J, SANDFORD R, LAAKSO M. Genetics and phenotypic characteristics of autosomal dominant polycystic kidney disease in Finns. *J Mol Med* 83(8):638-46, 2005.
29. ROSSETI S, STRMECKI L, HARRIS PC, *et al.* Mutation Analysis of the Entire *PKD1* gene: Genetic and Diagnostic Implications. *Am J Hum Genet* (68):46-63, 2001.
30. TSUCHIYA K, KOMEDA M, TAKAHASHI M, *et al.* Mutational analysis within the 3' region of the PKD1 gene in Japanese families. *Mut Res Genomics* (458):77-84, 2001.
31. KIM UK, JIN DK, AHN C, SHIN JH, LEE KB, KIM SH, CHAE JJ, HWANG DY, LEE JG, NAMKOONG Y, LEE CC. Novel Mutations of the PKD1 Gene in Korean Patients With Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Mut Res Genomics* 432(1-2):39-45, 2000.
32. HARRIS, PC, WARD, CJ, PERAL, B, HUGHES, J. Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: molecular analysis. *Hum Mol Genet* (4):1745-1749, 1995.

Tabela 1: Dados demográficos da amostra selecionada.

Característica	N= 50
Idade (anos)	58 ± 11 ¹
Idade de ingresso em hemodiálise (anos)	52±9 ¹
Tempo em hemodiálise (meses)	71±55 ¹
Gênero	
Masculino	52% ²
Feminino	48% ²
Etnia	
Euro-descendentes	68% ²
Afro-descendentes	32% ²
Descendentes asiáticos	0
Comorbidades	
Infecção de trato urinário	75% ²
Hipertensão arterial	55% ²

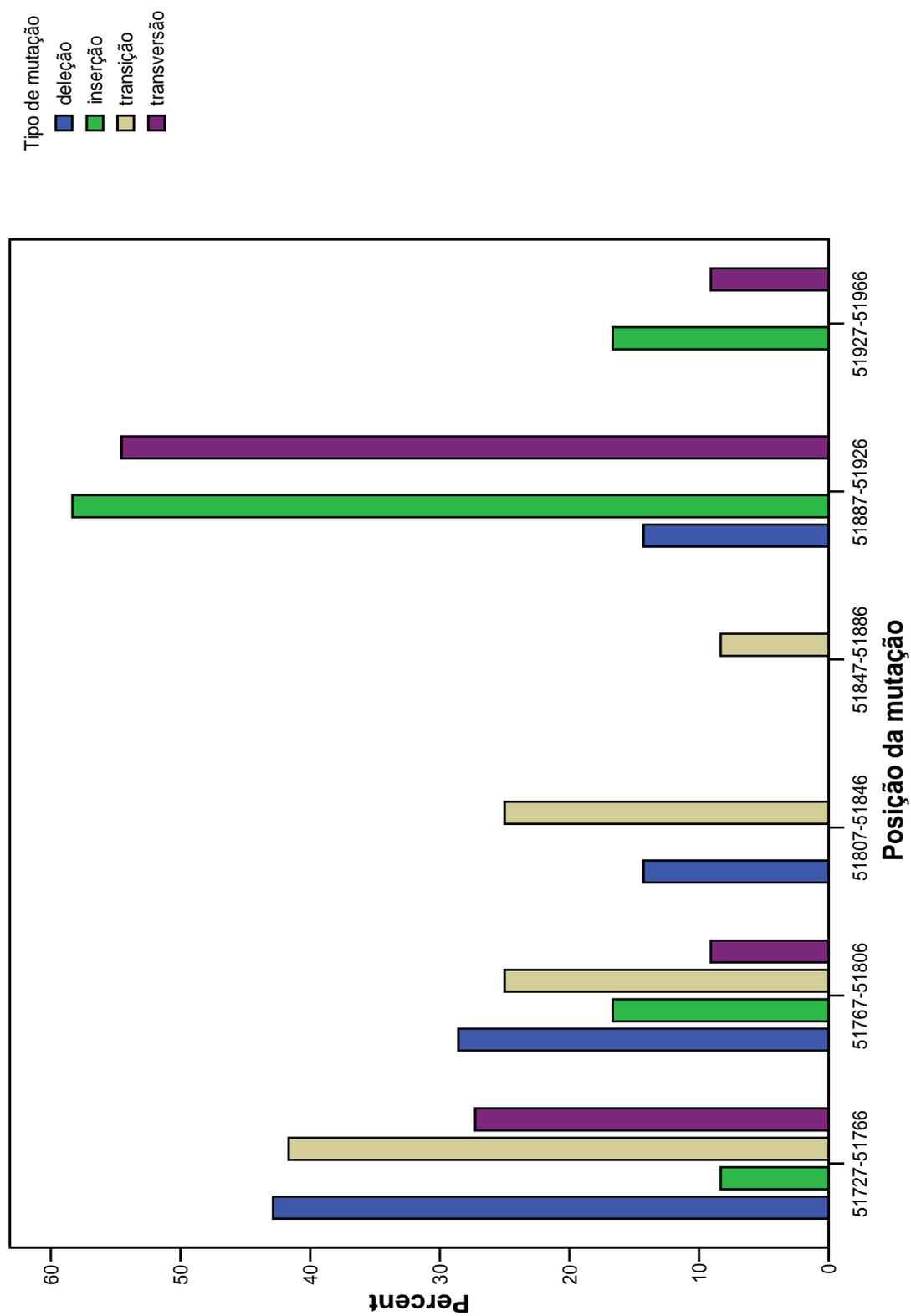
¹Média e desvio padrão (±); ² Porcentagem (%).

Tabela 2: Alterações nucleotídicas encontradas em pacientes com ADPKD.

Paciente	Sexo ¹	Quantidade ²	Posição ³	Alteração	
1	F	1	51742	Inserção	A
2	F	1	51834	Deleção	G→-
3	F	2	51830	Transição	C→T
			51851	Transição	G→A
4	M	1	51846	Inserção	G
5	M	1	51959	Inserção	G
6	M	2	51890	Transição	C→T
			51832	Transversão	G→C
7	M	4	51880	Transição	G→A
			51959	Inserção	G
			51882	Transição	C→T
			51832	Transversão	G→C
8	M	1	51727	Transversão	C→A
9	F	1	51747	Transversão	C→G
			51810	Inserção	T
			51958	Inserção	G
10	F	3	51741	Inserção	G
			51962	inserção	T
			51739	Inserção	G
11	M	2	51855	Transição	A→G
			51959	Transversão	A→T
12	M	1	51960	Transversão	T→G
			51894	Deleção	A→-
			51743	Inserção	A
13	M	3	51759	Inserção	G
			51805	Deleção	C→-
			51823	Transversão	A→C
			51852	Transição	C→T
			51862	Tranversão	A→C
			51871	Inserção	C
			51873	Transição	C→T
			51930	Transição	C→T
			51952	Transversão	G→T
			51898	Transição	G→A
51757	Transversão	G→C			
14	M	2	51838	Transição	A→G
			51841	Deleção	A→-
			51888	Deleção	G→-
			51757	Transversão	G→C
15	M	3	51837	Transversão	A→C
			51844	Deleção	A→-
			51757	Transversão	G→C
16	F	10	51809	Deleção	C→-
			51817	Transição	C→T
			51820	Transversão	A→C
			51824	Deleção	C→-
			51830	Transversão	A→C
			51833-51834	Deleção	CC→--
			51865	Deleção	G→-
51902	Deleção	G→-			
51957	Deleção	G→-			

(1) F = sexo feminino - M = sexo masculino / (2) Número total alterações de nucleotídeos observadas no mesmo paciente / (3) Posição do nucleotídeo mutado no gene *PKDI*.

Figura 1: Distribuição das alterações observadas na sequência de 240pb analisados.



**Mutational screen within 3' region of the *PKD1* gene in Southern
Brazilian polycystic kidney patients**

Vagner Milani¹, Ane Cláudia Fernandes Nunes¹, Renato Moreira Rosa², Nicolas Carlos Hoch², Daiana Benck Porsch³, Cristiane Mattos¹, Liana Rossato¹ e Elvino José Guardão Barros¹.

4. Nephrology Postgraduate Program – Federal University of Rio Grande do Sul. Porto Alegre/RS, Brazil.
5. Biophysics Department – Federal University of Rio Grande do Sul. Porto Alegre/RS, Brazil.
6. Medical Science Postgraduate Program – Federal University of Rio Grande do Sul. Porto Alegre/RS, Brazil.

Mailing:

Vagner Milani

Phone number: + 55-51- 2101-8887

Fax number: + 55-51-2101-8121

Mobile Phone number: +55 -51-8411-2740

E-mail: vagnermilani@yahoo.com.br

Running title: 3'-UTR region of the PKD1 gene in Brazilian patients

Key words: *PKD1* gene/ Mutacional analysis/ Polycystic Kidney Disease / hemodialysis

ABSTRACT

Introduction: Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease ((ADPKD) is one of the most common monogenic nephropathy, with an estimated prevalence of 1/400 to 1/1000 and is responsible for 6%-9% of cases of end-stage renal disease in North America and Europe. Two known genes are responsible for this disease: PKD1 at 16p13.3 and PKD2 at 4q21-23. The PKD1 gene accounts for approximately 85% of cases. The 5' region of PKD1 is reiterated at least five times further proximally on the same chromosome. Only the 3' end region of the gene is single copy. Pathogenic mutations in 3' end region of the PKD1 and PKD2 genes could affect, *in vivo*, the physical interaction and the functional stability of polycystins. To determine the types of mutations in the *PKD1* gene in south-brazilians patients, we performed screening 240pb of a single copy of the 3' region of the gene.

Patients and Methods: This study was conducted in five different regions of Rio Grande do Sul state (10 cities) by a search on medical records of hemodialysis centers. Mutations were analyzed based on a PCR-direct sequencing method.

Results: Fifty ADPKD patients were included in the study (52% cases were male and 48% female). The mean age was of 58±11 years old and 68% of patients were European descents. The mean age at starting dialytic therapy was of 52±9 years and the time on hemodialysis was of 71±55 months in average. We observed urinary tract infections in 75% of the ADPKD patients and a hypertension prevalence of 55%.

The descriptive mutational analysis of 18 ADPKD patients showed 52 alterations. Fifteen of them were transversion (29%), 13 deletions (25%), 12 insertions (23%) e 12 transition (23%) distributed in 240pb amplified of single copy of the 3' region of the gene (nucleotides 51727-51962). The nucleotide composition of the 240pb analysed in this study is rich in CG pairs and more than 50% of the observed alterations involve this nucleotides.

The GC richness results in a high level of CpG dinucleotides that are know to be hot spots for mutations. The observed data in this study are relevant, being possible describe nucleotide changes in 67% of the analysed samples.

Conclusions: We do not observed new mutations and the reduced sample size of this study is not sufficient to affirm a hot spot presence in the 3' region of PKD1 gene. However, the analysed sequence composition, rich in CG pairs, suggest the existence of an aptitude to alterations in this region, being necessary more studies with a large patients number.

INTRODUCTION

Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease ((ADPKD) is one of the most common monogenic nephropathy, with an estimated prevalence of 1/400 to 1/1000 and is responsible for 6%-9% of cases of end-stage renal disease in North America and Europe [1,2].

There are few studies about the ADPKD epidemiology available in Brazil, with a prevalence of 3.3% among hemodialysis patients in São Paulo state. A recently study showed a prevalence of 7.6% among hemodialysis patients in Porto Alegre, the capital city of Rio Grande do Sul state, in south of Brazil [3,4].

Two known genes are responsible for this disease: PKD1 at 16p13.3 and PKD2 at 4q21-23. The presence of the third locus responsible for this disease is still controversial.

The gene for the most common and severe form of ADPKD, PKD1, accounts for approximately 85% of cases. The 5' region of PKD1 is reiterated at least five times further proximally on the same chromosome. Only the 3' end region of the gene is single copy [5].

This gene extends over ~53 kb of genomic DNA on chromosome 16p13.3 and is divided into 46 exons that encode 14,5kb mRNA, comprising 4.303 amino acids [6].

The PKD1 gene product, polycystin-1 (PC1), is an integral glycoprotein composed of a large extracellular amino-terminal domain including a combination of protein-protein interaction motifs and a G-protein-coupled receptor proteolytic site (GPS), 11 transmembrane domains and a short cytoplasmic C-terminus involved in signal transduction [7]. The cytoplasmic tail contains a coiled-coil motif able to bind polycystin-2 (PC2), the PKD2 gene product, in the signal-transduction pathway, mediating mechanosensory calcium mobilization by function as flow-sensitive mechanosensors in the primary cilium of renal epithelium [8].

ADPKD is its phenotypic variability. Most previous studies have found unclear genotype-phenotype correlations for *PKD1* mutations [9]. Significant inter and intrafamilial phenotypic variation have been described, but no expanding mutation in *PKD1* has been found [10,11].

Mutation screening has proven uniquely difficult in ADPKD because the *PKD1* transcript is large and embedded in a complex duplicated genomic area. To date, at least 212 *PKD1* mutations have been identified and listed in the Human Gene Mutation Database (HGMD) with numerous point mutations, deletions and insertions [12].

To determine the types of mutations in the *PKD1* gene in south-brazilians patients, we performed screening 240pb of a single copy of the 3' region of the gene.

PATIENTS AND METHODS

This study was conducted in five different regions of Rio Grande do Sul state (10 cities) by a search on medical records of hemodialysis centers from December 2001 to December 2005.

The inclusion criteria were polycystic kidney family history and image diagnosis. Patients younger than 30 years old should have no more than two cysts in one of the kidneys; 30 to 59 years old patients should have at least two cysts in each kidney; and patients older 60 years old should have at least four cysts in each kidney [13].

Clinical information, according the medical history before dialysis treatment, also was analyzed as complementary data in these patients: macroscopic hematuria, renal lithiasis, urinary tract infections, hypertension, diverticulosis, hepatic cysts and aneurysm.

This study was approved by the Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (IRB number 0000921). The patients invited to participate were informed about the purposes of the study and individual informed consent was obtained from each subject.

PCR amplification

The DNA samples of the patients were isolated from peripheral blood by salting out method [14]. The PCR was conducted in a total volume of 25µl of the mixture containing 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCL, 1,25 mM dNTP, 1 µM of each primer, 1,5mM MgCl₂, 1 µL DMSO, 1U Taq DNA polymerase and 250 ng of genomic DNA.

Standard 25µl PCR was performed: 4 min at 94°C followed by 30 cycles at 94°C for 60 s, at annealing temperature at 64°C for 60 s, and 72°C for 60 s, with a final elongation step at 72°C for 10 min, in a thermal cycler (Perkin-Elmer). The PCR products were resolved by electrophoresis on 1.2% agarose gels and the targeted size bands were extracted, purified and directly sequenced.

PCR-direct sequencing

Mutations were analyzed based on a PCR-direct sequencing method. *PKD1* gene-specific PCR primers were described by Rossetti *et al.* [15]. The sequences of the oligonucleotides were as follows: 5' CCCGTGGCCCATCCCCGGGCCTGCGG 3' (sense) and 3' TACGTGCAGCCATTCTGCCTGGCCC 5' (anti-sense).

Two aliquots of the product (75-250 ng) was combined with each primer (4,8pmol) for sequencing reactions, analyzed on an ABI PRISM[®]3100 (Applied Biosystems) using

the DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit' (Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase). The results were analyzed by BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm standard deviation (SD). Differences for normally distributed variables were compared by unpaired t-test. Differences between proportions were assessed by χ^2 test with the Yates correction, as needed. Data analyses were performed using the SPSS 8.0 (Statistical Package for the Social Sciences - Inc, Chicago, IL). Statistical significance was established at 5%.

RESULTS

Fifty ADPKD patients were included in the study (52% cases were male and 48% female). The mean age was of 58 ± 11 years old and 68% of patients were European descents. The onset of ESRD is usually observed in the third decade in patients suffering from renal diseases. The mean age at starting dialytic therapy was of 52 ± 9 years and the time on hemodialysis was of 71 ± 55 months in average. We observed urinary tract infections in 75% of the ADPKD patients and a hypertension prevalence of 55%. Main characteristics of the autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) population are shown in table 1.

The descriptive mutational analysis of 18 ADPKD patients showed 52 alterations. Fifteen of them were transversion (29%), 13 deletions (25%), 12 insertions (23%) e 12 transition (23%) distributed in 240pb amplified of single copy of the 3' region of the gene (nucleotides 51727-51962).

The data of 18 ADPKD patients (61% male and 39% female) sequenced showed a mean age of 60 ± 8 years old. Furthermore, the mean age at starting dialytic therapy was of 54 ± 9 years and the time on hemodialysis was of 48 ± 39 months in average.

The changes observed are described in table 2 and the distribution of alterations found is showed in figure 1.

Two regions showed elevated number of distinct alterations (figure 1). The first covers the interval between the nucleotides 51727 and 51846 (119 pb) where the most prevalent changes are deletions (43%) and transitions (42%); The second region, that cover the interval between the nucleotides 51887 and 51966 (79 pb), showed insertions (58%) and transversions (55%).

We observed that 40% of transversions were C→G and 58% of transitions were C→T. Furthermore, in the observed deletions, 38% were C and G nucleotides and the most common insertion was the G nucleotide (58%). In the sample 18 we found a double deletion (position 51833-51834). This sample showed a total of 10 alterations, with 7 deletions, (3 guanine and 4 cytosine), 2 transversion e one transition. This patient has 58 years old, female caucasian and has been undergoing hemodialysis since the age of 50 years. Besides polycystic kidney disease and hypertension this patient has none associate co-morbidity.

The sample 15 is other case with 10 alterations, however more variable, with one deletion and one insertion of cytosine, 4 transversions, being two A→C and 4 transitions, where 3 of them are C→T. This patient with 70 years old, female Caucasian, show a similar clinic presentation like the sample 18, polycystic kidney disease and hypertension associated, besides hepatic cysts and undergoing hemodialysis since the age of 68 years

old, showing up the clinical variability of this disease, regardless of the kind of presented alterations.

DISCUSSION

Although several studies have been published defining the range of mutations in the *PKD1* and *PKD2* genes in patients with ADPKD, this is the first study to report genotypes alterations in ADPKD patients from a single geographical region in South of Brazil.

The importance of study the 3' UTR is justified by the probable coiled-coil structure within the C terminus of the PKD1 gene product. It is known that these domains in other proteins may form multimeric complexes with both coiled-coil and noncoiled-coil structures [8,15]. Furthermore, only the 3' end region of the gene is single copy [5]. In fact, the observed data in this study showed a considerable nucleotide alterations variability, just described before by others authors [16,17,18].

There is a consensus that the phenotypic variability in ADPKD is caused by PKD1 and PKD2 interactions. This allelic heterogeneity might influence renal disease severity modifying factors involved in epithelial cell differentiation and proliferation in normal renal tubule morphogenesis [19].

The intracellular carboxyl terminus of polycystin 1 harbors a coiled-coil domain that is involved in physical interaction with polycystin 2 to function as an ion channel in the plasma membrane. Pathogenic PKD1 mutations with premature termination of the peptide chain in their C-terminus lost their ability to sense Ca²⁺ [20].

Chaveut *et al.* showed that polycystin-1 undergoes a cleavage that releases its C-terminal tail (CTT), suggesting that this protein might participate in a series of successive cleavages resembling the multiple proteolytic events described for the RIP mechanism. The cleavage occurs *in vivo* in association with alterations in mechanical stimuli. The CTT

fragment of polycystin-1 (~200 amino acids) enters the nucleus, where it acts directly as a modulator of gene expression, bypassing adaptor proteins and kinase/phosphatase cascades [21, 22].

Pathogenic mutations in 3' end region of the PKD1 and PKD2 genes could affect, *in vivo*, the physical interaction and the functional stability of polycystins. However, it was difficult to define if the nucleotide changes detected are mutations, polymorphisms or only variants without functional significance.

In our study, of 13 deletions found, five are guanines and five cytosines. Although sample 18 had presented a high number of deletions, may not be relevant to the clinical features of the patient. Clinical manifestations may be dependent on the variations that occur during somatic events.

Of the transitions, the majority of them are C→T. Three transitions are G→A and two A→G.

Was not observed differences related about ethnic composition of the sample. The majority of patients evaluated in this work descend from European ethnic groups (68%).

Others 32% of the sample was identified like Afro-descendants and none Asiatic patient was found. The lack of significance could be attributed by the likeness between the genome standard model in GenBank and the ethnic distribution of our population. Others analysis, in the same target-region of this study, is just published in different Caucasians populations (European and North Americans), besides Asiatic groups (Japanese and Koreans) [18,23,24,25,26]. In the same way, we not found differences between this groups and our sample.

The nucleotide composition of the 240pb analysed in this study is rich in CG pairs and more than 50% of the observed alterations involve this nucleotides. Many mutations

can occur isolated in a determined gene. However, there are some sites where the probability of a mutational event occurrence is higher than the expected for an aleatory distribution [17,27]. The GC richness results in a high level of CpG dinucleotides that are known to be hot spots for mutation because the methylated cytosine is susceptible to spontaneous deamination to thymine.

We observed a considerable number of C→G alterations (40%) within the transversions and C→T alterations (58%) within the transitions. The most frequent deletions involve the cytosine (38%) and guanine (38%) nucleotides and the most common kind of insertion was the guanine nucleotide (58%). Even though we cannot affirm a hot spot existence in this region, we have considered the fact that the frequent alterations involve the GC nucleotides.

Other studies in the same region and in other populations could collaborate in this hypothesis elucidation. The observed data in this study are relevant, being possible to describe nucleotide changes in 67% of the analysed samples, even though considering a small DNA portion and a reduced number of evaluated individuals.

We do not observe new mutations and the reduced sample size of this study is not sufficient to affirm a hot spot presence in the 3' region of PKD1 gene. However, the analysed sequence composition, rich in CG pairs, suggests the existence of an aptitude to alterations in this region, being necessary more studies with a large patients number.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank all ADPKD patients who participated and donated blood samples for the study. We also thank staff members of the hemodialysis centers, as well as MD professors of the Nephrology Postgraduate Program. This work was supported by the CNPq (Science and Technology Ministry) and FIPE (Clinical Hospital of Porto Alegre - Federal University of Rio Grande do Sul).

REFERENCES

1. AFZAL AR, HAND M, PEREIRA ET, MALIK AS, TAYLOR R, JEFFERY S. Novel mutations in the 3' region of the polycystic kidney disease 1 (*PKDI*) gene. Hum Genet; 105 (Suppl 6): 648-53, 1999.
2. POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE FOUNDATION. Disponível em <http://www.pkdcure.org>
3. SESSO R, ANÇÃO MS, MADEIRA AS. Aspectos Epidemiológicos do Tratamento Dialítico na Grande São Paulo. Revista da Associação Médica Brasileira 40(1):10-14, 1994.
4. NUNES A, ROISENBERG I, PICOLLI E, WEBER R, SATLER F, GRASSELLI F, WAINBERG F, BOHN F, BARROS E. Adult polycystic kidney disease in patients on haemodialysis in the south of Brazil. Nephrol Dial Transplant; (Suppl 18):2686-87, 2003.
5. CALVET JP, GRANTHAM JJ. The genetics and physiology of polycystic kidney disease. Semin Nephrol, Suppl 2:107-23, 2001.
6. SESSA A, GHIGGERI GM, TURCO AE. Autosomal dominant polycystic kidney disease: clinical and genetic aspects. J Nephrol 10 (Suppl 6):295-310, 1997.
7. MURCIA NS, WOYCHIK RP, AVNER ED. The Molecular Biology of Polycystic Kidney Disease. Pediat Nephrol 12:721-6, 1998.

8. QIAN F, GERMINO FJ, CAI Y, ZHANG X, SOMLO S, GERMINO GG. *PKD1* interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain. *Nat Gen* 16(2):179-83, 1997.
9. ROSSETI S, BURTON S, STRMECKI L, HARRIS PC. The Position of the Polycystic kidney Disease 1 (PKD1) Gene Mutation Correlates with the Severity of Renal Disease. *J Am Soc Nephrol* (13):1230-37, 2002.
10. ONG ACM, HARRIS PC. Molecular pathogenesis of ADPKD: The polycystin complex gets complex. *Kidney Int* (67):1234-47, 2005.
11. MAGISTRONI R, HE N, GABOW P, DICKS E, PARFREY P, TORRA R, SANMILLAN JL, PETERS D, BOGDANOVA N, DEMETRIOU K, PIERIDES A, RAVINE D, PEI Y. Genotype-renal function correlation in type 2 autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 14(5):1164-74, 2003.
12. HUMAN GENE MUTATION DATABASE (HGMD). <http://uwcmml1s.uwcm.ac.uk>
13. U.S. Renal Data System, USRDS 2005 Annual Data Report: Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2005. <http://www.usrds.org/>
14. LAHIRI DK & NURBERGER JI. A rapid Non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLPs studies. *Nucleic Acids Res* 19:5444. 1991.

15. ROSSETTI, S, CHAUVEAU, D, WALKER, D, MALIK, SA, WINEARLS, CG, TORRES, VE, HARRIS, PC. A complete mutation screen of the ADPKD genes by DHPLC. *Kidney Int* 61:1588-1599.2002.
16. BADENAS C, TORRA R, SAN MILLÁN JL, LUCERO L, MILÀ M, ESTIVILL X, DARNELL A. Mutation analysis within the 3' region of the PKD1 gene. *Kidney Int* 55:1225-33, 1999.
17. PERAL B, MILLAN, JLS, ONG ACM, GAMBLE V, WARD CJ, STRONG C, HARRIS PC. Screening the 3' Region of the Polycystic Kidney Disease 1 (PKD1) Gene Reveals Six Novel Mutations. *Am J Hum Genet* (58): 86-96, 1996.
18. TSUCHIYA K, KOMEDA M, TAKAHASHI M, YAMASHITA N, CIGIRA M, SUZUKI T, SUZUKI K, NIHEI H, MOCHIZUKI T. Mutational analysis within the 3' region of the PKD1 gene in Japanese families. *Mut Res Genomics* 458:77-84, 2001.
19. SNAREY A, THOMAS S, SCHNEIDER MC, GERMINO GG, HARRIS PC, REEDERS, FRISCHAUF AM. Linkage Disequilibrium in the region of the Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease gene (PKD1). *Am J Hum Genet* 55:365-371, 1994.
20. DELMAS P, PADILLA F, OSORIO N, COSTE B, RAOUX M, CREST M. Polycystins, calcium signaling, and human diseases. *Bioch and Biophys Res Com* 322:1374–1383, 2004.
21. CHAUVET V, TIAN X, HUSSON H, *et al.* Mechanical stimuli induce cleavage and nuclear translocation of the polycystin-1 C terminus. *J Clin Invest* (114):1433–43, 2004.

22. GUAY-WOODFORD, LM. RIP-ed and ready to dance: new mechanisms for polycystin-1 signaling. *J Clin Invest* (114):1404–06, 2004.
23. TURCO AE, ROSSETTI S, BRESIN E, CORRA S, MASCHIO G, PIGNATTI PF. A novel nonsense mutation in the PKD1 gene (C3817T) is associated with autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) in a large three-generation Italian family. *Hum Mol Genet* 4(8):1331-5, 1995.
24. NEOPHYTOU P, CONSTANTINIDES R, LAZAROU A, PIERIDES A, DELTAS CC. Detection of a novel nonsense mutation and an intragenic polymorphism in the PKD1 gene of a Cypriot family with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hum Genet* 98(4):437-42, 1996.
25. PELTOLA P, LUMIAHO A, MIETTINEN R, PIHLAJAMAKI J, SANDFORD R, LAAKSO M. Genetics and phenotypic characteristics of autosomal dominant polycystic kidney disease in Finns. *J Mol Med* 83(8):638-46, 2005.
26. KIM UK, JIN DK, AHN C, SHIN JH, LEE KB, HWANG DY, LEE JG, NAMKOONG Y, LEE CC. Novel Mutations of the PKD1 Gene in Korean Patients With Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Mut Res Genomics* 432(1-2):39-45, 2000.
27. HARRIS, PC, WARD, CJ, PERAL, B, HUGHES, J. Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: molecular analysis. *Hum Mol Genet* (4):1745-1749, 1995.

Table 1 - Main characteristics of the Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease patients.

No. of patients	N= 50
Mean age (years)	58 ± 11 ¹
Mean age at hemodialysis treatment (years)	52±9 ¹
Time on hemodialysis (months)	71±55 ¹
Gender	
Male	52% ²
Female	48% ²
Race	
Euro-descendents	68% ²
Afro-descendents	32% ²
Asian- descendents	0
Co-morbidities	
Urinary tract infections	75% ²
Hypertension	55% ²

¹Mean (±) and standard deviation (SD)/ ²Percentage (%).

Table 2: Nucleotide alterations found in ADPKD patients.

Patient	Gender ¹	Quantity ²	Position ³	Alteration	
1	F	1	51742	Insertion	A
2	F	1	51834	Deletion	G→-
3	F	2	51830	Transition	C→T
			51851	Transition	G→A
4	M	1	51846	Insertion	G
5	M	1	51959	Insertion	G
6	M	2	51890	Transition	C→T
			51832	Transversion	G→C
7	M	4	51880	Transition	G→A
			51959	Insertion	G
			51882	Transition	C→T
			51832	Transversion	G→C
8	M	1	51727	Transversion	C→A
9	F	1	51747	Transversion	C→G
			51810	Insertion	T
			51958	Insertion	G
10	F	3	51741	Insertion	G
			51962	Insertion	T
			51739	Insertion	G
12	M	1	51855	Transition	A→G
			51959	Transversion	A→T
			51960	Transversion	T→G
			51894	Deletion	A→-
14	M	2	51743	Insertion	A
			51759	Insertion	G
15	F	10	51805	Deletion	C→-
			51823	Transversion	A→C
			51852	Transition	C→T
			51862	Tranversion	A→C
			51871	Insertion	C
			51873	Transition	C→T
			51930	Transition	C→T
			51952	Transversion	G→T
			51898	Transition	G→A
			51757	Transversion	G→C
16	M	4	51838	Transition	A→G
			51841	Deletion	A→-
			51888	Deletion	G→-
			51757	Transversion	G→C
17	M	3	51837	Transversion	A→C
			51844	Deletion	A→-
			51757	Transversion	G→C
18	F	10	51809	Deletion	C→-
			51817	Transition	C→T
			51820	Transversion	A→C
			51824	Deletion	C→-
			51830	Transversion	A→C
			51833-51834	Deletion	CC→--
			51865	Deletion	G→-
51902	Deletion	G→-			
51957	Deletion	G→-			

(1) F = Female - M = Male / (2) Total number of nucleotide alterations observed in the same patient/ (3) Nucleotide position of the PKD1 gene.

