

ORIGINALES

Análisis mutacional del gen PKD1 en pacientes con poliquistosis renal dominante

M. Ariza, V. Alvarez, S. Sanz de Castro, R. Peces, S. Aguado, J. Alvarez, M. Arias, F. Ortega, M.^ª J. Menéndez y E. Coto

Instituto Reina Sofía de Investigaciones Nefrológicas (Laboratorio de Genética Molecular) y Servicio de Nefrología. Hospital Central de Asturias (Oviedo). Servicio de Nefrología. Hospital Valdecilla (Santander).

RESUMEN

La poliquistosis renal dominante del adulto es una enfermedad genéticamente heterogénea, con la mayoría de las familias presentando ligamiento positivo a marcadores cercanos al gen PKD1, en la región cromosómica 16p13.3. El gen PKD1 codifica una proteína, la poliquistina, implicada en interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular. La mayor parte de la secuencia del gen se encuentra repetida al menos tres veces, con las secuencias homólogas localizadas en 16p13.1, muy próximas a PKD1. Debido a esta duplicación el análisis de las mutaciones en PKD1 en pacientes poliquísticos se limita a su región 3' única, no duplicada.

En nuestro estudio buscamos mutaciones mediante análisis de conformación de hebra sencilla del ADN (SSCP) en el gen PKD1 (exones 35 a 46) en los pacientes de 24 familias con ligamiento al cromosoma 16 (forma clásica de la enfermedad). Aquellos casos que indicaban la presencia de mutaciones fueron secuenciados para definir esta mutación.

En la región analizada, no hallamos ninguna mutación responsable de la enfermedad en las 24 familias. Sin embargo, encontramos dos polimorfismos (C12173T y A12273G), que son muy útiles en el análisis de ligamiento de familias afectadas. El análisis de estos dos polimorfismos, junto con el microsatélite KG8 situado en la región 3' del gen PKD1, nos permitieron definir los haplotipos que segregaban con la enfermedad en cada familia.

Palabras clave: *Poliquistosis renal dominante del adulto. Mutación. Secuenciación. Polimorfismos del ADN.*

MUTATION ANALYSIS OF THE PKD1 GENE IN PATIENTS WITH ADULT DOMINANT POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE

SUMMARY

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is a genetically heterogeneous disease. Most families show a positive linkage to polymorphic markers

Recibido: 16-III-98
En versión definitiva: 19-V-98
Aceptado: 25-V-98

Correspondencia: Dr. Eliecer Coto
Laboratorio de Genética Molecular
Hospital Central de Asturias
33006 Oviedo

around the PKD1 locus, mapped to 16p13.3. The PKD1 gene has been cloned and encodes polycystin, a protein involved in cell-cell and cell-extracellular matrix interaction. Most of the 5'-sequence of PKD1 is reiterated at least three times, with the homologous sequences lying on 16p13.1, proximal to PKD1. As a consequence of this duplication the analysis of PKD1-mutations on ADPKD1-patients has been limited to the 3' non duplicated region.

We searched for mutations by single strand conformation polymorphism (SSCP) at the PKD1 gene (exons 35 to 46) on genomic DNA of patients from 24 ADPKD1 families. Cases showing band shifts were sequenced to define the PKD1-mutation. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) was also performed to determine the presence of large deletions. No mutation responsible for the disease in any of the 24 families was found. However, two common polymorphisms (C12173T and A122736) were found. Both polymorphisms proved to be very useful in linkage analysis in affected families.

Key words: Autosomal dominant polycystic kidney disease. Mutation. DNA-polymorphisms. Linkage analysis.

INTRODUCCION

La poliquistosis renal dominante del adulto afecta aproximadamente a 1 de cada 1.000 individuos, padeciéndola alrededor del 10% de los pacientes en hemodiálisis. Esta enfermedad se caracteriza por la formación de quistes en ambos riñones, quistes que crecen en número y tamaño con la edad y son detectados mediante ecografía¹. Otras alteraciones son quistes en el hígado, hipertensión, y desarrollo de aneurismas.

El análisis del ligamiento en familias afectadas revela la existencia de al menos tres genes implicados en la enfermedad. La mayoría de las familias muestran ligamiento positivo a marcadores cercanos al gen PKD1, en 16p13.3^{2,3}. El gen PKD1 se ha clonado y han sido encontradas mutaciones en varias familias^{4,7}. Un segundo gen, designado como PKD2, se halla en el cromosoma 4q21-23^{8,9}. Este gen está mutado en las familias con ligamiento al cromosoma 4, que representan aproximadamente el 20% de las familias poliquísticas en nuestra población¹⁰. Algunas familias no presentan ligamiento a PKD1 o a PKD2, evidenciando la existencia de al menos un tercer gen implicado en la enfermedad¹¹⁻¹⁵. Varios estudios demuestran que la heterogeneidad genética que caracteriza a esta enfermedad tiene una correspondencia fenotípica, con una clínica más «suave» en los portadores de mutaciones en PKD2, siendo los quistes detectados a edad más tardía en estos que en aquellos con mutaciones en el gen PKD1¹⁶⁻¹⁹.

El gen PKD1, de 46 exones, se extiende sobre 52 kilobases (Kb) de ADN genómico^{4,5}. La proteína PKD1, la poliquistina, tiene un dominio carboxi terminal intracelular corto, 11 dominios transmembrana, y un dominio amino terminal ex-

tracelular largo que estaría envuelto en interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular^{5,20,21}. El transcrito (ARN) completo de PKD1 mide 14.148 bases, y todo él salvo las últimas 3.5 Kb de la región 3' se encuentra replicado al menos tres veces en la región 16p13.1. Estos genes, llamadas HG-A, -b y -C, tienen regiones 3' terminales diferentes a la de PKD1, mientras que sus regiones 5' son un 95% idénticas a la de PKD1⁵. La existencia de secuencias duplicadas dificultó la clonación del gen PKD1, limitando la búsqueda de mutaciones en los pacientes a la región 3' no duplicada del gen. Se han descrito dos tipos distintos de mutaciones en PKD1. Por una parte, mutaciones en la región 3' que afectan a uno o unos pocos nucleótidos y conllevan defectos de procesamiento, mutaciones de parada (codones stop) o cambios de un aminoácido por otro se han hallado en aproximadamente el 10% de las familias^{6,7}. Por otro lado, en algunos pacientes con manifestación de la enfermedad a edad muy temprana, incluso perinatal, se han encontrado deleciones que afectan parcial o totalmente al gen PKD1 y frecuentemente también al gen de la esclerosis tuberosa tipo 2 (TSC2), adyacente al gen PKD1. Estos pacientes están afectados por esclerosis tuberosa²². El gen PKD2 ha sido también caracterizado²³. Este gen codifica una proteína de membrana que funcionaría como un canal para el Ca⁺⁺. En la mayoría de las familias poliquísticas con ligamiento al cromosoma 4 se ha encontrado una mutación responsable de la enfermedad en el gen PKD2^{24,25}.

Para determinar el porcentaje de mutaciones en la región 3' no duplicada del gen PKD1, hemos analizado el ADN genómico de los pacientes de 24 familias de Asturias y Cantabria.

MATERIALES Y METODOS

Familias y análisis del ligamiento. Los miembros de 24 familias con al menos tres pacientes se evaluaron mediante ecografía y el diagnóstico se basó en la presencia de al menos un quiste en un riñón y dos o más quistes en el otro. El ADN de cada individuo se obtuvo siguiendo un procedimiento de precipitación salina²⁶. Se estudiaron dos polimorfismos microsatélites de la región 16p (SM7 y KG8)^{2,4}. KG8 se encuentra en la región 3' del gen PKD1 y SM7 está estrechamente ligado al gen. El análisis del ligamiento a 16p, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los microsatélites fue previamente descrito¹⁸.

Búsqueda de mutaciones. Las parejas de cebadores 1F x 1R a 11F x 11R amplifican la secuencia no replicada entre los exones 35 y 46 del gen PKD1 (tabla 1, fig. 1). Aproximadamente 100 ng de ADN genómico de dos pacientes de las 24 familias se amplificaron en un volumen final de 20 µl, conteniendo 20 pmol de cada pareja de cebadores (tabla 1), 200 µM de cada dNTP, 0,2 µCi ³²P-dCTP (3,000 Ci/mmol, Amersham), 2 mM MgCl₂, buffer de PCR 1 x, y 1 unidad de Taq polimerasa. Las condiciones de amplificación consistieron en un paso inicial de desnaturalización de 5 minutos a 98 °C, seguida de 30 ciclos de 30 segundos a 98 °C, 1 min a la temperatura de cebamiento y 2 min a 75 °C, y una ex-

Tabla 1. Cebadores empleados para amplificar la región 3' no replicada del gen PKD1, exones 35 a 46. La posición de estos cebadores en el gen PKD1 se presenta en la figura 1.

Cebador (5' - 3')	Tamaño del producto de la PCR (bp)
1F TCCAGCACTCCTGGGGAGAA 1R TTCAGTGGCTCCCAGCCGA	398
2F GCTGTGGCTGTGGCTGTCTC 2R CCGGCTCTCTACCAGGGTGTG	276
3F GGTCTTGCTGGAAGC 3R CATGCCATGTAGCCTCTTGACC 4F CATGCTTTTCTGCTGGTGACC 4R GCTCTGGGCTGGACTGGTTC	190
5F CGTGCTGCTGCCCTACGTC 5R CGTCCCCGAGCCATTGTG	561
6F TTCAGCACCAGCGATTACGAC 6R CCTGTTGTCCAGCCAGTTGTG	487
7F AGCTGCACAACCTGGCTGGAC 7R CCGAGGTGAGCAGAGGCAG	352
8F CCGTGTGCCTGCTGCTGTC 8R TCGGCATAATGTCTTGCCAAAG	384
9F CTGACCGCCAGTGACCC 9R GGGGTGACAGGTGCCAGGAC	456
10F TCTACCCTGTGTCCTGCCGAG 10R GGGAGGGCTCAGGCTCACAC	572
11F TCCGCTTTGAAGGGATGGAG 11R CAGGCGGCTGGGCAGTG	652
PDF CGCCAAGTGGTCCGTCTTTG HHR AGGAACAACCTCCACCATCTCGTAG	394
	497

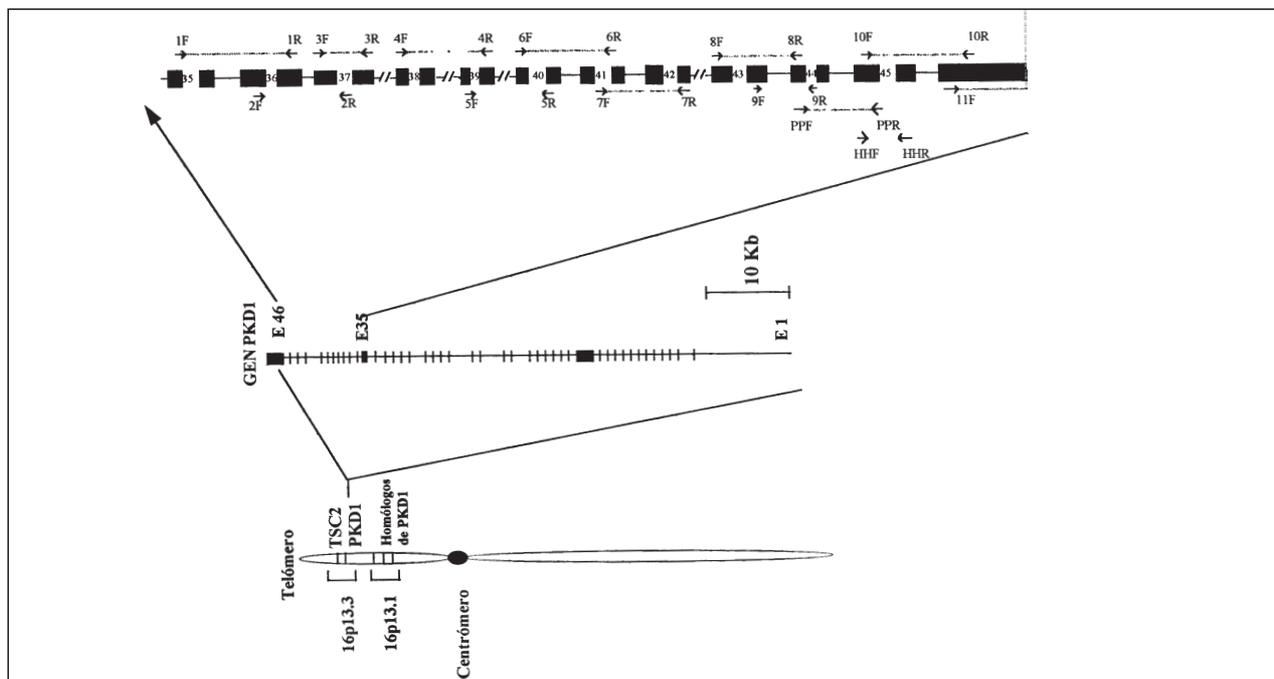


Fig. 1.—Haplotipos definidos por los polimorfismos C12173T, A12273G y KG8 en una familia poliquística. La enfermedad se hereda con el cromosoma definido por los alelos 12173:T-12273:G-KG8:1.

tensión final de 72 °C durante 5 min. El polimorfismo de conformación de hebra sencilla (SSCP) se analizó según el método original de Orita y cols.^{27,28}. En breve, se añadió solución desnaturalizante de formamida (100 µl) a cada PCR, se calentó a 98 °C durante 5 min y 3 µl fueron cargados inmediatamente en un gel del 6% de poliacrilamida-10% glicerol, de 60 cm de largo. La electroforesis fue a 20 W de 6 a 12 horas, tras la cual los geles fueron secados y autorradiografiados de 12 a 48 horas.

Aquellos casos mostrando bandas electroforéticas «anómalas» en el SSCP fueron secuenciados. Para ello, amplificamos 200 ng de ADN genómico en un volumen de 50 µl conteniendo 50 pmol de cada par de cebadores, 0,2 mM de cada dNTP, 2 mM de MgCl₂, buffer de PCR 1 x y 2 unidades de Taq polimerasa (Gibco-BRL).

Las condiciones de amplificación fueron las mismas que en el análisis de SSCP. Los fragmentos con el tamaño correcto se purificaron y se secuenciaron directamente según el método de Sanger, empleando sequenasa versión 2.0 (USB Biochemicals).

Análisis de los polimorfismos de PKD1. Hallamos dos polimorfismos en el exón 45 (C12173T y A12273G) que afectan a secuencias de restricción para los enzimas Ava II y Bsp 1286I. Para analizar estos polimorfismos en controles y miembros de las familias ADPKD amplificamos ADN genómico con

los cebadores PPF y HHR (C12173T), ó 10 F y HHR (A12273G) (tabla 1). Diez µl de la PCR se dirigieron con Avall o con BSP1286I (Boehringer Mannheim) y se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 4%. El gel fue teñido con bromuro de etidio y fotografiado definiendo el genotipo de cada individuo.

RESULTADOS

El análisis con los microsatélites del cromosoma 16 sobre las 24 familias afectadas por poliquistosis renal dominante del adulto mostró en todas un ligamiento positivo a esta región del genoma, por lo que estarían afectadas por la forma clásica y las mutaciones en el gen PKD1 serían las responsables de la enfermedad.

El ADN genómico de dos pacientes de cada una de las 24 familias se amplificó (PCR) con parejas de cebadores que cubrían la secuencia de PKD1, exones 35 a 46 y realizamos el análisis SSCP para determinar la presencia de mutaciones implicando a uno o unos pocos nucleótidos. Observamos dos patrones diferentes para el exón 45, pero obtuvimos los mismos patrones electroforéticos tanto en pacientes como en controles sanos, sugiriendo que las diferencias en la secuencia se debían a polimorfismos del ADN, no relacionados con la enfermedad (fig. 2).

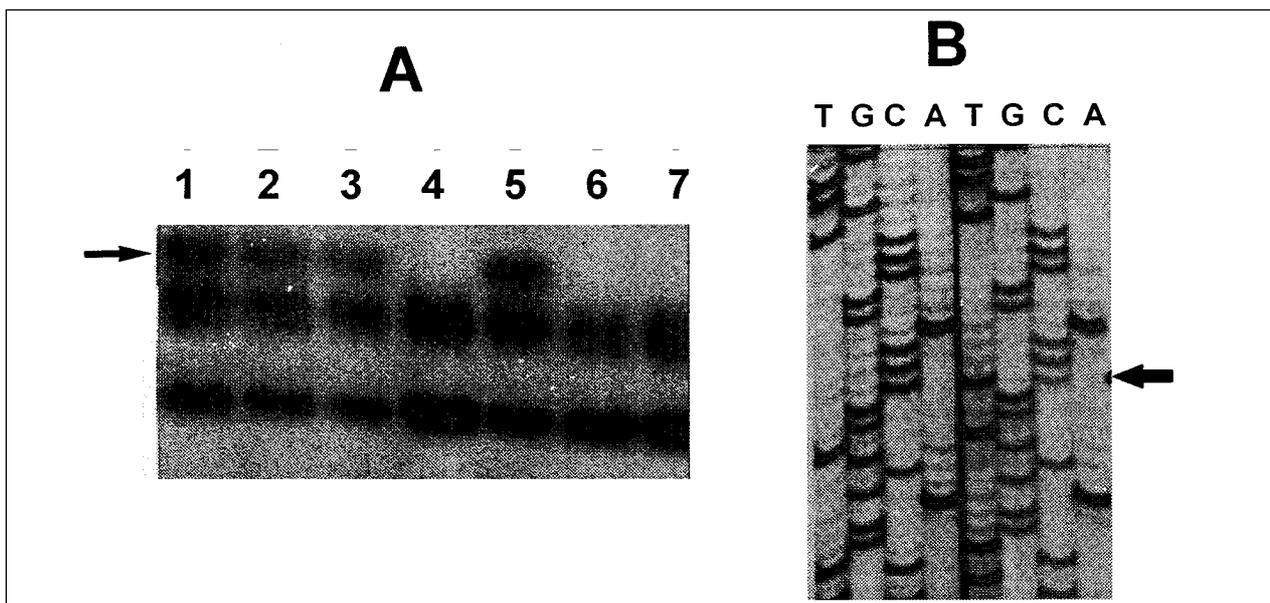


Fig. 2.—Posición de los genes PKD1, TSC2 y los tres homólogos de PKD1, en el brazo corto del cromosoma 16. Estructura éxon-intrón del gen PKD1, indicando las parejas de cebadores usados para amplificar la secuencia genómica de PKD1 (exones 35 a 46). Las barras gruesas negras representan los exones.

Secuenciamos el producto de la PCR de varios casos para determinar los cambios de nucleótido responsables del diferente patrón en el SSCP. Una de las diferencias correspondía a un cambio de C a T en el nucleótido 12173, determinando que el aminoácido 4058 fuese alanina o valina. El otro cambio era de A por G en el nucleótido 12273, una mutación «silenciosa» (alanina en posición 4091). En los dos casos encontramos las dos variantes en pacientes y controles sanos, siendo por tanto dos polimorfismos del gen PKD1. Los polimorfismos C12173T y A12273G afectan a sitios de restricción para *Avall* y *Bsp1286I*, respectivamente. Para analizar ambos polimorfismos en los miembros de las familias y en 50 controles sanos amplificamos y digerimos el fragmento conteniendo los sitios polimórficos, obteniendo en los dos casos los tres genotipos. Las frecuencias génicas se estimaron en 0,95 (C-12173) y 0,05 (T-12173), y 0,65 (A-12273) y 0,35 (G-12273). La figura 3 representa el análisis del polimorfismo A12273G en una de nuestras familias. En la figura 4 representamos un análisis familiar con los tres polimorfismos, C12173T, A12273G y KG8.

Aparte de los dos polimorfismos genéticos descritos, en ninguna de las 24 familias analizadas identificamos mutaciones responsables de la enfermedad en la región analizada del gen PKD1, lo que sugiere que estas se hallan en la región 5' del gen.

DISCUSIÓN

Cuatro genes homólogos, designados como PKD1, HG-A, HG-B y HG-C, han sido hallados en el hombre, y los cebadores para los exones 1 a 35 de PKD1 amplifican además estas secuencias, haciendo así complicada la búsqueda de mutaciones en esta región duplicada. Sólo usando cebadores específicos de PKD1, que no amplifiquen los genes homólogos, es posible un análisis de mutaciones, pero esto sólo es posible en la región 3' del gen, exclusiva de PKD1. No encontramos mutaciones en el gen PKD1 (exones 36 a 45) en los pacientes de ninguna de las 24 familias, pero sí hallamos dos polimorfismos, descritos también en otras poblaciones europeas²⁹⁻³¹. La frecuencia de los alelos de estos polimorfismos hallada en nuestra población es similar a la descrita en las otras poblaciones. Sin embargo, el porcentaje de heterocigotos para el polimorfismo A12273G es mayor en nuestra población que en las otras, lo que hace de este un marcador genético especialmente útil para los análisis familiares de ligamiento en nuestras familias poliquísticas.

Es posible que alguna mutación en alguno de nuestros pacientes no haya sido detectada median-

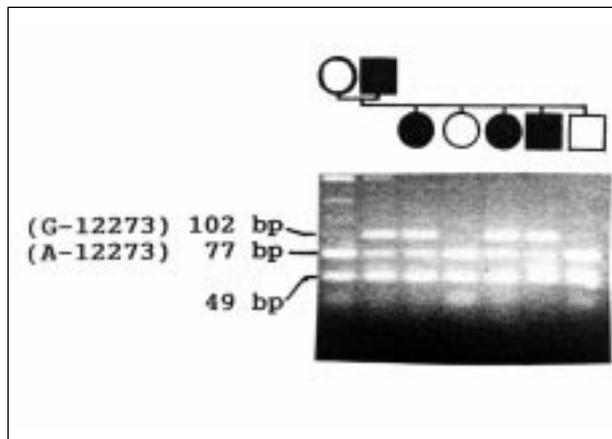


Fig. 3.—Análisis del polimorfismo A12273G en una familia poliquística. En esta familia la enfermedad segrega con el alelo 12273G, estando afectada por la forma clásica de la enfermedad.

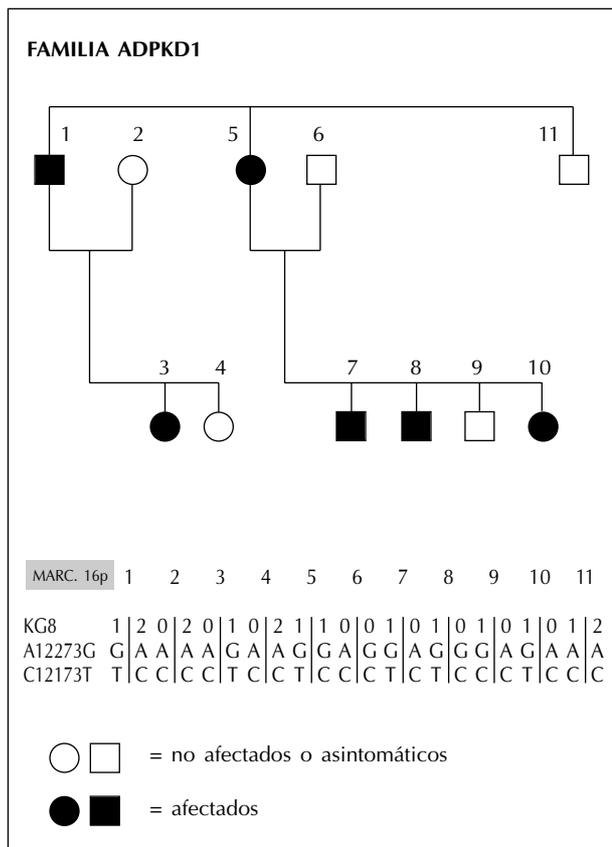


Fig. 4.—A: SSCP del exón 45 mostrando los diferentes patrones electroforéticos correspondientes al polimorfismo C o T en el nucleótido 12173 de la secuencia de PKD1, en pacientes (líneas 1 a 4) y controles sanos (líneas 5 a 7). La fecha indica la banda autorradiográfica del fragmento con C en la posición 12173. B: Secuenciación directa del exón 45 en un individuo homocigoto (C/C) para el polimorfismo C12173T y en un heterocigoto (C/T) para este polimorfismo.

te SSCP, una técnica cuya capacidad para detectar cambios de nucleótidos está limitada por varios factores, tales como el tamaño de los fragmentos amplificados o las condiciones electroforéticas. Sin embargo, anteriormente hemos utilizado esta técnica bajo condiciones similares buscando mutaciones en otros genes, tales como los supresores de tumores p53 y p16, encontrando una correlación total entre las mutaciones detectadas por SSCP y la incidencia real determinada por secuenciación directa²⁸. La ausencia de mutaciones mediante SSCP en la región no duplicada representaría una frecuencia muy baja de mutaciones en esta región PKD1. Un análisis reciente de parte de la región duplicada, exones 21 a 35, también mostró una tasa muy baja de mutaciones, sugiriendo que la mayoría de las mutaciones en el gen PKD1 se hallan en la zona 5' del gen^{6,32}.

Como resultado de un estudio que no mostramos aquí, en el análisis de fragmentos cromosómicos del ADN de nuestros pacientes no hallamos deleciones grandes, de varias kilobases, lo que está de acuerdo con las características clínicas de los pacientes de nuestras familias, quienes mostraron una forma típica adulta de la enfermedad con el desarrollo de síntomas después de la segunda década de vida. Las reordenaciones cromosómicas tales como las translocaciones y grandes deleciones afectando al gen PKD1 se han descrito en pacientes con una forma severa de la enfermedad, manifestándose a una edad temprana. Algunas de estas alteraciones genéticas afectan también al gen TSC2, muy cercano al gen PKD1, mostrando estos pacientes esclerosis tuberosa además de poliquistosis renal²².

Finalmente, hasta ahora la mayoría de las mutaciones halladas en el gen PKD1 lo han sido sólo en una familia, sugiriendo un amplio espectro de mutaciones^{6,32}. La ausencia de una mutación frecuente en el gen PKD1, junto con el enorme tamaño del gen, determina que la búsqueda de una mutación en cada familia requiera un análisis exón por exón del gen PKD1. En contraste, para otras enfermedades en las que hay una mutación frecuente el análisis directo de esta es un método rápido, barato y efectivo de caracterizar portadores. La mutación DeltaF en el gen de la fibrosis quística es un ejemplo de esto³³. Los estudios de ligamiento con polimorfismos del ADN siguen siendo el método más eficaz para los estudios familiares y la detección de portadores en las familias poliquísticas. En este sentido, los dos polimorfismos de restricción descritos aquí, junto con el microsatélite KG8 en la región 3' de PKD1, nos permitieron definir en nuestras familias el haplotipo que segregaba con la enfermedad. Basándonos en nuestra experiencia, proponemos el estudio familiar con estos 3 polimorfismos (C12173T,

A12273G y KG8) para definir si una familia padece la forma clásica de la enfermedad, con ligamiento al gen PKD1.

Agradecimientos

Manuela Ariza ha sido beneficiaria de una beca de la Fundación Renal Iñigo Alvarez de Toledo. Nuestro trabajo es subvencionado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (FIS 97/0960).

BIBLIOGRAFIA

1. Bear JC, Parfrey PS, Morgan JM, Martín CJ, Cramer BC: Autosomal dominant polycystic kidney disease: new information for genetic counselling. *Am J Med Genet* 43: 548-553, 1992.
2. Harris PC, Thomas S, Ratcliffe PJ, Breuning MH, Coto E, López-Larrea C: Rapid genetic analysis of families with polycystic kidney disease 1 by means of a microsatellite marker. *Lancet* 338: 1484-7, 1991.
3. Peral B, Ward CJ, San Millán JL, Thomas S, Stallings RL, Moreno F, Harris PC: Evidence of linkage disequilibrium in the Spanish polycystic kidney disease I population. *Am J Hum Genet* 54: 899-908, 1994.
4. The European Polycystic Kidney Disease Consortium: The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 Kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. *Cell* 77: 881-894, 1994.
5. Hughes J, Ward CJ, Peral B, Aspinwall R, Clark K, San Millán JL, Gamble V, Harris PC: The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nature Genet* 10: 151-159, 1995.
6. Peral B, San Millán JL, 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.
7. Turco AE, Rosetti S, Bresin E, Corrà 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: 1331-1335, 1995.
8. Peters DJM, Spruit L, Saris JJ, Tavine D, Pierides A, Brissenden JE, Frants RR, Van Ommen GJB, Breuning MH: Chromosome 4 localization of a second gene for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nature Genet* 5: 359-362, 1993.
9. Kimberling WJ, Kumar S, Gabow PA, Kenyon JB, Connolly CJ, Somlo S: Autosomal dominant polycystic kidney disease: localization of the second gene to chromosome 4q13-23. *Genomics* 18: 467-472, 1993.
10. Mochizuki T, Wu G, Hayashi T, Senophontos SL, Veldhuisen B, Saris JJ, Reynolds DM, Cai Y, Gabow PA, Pierides A, Kimberling WK, 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.
11. 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.
12. De Almeida S, De Almeida E, Peters DJM, Pinto JR, Tavora I, Lavinha J, Breuning MH, Prata MM: Autosomal dominant polycystic kidney disease: evidence for the existence of a third locus in a Portuguese family. *Hum Genet* 96: 83-88, 1995.

M. ARIZA y cols.

13. Bogdanova N, Dworniczak B, Dragova D, Todorov V, Dimitrakov D, Kalinov K, Hallmayer J, Horst J, Kalaydjieva L; Genetic heterogeneity of polycystic kidney disease in Bulgaria. *Hum Genet* 95: 645-650, 1995.
14. Ariza M, Alvarez V, Marín R, Aguado S, López-Larrea C, Alvarez 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.
15. Turco AE, Clementi M, Rossetti S, Tenconi R, Pignatti PF: An Australian family with autosomal dominant polycystic kidney disease unlinked to either the PKD1 or PKD2 gene. *Am J Kidney Dis* 5: 759-761, 1996.
16. Bear JC, Parfrey PS, Morgan J, Cramer BC, McManamon PJ, Gault MH, Churchill DN, Singh M, Hewitt R, Somlo S, Reeders ST: Autosomal dominant polycystic kidney disease: ultrasonographic detection and prognosis of PKD1 and PKD2 forms. *Am J Med Genet* 45: 39-43, 1989.
17. Coto E, Aguado S, Alvarez J, Menéndez MJ, López-Larrea C: Genetic and clinical studies in autosomal dominant polycystic kidney disease type I (ADPKD1). *J Med Genet* 29: 243-246, 1992.
18. Coto E, Sanz de Castro S, Aguado S, Alvarez J, Arias M, Menéndez MJ, López-Larrea C: DNA microsatellite analysis of families with autosomal dominant polycystic kidney disease types 1 and 2: evaluation of clinical heterogeneity between both forms of the disease. *J Med Genet* 32: 442-445, 1995.
19. Ravine D, Walker RG, Gibson WN, Forrest SM, Richards RI, Friend K, Sheffield LJ, Kincaid-Smith P, Danks DM: Phenotype and genotype heterogeneity in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet* 340, 1330-1333, 1992.
20. The American PKD1 Consortium: Analysis of the genomic sequence for the autosomal dominant polycystic kidney disease (PKD1) gene predicts the presence of a leucine-rich repeat. *Hum Mol Genet* 4: 575-582, 1995.
21. Ibraghimov-Beskrovnaya O, Dackowski WR, Foggenstiner L y cols.: 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.
22. Brook-Carter PT, Peral B, Ward CJ, Thompson P, Hughes J, Maheshwar MM, Nellist M, Gamble V, Harris PC, Sampson JR: Deletion of the TSC2 and PKD1 genes associated with severe infantile polycystic kidney disease a contiguous gene syndrome. *Nature Genet* 8: 328-332, 1994.
23. Mochizuki T, Wu G, Hayashi, Xenophontos SI, Veldhuisen B, Saris JJ, Reynolds DM, Cai Y, Gabow PA, Pierides A, Kimberling WK, 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.
24. Schneider MC, Rodríguez AM, Nomur H, Zhou J, Morton CC, Reeders ST, Weremowicz S: A gene similar to PKD1 maps to chromosome 4q22: a candidate gene for PKD2. *Genomics* 38:1-4, 1996.
25. Veldhuisen B, Saris JJ, De Haij S, Hayashi T, Mochizuki RE, Fossdal R, Bogdanova N, Van Dijk MA, 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.
26. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 16: 1215, 1988.
27. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K: Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5: 874-9, 1989.
28. González MV, Pello MF, López-Larrea C, Suárez C, Menéndez MJ, Coto E: Loss of heterozygosity and mutation analysis of the p16 (9p21) and p53 (17p13) genes in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 1: 1043-1049, 1995.
29. Constantinides R, Xenophontos SM, Neophytou P, Nomura S, Pierides A, Constantinou Deltas C: New amino acid polymorphism, Ala/Val 4058, in exon 45 of the polycystic kidney disease 1 gene: evolution of alleles. *Hum Genet* 99: 644-647, 1997.
30. Torra R, Bádenas C, Darnell A, Brú C, Escorsell A, Estivill X: Autosomal dominant polycystic kidney disease with anticipation and Caroli's disease associated with a PKD1 mutation. *Kidney Int* 52: 33-38, 1997.
31. Rossetti S, Bresin E, Restagno G, Carbonara A, Corrà S, De Prisco O, Pignatti PF, Turco AE: Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) in a Italian family carrying a novel nonsense mutation and two missense changes in exons 44 and 45 of the PKD1 gene. *Am J Med Genet* 65: 155-159, 1996.
32. Peral B, Gamble V, Strong C, Ong ACM, 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: 1399-1410, 1997.
33. Coto E, Bousoño C, Menéndez MJ, Cue R, Toral JF, Benavides A, Hernando I, Plasencia A, López-Larrea C: Fibrosis quística en Asturias: elevada frecuencia de la mutación Delta F508. *Medicina Clínica* 103: 681-683, 1994.