Rekomendacje Grupy Roboczej PTN. Zasady postępowania z chorymi na autosomalną dominującą wielotorbielowatość nerek i inne torbielowate choroby nerek: Diagnostyka molekularna i poradnictwo genetyczne w ADPKD

(NEFROL. DIAL. POL. 2018, 22, 91-93)

Recommendations of the PTN working group. Management of autosomal dominant polycystic kidney disease and other cystic kidney diseases: Molecular testing and genetic counseling

(NEPROL. DIAL. POL. 2018, 22, 91-93)

Beata S. LIPSKA-ZIĘTKIEWICZ[1]
Magdalena JANKOWSKA[2]
Marian KLINGER[3]
Jacek RÓŻAŃSKI[4]
Michał NOWICKI[5]
Hanna AUGUSTYNIAK-BARTOSIK[3]
Edyta SZUROWSKA[6]
Marcin MATUSZEWSKI[7]
Iga ZAŁUSKA-LEŚNIEWSKA[8]
Janusz LIMON[9]
Aleksandra ŻUROWSKA[8]
Alicja DĘBSKA-ŚLIZIEŃ[2]

[1]Katedra i Zakład Biologii i Genetyki Medycznej, Pracownia Genetyki Klinicznej, Gdański Uniwersytet Medyczny
Kierownik: dr hab. med. Bartosz Wasąg

[2]Katedra i Klinika Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych, Gdański Uniwersytet Medyczny
Kierownik: Prof. dr hab. med. Alicja Dębska-Ślizień

[3]Klinika Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu,
Kierownik: Prof. dr hab. med. Marian Klinger

[4]Klinika Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych, Pomorski Uniwersytet Medyczny
Kierownik: Prof. dr hab. n. med. Kazimierz Ciechanowski

[5]Klinika Nefrologii, Hipertensjologii i Transplantologii Nerek, Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Kierownik: Prof. dr hab. med. Michał Nowicki

[6]II Zakład Radiologii, Gdański Uniwersytet Medyczny
Kierownik: Dr hab. med. Edyta Szurowska, prof. nadzw. Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

[7]Klinika Urologii, Gdański Uniwersytet Medyczny
Kierownik: Dr hab. med. Marcin Matuszewski, prof. nadzw. Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

[8]Klinika Pediatrii, Nefrologii i Nadciśnienia, Gdański Uniwersytet Medyczny
Kierownik: Prof. dr hab. med. Aleksandra Żurowska

[9]Polska Akademia Nauk, Oddział w Gdańsku

Słowa kluczowe:
• ADPKD
• autosomalna dominująca wielotorbielowatość nerek
• policystyna
• badanie molekularne
• poradnictwo genetyczne

Key words:
• ADPKD
• autosomal dominant polycystic kidney disease
• polycystin
• molecular testing
• genetic counseling

Autorzy nie deklarują konfliktu interesów

Otrzymano: 26.08.2018
Zaakceptowano: 25.09.2018

Wprowadzenie

Autosomalna dominująca torbielowatość nerek (ADPKD) jest ogólnoustrojową chorobą genetyczną, dziedziczoną w sposób autosomalny dominujący. Częstość choroby oceniana jest na 1:400 do 1:1000 żywych urodzeń i jest to najczęstsza choroba genetyczna nerek. Za rozwój choroby odpowiedzialna jest mutacja w jednym z genów dla białek policystyny 1 lub policystyny 2 (*PKD1 lub PKD2*). W pojedynczych przypadkach choroba może powstać w wyniku mutacji także w innych genach (np. *GANAB i DNAJB11*). Wśród osób ze zidentyfikowaną mutacją w ok. 85% przypadków za chorobę odpowiedzialna jest mutacja w genie *PKD1* natomiast za ok. 15% w genie *PKD2.* 5-10% pacjentów ma negatywny wywiad rodzinny, gdyż za rozwój choroby odpowiada mutacja powstała *de novo*. W typowych przypadkach pierwsze objawy ADPKD występują między 30. a 50. rż. Choroba charakteryzuje się dużą zmiennością fenotypową: najwcześniejszą manifestacją kliniczną choroby jest nadciśnienie tętnicze, które może ujawnić się w wieku rozwojowym, a cechą charakterystyczną jest obecność torbielowatości nerek, które ujawniają się w różnym wieku, najpóźniej do 40 r. życia. Postęp choroby polega na systematycznym wzroście objętości nerek, którego najcięższym powikłaniem jest rozwój ich niewydolności. Schyłkowa niewydolność nerek z powodu ADPKD jest obserwowana wyjątkowo u dzieci natomiast w 60 rż. około 50% chorych wymaga leczenia nerkozastępczego. Chorzy z ADPKD stanowią 5-10% populacji dorosłych chorych leczonych nerkozastępczo.

Rozpoznanie ADPKD

Do postawienia ostatecznego rozpoznania wystarczające jest spełnienie kryteriów klinicznych opartych o wywiad rodzinny oraz diagnostykę obrazową, które szczegółowo zostaną przedstawione w osobnych rekomendacjach. Aktualne wytyczne Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) [1], Spanish Working Group for Inherited Diseases [2] oraz KHA-CARI Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease Guideline [3] **nie zalecają** rutynowej diagnostyki molekularnej. Zaleca się, żeby ostateczne rozpoznanie choroby stawiał specjalista nefrolog.

Sytuacje szczególne, których uzasadnione jest wykonanie diagnostyki molekularnej ADPKD

I. Badanie kandydatów na dawców rodzinnych przeszczepów nerek dla pacjentów z ADPKD, u których na podstawie analizy rodowodu nie można wykluczyć obecności choroby, a wykonane badania obrazowe (MRI lub TK u osób poniżej 40 rż.) nie wykazują zmian morfologicznych w nerkach.
II. Diagnostyka różnicowa pacjentów z rozpoznaniem torbielowatej choroby nerek o bardzo wczesnym lub wczesnym początku (okres noworodkowy i wczesnodziecięcy) o nietypowym przebiegu; z negatywnym lub niejednoznacznym wywiadem rodzinnym.
III. Diagnostyka prenatalna i preimplantacyjna. Zgodnie z wytycznymi KDIGO, Spanish Working Group for Inherited Diseases oraz KHA-CARI badanie takie może być wykonane u par z chorobą ADPKD.

Poradnictwo genetyczne

Zaleca się, aby osoby w wymienionych powyżej sytuacjach szczególnych, u których uzasadnione jest wykonanie diagnostyki molekularnej ADPKD, były kierowane do poradni genetycznej. Każdej osobie z nowo postawionym rozpo-

znaniem ADPKD można również zaproponować konsultację w poradni genetycznej. Lekarz specjalista genetyki klinicznej udzieli porady genetycznej, która obejmować będzie ocenę ryzyka zachorowania u innych członków rodziny oraz omówienie dostępnych opcji reprodukcyjnych. Lekarz udzieli również informacji o standardach diagnostyki genetycznej w przypadku chorób o późnym początku, w tym o ograniczeniach badania bezobjawowych nieletnich.

Korelacje pomiędzy genotypem a fenotypem

Pacjenci z mutacjami w genie *PKD1* średnio osiągają schyłkową niewydolność nerek około 20 lat wcześniej niż osoby z mutacjami w genie *PKD2* (58 rż. vs. 80 rż.). Pośród chorych z mutacjami w genie *PKD1*, najbardziej niekorzystne fenotypowo są warianty występujące w części początkowej (5') genu powodujące przedwczesną terminację translacji (ang. *truncating*) prowadzącą do powstania skróconej formy białka [4].

Diagnostyka molekularna

Z uwagi na wielkość, budowę oraz lokalizację genomową *PKD1* i *PKD2*, wykonanie wiarygodnego testu genetycznego jest trudne i powinno być zlecane jedynie certyfikowanym ośrodkom diagnostycznym stosującymi odpowiednie techniki molekularne. Zaleca się wykonanie badania całej sekwencji kodującej genów *PKD1* i *PKD2* dedykowanymi testami diagnostycznymi opartymi o zmodyfikowaną metodę Sangera lub technikę sekwencjonowania nowej generacji (NGS) gwarantującymi odczyty długich fragmentów DNA (por. metodyka badań molekularnych). W przypadku nie stwierdzenia obecności wariantów patogennych (tzw. mutacji punktowych) w drugim etapie zaleca się poszukiwanie dużych rearanżacji genów z zastosowaniem techniki MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) lub mikromacierzy CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) [5-7].

Po określeniu wariantu patogennego u jednego z członków rodziny możliwe jest przebadanie pozostałych jej członków tzw. badaniem celowanym, które jest szybkie i szeroko dostępne.

Materiał do badań molekularnych

Materiałem do badań molekularnych może być krew obwodowa pobrana na EDTA, wymaz z błony śluzowej policzka lub sucha kropla krwi pobrana na bibułę. Przed pobraniem materiału należy skontaktować się z laboratorium wykonującym badanie, w celu ustalenia jaki jest preferowany sposób pobrania, zabezpieczenia i transportu materiału.

Metodyka badań molekularnych

Z uwagi na specyficzną sekwencję początkowych 33 eksonów genu *PKD1*, która jest w 95-97% podobna do sześciu pseudogenów jak i wysoką zawartość fragmentów bogatych w pary GC oraz duplikacji segmentalnych, fragmenty te powinny być zamplifikowane metodą *long-range* PCR, RNA-*Seq* lub w oparciu o odpowiednie celowane techniki NGS (np. *long-read sequencing, single molecule sequencing, sequence capture*). Nie zaleca się wykonywania badań w oparciu o standardowe techniki Sangera, NGS (sekwencjonowanie amplikonów) w tym sekwencjonowania eksomowego (ang. WES) gdyż związane są one z niskim (28-50%) odsetkiem wykrywalności mutacji w regionach duplikacji genu *PKD1* oraz prowadzą do ok. 10% odczytów fałszywie dodatnich.

Nie zaleca się analizy sprzężeń jako metody diagnostycznej ADPKD, gdyż badanie to pozwala jedynie na określenie, która kopia genu została odziedziczona od danego rodzica, nie określa zaś typu wariantu.

Testy genetyczne *'direct-to-consumer'*

Należy przestrzec pacjentów przed możliwością wykonania samodzielnie przez nich testów genetycznych w oparciu o ofertę laboratoriów oferujących diagnostykę z pominięciem porady lekarskiej (ang. *direct-to-consumer*). Pomimo niższej ceny i łatwej dostępności, testy te obarczone są wysokim ryzykiem błędu związanego z nieprawidłową metodyką molekularną i/lub kliniczną.

Ograniczenia diagnostyki molekularnej ADPKD

W 9% przypadków, w rodzinach spełniających kryteria kliniczne choroby, nie udało się dostępnymi metodami zidentyfikować mutacji w genach *PKD1 i PKD2*. Istnieje więc ryzyko, że wynik badania molekularnego będzie negatywny pomimo spełnienia klinicznych kryteriów choroby.

Definicje użytych w tekście pojęć i skrótów:

Badanie molekularne – analiza sekwencji DNA umożliwiająca stwierdzenie obecności wariantów patogennych (dawniej mutacji). Badanie obejmuje: izolację DNA z limfocytów krwi obwodowej lub z wymazu ze śluzówki policzka; testy molekularne, np. PCR, sekwencjonowanie metodą Sangera, NGS; ocenę patogenności stwierdzonych wariantów sekwencyjnych w oparciu o dotychczas opisane mutacje, populacyjne bazy danych i analizy bioinformatyczne (*in-silico*).

MLPA – (ang. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) odmiana reakcji PCR umożliwiająca jednoczasową amplifikację kilkunastu-kilkudziesięciu amplikonów oraz ocenę zmiany liczby kopii poszczególnych fragmentów DNA. Technika dedykowana jest do wykrywania dużych rearanżacji tzn. delecji lub duplikacji całych eksonów a nawet genów.

Mikromacierz CGH – porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy (ang. *array Comparative Genomic Hybridization, aCGH*); technika umożliwiająca jednoczasową analizę całego genomu w poszukiwaniu dużych rearanżacji tzn. duplikacji lub delecji całych genów.

Mutacje *de novo* – pacjent, u którego stwierdzono obecność wariantu patogennego o charakterze *de novo* ma ujemny wywiad rodzinny, a żaden z jego rodziców nie posiada zmutowanej kopii genu.

PKD1 – gen zlokalizowany na chromosomie 16p13.3 zbudowany z 46 eksonów kodujący białko policystynę 1. Białko pełni rolę receptora przezbłonowego i tworzy wraz z policystyną 2 kompleks obecny w tzw. rzęsce pierwotnej. Dotychczas opisano ponad 1200 wariantów patogennych, z których większość (50-70%) występowała w obrębie tylko jednej rodziny (tzw. mutacje prywatne).

PKD2 – gen zlokalizowany na chromosomie 4q22.1 zbudowany z 15 eksonów. *PKD2* koduje białko policystynę 2, pełniącą rolę kanału przezbłonowego i tworzącą kompleks z policystyną 2. Dotychczas opisano ok. 200 wariantów patogennych.

Wariant patogenny – (dawniej: mutacja) zmiana w sekwencji DNA powodująca zmiany w strukturze, budowie lub ilości białka które prowadzą do rozwoju choroby.

Rodowód – analiza wywiadu rodzinnego uwzględniająca stopnie pokrewieństwa oraz zachorowania i zgony występujące w rodzinie.

Podsumowanie:

1. Diagnostyka molekularna ADPKD nie jest konieczna rutynowo do postawienia ostatecznego rozpoznania. Zaleca się, żeby rozpoznanie choroby stawiał specjalista nefrolog na podstawie kryteriów klinicznych i obrazowych.
2. Zaleca się, aby pacjenci wymagający diagnostyki molekularnej oraz wyrażający życzenie uzyskania indywidualnej porady genetycznej byli kierowani do lekarza specjalisty genetyka klinicznego.
3. W szczególnych przypadkach wymagających diagnostyki molekularnej zaleca się wykonanie badania całej sekwencji kodującej genów *PKD1* i *PKD2* metodą Sangera lub techniką sekwencjonowania nowej generacji (NGS) gwarantującymi odczyty długich fragmentów DNA.
4. Znajomość dokładnego podłoża molekularnego choroby w przyszłości może mieć znaczenie przy kwalifikacji pacjentów do grupy o niepomyślnym rokowaniu i/lub do nowych terapii lekowych i badań klinicznych.

Piśmiennictwo

1. **Chapman AB, Devuyst O, Eckardt K-U, Gansevoort R, Harris T. et al:** Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD): Executive summary from a kidney disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference. Kidney Int. 2015; 88: 17-27.
2. **Ars E, Bernis C, Fraga G, Marinez V, Marins J. et al:** Spanish guidelines for the management of autosomal dominant polycystic kidney disease, Nephrol. Dial. Transplant. 2014; 29: 95-105.

3. **Tchan M, Savige J, Patel C, Mallet A, Tong A. et al:** KHA-CARI Autosomal dominant polycystic kidney disease guideline: Genetic Testing for Diagnosis. Semin Nephrol. 2015; 35: 545-549.
4. **Harris PC, Torres VE:** Polycystic kidney disease, autosomal dominant. W: **Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA. et al:** editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2018.
5. **Eisenberger T, Decker C, Hiersche M. et al:** An efficient and comprehensive strategy for genetic diagnostics of polycystic kidney disease. PLoS One. 2015; 10: 116-680.
6. **Patel C, Tchan M, Savige J. et al:** KHA-CARI Autosomal dominant polycystic kidney disease guideline: Genetics and Genetic Counseling. Semin Nephrol. 2015; 35: 550-556.
7. **Lanktree MB, Iliuta IA, Haghighi A, Song X, Pei Y:** Evolving role of genetic testing for the clinical management of autosomal dominant polycystic kidney disease. Nephrol. Dial. Transplant. 2018; 10: 93-261.