



IRO
Institut de Recerca Oncològica



**Centre de Genètica Mèdica i Molecular
Institut de Recerca Oncològica
IDIBELL**

**Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona**

REABSORCIÓ RENAL D'AMINOÀCIDS: ANÀLISI DE MUTACIONS DE
SLC7A9, EL GEN DE CISTINÚRIA DE TIPUS B, I GENERACIÓ D'UN MODEL
MURÍ *KNOCKOUT* DE *Slc7a8*

Mariona Font i Llitjós

Tesi Doctoral

Barcelona, febrer 2005

Memòria de tesi realitzada a l'Institut de Recerca Oncològica per optar al grau de

DOCTORA EN BIOQUÍMICA

PROGRAMA DE DOCTORAT BIOQUÍMICA

BIENNI 1998-2000

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR DE LA UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Presentada per:

MARIONA FONT I LLITJÓS

Vist i plau dels directors:

La doctoranda:

Virginia Nunes Martínez
Centre de Genètica Mèdica i Molecular
Institut de Recerca Oncològica

Mariona Font i Llitjós

Manuel Palacín Prieto
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Universitat de Barcelona

Al meu avi

Els científics s'esforcen per fer possible l'impossible;
els polítics, per fer el possible impossible.

BERTRAND RUSSELL

Agraiments

Aquesta tesi està dedicada a tota la gent que d'una manera o altra m'ha ajudat a realitzar-la, ajudant-me, suportant-me i/o estimant-me.

Primer m'agradaria agrair als meus "jefes" que m'hagin donat l'oportunitat de treballar amb ells. Gracias Virginia por ser una jefa accesible, justa y comprensiva, por darme tanta libertad y confiar en mi trabajo. Y gracias Manuel por haberme transmitido la pasión por la bioquímica en mi primer año de carrera, si no te hubiese tenido de profesor probablemente habría seguido otro camino.

Gràcies al grup de cistinúria, en especial a la doctora Maitetxu, els teus opiacis endògens m'han alegrat els dies. Estàs com una cabra, però m'encantes! Recordo quan treballaves a l'IRO, vas estar amb mi i l'Aïna en els moments més difícils de la meva tesi (i de la vida) i hem compartit penes i alegries en l'escriptura de papers i de la tesi. Aïna, eres la floreta del laboratori, vas revolucionar tot el departament amb el teu encant, i em vas ajudar a suportar els mals moments intra i extralab junt amb la Maitetxu. És una llàstima que deixéssiu l'IRO tan aviat. Us estimo molt a les dues. Gràcies Nònia, per ajudar-me a fer els primers passos al lab. Gràcies també a la Lolilla, la Marisa i la Sandra que han participat en aquesta tesi, i al Sergio, per fer-me més divertit el curs de radioisòtops.

Gràcies als altres Z: El Benja, la Montse, la Laura i el Jesús, per compartir el lab amb mi i sobreviure al meu CAOS. Per tu Benja... "no tinc paraules". Bromes a part, saps que sense tu no hagués estat possible aquesta tesi. Has estat sempre al meu costat, i m'has sabut escoltar i animar com ningú. Et trobaré molt a faltar, doctor Mitocondri. Montse, gràcies pel teu ajut.

Gràcies a tots els insulinos, en especial a la Nuri: ets una crac, em va agradar molt treballar amb tu els primers mesos de la tesi, i també em va molar el viatge a New York amb el nostre primer sou. Espe, Emma, Marta Pineda, Sara i Reini hem coincidit poc però m'alegro d'haver-vos conegut. Reini, gracias por acojernos y hacernos de guía en Munchen. Hans gràcies pels vectors i els bons consells. Gràcies també a la Perla, la Marta Camps, la Manu, el Joan Bertran, el Chipi, el David i el Raül.

Vull agrair a tota la gent del Departament de Genètica de l'IRO que d'una manera o altra ha influït en aquesta tesi, especialment a l'Aubareda, ets un solet de persona, vas reemplaçar les rialles de la Cascante quan va marxar, portes bon rotllo per allà on passes. M'encanta haver-te conegut. Flipi, guapa, m'ha encantat compartir activitats extralaborals amb tu ☺: les classes de sevillanes, els soparets, les vacances a Menorca... David, pajarraco, he rigut molt amb tu, sempre tens una rialla o una paraula d'ànim pels altres encara que ho estiguis passant malament i això s'agraeix molt. A veure quan em transfereixes el gen de l'optimisme. Recorda que tinc proves gràfiques compromeses del viatge a Marsella, que les puc utilitzar en qualsevol moment... Rafa-er pisha qué haríamos sin tus "cuñaos" en las cenas, sin tus "nomtoker!!!", sin tu gracia... Gracias por llevarme de feria, siempre recordaré a Neo. Gràcies també al Paco, la Nadia, les Vanes, la Marga, la Pili i el Joan pels moments compartits.

Gràcies a l'Antònia i la Mara, per la vostra feina. Als "jefes" de Genètica: Conxi, Núria, Mercè, Josep, Tere, Sara, Volpini i Fèlix. A diagnòstic: Loli, Javi, Pere, Jordi, Carol, Helena, gràcies per les vostres extraccions. Isa gràcies pels consells per fer *Southern*s fluorescents. Helena, gràcies per les correccions dels pòsters. A la Mari, per mantenir sempre netes les provetes. Gràcies Bernie, Bego, Nerea, Xavi, Mari, Eva L. Eva P., Raquel, Juanjo, Sandra, Itziar i a totes les persones que han entrat recentment. Edu, me n'alegro que hagi tornat, encara que pel Benja i per mi mai no vas acabar de marxar, sempre cantàvem la teva cançó... Házme el amor, aprisióoooooname!

Vull agrair a tots els CRGs (ex-IRO), en particular a tu Cascante, que vas portar alegria al departament amb les teves rialles i em vas fer companyia durant l'intensiu curs d'animals a la UAB, suposo que recordes els viatges en ferrocarril...

Als meus companys de bioquímica per haver compartit alguns bons moments durant la carrera: Anna Lladó, Vicente, Yoyo, Cris, Neus, Charo, Marta, Anna, Berta i Jordi.

A les companyes de l'institut Sandra, Clara, Joana, Marta i Bea, amb vosaltres vaig compartir les eStones de descans a l'institut, les meves primeres nits per Gràcia, el viatge a Itàlia... espero que continuem fent sopars de tant en tant. Sandra, no puc dir res que ja no t'hagi dit. Ets la més gran amiga, hem passat molts bons moments i alguns mals moments juntes, ets la parella que m'ha durat més... Espero que a l'asil poguem continuar tenint aquestes discussions tant productives mentre fem una partida de domino. Clareta, ara ja no ens veiem gaire, però has estat molt important en la meva vida.

Núria, ets l'amiga més antiga que tinc. Espero que continuem fent les nostres sessions de cinema durant molt de temps. Espero que et vagi bé amb el taller. Oms, Bayà, Adela, Ursi gràcies pels bons moments compartits: festivals, cines, nits, viatges... Oms, tu també ets de les amigues més antigues que tinc, espero que encara que ara ens veiem poc, no deixem mai d'estar en contacte.

AGRAÏMENTS

Sandra, Cabot, Germà, Carlota, Boleda, Martí i mongeta, gràcies per aguantar les crisis “desamoroses” i per compartir pràcticament tots els dimecres d'aquests últims anys que m'han donat tanta “vidilla”. Gràcies també pel fòrum10 de 10, pels cines compartits, pels llibres regalats, per les nits graciesques relaxades.

Natx, no puc dir que em vas ajudar a fer la tesi, perquè el que vas fer és fer-me-la més difícil. Però de tot se'n treuen coses bones, i estic segura que el fet d'haver-te conegut m'ha servit per madurar. A més, he agrair haver pogut compartir tantes nits i bons moments amb el Taverna, el Santi, l'Héctor, l'Arnie, el Vinxente, el Pinxe, el Víctor, i en especial el QQ i l'Ernest. QQ vas tractar-nos com reinetes quan vem venir-te a veure amb la Sandra a Copenhaven i ens vas portar a tot arreu, però recordo amb especial carinyo la nit del Bopa, Stereobar... i el dia que la Sandra ens va ensenyar com es feia *the garrapat position*. Ernest, tu vas ser el més bon confident durant aquella època, em vas escoltar i animar com ningú, no saps com em vas ajudar. Rubén, vull agrair el temps que hem compartit, vas ajudar-me a tirar endavant amb la tesi en moments molt difícils.

A la meva família també els agraeixo tot el que han fet per mi. A tu aviet, que ens va saber educar amb molt amor. Sempre recordaré els estius amb tu i l'àvia a Arbúcies. T'estimaré sempre. Als meus pares, Pep i Anna, vosaltres sou els principals responsables indirectes que fes la tesi. Us agraeixo l'educació que m'heu donat i la dedicació que heu tingut malgrat tenir com a filla una *Rebel sense causa*. Ari, la meva germana virtual, gràcies per compartir els primers anys de les nostres vides, i per donar-me bons consells. A veure quan tornes a casa! A la Roseta i l'Helena gràcies per haver-me cuidat i estimat tant des de petita. Us estimo molt a tots. Gràcies també a la família Font: Jordi, Carmina, Bea, Toni, Xavier, Rosa, Albert, Pere i àvia, i en especial a la tia Josefina, és un plaer conversar amb tu.

Gràcies a l'Isabel i l'Àngel per haver-me acollit a Can Bosc. Francesc, malgrat les dificultats que hem passat des del principi, vull dir-te que ets el millor que m'ha passat mai, i que des que ens coneixem m'has alimentat, com ningú... en tots els sentits;-) T'estimo.

Índex

AGRAÏMENTS	9
ÍNDIX	13
ACRÒNIMS I ABREVIACIONS	21
INTRODUCCIÓ	25
1 EL RONYÓ	27
1.1 ANATOMIA DEL RONYÓ	27
1.1.1 La nefrona	27
1.1.1.1 El corpuscle renal	27
1.1.1.2 El túbul renal	28
1.2 FUNCIONS RENALS	29
1.2.1 Filtració glomerular	30
1.2.2 Reabsorció al túbul renal	30
1.2.2.1 Reabsorció d'aminoàcids al túbul renal	31
2 SISTEMES DE TRANSPORT D'AMINOÀCIDS A MAMÍFERS	32
2.1 CLASSIFICACIÓ SEGONS L'ESTRUCTURA PREDITA	34
2.2 CLASSIFICACIÓ SEGONS EL TIPUS DE TRANSPORT	34
2.3 CLASSIFICACIÓ FILOGENÈTICA	34
3 ELS TRANSPORTADORS HETEROMÈRICS D'AMINOÀCIDS (HAT)	35
3.1 SUBUNITATS PESADES DE TRANSPORTADORS D'AMINOÀCIDS HETEROMÈRICS (HSHAT)	36
3.1.1 rBAT	38
3.1.2 4F2hc	39
3.2 SUBUNITATS LLEUGERES DE TRANSPORTADORS D'AMINOÀCIDS HETEROMÈRICS (LSHAT)	40
3.2.1 LAT-1 (<i>SLC7A5</i>)	42
3.2.2 LAT-2 (<i>SLC7A8</i>)	43
3.2.3 γ^+ LAT-1 (<i>SLC7A7</i>)	44
3.2.4 γ^+ LAT-2 (<i>SLC7A6</i>)	44
3.2.5 b^0+ AT (<i>SLC7A9</i>)	45
3.2.6 xCT (<i>SLC7A11</i>)	45
3.2.7 asc-1 (<i>SLC7A10</i>)	46
3.2.8 asc-2 (<i>Slc7a12</i>)	46
3.2.9 AGT-1 1 (<i>SLC7A13</i>)	47
3.2.10 arpAT (<i>Slc7a14</i>)	47
3.3 CONEIXEMENTS DEL SISTEMA B^0+ -LIKE FINS LA CLONACIÓ DE B^0+ AT	47
3.4 MODEL DE REABSORCIÓ RENAL DE CISTINA I AMINOÀCIDS BÀSICS	48
4 AMINOACIDÚRIES HEREDITÀRIES PRIMÀRIES	49
4.1 LPI	49
4.1.1 Manifestacions clíniques	49
4.1.2 Genètica molecular de la LPI	50
4.2 MALALTIA DE HARTNUP	51
4.2.1 Manifestacions clíniques	51
4.2.2 Genètica molecular de Hartnup	52
4.3 IMINOGLICINÚRIA	52
4.3.1 Manifestacions clíniques	52
4.3.2 Genètica molecular	53
4.4 AMINOACIDÚRIA DICARBOXÍLICA	53
4.4.1 Manifestacions clíniques	53
4.4.2 Genètica molecular	53
4.5 CISTINOSI	53
4.5.1 Manifestacions clíniques	53
4.5.2 Genètica molecular de la Cistinosi	54
5 CISTINÚRIA	54
5.1 HISTÒRIA	54
5.2 ASPECTES CLÍNICS DE LA CISTINÚRIA	55
5.2.1 Heterogeneïtat fenotípica	55

ÍNDEX

5.2.2	Urolitiasi	57
5.2.3	Incidència	57
5.3	GENÈTICA MOLECULAR DE LA CISTINÚRIA	58
5.3.1	Clonació de rBAT	58
5.3.1.1	Mutacions a rBAT en pacients de cistinúria de tipus I	58
5.3.2	Heterogeneïtat genètica: 2 <i>loci</i> per la cistinúria	59
5.3.2.1	Crivellatge del genoma per cercar l'altre gen	59
5.4	ABSORCIÓ RENAL I INTESTINAL DE LA CISTINA I ELS AMINOÀCIDS DIBÀSICS	60
5.5	TRACTAMENT	61
5.6	MODELS ANIMALS DE CISTINÚRIA	62
5.6.1	Models naturals	62
5.6.2	Ratolins <i>knockout</i> dels gens de cistinúria	63
5.6.2.1	knockout de <i>Slc7a9</i>	63
5.6.2.2	knockout de <i>Slc3a1</i>	64
6	GENERACIÓ DE RATOLINS <i>KNOCKOUT</i>	64
6.1	ÚS DE RATOLINS EN EXPERIMENTACIÓ	64
6.2	GENERACIÓ DELS RATOLINS <i>KNOCKOUT</i>	65
6.3	TÈCNICA GENERAL DE DIRECCIONAMENT GÈNIC	66
6.3.1	Cèl·lules ES	66
6.3.2	Freqüència de recombinació homòloga	67
6.3.3	Característiques dels vectors utilitzats	67
6.3.3.1	Vectors d'inserció i reemplaçament	67
6.3.3.2	Marcadors de selecció	68
6.3.3.3	Components addicionals dels vectors diana	68
6.3.3.4	Optimització del vector	69
6.3.4	Optimització del direccionament gènic	69
6.4	FONS GENÈTIC	70
7	MODELS <i>KNOCKOUT</i> DE TRANSPORTADORS D'AMINOÀCIDS	71
OBJECTIUS		73
RESULTATS		77
8	ACOTACIÓ DEL NOU <i>LOCUS</i> DE CISTINÚRIA	79
Recombinant families locate the gene for non-type I cystinuria between markers <i>C13</i> and <i>D19S587</i> on chromosome 19q13.1		79
8.1	IDENTIFICACIÓ D'UN NOU <i>LOCUS</i> DE CISTINÚRIA	85
8.2	ACOTACIÓ DEL <i>LOCUS</i> DE CISTINÚRIA DE TIPUS NO I	85
9	IDENTIFICACIÓ D'UN NOU MEMBRE DE LA FAMÍLIA DE LSHAT	87
Non-type I cystinuria caused by mutations in <i>SLC7A9</i> , encoding a subunit ($b^{0,+}$ AT) of rBAT		87
9.1	CLONACIÓ DEL GEN DE CISTINÚRIA DE TIPUS NO I	95
9.1.1	Cerca de EST	95
9.1.2	Obtenció del cDNA complet de les noves LSHAT per crivellatge d'una llibreria de cDNA de ronyó	96
9.2	ANÀLISI DE MUTACIONS EN PACIENTS DE CISTINÚRIA DE TIPUS NO I	97
9.3	FUNCIÓ DE LA PROTEÏNA $b^{0,+}$ AT	98
10	ANÀLISI DE MUTACIONS A <i>SLC7A9</i>	101
Functional analysis of mutations in <i>SLC7A9</i> , and genotype-phenotype correlation in non-Type I cystinuria		101
10.1	ANÀLISI DE L'ESTRUCTURA GENÒMICA DEL GEN RESPONSABLE DE LA CISTINÚRIA DE TIPUS NO I (<i>SLC7A9</i>)	115
10.2	ANÀLISI DE MUTACIONS: <i>SLC7A9</i> ÉS EL PRINCIPAL GEN CAUSANT DE CISTINÚRIA DE TIPUS NO I	115
10.3	CORRELACIÓ GENOTIP-FENOTIP	115
10.4	ANÀLISI FUNCIONAL DE MUTACIONS A $b^{0,+}$ AT	116
11	LA NOVA CLASSIFICACIÓ DE LA CISTINÚRIA GENÈTICA	119
Comparison between <i>SLC3A1</i> and <i>SLC7A9</i> cystinuria patients and carriers: a need for a new classification		119
New insights into cystinuria: forty new mutations, genotype-phenotype correlation and digenic inheritance causing partial phenotype		129
11.1	CLASSIFICACIÓ GENÈTICA	143

11.2	RESULTAT DE L'ANÀLISI DE MUTACIONS EXHAUSTIU DELS DOS GENS	144
11.2.1	Anàlisi de grans reordenaments de <i>SLC7A9</i> mitjançant <i>Southern blot</i>	147
11.2.2	Anàlisi de grans reordenaments de <i>SLC7A9</i> mitjançant PCR Multiplex semiquantitativa	147
11.2.3	Mutacions de <i>splicing</i> en zones no consens	150
11.3	FREQÜÈNCIES AL·LÈLIQUES	150
11.4	DISTRIBUCIÓ D'AL·LELS DE CISTINÚRIA SEGONS EL FENOTIP I GENOTIP	152
11.5	CORRELACIÓ GENOTIP-FENOTIP	152
11.5.1	La dupE5-E9 de <i>SLC3A1</i> va associada a fenotip no I en la majoria dels heterozigots	152
11.5.2	Onze mutacions de <i>SLC7A9</i> mostren fenotip I en heterozigots	153
11.5.3	Excreció d'aminoàcids a l'orina en pacients de cistinúria segons el genotip i el fenotip	153
11.5.4	Herència digènica que provoca un fenotip parcial en dues famílies de cistinúria	154
12	RESUM MUTACIONS	156
12.1	DESCRIPCIÓ DE LES NOVES MUTACIONS TROBADES A <i>SLC7A9</i> PER L'ICC	159
12.2	DESCRIPCIÓ DE LES NOVES MUTACIONS TROBADES A <i>SLC3A1</i> EN PACIENTS ESPANYOLS	162
12.3	ESTUDIS DE RNA EN ELS PACIENTS	163
12.4	MUTACIONS DE <i>SPLICING</i> FORA DELS LLOCS CONSENS	164
13	POLIMORFISMES IDENTIFICATS EN ELS PACIENTS ESPANYOLS	166
13.1	POLIMORFISMES EXÒNICS I INTRÒNICS DE <i>SLC7A9</i>	166
13.2	ESTUDI DE MUTACIONS DEL PROMOTOR DEL GEN <i>SLC7A9</i>	168
14	ALTRES GENS CANDIDATS DE CISTINÚRIA (ASC-1, LAT-2)	171
14.1	Asc-1	171
	The amino acid transporter asc-1 is not involved in cystinuria	171
14.1.1	Clonació del gen d'asc-1, <i>SLC7A10</i>	185
14.1.2	Localització de l'expressió d'asc-1 en ronyó humà	185
14.1.3	Paper del gen <i>SLC7A10</i> (asc-1) en cistinúria	185
14.1.4	Anàlisi de mutacions de <i>SLC7A10</i> per SSCP en famílies noves de tipus no I	186
14.2	LAT-2	187
15	ESTUDI DE <i>KNOCKOUTS</i>	189
15.1	<i>KNOCKOUT</i> DE <i>SLC3A1</i> (RBAT)	189
15.2	<i>KNOCKOUT</i> DE <i>SLC7A8</i> (LAT-2)	189
15.3	GENERACIÓ DEL VECTOR PEL <i>KNOCKOUT</i> DE <i>SLC7A8</i> (LAT-2)	189
15.3.1	Característiques del vector	190
15.4	TRANSFECCIÓ DE LA CONSTRUCCIÓ EN CÈL·LULES ES	193
15.5	TRANSFERÈNCIA CÈL·LULES ES RECOMBINANTS A BLASTÒCITS	194
	DISCUSSIÓ GENERAL	197
16	BASES MOLECULARS DE LA CISTINÚRIA	199
16.1	DOS <i>LOCI</i> IMPLICATS EN CISTINÚRIA	199
16.2	HETEROGENEÏTAT GENÈTICA DE LA CISTINÚRIA	200
16.3	CARACTERÍSTIQUES CLÍNiques DELS PACIENTS CISTINÚRICS DE L'ICC	202
16.4	CORRELACIÓ GENOTIP-FENOTIP EN LA CISTINÚRIA	202
16.5	NOVA CLASSIFICACIÓ DE CISTINÚRIA: TIPUS A I TIPUS B	203
16.5.1	Famílies de tipus B	204
16.5.2	Pacients heterozigots per <i>SLC7A9</i> (B+)	205
16.5.3	Famílies de tipus A	205
16.5.4	Famílies mixtes	206
16.5.5	Digènia amb fenotip parcial	206
17	AL·LELS QUE QUEDEN PER EXPLICAR EN CISTINÚRIA	209
17.1	MUTACIONS EN LES REGIONS PROMOTORES	209
17.2	MUTACIONS EN REGIONS INTRÒNIQUES	209
17.3	POLIMORFISMES DE <i>SLC3A1</i> O <i>SLC7A9</i>	210
17.4	ALTRES MEMBRES DE LSHAT COM A CANDIDATS DE CISTINÚRIA	211
17.4.1	<i>SLC7A10</i> (asc-1)	211
17.4.1.1	Polimorfismes a <i>SLC7A10</i> (asc-1)	211
17.4.1.2	Funció fisiològica d'asc-1	212
17.4.2	<i>SLC7A8</i> (LAT-2)	213
17.4.2.1	Polimorfismes a <i>SLC7A8</i> (LAT-2)	213
17.4.2.2	Paper fisiològic de LAT-2	214

ÍNDEX

17.4.2.3	Ratolí knockout per LAT-2	214
17.4.3	Altres possibles subunitats lleugeres de rBAT	214
18	FISIOPATOLOGIA DE LA CISTINÚRIA	216
18.1	FACTORS MODULADORS DEL FENOTIP LITIÀSIC EN CISTINÚRIA	216
19	PAPER DE LES MUTACIONS DE CISTINÚRIA EN ELS ESTUDIS D'ESTRUCTURA-FUNCIÓ DEL SISTEMA B⁰⁺ AT	218
19.1	MUTACIONS A RBAT	218
19.2	PAPER DE LES MUTACIONS DE B ⁰⁺ AT EN ELS ESTUDIS ESTRUCTURA-FUNCIÓ DE LES LSHAT	219
19.3	CISTINÚRIA I OLIGOMERITZACIÓ DEL COMPLEX RBAT/B ⁰⁺ AT	221
20	PAPER FISIOLÒGIC DELS HAT EN REABSORCIÓ	222
CONCLUSIONS		225
MATERIALS I MÈTODES		229
21	ESTUDI DE PACIENTS DE CISTINÚRIA	231
22	TÈCNiques GENERALS DE MANIPULACIÓ DE DNA	232
22.1	EXTRACCIÓ DE DNA DE SANG	232
22.2	REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	234
22.2.1	PCR tipus	234
22.2.2	PCR-RACE (<i>Rapid amplification of cDNA ends</i>)	235
22.2.3	PCR ACRS (<i>Amplification created restriction site</i>)	235
22.2.4	PCR semiquantitativa Multiplex	236
22.2.5	Reacció de seqüència	236
22.2.5.1	PCR de seqüència	237
22.2.5.2	Purificació dels productes de seqüenciació	238
22.3	ELECTROFORESI	238
22.3.1	Electroforesi de DNA en gel d'agarosa	238
22.3.2	Electroforesi de DNA en gel d'acrilamida	239
22.3.2.1	Tècnica de SSCP-HD (<i>Single-Strand Conformation Polymorphism-Heteroduplex</i>)	240
22.4	ANÀLISI DEL DNA AMB ENZIMS DE RESTRICCIÓ	241
22.5	PURIFICACIÓ DE DNA	241
22.6	ESTABLIMENT DE LÍNIES CEL·LULARS ESTABLES DE LIMFÒCITS HUMANS (LCL)	241
23	TÈCNiques GENERALS DE MANIPULACIÓ I DETECCIÓ DEL RNA	242
23.1	EXTRACCIÓ DE RNA DE SANG	242
23.2	RT-PCR	243
23.2.1	Eliminació del DNA genòmic	243
23.2.2	Transcripció inversa (RT, <i>Retrotranscription</i>).	244
24	TÈCNiques GENERALS DE MANIPULACIÓ DE BACTERIS I DE DNA PLASMÍDIC	244
24.1	CRIVELLATGE DE GENOTECA cDNA λZAP PER HIBRIDACIÓ	245
24.1.1	Titulació de la llibreria	246
24.1.2	Plaueig de la llibreria	246
24.1.3	Transferència a una membrana de niló a partir de placa	247
24.1.4	Hibridació de les membranes amb una sonda específica	248
24.1.5	Crivellatge secundari	249
24.1.6	Escissió del fagèmid pBluescript SK(-) del vector Uni-ZAP® XR	250
24.1.7	Obtenció de DNA plasmídic a partir de cultius bacterians	251
25	GENERACIÓ D'UNA CONSTRUCCIÓ PER AL KNOCKOUT DE SLC7A8	251
25.1	OBTENCIÓ DELS BRAÇOS D'HOMOLOGIA DEL VECTOR PER PCR LLARGA	251
25.2	ENZIMS UTILITZATS PER SUBCLONAR	251
25.3	DESFOSFORILACIÓ DELS INSERTS (FRAGMENTS D'HOMOLOGIA)	252
25.4	LLIGACIÓ	252
25.4.1	Lligació amb pGEM-T	253
25.4.2	Obtenció de bacteris competents i transformació	253
25.4.2.1	Preparació de bacteris competents per electroporació	254
25.4.2.2	Transformació per electroporació	254
25.5	COMPROVACIÓ DELS CLONS POSITIU EN ELS DIFERENTS PASSOS DE SUBCLONACIÓ PER OBTENIR LA CONSTRUCCIÓ	255

26	OBTENCIÓ DE CLONS DE CÈL·LULES ES MODIFICADES	256
26.1	TÈCNIQUES DE MANIPULACIÓ DE CÈL·LULES ES	256
26.2	PREPARACIÓ DE DNA A PARTIR DE CÈL·LULES ES	256
26.3	CRIVELLATGE DELS CLONS ES PER PCR EXTERNA AL BRAÇ PETIT (REGIÓ 3')	257
26.4	COMPROVACIÓ DE CLONS RECOMBINANTS PER <i>SOUTHERN</i>	258
26.4.1	Anàlisi de <i>Southern</i>	258
26.4.1.1	Electroforesi	258
26.4.1.2	Transferència alcalina	258
26.4.1.3	Marcatge radioactiu de les sondes (dsDNA) per random priming	259
26.4.1.4	Eliminació de la radioactivitat lliure en les reaccions de marcatge de dsDNA	260
26.4.1.5	Hibridació	260
27	DISSENY D'ENCEBADORS	261
28	EINES BIOINFORMÀTIQUES PER L'ANÀLISI DE SEQÜÈNCIES	262
28.1	<i>BASIC LOCAL ALIGNMENT TOOLS</i> (BLAST)	262
28.2	ALINEAMENT MÚLTIPLE DE SEQÜÈNCIES AMB CLUSTALW	262
28.3	CERCA DE ESE (<i>ENHANCER SPLICING ELEMENTS</i>) AMB L'ESEFINDER®	262
29	WEBS D'INTERÈS	263
29.1	WEBS DE CISTINÚRIA	263
29.2	ALTRES LLOCS WEB D'INTERÈS	263
30	NOMENCLATURA DE MUTACIONS	263
30.1	NOMENCLATURA DE DNA	263
30.1.1	Descripció de canvis de nucleòtid	264
30.2	NOMENCLATURA DE RNA	265
30.3	NOMENCLATURA DE PROTEÏNA	265
30.3.1	Descripció de canvis d'aminoàcid	265
31	PROGRAMES INFORMÀTICS MÉS UTILITZATS	267
31.1	SEQUENCHER™	267
31.2	STRIDER	267
31.3	OLIGO™	267
ANNEXOS		269
Annex 1: Llista d'encebadors		271
Annex 2: Duplicació/deleció exó 12		277
Annex 3: Resultats obtinguts pel programa <i>ESEfinder</i> per les mutacions i polimorfismes de <i>SLC7A9</i>		278
Annex 4: Promotor <i>SLC7A9</i>		280
BIBLIOGRAFIA		281

Acrònims i Abreviacions

AGT-1: *Aspartate and Glutamate Transporter-1*
 ArpAT: *Aromatic Preferring Amino acid Transporter*
 APC: *Amino acid/Polyamine/organic Cation or Choline*
 Arg: Arginina
 asc-1: *system asc amino acid transporter-1*
 asc-2: *system asc amino acid transporter-2*
 b⁰⁺AT: *system b⁰⁺ amino Acid Transporter*
 BBMV: vesícules de membrana de vora en raspall (*brush border membrane vesicles*)
 BCH: àcid 2-aminobiciclo-(2,2,1)-heptà-2-carboxílic
 BLAST: eina bàsica de cerca per alineament local (*basic local alignment search tool*)
 cpm: comptes (de radiactivitat) per minut
 CscC: L-cistina
 dbSNP: base de dades de polimorfismes d'un sol nucleòtid (*data base of single nucleotide polymorphisms*)
 DEPC: dietilpirocarbonat
 DMEM: Medi d'Eagle modificat per Dulbecco (*Dulbecco's modified Eagle's medium*)
 DMSO: dimetilsulfòxid
 DNA: àcid desoxiribonucleic (*deoxyribonucleic acid*)
 dNTP: desoxinucleòsid trifosfat (*deoxynucleoside triphosphate*)
 DTM: domini transmembrana
 DTT: ditiotreitol
 ES: (cèl·lules) mare embrionàries (*embryonic stem*)
 EST: marcador de seqüència expressada (*expressed sequence tag*)
 EDTA: àcid etilendiamintetraacètic
 ENU: etilnitrosourea
 FISH: hibridació fluorescent *in situ* (*fluorescence in situ hybridization*)
 H₂O_{dd}: aigua bidestil·lada o de qualitat similar
 HEPES: àcid 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-etansulfònic
 HGMP-RC: Human Genome Mapping Project Resource Centre
 ICC: Consorci Internacional de Cistinúria (*Internacional Cystinuria Consortium*)
 IMAGE: Integrated Molecular Analysis of Genomes and their Expression
 HAT: *Heteromeric Amino acid Transporter*
 HSHAT: *Heavy Subunit Heteromeric Amino acid Transporter*
 hxCT: human xCT
 kDa: kilo Dalton
 K_m: constant de Michaelis Menten (K_{0,5})
 LAT-1: *system L Amino acid Transporter-1*
 LAT-2: *system L Amino acid Transporter-2*
 LIF: factor inhibidor de la leucèmia (*leukemia inhibitory factor*)
 LLNL: Lawrence Livermore National Laboratory
 LOD: logaritme de probabilitats (*logarithm of odds*)

ACRÒNIMS I ABREVIACIONS

LPI: *Lisinuric Protein Intolerance*

LSHAT: *Light Subunit Heteromeric Amino Acid Transporter*

Lys: Lisina

MEF: fibroblasts embrionaris de ratolí (*mouse embryonic fibroblasts*)

MOPS: àcid 3-(N-morfolino)-propansulfònic

NCBI: Nacional Center for Biotecnology Information

NEM: N-etilmaleïmida

o/n: durant la nit (*overnight*)

Orn: ornitina

PA: fosfatasa alcalina

PAS: àcid periòdic – Schiff (*periodic acid Schiff*)

PBS: solució salina de fosfat tamponat (*phosphate buffered saline*)

PCR: reacció en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*)

pCMB: p-cloromercuriobenzoato

pCMBS: p-cloromercuribenzenosulfonato

4F2hc: cadena pesada del antígen de superfície 4F2

pfu: unitats formadores de calba (*plaque forming units*)

q.s.p.: quantitat suficient per a

rpm: revolucions per minut

SDS: dodecilsulfat sòdic

STS: lloc amb seqüència marcada (*sequence tagged site*)

RNA: àcid ribonucleic (*ribonucleic acid*)

RT-PCR: *Retro-Transcriptase Polymerase Chain Reaction*

T_{amb}: Temperatura ambient

TM: domini transmembrana

Tris: tris(hidroximetil)aminometà

TEMED: N,N,N',N'-tetrametilendiamina

xCT: *system x_c⁻ amino acid Transporter*

y⁺LAT-1: *system y⁺L Amino acid Transporter-1*

y⁺LAT-2: *system y⁺L Amino acid Transporter-2*

Introducció

1 EL RONYÓ

En aquest apartat es fa una breu descripció de l'anatomia i funció del ronyó i de l'estructura de la nefrona, unitat funcional i estructural del ronyó. També es resumeixen els mecanismes de reabsorció d'aminoàcids en el túbul renal, fent especial esment en els sistemes que participen en la reabsorció d'aminoàcids bàsics i neutres. En l'apartat de Discussió s'aprofundirà en el paper dels transportadors caracteritzats en aquest treball en la reabsorció renal.

1.1 ANATOMIA DEL RONYÓ

El ronyó d'un adult pesa aproximadament 150 g, té forma de mongeta, de 10-12 cm de llarg i 3,5-5 cm d'ample i està dividit en 8-10 lòbuls (figura 1). La cara interna del ronyó té un galze anomenat hili, per on passen l'artèria i vena renals, els vasos limfàtics, els nervis i l'urèter, que porta l'orina a la bufeta, on serà acumulada fins la seva expulsió. La medul·la està dividida en masses de forma cònica, les piràmides, la punta de les quals forma una papil·la renal, que desemboca al calze menor. Els calzes menors s'uneixen per formar el calze major que desemboca a la pelvis, o part superior de l'urèter.

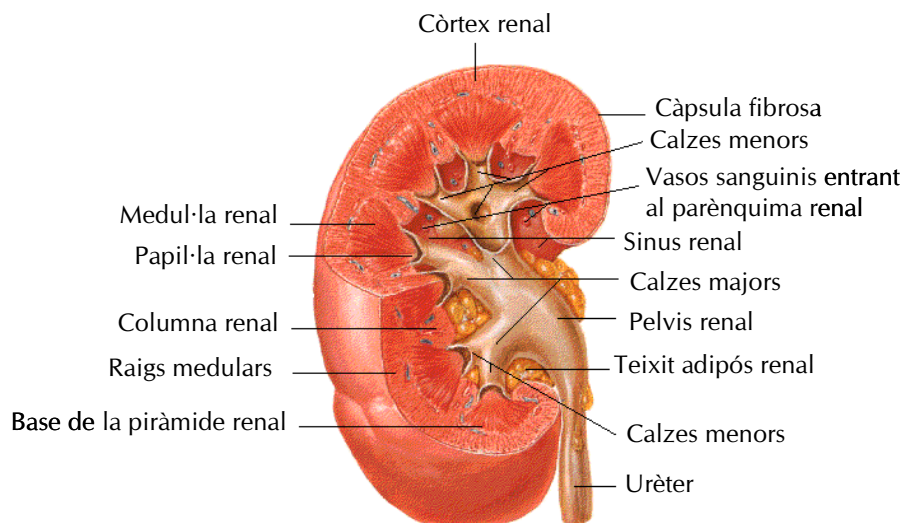


Figura 1. Representació esquemàtica de les parts del ronyó.

1.1.1 La nefrona

És la unitat estructural i funcional del ronyó (Nyengaard and Bendtsen 1992). Un ronyó humà conté entre 800.000 i 1.200.000 nefrones, però la funció renal es pot mantenir amb només un 25% del total de nefrones. Està formada per dos parts: un corpuscle renal, a través del qual es filtra la sang, i un túbul llarg on el líquid filtrat esdevé orina (veure Figura 2A). Les nefrones es poden classificar segons si el corpuscle se situa a la part més superficial del còrtex o junt a la medul·la: nefrones corticals, subcorticals i juxtamedul·lars. També es classifiquen en nefrones de nansa curta o llarga, en funció de si la nansa de Henle gira a la medul·la externa o a la interna (Hebert 1992).

1.1.1.1 El corpuscle renal

El corpuscle renal és el responsable de la filtració del plasma i està constituït pel glomèrul i la càpsula de Bowman. El glomèrul és una xarxa de capil·lars sanguinis fenestrats, que està dins una estructura en forma

INTRODUCCIÓ

de copa, anomenada càpsula de Bowman. A diferència de la majoria de teixits, en que les arterioles acaben en vànules, el glomèrul desemboca en una arteriola eferent (veure figura 2A i B).

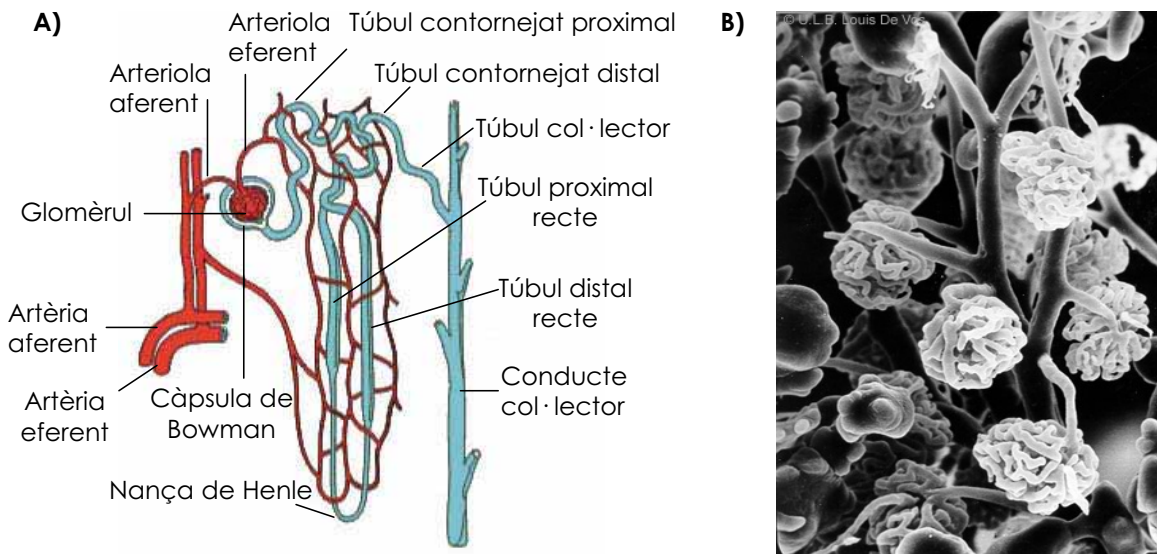


Figura 2. **A)** Representació esquemàtica de les parts d'una nefrona. **B)** Fotografia de glomèruls (xarxa de capil·lars) feta al microscopi electrònic de rastreig pel professor Louis De Vos de Biodic (Universitat de Brussel·les).

1.1.1.2 El túbul renal

El túbul renal s'estén a partir de la càpsula de Bowman i desemboca al túbul col·lector. En humans té una longitud de ~55 mm i està delimitat per una sola capa de cèl·lules epitelials. La funció primària del túbul renal és la reabsorció selectiva de l'aigua, els ions inorgànics i altres molècules del filtrat glomerular. A més, alguns ions inorgànics són secretats des de la sang a la llum del túbul. Aquests trams del túbul renal presenten característiques citològiques, histològiques i funcionals diferenciades. Així per exemple, les cèl·lules del túbul proximal, que és on té lloc la major part de la reabsorció de soluts, són cèl·lules epitelials amb la membrana apical ben diferenciada a epiteli en raspall o *brush border*, per tal d'augmentar la superfície d'absorció. Les cèl·lules del túbul distal en canvi no presenten aquesta diferenciació en la membrana apical.

Les 4 zones ben diferenciades del túbul renal són (veure Figura 2A):

1. El **túbul proximal**. És la part de la nefrona on es reabsorbeix la major part de la càrrega d'aminoàcids. Està dividit en els segments S1, S2 i S3. L'estructura del túbul proximal es divideix en:
 - **Túbul proximal contornejat:** se situa a l'escorça renal, exclosos els raigs medul·lars, i conté els segments S1 i la part inicial del S2.
 - **Túbul proximal recte:** se situa als raigs medul·lars de l'escorça renal i a la medul·la externa, i conté el tram final de S2 i el segment S3. El túbul proximal recte de les nefrones juxtamedul·lars penetra directament a la medul·la externa sense entrar als raigs medul·lars.

Segons diferències ultraestructurals del tipus cel·lular, es distingeixen 3 regions o segments al túbul proximal (figura 3):

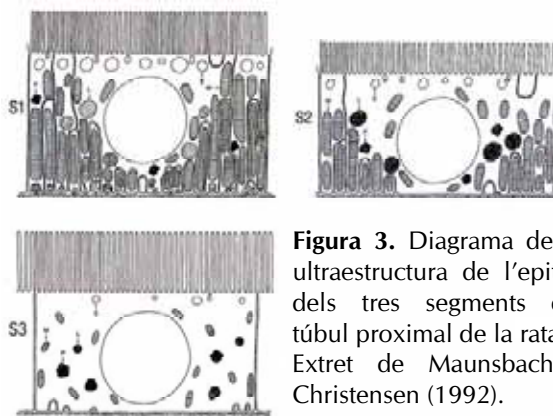


Figura 3. Diagrama de la ultraestructura de l'epiteli dels tres segments del túbul proximal de la rata. Extret de Maunsbach i Christensen (1992).

- **S1:** és el primer segment i es troba exclusivament al túbul proximal contornejat . Les seves cèl·lules són altes (d'uns 7 μm), amb uns microvil·li ben desenvolupats (d'uns 2,8 μm) i un extensiu replegament de la membrana basolateral (que representa el 90% de la membrana basolateral total). Tenen molts mitocondris grossos i un extens compartiment endocític acidí.
 - **S2:** hi ha una transició gradual de l'S1 a l'S2, entre el túbul proximal contornejat i la part molt primerenca del túbul proximal recte, als raigs medul·lars. Les cèl·lules són més curtes i tenen els microvil·li més curts i menys densament empaquetats, i les interdigitacions laterals estan menys desenvolupades. També tenen menys mitocondris i més petits.
 - **S3:** la transició de l'S2 a l'S3 és més abrupta i l'S3 ocupa el que queda del túbul proximal recte (la majoria), que se situa ja a la medul·la externa. Les cèl·lules són encara més curtes, amb microvil·li més llargs que a l'S1 i S2 i menys interdigitacions laterals. Tenen menys i menors mitocondris, la qual cosa es tradueix en la menor capacitat per a sistemes de transport que necessitin energia. La menor àrea de membrana basolateral i la menor activitat Na^+, K^+ -ATPasa concorden amb la menor absorció de fluid que es dona a l'S3.
2. La **nansa de Henle**. Constitueix un túbul prim que descendeix fins la medul·la per la branca descendent i torna a pujar, després d'un gir de 180° , per la branca ascendent (que és la primera part del túbul distal recte). La longitud de la nansa de Henle varia depenent de la localització del glomèrul. Així, les nefrones corticals i subcorticals solen presentar nanses que s'estenen fins a la medul·la externa, mentre que la nansa de Henle de les nefrones juxtamedul·lars s'estenen fins a la medul·la interna. Associats a les nanses de Henle s'hi troben els feixos de capil·lars sanguinis, anomenats *vasa recta*.
 3. El **túbul distal**. Distingim el túbul distal recte a la medul·la externa, que constitueix el tram gruixut ascendent de la nansa de Henle, un segment curt i pla anomenat màcula densa que passa pel costat de l'arteriola eferent formant l'aparell juxtaglomerular i, finalment, el túbul distal contornejat, localitzat al còrtex, que es connecta al túbul col·lector.
 4. El **túbul col·lector**. És la part terminal recta de la nefrona, que convergeix amb altres per formar el conducte col·lector. Els conductes col·lectors descendeixen des del còrtex en feixos paral·lels, anomenats raigs medul·lars, que es fusionen progressivament a la medul·la fins a formar els conductes de Bellini, que desemboquen en la papil·la renal.

1.2 FUNCIONS RENALS

El ronyó realitza diverses funcions molt importants (Guyton and Hall 2001). És el principal òrgan osmoregulator en mamífers: regula l'equilibri hídric i electrolític i així controla el volum i la composició dels líquids corporals. Regula la pressió arterial, mitjançant l'excreció variable de sodi i aigua, i la de l'hormona vasoactiva renina. També elimina els productes de rebuig del metabolisme com per exemple la

INTRODUCCIÓ

urea, l'àcid úric, la bilirubina, la creatinina, o els metabòlits d'algunes hormones i les toxines. Té una funció endocrina de producció d'hormones com la renina o l'eritropoietina, la qual es secreta en resposta a la hipòxia promovent la formació d'eritròcits. Manté l'equilibri àcid-base, junt amb els pulmons i els amortidors dels líquids corporals, excretant àcids i regulant les reserves de substàncies amortidores. També controla la formació de la forma activa de la vitamina D, fonamental per a l'homeòstasi del calci i el fòsfor. Sintetitza glucosa en situacions de dejuni perllongat. Però la funció que més es tractarà en aquest treball és la reabsorció d'aminoàcids i altres substàncies útils del filtrat glomerular.

1.2.1 Filtració glomerular

Als ronyons humans cada dia es filtren al voltant de 180 litres de plasma. D'aquest volum, només 1 o 2 litres són finalment expulsats en forma d'orina, mentre que la resta és reabsorbit. La ultrafiltració de la sang que arriba als capil·lars fenestrats del glomèrul es dona gràcies a la presència de porus d'uns 100 nm de diàmetre a l'endoteli capil·lar fenestrat i a la capa de cèl·lules de la càpsula de Bowman, anomenades podòcits. Aquestes cèl·lules presenten unes prolongacions de la membrana plasmàtica anomenades pedicels que recobreixen l'epiteli vascular. Existeix una diferència de pressió entre l'arteriola aferent i la càpsula de Bowman que impulsa el filtrat plasmàtic a través dels porus endotelials. Aquesta diferència és facilitada pel fet que les arterioles eferents tenen un diàmetre menor que les aferents, la qual cosa manté una pressió més gran al glomèrul. El filtrat glomerular es forma passivament a causa de la diferència de pressions entre l'arteriola aferent i la càpsula de Bowman, i correspon de mitjana al 20% del volum sanguini que hi circula. El volum de filtració està fortament regulat per hormones i pel sistema de realimentació de l'aparell juxtaglomerular. Es dona una filtració electrostàtica deguda a la càrrega polianiónica de la membrana, que repel·leix la majoria de les proteïnes plasmàtiques. Els podòcits situats sobre la membrana basal, amb els seus porus en esclatxa, no representen una gran barrera de filtració. Així doncs, la capacitat dels diferents soluts per a filtrar-se, es basa en la seva mida i càrrega elèctrica. Mentre les cèl·lules i les proteïnes amb masses moleculars al voltant de la de l'albumina i majors queden retingudes, la majoria de les molècules petites com el sodi, la glucosa i els aminoàcids hi passen lliurement.

1.2.2 Reabsorció al túbul renal

La reabsorció tubular és un procés molt selectiu: la glucosa i els aminoàcids són totalment reabsorbits, la major part del Na^+ i el Cl^- també són reabsorbits, però alhora de forma molt regulada, la urea només es reabsorbeix en un 50%, i la creatinina no es reabsorbeix. Les diferents substàncies són absorbides o excretades segons un o alguns dels següents mecanismes: difusió passiva, difusió facilitada, pinocitosi, transport actiu primari, secundari o terciari. Per a ser reabsorbides, les substàncies han de passar de la llum del túbul al líquid intersticial renal a través de les cèl·lules epitelials (ruta transcel·lular) o per els seus espais intermedis (ruta paracel·lular), i llavors entrar als capil·lars peritubulars per ultrafiltració (Maunsbach and Christensen 1992).

El Na^+ pateix un transport actiu primari en sortir per la membrana basolateral de les cèl·lules epitelials. Així, la hidròlisi de l'ATP cedeix l'energia necessària per mantenir-ne la concentració intracel·lular baixa, la qual cosa permet l'entrada del Na^+ per la membrana apical mitjançant difusió facilitada (a favor de gradient electroquímic). De fet, el gradient electroquímic de Na^+ és tan favorable que és aprofitat com a força motriu per al transport actiu secundari de diverses substàncies, bé per cotransport (glucosa, alguns aminoàcids, etc.) o bé per intercanvi (H^+ , Ca^{2+} , etc.). Així, en la ruta transcel·lular de la majoria de les substàncies reabsorbides, com ara la glucosa i els aminoàcids, l'entrada per la membrana apical respon a un transport actiu, mentre que la sortida per la membrana basolateral es dona per difusió facilitada.

Les cèl·lules del túbul proximal tenen una elevada taxa metabòlica i molts mitocondris per poder mantenir l'elevada taxa de transport actiu (veure figura 3). A més, l'extens epiteli en raspall, o *brush border*, de la membrana apical (orientada cap a la llum del túbul) i l'ampli laberint de conductes de la membrana basal els proporcionen una gran superfície de membrana que els permet assolir una alta velocitat en el transport de substàncies del túbul a la sang.

El túbul proximal té una alta permeabilitat als ions i a l'aigua, que li permet reabsorbir dos terços de l'aigua i el clorur de sodi filtrats. Com s'ha esmentat, la glucosa filtrada és completament absorbida al túbul proximal en un procés actiu electrogènic on és cotransportada amb Na^+ . La velocitat d'absorció va disminuint al llarg del túbul proximal (Barfuss and Schafer 1981). Les dades són compatibles amb dos mecanismes de transport diferents: un transportador d'alta capacitat i baixa afinitat al túbul proximal

contornejat i un transportador de baixa capacitat i alta afinitat al túbul proximal recte. L'absorció preferent de glucosa i aminoàcids al principi del túbul proximal contornejat té la conseqüència addicional de produir una força motriu per a la reabsorció de líquid. Com que la majoria dels aminoàcids i la glucosa són absorbits al primer 30-50% del túbul proximal (Ullrich 1979), el Na^+ , que primer es cotransporta amb la glucosa i els aminoàcids, després ho fa amb el Cl^- . L'aigua, en canvi, va difonent en tota la longitud del túbul proximal, de manera que l'osmolaritat es manté constant.

1.2.2.1 Reabsorció d'aminoàcids al túbul renal

Una càrrega diària de ~450 mmols d'aminoàcids entra al lumen del túbul renal formant part de l'ultrafiltrat obtingut al glomèrul, però el conjunt de sistemes tubulars de transport d'aminoàcids permet que l'excreció urinària final d'aminoàcids estigui al voltant de l'1% de la quantitat filtrada (Cusworth and Dent 1960). Per tant, han d'existir mecanismes de reabsorció eficients localitzats a les parets tubulars, que assegurin que gairebé tota la càrrega d'aminoàcids filtrats sigui recollida del fluid tubular i retornada cap a la sang.

El procés de reabsorció implica que els aminoàcids travessen les cèl·lules epitelials tubulars en un transport direccional transepitelial, és a dir: entren a la cèl·lula des del lumen tubular per la membrana apical, i es dirigeixen cap a la sang a través de la membrana basolateral. Hi ha tres forces que participen en el transport transepitelial de soluts: el potencial elèctric de la membrana plasmàtica (negatiu a l'interior de la cèl·lula), el gradient electroquímic de Na^+ obtingut per l'acció de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa, i el gradient de concentració transcel·lular d'alguns aminoàcids (Samarzija and Fromter 1982).

Per tal d'estudiar els diferents sistemes de transport que contribueixen en el flux transepitelial d'aminoàcids s'han utilitzat diverses metodologies: la microperfusió *in vivo* o en túbuls aïllats, les mesures de potencial elèctric i els assaigs de transport en talls de còrtex renal o en preparacions de vesícules d'escorça de ronyó (Silbernagl 1988). Aquests mètodes permeten obtenir una idea general del conjunt de processos que tenen lloc en la preparació estudiada, malgrat que en la majoria de casos és bastant difícil assegurar que les dades obtingudes corresponen a un determinat sistema de transport. Sovint els resultats obtinguts pels diferents mètodes pel que fa a les característiques cinètiques del transport estudiat difereixen considerablement per alguns aminoàcids. Per altra banda, els estudis amb línies cel·lulars polaritzades han permès l'obtenció de bons models de reabsorció tubular (Malstrom *et al.* 1987). Actualment, la clonació dels transportadors responsables de diferents sistemes de transport d'aminoàcids ha permès el desenvolupament de nous mètodes d'estudi de la seva funció en sistemes d'expressió heteròlegs, com els oòcits de *Xenopus laevis* i les cèl·lules de mamífer en cultiu transfectades.

Els experiments de microperfusió *in vivo* van representar la primera evidència que demostrava que els aminoàcids del fluid tubular són reabsorbits majoritàriament en els primers trams del túbul proximal (Haberle *et al.* 1969). Posteriorment, el paper del túbul proximal en reabsorció d'aminoàcids ha estat confirmat en múltiples treballs (revisat a Silbernagl, 1988). El perfil de reabsorció obtingut per la majoria d'aminoàcids demostrà que la major part de la reabsorció es produeix en els primers dos terços del túbul proximal més pròxims al glomèrul (segments S1 i S2) (Silbernagl 1979). En aquesta zona, per exemple, les concentracions luminals d'aminoàcids com glutamat, glutamina i valina presenten el 10% de la seva concentració plasmàtica.

El tram final del túbul proximal (segment S3) i la nansa de Henle estan implicats en la reabsorció de baixa capacitat d'alguns aminoàcids com la glicina i la taurina. Les parts finals del túbul proximal també són importants per a la reabsorció dels aminoàcids que s'escapen al lumen des de les cèl·lules epitelials, dels aminoàcids formats en la degradació intraluminal dels pèptids, i d'aquells aminoàcids que puguin haver patit una càrrega de filtració major de la normal. Així, per un mateix aminoàcid existirien diferents sistemes de captació distribuïts al llarg del túbul proximal (Bergeron and Morel 1969). Observant aquest fenomen s'ha proposat l'existència d'heterogeneïtat en la distribució axial dels transportadors d'aminoàcids, de manera que en els segments més pròxims al glomèrul es localitzarien els transportadors d'alta capacitat i baixa afinitat, mentre que en el segment S3 es localitzarien els de més afinitat i menys capacitat (Scriber and Tenenhouse 1985). De tota manera, existeix heterogeneïtat entre nefrones, és a dir, que la reabsorció d'aminoàcids en les nefrones superficials (accessibles per als estudis de micropunció) era diferent a la que es donava en nefrones més profundes del còrtex renal. Així com les nefrones superficials, accessibles als experiments de microperfusió, absorbeixen la majoria dels aminoàcids a la primera part del túbul contornejat, les nefrones més profundes (no només les juxtamedul·lars) deixen una fracció d'aminoàcids major als segments posteriors (Dantzler and Silbernagl 1988; Dantzler and Silbernagl 1990).

2 SISTEMES DE TRANSPORT D'AMINOÀCIDS A MAMÍFERS

El transport d'aminoàcids a través de les membranes cel·lulars està mediat per diferents sistemes de transport amb especificitats de substrat solapants (Christensen 1990). Els aminoàcids, i per tant, els transportadors d'aminoàcids, són importants per diferents processos cel·lulars: com ara la síntesi de proteïnes, la regulació del metabolisme cel·lular (metabolisme del nitrogen), la producció d'energia metabòlica, el creixement cel·lular, la regulació del volum cel·lular, la comunicació entre cèl·lules, la transmissió nerviosa i l'absorció d'aminoàcids en epitelis polaritzats. Els transportadors d'aminoàcids mitjancen i regulen el flux d'aminoàcids a través de la membrana plasmàtica i, en conseqüència, participen en tots aquests processos.

A partir dels estudis pioners de Christensen i col·laboradors al principi dels anys 60 (Oxender and Christensen 1963), se succeïren una sèrie de treballs que permeteren la identificació i caracterització de diferents sistemes de transport d'aminoàcids en mamífers. Aquests sistemes han estat caracteritzats funcionalment en òrgans perfosos, cèl·lules aïllades o vesícules de membrana mitjançant estudis cinètics i de competència. Així es van descriure les seves propietats generals: alta estereoespecificitat, amb preferència pels L-aminoàcids sobre els D-aminoàcids, i baixa especificitat de substrat, si els comparem amb els enzims. Aquests treballs van permetre la seva classificació segons l'especificitat de substrat, les propietats cinètiques (afinitat, inhibidors) i els mecanismes de transport i regulació (dependència o independència de ions, electrogenicitat).

Inicialment, els sistemes de transport d'aminoàcids es dividiren en dependents i independents de sodi. Els primers utilitzen l'energia deguda al gradient electroquímic del sodi a través de la membrana, que és mantingut per la Na^+/K^+ -ATPasa. La resta de sistemes faciliten el moviment de determinats aminoàcids a través de la membrana de manera independent de sodi. La nomenclatura adoptada pels sistemes de transport d'aminoàcids en mamífers utilitza acrònims indicatius de la seva especificitat de substrat, i designa els sistemes sodi-dependents en majúscules, i en minúscules els sodi-independents. L'excepció és el sistema sodi-independent L, designat amb majúscules per raons històriques (Oxender and Christensen 1963).

A partir dels anys 90, amb les noves tècniques de clonació: per expressió funcional, per tècniques de purificació-reconstitució i posteriorment per clonació *in silico* s'han identificat diferents transportadors d'aminoàcids. Aquests transportadors han estat caracteritzats funcionalment en sistemes d'expressió heteròlegs (oòcits de *Xenopus* o altres models cel·lulars) i les proteïnes caracteritzades han estat assignades als diferents sistemes de transports d'aminoàcids descrits prèviament. La Taula 1 mostra les diferents isoformes clotades en mamífers corresponents als diferents sistemes de transport d'aminoàcids descrits. De cadascun dels transportadors s'indica l'especificitat de substrat i el mecanisme de transport.

Sistema de transport	Isoformes (cDNA clonats)	Altres noms	Mecanisme	Substrats
A	ATA1 ATA2 ATA3	GlnT, SAT1, NAT2, SA1, SA2 NAT3	Cotransport 1Na ⁺ /AA	G, A, S, C, Q, N, H, M G, P, A, S, C, Q, N, H, M G, P, A, S, C, Q, N, M
asc	4F2hc/asc-1 ? /asc-2 (b)		Antiport	G, A, S, C, T (isoformes D i L) G, A, S, T
ASC	ASCT1 ASCT2	SAAT1 ATB ⁰	Antiport Na ⁺ /AA	A, S, C, T, V A, S, C, T, Q, N, M, L, G
b ^{0,+}	rBAT/b^{0,+}AT	NBAT/lc6	Antiport	K, R, O, A, S, C, T, N, Q, H, M, I, L, V, F, Y, W, C-
B ⁰	B ⁰ AT-1	-	Cotransport 2Na ⁺ /AA	L, I, Q, F, A, P, S, C, V, M, N, (H, G, T, W, Y)
B ^{0,+}	ATB ^{0,+}		Cotransport 2Na ⁺ /1Cl ⁻ /AA	A, S, C, H, M, I, L, V, F, Y, W, (K, R, T, N, Q)
beta	GAT1 GAT2 GAT3 GAT4	BGT1 GAT2 GAT3	Cotransport 2-3Na ⁺ /1Cl ⁻ /AA	GABA GABA, betaïna, P, D-A GABA, betaïna, taurina GABA, betaïna
Gly	GlyT1 GlyT2		Cotransport 2-3Na ⁺ /1Cl ⁻ /AA	G G
IMINO	PAT1 PAT2 PAT3 (?)		Cotransport 1H ⁺ /AA	P, G, A, D-A, AIB, GABA P, G, A, MeAIB ?
L	4F2hc/LAT-1 4F2hc/LAT-2 LAT-3	4F2hc-lc5	Antiport	H, M, N, L, I, V, F, Y, W, (Q) A, S, C, T, N, Q, H, M, L, I, V, F, Y, W L, I, V, F, M
N	SN1 SN2	NAT1	Cotransport AA/Na ⁺ acoblat a antiport H ⁺	Q, N, H Q, N, H, S, G
T	TAT1		Uniport	F, Y, W
X ^{AG}	EAAT1 EAAT2 EAAT3 EAAT4 EAAT5	GLAST GLT-1 EAAC1	Cotransport 3Na ⁺ /1H ⁺ /AA acoblat a antiport 1K ⁺	E, D E, D E, D, C E, D E, D
x ^c	4F2hc/xCT		Antiport	E, C, (D)
y ⁺	CAT-1 CAT-2A/B CAT-3 CAT-4		Uniport	R, K, H, O R, K, H, O R, K ?
y ^{+L}	4F2hc/y ⁺ LAT-1 4F2hc/v ⁺ LAT-		Antiport 1Na ⁺ /AA	K, R, Q, H, M, L K, R, Q, H, M, L, A, C

Taula 1. Sistemes de transport d'aminoàcids en mamífers, transportadors clonats, mecanisme de transport i especificitat de substrat. Els aminoàcids transportats es mostren en codi d'una lletra (C-, cistina; O, ornitina; GABA, àcid gamma-aminobutíric; AIB, àcid aminoisobutíric). Els substrats de menor afinitat es presenten entre parèntesis. asc-2 va associat a una cadena pesada desconeguda. El sistema de transport induït per AGT-1 no s'ha descrit amb anterioritat. Adaptat de Broer, 2002.

INTRODUCCIÓ

2.1 CLASSIFICACIÓ SEGONS L'ESTRUCTURA PREDITA

Els transportadors d'aminoàcids presenten diferents estructures (Palacín et al. 1998a). Així, els transportadors dels sistemes X_{AG} i ASC tenen una estructura de 8 dominis transmembrana, mentre que pels sistemes A, $B^{0,+}$, β , Gly, IMINO, N, T i γ^+ , els transportadors presenten estructures amb 11-14 dominis transmembrana. Per altra banda, els transportadors dels sistemes asc, $b^{0,+}$, L, xc^- i γ^+L són transportadors heteromèrics, constituïts per una glicoproteïna de membrana de tipus II (4F2hc o rBAT) i una subunitat politòpica amb predicció de 12 dominis transmembrana.

2.2 CLASSIFICACIÓ SEGONS EL TIPUS DE TRANSPORT

Els transportadors d'aminoàcids també difereixen en el mecanisme de transport utilitzat (veure Taula 1), que s'ha relacionat amb la funció fisiològica del transportador (Broer and Wagner 2002). Així distingim:

- **Transportadors que permeten elevada acumulació intracel·lular d'aminoàcids.** Aquests transportadors presenten mecanismes complexos de cotransport amb diversos ions. Per exemple els sistemes β , Gly i $B^{0,+}$ presenten cotransport amb els ions Na^+ i Cl^- , mentre que el sistema X_{AG} presenta cotransport amb Na^+ i H^+ acoblat a antiport amb K^+ . Aquests sistemes permeten l'acumulació intracel·lular d'osmolits i neurotransmissors i la reabsorció apical d'alguns aminoàcids en els epitelis.
- **Transportadors que permeten una acumulació intracel·lular d'aminoàcids lleugera.** Aquests transportadors són els associats al cotransport amb Na^+ o H^+ i els uniports. Així, els sistemes A, IMINO i N, presenten cotransport amb Na^+ , cotransport amb H^+ i cotransport de Na^+ acoblat a antiport de H^+ , respectivament. Per altra banda els transportadors dels sistemes γ^+ i T actuen com a uniports, de manera que la direcció de transport ve determinada pel gradient electroquímic.
- **Transportadors que permeten intercanvi d'aminoàcids.** Aquests transportadors permeten el transport associat als sistemes ASC, asc, L, xc^- , γ^+L i $b^{0,+}$. Llevat dels transportadors del sistema ASC, tots els altres pertanyen a la família de transportadors heteromèrics d'aminoàcids, de la qual parlarem en l'apartat 3 d'aquesta Introducció. El mecanisme d'antiport és essencial pel transport vectorial d'aminoàcids a través dels epitelis.

En una cèl·lula existeixen un conjunt concret de sistemes de transport d'aminoàcids a la seva membrana plasmàtica, que són la combinació de sistemes ubiqus (p.e., sistema A, L, ASC, γ^+ , X_{AG}) i sistemes específics d'un determinat teixit (p.e., sistema $B^{0,+}$, N, $b^{0,+}$). D'aquesta manera es permet la regulació dels fluxos d'aminoàcids en cada cèl·lula regulant el nombre d'estructures que permeten el transport d'aminoàcids a nivell cel·lular i interorgànic (Christensen 1990).

2.3 CLASSIFICACIÓ FILOGENÈTICA

Un cop clonats la majoria dels transportadors d'aminoàcids, el coneixement de la seva seqüència ha permès una altra classificació, aquesta basada en la seva filogènia. Així les principals famílies que contenen transportadors d'aminoàcids de mamífers són:

- **Família de transportadors d'aminoàcids neutres dependents de Na^+ o de H^+ .** Formen part de la superfamília *SLC38* (SLC, *solute carrier*): Està composta per les subfamílies dels sistemes de transport A, N i PAT. De la primera s'ha clonat fins el moment tres membres, ATA1 a ATA3 (*amino acid transporter A*), que tenen 11/12 dominis transmembrana (DTM) putatius; de la segona, dos membres, SN1 i SN2 (*system N*), que tenen 11 putatius DTM; i de la tercera també dos membres, PAT1 i PAT2, amb 11 DTM putatius.
- **Família de transportadors d'aminoàcids catiònics i d'intercanviadors d'aminoàcids, *SLC7*.** Està inclosa dins la superfamília APC (transportadors d'aminoàcids, poliamines i colina), i es pot dividir en dues subfamílies, la de transportadors catiònics i la d'intercanviadors d'aminoàcids. De la primera s'ha clonat 4 membres, CAT1 a CAT4 (*cationic amino acid transporter*), almenys els tres primers, transportadors transestimulables representants del sistema γ^+ , tots amb 14 DTM putatius. La segona es distingeix de l'anterior per dues característiques fonamentals: gairebé tots els seus membres són intercanviadors obligatoris, i tots ells necessiten coexpressar-se amb alguna proteïna de la família *SLC3* (amb dos membres clonats, 4F2hc i rBAT) per arribar a la membrana. Fins ara se n'ha descrit 10: LAT-1 (*system L amino acid transporter*), LAT-2, γ^+LAT-1 (*system γ^+L*

amino acid transporter), y^+ LAT-2, $b^{0,+}$ AT (system $b^{0,+}$ *amino acid transporter*), asc-1 (system *asc amino acid transporter*), asc-2, xCT (system X_c^- *amino acid transporter*) i AGT-1 (*aspartate and glutamate amino acid transporter*), tots ells amb 12 DTM putatius i arpAT (*aromatic preferring-amino acid transporter*).

- **Superfamília de transportadors d'aminoàcids dependents de sodi i de clorur, SLC6.** Comprèn diverses subfamílies, que inclouen les proteïnes GAT-1 a 3, BGT-1, TAUT, GLYT1 i 2, PROT i $B^{0,+}$, totes amb 12 DTM putatius.
- **Superfamília de transportadors d'aminoàcids aniónics i neutres petits dependents de sodi, SLC1.** Inclou els transportadors ASCT1, ASCT2, també anomenat ATB^0 , i els transportadors de dicarboxilats EAAT-1 a 5, inicialment amb 10 DTM predits, però, almenys EAAT-2 amb una estructura més complexa, amb llaços reentrants (Grunewald et al. 1998).
- **Família SLC16 de transportadors de monocarboxilats.** Inclou TAT1, amb 12 DTM putatius, que representa el sistema T.

3 ELS TRANSPORTADORS HETEROMÈRICS D'AMINOÀCIDS (HAT)

La família de transportadors heteromèrics d'aminoàcids (*Heteromeric amino acid transporter*, HAT) pertany a una de les cinc superfamílies de transportadors descrites, anomenada APC (*Amino acid-polyamine-organic cation transporter superfamily*), que inclou transportadors de llevats, plantes i animals (Jack et al. 2000). S'han descrit 6 famílies de transportadors d'aminoàcids de membrana plasmàtica en mamífers. Els transportadors heteromèrics d'aminoàcids (HAT) són els únics transportadors d'aminoàcids a eucariotes superiors (metazous; des de platelmints fins a mamífers) que estan constituïts per més d'una cadena polipeptídica diferent (taula 1). La resta de transportadors d'aminoàcids de membrana plasmàtica de mamífer estan formats per un únic tipus de cadena polipeptídica, codificada per un sol gen i que té una activitat de transport determinada (Chillarón et al. 2001). La família HAT està formada per subunitats pesades (HSHAT) i subunitats lleugeres (LSHAT) unides per un pont disulfur conservat en tots els membres de la família (Verrey et al. 1999; Chillarón et al. 2001; Wagner et al. 2001). Cada unitat funcional del transportador, com es representa a la figura 4, està formada almenys per una subunitat pesada i una lleugera, essent aquesta última la que confereix l'especificitat de substrat. De fet, l'heterodimerització en teixits en la família dels HAT només ha estat demostrada per a 4F2hc/LAT-1 (Mannion et al. 1998), 4F2hc/LAT-2 (Merlin et al. 2001) i rBAT/ $b^{0,+}$ AT (Fernández et al. 2002). Fins aquest moment s'han descrit dues cadenes pesades i 10 cadenes lleugeres. Les cadenes pesades, rBAT i 4F2hc, van ser associades al transport d'aminoàcids el 1992, mentre que les primeres cadenes lleugeres, veritables subunitats transportadores del complex, no van ser clonades fins l'any 1998.

Fins fa poc l'estequiometria de les subunitats d'aquests transportadors era desconeguda. Però experiments fets pel nostre grup semblen demostrar que 4F2hc està present com a heterodímer a la membrana, mentre que rBAT es trobaria majoritàriament formant heterotetràmers (Maite Jiménez, tesi doctoral). Els transportadors heteromèrics es comporten com intercanviadors obligatoris amb una estequiometria 1:1. Això s'ha demostrat per a LAT-1/4F2hc, LAT-2/4F2hc i $b^{0,+}$ AT/rBAT (Meier et al. 2002; Reig et al. 2002). Només asc-1/4F2hc (Nakauchi et al. 2000), LAT-2/4F2hc de rata (Segawa et al. 1999) i asc-2 no semblen intercanviadors.

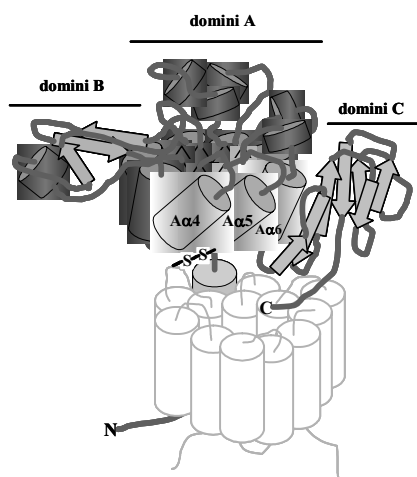


Figura 4. Representació esquemàtica dels HAT. La subunitat pesada (de color gris) està unida per un pont disulfur a la subunitat lleugera (de color blanc) entre dues cisteïnes conservades, localitzades al segon llaç extracel·lular de la LSHAT i a uns quants residus del final del domini transmembrana de la HSHAT. El domini extracel·lular de la subunitat pesada és homòleg a glicosidases. Aquest model 3D està basat en l'estructura 3D de la oligo 1,6 glucosidasa de *Bacillus cereus*. La part extracel·lular de 4F2hc conté 2 dominis: A, un TIMbarrel o 8(α/β); C, 8 fulles β antiparal·leles al C-terminal. rBAT i la O1,6G tenen un domini B protuberant addicional amb una hèlix α i 3 fulles β antiparal·leles. Adaptat de Palacín et al., 2004.

INTRODUCCIÓ

Els HAT són principalment intercanviadors: mostren, en major o menor grau, un mecanisme de transport d'intercanvi d'aminoàcids, que en alguns casos és totalment obligatori (sistema $b^{0,+}$ (Busch *et al.* 1994); sistema y^+L , (Chillarón *et al.* 1996); sistema L2 (Pineda *et al.* 1999); sistema x_c^- , (Bassi *et al.* 2001)).

L'únic estudi existent sobre el mecanisme específic d'intercanvi és un estudi cinètic del sistema $b^{0,+}$ en vesícules provinents de l'epiteli en raspall d'intestí de pollastre que és compatible amb un mecanisme seqüencial (formació d'un complex ternari del transportador unit simultàniament als seus substrats en ambdós costats de la membrana) (Torras-Llort *et al.* 2001). Es desconeix el mecanisme d'intercanvi dels altres HAT identificats. Els HAT presenten una forta asimetria en la seva interacció amb els substrats: la seva afinitat aparent és més elevada en el costat intracel·lular que en l'extracel·lular (Torras-Llort *et al.* 2001; Meier *et al.* 2002; Reig *et al.* 2002).

En aquesta tesi s'ha treballat principalment en l'estudi genètic de *SLC7A9* (gen que codifica per $b^{0,+}$ AT) en pacients de cistinúria però també s'han estudiat els gens de dues subunitats lleugeres més: *SLC7A8* (LAT-2), *SLC7A10* (asc-1), i el de la cadena pesada rBAT, *SLC3A1*.

3.1 SUBUNITATS PESADES DE TRANSPORTADORS D'AMINOÀCIDS HETEROMÈRICS (HSHAT)

Les subunitats pesades (*Heavy Subunits of Heteromeric Amino acid Transporter*, HSHAT) componen la família SLC3 (*SoLute Carrier 3*) (Palacín and Kanai 2004). Fins al moment aquesta família està formada per dues proteïnes que comparteixen propietats estructurals i funcionals: rBAT (també anomenada NBAT o D2 i codificada pel gen *SLC3A1*) i 4F2hc (també anomenada CD98hc i codificada pel gen *SLC3A2*). Les seqüències humanes de rBAT i 4F2hc codifiquen per glicoproteïnes de 685 i 529 aminoàcids respectivament, i presenten un 30% d'identitat entre elles (Figura 5). Les formes glicosilades d'aquestes proteïnes presenten una mobilitat en SDS-PAGE en condicions reductores de 94 i 85 kDa (Palacín *et al.* 1998a), mentre que en condicions no reductores les subunitats pesades formen part d'un complex de 120-130 kDa (Chillarón *et al.* 2001). Aquesta observació evidencià que les glicoproteïnes rBAT i 4F2hc formen part de transportadors d'aminoàcids heteromèrics (revisat a Chillarón *et al.*, 2001).

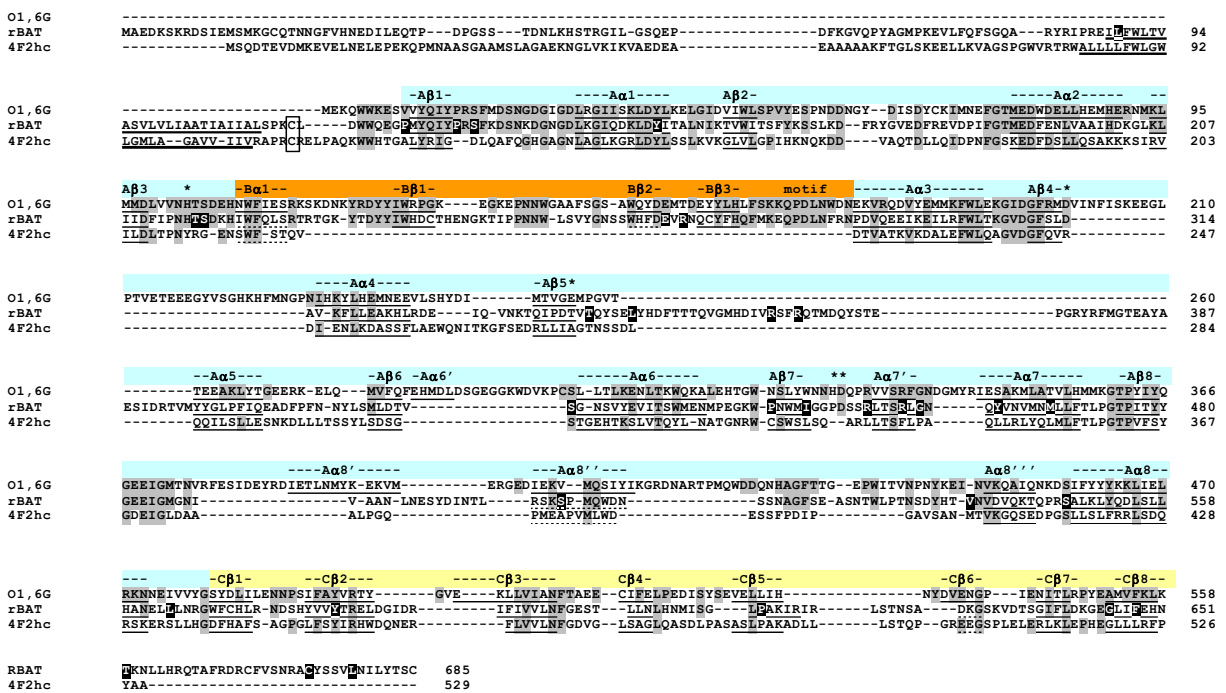


Figura 5. Multialineament de les subunitats pesades humanes rBAT i 4F2hc i la oligo-1,6-glicosidasa (O1,6G) de *Bacillus cereus*. Els elements principals d'estructura secundària de O1,6G estan indicats sobre la seqüència (α, alfa hàlix; β, fulla beta) en les tres dominis de la proteïna (A, TIM barrel indicat en blau; B, indicat en taronja; C, barril β antiparal·lel indicat en groc). Els residus de O1,6G conservats en els membres de SLC3 estan marcats en gris. Els residus de rBAT implicats en mutacions puntuals en cistinúria s'indiquen en blanc sobre negre. El domini transmembrana predit per les proteïnes de SLC3 es representa subratllant la seqüència. Els asteriscs indiquen els residus catalítics a O1,6G.

4F2hc i rBAT estan mancades de seqüència líder, tenen perfils d'hidrofobicitat semblants i un domini amb homologia a les α -amilases d'insectes i α -glucosidases bacterianes. La taula 2 mostra les principals característiques d'aquestes dues proteïnes. El gen *SLC3A2* és molt més petit que *SLC3A1*, però ambdós gens tenen un nombre i una mida d'exons similar i que presenten elevat grau d'homologia. rBAT i 4F2hc són N-glicoproteïnes de membrana de tipus II: Els algorismes de predicció de topologia de membrana indicaven l'existència d'un sol segment transmembrana a les dues proteïnes, amb la zona amino-terminal intracel·lular i un voluminós domini carboxi-terminal extracel·lular (Bertran *et al.* 1992b; Wells and Hediger 1992).

Característica	rBAT	4F2hc
Localització cromosòmica	2p16.3-p21	11q12-q13
Nom del gen	<i>SLC3A1</i>	<i>SLC3A2</i>
Nombre d'exons (mida del gen)	10 (~45 kb)	9 (8 kb)
Nombre d'aminoàcids	685	529
Nombre de DTM putatius	1(o 4)	1
Mobilitat electroforètica en condicions reductores	~90 kDa	~85 kDa
Mobilitat electroforètica condicions no reductores	~125 kDa i > 240 kDa	~125 kDa
Expressió tissular i subcel·lular	Membrana apical de ronyó i intestí prim	Membrana basolateral o plasmàtica de molts teixits

Taula 2. Principals característiques de rBAT i 4F2hc. Extreta de Palacín *et al.*(1998b).

El residu de cisteïna que participa en la formació del pont disulfur amb la subunitat lleugera es localitza extracel·lularment, a una distància de 4-5 aminoàcids del segment transmembrana. També es proposà un model de rBAT amb 4 segments transmembrana i els extrems N- i C-terminals intracel·lulars, recolzat per experiments d'immunofluorescència amb anticossos específics de pèptids i per proteòlisi limitada (Mosckovitz *et al.* 1994). El grup de M.H. Ginsberg ha demostrat que l'extrem N-terminal de 4F2hc és intracel·lular i el C-terminal és extracel·lular (Fenczik *et al.* 2001), d'acord amb les primeres prediccions. Un altre argument a favor de l'estructura d'un sol domini transmembrana és el domini C-terminal extracel·lular de 4F2hc i rBAT presenta homologia significativa amb les α -amilases d'insectes i les α -glucosidases bacterianes (30-40% d'identitat) (Quackenbush *et al.* 1987; Teixeira *et al.* 1987; Bertran *et al.* 1992b; Tate *et al.* 1992; Wells and Hediger 1992). El domini extracel·lular comença a 7 i 13 residus del segment TM a 4F2hc i rBAT, respectivament, i continua fins a l'extrem C-terminal del domini extracel·lular i de les glucosidases bacterianes (Chillarón *et al.* 2001). Aquests enzims pertanyen a la família de les glicosil-hidrolases (Janecek 1997), i presenten tots ells una estructura similar. En col·laboració amb R. Roca i A. València (CNB/CSIC, Madrid) s'ha modelat per homologia aquests dominis extracel·lulars sobre la base de les glucosidases bacterianes cristal·litzades (p.e.,PDB: 1UOK). Aquests models revelen que molt probablement aquest domini extracel·lular està constituït per 3 subdominis: 1) domini A o catalític amb estructura de *TIM-barrel* (8 cadenes α i β alternades), 2) domini B protuberant (present a rBAT i absent a 4F2hc) d'unió a calci que interromp el domini A entre les cadenes β_3 i α_3 ; i 3) domini C amb una estructura de làmines β antiparal·leles en l'extrem C-terminal (Figura 4). Part del domini A no pot modelar-se amb precisió ja que un terç del mateix es basa en alineaments de seqüència amb identitat d'aminoàcids molt baixa. La seqüència de domini B s'ha utilitzat per dividir la família de les glicosil-hidrolases en 5 grups (Janecek 1997). rBAT pertanyeria al grup definit per l'oligo 1,6-glicosidasa de *Bacillus cereus* (O1,6G). En la Figura 5 es mostra un alineament de O1,6G amb les proteïnes humanes rBAT i 4F2hc. Aquest alineament revela que: 1) el domini extracel·lular dels membres SLC3 té una estructura probablement de *TIM-barrel* (amb excepció dels últims 30 residus de rBAT), malgrat que l'homologia és baixa en algunes zones; 2) 4F2hc no presenta el domini B; i 3) alguns residus implicats en catàlisi enzimàtica (Watanabe *et al.* 1997) no estan presents en rBAT o 4F2hc. De fet, ni rBAT (Wells and Hediger 1992) ni 4F2hc presenten activitat α -amilasa o maltasa quan s'expressa en oòcits de *Xenopus*.

Malgrat l'homologia, encara es desconeix l'estructura 3D amb alta resolució de les HSHAT; els models actuals són incomplets i poc satisfactoris (Chillarón *et al.* 2001) i tampoc es coneix la funció que realitza aquest domini extracel·lular (veure Discussió General).

INTRODUCCIÓ

El fet que tinguin una estructura inusual com a proteïnes relacionades amb el transport d'aminoàcids feu hipotetitzar que formaven part d'un holotransportador junt amb subunitats aleshores conegudes (Palacín *et al.* 1998a). La manca de correlació entre la quantitat de proteïna rBAT en la superfície de l'oòcit i el transport y^+L induït (Chillarón *et al.* 1997) i uns estudis d'inactivació de l'activitat de transport y^+L deguda a la modificació de residus de cisteïna (*cysless*) de 4F2hc (Estévez *et al.* 1998) confirmaren la hipòtesi.

Així, malgrat que cap d'aquestes dues proteïnes presenta la típica estructura d'un transportador, quan són expressades mitjançant injecció del seu cRNA en oòcits de *Xenopus*, ambdues indueixen el transport d'aminoàcids. rBAT indueix una activitat molt semblant a l'activitat $b^{0,+}$ (veure la taula 1), definida per Van Winkle en blastòcits de ratolí (Van Winkle *et al.* 1988), però que a més transporta cistina. També s'ha descrit altres activitats associades a l'expressió de rBAT, fins i tot una dependent de Na^+ (Peter *et al.* 1996; Ahmed *et al.* 1997). 4F2hc indueix una activitat molt semblant al sistema y^+L (Bertran *et al.* 1992a; Wells and Hediger 1992), al sistema L (Bröer *et al.* 1995; Bröer *et al.* 1997) i al sistema $b^{0,+}$ (Bröer *et al.* 1998). El fet que ambdues proteïnes induïssin més d'una activitat de transport donà força a la hipòtesi, ara comprovada, que rBAT i 4F2hc són subunitats acompanyants de transportadors heteromèrics. Quan els cRNA de rBAT o el de 4F2hc són injectats a oòcits de *Xenopus*, les corresponents proteïnes (subunitats pesades) s'associen als transportadors silencis endògens (subunitats lleugeres) i formen l'holotransportador actiu. En canvi, l'expressió de rBAT a cèl·lules COS-7, que no deuen tenir una subunitat lleugera adient, no indueix el transport d'aminoàcids (Palacín 1994).

Des del punt de vista funcional, el paper de la subunitats pesades 4F2hc i rBAT s'ha relacionat amb el tràfic de la subunitat lleugera a la membrana plasmàtica. L'eliminació del pont disulfur per mutació de les cisteïnes implicades disminueix, però no elimina, l'expressió de l'heterodímer a la membrana plasmàtica, fet que suggereix l'existència d'interaccions no covalents entre la subunitat pesada i la lleugera (Estévez *et al.* 1998; Pfeiffer *et al.* 1998). Per altra banda, diferents observacions han implicat a les subunitats pesades en la modulació de les propietats funcionals dels holotransportadors (Peter *et al.* 2000; Rajan *et al.* 2000a). En experiments de reconstitució realitzats al nostre grup (Reig *et al.* 2002) es demostrà que $b^{0,+}AT$ és la subunitat catalítica, mentre que s'ha suggerit que rBAT és important pel tràfic de l'holotransportador. En aquest sentit, totes les mutacions de rBAT implicades en cistinúria estudiades, afecten el tràfic del holotransportador a la membrana plasmàtica (Chillarón *et al.*, 1997; Saadi *et al.*, 1998). Per altra banda, alguns estudis han suggerit que rBAT podia actuar alterant les propietats funcionals de l'heterodímer rBAT/ $b^{0,+}AT$: 1) La mutació p.C664A a rBAT de rata (corresponent al residu p.C666 de rBAT humana) altera la sensibilitat a NEM del transportador (Peter *et al.* 2000). 2) Les constants cinètiques són diferents segons si $b^{0,+}AT$ es coexpressa amb rBAT o 4F2hc en cèl·lules HRPE (Rajan *et al.* 2000a). 3) Sabem que els mutants p.C571S, p.C666S aboleixen gairebé totalment l'activitat de transport induïda per rBAT (Marta Pineda, tesi doctoral). A més la mutació de cistinúria p.R365W, que produeix un defecte de tràfic sensible a temperatura en cèl·lules HeLa però no en oòcits, mostra un defecte de l'eflux d'arginina però no de l'influx (Pineda *et al.* 2004b) (veure Discussió General).

3.1.1 rBAT

La proteïna rBAT (*related to $b^{0,+}$ Amino acid Transporter*) fou la primera subunitat identificada de la família de transportadors heteromèrics d'aminoàcids. Es clonà l'any 1992 per expressió funcional en oòcits de *Xenopus* a partir de mRNA de ronyó de conill i rata de forma independent i simultània en 3 laboratoris (Bertran *et al.* 1992b; Tate *et al.* 1992; Wells and Hediger 1992). Els cDNA induïen el transport independent de Na^+ d'aminoàcids bàsics, alguns neutres i cistina. Aquests cDNA corresponien a les versions en conill (Bertran *et al.* 1992b) i rata (Tate *et al.* 1992; Wells and Hediger 1992) de la mateixa proteïna que, segons el laboratori, rebé els noms de rBAT (*related to $b^{0,+}$ amino acid transport*), D2 i NBAMINOÀCID -Tr (*neutral and basic amino acid transporter*), respectivament. Poc després se'n clonà el cDNA humà (NM_000341) (Bertran *et al.* 1993; Lee *et al.* 1993). Les seves seqüències mostren entre el 80 i el 85% d'identitat d'aminoàcids. La homologia de rBAT amb l'antigen de superfície de membrana 4F2hc (4F2 *heavy chain*, 4F2hc, també anomenat CD98hc) (NM_002394) (30% d'identitat de seqüència entre els gens humans) va promoure la seva expressió en oòcits de *Xenopus*, el que va permetre relacionar aquesta proteïna amb el sistema de transport d'aminoàcids y^+L (Bertran *et al.* 1992a; Wells *et al.* 1992). D'aquesta manera es va establir la família de proteïnes que posteriorment s'ha anomenat família de les cadenes pesades dels transportadors HAT (*heavy chains* o HSHAT).

El mRNA de rBAT s'expressa principalment al ronyó i a la mucosa de l'intestí prim, i en menor grau, al fetge i el pàncrees (Bertran *et al.* 1992b; Wells and Hediger 1992; Yan *et al.* 1992; Lee *et al.* 1993). L'anàlisi de *Northern* en aquests teixits mostra un transcrit de 2,3 kb i un de 4 kb, corresponents a poliadenilacions alternatives del mateix gen (Bertran *et al.* 1992b; Markovich *et al.* 1993). Estudis

d'hibridació *in situ* i d'immunolocalització han demostrat que l'expressió de rBAT es localitza als microvil·li de la mucosa de l'intestí prim i de les cèl·lules epitelials del túbul proximal de la nefrona, amb una expressió creixent del segment S1 a l'S3 (Kanai *et al.* 1992; Furriols *et al.* 1993; Pickel *et al.* 1993). D'altra banda, al cervell s'ha detectat un transcrit més llarg, d'unes 5 kb, que també és present a altres teixits humans (Yan *et al.* 1992; Bertran *et al.* 1993), i sembla correspondre a un gen homòleg a rBAT (Yan *et al.* 1992; Pickel *et al.* 1993). L'expressió de rBAT es regula durant el desenvolupament, de manera que el seu mRNA es comença a detectar al final de la vida fetal, i la proteïna, a partir del cinquè dia de vida postnatal de la rata i incrementa després de l'al·letament (Furriols *et al.* 1993).

L'activitat de transport associada a rBAT s'ha estudiat en oòcits de *Xenopus*. En aquest sistema rBAT indueix transport Na^+ -independent de cistina i aminoàcids bàsics i neutres amb elevada afinitat (Bertran *et al.* 1992b; Wells and Hediger 1992). Com ja s'ha esmentat anteriorment, aquesta activitat s'anomena $\text{b}^{0,+}$ -like. Posteriorment es demostrà que rBAT actua com a intercanviador obligatori (Coady *et al.* 1994; Ahmed *et al.* 1995) amb una estequiometria 1:1 (Chillarón *et al.* 1996), i que l'intercanvi entre aminoàcids bàsics i neutres és electrogènic, és a dir, la captació d'aminoàcids neutres va acompanyada per corrents de sortida generades per la sortida simultània d'aminoàcids bàsics, mentre que la captació d'aminoàcids catiònics va acompanyada de corrents d'entrada, degut a l'antiport d'aminoàcids neutres (Busch *et al.* 1994). Per altra banda, el paper de rBAT en reabsorció d'aminoàcids catiònics i cistina va evidenciar-se pel fet que el *knock down* de rBAT en cèl·lules OK disminueix l'activitat $\text{b}^{0,+}$ (Mora *et al.* 1996) i que mutacions a *SLC3A1* (gen que codifica rBAT) causen cistinúria, una aminoacidúria primària hereditària caracteritzada per hiperexcreció renal de cistina i aminoàcids bàsics i per la producció de litiasi de cistina (Calonge *et al.* 1994) (veure apartat 5 d'aquesta Introducció).

L'any 1999 vam identificar el transportador $\text{b}^{0,+}$ AT (*SLC7A9*) com a responsable de la inducció de l'activitat $\text{b}^{0,+}$ quan s'expressava juntament amb rBAT (article 2) (Chairoungdua *et al.* 1999; Pfeiffer *et al.* 1999a). També vam trobar mutacions en aquesta subunitat en pacients de cistinúria principalment de tipus no I. Aquests resultats es presenten en l'article 2 de la secció de Resultats d'aquesta tesi.

3.1.2 4F2hc

4F2hc fou clonada el 1987 gràcies a un anticòs monoclonal desenvolupat contra antígens de membrana de cèl·lules limfoblàstiques (Quackenbush *et al.* 1987; Teixeira *et al.* 1987), però el seu paper biològic no era clar. La injecció de 4F2hc en oòcits de *Xenopus* indueix transport de tipus y^+L : transport d'aminoàcids bàsics independent de Na^+ i d'aminoàcids neutres dependent de Na^+ amb elevada afinitat. Aquesta activitat s'ha caracteritzat com un intercanvi obligatori i asimètric, és a dir, afavoreix la sortida d'aminoàcids bàsics intercanviats per aminoàcids neutres i Na^+ (Chillarón *et al.* 1996). Com s'ha comentat anteriorment, l'expressió de 4F2hc en oòcits també es va relacionar amb la inducció de sistema L (Bröer *et al.* 1995).

A diferència de rBAT, El mRNA de 4F2hc és gairebé ubic en ratolí, on les quantitats més elevades es troben als testicles, pulmó, ronyó, cervell i pàncrees (Parmacek *et al.* 1989). La proteïna 4F2hc és ubiqüa i sembla estar present en totes les cèl·lules i línies cel·lulars tumorals (Parmacek *et al.* 1989; Nakamura *et al.* 1999). La comparació dels nivells d'expressió en teixits neonatals i adults de ratolí no han mostrat un patró de regulació clar durant el desenvolupament (Parmacek *et al.* 1989). L'expressió de 4F2hc en ronyó s'ha localitzat en la membrana basolateral de les cèl·lules epitelials del túbul proximal de ronyó i l'intestí (Quackenbush *et al.* 1986; Rossier *et al.* 1999).

Actualment se sap que la proteïna 4F2hc interacciona amb diferents membres de la família de subunitats lleugeres de transportadors d'aminoàcids heteromèrics induint diferents sistemes de transport (Taules 1 i 3). Així, els heterodímers formats per 4F2hc amb les subunitats lleugeres $\text{y}^+\text{LAT-1}$, $\text{y}^+\text{LAT-2}$, LAT-1 , LAT-2 , asc-1 i xCT induïxen activitat de transport de tipus y^+L , L , asc i x^- respectivament (revisat a Chillarón *et al.*, 2001). S'ha demostrat que en la interacció amb aquestes subunitats intervenen diferents dominis de la seva seqüència. Delecions en 4F2hc han demostrat que el domini C-terminal és imprescindible pel reconeixement i unió a LAT-2 i $\text{y}^+\text{LAT-2}$, però no es requereix per la unió a LAT-1 (Bröer *et al.* 2001).

La proteïna 4F2hc és una proteïna multifuncional. A part de la seva implicació en transport d'aminoàcids s'han descrit altres funcions associades al complex 4F2 com ara l'activació, la proliferació, l'adhesió, la fusió i la diferenciació cel·lular. Així, diversos estudis han demostrat inducció de l'expressió de 4F2hc en cèl·lules limfocítiques i càncers, suggerint per 4F2hc un paper en creixement cel·lular i malignitat (Devés and Boyd 2000; Chillarón *et al.* 2001). Fins al moment però es desconeix si aquest efecte té a veure amb la funció de 4F2hc com a transportador d'aminoàcids o amb una funció encara desconeguda. També s'ha descrit un paper per 4F2hc en la funció de les integrines. 4F2hc ha estat identificada com a proteïna

INTRODUCCIÓ

reguladora de l'activació de les integrines i involucrada en la senyalització intracel·lular per integrines, degut a la seva capacitat de complementar la supressió dominant de l'activitat d'un complex quimèric d'integrina (Fenczik *et al.* 1997). Aquests treballs han suggerit que el domini N-terminal de 4F2hc està associat intracel·lularment amb el domini C-terminal de les subunitats β de les integrines (Fenczik *et al.* 2001). Per altra banda, 4F2hc sembla jugar un paper important en la fusió cel·lular induïda per infecció vírica (Tsurudome and Ito 2000).

3.2 SUBUNITATS LLEUGERES DE TRANSPORTADORS D'AMINOÀCIDS HETEROMÈRICS (LSHAT)

Les subunitats lleugeres (*Light Subunits of Heteromeric Amino acid Transporter*, LSHAT) són membres de la família SLC7 (*SoLute Carrier 7*) i formen part (igual que la família CAT) de la gran superfamília de transportadors APC (aminoàcids, poliamines, colina) (Reizer *et al.* 1993; Jack *et al.* 2000). Es troben emmarcats a l'anomenada família LAT (doncs LAT-1 fou el primer membre que se n'identificà), que inclou, a més de les LSHAT de mamífers, LAT-1 de *Xenopus laevis*, la proteïna SPRM1 del platihelmit *Schistosoma mansoni* (L25068), la permeasa de metionina d'alta afinitat MUP1 de llevat (U40316), la hipotètica proteïna MUP3 de llevat (P38734), i diverses proteïnes hipotètiques de *Caenorhabditis elegans* i de *Drosophila melanogaster*.

Fins ara han estat identificats 10 gens paràlegs de LSHAT en vertebrats, com s'indica a la Taula 3. Aquestes subunitats són LAT-1 (Kanai *et al.* 1998; Mastroberardino *et al.* 1998; Nakamura *et al.* 1999; Prasad *et al.* 1999), LAT-2 (Pineda *et al.* 1999; Rossier *et al.* 1999; Segawa *et al.* 1999; Rajan *et al.* 2000b), γ^+ LAT-1 (Torrents *et al.* 1998; Pfeiffer *et al.* 1999b), γ^+ LAT-2 (Torrents *et al.* 1998; Pfeiffer *et al.* 1999b), $b^{0,+}$ AT (objecte d'aquesta tesi) (article 2)(Chairoungdua *et al.* 1999; Pfeiffer *et al.* 1999a; Rajan *et al.* 1999), asc-1 (Fukasawa *et al.* 2000; Nakauchi *et al.* 2000), xCT (Sato *et al.* 1999; Sato *et al.* 2000; Bassi *et al.* 2001; Bridges *et al.* 2001), asc-2 (Chairoungdua *et al.* 2001) i AGT-1 (Matsuo *et al.* 2002) i arpAT (E. Fernández, manuscrit en preparació). La taula 3 mostra les principals característiques de cadascuna d'aquestes proteïnes, on el nombre d'aminoàcids correspon a la proteïna humana (tret d'asc-2, per la qual fins ara només s'ha descrit la proteïna de ratolí).

Acrònim	Gen	Cromosoma humana	Núm. AA, M Mol.	Localització	HSHAT associada	Sistema de transport	Malaltia associada
LAT-1	<i>SLC7A5</i>	16q24.3	507 55 kDa	ovari, placenta, cervell > melsa, testicles > ubiqua	4F2hc	L	
LAT-2	<i>SLC7A8</i>	14q11.2	535 59 kDa	túbul proximal renal >> placenta > cervell, fetge > melsa, múscul esquelètic, cor, intestí prim, pulmó	4F2hc	L	
γ^+ LAT-1	<i>SLC7A7</i>	14q11.2	511 56 kDa	intestí prim, ronyó >> epidídim > molts altres teixits	4F2hc	γ^+ L	LPI
γ^+ LAT-2	<i>SLC7A6</i>	16q22.1-2	515 56 kDa	ubiqua	4F2hc	γ^+ L	
asc-1	<i>SLC7A10</i>	19q13.1	523 53 kDa	cervell, placenta, cor, ronyó, intestí prim, múscul esquelètic	4F2hc	asc	
xCT	<i>SLC7A11</i>	4q28-32	501 55 kDa	macròfags activats, cèl·lules en cultiu, cervell	4F2hc	x ^c	
$b^{0,+}$ AT	<i>SLC7A9</i>	19q13.1	487 54 kDa	intestí prim, túbul proximal renal (S1 > S2) > pulmó, placenta, cervell, timus	rBAT	$b^{0,+}$	Cistinúria
arpAT	<i>Slca14</i>			cervell i intestí prim	rBAT	nou	
asc-2	<i>Slc7a12</i>		465 51 kDa	túbul col·lector renal, múscul esquelètic, pulmó, eritròcits	Y	asc	
AGT-1	<i>SLCA13</i>	8q21.3	470 51 kDa	túbuls proximal i distal renals	Y/Z	nou	

Taula 3. Principals característiques de les LSHAT conegudes. S'indiquen les subunitats lleugeres amb les corresponents subunitats pesades conegudes fins al moment en la família HAT. Es mostra el nom de la proteïna, el nom del gen, la localització cromosòmica humana, el sistema de transport induït, i la malaltia associada a mutacions en el corresponent transportador. X representa una hipotètica LSHAT no identificada, diferent de les altres (veure l'apartat 17.4.3 de la Discussió General). Y representa una HSHAT no identificada diferent de 4F2hc i rBAT. Y/Z representa l'esmentada Y o encara una altra HSHAT diferent de les anteriors. AA, aminoàcids. MMol, massa molecular. Modificada i ampliada de Verrey *et al.* (1999) i Palacín *et al.* (2000).

La identitat de seqüència entre els diferents paràlegs de mamífers va del 19 al 70% i la dels ortòlegs de mamífers, del 69 al 98%. En la Figura 6 es representa l'arbre filogenètic d'aquests membres. Sis subunitats lleugeres (y^+ LAT-1, y^+ LAT-2, LAT-1, LAT-2, asc-1 i xCT) s'uneixen a 4F2hc, $b^{0,+}$ AT s'uneix a rBAT (revisat a Chillarón *et al.*, 2001) i les subunitats asc-2 i AGT-1 no s'uneixen a les subunitats pesades descrites fins al moment (Chairoungdua *et al.* 2001; Matsuo *et al.* 2002).

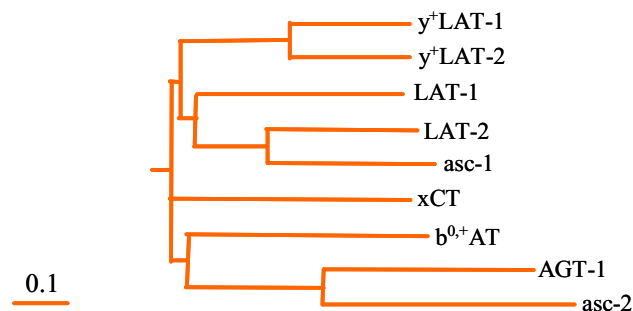


Figura 6. Arbre filogenètic dels membres de la família LSHAT. L'arbre filogenètic ha estat realitzat a partir de les seqüència de ratolí d'asc-2 i les seqüències humanes de la resta de membres de la família LSHAT.

Les LSHAT estan formades per 12 segments TM putatius (revisat a Chillarón *et al.*, 2001; Palacín *et al.*, 2001). Fins ara han estat resoltes amb alta resolució bé mitjançant cristalls 2D, 3D o per altres aproximacions menys de 50 proteïnes integrals de membrana. Destaquen en l'àmbit dels transportadors de membrana i canals proteïnes com la aquaporina (Murata *et al.* 2000), canals bacterians de potassi (Jiang *et al.* 2002) i de clor (Dutzler *et al.* 2002), permeasa de lactosa (Sorgen *et al.* 2002), representants procariotes de la gran superfamília de transportadors ABC (Chang and Roth 2001) i en menor resolució representants de la superfamília de facilitadors (MFS) (Hirai *et al.* 2002). Cap d'aquests transportadors no presenta homologia significativa amb els membres de la superfamília de transportadors d'aminoàcids/poliamines/colina (APC), a la qual pertanyen les LSHAT (Jack *et al.* 2000; Chillarón *et al.* 2001). El model elegit pel nostre grup per a l'elucidació de la topologia a la membrana de les LSHAT ha estat la subunitat lleugera xCT (Bassi *et al.* 2001). Això es deu a què el grau d'expressió de transport d'aminoàcids (glutamat i cistina en aquest cas) sobre l'activitat basal en sistemes d'expressió (oòcits o cèl·lules transfectades) de xCT i 4F2hc és el major dels membres de la família de transportadors HAT estudiats pel nostre grup (que inclou LAT-1, LAT-2, asc-1, $b^{0,+}$ AT, y^+ LAT-1, y^+ LAT-2, i arpAT). La coexpressió de 4F2hc i xCT en oòcits o cèl·lules transfectades induïx l'activitat de transport x_c^- , caracteritzada per l'intercanvi electroneutre de glutamat i cistina, ambdós en forma aniònica (Bassi *et al.* 2001). Per fer aquest estudi Emma Gasol utilitzà l'estratègia d'accessibilitat de residus de cistina desenvolupada per a estudiar el transportador de glutamat GLT-1 (Grunewald *et al.* 1998). Per això va construir un transportador xCT sense cisteïnes (*cysless*) que manté un ~30% de l'activitat del transportador salvatge en cèl·lules HeLa transfectades. Aquests estudis van corroborar que xCT, i en general totes les LSHAT, que presenten una identitat de seqüència d'aminoàcids de ~40% amb xCT, presenten una topologia de 12 segments TM amb els extrems N- i C-terminals situats intracel·lularment. (figura 4), extrems N- i C-terminals situats intracel·lularment, resultats compatibles amb el model proposat pels programes de predicció d'estructura (p.e. HMMTOP) (Gasol *et al.* 2004). Mitjançant immunodetecció també es demostrà la localització intracel·lular dels extrems N i C-terminal (Gasol *et al.* 2004).

Els membres de la família LSHAT presenten una sèrie de característiques comunes (Chillarón *et al.*, 2001):

- Les LSHAT són proteïnes d'uns 500 aminoàcids, no glicosilades i presenten una topologia de 12 segments TM amb els extrems N- i C-terminals situats intracel·lularment (Gasol *et al.* 2004) tal com es representa a la figura 4 (veure Discussió General).
- Totes les LSHAT de vertebrats descrites (i algun altre membre no vertebrat de la família LAT) conserven una cisteïna al segon llaç extracel·lular putatiu, que forma el pont disulfur amb un altre residu de cisteïna de la corresponent subunitat pesada. (figura 4). Malgrat que existeixen evidències de la formació d'aquests heterodímers funcionals per expressió d'aquestes proteïnes en sistemes heteròlegs, l'heterodimerització en teixits només s'ha demostrat per 4F2hc/LAT-1, 4F2hc/LAT-2 i rBAT/ $b^{0,+}$ AT (Mannion *et al.* 1998; Merlin *et al.* 2001; Fernández *et al.* 2002).
- Des de la identificació de les primeres LSHAT se sap que la seva expressió en la membrana plasmàtica en sistemes heteròlegs depèn de la seva interacció amb la corresponent HSHAT

INTRODUCCIÓ

(Mastroberardino *et al.* 1998; Torrents *et al.* 1998), malgrat que el pont disulfur no és imprescindible per a la seva associació. Per tant, altres interaccions no covalents són suficients perquè l'heterodímer es localitzi a la superfície cel·lular (Pfeiffer *et al.* 1998; Nakamura *et al.* 1999). Es desconeixen els determinants estructurals que retenen a les subunitats dels HAT en el reticle endoplasmàtic quan s'expressen per separat. Contràriament a les LSHAT, que necessiten unir-se a la subunitat pesada per arribar a la membrana, almenys 4F2hc, és capaç d'arribar sol a la membrana, probablement gràcies a la interacció amb subunitats lleugeres endògenes (Mastroberardino *et al.* 1998; Pfeiffer *et al.* 1998; Torrents *et al.* 1998; Nakamura *et al.* 1999; Pfeiffer *et al.* 1999b; Rossier *et al.* 1999). rBAT, en canvi, necessita la presència de b⁰⁺AT per arribar a la membrana en cèl·lules COS transfectades (article 2). La presència de b⁰⁺AT estabilitzava la proteïna rBAT i permet l'aparició de la seva forma madura (Reig *et al.* 2002). Estudis realitzats en cèl·lules MDCK transfectades establement, han demostrat que rBAT i b⁰⁺AT es necessiten mútuament per assolir la membrana apical d'aquestes cèl·lules, i fent estudis de marcatge metabòlic han demostrat que la presència de b⁰⁺AT és necessària per la maduració de les N-glicosilacions de rBAT i també per la seva estabilitat, mentre que la proteïna b⁰⁺AT sola és estable en absència de rBAT (Bauch and Verrey 2002).

- Les LSHAT són la subunitat que dona especificitat de transport al complex heteromèric (revisat a Chillarón *et al.*, 2001). A més, s'ha demostrat que la subunitat b⁰⁺AT és funcional en absència de rBAT en un sistema reconstituït (Reig *et al.* 2002).
- Es comporten com a intercanviadors. Els membres LAT-1, LAT-2, y⁺LAT-1, y⁺LAT-2, xCT i b⁰⁺AT han estat descrits com a intercanviadors obligatoris, mentre que els membres asc-1 i asc-2 transporten per intercanvi i difusió (veure més avall).

Seguidament es fa una breu descripció de cadascun dels membres de la família de les subunitats lleugeres de transportadors d'aminoàcids heteromèrics.

3.2.1 LAT-1 (SLC7A5)

LAT-1 va ser el primer membre de la família de les LSHAT clonat de manera independentment i simultània per dos grups (Kanai *et al.* 1998; Mastroberardino *et al.* 1998), com a subunitat de 4F2hc. L'ortòleg de rata va ser clonat usant expressió funcional en oòcits (Kanai *et al.* 1998), mentre que LAT-1 de *Xenopus* ja havia estat clonat com a missatger induïble per aldosterona (Spindler *et al.* 1997) i la seva associació funcional amb 4F2hc va evidenciar-se per coexpressió (Mastroberardino *et al.* 1998). Per altra banda, altres grups identificaren LAT-1 com a subunitat de l'antigen de superfície CD98 {Mannion, 1998 #1259}{Nakamura, 1999 #750}{Tsurudome, 1999 #1258}.

LAT-1 s'expressa àmpliament en teixits com cervell, melsa, timus, pell, fetge, placenta, múscul esquelètic i estómac (Kanai *et al.* 1998; Nakamura *et al.* 1999; Prasad *et al.* 1999). En cervell, l'expressió de LAT-1 es concentra a les cèl·lules endotelials que formen la barrera hematoencefàlica (Boado *et al.* 1999; Yanagida *et al.* 2001). Per altra banda, LAT-1 s'expressa en moltes línies cel·lulars tumorals, en cèl·lules en proliferació i en tumors primaris humans: S'ha observat un augment a l'expressió de LAT-1 i al transport del sistema L a cèl·lules d'hepatoma de rata en resposta a l'escassetat d'arginina. L'expressió de LAT-1 es modula en funció de la disponibilitat de nutrients i s'ha proposat per aquesta proteïna una funció important en cèl·lules en creixement (Shultz *et al.* 1999; Campbell *et al.* 2000). També s'ha vist que la seva expressió és més gran en cèl·lules tumorals que en els corresponents teixits adults (Wolf *et al.* 1996). Aquests i altres estudis semblen indicar que LAT-1 pot tenir un paper a la proliferació i el creixement tumoral (Gaugitsch *et al.* 1992; Wolf *et al.* 1996; Campbell and Thompson 2001; Yanagida *et al.* 2001).

La coexpressió de 4F2hc/LAT-1 en oòcits de *Xenopus* induïx un transport d'aminoàcids neutres de cadena ramificada i aromàtica independent de Na⁺. La seva afinitat intracel·lular i extracel·lular per a diversos substrats és diferent. Presenta elevada afinitat pels substrats extracel·lulars (rang micromolar) (Kanai *et al.* 1998; Mastroberardino *et al.* 1998; Prasad *et al.* 1999), mentre que l'afinitat pels substrats intracel·lulars és molt menor. Per tant no media el flux net d'aminoàcids, però pot modificar la concentració cel·lular de cadascun en concret (Meier *et al.* 2002). Es tracta de la variant L1 del sistema L prèviament descrita (Weissbach *et al.* 1982). Aquest transport és independent de Cl⁻ i Na⁺, és inhibït per l'àcid 2-amino-(2,2,1)-heptà-2-carboxílic (BCH), i té un mecanisme d'intercanviador obligatori amb estequiometria 1:1, almenys quan s'expressa a oòcits de *Xenopus* (Mastroberardino *et al.* 1998; Meier *et al.* 2002).

3.2.2 LAT-2 (SLC7A8)

El 1999 els doctors David Torrents i Esperanza Fernández va clonar LAT-2 *in silico* per homologia a membres d'aquesta família. Presentava alta homologia amb LAT-1, major que amb γ^+ LAT-1 o γ^+ LAT-2, fet que va fer hipotetitzar que induïrien activitats similars. L'expressió en oòcits de *Xenopus* de LAT-2 sol o acompanyat amb 4F2hc induïa un transport d'aminoàcids neutres independent de sodi, però no d'aminoàcids bàsics, com s'havia observat per LAT-1. Per estudis posteriors d'inhibició del transport fets per la doctora Esperanza Fernández es va poder concloure que es tractava d'una altra isoforma del sistema L que intercanvia aminoàcids neutres (entre ells cisteïna) amb una àmplia especificitat. Per *Northern* i hibridació *in situ* va observar que s'expressava molt a ronyó (localitzant-se en el túbul proximal), placenta, cervell, fetge i múscul esquelètic.

El cDNA de LAT-2 comprenia 3733 pb amb una ORF que codificava per 535 aminoàcids. Els estudis d'hidrofobicitat predigueren per a la proteïna una estructura de 12 dominis transmembrana, amb els extrems N- i C-terminalis citoplasmàtics, tal com s'havia descrit per la resta de membres identificats de la família (Kanai *et al.* 1998; Mastroberardino *et al.* 1998; Torrents *et al.* 1998). La seqüència d'aminoàcids presentava 50%, 44% i 45% d'identitat amb LAT-1, γ^+ LAT-1 i γ^+ LAT-2, respectivament. Per tant, LAT-2 esdevenia el quart membre clonat de la família de subunitats lleugeres de transportadors heteromèrics d'aminoàcids.

El mapatge cromosòmic del gen de LAT-2, anomenat *SLC7A8*, el realitzà Esperanza Fernández utilitzant híbrids de radiació. Es determinà que el gen es trobava a 13 cR (~286 Kb) del marcador *D14S1349*. El marcador centromèric més proper a aquest, *X52889*, es trobava a 14q11.2-13. Per tant, *SLC7A8* es localitzava molt proper al gen de γ^+ LAT-1 (*SLC7A7*, mutat a LPI) en el genoma, tal com s'esquematitza en la figura 7.

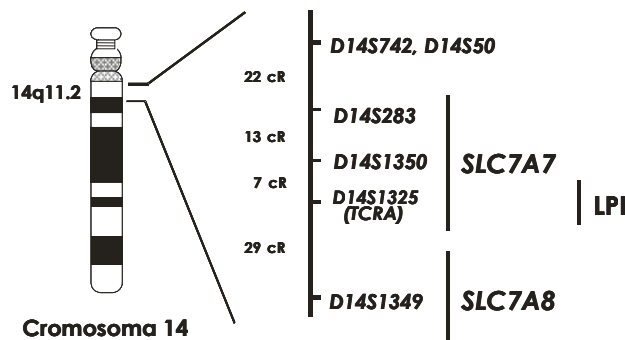


Figura 7. Mapatge cromosòmic de *SLC7A8*, el gen de LAT-2. Les posicions relatives i distàncies entre marcadors s'han obtingut del *Stanford Human Genome Center*. cR, centirradiants.

LAT-2 s'expressa molt en epitelí polaritzat, la qual cosa suggeria un paper important al transport transepitelial d'aminoàcids (Bassi *et al.* 1999; Pineda *et al.* 1999; Rossier *et al.* 1999; Segawa *et al.* 1999; Rajan *et al.* 2000b). Es localitza a la membrana basolateral i sabem que 4F2hc/LAT-2 participa en el pas transepitelial (apical a basolateral) de cistina (Fernández *et al.* 2002) (veure apartat 3.4 i Discussió General). El seu mRNA s'ha trobat principalment a ronyó i placenta, i en quantitats més baixes a cervell, fetge, melsa, múscul esquelètic, cor, intestí prim i pulmó (Pineda *et al.* 1999; Rossier *et al.* 1999; Segawa *et al.* 1999). Desconeixem la seva funció a múscul esquelètic i cor, on té una notable expressió (Pineda *et al.* 1999). Com LAT-1, LAT-2 també és un transportador independent de Na^+ per aminoàcids neutres, però té una especificitat de substrat més àmplia, acceptant α -aminoàcids neutres de qualsevol mida, amb valors de K_m entre 30 i 300 μM . Aquestes característiques coincideixen amb la variant L2 descrita a hepatòcits (Weissbach *et al.* 1982). Curiosament, la proteïna humana funciona com un intercanviador obligatori (Pineda *et al.* 1999; Rossier *et al.* 1999), mentre que la de rata no es veu afectada per la presència de substrats al costat *trans* (Segawa *et al.* 1999). Recentment, s'ha observat que l'expressió del mRNA i de proteïna de LAT-2 en ratolí en intestí prim es localitza a la membrana basolateral dels enteròcits del jejú, principalment, però també del duodè i l'ili, i s'observa un fort gradient d'expressió decreixent, des de la punta dels vili fins a la cripta. També s'ha observat força expressió en la membrana basolateral de les cèl·lules parietals de l'estómac positives per ATPasa H^+/K^+ , que és un òrgan on no s'havia descrit prèviament que tingués un paper en l'absorció d'aminoàcids (Dave *et al.* 2004).

Aquest transportador media l'intercanvi d'aminoàcids neutres de qualsevol mida a través de la membrana.

INTRODUCCIÓ

La manca de substrats amb càrrega feia difícil predir quins aminoàcids entren o surten en balanç net de la cèl·lula per aquest transportador. Aquesta situació és diferent en el cas dels transportadors rBAT/ b^{0,+}AT i 4F2hc/y⁺LAT-1 on els aminoàcids bàsics entren a la cèl·lula a través del primer transportador a favor de gradient elèctric i surten a través del segon gràcies al gradient electroquímic de Na⁺ (figura 8, apartat 3.4). La reducció parcial de l'expressió de LAT-2 en les cèl·lules OK ha mostrat que LAT-2 facilita la sortida neta de cisteïna i l'entrada neta d'alanina, serina i treonina (Fernández *et al.* 2003). Això probablement era degut a la particular concentració d'aminoàcids en l'interior de la cèl·lula OK, que deriva del seu metabolisme i de la dotació de transportadors d'aminoàcids. Per això no podem predir el seu paper fisiològic en un altre tipus cel·lular.

En la present tesi s'ha fet un anàlisi de mutacions d'aquest gen en pacients de cistinúria per tal d'estudiar la possible implicació d'aquest transportador en cistinúria. També s'ha generat un ratolí *knockout* de *Slc7a8* per conèixer la fisiologia d'aquest transportador (encara no s'han aconseguit heterozigots de 456 cries dels creuaments en quimeres, veure apartat 15.5).

3.2.3 y⁺LAT-1 (SLC7A7)

El cDNA humà de y⁺LAT-1 va ser identificat per la seva homologia (52%) amb la proteïna ASUR4. Fins al moment, s'han descrit els cDNA corresponents a humà, rata, ratolí i sariga (Torrents *et al.* 1998; Pfeiffer *et al.* 1999b; Kanai *et al.* 2000; Fernández *et al.* 2003). El gen SLC7A7 es va localitzar a 14q11-13 per anàlisi de lligament (veure figura 7). La seqüència humana de y⁺LAT-1 codifica una proteïna de 511 aminoàcids amb un pes molecular de ~56 kDa (Torrents *et al.* 1998; Pfeiffer *et al.* 1999b). El missatger humà es troba principalment a ronyó i intestí prim i, en menor grau, a leucòcits de sang perifèrica, fetge, pàncrees, epidídim, tiroide, placenta, pulmó, melsa, testicle i ovari (Torrents *et al.* 1998; Pfeiffer *et al.* 1999b). Per experiments d'immunohistoquímica, s'ha observat que la proteïna de ratolí es localitza a la membrana basolateral de les cèl·lules epitelials d'intestí i ronyó, on mostra un gradient decreixent d'expressió des de S1 a S3 del túbul contornejat proximal (Bauch *et al.* 2003) com LAT-2 i b^{0,+}AT (Pfeiffer *et al.* 1999a; Rossier *et al.* 1999). S'ha observat que l'expressió del mRNA i de proteïna de y⁺LAT-1 en ratolí colocalitza amb 4F2hc a la membrana basolateral dels enteròcits del jejú, i ili i en menor grau al duodè. Com a LAT-2, s'observa un fort gradient d'expressió decreixent, des de la punta dels vili fins a la cripta i no totes les cèl·lules expressen y⁺LAT-1. A més, es perd colocalització amb 4F2hc cap a la base del vili, degut probablement a diferències d'expressió (Dave *et al.* 2004).

L'expressió de 4F2hc/y⁺LAT-1 indueix en oòcits activitat de tipus y⁺L, i es caracteritza per un intercanvi obligatori entre aminoàcids dibàsics sense Na⁺ i aminoàcids neutres amb Na⁺ (Torrents *et al.* 1998; Pfeiffer *et al.* 1999b; Kanai *et al.* 2000). El Na⁺ incrementa l'afinitat pels aminoàcids neutres sense alterar la velocitat màxima del transportador (Kanai *et al.* 2000). y⁺LAT-1 té una estequiometria pels aminoàcids transportats 1:1, i el Na⁺ és cotransportat juntament amb els aminoàcids neutres, també amb estequiometria 1:1 (Kanai *et al.* 2000).

L'expressió de y⁺LAT-1 suggereix que aquesta proteïna podia ser la responsable de la sortida d'aminoàcids bàsics a través de la membrana basolateral de les cèl·lules epitelials (Torrents *et al.* 1998; Pfeiffer *et al.* 1999b). Sembla que y⁺LAT-1 intervé preferentment en la sortida d'arginina, la qual cosa podria ser important al ronyó, on l'arginina es produeix a partir de la citrulina i s'allibera a la sang per subministrarla a la resta del cos. El fet que mutacions a y⁺LAT-1 causin la malaltia recessiva de lisinúria amb intolerància a proteïnes (LPI; veure l'apartat 4.1.2 d'aquesta introducció) (Borsani *et al.* 1999; Torrents *et al.* 1999) evidencia aquest fet.

3.2.4 y⁺LAT-2 (SLC7A6)

La proteïna y⁺LAT-2 va ser clonada a partir de mieloblasts humans KG-1 (Nagase *et al.* 1996), posteriorment s'identificà com a membre de la família LSHAT perquè presentava homologia amb LAT-1 (Torrents *et al.* 1998; Pfeiffer *et al.* 1999b). El seu mRNA s'ha detectat sobretot a cervell (tant en neurones com en astròcits), però també a testicles i glàndula paròtida, i menys intensament a intestí prim, ronyó i cor, i molt feblement a pulmó i fetge (Bröer *et al.* 2000). L'expressió a cervell és menor en l'adult que en l'embrió, fet que suggereix una possible regulació de la seva expressió durant el desenvolupament (Bröer *et al.* 2000).

L'expressió de 4F2hc/y⁺LAT-2 indueix activitat y⁺L en oòcits. y⁺LAT-2 presenta el mateix mecanisme de transport que y⁺LAT-1, però amb una afinitat elevada però una mica menor, i una especificitat de substrat diferent i més àmplia que y⁺LAT-1 (a més d'aminoàcids catiónics, prefereix aminoàcids neutres amb

cadena lateral voluminosa) {Torrents, 1998 #1049}{Bröer, 2000 #1272}. El transport induït té una estequiometria d'intercanvi 1:1 (Bröer *et al.* 2000). Presenta una gran asimetria: mentre que l'arginina és un bon substrat per a l'entrada i la sortida de la cèl·lula, la leucina i la glutamina són fàcilment captades però difícilment alliberades de la cèl·lula. Per això s'ha suggerit que podria participar en la transferència d'arginina i glutamina al cervell i altres teixits (Bröer *et al.* 2000), però el paper fisiològic d'aquest transportador encara no és clar.

3.2.5 $b^{0,+}$ AT (SLC7A9)

És l'única LSHAT descrita fins el moment que s'uneix a rBAT en humans per al seu tràfic a la membrana plasmàtica. La subunitat $b^{0,+}$ AT va ser identificada per homologia amb els membres de la família LSHAT clonats anteriorment (article 2) (Chairoungdua *et al.* 1999; Pfeiffer *et al.* 1999a). El mRNA de $b^{0,+}$ AT humà s'expressa a ronyó i intestí prim, i en menor quantitat en cor, fetge, placenta, pulmó, cervell i testicle (article 2) (Chairoungdua *et al.* 1999; Pfeiffer *et al.* 1999a; Mizoguchi *et al.* 2001). La proteïna s'ha localitzat a la membrana apical de les cèl·lules epitelials d'intestí i ronyó, on l'expressió disminueix des del segment S1 a S3 del túbul proximal (Mizoguchi *et al.* 2001; Bauch *et al.* 2003). S'ha demostrat que rBAT i $b^{0,+}$ AT heterodimeritzen en les membranes apicals de ronyó humà i de ratolí (Fernández *et al.* 2002). El de rata s'ha localitzat a ronyó, jejú i ili (Chairoungdua *et al.* 1999), i el de conill a ronyó i intestí (Rajan *et al.* 1999).

L'expressió de rBAT/ $b^{0,+}$ AT indueix en sistemes heteròlegs activitat de transport de tipus $b^{0,+}$ -like (article 2) (Chairoungdua *et al.* 1999; Pfeiffer *et al.* 1999a), descrita inicialment per rBAT expressat en oòcits de *Xenopus* (Bertran *et al.* 1992b; Tate *et al.* 1992; Wells and Hediger 1992). És un intercanviador obligatori independent de Na^+ d'aminoàcids neutres i bàsics. L'afinitat pels aminoàcids bàsics és major que pels aminoàcids neutres (Pfeiffer *et al.* 1999a), i el potencial negatiu de membrana afavoreix l'entrada d'aminoàcids bàsics a canvi dels aminoàcids neutres. El fort gradient electroquímic de cistina també afavoreix la seva entrada. El transport independent de sodi de cistina i aminoàcids bàsics presenta una constant d'afinitat $< 50 \mu M$, mentre que l'afinitat pels aminoàcids neutres és $> 300 \mu M$ (article 2). El transport obeeix a un mecanisme d'intercanvi obligatori per aminoàcids bàsics i neutres amb estequiometria 1:1, i asimetria en l'afinitat pels substrats a ambdós costats de la membrana (Reig *et al.* 2002).

Tant rBAT com $b^{0,+}$ AT s'expressen a la membrana de l'epiteli en raspall (microvil·li) del túbul proximal de la nefrona, però mentre que l'expressió de rBAT augmenta des del segment S1 al segment S3 de la nefrona (Furriols *et al.* 1993; Pickel *et al.* 1993; Mosckovitz *et al.* 1994), la de $b^{0,+}$ AT presenta el gradient d'expressió oposat (Chairoungdua *et al.* 1999; Pfeiffer *et al.* 1999a; Rajan *et al.* 2000a; Mizoguchi *et al.* 2001). Aquest fet suggereix que rBAT i $b^{0,+}$ AT podrien interaccionar amb altres subunitats *in vivo*.

Mutacions en el gen *SLC7A9* causen cistinúria de tipus no I principalment, demostrant així el paper de $b^{0,+}$ AT en la reabsorció apical de cistina i aminoàcids bàsics (article 2). Per altra banda, s'ha demostrat que la subunitat $b^{0,+}$ AT és plenament funcional en absència de rBAT, demostrant que $b^{0,+}$ AT és la subunitat catalítica d'aquest transportador heteromèric (Reig *et al.* 2002).

La clonació del gen *SLC7A9*, que codifica per la proteïna $b^{0,+}$ AT, el patró d'expressió, la cerca de mutacions en aquest gen en pacients de cistinúria, les característiques de transport i el paper en la reabsorció d'aminoàcids i en la cistinúria es tractaran les seccions de Resultats i Discussió, i Discussió General d'aquesta tesi.

3.2.6 xCT (SLC7A11)

El transportador xCT de ratolí s'identificà per expressió funcional, juntament amb 4F2hc, en oòcits de *Xenopus* a partir de RNA de macròfags activats (Sato *et al.* 1999), mentre que l'ortòleg humà s'identificà per homologia amb altres membres clonats de la família LSHAT (Bassi *et al.* 2001). L'expressió de 4F2hc/ xCT en oòcits de *Xenopus* indueix activitat x_c^- , caracteritzada per l'intercanvi obligatori electroneutre d'aminoàcids aniònics independent de Na^+ i d'alta afinitat, amb una estequiometria d'intercanvi 1:1 (Sato *et al.* 1999; Bassi *et al.* 2001; Bridges *et al.* 2001). Aquesta activitat és responsable de l'entrada de cistina i sortida de glutamat, pel fet que la concentració intracel·lular és baixa per la cistina i elevada pel glutamat. L'entrada de cistina a la cèl·lula provoca la seva reducció a cisteïna, que s'incorpora a la síntesi de proteïnes i glutatió. L'activitat del sistema x_c^- té un paper fisiològic directe en la regulació de la concentració intracel·lular de glutatió reduït (Bannai and Tateishi 1986). 4F2hc/ xCT juga un paper important en la protecció contra l'estrès oxidatiu cel·lular, molt documentat en neurones,

INTRODUCCIÓ

ajudant a combatre la cèl·lula contra els radicals lliures (Christensen 1990). L'exposició de les cèl·lules a agents químics o tractaments que disminueixen els nivells intracel·lulars de glutatió activen la transcripció de xCT (Sato *et al.* 1999; Bridges *et al.* 2001; Sato *et al.* 2001). Així, els lipopolisacàrids, l'estrès químic o l'òxid nítric s'ha demostrat que indueixen l'expressió de xCT en macròfags i cèl·lules pigmentades de la retina (Sato *et al.* 1999; Bridges *et al.* 2001), efecte que és modulats per la concentració d'oxigen (Bridges *et al.* 2001).

El missatger d'xCT de ratolí s'expressa fonamentalment a macròfags activats, cervell (àrea hipotalàmica i meninges), medul·la espinal i pàncrees i amb menys intensitat en fetge, intestí, ovari, ronyó, pulmó, illots pancreàtics i les línies cel·lulars tumorals Caco-2 i HepG2 (Sato *et al.* 1999; Bassi *et al.* 2001; Kim *et al.* 2001b; Sato *et al.* 2002). També l'activitat del sistema Xc⁻ s'ha vist induïda per estrès químic o físic en macròfags, hepatòcits, fibroblasts, neurones i cèl·lules de la glia, ronyó i pàncrees (Ishii *et al.* 1992; Sato *et al.* 1998).

El model elegit pel nostre grup per a l'elucidació de la topologia a la membrana de les LSHAT ha estat la subunitat lleugera xCT, ja que el grau d'expressió de transport d'aminoàcids (glutamat i cistina en aquest cas) sobre l'activitat basal en sistemes d'expressió (oòcits o cèl·lules transfectades) de xCT i 4F2hc és el major dels membres de la família de transportadors HAT. També s'ha utilitzat xCT per realitzar estudis per identificar els residus rellevants per l'activitat catalítica en les LSHAT.

3.2.7 asc-1 (*SLC7A10*)

Asc-1 va ser identificada per homologia amb LAT-2 a partir d'una llibreria de cDNA de cervell de ratolí (Fukasawa *et al.* 2000). Les seqüències de ratolí i humana codifiquen per una proteïna de 530 i 523 aminoàcids respectivament amb un pes molecular aparent de ~53 kDa i una identitat del 91% entre les dues espècies. L'mRNA d'asc-1 es troba sobretot a ronyó i cervell, però també a placenta, cor, múscul esquelètic, pulmó, fetge i pàncrees humans (Nakauchi *et al.* 2000). L'expressió d'asc-1 i 4F2hc en oòcits de *X. laevis* indueix el transport d'alta afinitat independent de Na⁺ d'L- i D-aminoàcids neutres de cadena curta, com la L-alanina, L-serina, L-cisteïna, L-glicina i L-treonina (sistema asc), i s'inhibeix per l'àcid α-aminoisobutíric (AIB) i la β-alanina, que també es transporten (Fukasawa *et al.* 2000). A diferència de la majoria de LSHAT, asc-1/4F2hc, a més d'intercanviar, és capaç d'induir l'uniport d'aminoàcids a oòcits de *Xenopus*; no és per tant un intercanviador obligatori (Nakauchi *et al.* 2000). Aquest doble comportament ja ha estat descrit pel transportador d'anions orgànics OAT1 (Sekine *et al.* 1997) i pel transportador de glutamat GLT-1 que mitjança el transport dependent de K⁺ i l'intercanvi independent de K⁺ (Zerangue and Kavanaugh 1996; Kavanaugh *et al.* 1997). Les característiques del transport són similars a un dels dos subtipus de l'activitat de transport asc ja descrit en eritròcits (Fincham *et al.* 1985). El transport de D-serina a concentració fisiològica podria jugar un paper important al sistema nerviós central, ja que la serina actua com a modulador endogen dels receptors de glutamat de tipus NMDA. És possible que la mobilització de D-serina a través d'asc-1 a les zones glutamatèrgiques tingui un paper en la regulació de la transmissió sinàptica (Nakauchi *et al.* 2000).

El gen corresponent a asc-1, *SLC7A10*, mapa al cromosoma 19q13.1 humana (Nakauchi *et al.* 2000), (i apartats 14.1 de Resultats), dins el locus genètic de la cistinúria de tipus no I. L'estudi genètic d'aquest gen en pacients de cistinúria està detallat a l'apartat 14.1.4 dels Resultats.

3.2.8 asc-2 (*Slc7a12*)

La proteïna asc-2 ha estat identificada com a membre de la família LSHAT degut a la seva homologia (baixa però significant) amb la resta de membres (Chairoungdua *et al.* 2001; Blondeau 2002). Fins a l'actualitat només ha estat identificat el cDNA de ratolí. La proteïna asc-2 s'expressa en ronyó, placenta, pulmó, melsa i múscul esquelètic. Concretament en el ronyó, la proteïna es localitza tant a la membrana apical com basolateral de les cèl·lules epitelials del tub col·lector (Chairoungdua *et al.* 2001).

asc-2 presenta totes les característiques de les LSHAT (inclosa la cisteïna conservada del pont disulfur) però no indueix transport d'aminoàcids quan es coexpressa amb rBAT o 4F2hc en sistemes heteròlegs. La caracterització funcional d'asc-2 s'ha fet utilitzant proteïnes de fusió d'asc-2 connectades a 4F2hc o rBAT. Aquestes proteïnes de fusió s'expressen a la membrana plasmàtica, induint activitat de transport de tipus asc (transport Na⁺-independent d'aminoàcids neutres petits) (Chairoungdua *et al.* 2001). A diferència del transport induït per 4F2hc/asc-1, aquest transport és estereoselectiu i a penes transporta àcid α-aminoisobutíric, D-serina, D-alanina i β-alanina. Així, el subtipus de transport induït per asc-1 correspon a l'identificat a limfòcits de sang perifèrica i hepatòcits (Albi *et al.* 1994), i l'indueït per asc-2, al descrit a

eritròcits (Albi *et al.* 1994; Chairoungdua *et al.* 2001). El seu mRNA es detecta principalment a ronyó, múscul esquelètic i placenta, però també a pulmó i melsa. El mecanisme de transport proposat per asc-2 és d'intercanvi i difusió facilitada (Chairoungdua *et al.* 2001). S'ha suggerit que el transport d'alanina a les cèl·lules del tub col·lector, podria proporcionar el substrat necessari per a la síntesi d'osmòlits (Jans *et al.* 1988; Chairoungdua *et al.* 2001).

Per anàlisi de Western blot d'asc-2 en eritròcits i ronyó en condicions no reductores es detecten múltiples bandes d'elevada massa molecular, mentre que en condicions reductores es detecta una única banda de mida menor. Això suggereix que asc-2 podria associar-se a altres proteïnes per mitjà de pont disulfur. Per tant, sembla que asc-2 s'uniria a una o més cadenes pesades encara no identificades (Chairoungdua *et al.* 2001).

3.2.9 AGT-1 1 (SLC7A13)

AGT-1 es va clonar a partir d'una llibreria de cDNA de ronyó de ratolí per la seva homologia amb $b^{0,+}$ AT (Matsuo *et al.* 2002). Posteriorment es va clonar el seu ortòleg humà (Blondeau 2002). Aquest transportador s'expressa a ronyó, concretament a la membrana basolateral del túbul proximal recte i del túbul distal (Blondeau 2002; Matsuo *et al.* 2002). AGT-1 és l'última de les LSHAT descrites fins ara, i presenta elevada homologia amb asc-2 (48% d'identitat entre les proteïnes de ratolí). Com asc-2, AGT-1 no és funcional quan s'expressa amb 4F2hc o rBAT. Per anàlisi de Western blot, AGT-1 es detecta com una banda d'elevada massa molecular en condicions no reductores i com a monòmer en condicions reductores, suggerint que aquesta subunitat lleugera s'uneix a una subunitat pesada, encara no identificada, per pont disulfur (Blondeau 2002; Matsuo *et al.* 2002). Per estudiar l'activitat s'ha analitzat utilitzant proteïnes de fusió d'AGT-1 amb 4F2hc o rBAT. El transport induït a oòcits de *Xenopus* és exclusiu d'aminoàcids àcids (glutamat i aspartat), independent de sodi, amb elevada afinitat i estereoselectiu. A diferència d'xCT, que no té gaire afinitat per l'aspartat, aquest transportador té preferència per les cadenes laterals curtes, i no accepta cistina (Matsuo *et al.* 2002). Aquesta activitat no es correspon amb cap sistema de transport descrit fins el moment, potser a causa de la seva limitada expressió, a la membrana basolateral de les cèl·lules epitelials dels túbuls proximal recte i distal. En aquestes cèl·lules també s'expressa el transportador dependent de Na^+ d'aminoàcids àcids EAMINOÀCID T-3 (=EAMINOÀCID C-1), que pot haver interferit en la identificació d'aquest sistema de transport. Es considera la possibilitat que AGT-1 proporcioni el camí de sortida basolateral als aminoàcids reabsorbits per EAMINOÀCID T-3 (Matsuo *et al.* 2002).

3.2.10 arpAT (Slc7a14)

Estudis recents realitzats pels Drs. J. Chillarón i E. Fernández han identificat en la genoma de ratolí una nova subunitat lleugera de la família LSHAT. L'han cridat arpAT (Aromatic Preferring Amino acid Transporter) i presenta una identitat de seqüència amb la resta de membres de la família del 32-43%. La seva caracterització funcional mostra que indueix transport d'aminoàcids neutres, preferentment aromàtics, independent de sodi, transestimulable, estereoselectiu i de baixa afinitat (E. Fernández, J. Chillarón i M. Palacín, manuscrit en preparació). Podria representar una variant del sistema de transport d'aminoàcids T, ja que es va clonar per RT-PCR a partir de ronyó de ratolí (E. Fernández, Tesi Doctoral). La seva activitat de transport s'indueix tant quan arpAT s'expressa sola com amb rBAT o 4F2hc en cèl·lules HeLa. L'ortòleg humà d'arpAT sembla estar silenciada en el genoma humà (E. Fernández i J. Chillarón, comunicació personal). Experiments de Northern blot presenten senyal d'arpAT a ronyó, intestí prim, cervell, fetge i cor però en augmentar l'astringència de rentat, només apareix expressió a cervell i intestí prim, perdent el senyal a ronyó (E. Fernández, Tesi Doctoral). Experiments d'hibridació in situ semblen confirmar que arpAT no s'expressa a ronyó (E. Fernández i J. Chillarón, comunicació personal).

3.3 CONEIXEMENTS DEL SISTEMA $B^{0,+}$ -LIKE FINS LA CLONACIÓ DE $B^{0,+}$ AT

El sistema $b^{0,+}$ fou descrit l'any 1988 a blastòcits de ratolí com un transport independent de Na^+ d'aminoàcids bàsics i neutres (Van Winkle 1988; Van Winkle *et al.* 1988).

El nostre grup va expressar una activitat independent de Na^+ de transport d'aminoàcids bàsics i neutres en injectar RNA poli(A)⁺ d'escorça renal de conill a oòcits de *X. laevis*. Aïllà el cDNA responsable d'aquesta inducció i anomenà la proteïna rBAT (*related to $b^{0,+}$ amino acid transporter*) (Bertran *et al.* 1992b). El

INTRODUCCIÓ

transport era saturable, amb una K_m per a aminoàcids bàsics i cistina entre 50 i 100 μM , i variable per a aminoàcids neutres, segons la seva cadena lateral. El fet que transportés cistina el distingia del sistema $b^{0,+}$ tal com fou descrit, doncs el sistema de transport de blastòcits no transportava cistina, per això s'anomenà $b^{0,+}$ -like al sistema induït per rBAT. Estudis posteriors demostraren que el sistema de transport induït per rBAT a oòcits actuava com un intercanviador obligatori amb una estequiometria 1:1 (Chillarón *et al.* 1996).

El patró de transferència de Western de la proteïna rBAT expressada al ronyó depèn de la seva manipulació en condicions reductores o no reductores. En absència d'agents reductors, es detecta bandes de 125 kDa i superiors. En presència d'agents reductors, com ara el DTT, aquestes bandes desapareixen per donar lloc a una banda de 94 kDa. Si es tracta l'extracte amb endoglicosidasa F, aquesta banda adopta el pes deduït de la seqüència d'aminoàcids de rBAT (Wang and Tate 1995; Palacín *et al.* 1996b). Tot això indica que rBAT s'uneix mitjançant un pont disulfur (es trenca en condicions reductores) a una altra proteïna de 30-50 kDa. A més, el transport induït per rBAT a oòcits se satura amb baixes quantitats de cRNA injectat, la qual cosa fa pensar que hi ha un altre factor limitant en el transport. El cas de 4F2hc, proteïna homòloga a rBAT i de la qual se sospitava la mateixa estructura heteromultimèrica, aportava dades addicionals. Així, la coinjecció de poli(A)⁺ de pulmó de rata amb el cRNA de 4F2hc, aconsegueix augmentar el transport que se satura a baixes quantitats de 4F2hc, fet que indica que un altre mRNA, aportat pel poli(A)⁺, actua com la subunitat lleugera endògena que limita el transport.

rBAT induïx un transport d'alta afinitat d'aminoàcids bàsics i neutres independent de Na^+ , i alhora és responsable d'un sistema de reabsorció activa d'aminoàcids bàsics, com demostra el defecte renal de la cistinúria. Es van dur a terme experiments de transport amb aminoàcids isotòpics en cèl·lules OK (de túbul proximal de sariga) i en oòcits de *X. laevis*, i electrofisiològics en oòcits (Busch *et al.* 1994; Chillarón *et al.* 1996). Mitjançant experiments d'antisentit, s'havia vist que rBAT és responsable del sistema $b^{0,+}$ -like a cèl·lules OK (Mora *et al.* 1996), i llavors es demostrava que tant al sistema "artificial" de l'oòcit com al "natural" de les cèl·lules OK, rBAT induïx un intercanvi obligatori d'aminoàcids. L'entrada d'aminoàcids bàsics a canvi de la sortida d'aminoàcids neutres està afavorida. Aquest sistema permet l'acumulació d'aminoàcids a la cèl·lula en contra de gradient, ja que utilitza l'alta concentració d'altres aminoàcids a l'interior cel·lular. El sistema y^+L induït a oòcits per 4F2hc, també es comporta com un bescanviador obligatori asimètric, donat que afavoreix la sortida d'aminoàcids bàsics, a canvi de l'entrada d'aminoàcids neutres. rBAT es localitza al domini apical del túbul proximal de la nefrona, amb una expressió que augmenta del segment S1 a l'S3 (Furriols *et al.* 1993; Pickel *et al.* 1993), mentre que 4F2hc se situa a la membrana basolateral del túbul proximal (Quackenbush *et al.* 1986).

3.4 MODEL DE REABSORCIÓ RENAL DE CISTINA I AMINOÀCIDS BÀSICS

Tot això permeté hipotetitzar un model per a la reabsorció al túbul proximal renal d'aminoàcids bàsics i cistina (figura 8). Segons aquest model, la bomba Na^+/K^+ -ATPasa mantindria la concentració de Na^+ intracel·lular baixa i el potencial de membrana negatiu gràcies al consum d'ATP. Els transportadors dependents de Na^+ de la membrana apical aprofitarien aquest gradient de Na^+ per augmentar la concentració intracel·lular d'aminoàcids. El gradient generat d'aminoàcids neutres seria utilitzat pel sistema $b^{0,+}$ -like per a transportar els aminoàcids bàsics i la cistina a l'interior de la cèl·lula de forma activa terciària. La cistina seria ràpidament reduïda a cisteïna dins la cèl·lula, mantenint així el gradient de concentració. La cisteïna abandonaria la cèl·lula mitjançant el sistema L de transport d'aminoàcids neutres de la membrana basolateral. Els aminoàcids bàsics, que havien entrat a favor del potencial de membrana, sortirien per la membrana basolateral utilitzant el sistema y^+L -like (Chillarón *et al.* 1996) (veure Discussió General).

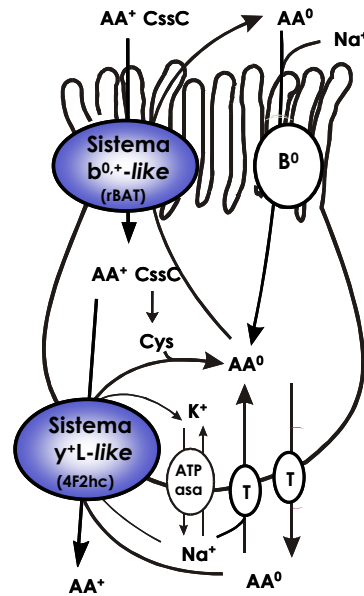


Figura 8. Model de reabsorció renal de cistina i aminoàcids bàsics mitjançant els sistemes $b^{0,+}$ -like i $y+L$ -like. AA^+ , aminoàcids bàsics; AA^0 , aminoàcids neutres; CysC, cistina; ATPasa, bomba Na^+K^+ ATPasa; T, transportadors d'aminoàcids neutres. Redibuixat de Chillarón *et al.* (1996).

4 AMINOACIDÚRIES HEREDITÀRIES PRIMÀRIES

Les aminoacidúries renals es caracteritzen per la hiperexcreció d'un determinat grup d'aminoàcids, degut a un defecte hereditari en el sistema de transport encarregat de la seva reabsorció. A continuació es descriuen les aminoacidúries renals més importants.

4.1 LPI

La lisinúria amb intolerància a proteïnes (LPI) o hiperaminoacidúria dibàsica de tipus 2 (OMIM 222700) és una malaltia hereditària autosòmica recessiva rara, descrita per primera vegada l'any 1965 (Perheentupa and Visakorpi 1965). La LPI està causada per un transport defectiu d'aminoàcids bàsics (lisina, arginina i ornitina) a la membrana basolateral de les cèl·lules epitelials de ronyó i intestí, i és molt poc freqüent: només se'n coneixen 200 pacients, la meitat dels quals provenen de Finlàndia, on la prevalença és d'un de cada 60.000 naixements (Norio *et al.* 1971), també es coneixen agrupacions de famílies en altres llocs, com al sud d'Itàlia i al Japó (revisat a Simell, 2001).

La LPI és una malaltia multisistèmica. Els indicadors determinants per al diagnòstic de LPI són l'aminoacidúria d'aminoàcids bàsics, la hiperamonèmia i els baixos valors d'aminoàcids bàsics en sang (Simell 2001).

4.1.1 Manifestacions clíniques

Tots els pacients de LPI presenten hiperexcreció dels tres aminoàcids bàsics en orina, especialment de lisina (que en ocasions pot arribar a la secreció tubular neta) i moderadament alta d'arginina i ornitina. L'administració *in vivo* d'aminoàcids bàsics en pacients dejunats revelà també un defecte en l'absorció intestinal, més marcat per la lisina que per l'arginina i ornitina (Simell and Perheentupa 1974). S'ha descrit un transport anormal als túbuls renals, l'intestí i probablement els hepatòcits (Simell 1975), però no als eritròcits (Smith *et al.* 1988). Hi ha articles contradictoris sobre el possible defecte als fibroblasts en cultiu (Smith *et al.* 1988; Dall'Asta *et al.* 2000). Els anàlisis a partir de mostres de pacients de LPI van demostrar que la sortida d'aminoàcids bàsics a través de la membrana basolateral de les cèl·lules del túbul renal i de

INTRODUCCIÓ

L'intestí és defectuosa (Desjeux *et al.* 1980; Rajantie *et al.* 1980a; Rajantie *et al.* 1981). Això provoca que les concentracions d'aquests aminoàcids en plasma siguin més baixes i les seves reserves es veuen deplecionades. L'arginina i l'ornitina són intermediaris del cicle de la urea, i la lisina és un aminoàcid essencial. Per això, presenten símptomes de malnutrició, agreujats per la deficiència en l'aminoàcid essencial lisina. Alhora, el fet de patir una depleció d'aminoàcids bàsics provoca una disfunció del cicle de la urea per manca de substrats, amb els conseqüents episodis d'hiperamònemia (Rajantie *et al.* 1980b) i, en conseqüència, tenen nàusees, vòmits i aversió al menjar ric en proteïnes.

Les principals manifestacions clíniques apareixen amb el deslletament, que els provoca episodis d'hiperamònemia, en forma de vòmits i diarrea, i es pot arribar al coma si els pacients són forçats a menjar proteïnes. Els pacients refusen aliments rics en proteïnes, tenen desenvolupament físic retardat, hepatoesplenomegàlia (fetge i la melsa engrandits), hipotonia muscular, cabell escàs i altres símptomes de malnutrició. També és molt comú l'osteoporosi i creixement retardat dels ossos. En alguns casos tenen retard mental moderat. Sovint es presenta insuficiència respiratòria crònica o aguda, acompanyades de proteïnosi alveolar, eritroblastofàgia i anormalitats del sistema immune, o bé altres disfuncions multiorgàniques, entre elles insuficiència renal. La proteïnosi alveolar és una de les manifestacions més dramàtiques de la LPI i pot ser fatal en malalts pediàtrics (revisat a Simell, 2001).

El defecte en el sistema de transport γ^+L explica el bloqueig en l'absorció intestinal i reabsorció renal d'aminoàcids bàsics, ja que no permet que aquests passin a la sang a través de la membrana basolateral, bloquejant llavors l'absorció per la membrana apical. Això explica la causa de la baixa concentració d'aminoàcids bàsics en sang i les manifestacions clíniques que d'aquest fet se'n deriven, com la malnutrició i la hiperamonèmia, però no està clara la causa de la proteïnosi alveolar i altres manifestacions que impliquen cèl·lules del sistema immunitari.

El tractament de la LPI s'ha enfocat en la correcció del defecte funcional del cicle de la urea, per tal d'evitar els episodis d'hiperamònemia: consisteix en una restricció proteica i la suplementació oral de citrulina (Rajantie *et al.* 1980b). Els pacients de LPI absorbeixen correctament aquest aminoàcid neutre, que pot convertir-se en arginina i ornitina, proveint d'intermediaris el cicle de la urea (Carpenter *et al.* 1985). Per altra banda, per tal de corregir la malnutrició deguda a la manca de l'aminoàcid essencial lisina, els pacients reben dosis de Σ -N-acetil·lisina, un anàleg neutre de la lisina, que permet l'augment de la concentració plasmàtica de lisina, malgrat que l'elevat preu i la disponibilitat limitada fan que no sigui un compost adequat per a tractaments a llarg termini (Rajantie *et al.* 1983). Les complicacions pulmonars ocasionalment responen a altes dosis de prednisolona i a rentats broncoalveolars. No es coneix cap teràpia per a la fallida renal (Simell 2001).

4.1.2 Genètica molecular de la LPI

L'anàlisi de lligament en famílies amb LPI va localitzar el gen responsable de la malaltia al cromosoma 14q11.2 en famílies finlandeses (Lauteala *et al.* 1997) i no finlandeses (Lauteala *et al.* 1998), entre els marcadors *D14S72* i *MYH7*. El 1998 el nostre grup publicà el clonatge de γ^+ -LAT-1, un transportador d'aminoàcids amb activitat d'intercanvi d'aminoàcids bàsics i neutres que podia explicar el defecte de transport trobat a LPI (Torrents *et al.* 1998). El seu patró d'expressió tissular coincidia amb els teixits amb major afectació en LPI: ronyó, intestí, cèl·lules del sistema immunològic i pulmó (Torrents *et al.* 1998; Borsani *et al.* 1999). Funcionava associat covalentment a 4F2hc, situada a la membrana basolateral (Quackenbush *et al.* 1986). El gen que codifica per γ^+ -LAT-1, *SLC7A7*, mapava precisament a la regió cromosòmica 14q11 (Torrents *et al.* 1998). Totes aquestes raons van portar el grup a realitzar un crivellatge de mutacions de *SLC7A7* en pacients de LPI.

La proteïna γ^+ -LAT-1 juntament amb 4F2hc indueix transport d'aminoàcids de tipus γ^+L , que s'expressa en la membrana basolateral de ronyó i també a intestí (veure l'apartat 3.2.3 d'aquesta introducció).

Fins al moment s'han identificat 35 mutacions en el gen *SLC7A7* en 113 pacients de LPI (222 al·lels explicats de 226) (Borsani *et al.* 1999; Torrents *et al.* 1999; Mykkanen *et al.* 2000; Noguchi *et al.* 2000; Sperandeo *et al.* 2000; Palacín *et al.* 2001a). D'aquestes mutacions, 8 són mutacions puntuals que provoquen canvi d'aminoàcid, 4 trunquen la proteïna, 15 són delecions o insercions que canvien la pauta de lectura i 4 provoquen canvis de *splicing*. Tots els pacients finlandesos tenen una mateixa mutació fundadora en un acceptor de *splicing* (c.IVS6-2A>T), que provoca un canvi de pauta de lectura donant lloc a una proteïna truncada no funcional.

L'efecte d'algunes mutacions s'ha analitzat per expressió d'activitat γ^+L en oòcits de *Xenopus* i cèl·lules transfectades, i en tots els casos s'ha vist que els mutants eren incapaços d'induir aquesta activitat de

transport en ser expressats amb 4F2hc. Les mutacions de canvi de pauta de lectura (1291delCTTT , 1548delC i la mutació fina) produeixen un defecte de tràfic sever i no arriben a la membrana plasmàtica quan es coexpressen amb 4F2 (Mykkanen *et al.* 2000; Toivonen *et al.* 2002). En canvi les mutacions de canvi de sentit G54V i L334R inactiven el transportador encara que la proteïna arriba a la membrana plasmàtica (Mykkanen *et al.* 2000; Toivonen *et al.* 2002).

S'ha analitzat la regió promotora del gen *SLC7A7* en pacients de LPI. S'ha investigat els nivells d'expressió i els elements 5' del promotor 'putatiu' del *SLC7A7*. La regió de 5' del primer exó no traduït no conté cap *TATA-box*, elements *Inr* ni altres elements de promotor clàssics, però té en canvi unes altres seqüències d'unió de factor de transcripció putatives. L'*E-box* i els elements d'*AP-2* poden lligar proteïnes en cèl·lules HEK293 i extractes de teixits de ronyons adults, però no en fibroblasts. Els estudis amb gen reporter luciferasa fent transfeccions transitòries, mostraren que els primers dos introns, situats a la regió no traduïda, contenen elements activadors transcripcionals (*enhancers*) (Mykkanen *et al.* 2003).

Fins al moment no s'ha pogut establir cap correlació genotip-fenotip en la LPI, ja que pacients amb el mateix genotip presenten gran variabilitat en les manifestacions clíniques (Simell 2001). La única manifestació clínica evident és l'aminoacidúria dibàsica, però es desconeix l'etiologia de la resta de símptomes de la malaltia. Per tant, altres factors deuen jugar un paper important en la patogènesi i les manifestacions clíniques de la LPI.

4.2 MALALTIA DE HARTNUP

La malaltia de Hartnup (OMIM 234500) és una malaltia hereditària autosòmica recessiva renal i gastrointestinal causada per un defecte en el transport d'aminoàcids neutres a través de les cèl·lules epitelials dels túbuls proximals renals i de la mucosa intestinal. És un dels trastorns aminoacídics més comuns. La seva incidència segons crivellatges a nounats varia entre 1:23.000 i 1:54.000 (Levy 2001). El nom ve de la família on es va descriure aquesta malaltia per primera vegada el 1956 (Baron *et al.* 1956). Els pacients presenten una important hiperexcreció d'aminoàcids neutres, que és la base per al diagnòstic d'aquesta malaltia.

4.2.1 Manifestacions clíniques

L'elevada hiperaminoacidúria en pacients de Hartnup afecta sobretot els aminoàcids alanina, asparragina, glutamina, histidina, isoleucina, leucina, treonina, fenilalanina, serina, triptòfan, tirosina i valina (Evered 1956), amb un rang d'hiperexcreció que oscil·la entre 5 i 20 vegades el valor en controls (Levy 2001). L'absència de prolina la distingeix de la hiperaminoacidúria generalitzada. El fet que es mantingui un transport substancial tubular renal d'aquests aminoàcids, suggereix que aquests aminoàcids són transportats per més d'un sistema (Scriver and Hechtman 1970). A més, els pacients també presenten hiperexcreció de compostos indòlics provinents de la degradació bacteriana del triptòfan no absorbit. Per altra banda, en alguns pacients, la reduïda absorció intestinal del triptòfan, comporta una disponibilitat reduïda per a la síntesi de la niacina. Aquesta carència és la que dona els principals símptomes de potencial aparició, semblants als de la pellagra: erupció cutània fotosensible, atàxia cerebel·lar, comportament psicòtic, inestabilitat emocional i, en alguns casos, retard mental (Baron *et al.* 1956; Levy 2001). De tota manera, la majoria de la niacina prové de la dieta, de manera que només en casos on la dieta fos insuficient es podria donar aquest defecte. El tractament amb nicotinamida o niacina milloren les erupcions cutànies dels pacients; en alguns casos aquest tractament també sembla millorar els episodis d'atàxia i comportament psicòtic (revisat a Levy, 2001). Tot i la hiperexcreció d'aminoàcids, la majoria de pacients de Hartnup són asimptomàtics, i calen factors agreujants, com una dieta pobre o diarrea, per a la presentació de símptomes clínics (Milne 1969).

El fet que es doni hiperexcreció d'aminoàcids neutres en orina i femta és indicatiu de que el defecte en la malaltia de Hartnup afecta tant l'absorció intestinal com la reabsorció renal d'aquests aminoàcids. El defecte en reabsorció es manifesta amb hiperaminoacidúria. Pel que fa al defecte en intestí, els estudis en biòpsies de jejú de pacients van demostrar que el transport d'aminoàcids neutres estava afectat (Tarlow *et al.* 1970; Shih *et al.* 1971). El defecte intestinal es dona a la membrana apical, doncs la càrrega oral dels aminoàcids lliures implicats causa una resposta en plasma atenuada, mentre que la seva càrrega en forma de dipèptids dona una resposta normal (Asatoor *et al.* 1970a; Asatoor *et al.* 1970b; Leonard *et al.* 1976). Els defectes renal i intestinal no sempre s'expressen de forma concordant. Alguns individus amb hiperaminoacidúria de Hartnup no tenen una excreció urinària elevada d'àcids indòlics, suggerint que no pateixen el defecte intestinal (Scriver *et al.* 1987). I al contrari, s'ha descrit un individu amb defecte

INTRODUCCIÓ

intestinal i no renal (Hillman *et al.* 1986). Segons Scriver, aquesta heterogeneïtat entre òrgans podria indicar la implicació d'un transportador heteropolimèric amb un diferent arranjamnt de subunitats al ronyó i l'intestí (Scriver and Tenenhouse 1992).

4.2.2 Genètica molecular de Hartnup

Per les característiques del transport afectat, es va pensar que es tractava d'un transportador que indueix sistema B⁰, el qual s'ha descrit anteriorment com a principal mediador de la captació d'aminoàcids neutres en cèl·lules epitelials. La proteïna ATB⁰ (també anomenada ASCT2) transporta aminoàcids neutres dependent de sodi (Kekuda *et al.* 1997) i es localitza a la membrana apical de ronyó i intestí (Avissar *et al.* 2001), però el fet que es comporti com a intercanviador d'aminoàcids (Broer *et al.* 1999) fa que no pugui ser responsable del flux net d'aminoàcids neutres a la membrana apical. El gen *SLC1A5*, del sistema ATB⁰ semblava un bon candidat funcional i posicional. El mapatge del gen a 19q13.3 (Kekuda *et al.* 1996), suggeria associació amb fenotip de Hartnup en algunes famílies per anàlisi de lligament. Aquest anàlisi exclouïa l'altra regió candidata, 11q13. Però no s'han trobat mutacions en el gen que codifica per la proteïna ATB⁰ en pacients de Hartnup, només s'han trobat dos polimorfismes (Potter *et al.* 2002).

Dove i col·laboradors van desenvolupar un model murí de la malaltia de Hartnup induint mutacions amb N-etil-N-nitrosourea (ENU) (Symula *et al.* 1997b). D'aquesta manera van identificar el gen responsable de la hiperfenilalaninèmia 2 (*hph2*), que quan es trobava mutat en homozigosi dóna un fenotip semblant, però no idèntic, al dels pacients de la malaltia de Hartnup, el ratolí mutant presenta hiperexcreció d'aminoàcids neutres però les seves concentracions en plasma són normals. Per això fou proposat com a model de Hartnup (Symula *et al.* 1997b).

El *locus hph2* es va mapar al cromosoma 7 distal de ratolí, que correspon a la regió cromosòmica humana 11q13 (Symula *et al.* 1997a). 4F2hc ha estat mapat a 11q13-20. Encara que se sap que 4F2hc està implicat en moltes activitats de transport d'aminoàcids i en altres funcions cel·lulars, seria possible que certes mutacions en aquesta proteïna només afectessin el seu paper en el transport d'aminoàcids neutres. Fins ara no s'ha publicat cap treball en aquest sentit. De totes maneres, per estudis de lligament s'ha descrit un *locus* humà per al trastorn de Hartnup a dues famílies japoneses, al cromosoma 5p15 (Nozaki *et al.* 2001). La possibilitat d'heterogeneïtat genètica no permet descartar de moment altres *loci*.

Recentment, s'ha clonat, a ratolí, un transportador electrogènic Na⁺-dependent de la família de neurotransmissors (mB⁰AT1), que presenta les propietats del sistema B⁰, que podria estar involucrat en Hartnup. Transporta la majoria d'aminoàcids neutres, però cap catiònic ni aniònic. S'expressa a la membrana apical de l'intestí i del túbul proximal renal, i també a la pell (Broer *et al.* 2004). Aquest gen es localitza a una regió del cromosoma 13 de ratolí que correspon a la regió cromosòmica 5p15 humana, el *locus* de Hartnup (Nozaki *et al.* 2001). Per tant l'homòleg humà d'aquest transportador era un bon candidat funcional i posicional per la malaltia de Hartnup (Broer *et al.* 2004). Dos laboratoris en paral·lel han clonat l'homòleg humà, B⁰AT1, i n'han identificat mutacions en pacients de Hartnup (Kleta *et al.* 2004; Seow *et al.* 2004). El nou gen, *SLC6A19*, localitza al cromosoma 5p15.33 i té 12 exons. Codifica per una proteïna de 634 aminoàcids amb 12 segments transmembrana predits. És un transportador d'aminoàcids neutres Na⁺-dependent i Cl⁻-independent, que s'expressa predominantment a ronyó i intestí, i té propietats del sistema B⁰. S'han identificat 10 mutacions a *SLC6A19* (IVS8+2T>G, c.884_885delTG, p.57RC, c.340delC, c.682_683AC>TA, p.D173N, p.R240X, p.L242P, p.E501K, IVS11+1G>A), que cosegreguen amb la malaltia de manera recessiva. La majoria dels individus afectes són heterozigots compostos. L'estudi funcional de les mutacions dóna una reducció del transport d'aminoàcids neutres *in vitro*. Les freqüències poblacionals per als al·lels mutats de *SLC6A19* més comuns són: 0.007 per a c.517G>A i 0.001 per a c.718C>T (Kleta *et al.* 2004; Seow *et al.* 2004).

4.3 IMINOGLICINÚRIA

La iminoglicinúria familiar (OMIM 242600) és una aminoacidúria hereditària benigna amb una prevalença de 1/15000 entre els caucàsics, que implica un transportador del túbul renal amb preferència per la L-prolina, la hidroxil-L-prolina (iminoàcids) i la glicina, que resulta en una hiperexcreció d'aquests aminoàcids. Aquesta aminoacidúria és autosòmica recessiva, malgrat que en algunes famílies s'observen diversos graus de dominància i heterogeneïtat.

4.3.1 Manifestacions clíniques

Els homozigots retenen una reabsorció apreciable d'iminoàcids i glicina (Chesney 2001). Aquesta funció residual de transport es veu saturada a les concentracions endògenes de substrat i les interaccions competitives normals han desaparegut. Això s'explica perquè hi ha diversos transportadors implicats en la reabsorció dels iminoàcids i la glicina. S'ha demostrat un defecte en el transport intestinal de glicina en alguns homozigots. Els heterozigots obligats poden ser hiperglicinúrics o silents. Aquests dos tipus d'heterogeneïtat fenotípica indiquen una probable heterogeneïtat genètica.

4.3.2 Genètica molecular

No es coneix fins al moment el gen responsable d'aquest defecte, que suposadament codifica per un transportador que permet la reabsorció de glicina i iminoàcids a la membrana apical de l'epiteli del túbul renal (Chesney 2001). Darrerament s'han identificat dues proteïnes de ratolí, PAT-1 i PAT-2, que funcionen cotransportant protons amb aminoàcids neutres petits com glicina, alanina i prolina (Boll *et al.* 2002). La proteïna PAT-1, que s'expressa en ronyó i presenta unes característiques semblants a les descrites pel transport de glicina i iminoàcids en vesícules apicals de ronyó (Foreman *et al.* 1985), podria ser candidata a ser la responsable de la iminoglicinúria. L'anàlisi de mutacions en el gen de PAT-1 en pacients iminoglicinúria permetria obtenir evidències de la seva implicació en aquesta malaltia.

4.4 AMINOACIDÚRIA DICARBOXÍLICA

L'aminoacidúria dicarboxílica (OMIM 222730) és una malaltia autosòmica recessiva que pot anar associada a retard mental. És una malaltia rara a la població mundial, amb una prevalença més elevada a la població franco-canadenca (1 en 29.000).

4.4.1 Manifestacions clíniques

Es caracteritza per un defecte en el transport d'aminoàcids aniònics al ronyó i l'intestí, provocant hiperexcreció d'aquests aminoàcids en orina, sense nivells elevats en plasma. La depuració renal d'aquests aminoàcids pot superar dos o tres cops la taxa de filtració glomerular (Teijema *et al.* 1974; Melançon *et al.* 1977). Va ser descrita per primera vegada l'any 1974, el transport intestinal de glutamat es va assajar amb càrregues orals a dos pacients, i semblava ser normal en un proband i disminuït en un altre (Teijema *et al.* 1974).

4.4.2 Genètica molecular

S'ha proposat EAAC1 (també anomenat EAAT3), un transportador d'aspartat i glutamat dependent de sodi que s'expressa al sistema nerviós, el ronyó i l'intestí, com a candidat per a l'aminoacidúria dicarboxílica (Smith *et al.* 1994a) (veure taula 1, apartat 2), però fins ara no s'hi han descrit mutacions als pacients. Existeix un ratolí *knockout* per a EAAC1 desenvolupa aminoacidúria dicarboxílica i problemes motors (Peghini *et al.* 1997). (veure apartat 7 i Discussió General).

4.5 CISTINOSI

És una malaltia autosòmica recessiva de l'emmagatzematge lisosòmic (OMIM 219800), deguda a un defecte d'un transportador de cistina de la membrana lisosòmica (Gahl *et al.* 2002). La seva incidència s'estima entre 1 en 100.000 i 1 en 200.000 (Gahl *et al.* 2001).

4.5.1 Manifestacions clíniques

En la cistinosis, la de cistina lliure s'acumula als lisosomes entre 10 i 100 vegades respecte la concentració normal, i forma cristalls a la majoria dels teixits arribant a provocar destrucció cel·lular. S'han descrit 3 tipus de cistinosis segons l'edat d'inici i la severitat dels símptomes: infantil, juvenil i cistinosis ocular. Els pacients desenvolupen diferents símptomes, i en diferent grau, depenent dels teixits afectats. Els nens amb cistinosis neixen sans però desenvolupen síndrome de Fanconi (una disfunció generalitzada del túbul proximal renal) entre els 6 i 12 mesos d'edat. A més dels símptomes propis de la síndrome de Fanconi (deshidratació, acidosi, vòmits, desequilibri electrolític, hipofosfatèmia i creixement pobre), els pacients

INTRODUCCIÓ

manifesten fotofòbia, hipotiroïdisme, ceguesa retinal, diabetis, miopatia distal, funció pulmonar debilitada, insuficiència pancreàtica, hipogonadisme primari a mascles i deteriorament neurològic (Gahl *et al.* 2001). S'ha observat que l'acumulació de cistina inhibeix la Piruvat quinasa en cor i còrtex cerebral de rata (Feksa *et al.* 2004; Rosa *et al.* 2004). La cistinosi es pot diagnosticar determinant el contingut de cistina en leucòcits polimorfonucleats per HPLC, mètode que permet detectar individus heterozigots (Levtchenko *et al.* 2004; Martinez Llamas *et al.* 2004).

El tractament intenta adreçar-se als diversos símptomes, a més de reduir els nivells de cistina amb l'administració oral de cisteamina, un compost que forma un disulfur mixt amb la cistina, i així possibilita la seva sortida dels lisosomes i la dissolució dels cristalls (Gahl *et al.* 1987). La diagnosi ha de ser el més aviat possible (antenatal o perinatal) per poder prevenir o retardar els símptomes.

4.5.2 Genètica molecular de la Cistinosi

El gen responsable de la cistinosi és *CTNS*, que es localitza al cromosoma 17p13, i codifica per la cistinosina, una proteïna de 367 aminoàcids. La cistinosina és una proteïna de la membrana lisosòmica (Cherqui *et al.* 2001) amb una topologia de 7 dominis transmembrana, amb el C-terminal orientat cap al citosol i la regió N-terminal, altament glicosilada, cap al lumen lisosòmic. S'han identificat dos senyals que determinen la localització lisosòmica de la cistinosina: un motiu clàssic GYDQL situat al C-terminal i una nova senyal conformacional situada al cinquè llaç (Cherqui *et al.* 2001). A causa de la inaccessibilitat relativa del lumen lisosòmic, s'expressà la cistinosina a la membrana plasmàtica, per eliminació del motiu GYDQL, i es mesurà l'entrada de cistina a la cèl·lula a pH extern acídic per conèixer l'activitat d'eflux de cistina lisosomal (Kalatzis *et al.* 2001). Aquest model *in vitro*, mostrà que la cistinosina és el transportador de cistina lisosòmic i que la seva activitat depèn del gradient electroquímic de H⁺ de la membrana lisosòmica. S'hi ha identificat diverses mutacions (Town *et al.* 1998).

La mutació més prevalent és una deleció de 57 kb que es troba en el 60% dels pacients dels Estats Units i Nord d'Europa. Aquesta deleció afecta la regió promotora del gen, i de l'exó 1 fins a part de l'exó 10, i tot el gen adjacent *CARKL*, del qual no se'n coneix la funció (Bendavid *et al.* 2004). S'han realitzat estudis de localització intracel·lular i activitat transportadora d'alguns mutants i s'ha correlacionat amb el fenotip clínic. La majoria de mutacions causen un defecte en la funció i no una alteració de la localització lisosomal. A més, existeix una bona correlació entre el grau de defecte de transport i la severitat de la malaltia: en el tipus infantil hi ha una pèrdua total del transport, mentre que en els altres tipus hi ha una reducció de l'activitat transportadora (Kalatzis *et al.* 2004).

5 CISTINÚRIA

La cistinúria (OMIM 220100 i OMIM 600918) és una aminoacidúria hereditària autosòmica recessiva i dominant amb penetrança incompleta caracteritzada per un defecte en el transport d'aminoàcids bàsics i cistina que afecta les cèl·lules epitelials del túbul renal i de l'intestí. Es manifesta per una hiperaminoacidúria de cistina i aminoàcid dibàsics. La cistina és un aminoàcid amb baixa solubilitat i precipita formant càlculs renals que poden produir obstruccions, infeccions i insuficiència renal en alguns casos.

5.1 HISTÒRIA

La primera descripció de la cistinúria es féu l'any 1810, quan Wollaston trobà dos càlculs groguencs semitransparents en la bufeta d'un pacient. Per les seves propietats físico-químiques pensà que eren òxids, i anomenà la matèria que els componia òxid cístic (del grec *kystis*, bufeta) (Wollaston 1810). El 1817 Marcet trobà càlculs als ronyons (Marcet 1817). Prout especulà el 1820 que la cistinúria es devia a una disfunció renal que resultava en l'excreció excessiva d'òxid cístic, ja que trobava de forma recurrent els característics cristalls grocs hexagonals a l'orina d'aquests pacients (Prout 1823). El 1830 Berzelius va observar que els càlculs estaven formats per una amina, i passà a anomenar-se cistina (Berzelius 1833), no va ser fins molt més tard que es determinà que la cistinúria anava associada a hiperexcreció en orina de cistina (Toel, 1855) i dels aminoàcids bàsics arginina, lisina i ornitina en pacients cistinúrics (Yeh *et al.* 1947; Stein 1951). Garrod el 1908 classificà la cistinúria com un error congènit del metabolisme (Garrod 1908). El 1951, Dent i Rose demostraren que les concentracions d'aquests aminoàcids en el plasma dels

pacients eren normals, fet que els va permetre postular que existia un mecanisme comú de reabsorció renal per aquests quatre aminoàcids que seria defectuós en pacients de cistinúria.

Per altra banda, diferents evidències apuntaven que també existia un defecte en l'absorció intestinal d'aquests aminoàcids: el 1934, Brand havia associat un fenotip intestinal a la cistinúria, en veure que l'excreció de cistina dels pacients no augmentava després d'una càrrega oral d'aquesta, mentre que sí pujava la cistina després d'una càrrega de metionina (Brand and Cahill 1934). Durant els anys 60 es va dur a terme els primers assaigs *in vitro*: les biòpsies de la mucosa del jejú de molts cistinúrics, però no tots, eren incapaces de concentrar cistina, lisina i arginina marcades radioactivament (Fox *et al.* 1964; McCarthy *et al.* 1964; Thier *et al.* 1964; Rosenberg *et al.* 1966a). Les dades sobre el defecte intestinal no eren del tot clares, ja que no es produïa en tots els pacients, les concentracions sanguínies d'aquests aminoàcids eren normals i no es donaven els símptomes típics de malabsorció intestinal. El fet que el transport de pèptids no es veiés afectat en pacients cistinúrics, feia pensar que el defecte es trobava en la membrana apical (Palacín *et al.* 2001c).

Així, el defecte en el transport d'aminoàcids en pacients de cistinúria indicava que el sistema de transport afectat era el sistema $b^{0,+}$, que ja hem esmentat que participa en la captació d'aminoàcids bàsics i cistina en la membrana apical de les cèl·lules epitelials de ronyó i intestí.

5.2 ASPECTES CLÍNICS DE LA CISTINÚRIA

La cistinúria es caracteritza per la hiperexcreció dels tres aminoàcids bàsics lisina, arginina i ornitina, i de l'aminoàcid neutre cistina en orina. Els nivells plasmàtics dels quatre aminoàcids són normals o lleugerament baixos (Dent *et al.* 1954; Morin *et al.* 1971; Goodyer *et al.* 1993; de Sanctis *et al.* 2001). A més de la hiperexcreció urinària d'aquests quatre aminoàcids, també s'ha descrit la hiperexcreció del disulfur cisteïna-homocisteïna, a pacients però no a controls (Frimpter 1963). A alguns pacients s'ha descrit també hiperexcreció d'altres aminoàcids com l'homoarginina o la citrulina (Palacín *et al.* 2001b; Palacín *et al.* 2001c). La cistinúria aïllada és molt rara en humans, s'han descrit dos casos de cistinúria aïllada, en els quals no existeix hiperexcreció d'aminoàcids bàsics però sí de cistina (Brodehl *et al.* 1967). Brodehl i col·laboradors la descrigueren a dos germans, els pares dels quals presentaven nivells normals de cistina en orina. A més, aquests pacients no mostraven el defecte intestinal (Brodehl *et al.* 1967).

5.2.1 Heterogeneïtat fenotípica

Els pacients de cistinúria presenten hiperexcreció de cistina i aminoàcids bàsics, a una concentració superior a $13000 \mu\text{mol} / \text{g}$ de creatinina (suma dels valors). Harris i col·laboradors descrigueren per primer cop l'heterogeneïtat genètica de la cistinúria, en observar que mentre dos terços dels heterozigots obligats (pares de pacients cistinúrics) mostraven valors normals dels quatre aminoàcids en orina, l'altre terç presentava valors alts o moderadament alts, però inferiors als dels afectes. El tipus d'herència del primer grup era recessiu, i el del segon grup, dominant amb penetrança incompleta (Harris *et al.* 1955).

L'any 1966, Rosenberg i col·laboradors van estudiar l'heterogeneïtat des del punt de vista intestinal i renal, i van fer una classificació de la cistinúria en tres tipus. En experiments *in vitro* amb biòpsies de jejú de pacients obtingueren els següents resultats: els classificats com a tipus I no acumulaven cistina ni lisina ni arginina, els de tipus II no acumulaven cistina però sí lisina, i els de tipus III acumulaven cistina, lisina i arginina, tot i que en quantitats força variables (Rosenberg *et al.* 1966a). També realitzaren càrregues orals dels aminoàcids d'interès i posterior anàlisi de les seves concentracions en sang a diferents temps. Aquests experiments confirmaren parcialment els resultats *in vitro*. Els estudis intestinals es realitzaren en un nombre reduït de pacients, de manera que algunes de les distincions que es feren no quedaren prou definides ni contrastades. Les excrecions urinàries dels heterozigots presentaven diferències significatives entre els tres tipus per als quatre aminoàcids (Rosenberg *et al.* 1966a; Rosenberg *et al.* 1966b): els de tipus I tenien excrecions normals, els de tipus II molt elevades i els de tipus III moderadament elevades. Aquesta classificació, que ha estat àmpliament acceptada durant diverses dècades, es resumeix a la taula 4.

INTRODUCCIÓ

		Excreció urinària	Absorció intestinal
Tipus I	Heterozigot	Normal	
	Homozigot	Elevada per CssC, Lys, Arg i Orn	No s'absorbeix CssC
Tipus II	Heterozigot	Elevada per CssC i Lys, i moderada per Arg i Orn	
	Homozigot	Elevada per CssC, Lys, Arg i Orn	Lleugera absorció de CssC
Tipus III	Heterozigot	Moderada per CssC i Lys	
	Homozigot	Elevada per CssC, Lys, Arg i Orn	Absorció normal de CssC

Taula 4. Classificació tradicional de la cistinúria segons els fenotips renal i intestinal d'heterozigots i homozigots. CssC, cistina; Lys, lisina; Arg, arginina; Orn, ornitina.

La imprecisió d'aquesta classificació obligà posteriorment a establir una nova classificació en funció del fenotip renal dels heterozigots obligats: com que els estudis intestinals, tant *in vivo* com *in vitro*, són invasius i laboriosos, i donat que aparentment els valors d'excreció de cistina, lisina, arginina i ornitina eren prou diferents entre els diferents tipus per permetre la classificació de les famílies, Kelly proposà utilitzar només els valors d'excreció urinària dels quatre aminoàcids als heterozigots per a classificar cada família, i proporcionà unes mitjanes d'excreció per a cadascun dels tres grups (Kelly 1978).

1. La cistinúria recessiva o de tipus I, en la qual els valors d'excreció de cistina i aminoàcids bàsics en heterozigots són normals ($< 400 \mu\text{mol} / \text{g}$ de creatinina).
2. La cistinúria dominant amb penetrança incompleta de tipus II, on els heterozigots presenten una excreció de cistina i aminoàcids bàsics superior a $4500 \mu\text{mol} / \text{g}$ de creatinina.
3. La cistinúria dominant amb penetrança incompleta de tipus III, en la que l'excreció d'aquests aminoàcids en heterozigots es troba per sobre dels valors normals però per sota dels valors establerts per a tipus II.

Els valors d'excreció d'aminoàcids seguint aquesta classificació en el pacients de l'ICC es mostren en la taula 5 (Palacín *et al.*, 2001).

Tipus (nº individus)	Cistina	Ornitina	Arginina	Lisina	Total
Normals (9)	43 ± 7	22 ± 3	17 ± 5	238 ± 68	323 ± 75
I/N (8)	87 ± 14	40 ± 1	26 ± 3	237 ± 26	390 ± 33
II/N (6)	1035 ± 110	519 ± 82	376 ± 132	3814 ± 655	6369 ± 726
III/N (31)	343 ± 33	126 ± 20	104 ± 20	1488 ± 140	2045 ± 171
I/I (7)	1716 ± 772	2056 ± 534	2610 ± 1171	7380 ± 1390	14000 ± 2922
II/II (4)	1808 ± 566	2290 ± 580	4422 ± 502	9900 ± 1807	18413 ± 3212
III/III (20)	1816 ± 648	1899 ± 402	3833 ± 1401	6963 ± 2039	14511 ± 3286
I/III (6)	1245 ± 517	1382 ± 350	1702 ± 483	5164 ± 800	9489 ± 1964

Taula 5. Valors d'excreció urinària en els diferents tipus de cistinúria. Mitjana ± error estàndard de l'excreció urinària ($\mu\text{mol/g}$ creatinina) dels aminoàcids indicats i de la suma de tots ells (Total) en individus adults.

Morin i col·laboradors també van analitzar l'excreció d'aminoàcids, i van fer estudis d'acumulació en biòpsies de jejú i càrregues orals. Segons les excrecions urinàries dels heterozigots només van distingir dos tipus de famílies, que anomenaren I (recessives) i II (recessives incompletes). Els homozigots d'aquests dos tipus es comportaven de la mateixa manera als estudis *in vitro* i a les càrregues orals: no manifestaven acumulació de cistina ni lisina, ni absorció d'aquests aminoàcids *in vivo* (Morin *et al.* 1971).

Inicialment es va pensar que els 3 tipus de cistinúria eren un reflex d'heterogeneïtat al·lèlica, és a dir, deguda a diferents mutacions al mateix gen, que donarien un fenotip suau, moderat o sever (Rosenberg 1966). Aquesta hipòtesi es basava en la troballa de pacients cistinúrics que aparentment tenien un progenitor d'un tipus de cistinúria i l'altre d'un tipus diferent. Posteriorment, s'observà que aquests pacients de famílies mixtes (tipus I/III) presentaven nivells d'excreció de cistina inferiors als dels homozigots de qualsevol altre tipus, i es proposà que aquest fenomen es podia deure a una complementació parcial entre dos o més gens responsables de cistinúria (Goodyer *et al.* 1993; Goodyer *et al.* 1998).

Però aquesta classificació va anar perdent força a mesura que es coneixia millor la base molecular de la malaltia. Més tard es van definir dos grups: tipus I (OMIM 220100) i tipus no I (OMIM 600918), aquest últim englobava els tipus II i III. Els dos tipus de cistinúria es distingeixen en base als nivells de cistina i aminoàcids dibàsics en orina dels heterozigots obligats (Palacín *et al.* 2001c). Els heterozigots de tipus I són silenciosos, mentre que els heterozigots de tipus no I presenten un grau variable d'hiperexcreció urinària de cistina i aminoàcid dibàsics, que és més elevada en el tipus II que en el III.

5.2.2 Urolitiasi

L'única manifestació patològica de la cistinúria és la formació de càlculs de cistina, a causa de la baixa solubilitat d'aquest aminoàcid. La solubilitat de la cistina varia segons el pH, i és mínima a pH 5,2 on el límit de solubilitat és de 300 mg/l o 1,2 mM. Tal com s'ha comentat anteriorment, el 99% dels aminoàcids filtrats en el glomèrul es reabsorbeixen mitjançant mecanismes de transport localitzats a la membrana apical de les cèl·lules epitelials del túbul proximal (Silbernagl 1988). Els pacients cistinúrics concentren al túbul quantitats de cistina que oscil·len entre el 50% i el 200% del filtrat glomerular a causa del defecte de reabsorció de cistina. A més, el filtrat es va acidificant, excedint amb facilitat la seva constant de solubilitat i precipita en forma de cristalls hexagonals i pedres opaques (Palacín *et al.* 2001c).

La urolitiasi es manifesta durant la primera dècada de la vida en el 50% dels pacients, malgrat que aquest paràmetre es veu influenciat per factors genètics i ambientals (Goodyer *et al.* 1998) (i apartat 11 de Resultats i Discussió General). Tot i que els càlculs de cistina només suposin el voltant d'un 2% i 7% de les urolitiasis que es donen en adults i nens, respectivament, el problema principal de la cistinúria és que la formació d'aquests càlculs és recurrent: segons Martin i col·laboradors, només el 44% dels seus pacients es mantenen lliures de càlculs tres mesos després de l'extracció d'una pedra de cistina (Martin *et al.* 1991). A part de les molèsties físiques que ocasiona la formació contínua de càlculs, cal afegir el risc d'obstrucció de les vies urinàries, infeccions i, en últim terme, insuficiència renal (Dahlberg *et al.* 1977).

Malgrat que el defecte genètic presenta igual prevalença als dos sexes, la malaltia litiasica té una incidència més gran en homes que en dones, donat que l'anatomia del seu tracte urinari els fa més propensos a obstruccions. De fet, la urolitiasi depèn de diversos factors, com ara l'excreció d'inhibidors de la litiasi o el balanç salí de l'individu. S'ha demostrat que els electròlits i les macromolècules augmenten la solubilitat de la cistina (Pak and Fuller 1983). Malgrat que els cristalls hexagonals de cistina es poden trobar gairebé a qualsevol mostra d'orina de pacients cistinúrics, l'aparició dels primers càlculs patològics pot donar-se a la primera dècada de vida (25-30% dels pacients simptomàtics), a la segona (30-35%) o retardar-se fins edats més tardanes (Stephens 1989)(article 4, apartat 11). Fins i tot hi ha individus bioquímicament afectes (amb valors d'excreció de cistina que superen els considerats patològics) que no arriben a patir símptomes d'urolitiasi en tota la seva vida. Els càlculs de cistina purs són radiopacs, tot i que menys densos que els d'oxalat càlcic, i es poden identificar mitjançant radiografies o ecografies. Aproximadament la meitat dels càlculs de cistina contenen quantitats considerables d'oxalat, fosfat de calci o fosfat amònic-magnèsic (Boström and Hambræus 1964; Evans *et al.* 1982; Stephens 1989).

5.2.3 Incidència

Els càlculs de cistina suposen només l'1-3% de les urolitiasis entre els adults (Singer and Das 1989), i el 6-8% entre nens (Polinsky *et al.* 1987). Tot i així, la cistinúria és la principal malaltia monogènica d'urolitiasi hereditària en adults (Walsh *et al.* 1992).

La incidència mundial de la cistinúria s'ha estimat en 1:7000 (Levy 1973), però la incidència varia considerablement en les diverses poblacions. Així, oscil·la entre els 1:2500 pels jueus libis (Weinberger *et al.* 1974) i els 1:100000 a Suècia (Boström and Hambræus 1964). Al Japó s'ha estimat en 1:8000 (Ito *et al.* 1983), a Massachusetts en 1:16000 (Levy *et al.* 1972), a Gran Bretanya en 1:20000 (Crawhall and Watts 1968), i a Praga en 1:22000 (Thalhammer 1975). Aquests valors es deuen en gran part a diferències reals entre les poblacions, però també a diferències en el sistema de crivellatge, que en uns casos es basava simplement en el test de Brandt, mentre que en altres utilitza valoracions més acurades de la cistina. El test de Brandt, també anomenat del nitroprussiat, detecta nivells de cistina superiors a 420 µM (que equivalen a uns 300-500 µmol de cistina per gram de creatinina). Aquests nivells són assolits pels homozigots cistinúrics, però també ho són sovint pels heterozigots de tipus no I. Així doncs, el test de Brandt pot donar fàcilment falsos positius. A més, els valors de tall utilitzats per diagnosticar cistinúria amb els altres tipus de determinacions també són variables, afegint heterogeneïtat als resultats.

Les estimacions d'incidència en nomenats donen freqüències més altes, com a resultat de l'ontogènia del

INTRODUCCIÓ

sistema de reabsorció renal dels aminoàcids bàsics i la cistina. Així, Scriver i col·laboradors trobaren cistinúria a 1:450 nounats, que en poques setmanes es corregí a 1:1800 infants. Als sis mesos de vida la incidència quedava normalitzada al voltant dels 1:12500 que es trobaven a la població adulta del Quebec (Scriver *et al.* 1985). Amb el seguiment longitudinal d'una part dels infants positius al crivellatge, pogueren comprovar com els valors d'excreció que inicialment situaven a la majoria com a afectes, disminuïen fins a valors majoritàriament d'heterozigots tipus II o III, semblants als dels pares. Els que inicialment haurien estat classificats com a portadors tipus II o III acabaven com a tipus I, també com els pares. Així, suggerien que no es doni una classificació definitiva dels infants fins els sis mesos d'edat, quan els seus valors d'excreció d'aminoàcids bàsics i cistina s'estabilitzen. Altres treballs també advertiren una major incidència de la cistinúria en nadons (Woolf 1967; Levy 1973; Zammarchi *et al.* 1981), i la seva reducció durant el creixement (Levy 1973; Wilcken *et al.* 1980). S'ha descrit que la reabsorció tubular renal és immadura en la vida postnatal primerenca, fenomen que es fa evident en el lleuger increment dels valors d'excreció dels quatre aminoàcids a l'infant normal (Brodehl and Gellissen 1968). La major expressió del defecte de transport en infants que en adults fa pensar que els sistemes d'absorció implicats en la cistinúria juguen un paper important en la reabsorció tubular de l'infant humà.

5.3 GENÈTICA MOLECULAR DE LA CISTINÚRIA

5.3.1 Clonació de rBAT

El 1992 es va realitzar el clonatge simultani d'uns cDNA de ronyó de conill (Bertran *et al.* 1992b) i rata (Tate *et al.* 1992; Wells and Hediger 1992), que induïen el transport de cistina, lisina, arginina i ornitina entre d'altres aminoàcids a intestí i ronyó. El gen que codificava per aquests cDNA, *SLC3A1*, era un bon candidat funcional per a la cistinúria. L'anàlisi de mutacions en pacients cistinúrics realitzat pel nostre grup va permetre demostrar que mutacions en el gen *SLC3A1* eren responsables de la cistinúria de tipus I, i es demostrava el defecte de transport que la corresponent proteïna (rBAT) mutada induïa en oòcits de *X. laevis* (Calonge *et al.* 1994). També es localitzà el gen al cromosoma 2p, prop dels marcadors *D2S119* i *D2S177* (Lee *et al.* 1993; Zhang *et al.* 1994; Calonge *et al.* 1995a), on l'any 1994 es va determinar per anàlisi de lligament el locus responsable de cistinúria de tipus I (Pras *et al.* 1994; Calonge *et al.* 1995b). En aquesta localització, concretament a 2p16.3 es trobava el gen *SLC3A1*, codificant per la proteïna rBAT, que és la subunitat pesada del transportador d'aminoàcids bàsics i cistina del sistema $b^{0,+}$ -like (Bertran *et al.* 1992b) present a l'epiteli en raspall del segment S3 de la nefrona i de l'intestí prim (Furriols *et al.* 1993). El gen *SLC3A1* ocupa 45 kb aproximadament, conté 10 exons i codifica per una proteïna de 685 aminoàcid (Purroy *et al.* 1996). A la taula 6 apareixen les mides dels exons i introns de *SLC3A1*, així com les seqüències donadores i acceptores de *splicing*.

Exó	Posició cDNA	Donador	Acceptador	Mida intró (kb)
1	1-430	GAAAG g _t acat	cttcag GTATT	4.7
2	431-610	TAAAG g _t aagt	cattag GTTTA	0.5
3	611-765	ACTGG g _t aagt	tgccag TTAAG	4.5
4	766-891	TAAAA g _t gagt	ctttag GAAAT	13.0
5	892-1011	TCCCG g _t aaag	tcaaag GACAC	0.9
6	1012-1136	TAGAG g _t tgac	ttatag GTTCA	3.5
7	1137-1332	GGATG g _t aagt	tttcag ATTGG	7.5
8	1133-1500	ATATT g _t aagt	acatag AATAC	1.1
9	1501-1617	TTGAT g _t aagt	aaatag GTCCA	5.6
10	1618-2055			

Taula 6. Seqüències donadores i acceptores de *splicing* del gen *SLC3A1* (rBAT), posició del cDNA dels 10 exons i mida estimada dels introns. Les seqüències exòniques estan en majúscules i les intròniques estan en minúscules.

5.3.1.1 Mutacions a rBAT en pacients de cistinúria de tipus I

Fins el moment d'iniciar aquesta tesi s'havien identificat 46 mutacions específiques de cistinúria a *SLC3A1* (Calonge *et al.* 1994; Gasparini *et al.* 1995; Miyamoto *et al.* 1995; Pras *et al.* 1995; Bisceglia *et al.* 1996; Horsford *et al.* 1996; Endsley *et al.* 1997; Gitomer *et al.* 1998a; Gitomer *et al.* 1998b; Pras *et al.*

1998a; Saadi *et al.* 1998)(veure apartat 12 de Resultats), que inclouen mutacions puntuals de canvi de sentit, de pèrdua de sentit, de seqüències donadores i acceptores de *splicing* i de desplaçament de pauta de lectura, així com grans delecions i insercions que inclouen un o més exons (revisat a Palacín *et al.*, 1998 i Palacín *et al.*, 2000).

El nostre grup està generant una web sobre els transportadors HAT, pel projecte europeu EUGINDAT. En aquesta web hi ha una base de dades dels pacients de cistinúria estudiats i les mutacions de cistinúria.

L'anàlisi funcional de la mutació més freqüent de *SLC3A1*, p.M467T, revelà un defecte de tràfic: la proteïna mutant arriba a la membrana plasmàtica però de manera molt poc eficient (Chillarón *et al.* 1997). S'han descrit més mutacions de *SLC3A1* amb defecte de tràfic (Chillarón *et al.* 1997; Saadi *et al.* 1998) dades consistents amb la funció proposada per rBAT com a ajudant de la corresponent subunitat lleugera del transportador, però també s'han identificat determinats residus que afecten l'activitat del transportador (veure Discussió General).

5.3.2 Heterogeneïtat genètica: 2 loci per la cistinúria

Un cop demostrada la responsabilitat d'aquest gen a la cistinúria de tipus I, s'evidencià l'heterogeneïtat genètica de la malaltia, en observar-se que altres tipus de cistinúria no lligaven amb el *locus* del cromosoma 2. Per altra banda, no es trobaven mutacions en el gen *SLC3A1* en pacients de cistinúria de tipus II o III (també anomenada cistinúria de tipus no I) (Calonge *et al.* 1995a; Calonge *et al.* 1995b; Gasparini *et al.* 1995), fet que suggeria que la cistinúria era una malaltia amb heterogeneïtat de *locus*.

Es va determinar l'existència d'un segon *locus* responsable de la cistinúria de tipus no I en el cromosoma 19q13.1 (Bisceglia *et al.* 1997; Wartenfeld *et al.* 1997). Es va identificar per "exclusion map" el *locus* de la cistinúria de tipus no I al cromosoma 19q12-13.1 (Bisceglia *et al.* 1997). Es va acotar el nou *locus* de cistinúria (Pras *et al.* 1999) i (article 1, Resultats i Discussió). El 1999 es clonà *SLC7A9*, situat al segon *locus* de cistinúria (article 2, Resultats i Discussió) (Pfeiffer *et al.* 1999a). Aquest gen codifica per b⁰⁺AT, un transportador d'aminoàcids bàsics i alguns neutres que s'uneix a rBAT per arribar a la membrana (article 2) (Chairoungdua *et al.* 1999; Pfeiffer *et al.* 1999a). També vem demostrar que les mutacions a *SLC7A9* són responsables de la cistinúria de tipus no I, amb la qual cosa augmentava el coneixement molecular d'aquesta malaltia (article 2).

Fins el clonatge dels gens responsables de la cistinúria, la subclassificació d'aquesta malaltia només havia tingut una base fenotípica. Les dades de correlació genotip-fenotip han portat a l'ICC a proposar una nova classificació de la cistinúria en base a la genètica (article 4). Tot això serà presentat i discutit en detall a les seccions de Resultats i Discussió, i Discussió General.

5.3.2.1 Crivellatge del genoma per cercar l'altre gen

Les Dres. María Julia Calonge i Lúdia Feliubadaló (Barcelona), i Luigi Bisceglia (San Giovanni Rotondo) van començar la cerca d'un nou *locus* de cistinúria utilitzant famílies cistinúriques en les quals la malaltia no era deguda a mutacions a *SLC3A1*. Per a seleccionar aquestes famílies es va mirar que fossin de tipus III/III o II/II (actualment no I), ja que les anomenades famílies mixtes podien causar confusió. Es comprovà si aquestes famílies (F3, F5, F7, F25, F28, F41, F42, F48, F58, F62 i F78) estaven excloses de lligament amb *SLC3A1*, i totes confirmaren falta de segregació entre la malaltia i el gen, tret de la família F3. A la família F3 els marcadors analitzats no eren prou informatius, però l'anàlisi de tota la regió codificant de *SLC3A1* als dos pacients de la família no n'identificà cap mutació. Per accelerar la cerca per tot el genoma, se seleccionà dins aquestes famílies 4 grups de germans afectes (almenys dos per grup), els de les famílies F3, F5, F42 i F48. S'hi buscava parells d'al·lèles iguals entre els germans. Com la família F42 era fruit d'un matrimoni consanguini, s'hi esperava, a més, homozigositat al·lèlica dels marcadors. Quan es trobava algun marcador que complís la majoria dels requisits esmentats, s'analitzava la segregació amb la malaltia a la resta de la família i a marcadors propers. Així foren descartats tots els *loci* candidats fins arribar, aproximadament a la meitat del crivellatge, al marcador *D19S414*. Aquest marcador mantenia la segregació a totes les famílies analitzades excepte a la F48, la qual cosa semblava indicar lligament, tot i que amb una recombinació en aquesta família. Per saturar la zona, es buscaren altres marcadors descrits a la regió (Reed *et al.* 1994; Dib *et al.* 1996). Així, s'afegiren els cinc marcadors *D19S882*, *D19S409*, *D19S225*, *D19S425* i *D19S220*.

Els 6 marcadors esmentats presentaven un *LOD score* màxim major de 3, i per tant es consideraven lligats al gen de cistinúria per identificar. Els marcadors *D19S882*, *D19S409*, *D19S414* i *D19S220* mostraven un

INTRODUCCIÓ

LOD score de $-\infty$ a una distància de 0 cM, la qual cosa indicava que hi havia almenys una recombinació entre ells i el gen de cistinúria a alguna de les famílies analitzades. Els marcadors *D19S225* i *D19S425* presentaven *LOD scores* de 13,1 i 10,3 respectivament a 0 cM. L'ordre de marcadors publicat és cen-*D19S882-D19S409-2* cM- *D19S414-3* cM-*D19S225-3* cM-*D19S425-3* cM-*D19S220*-tel. Tenint-lo en compte, el nou *locus* de cistinúria se situava al cromosoma 19q, limitat pels marcadors *D19S414* i *D19S220* (Bisceglia et al. 1997).

També es realitzà una anàlisi de lligament multipunt, per maximitzar la informació de lligament en integrar les dades de tots els marcadors, i per oferir la posició més probable del gen. La màxima probabilitat de trobar el gen era a la posició del marcador *D19S225*, amb un *LOD score* de 15,9. (Bisceglia et al. 1997).

Donat que totes les famílies mostraven lligament positiu a freqüència de recombinació 0 amb els marcadors centrals, els resultats del programa HOMOG confirmaren l'absència d'heterogeneïtat genètica no al·lèlica.

La majoria de les famílies disponibles havien estat classificades com a tipus III/III, segons la classificació urinària descrita a (Calonge et al. 1995b) i, per tant, no hi havia dubte que el nou *locus* era responsable d'aquest tipus de cistinúria. D'altra banda, l'estudi només incloïa dues famílies de tipus II/II (F58 i F62). Aquestes, famílies però, eren prou grosses per conferir al marcador *D19S225* un *LOD score* de 3,1 a una distància de recombinació de 0 cM. Això vol dir que la probabilitat que aquesta segregació s'hagués donat per atzar és menor a 1/1000, aquesta probabilitat és suficient per considerar provat el lligament (Morton 1955). A més, l'anàlisi d'homogeneïtat, confirmà l'homogeneïtat del lligament amb els dos tipus de famílies, encara que no es podia considerar totalment provada la implicació d'aquest *locus* en l'anomenada cistinúria de tipus II (Bisceglia et al. 1997).

5.4 ABSORCIÓ RENAL I INTESTINAL DE LA CISTINA I ELS AMINOÀCIDS DIBÀSICS

Aquest apartat revisa el coneixement extret d'experiments realitzats en humans i animals, cistinúrics o sans, doncs la combinació de tots ells ha permès perfilar el que avui sabem del transport d'aquests quatre aminoàcids en cèl·lules polaritzades.

Als adults, el 99% de la cistina filtrada al ronyó és reabsorbida, però la contribució relativa dels diversos segments del túbul proximal no és clara. El transport de cistina a vesícules de la membrana de l'epiteli en raspall (*brush border membrane vesicles*, BBMV) de ronyó de rata és relativament independent de Na^+ , si el comparem amb el de la resta d'aminoàcids neutres (Foreman et al. 1980; McNamara et al. 1981; McNamara et al. 1992). S'ha proposat que la cistina entra a favor de gradient de concentració, gràcies a la seva reducció a cisteïna, catalitzada per la glutatió-cisteïna transhidrogenasa (Crawhall and Segal 1966; Segal and Smith 1969; States and Segal 1969). Així, la cisteïna abandona la cèl·lula mitjançant un sistema de transport de la membrana basolateral (Silbernagl 1988).

Com s'ha comentat a l'apartat 5.1, la primera pista d'un sistema de transport compartit entre la cistina i els aminoàcids bàsics provingué dels estudis de Dent i Rose en pacients cistinúrics: si els quatre aminoàcids patien el mateix defecte de transport, bé devien compartir un sistema de transport (Dent and Rose 1951). Robson i Rose observaren que quan s'augmentava la càrrega de lisina en el filtrat, augmentava l'excreció de cistina en orina (Robson and Rose 1957). Aquest experiment proporcionava la primera evidència d'inhibició competitiva entre aquests aminoàcids.

La infusió d'aminoàcids *in vivo* ha mostrat l'existència de més d'un mecanisme d'absorció de cistina i aminoàcids bàsics al ronyó. S'infongué quantitats creixents de lisina a pacients cistinúrics i quan la concentració de lisina en plasma arribà a 7-10 vegades la normal, el defecte reabsortiu va deixar de notar-se (Lester and Cusworth 1973). Aquesta observació suggerí l'existència d'almenys dos sistemes de transport per a la lisina: un d'alta afinitat i baixa capacitat i un altre d'alta capacitat i baixa afinitat, no afectat en cistinúria. En experiments de microperfusió de ronyó de rata s'observà que els aminoàcids neutres inhibien de forma diferent la captació luminal de cistina i cisteïna (Völkl and Silbernagl 1982), per tant aquests dos aminoàcids es transportaven de forma diferent. El transport de cistina a BBMV (Segal et al. 1977) i a fragments de túbul (Foreman et al. 1980), mostrava dos sistemes saturables a la membrana apical: el d'alta afinitat tenia una K_m aparent de 10 μM ; el de baixa afinitat era exclusiu per a la cistina i tenia una K_m aparent de 500 μM . Donat que la concentració de cistina a l'ultrafiltrat és aproximadament 50 μM , els dos sistemes contribuirien de forma similar a la reabsorció renal de cistina (Foreman et al. 1980). L'estudi del sistema de baixa afinitat *in vitro* és complicat, ja que la seva K_m és propera al límit de solubilitat de la cistina, que no sempre ha permès demostrar-ne la saturabilitat (Völkl and Silbernagl

1982). El transportador de cistina de baixa afinitat sembla ser dependent de Na^+ (Foreman *et al.* 1980; Völkl and Silbernagl 1982), mentre que el d'alta afinitat n'és independent (McNamara *et al.* 1992). A més, el sistema d'alta afinitat intercanvia cistina i aminoàcids bàsics, de manera que potencialment podria procurar el moviment de cistina a través de la membrana luminal en qualsevol direcció.

El sistema d'alta afinitat se situa, segons estudis de microperfusió i de transport en fragments de túbul, al túbul proximal recte (TPR), és a dir, al segment S3. Els mateixos experiments situen el sistema de baixa afinitat al túbul proximal contornejat (TPC), o segments S1 i S2 (Völkl and Silbernagl 1982; Schafer and Watkins 1984). Un estudi amb BBMV de la medul·la externa (TPR) confirma la presència del sistema d'alta afinitat, la seva menor dependència de Na^+ i la seva major sensibilitat a la inhibició per concentracions micromolars d'aminoàcids neutres, que el sistema de les BBMV del còrtex extern (TPC) (Riahi-Esfahani *et al.* 1995).

Les BBMV d'intestí de rata, en canvi, mostren la presència d'un sol sistema de transport de cistina d'alta afinitat i compartit amb aminoàcids bàsics (Furlong and Posen 1990). Càrregues orals i biòpsies de jejú de pacients mostren un defecte de transport (Rosenberg *et al.* 1966a; Morin *et al.* 1971; Pras *et al.* 1998b; de Sanctis *et al.* 2001), de manera que el sistema de transport afectat a la cistinúria sembla ser un sistema d'alta afinitat compartit per la cistina i els aminoàcids bàsics, independent de sodi, present al segment S3 de la nefrona i a l'intestí prim.

Segons experiments *in vitro*, el sistema renal de transport de cistina i aminoàcids bàsics d'alta afinitat està compartit també amb alguns aminoàcids neutres, doncs aquests inhibeixen el transport de cistina a concentracions micromolars (Foreman *et al.* 1980; Völkl and Silbernagl 1982; Schafer and Watkins 1984; Riahi-Esfahani *et al.* 1995). Malgrat això, no s'ha trobat hiperexcreció d'aminoàcids neutres (tret de la cistina) als pacients cistinúrics, probablement perquè que altres sistemes de transport s'encarreguen de la seva reabsorció (veure l'apartat 2).

5.5 TRACTAMENT

El tractament de la cistinúria està dirigit a afavorir la solubilització de la cistina que s'hiperexcreta en orina prevenint la formació de càlculs o, quan ja s'han format, en procurar la seva dissolució. Aquest objectiu s'intenta assolir per diferents aproximacions:

Control dietètic per minimitzar la producció de cistina: reduint la ingesta de metionina, aminoàcid essencial precursor de la cistina. La ingesta s'ha de mantenir per sobre del requeriment mínim fisiològic per aquest aminoàcid, 1200-1400 mg/dia, i la reducció no és aconsellable a pacients en edat de creixement. La disminució en la ingesta s'assoleix evitant els ous i consumint moderadament carn, peix, pastissos i formatge (Rodman *et al.* 1984). Una dieta baixa en Na^+ també s'ha vist que disminueix l'excreció de cistina mitjançant control de la concentració de l'orina (Jaeger *et al.* 1986; Norman and Manette 1990; Peces *et al.* 1991; Rodriguez *et al.* 1995).

Mesures per tal d'evitar la concentració de la cistina i augmentar-ne la solubilitat: La dilució de la cistina pot aconseguir-se mitjançant la ingesta continuada de líquid, per mantenir la concentració de la cistina per sota dels 300 mg/l a les vies urinàries. Això en molts casos vol dir ingerir entre 3 i 3,5 litres de líquids en 24 h, que equival a un ritme d'ingestió de 125-145 mL/h. Aquest ritme és factible durant el dia, però durant la nit la ingestió es deté i la concentració de la cistina augmenta. El pH urinari, a més, disminueix en aquest període, disminuint la solubilitat de la cistina. En aquest sentit, Dent i Senior recomanaven la ingesta d'un bol de fluid abans d'anar al llit i un altre a les 2 o 3 h de la matinada (Dent and Senior 1955). Aquest tractament va reduir la freqüència dels càlculs a 12 de 18 pacients en un seguiment de 10 anys. Una altra aproximació de tractament és l'alcalinització de l'orina, ja que es coneix que la solubilitat de la cistina incrementa a valors de pH superiors a 7,5. Per aquest motiu es fan tractaments per alcalinitzar l'orina utilitzant agents com el bicarbonat de sodi (1,5-2 mEq/Kg/24 h). S'ha comprovat que la ingestió de 5-6 mEq/Kg/24 h durant breus períodes pot fins i tot dissoldre els càlculs (Dent and Senior 1955). El 50% de les pedres de cistina contenen també sals de calci. En aquests casos el citrat de potassi podria ser més adequat, ja que el citrat pot ajudar a quelar el Ca^{2+} . A més, el seu metabolisme consumeix protons, la qual cosa perllonga l'efecte d'alcalinització (Palacín *et al.* 2001c).

Fàrmacs: Altres teràpies més agressives es basen en el desplaçament de l'equilibri de la reacció de dimerització (oxidació) de la cisteïna en cistina cap al monòmer, a causa de la formació d'altres dímers més solubles entre el fàrmac i la cisteïna. La primera substància utilitzada amb aquesta finalitat fou la D-penicilamina. El 1963 es va descriure que l'administració oral de 450 mg de D-penicilamina cada 8 h reduïa substancialment la cistina lliure en orina (Crawhall *et al.* 1963). També s'ha aconseguit la dissolució de càlculs amb aquest fàrmac (McDonald and Henneman 1965; Stephens 1989; Combe *et*

INTRODUCCIÓ

al. 1993). La D-penicilamina té efectes secundaris freqüents que obliguen a suspendre el tractament en alguns pacients. Això ha comportat la cerca de tiols alternatius, com ara l' α -mercaptopropionilglicina (MPG) o tiopronina. En un assaig clínic comparatiu el MPG es mostrà tan efectiva com la D-penicilamina, i només el 31% dels pacients va deixar el tractament a causa dels efectes secundaris, respecte el 69% dels que prenen D-penicilamina (Pak et al. 1986). També s'ha proposat l'àcid meso-2,3-dimercaptosuccínic (DMSA) (Maiorino et al. 1989) i el captopril (Sloand and Izzo 1987; Strem and Hall 1989), però aquests agents no han estat àmpliament validats.

Aquestes mesures normalment es combinen per tal d'aconseguir una prevenció efectiva de la formació de càlculs de cistina (Joly et al. 1999). Tot i així, actualment es tendeix a tractaments conservadors com l'elevada ingestió de líquids o l'alcalinització urinària, perquè els tractaments més eficaços, amb compostos dotats de grups tiol, generen massa efectes secundaris. El nostre grup està realitzant assaigs de possibles fàrmacs contra la litiasi de cistina en ratolins *Slc7a9^{-/-}* litiàsics (veure més avall).

S'ha associat la concentració de cistina en orina amb la seva concentració de Na⁺ (Jaeger et al. 1986), i s'ha provat l'efecte d'una dieta pobre en sal sobre el tractament de la cistinúria. Alguns investigadors han obtingut resultats positius i d'altres no, però s'ha suggerit que aquest tipus de dieta podria fins i tot augmentar el risc de nefrolitiasi en reduir el pH urinari com a conseqüència de l'augment de l'osmolaritat de l'orina (Norman and Manette 1990).

Quan els càlculs causen símptomes d'obstrucció, o creixen, són fragmentats per a la seva posterior eliminació, natural o quirúrgica. Les pedres de cistina són relativament resistents a la litotripsia extracorpòria per ones de xoc. Així, quan el càlcul és gran, se sol substituir aquesta tècnica per la seva fragmentació mitjançant ultrasons intracorporis i posterior extracció per nefrolitotomia percutània. Les pedres de cistina a l'urèter es solen tractar per ureteroscopia (Joly et al. 1999). Així, aquestes tècniques relativament poc invasives, són preferibles a la cirurgia oberta, especialment si es té en compte que la majoria de pacients pateixen aquests episodis d'obstrucció de forma recurrent en pocs anys.

5.6 MODELS ANIMALS DE CISTINÚRIA

5.6.1 Models naturals

S'han descrit diversos models animals de cistinúria. S'ha trobat cistinúria a gats, a gossos de moltes races, a genetes i a llops.

El llop de crin del Brasil i l'Argentina (*Crysocyon brachyurus*), presenta una alta incidència de cistinúria (81%) (Bovée et al. 1981). Estudis de la depuració renal de 5 afectes mostraren concentracions variables de cistinúria i aminoacidúria dibàsica: mentre un dels afectes mostrava secreció tubular neta dels quatre aminoàcids, els altres mostraven reabsorció disminuïda de cistina, un defecte lleuger o inexistent de l'absorció de lisina i ornitina, i absorció normal d'arginina.

El gat descrit amb cistinúria (DiBartola et al. 1991) mostrava reabsorció reduïda de cistina i els tres aminoàcids bàsics, i càlculs de cistina a la bufeta. En una revisió d'urolitiasi a felins es comenta que només 2 de 1180 càlculs (0,2%) eren de cistina (Osborne et al. 1989).

La hiperexcreció de cistina, no acompanyada d'hiperexcreció d'aminoàcids bàsics, fou descrita a una espècie de geneta (*Genetta tigrina*) (Datta and Harris 1951). Aquesta excreció de cistina, que rondava els 1-1,5 mg/mL, no provocava litiasi a la geneta. Més endavant, Crawhall i Segal (1965) veieren que una part de l'excreció de tiols que Datta i Harris havien pres per cistina, corresponia a dímers amb sulfocisteïna i que la concentració de cistina en orina, tot i ser elevada, no devia superar la concentració soluble en orina humana determinada per Dent i Senior (1955).

Entre els gossos s'ha observat una gran diversitat al patró d'aminoacidúria (Cornelius et al. 1967; Tsan et al. 1972a; Hoppe et al. 1993; Casal et al. 1995). Aparentment hi ha diverses poblacions de gossos cistinúrics. Un grup pateix cistinúria aïllada, un altre mostra hiperexcreció de cistina i els tres aminoàcids bàsics, i un tercer té cistinúria, glutaminúria, treoninúria i citrulinúria (Hoppe et al. 1993; Osborne et al. 1999). S'ha observat proporció més gran de mascles que de femelles cistinúrics (Osborne et al. 1999). Aquesta tendència pot ser resultat d'un biaix de detecció, ja que l'anatomia de la uretra dels mascles (llarga i de diàmetre reduït fix) els fa molt més propensos a patir obstruccions que la de les femelles (curta i distensible). D'altra banda, en analitzar l'excreció urinària d'una gran família cistinúrica de terriers escocesos s'observà un patró d'herència lligada al cromosoma X (Tsan et al. 1972a). No s'ha detectat defecte intestinal als gossos cistinúrics, segons estudis *in vitro* (Tsan et al. 1972b).

Els gossos Newfoundland formen un subgrup amb paràmetres bioquímics més homogenis i una etiologia coneguda. El sever defecte renal es manifesta com una hiperexcreció marcada dels quatre aminoàcids i una aparició primerenca de símptomes associats als càlculs. Encara que els dos sexes estan afectats, només els mascles pateixen obstrucció urinària, a causa de les esmentades diferències anatòmiques del tracte urinari. El seu patró d'herència és autosòmic recessiu, on els heterozigots obligats (progenitors dels afectes) no pateixen cap defecte reabsortiu (Casal *et al.* 1995). Totes aquestes característiques assenyalaven la cistinúria dels Newfoundlands com l'homòleg caní de la cistinúria de tipus I humana. Això animà els investigadors a clonar el gen *SLC3A1* caní i a cercar-hi mutacions. L'any 2000 es descrigué una mutació amb error de sentit que es trobava en homozigosi als afectes d'una família de Newfoundlands (Henthorn *et al.* 2000). Els autors van cercar mutacions a *SLC3A1* a 6 gossos d'altres races sense èxit, i mantenen que això i l'heterozigositat de la majoria d'ells per a dos marcadors polimòrfics intragènics suggereixen l'heterogeneïtat genètica de la cistinúria canina, com succeeix amb la humana.

5.6.2 Ratolins *knockout* dels gens de cistinúria

5.6.2.1 *knockout* de *Slc7a9*

En el nostre grup s'ha generat un ratolí *knockout* per a *Slc7a9* (Patent P200301592), que ha resultat ser un bon model animal per a l'estudi de la cistinúria (Feliubadaló *et al.* 2003). S'ha generat un ratolí amb una mutació nul·la a *Slc7a9*. Aquest ratolí expressa una proteïna truncada abans del primer segment transmembrana, amb els primers 29 aminoàcids de b⁰⁺AT, seguits de 12 aminoàcids amb error de sentit. Els ratolins *Slc7a9*^{-/-} presenten una dramàtica hiperexcreció de cistina i aminoàcids bàsics. Els heterozigots, *Slc7a9*^{+/-}, presenten una hiperexcreció moderada de cistina i aminoàcids bàsics. En conseqüència, el ratolí *knockout* de *Slc7a9* és un model murí de la cistinúria de tipus no I. Els ratolins *SLC7A9*^{-/-} presenten càlculs de cistina al sistema urinari (figura 9).

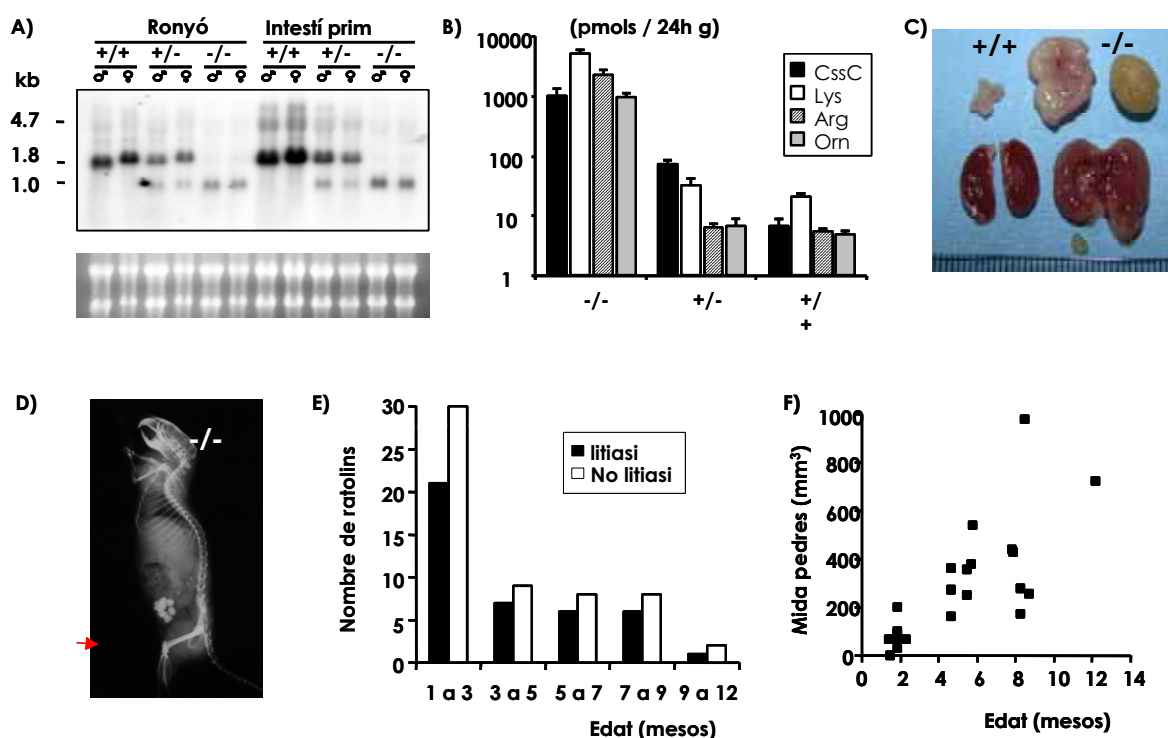


Figura 9. Model Knockout Stones (*Slc7a9*^{-/-}) de cistinúria de tipus B. Les característiques del model són: **A)** no expressa la proteïna b⁰⁺AT a ronyó (Northern); **B)** és cistinúric ja que hiperexcreta (100 vegades sobre valors normals) cistina i aminoàcids bàsics, i en principi de tipus no I ja que els heterozigots mostren hiperexcreció de cistina; **C)** el ratolí KO homozigot desenvolupa litiasi de cistina a bufeta, ronyó i urèter; **D)** els càlculs són identificables mitjançant radiografia de raigs X ja durant el segon mes de vida; **E)** només el ~40% dels ratolins KO homozigots produeixen càlculs a bufeta, i **F)** en aquests ratolins litíasics els càlculs a bufeta augmenten de mida amb l'edat.

INTRODUCCIÓ

El percentatge de cristal·lúria és molt superior al de la litiasi: el 82% dels ratolins *Slc7a9*^{-/-} analitzats presenten cristal·lúria en orina fresca mentre que la prevalença de la litiasi entre els ratolins *Slc7a9*^{-/-} oscil·la entre el 43% dels ratolins menors de 3 mesos i el 56% dels majors de 9 mesos. Aquest fet permet analitzar per separat el fenotip provocat directament per la disfunció bioquímica i el que és conseqüència de la litiasi al sistema urinari. La majoria dels ratolins litiàsics només presenten càlculs a la bufeta. L'11% d'ells, presenten a més, càlculs a la pelvis renal. En alguns casos també presenten càlculs als urèters o a la uretra peniana dels mascles. Tant uns com els altres poden acabar causant obstruccions, que desemboquen en uropatia obstructiva, o impediment del flux urinari. La uropatia obstructiva comporta una sèrie de patologies agrupades sota el nom de nefropatia obstructiva, que són la dilatació de la pelvis i els túbuls (hidronefrosi), la necrosi tubular, la nefritis intersticial crònica i la presència de gotes hialines. Totes aquestes patologies han estat observades a ronyons de ratolins *Slc7a9*^{-/-} litiàsics. Des del punt de vista bioquímic, la insuficiència renal obstructiva provocada per l'aturada del flux urinari representaria un augment de la concentració d'urea i K⁺ en sang, que són les causes més probables de mort de la majoria dels ratolins litiàsics trobats morts abans de la vellesa. Per últim, l'elevat volum dels càlculs a la bufeta, força l'increment de les dimensions de l'òrgan, i la constant fricció amb les parets de l'uroteli, provoquen la seva inflamació. En conseqüència, s'ha trobat que el pes de les bufetes dels animals litiàsics és 6 vegades superior al dels no litiàsics. Les alteracions histològiques trobades en aquestes bufetes engrandides són hiperplàsia urotelial i inflamació crònica. Els ratolins *Slc7a9*^{-/-} litiàsics també poden servir de model per estudiar l'evolució i millorar el tractament de totes aquestes patologies. El fons genètic mixt d'aquest ratolí (129P2/OlaHsd-C57BL/6J), suggereix l'existència de moduladors genètics del fenotip litiàsic. En un model murí de litiasi, els factors ambientals es poden controlar en gran mesura, per tant aquest ko és un bon model per estudiar els factors genètics, que s'espera que siguin els principals responsables de l'heterogeneïtat del fenotip litiàsic (presència i edat d'aparició) dels ratolins *Slc7a9*^{-/-}. El KO de *Slc7a9* també permet realitzar estudis de la influència de factors ambientals en la litiasi de cistina, com ara la ingesta de sodi i altres ions, o de diversos agents alcalinitzants. També s'estan duent a terme al nostre laboratori assaigs per desenvolupar nous fàrmacs per al tractament de la cistinúria en ratolins *Slc7a9*^{-/-} litiàsics, amb la col·laboració dels laboratoris Rubió. Tots aquests temes es tracten a la secció de Discussió General.

5.6.2.2 *knockout de Slc3a1*

Una empresa alemanya anomenada *Ingenium Pharmaceuticals AG* ha generat un ratolí amb una mutació puntual a *Slc3a1* (homozigot per a la mutació p.D140G) que desenvolupa cistinúria de tipus I amb urolitiasi (ratolins *Pebbles*) (Peters *et al.* 2003). El seu model ha estat aïllat durant el crivellatge metabòlic posterior a un experiment de mutagènesi amb etilnitrosourea (ENU) (Ade 2002). El nostre grup volem creuar aquests ratolins "*Slc3a1*^{+/-}" amb els nostres *Slc7a9*^{+/-} per comparar els fenotips de les diverses combinacions. Això ens permetrà profunditzar més en les interrelacions de b^{0,+}AT i rBAT, els seus papers fisiològics, i la possibilitat de la complementació gènica.

6 GENERACIÓ DE RATOLINS *KNOCKOUT*

La part final d'aquesta tesi s'ha ocupat de la generació d'un ratolí *knockout* per a *Slc7a8* (LAT-2), per tal de conèixer les funcions fisiològiques d'aquesta proteïna. En aquest apartat de la introducció parlaré d'aquest tipus de ratolins.

6.1 ÚS DE RATOLINS EN EXPERIMENTACIÓ

El ratolí reuneix una sèrie de característiques que l'han convertit en el vertebrat més utilitzat en experimentació en aquests últims anys. Entre elles es pot destacar: 1) Té un interval temporal curt entre la concepció i la maduresa sexual: només calen unes 10 setmanes des de que neixen fins que pareixen. 2) Les ventrades són grosses, amb una mitja de 5-10 cries per part, i les femelles es poden tornar a quedar embarassades immediatament després del part. Això permet un ràpid desenvolupament de la soca de ratolí d'interès. 3) la seva petita mida, pesa entre 25 i 40 g en l'edat adulta, permet la manutenció d'un gran nombre d'animals en condicions relativament econòmiques i el seu espai d'establiment és reduït. 4) Es disposa d'un ampli ventall de soques altament homogènies i genèticament estandarditzades

(obtingudes per creuaments consecutius entre germans). 5) La majoria de soques de laboratori són dòcils i fàcils de manejar (Silver 1995).

Els ratolins consanguinis s'han utilitzat àmpliament per a l'estudi de mutants espontanis de diversos defectes, principalment neurològics, que han ofert informació rellevant sobre malalties humanes. D'altra banda, el desenvolupament de tècniques experimentals que permeten l'alteració predeterminada de la genoma del ratolí, ha resultat en la generació de molts nous models de soques que ofereixen informació important sobre la funció de diverses proteïnes. La modificació genètica dels ratolins ha permès la integració de dades moleculars i cel·lulars amb la obtinguda en estudis fisiològics i conductuals, i ha fet possible explorar preguntes que fins ara s'havien estudiat utilitzant només aproximacions bioquímiques o farmacològiques.

Hi ha animals encara més petits i amb temps de generació més curts que els ratolins, com ara els coneguts *Drosophila melanogaster* i *Caenorhabditis elegans*, però van divergir evolutivament dels mamífers fa uns 570 milions d'anys, mentre que ratolins i humans ho feren fa 65 milions d'anys. Així, la mida dels genomes humà i murí són molt semblants i l'organització genòmica està força conservada –els mapes de sintènia testimonien les grans regions cromosòmiques on s'ha conservat l'ordre dels gens (Mural *et al.* 2002). També els propis gens són força similars, de manera que les corresponents proteïnes sovint poden substituir-se funcionalment. I la similitud arriba a nivell de l'organisme complet, de manera que si l'absència d'un gen provoca uns efectes en l'organisme murí, és molt probable que l'absència de l'homòleg humà provoqui efectes similars a l'home. Amb aquesta idea s'ha desenvolupat els ratolins *knockout*, que poden ajudar a esbrinar la funció d'una proteïna o servir de model d'una malaltia humana. Fins el moment, la tècnica necessària per alterar un gen de manera dirigida en mamífers només està desenvolupada en aquesta espècie

6.2 GENERACIÓ DELS RATOLINS *KNOCKOUT*

Durant els últims vint anys, s'han desenvolupat tècniques sofisticades que han permès manipular la línia germinal del ratolí a través de la introducció i selecció de mutacions específiques en el seu genoma. Aquest pas revolucionari en biologia no només ha proporcionat informació rellevant sobre la funció *in vivo* de diverses proteïnes, sinó que també ha permès la creació de models de malalties genètiques humanes, en particular les provocades per la pèrdua de la funció d'un gen. El ratolins *knockout* (KO) són aquells on s'ha introduït, mitjançant manipulació genètica, una mutació que anul·la la funció d'un dels seus gens. La recombinació homòloga en cèl·lules de mamífer i la utilització de cèl·lules mare totipotents són les claus per a que avui dia es puguin haver generat més de 3000 KO (Hardouin and Nagy 2000):

- El 1984 es va publicar el primer treball de modificació gènica en mamífers d'un *locus* natural, el de la β -globina, per direccionament gènic, és a dir, per recombinació homòloga en cèl·lules de mamífer entre un vector artificial i un gen endogen (Smithies *et al.* 1985). La recombinació homòloga és el fenomen pel qual dues molècules de DNA que contenen seqüències molt semblants, interaccionen i intercanvien material genètic. Aquest és un fenomen anàleg a l'entrecruament entre cromàtides germanes, que ocorre durant la profase I de la meiosi. Quan la recombinació homòloga ocorre entre una seqüència de DNA extracromosòmic i una d'un cromosoma, el procés rep el nom de direccionament gènic (o *gene targeting*). Aquest fenomen s'havia utilitzat àmpliament per manipular la genoma del llevat, on gairebé sempre la seqüència introduïda interacciona i substitueix la seqüència homòloga endògena a través de dos entrecruaments simples. En mamífers ocorre el mateix procés però les freqüències de recombinació homòloga són molt menors a les que s'observen en llevat, per exemple, en el cas de la globina, sense utilitzar marcadors específics de selecció, la recombinació homòloga ocorria amb èxit en 1 de cada 1000 cèl·lules transfectades (Smithies *et al.* 1985).
- El direccionament gènic ha possibilitat de transmetre les modificacions gèniques a la línia germinal d'un ratolí gràcies a la utilització de cèl·lules mare totipotents (ES, *embryonic stem*). El 1981 dos grups havien derivat línies de cèl·lules ES a partir de blastòcits de ratolí (Evans and Kaufman 1981; Martin 1981). No va ser fins a 1984 quan Bradley i col·laboradors van demostrar que les cèl·lules ES injectades en blastòcits eren capaces de competir amb les cèl·lules totipotents de l'embrió hoste, fins i tot després de cultiu cel·lular perllongat, donant lloc a ratolins quimèrics amb cèl·lules germinals derivades de les cèl·lules ES (Bradley *et al.* 1984). Finalment, el 1987 dos grups aconseguiren alterar el genoma del ratolí per recombinació homòloga en cèl·lules ES, concretament al gen de la hipoxantina fosforibosiltransferasa (*HPRT*) (Doetschman *et al.* 1987; Thomas and Capecchi 1987). Doetschman i col·laboradors van corregir l'activitat enzimàtica de

INTRODUCCIÓ

L'HPRT canviant el gen mutat per un altre de funcional, amb una freqüència d'èxit d'una colònia recombinant per cada milió de cèl·lules transfectades, mentre que Thomas i Capecchi van inactivar el mateix gen amb una freqüència d'una colònia recombinant per cada dos milions de cèl·lules transfectades. Aquest gen tenia dues avantatges: 1) que amb ell es podia seleccionar directament la recombinació homòloga: es seleccionaren els clons corregits o inactivats en medis amb HAT (hipoxantina, aminopterina i timidina) o amb 6-TG (6-tioguanina, que mata les cèl·lules *hprt*⁺) respectivament. 2) Com que aquest gen es localitza al cromosoma X i les cèl·lules ES solen ser mascle, la modificació d'una sola còpia era suficient per generar el fenotip desitjat, inactivant una còpia per eliminar la funció del gen. Avui dia es pot seleccionar la recombinació homòloga en qualsevol mena de gen, mitjançant l'ús de gens marcadors de selecció (veure l'apartat 6.3.3.2 d'aquesta introducció).

6.3 TÈCNICA GENERAL DE DIRECCIONAMENT GÈNIC

Per a generar un ratolí KO, el primer que cal és modificar genèticament les cèl·lules ES, és a dir, modificar-hi un dels al·lels del gen diana de manera que no pugui ser funcional. Així s'obté un clon de cèl·lules heterozigotes per a la mutació. La mutació s'indueix mitjançant recombinació homòloga entre el DNA d'un vector transfectat a les cèl·lules i el gen diana, per això es requereix que el vector contingui seqüències del gen diana. Aquest vector es transfecta en cèl·lules ES i se seleccionen els clons que hagin patit la recombinació homòloga desitjada. En la majoria dels casos, el vector s'incorpora de manera aleatòria a la genoma de les cèl·lules ES però en algunes cèl·lules el DNA genòmic del vector s'acobla amb la seqüència cromosòmica corresponent, i incorpora la mutació en el *locus* desitjat del genoma mitjançant recombinació homòloga. Els clons de cèl·lules ES que porten la mutació en un dels dos cromosomes homòlegs, se seleccionen i s'identifiquen. Els clons escollits són incorporats a un embrió normal de ratolí. Actualment es poden utilitzar dues tècniques alternatives per assolir aquesta incorporació. En una, s'injecta les cèl·lules ES a la cavitat blastocèlica de blastòcits i en l'altra s'agreguen les cèl·lules ES a embrions en estadi de mòrula. L'embrió resultant és implantat a l'aparell reproductor d'una femella pseudogestant, que han estat muntades per un mascle vasectomitzat i per tant tenen el mateix perfil hormonal d'una femella prenyada i poden acollir embrions exògens per a un embaràs normal.

Alguns dels animals que neixen són quimeres, és a dir, tenen diferents proporcions de cèl·lules derivades de l'embrió receptor i de les cèl·lules ES manipulades. Si les cèl·lules ES donants contribueixen a la formació d'algunes de les cèl·lules de la línia germinal (els gàmetes), quan es creua la quimera amb un ratolí normal es generaran ratolins provinents de les cèl·lules ES donants. Aquest percentatge de quimerisme se sol identificar pel color de la pell. Es tria els embrions hoste d'una soca que, a més de ser compatible per a la formació de quimeres amb la soca de les cèl·lules ES, tingui un color de pell diferent del de la soca d'aquestes. La soca més utilitzada per a combinar amb cèl·lules ES de la soca 129 és la C57BL/6. Els ratolins quimèrics amb alt grau de quimerisme són creuats per obtenir la següent generació, anomenada F1. Si s'ha triat per al creuament una soca que ho permeti, es podrà identificar a la F1 els ratolins descendents de cèl·lules germinals derivades de les cèl·lules ES, segons el color de la pell. El 50% d'aquests ratolins seran heterozigots per la mutació i l'altre 50% seran salvatges. Per mitjà de PCR o transferència *Southern*, es trien els heterozigots, que seran creuats entre ells per obtenir la següent generació, F2, on el color de la pell ja no ha de tenir res a veure amb el fons genètic o el genotip (suposant que el gen "knockejat" no estigui lligat a cap gen implicat en el color de la pell). Si l'homozigot per la mutació del gen anul·lat no confereix un desavantatge durant el desenvolupament, s'obtiniran les proporcions mendelianes d'¼ de ratolins salvatges, ½ de ratolins heterozigots i ¼ de ratolins homozigots per la mutació.

6.3.1 Cèl·lules ES

Les cèl·lules mare totipotents o cèl·lules ES deriven de la massa cel·lular interna d'un embrió en estadi de blastòcit pre-implantat (Evans and Kaufman 1981; Martin 1981). Són cèl·lules euploides amb un cariotip estable, que tenen la qualitat única de poder ser cultivades i manipulades *in vitro*, amb relativa facilitat sense perdre la seva capacitat de contribuir a qualsevol tipus de teixit (somàtic o de la línia germinal) quan són reintroduïdes al blastòcit. Aquesta capacitat depèn en gran mesura d'unes condicions de cultiu que mantenen les cèl·lules en un estat no compromès, indiferenciat. Se'n poden trobar protocols detallats als llibres de Joyner (1993), Torres *et al.* (1997), i Hogan *et al.* (1994). Els senyals que inhibeixen la diferenciació poden ser aportats per una capa de cèl·lules nodradores, que també fan de matriu on

s'adhereixen les cèl·lules ES, i/o pel factor inhibidor de la leucèmia (*leukemia inhibitory factor*, LIF) afegit al medi de cultiu (Pease and Williams 1990). Les cèl·lules nodradores més utilitzades són fibroblasts primaris embrionaris de ratolí (MEF, *mouse embryo fibroblasts*) o la línia cel·lular STO (una línia de fibroblasts de ratolí resistent a tioguanina i ouabaína). Prèviament a l'ús d'aquestes cèl·lules com a nodradores, s'ha d'inactivar el seu creixement mitjançant un tractament amb mitomicina C o amb radiacions γ .

S'han establert diverses línies de cèl·lules ES de diferents soques de ratolí, tot i que les que més sovint s'han utilitzat amb èxit per colonitzar la línia germinal de les quimeres són les derivades de la soca 129. Les cèl·lules utilitzades són mascle per diverses raons: 1) El cariotip XY és més estable en cultiu que el XX. 2) Les quimeres mascle es reproduïen més ràpidament que les femelles i així es pot comprovar abans la transmissió de les cèl·lules recombinades a la línia germinal. 3) Les cèl·lules ES mascle poden donar lloc a conversió sexual, és a dir, que una alta contribució de cèl·lules mascle a un blastòcit femella fan que l'embrió es desenvolupi com a mascle. Llavors tota la línia germinal provindrà de les cèl·lules recombinades (Bradley *et al.* 1984; Joyner 1993). Cèl·lules semblants a les cèl·lules ES (ES-like) han estat derivades d'altres espècies, com la rata, el pollastre, els primats, i fins i tot l'home (Thomson and Marshall 1998). Fins ara, tanmateix, cap d'elles no ha pogut colonitzar amb èxit la línia germinal quan ha estat reintroduïda a blastòcits.

6.3.2 Freqüència de recombinació homòloga

Un factor limitant del direccionament gènic és la baixa freqüència de la recombinació homòloga en cèl·lules de mamífers. S'ha observat que aquesta ocorre amb més facilitat si la construcció disposa d'extrem lliures, en comptes de ser circular (Wong and Capecchi 1987). D'altra banda, el grau d'homologia entre la construcció i el gen diana pot determinar la freqüència de recombinació homòloga de dues maneres: Primer, la recombinació homòloga requereix seqüències de DNA d'homologia exacta. El DNA que s'utilitza per a la construcció del vector ha de ser de la mateixa espècie que la cèl·lula receptora, ja que el canvi d'un sol nucleòtid és suficient per reduir dràsticament la freqüència de recombinació homòloga. Per aquesta raó és preferible, encara que no imprescindible, utilitzar DNA isogènic (Deng and Capecchi 1992). Segon, la freqüència de recombinació homòloga augmenta a mesura que va augmentant la longitud de la seqüència homòloga del DNA, la qual està limitada per la màxima mida que pot tenir el vector transfectat (Hasty *et al.* 1991b; Deng and Capecchi 1992). La mínima longitud d'homologia és d'1 kb per al braç curt, ja que si és menor redueix tant el grau com la fidelitat de recombinació (Thomas *et al.* 1992).

6.3.3 Característiques dels vectors utilitzats

La integració per recombinació homòloga del DNA transfectat al genoma de les cèl·lules ES sol ocórrer en un percentatge baix, normalment de 0.1-10%. Per aquesta raó, en dissenyar els vectors adequats s'ha de tenir en compte la possibilitat de distingir amb facilitat entre els esdeveniments d'integració aleatòria i els que tenen lloc per recombinació homòloga. Les construccions que s'utilitzen per a la integració de DNA exogen mitjançant recombinació homòloga poden tenir dues configuracions bàsiques: d'inserció o de reemplaçament.

6.3.3.1 Vectors d'inserció i reemplaçament

1) Els vectors d'inserció tenen una zona d'homologia amb el gen diana i pateixen un sol esdeveniment de recombinació homòloga que resulta en la inserció de tot el vector a la seqüència diana. Així, s'introdueixen noves seqüències al gen diana interrompent la seva estructura normal. Aquest tipus de construcció s'utilitza amb poca freqüència per a la generació de ratolins KO convencionals, ja que no pot generar una deleció en la seqüència del gen diana. 2) Els vectors de reemplaçament, en canvi, tenen dues zones d'homologia, que es troben flanquejant un marcador de selecció, i pateixen un esdeveniment de recombinació a cadascuna d'elles, de manera que el resultat és la substitució del segment genòmic entre les zones d'homologia, pel segment equivalent del vector. Aquest últim tipus de vectors és el més utilitzat, perquè permet delecionar trossos del gen diana.

INTRODUCCIÓ

6.3.3.2 Marcadors de selecció

- **Selecció positiva**

Només una petita proporció de les cèl·lules ES transfectades integren el DNA del vector degut a la baixa freqüència de recombinació homòloga, per tant, és necessari introduir en el vector un marcador de selecció positiva d'integració. Donat que la disrupció de la majoria de gens diana no es pot seleccionar directament, s'ha generalitzat l'ús de gens marcadors de selecció positiva. Aquests marcadors es col·loquen entre les regions d'homologia i així queden inserits després de la recombinació homòloga. Sovint s'aprofita per a què el propi marcador interrompi (o substitueixi) la seqüència del gen, i així anul·li la seva funció.

Els marcadors solen ser gens bacterians de resistència a antibiòtics, sota el control d'un promotor fort (que, evidentment, s'expressi en cèl·lules ES) i el més independent de posició que sigui possible. El gen més utilitzat és el gen de resistència a neomicina (neomicina fosfotransferasa, neo'), però també s'han utilitzat els de resistència a higromicina, puromicina, o histidinol. Els promotors més utilitzats són el de la fosfoglicerat quinasa I (PGK-1), el de la RNA polimerasa II (pol 2) i el de la β -actina. Per garantir una traducció eficient a les cèl·lules ES la seqüència al voltant del lloc d'inici de la traducció dels marcadors de selecció derivats de procariotes ha d'estar conforme amb la seqüència consens de Kozak d'eucariotes. A més, l'eficiència dels marcadors de selecció depèn també de senyals per al seu correcte processament transcripcional. Per això també s'afegeixen senyals de poliadenilació, normalment el de la PGK o el de l'hormona de creixement bovina.

- **Selecció positiva-negativa**

La utilització de drogues elimina la majoria de les cèl·lules que no han incorporat de manera estable el gen marcador utilitzat per a la selecció positiva. Tanmateix, a molts dels clons resistents a aquesta selecció els vectors s'integren en la genoma de manera aleatòria ja que la recombinació homòloga a cèl·lules de mamífer és un fenomen quantitativament desafavorit respecte la integració a l'atzar. Per aquesta raó, s'han desenvolupat estratègies que permeten l'enriquiment i/o crivellatge de clons resultants per recombinació homòloga. L'estratègia més utilitzada per als vectors de reemplaçament és la selecció positiva-negativa on, a més de l'esmentat marcador de selecció positiva, s'inclou al vector un gen marcador de selecció negativa, col·locat externament a les regions d'homologia. Aquest mètode es pot aplicar únicament en el cas dels vectors de reemplaçament. Aquelles cèl·lules que hagin patit recombinació homòloga no hauran incorporat el marcador. En canvi, les que hagin patit integració a l'atzar hauran inserit tot el vector, amb el marcador negatiu, i seran seleccionades en contra. Un exemple àmpliament utilitzat és el gen de la timidina quinasa (tk) del virus *herpes simplex* (HSV-tk). En presència del gen tk les cèl·lules són sensibles a l'aciclovir i seus anàlegs, com per exemple el ganciclovir. L'enzim HSV-tk activa aquestes drogues, les quals s'incorporen al DNA durant el procés de l'elongació, causant acabament de la cadena i mort cel·lular. Es pot seleccionar contra el gen tk, cultivant les cèl·lules en presència de ganciclovir. Utilitzant aquesta doble selecció, els clons que integrin el vector transfectat seran resistents a G418 i a ganciclovir, mentre que els clons que hagin integrat aleatòriament la construcció seran resistents a G418 i sensibles a ganciclovir. Aquesta selecció proporciona un enriquiment força variable, que oscil·la entre les dos i les 20 vegades, donat que en alguns clons el marcador negatiu és inactivat a causa de mutacions o delecions, donant lloc a clons resistents a ambdues drogues. Per als marcadors de selecció negativa se sol utilitzar els mateixos promotors i senyals de poliadenilació que per a la positiva.

Una altra opció, que selecciona alhora la integració i la recombinació homòloga, és la selecció positiva condicional. En aquest cas, el vector es dissenya de tal manera que el gen marcador de selecció positiva només s'expressarà si està inserit adientment dins un gen que li proporcioni algun element regulador absent, com ara el promotor o el senyal de poliadenilació.

6.3.3.3 Components addicionals dels vectors diana

Els vectors diana no només ofereixen la possibilitat d'introduir al genoma un marcador de selecció positiva, sinó també elements genètics nous, com els marcadors informatius d'expressió, com per exemple els gens de la β -galactosidasa (LacZ), la proteïna fluorescent verda (GFP), o la fosfatasa alcalina de placenta (PAP). Aquests marcadors permeten determinar l'expressió d'un *locus* a resolució cel·lular i ofereixen la possibilitat de seguir el destí de les cèl·lules modificades en les quimeres

6.3.3.4 Optimització del vector

L'èxit del direccionament gènic depèn de molts factors, entre els que s'inclou el propi gen diana. En general el gen diana ve determinat per les necessitats del projecte, però hi ha diverses variables que permeten millorar el disseny del vector:

- **Longitud de la zona d'homologia.** Com major sigui la zona de homologia, major serà la freqüència de recombinació homòloga (Thomas and Capecchi 1987; Hasty *et al.* 1991b). La tendència és fer les regions d'homologia tan llargues com sigui possible, tenint en compte que s'han d'encabir, junt amb els marcadors de selecció, dins un vector generalment bacterià. Quan el crivellatge dels clons es pretén fer per PCR, se sol utilitzar un braç llarg i un braç curt, de manera que la PCR usi com a motlle el braç curt. És convenient que el braç curt no sigui inferior a 1 kb. La longitud total d'homologia sol ser de 5-8 kb (Joyner 1993).
- **Posició del marcador de selecció positiva.** Donat que aquest marcador normalment serveix també per a interrompre el gen, és preferible que ho faci als primers exons. Així, la possibilitat que la proteïna truncada o recombinant conservi una part de funció, és més baixa. La majoria de vegades, és aconsellable delectonar algun tros de la seqüència codificant. D'aquesta manera, encara que es donessin fenòmens d'emplaçament inesperats, s'hauria eliminat almenys una part de la proteïna.
- **DNA isogènic.** La freqüència de la recombinació homòloga depèn de la bondat de l'aparellament entre les dues seqüències homòlogues, és a dir, de la similitud entre aquestes. S'ha descrit que aquesta freqüència disminueix sensiblement quan s'utilitza per al vector seqüències homòlogues d'una soca de ratolí diferent a la de les cèl·lules ES (te Riele *et al.* 1992; van Deursen and Wieringa 1992; Zhou *et al.* 2001).
- **Tall de doble cadena.** Els vectors de reemplaçament han de ser linealitzats per desafavorir la inserció del vector complet. Això implica que s'ha de col·locar una diana de restricció única fora de les zones d'homologia. Aquesta diana és convenient situar-la lluny del vector de selecció negativa, per evitar que les exonucleases cel·lulars degradin aquest gen de manera que s'impedeixi la selecció negativa de la integració del vector.

6.3.4 Optimització del direccionament gènic

Des de la descripció del direccionament gènic el 1987 (Thomas and Capecchi 1987), aquesta tècnica ha estat àmpliament utilitzada i s'hi ha fet diverses adaptacions per a respondre a objectius més o menys concrets. Algunes d'aquestes adaptacions estan aquí resumides, per donar una idea de les nombroses possibilitats de la tècnica.

Les estratègies més comunes, que usen vectors d'inserció i reemplaçament, creen mutacions mitjançant delectons o insercions a la part codificant del gen diana. De vegades, però, interessa crear una mutació concreta, potser la mateixa que la de determinats pacients d'una malaltia genètica. L'aproximació "dins i fora" (de l'anglès *in and out*, també anomenada *hit and run*) utilitza dues etapes de recombinació homòloga (Hasty *et al.* 1991a; Valancius and Smithies 1991). En primer lloc utilitza un vector d'inserció amb un marcador de selecció positiva i un de selecció negativa. La inserció del vector, seleccionada amb el marcador de selecció positiva, ha produït la duplicació de seqüències gèniques (una d'elles contindrà la mutació) i la introducció dels dos marcadors enmig d'elles. Llavors, el marcador de selecció negativa permet seleccionar una nova recombinació (ara intracromosòmica) entre les zones duplicades. Una proporció dels productes d'aquesta reacció suposarà la fixació de la mutació, sense cap altra alteració al genoma. Una altra aproximació s'anomena en anglès *tag and exchange*. També utilitza dues etapes de recombinació homòloga, però aquí la segona es dona entre el genoma recombinat i un altre vector. Tots dos vectors són de reemplaçament, i mentre al primer pas només s'introdueixen els gens marcadors de selecció positiva i negativa, al segon pas són eliminats i intercanviats per la seqüència genòmica amb la mutació. Aquesta aproximació té l'avantatge que estalvia temps quan es vol generar una sèrie de mutants al mateix *locus* (Moore *et al.* 1995).

S'ha demostrat en diversos casos que la disrupció d'un gen per recombinació homòloga i la subseqüent introducció d'un minigen pGK-NEO al genoma pot reduir l'expressió dels gens veïns, i afectar així gens fins i tot 100 kb després del promotor inserit (Pham *et al.* 1996). Aquest efecte es pot evitar dissenyant el marcador de selecció positiva de manera que es pugui eliminar després de la selecció. Una estratègia per a fer-ho (a més de les dues anteriors) és flanquejar-lo de llocs loxP amb la mateixa orientació relativa, que

INTRODUCCIÓ

poden dirigir la seva escissió, mitjançant l'expressió transitòria de la recombinasa Cre en les cèl·lules ES o el creuament del ratolí KO amb un transgènic que expressi Cre a les cèl·lules germinals dels ovaris o testicles (Kuhn and Schwenk 1997; Gingrich and Hen 2000).

L'estratègia loxP-Cre recombinasa s'ha utilitzat també per eliminar parts del gen (o tot ell) que volem anul·lar. La distància entre els llocs loxP que permet la recombinació mitjançant la Cre recombinasa és il·limitada, de manera que permet la realització de grans delecions (Li *et al.* 1996). Fins i tot permet altres tipus de reordenaments cromosòmics, com ara les translocacions o inversions. Hi ha revisions força detallades sobre les estratègies Cre-loxP (Kilby *et al.* 1993; Torres and Kühn 1997).

L'alta eficiència de la recombinació dels llocs loxP per mitjà de la Cre recombinasa permet dissenyar l'experiment de manera que aquesta recombinació es doni pràcticament on i quan es vulgui. D'aquesta tècnica se'n diu direcció genètic condicional. Es pot crear un ratolí que expressi normalment el gen diana, que té alguna part de la seqüència flanquejada per llocs loxP. Aquest ratolí, a més, expressarà la recombinasa Cre en el moment del desenvolupament i teixit que li dicti el promotor que la governi. Només cal creuar el ratolí amb els loxP amb un ratolí transgènic que expressi la Cre recombinasa sota el control del promotor més adient (Gu *et al.* 1994). Actualment hi ha nombrosos ratolins transgènics per a la Cre recombinasa disponibles, fins i tot n'hi ha que l'expressen sota promotors induïbles a conveniència, com ara per ingestió de tetraciclina (Shockett and Schatz 1996) o altres drogues o lligands (Gingrich and Roder 1998). Existeix una base de dades sobre aquests ratolins transgènics, consultable a la pàgina d'Internet <http://www.mshri.on.ca/nagy/cre.htm>.

6.4 FONTS GENÈTIC

És possible que una mutació dissenyada per a reproduir en ratolins una malaltia genètica humana pugui imitar acuradament molts dels símptomes d'aquesta malaltia en una soca pura, mentre que en una altra soca la mateixa mutació provoqui un fenotip força més suau, amb molts menys símptomes. Aquest fet dóna l'oportunitat d'identificar gens que modifiquin l'expressió d'aquests símptomes, és a dir, els gens modificadors, que poden arribar a ser valuoses dianes per al tractament (Gingrich and Hen 2000). En aquest sentit, en el nostre laboratori s'estan realitzant experiments amb el model *Stones* per trobar possibles gens modificadors (veure la Discussió General).

Com que l'expressió d'una mutació específica pot estar fortament influenciada pel fons genètic on es dóna, l'elecció de la parella amb qui es creui la quimera afecta el model que es produeixi. Un model coisogènic, on el KO només difereixi dels controls en la pròpia mutació és directament accessible si es creua la quimera amb ratolins de la mateixa soca que la de les cèl·lules ES. Desafortunadament, els ratolins de la soca 129, d'on deriven les cèl·lules ES que donen millors resultats colonitzant la línia germinal, tenen ventrades petites, no són gaire bons en la cria, i són particularment sensibles a les infeccions. D'aquesta manera es fa molt difícil establir-ne una colònia. L'alternativa és creuar les quimeres a altres soques més robustes, com ara la C57BL, o a una soca creuada a l'atzar (*outbred*) com MF1 o CD1. Si les quimeres són creuades a una soca pura diferent, la descendència de la primera generació filial (F₁), que inclourà animals salvatges i animals heterozigots per a la mutació, serà genèticament homogènia (sense comptar el *locus* mutat) i generalment vigorosa. Però els homozigots obtinguts en la següent generació filial (F₂) seran heterogenis: cadascun tindrà una combinació a l'atzar del genoma de les dues soques a parts iguals. Malgrat que aquesta variabilitat pot emascarar un fenotip feble, aquesta estratègia ofereix una alternativa raonable en un temps curt. Una tercera opció, que permet gaudir de bons controls, és generar una soca congènica. En el cas d'un *knockout*, es creua la quimera amb ratolins d'una soca i la descendència heterozigota es va tornant a creuar sempre amb ratolins salvatges d'aquesta soca. En 10 generacions s'arriba a ratolins amb el 99,8% del genoma homozigot per la soca desitjada (la resta, que inclourà la zona al voltant de la manipulació genètica, serà heterozigota), que es consideren congènics i poden ser comparats amb controls de la soca pura. Aquest procés dura, però, 3 anys en el millor dels casos.

Els fenotips robustos, que es mantenen en diversos fons genètics, proporcionen una major confiança en la contribució d'aquell gen a un fenotip determinat. És aconsellable, doncs, l'anàlisi del fenotip produït per la mutació en més d'un fons genètic.

7 MODELS *KNOCKOUT* DE TRANSPORTADORS D'AMINOÀCIDS

S'han descrit fins el moment 7 ratolins *knockout* per a transportadors d'aminoàcids: CAT-1, GLT-1, EAAC-1, GLAST i CAT-2, b⁰⁺AT (fet pel nostre grup, veure apartat 5.6.2.1), rBAT, dels quals quatre models *knockout* són de proteïnes que transporten aminoàcids bàsics, dos pertanyents a la família CAT, i 2 a la família HAT (implicats en cistinúria). A més el grup de M.P. Sperandeo (Universitat Federico II, Nàpols, Itàlia) està generant el *knockout* de y⁺LAT1.

Dels cinc transportadors (EAAT-1 a 5) clonats representants del sistema X_{AG}, s'ha generat el model murí deficient per a tres. La recaptació del glutamat permet una correcta relació senyal-soroll en la transmissió sinàptica i evita la citotoxicitat que provocaria la contínua excitació neuronal (Choi 1988). Així, la pèrdua o inversió de transportadors de glutamat, podria contribuir al dany cel·lular en apoplexia, trauma, malaltia d'Alzheimer, esclerosi lateral amiotròfica i malaltia de Huntington. Malauradament, les funcions de cada transportador no eren conegudes a causa de la manca d'inhibidors específics. L'aproximació genètica semblava, doncs, la més adequada. GLT-1 (EAAT-2) i GLAST (EAAT-1) s'expressen a l'astroglia, tipus cel·lular que, entre d'altres funcions, sembla el principal encarregat de recaptar ràpidament el glutamat alliberat en les transmissions sinàptiques. GLT-1 s'expressa principalment al telencèfal i GLAST al cerebel. No ha sorprès, doncs, que els ratolins mutants per a cadascun d'ells presentin major susceptibilitat al dany cerebral i cerebelar, respectivament (Tanaka *et al.* 1997; Watase *et al.* 1998). El transport de glutamat als sinaptosomes corticals de mutants de GLT-1 està reduït al 5,8% del dels ratolins control. Això demostra que GLT-1 és el principal responsable del transport de glutamat al cervell. Aquests mutants són viables, però moren prematurament a causa d'atacs epilèptics espontanis (Tanaka *et al.* 1997). Els mutants de GLAST són viables i tenen una arquitectura cerebelar normal, al marge d'una anormal enervació múltiple per fibres grimpadores (*climbing fibers*), que pot ser la responsable de la lleugera descoordinació motora que pateixen (Watase *et al.* 1998). GLAST també s'expressa a la còclea, i els ratolins *glast*^{-/-} pateixen una major pèrdua d'oïda causada pel soroll (Hakuba *et al.* 2000).

EAAC-1 (EAAT-3) és un transportador de glutamat expressat principalment a les neurones del sistema nerviós central, al ronyó i a l'intestí. Els ratolins *eaac*^{-/-} no pateixen cap tipus de neurodegeneració, no tenen problemes de coordinació motora ni orientació espacial, ni tan sols major sensibilitat a la inducció d'atacs epilèptics. L'únic fenotip nerviós trobat fins el moment és una menor activitat locomotora (Peghini *et al.* 1997). On sí s'ha trobat un fenotip clar i esperat ha estat al ronyó, que es manifesta com una important hiperaminoacidúria dicarboxílica. Els ratolins *eaac-1*^{-/-} excreten 1400 cops més glutamat i 10 cops més aspartat que els ratolins control. Aquesta troballa demostra que EAAC-1 reabsorbeix glutamat i aspartat als túbuls renals i suggereix que altres transportadors no compensen la pèrdua al model murí de deficiència. Aquest model, per tant, reproduïx perfectament el fenotip renal dels malalts humans amb aminoacidúria dicarboxílica, si bé no imita el retard mental, que tampoc es troba a tots els malalts humans (Melançon *et al.* 1977).

S'han publicat dos models *knockout* de proteïnes que transportin aminoàcids bàsics, a part dels models de cistinúria, totes dues pertanyents a la família CAT. Els fibroblasts d'embrió primari (*primary embryo fibroblasts*, pef) dels ratolins *Cat1*^{-/-} són resistents a infecció per retrovirus ecotròpics, la qual cosa demostra que *Cat1* és l'únic receptor d'aquests virus murins. Respecte el seu paper a la vida normal i al desenvolupament del ratolí, l'absència de *Cat1* funcional provoca la mort dels ratolins *Cat1*^{-/-} durant el primer dia de vida a causa d'una anèmia severa i la reducció del pes dels nounats en un 25% (Perkins *et al.* 1997). S'ha trobat que el transport d'aminoàcids catiònics mediat per *Cat3* compensa funcionalment l'absència de *Cat1* a fibroblasts embrionaris derivats del *knockout* de *Cat1* (Nicholson *et al.* 1998). Calen més experiments per determinar si l'alteració a l'expressió de *Cat3* explica la supervivència dels ratolins *Cat1*^{-/-} fins el naixement. L'expressió coordinada de CAT2 i la sintasa d'òxid nítric 2 (NOS2) a molts tipus cel·lulars feu pensar en un possible paper del transport d'arginina mediat per CAT2 en la regulació de la producció d'òxid nítric (NO). Així, els ratolins *Cat2*^{-/-} són sans i fèrtils, però el seus macròfags activats per citoquines produeixen un 92% menys NO i transporten un 95% menys arginina. Sorprenentment, la concentració intracel·lular d'arginina i la quantitat de proteïna NOS2 romanen normals, la qual cosa suggereix l'existència de dues reserves d'arginina al macròfag activat, una d'elles inaccessible a la NOS2. L'activitat de *Cat2* ompliria la reserva accessible a NOS2, i així limitaria la producció de NO a aquestes cèl·lules. L'arginina necessària per a l'activitat metabòlica dels macròfags, és probablement aportada per altres sistemes de transport d'aminoàcids catiònics (Nicholson *et al.* 1998).

Objectius

Els objectius d'aquesta tesi han estat:

- I. Acotació del *locus* de cistinúria de tipus no I i clonació de cistinúria *SLC7A9*.

- II. Anàlisi de mutacions als gens *SLC7A9* i *SLC3A1* en les famílies cistinúriques de l'*International Cystinuria Consortium* (ICC).

- III. Estudi de la correlació genotip-fenotip en la cistinúria.

- IV. Estudi del paper dels polimorfismes de promotor i de canvi d'aminoàcid a *SLC7A9* en el fenotip cistinúric.

- V. Estudi de possibles gens moduladors del fenotip cistinúric: anàlisi dels gens *SLC7A8* (LAT-2) i *SLC7A10* (asc-1).

- VI. Generació d'un ratolí *knockout* per a *Slc7a8* (LAT-2)

Resultats

En aquesta secció es presenten els resultats obtinguts en aquesta tesi, en forma de 6 articles, publicats entre el 1999 i el 2005. Cada publicació va acompanyada d'un resum dels resultats presentats, alguns resultats complementaris i la discussió dels resultats.

8 ACOTACIÓ DEL NOU *LOCUS* DE CISTINÚRIA

Article 1:

RECOMBINANT FAMILIES LOCATE THE GENE FOR NON-TYPE I CYSTINURIA BETWEEN MARKERS *C13* AND *D19S587* ON CHROMOSOME 19Q13.1

Genomics 60:362-365. 1999

Lídia Feliubadaló, Luigi Bisceglia, Mariona Font, Luca Dello Strollogo, Ercole Beccia, Mine Arslan-Kirchner, Beat Steinmann, Leopoldo Zelante, Xavier Estivill, Antonio Zorzano, Manuel Palacín, Paolo Gasparini, and Virginia Nunes

Contribució:

Conjuntament amb Lídia Feliubadaló i Luigi Bisceglia, genotipació de famílies cistinúriques per als marcadors disponibles de la regió, permetent l'acotament del *locus* de cistinúria de tipus no I.

SHORT COMMUNICATION

Recombinant Families Locate the Gene for Non-Type I Cystinuria between Markers *C13* and *D19S587* on Chromosome 19q13.1

Lidia Feliubadaló,^{*,†} Luigi Bisceglia,[‡] Mariona Font,^{*} Luca Dello Strologo,[§] Ercole Beccia,[¶] Mine Arslan-Kirchner,^{||} Beat Steinmann,^{**} Leopoldo Zelante,[‡] Xavier Estivill,^{*} Antonio Zorzano,[†] Manuel Palacín,[†] Paolo Gasparini,[‡] and Virginia Nunes^{*,1}

^{*}Centre de Genètica Mèdica i Molecular-IRO, Hospital Duran i Reynals, Autovia de Castelldefels, Km 2.7, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona E-08907, Spain; [†]Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 645, Barcelona E-08028 Spain; [‡]Servizio di Genetica Medica, and [¶]Division di Urologia, "Casa Sollievo della Sofferenza," San Giovanni Rotondo, Foggia, Italy; [§]Divisione di Nefrologia e Dialisi, Ospedale Pediatrico "Bambino Gesù"–IRCCS, Rome, Italy; ^{||}Department of Human Genetics, Medical School, Hannover, Germany; and ^{**}Division of Metabolic and Molecular Diseases, University Children's Hospital, Steinwiesstrasse 75, CH-8032 Zurich, Switzerland

Received April 12, 1999; accepted July 12, 1999

Cystinuria is an autosomal recessive aminoaciduria in which three urinary phenotypes have been described. The gene responsible for type I, *SLC3A1*, encodes the amino acid transporter rBAT. This gene is not responsible for types II or III. Recently the type III locus (CSNU3) was mapped by two groups to overlapping 6-Mb regions on chromosome 19q. In the present study, we restrict the critical region for non-type I cystinuria to 2.4 Mb by recombination analysis in Italian, German, and Spanish families. For this purpose, we have used the microsatellite markers described in the region plus new microsatellites that we have developed. Our results locate the non-type I cystinuria gene in an interval flanked by the markers *C13* and *D19S587*, which are about 2.8 cM apart. © 1999 Academic Press

Press

Cystinuria is a disorder (MIM 220100) of amino acid transport, transmitted as an autosomal recessive trait. It is caused by a defective transport of cystine and dibasic amino acids through the luminal membrane of the epithelial cells of the renal and intestinal tracts. The low solubility of cystine induces its precipitation in the kidney tubules to form calculi that produce obstruction, infection, and, ultimately, renal insufficiency (16). Three phenotypes have been described for cystinuria, based on the urinary excretion of cystine in obligate heterozygotes: Type I carriers are silent, whereas type II and type III heterozygotes show high or moderate hyperexcretion, respectively (14). Our linkage

Sequence data from this article have been deposited with the GenBank Data Library under Accession Nos. AF139859 and AF139860.

¹To whom correspondence should be addressed. Telephone: 34-932607775. Fax: 34-932607776. E-mail: vnunes@iro.es.

data suggest that types II and III could be considered together (3). Thus, from now on we will refer to them as non-type I cystinuria.

A renal cDNA (named rBAT, D2, or NBAT), also expressed in the intestine, induces high-affinity transport when injected in *Xenopus laevis* oocytes (2, 17, 20). More than 35 mutations in the corresponding human gene, *SLC3A1*, have been found in type I patients (for review see Ref. 10). Mutational and functional analyses demonstrated that this gene is linked to type I but not to type III (4, 6). *SLC3A1* maps to chromosome 2p16.3 (5). The locus for non-type I cystinuria has been localized by linkage analysis to chromosome 19q13.1 by two groups. Our group has defined the non-type I locus between the markers *D19S414* and *D19S220* ($Z_{\max} = 13.11$ at $\theta_{\max} = 0.00$ with *D19S225*) (3). Simultaneously, Wartenfeld *et al.* (19) located the locus in Libyan families in an overlapping region, between markers *D19S409* and *D19S208*. We report the narrowing of the region by analysis of key recombination events in our non-type I families. We also describe the generation of two new microsatellite markers.

A total of 22 (20 Italian, 1 Spanish, and 1 German) non-type I families, many reported elsewhere, were available for the study (3). Patients and relatives were typed according to the classification by Rosenberg *et al.* (14, 15) as described elsewhere (4). To develop the two new microsatellite markers, we used a contig of cosmids kindly provided by the LLNL, whose restriction maps are available at <http://www-bio.llnl.gov/rmap>. These contigs are anchored to the metric physical map of chromosome 19 (1), updated at <http://www-bio.llnl.gov/bbrp/genome/genome.html>. Some cosmids near *D19S225* were initially screened for CA repeats by probing Southern blots containing *EcoRI* digests with a (CA)₁₀ oligonucleotide. The same 2.4-kb fragment from

TABLE 1
Characteristics of the Two New Polymorphic Dinucleotide Repeat Markers

Marker name	GenBank Accession No.	Cosmid clone	Primer sequence	Repeat in cosmid	Alleles	Size range	Heterozygosity	PIC
C13	AF139859	F10084	CACGTACCTCACCCCTTCTTA GGCTACTATTCTGTCTTGG	(AC) ₁₈	5	197–209	0.64	0.59
C17	AF139860	R32329 F19306	TGTCGGGGAAGTATAATGT AACATTCCGTCAGAT	(AC) ₁₄	8	256–272	0.75	0.72

overlapping cosmids R32329 and F19306 was subcloned into pBS (KS; Stratagene). The subclones were sequenced with vector primers to give the microsatellite *C17*. To develop the microsatellite *C13*, primers flanking the repeat sequence were identified after sequencing out the repeat (21), using cosmid F10084 as template. The GenBank Accession numbers assigned to markers *C13* and *C17* are AF139859 and AF139860, respectively.

The microsatellites used to genotype the families were *D19S414*, *D19S75*, *D19S251*, *D19S431*, *D19S430*, *C13*, *D19S225*, *C17*, *D19S868*, *D19S416*, *D19S248*, *D19S213*, *D19S245*, *D19S874*, *D19S587*, *D19S425*, *D19S208*, and *D19S220*. Information on all except *C13* and *C17* is accessible in the Genome Data Base at <http://www.gdb.org>. The physical mapping data used for markers *D19S414*, *D19S75*, *D19S251*, *D19S431*, *D19S430*, *C13*, *D19S225*, *C17*, *D19S416*, *D19S248*, *D19S213*, *D19S245*, *D19S587*, *D19S425*, *D19S208*, and *D19S220* were taken from three LLNL maps: the version of the chromosome 19q arm map available at <http://www-bio.llnl.gov/genome-bin/loadmap?region=mq>, the version of the chromosome 19q arm FISH map available at <http://www-bio.llnl.gov/genome-bin/loadmap?region=fq1>, and that of the restriction maps available at <http://www-bio.llnl.gov/rmap> on March 16, 1999. We located *D19S868* and *D19S874* using the information assembled in the Genome Data Base. Markers *D19S431* and *D19S430* are located in the Chromosome 19q arm FISH Map and in the metric physical

map published by Mohrenweiser *et al.* (9), but they are not ordered in either map. We have also used genetic and radiation hybrid items of information from the centers cited above to choose *D19S430* as the most telomeric.

Among the 22 families studied, 7 showed a recombination between the disease and markers within our published interval. We saturated the interval with all the microsatellites published to date in the databases of GDB, CEPH, and CHLC. Table 1 shows the main characteristics of new polymorphic markers *C13* and *C17* developed here. The results of genotyping the selected families for these markers are summarized in Fig. 1. Families F28, F84, F104, F117, and F83 locate the centromeric limit in markers *D19S75*, *D19S251*, *D19S251*, *D19S430*, and *C13*, respectively. Families F7 and F41 locate the telomeric limit in markers *D19S208* and *D19S587*, respectively. In Fig. 2, family F83 provides the current centromeric limit as *C13* and family F41 gives the current telomeric limit, which is *D19S587*. This leaves the CSNU3 region as a 2.4-Mb interval. Using the data provided by Mohrenweiser *et al.* (9), where 1 Mb in the chromosome 19q13.1 band corresponds to a sex-average recombination distance of 1.19 cM, the genetic distance can be approximated to 2.8 cM. This interval is still too large for a positional cloning approach. Family F117 is noninformative for six microsatellites in the centromeric limit. We are still working on new markers on both sides that could reduce the locus, using families F117 and F41.

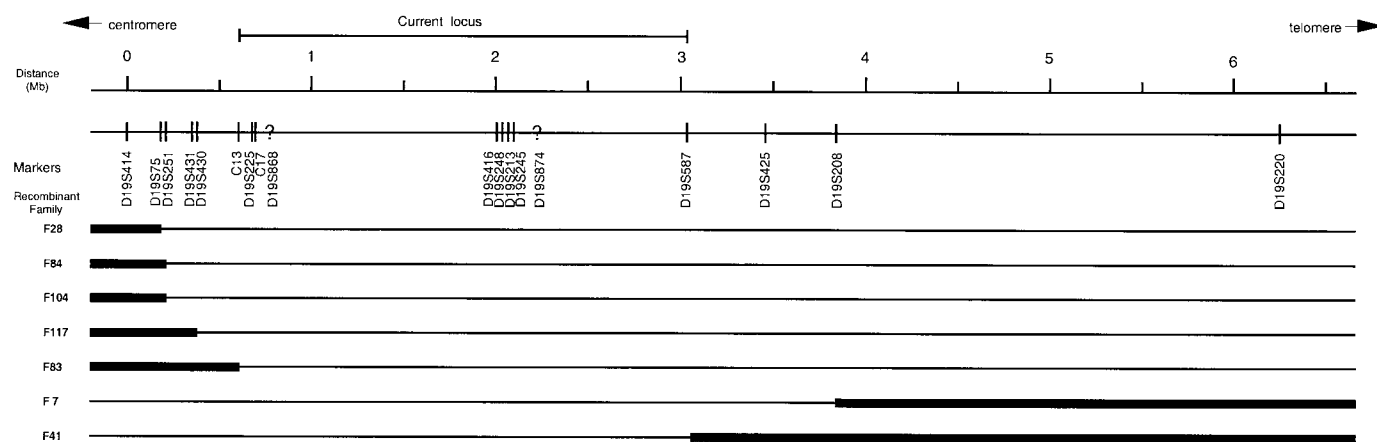


FIG. 1. Physical and genetic localization of the cystinuria non-type I gene and a schematic representation of the breakpoints of each of the seven key recombinant families used in this study. The physical position of the genetic markers has been retrieved from the cited LLNL maps. The question marks over markers *D19S868* and *D19S874* indicate that no physical information was available for them, and they have been located with linkage and radiation hybrid data. Black bars represent nonconcordance between a DNA locus and disease status in each family.

Number : F41

Number : F83

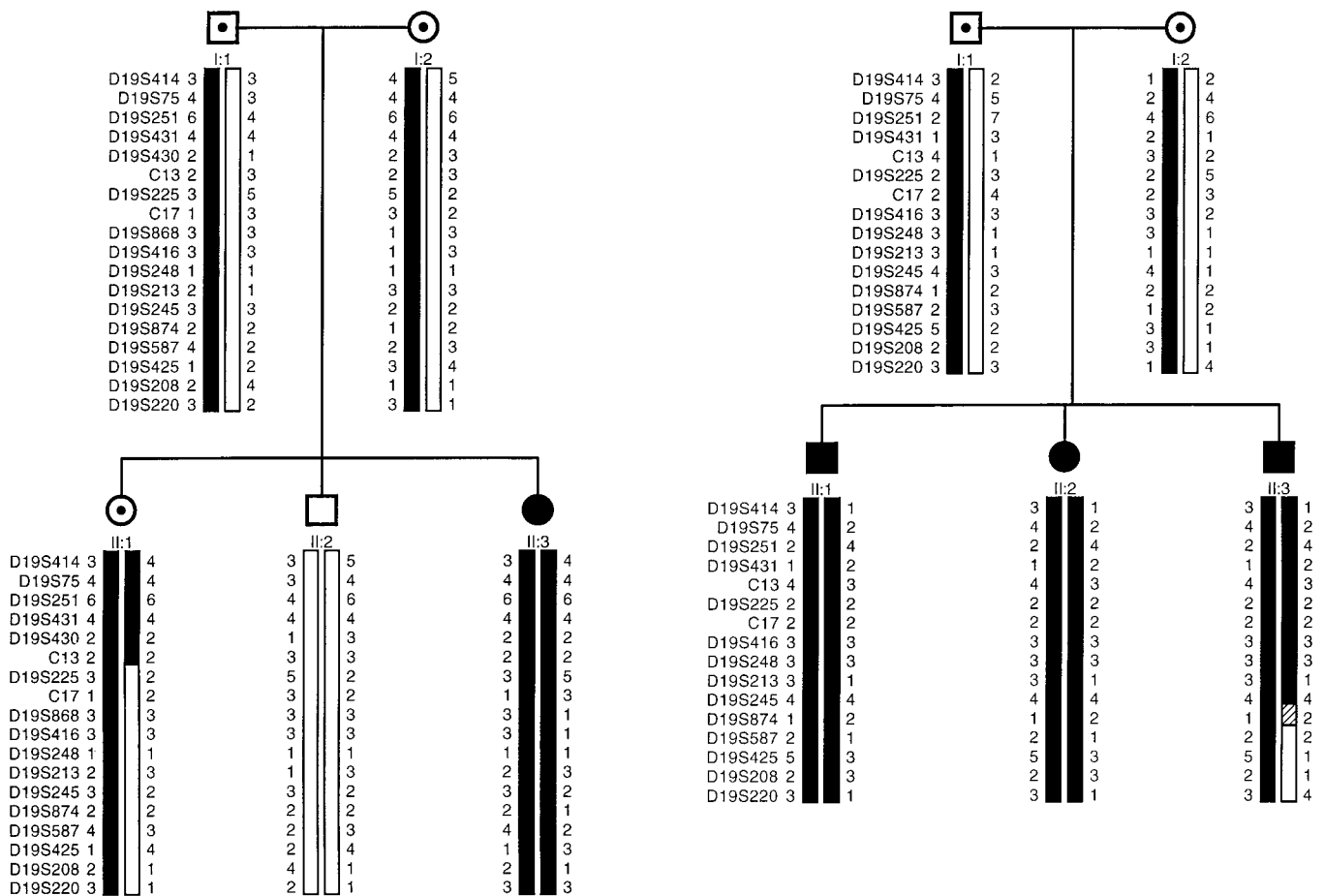


FIG. 2. Meiotic recombinations between the cystinuria non-type I locus and the closely linked DNA markers in two key recombinant families are illustrated. For each sibling, the paternal chromosome is on the left and the maternal chromosome is on the right. The filled bars represent the original disease-bearing haplotype. The diagonal lines indicate an indeterminate region between the recombination break-points, due to noninformativity of the marker. Disease status is indicated: affected, filled symbols; carriers, dotted symbols; unaffected, clear symbols.

The genes mapped to the current region are not good functional candidates for the non-type I cystinuria gene. Consequently, we collected the sequences of the ESTs mapped to the published locus, using the NCBI list available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/SCIENCE96>. We performed BLASTX with these sequences against the nonredundant protein sequence database at the NCBI. Nine sequences that showed slight similarity to transporters, or even to integral membrane proteins, were selected. The corresponding cDNA clones were ordered from the HGMP Resource Centre-UK or from Research Genetics. They were sequenced, and the new sequences were used to obtain the full-length sequence for the putative genes. Analysis of the new BLASTX results ruled out all nine provisional candidates.

Taking advantage of a functional approach, other candidates have appeared. They are members of a recently found family of permeases. Four cDNAs have been identified as subunits of 4F2hc and coexpress

with it amino acid transport activity in oocytes (7, 8, 12, 13, 18). The structural and functional similarities between rBAT and 4F2hc suggest that another member of this family might be the subunit that rBAT needs to induce its amino acid transport activity (reviewed in Refs. 10, 11). This subunit is a strong candidate for the cystinuria non-type I gene. A search through the databases suggests that there may be up to three new human members of this family. Two of them map to our locus, and their corresponding cDNAs are being screened for mutations in non-type I cystinuria patients. Finding these mutations in any of these genes would indicate which of them are responsible for non-type I cystinuria.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the families that participated in this work. We thank Jesús Purroy for helpful discussions and Robin Rycroft and Helena Krueyer for editorial help. This work was supported in part by the

Dirección General de Investigación Científica y Técnica, Research Grant PM96/0060, EU BIOMED 2 Grant BMH4CT98-3514, Fundació la Marató-TV3 Research Grant 981930, Generalitat de Catalunya/Spain, and TELETHON Grant to L.Z. (Italy). L.F. and M.F. are recipients of a fellowship from the Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica (Catalonia, Spain).

REFERENCES

- Ashworth, L. K., Batzer, M. A., Brandriff, B., Branscomb, E., de Jong, P., Garcia, E., Garnes, J. A., Gordon, L. A., Lamerdin, J. E., Lennon, G., Mohrenweiser, H., Olsen, A. S., Slezak, T., and Carrano, A. V. (1995). An integrated metric physical map of human chromosome 19. *Nat. Genet.* **11**: 422–427.
- Bertran, J., Werner, A., Moore, M. L., Stange, G., Markovich, D., Biber, J., Testar, X., Zorzano, A., Palacin, M., and Murer, H. (1992). Expression cloning of a cDNA from rabbit kidney cortex that induces a single transport system for cystine and dibasic and neutral amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 5601–5605.
- Bisceglia, L., Calonge, M. J., Totaro, A., Feliubadaló, L., Melchionda, S., García, J., Testar, X., Gallucci, M., Ponzzone, A., Zelante, L., Zorzano, A., Estivill, X., Gasparini, P., Nunes, V., and Palacin, M. (1997). Localization, by linkage analysis, of the cystinuria type III gene to chromosome 19q13.1. *Am. J. Hum. Genet.* **60**: 611–616.
- Calonge, M. J., Volpini, V., Bisceglia, L., Rousaud, F., de Sanctis, L., Beccia, E., Zelante, L., Testar, X., Zorzano, A., Estivill, X., Gasparini, P., Nunes, V., and Palacin, M. (1995). Genetic heterogeneity in cystinuria: The SLC3A1 gene is linked to type I but not to type III cystinuria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 9667–9671.
- Calonge, M. J., Nadal, M., Calvano, S., Testar, X., Zelante, L., Zorzano, A., Estivill, X., Gasparini, P., Nunes, V., and Palacin, M. (1995). Assignment of the gene responsible for cystinuria (rBAT) and of markers D2S119 and D2S177 to 2p16 by fluorescence in situ hybridization. *Hum. Genet.* **95**: 633–636.
- Gasparini, P., Calonge, M. J., Bisceglia, L., Purroy, J., Dianzani, I., Notarangelo, A., Rousaud, F., Gallucci, M., Testar, X., Ponzzone, A., Estivill, X., Zorzano, A., Palacin, M., Nunes, V., and Zelante, L. (1995). Molecular genetics of cystinuria: Identification of four new mutations, and seven polymorphisms, and evidence for genetic heterogeneity. *Am. J. Hum. Genet.* **57**: 781–788.
- Kanai, Y., Segawa, H., Miyamoto, K., Uchino, H., Takeda, E., and Endou, H. (1998). Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J. Biol. Chem.* **273**: 23629–23632.
- Mastroberardino, L., Spindler, B., Pfeiffer, R., Skelly, P. J., Shoemaker, C. B., and Verrey, F. (1998). Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family. *Nature* **395**: 288–291.
- Mohrenweiser, H. W., Tsujimoto, S., Gordon, L., and Olsen, A. S. (1998). Regions of sex-specific hypo- and hyper-recombination identified through integration of 180 genetic markers into the metric physical map of human chromosome 19. *Genomics* **47**: 153–162.
- Palacin, M., Estévez, R., Bertran, J., and Zorzano, A. (1998). Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol. Rev.* **78**: 969–1054.
- Palacin, M., Estévez, R., and Zorzano, A. (1998). Cystinuria calls for heteromultimeric amino acid transporters. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**: 455–461.
- Pfeiffer, R., Rossier, G., Spindler, B., Meier, C., Kühn, L., and Verrey, F. (1999). Amino acid transport of γ^+ L-type by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of the glycoprotein-associated amino acid transporter family. *EMBO J.* **18**: 49–57.
- Pineda, M., Fernández, E., Torrents, D., Estévez, R., López, C., Camps, M., Lloberas, J., Zorzano, A., and Palacin, M. (1999). Identification of a membrane protein (LAT-2) that co-expresses with 4F2hc an L type amino acid transport activity with broad specificity for small and large zwitterionic amino acids. *J. Biol. Chem.* **274**: 19738–19744.
- Rosenberg, L., Downing, S., Durant, J., and Segal, S. (1966). Cystinuria: Biochemical evidence for three genetically distinct diseases. *J. Clin. Invest.* **45**: 365–371.
- Rosenberg, L. E., Durant, J. L., and Albrecht, I. (1966). Genetic heterogeneity in cystinuria: Evidence for allelism. *Trans. Soc. Am. Physicians* **79**: 284–296.
- Segal, S., and Thier, S. O. (1995). Cystinuria. In "Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases" (C. H. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, and D. Valle, Eds.), pp. 3581–3601, McGraw-Hill, New York.
- Tate, S. S., Yan, N., and Udenfriend, S. (1992). Expression cloning of a Na^+ -independent neutral amino acid transporter from rat kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 1–5.
- Torrents, D., Estévez, R., Pineda, M., Fernández, E., Lloberas, J., Shi, Y.-B., Zorzano, A., and Palacin, M. (1998). Identification and characterization of a membrane protein (γ^+ L amino acid transporter-1) that associates with 4F2hc to encode the amino acid transport activity γ^+ L. A candidate gene for lysinuric protein intolerance. *J. Biol. Chem.* **273**: 32437–32445.
- Wartenfeld, R., Golomb, E., Katz, G., Bale, S. J., Goldman, B., Pras, M., Kastner, D. L., and Pras, E. (1997). Molecular analysis of cystinuria in Libyan Jews: Exclusion of the SLC3A1 gene and mapping of a new locus on 19q. *Am. J. Hum. Genet.* **60**: 617–624.
- Wells, R. G., and Hediger, M. A. (1992). Cloning of a rat kidney cDNA that stimulates dibasic and neutral amino acid transport and has sequence similarity to glucosidases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 5596–5600.
- Yuille, M. A. R., Goudie, D. R., Affara, N. A., and Ferguson-Smith, M. A. (1991). Rapid determination of sequences flanking microsatellites. *Nucleic Acids Res.* **19**: 1950.

8.1 IDENTIFICACIÓ D'UN NOU LOCUS DE CISTINÚRIA

Després de la demostració que mutacions a *SLC3A1* causaven cistinúria (Calonge *et al.* 1994), s'observà que només es trobaven mutacions als malalts de cistinúria de tipus I (Gasparini *et al.* 1995; Bisceglia *et al.* 1996). La descripció de polimorfismes a *SLC3A1* i la seva localització a la regió cromosòmica 2p16, junt amb els marcadors microsatèl·lits *D2S119* i *D2S177* (Calonge *et al.* 1995a), permeté l'anàlisi de lligament en les famílies cistinúriques. Així es confirmà, que si bé les famílies de tipus I/I (on els dos progenitors eren portadors de tipus I) mostraven lligament homogeni amb *SLC3A1*, les famílies dels llavors anomenats tipus I/III (amb un progenitor portador de tipus I i l'altre de tipus III) i III/III (on els dos progenitors eren portadors de tipus III) no estaven lligades a aquest gen (Calonge *et al.* 1995b).

El grup va iniciar la cerca d'altres gens responsables de cistinúria, mitjançant genètica posicional, utilitzant famílies de tipus III/III. Aquesta es va dur a terme per les doctores Maria Julia Calonge i Lidia Feliubadaló (Barcelona), i Luigi Bisceglia (San Giovanni Rotondo) (veure Introducció). La doctoranda s'incorporà al treball quan s'estava reduint la regió candidata de lligament, al cromosoma 19.

8.2 ACOTACIÓ DEL LOCUS DE CISTINÚRIA DE TIPUS NO I

Es va estudiar l'interval entre els marcadors *D19S222* i *D19S224*. Aquesta regió contenia 13 gens i 35 transcrits desconeguts. Es van obtenir totes les seqüències (unes 80) associades als transcrits desconeguts i se les va comparar mitjançant el programa BLASTX de l'NCBI amb el conjunt no redundat de bases de dades de proteïnes. Es van triar els 11 cDNA que mostraven homologia amb proteïnes de membrana. Tres cDNA van ser descartats perquè un mapatge més precís els va situar fora del *locus* del moment, i dels altres 6, uns no presentaven una homologia significativa amb proteïnes de membrana, i els altres es van descartar com a possibles transportadors d'aminoàcids. Així, tots els candidats provisionals van ser descartats.

Calia seguir alguna estratègia de cerca de gens segons la seva posició, com ara l'atrapament d'exons (*exon trapping*) o la selecció de cDNA (*cDNA selection*). La dificultat d'aquestes tècniques augmenta amb la mida de la regió. El *locus* estava delimitat pels marcadors *D19S414* i *D19S220*, situats a una distància massa gran per utilitzar aquestes tècniques i calia acotar-lo.

Per fer-ho, calia trobar famílies associades al *locus* on s'hagués produït una recombinació informativa dins aquest, per tant, calia ampliar al màxim el nombre de famílies lligades al *locus*, i també el nombre de marcadors dins aquest. Es fenotiparen i genotiparen un total de 22 famílies de tipus II i III. S'afegiren 12 marcadors microsatèl·lit més: *D19S75*, *D19S251*, *D19S431*, *D19S430*, *D19S868*, *D19S416*, *D19S248*, *D19S213*, *D19S245*, *D19S874*, *D19S587* i *D19S208*, situats dins la regió (figura 1 de l'article 1). El mapa físic de la zona s'obtingué d'un parell d'articles (Ashworth *et al.* 1995; Garcia *et al.* 1995) i una pàgina web (http://bbrp.llnl.gov/genome/html/chrom_map.html).

Malgrat la llarga llista de marcadors afegits a l'estudi, encara hi havia zones poc representades per marcadors. Es desenvoluparen 5 marcadors microsatèl·lits, dos d'ells publicats a la taula 1 de l'article 1 d'aquest apartat, i els altres 3, a l'article 2 de l'apartat 9.

D'entre les 22 famílies analitzades, 7 mostraren recombinacions dins els límits del *locus* inicial. La informació facilitada per aquestes famílies es resumeix a la figura 1 de l'article 1. Les famílies F41 i F83 definiren els límits centromèric i tel·lomèric, respectivament, del nou *locus*. La figura 2 de l'article 1 mostra aquestes dues famílies i els seus haplotips. D'aquesta manera, el *locus* de cistinúria havia quedat reduït a la zona del cromosoma 19q13.1 delimitada pels marcadors *C13* i *D19S587*. Segons les dades de localització del cosmidi F10084, on s'havia trobat *C13*, i el mapatge físic publicat de *D19S587*, el nou *locus* mesurava 2,4 Mb que, donada una freqüència de recombinació d'1,19 cM/Mb (Mohrenweiser *et al.* 1998), corresponien a 2,8 cM.

Totes les famílies incloses a l'estudi, tant les de tipus II com les de tipus III, mostraven segregació de la cistinúria amb el *locus* del cromosoma 19, recolzant el fet que els dos tipus de cistinúria es devien a un sol *locus*. Hi havia una família (F74, veure pedigrí a la figura 17) que segons la classificació fenotípica de (Calonge *et al.* 1995b), es podia considerar de tipus III/II. Aquesta família ens donava una nova pista sobre l'etiologia genètica d'aquesta malaltia. El fet que un sol *locus* sigui responsable de dos tipus d'una malaltia pot tenir diverses explicacions. Una possible hipòtesi, seria la que dos gens propers, ambdós inclosos al *locus*, podrien ser responsables cadascun d'un dels tipus de la malaltia. En la hipòtesi alternativa, un sol gen seria el responsable dels dos tipus. En aquest segon cas, les diverses mutacions del

RESULTATS

gen, podrien donar lloc als dos tipus de la malaltia, depenent de la severitat de la mutació, o fins i tot depenent d'altres factors externs al propi *locus*, com ara gens modificadors o factors ambientals. A la família F74, un mateix haplotip anava associat a fenotip III en la mare i a fenotip II en un dels fills. Si els dos tipus de cistinúria fossin deguts a gens diferents dins el *locus* 19q, o sempre a mutacions diferents en un únic gen dins el *locus*, l'haplotip associat a fenotip III/+ a la mare, hauria de forçar la presència del fenotip també III/+ al fill. Aquesta família, doncs, semblava indicar que un mateix haplotip al cromosoma 19q podia comportar fenotips II o III en generacions consecutives. Els tipus de cistinúria II i III, probablement estaven causats per mutacions al mateix gen, de vegades i tot, per la mateixa mutació (com es podia esperar a la família F74) en un sol gen del *locus*.

Com s'ha comentat a l'apartat 5.2.1 de la Introducció, la separació entre els tipus de cistinúria II i III, té la seva base en els fenotips urinari i intestinal, tot i que a la pràctica, se sol utilitzar només l'urinari per a la classificació de les famílies. Els portadors de tipus II presenten una hiperexcreció de cistina, lisina, arginina i ornitina superior a la dels portadors de tipus III. Pel que fa a l'intestí, segons Rosenberg i col·laboradors, la diferència entre els tipus II i III és l'absència de transport de lisina *in vitro* mediat als homozigots de tipus II i la seva presència als de tipus III, així com una lleugera resposta a les càrregues orals de cistina als homozigots tipus III, que no es detecta als de tipus II (Rosenberg *et al.* 1966a). Totes aquestes diferències, tant les renals com les intestinals, es poden atribuir a un gradient quantitatiu més que no pas qualitatiu en el transport residual produït per un mateix polipèptid amb dues mutacions diferents, o fins i tot, com es pot sospitar de la família F74 (només analitzada per al fenotip renal), de la mateixa mutació en un entorn cel·lular o fisiològic diferent. De fet, el grup de Rosenberg troba solapament en el fenotip urinari dels tipus II i III (Rosenberg *et al.* 1966a). Morin i col·laboradors, després de l'anàlisi renal i intestinal de 10 famílies cistinúriques, conclouen que no poden distingir entre un tipus II i un tipus III (Morin *et al.* 1971): al fenotip renal troben un continu d'hiperexcrecions al tipus dominant amb penetrança incompleta, que anomenen II i que, segons ells, no justifica la inclusió d'un tercer tipus; al fenotip intestinal no troben diferències ni tan sols entre les absorcions o les acumulacions *in vitro* dels homozigots dels tipus I i II. Així doncs, els nostres resultats preliminars i la literatura existent ens van començar a fer pensar en dos tipus de cistinúria que vem anomenar tipus I i tipus no I (II i III).

9 IDENTIFICACIÓ D'UN NOU MEMBRE DE LA FAMÍLIA DE LSHAT

Els resultats d'aquesta part són recollits a l'article 2:

NON-TYPE I CYSTINURIA CAUSED BY MUTATIONS IN *SLC7A9*, ENCODING A SUBUNIT (B^{0,+}AT) OF RBAT

Nature Genetics 23 (1):52-57. 1999

International Cystinuria Consortium:

Group A: Lídia Feliubadaló*, Mariona Font*, Jesús Purroy, Ferran Rousaud, Xavier Estivill and Virginia Nunes

Group B: Eliahu Golomb*, Michael Centola, Ivona Aksentijevich, Yitshak Kreiss, Boleslaw Goldman, Mordechai Pras, Daniel L. Kastner and Elon Pras

Group C: Paolo Gasparini*, Luigi Bisceglia, Ercole Beccia, Michele Gallucci, Luisa de Sanctis, Alberto Ponzzone, Gian Franco Rizzoni and Leopoldo Zelante

Group D: Maria Teresa Bassi*, Alfred L. George Jr, Marta Manzoni, Alessandro de Grandi, Mirko Riboni, John K. Endsley, Andrea Ballabio and Giuseppe Borsani

Group E: Núria Reig*, Esperanza Fernández, Raúl Estévez, Marta Pineda, David Torrents, Marta Camps, Jorge Lloberas, Antonio Zorzano and Manuel Palacín

*Aquests autors han contribuït en la mateixa mesura al treball

Contribució:

- Conjuntament amb Núria Reig, obtenció del clon sencer de cDNA de *SLC7A9* (figura 1), per crivellatge de la genoteca de ronyó humà.
- Localització de *SLC7A9* al BAC356357 del cromosoma humà 19q13.1.
- Cerca de mutacions a *SLC7A9* als pacients espanyols amb cistinúria de tipus no I (taula 1 i figures 4 i 5).

Non-type I cystinuria caused by mutations in *SLC7A9*, encoding a subunit ($b^{0,+}AT$) of rBAT

International Cystinuria Consortium

Cystinuria (MIM 220100) is a common recessive disorder of renal reabsorption of cystine and dibasic amino acids. Mutations in *SLC3A1*, encoding rBAT, cause cystinuria type I (ref. 1), but not other types of cystinuria (ref. 2). A gene whose mutation causes non-type I cystinuria has been mapped by linkage analysis to 19q12–13.1 (refs 3,4). We have identified a new transcript, encoding a protein ($b^{0,+}AT$, for $b^{0,+}$ amino acid transporter) belonging to a family of light subunits of amino acid transporters, expressed in kidney, liver, small intestine and placenta, and localized its gene (*SLC7A9*) to the non-type I cystinuria 19q locus. Co-transfection of $b^{0,+}AT$ and rBAT brings the latter to the plasma membrane, and results in the uptake of L-arginine in COS cells. We have found *SLC7A9* mutations in Libyan-Jews, North American, Italian and Spanish non-type I cystinuria patients. The Libyan Jewish patients are homozygous for a founder missense mutation (V170M) that abolishes $b^{0,+}AT$ amino-acid uptake activity when co-transfected with rBAT in COS cells. We identified four missense mutations (G105R, A182T, G195R and G295R) and two frameshift (520insT and 596delTG) mutations in other patients. Our data establish that mutations in *SLC7A9* cause non-type I cystinuria, and suggest that $b^{0,+}AT$ is the light subunit of rBAT.

We identified a human kidney cDNA, *SLC7A9*, which encodes a new member of a family of amino acid transporters^{5–10}. *SLC7A9* cDNA is 1,814-bp, polyadenylated and has an ORF encoding 487 amino acid residues (data not shown). Multialignment of the protein $b^{0,+}AT$ with the other human members of the family is shown (Fig. 1). Northern-blot analysis showed that $b^{0,+}AT$ is expressed in kidney, liver, small intestine and placenta as a transcript of approximately 1.9 kb, the size of *SLC7A9* cDNA (data not shown). This tissue distribution is consistent with that of a tentative rBAT light subunit¹¹.

As expected for an rBAT subunit, $b^{0,+}AT$ brings rBAT to the plasma membrane in co-transfected COS cells (Fig. 2). In contrast, transfection of rBAT alone resulted in the blockage of the

expressed protein in the endoplasmic reticulum (ER; Fig. 2), as reported¹². Similar behaviour was found for 4F2hc and its subunits when co-injected in *Xenopus laevis* oocytes^{6,8,9,13}. Co-injection of rBAT or 4F2hc with $b^{0,+}AT$ cRNAs in oocytes does not induce expression of amino acid transport (data not shown). In the case of rBAT this is probably due to the high amino acid transport induced by rBAT alone in oocytes. In contrast, co-transfection of rBAT and $b^{0,+}AT$ increased sodium-independent uptake of L-arginine in COS cells (Fig. 3).

YAC library and BAC contig screening indicated that *SLC7A9* maps to YAC 877f9 and BAC356357 (data not shown). This BAC localized between microsatellite marker loci *D19S776* and *D19S786* (ref. 14), in the refined locus of non-type I cystinuria. Thus, analysis of recombinant events in Spanish and Italian families, and historical recombinant events in Libyan Jewish families, including new marker loci¹⁵ (*C17A* and *C17* in cosmid R32329, *B27A* in BAC 277469 and *B35* in BAC35635), confined the gene to a 1.3-Mb interval between *C17A* and *D19S874* (centromere...*C17A/D19S225/C17-D19S868-D19S776-B27A/B35-D19S786-D19S416-D19S213-D19S874*...telomere; refs 15, 16 and data not shown). This data suggests *SLC7A9* as a candidate gene for non-type I cystinuria.

We searched for sequence alterations in *SLC7A9* in non-type I cystinuria Libyan Jewish and Italian patients, and in unclassified cystinuria patients from North America, with no mutations in the coding region of *SLC3A1*. We also screened patients with mixed type I/non-type I cystinuria from Italy. Sequencing of the entire cDNA in 3 Libyan-Jewish homozygotes revealed a c693G→A substitution, resulting in a mutation at position 170 of a fully conserved valine to methionine (Figs 1 and 4). Restriction analysis showed that the V170M mutation was found in 16 of 17 independent carrier chromosomes of 23 patients analysed (Table 1), but not in 200 control chromosomes. Restriction analysis also showed mendelian inheritance of V170M in all patients (data not shown). In one carrier chromosome from

Group A: Lidia Feliubadaló^{1,2*}, Mariona Font¹, Jesús Purroy¹, Ferran Rousaud³, Xavier Estivill¹ & Virginia Nunes¹

Group B: Eliahu Golomb^{4*}, Michael Centola⁵, Ivona Aksentijevich⁵, Yitshak Kreiss⁶, Boleslaw Goldman⁷, Mordechai Pras^{8,9}, Daniel L. Kastner⁵ & Elon Pras^{6,7}

Group C: Paolo Gasparini^{10*}, Luigi Bisceglia¹⁰, Ercole Beccia¹¹, Michele Gallucci¹², Luisa de Sanctis¹³, Alberto Ponzzone¹³, Gian Franco Rizzoni¹⁴

& Leopoldo Zelante¹⁰

Group D: Maria Teresa Bassi^{15*}, Alfred L. George Jr^{16,17}, Marta Manzoni¹⁵, Alessandro De Grandi¹⁵, Mirko Riboni¹⁵, John K. Endsley¹⁷, Andrea Ballabio¹⁵

& Giuseppe Borsani¹⁵

Group E: Núria Reig^{2*}, Esperanza Fernández², Raúl Estévez², Marta Pineda², David Torrents², Marta Camps², Jorge Lloberas¹⁸, Antonio Zorzano²

& Manuel Palacín²

*These authors contributed equally to this work.

¹Centre de Genètica Mèdica i Molecular (IRO), Hospital Duran i Reynals, Autovia de Castelldefels Km 2.7, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona E-08907, Spain. ²Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avda.Diagonal 645, Barcelona E-08028, Spain.

³Servicio de Nefrología IUNA, Fundación Puigvert, Cartagena 340, Barcelona E-08025, Spain. ⁴Department of Pathology, Sackler School of Medicine, Tel Aviv University, Tel Aviv 69978, Israel. ⁵Arthritis and Rheumatism Branch, National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases, Bethesda, Maryland 20892, USA. ⁶Department of Medicine C, ⁷Institute of Human Genetics, ⁸Department of Medicine F, ⁹Heller Institute of Medical Science, Sheba Medical Center, Tel Hashomer 52621, Israel. ¹⁰Medical Genetics Service, IRCCS-Hospital "CSS", San Giovanni Rotondo, Italy. ¹¹Division of Urology, IRCCS-Hospital "CSS", San Giovanni Rotondo, Italy. ¹²Division of Urology, Hospital "Cristo Re", Rome, Italy. ¹³Department of Pediatrics, University of Turin, Turin, Italy. ¹⁴Division of Pediatric Nephrology, Hospital "Bambino Gesù", Rome, Italy. ¹⁵Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), San Raffaele Biomedical Science Park, 20132 Milan, Italy. Divisions of ¹⁶Genetic Medicine, ¹⁷Nephrology, Vanderbilt University Department of Medicine, Nashville, Tennessee 37232, USA. ¹⁸Departament de Fisiologia (Biology of Macrophage), Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avda.Diagonal 645, Barcelona E-08028, Spain. Correspondence should be addressed to M.P. (e-mail: mpalacin@porthos.bio.ub.es).

b ^{0,+} AT	-----MCDTGLRKRRE-----D-EKSIQSQEPKTTT-----LQKELGLTS	34
y ¹ LAT-1	-----MVDSTTEYEVAS-----QPEVETSPLGDGASGPG-----EQVKLKEISLLN	41
y ¹ LAT-2	-----MEAREPGRPPTTYHLVPTNSQSQVEEDVSSPPQRSSETMQLKKEISLLN	49
LAT-2	-----MEEGARHRNN-----TEKKHPGGGSDASPEAGSGGGGVALKKEIGLVS	44
LAT-1	MAGAGPKRRRLAAPAAEKEKE-----AREKMLAAKSADGSAPEAGEGEG-VTLQRNITLLN	54
I		
b ^{0,+} AT	GISIIIVGTTIGSGIFVSPKSVLSNTEAVGCPCLIIWAACGVLATLGLCFABELGTMITKSG	94
y ¹ LAT-1	GVCLIVGNMIGSGIFVSPKGVLIYSASFGLSLVHWAVGGFLSVFVGLCYAELGTTIKKSG	101
y ¹ LAT-2	GVSLVVGNMIGSGIFVSPKGVLVHTASVGMSLVWATGGFLSVVGLCYAELGTTIKKSG	109
LAT-2	ACGIVGNIIGSGIFVSPKGVLENAGSVGLALIVIVTGFITVVGALCTARLGVTTIPKSG	104
LAT-1	GVAVIVGTTIGSGIFVTPGTVLEKAGSGPLALVWVWACGVFSIVGALCTARLGVTTIKKSG	114
II		
b ^{0,+} AT	GEYFYLMEAYGPIPAYLFSWASLIVKPTSFALICLSEFSEYVCAFFYVCGKPPQIVVKCL	154
y ¹ LAT-1	ASVAYILEAFPGFLAFIRLWTSLLIIEPTSQAITAITFANYMQVLPFSPCFAPYAASRL	161
y ¹ LAT-2	ASVAYILEAFPGFLAFIRLWTSLLIIEPTSQAITAITFANYMQVLPFSPCFAPYAASRL	169
LAT-2	GDYSYVKDIYPCGLACGFRIRLWIAVLVYPTNQAIVLTFESNYLQPLPTCFEPESGLRL	164
LAT-1	GDYAYMLEVYGSLLPFAFKLWIELLIIRPSSQYVALVVFATYLLKLEPFTCPVPEEAARKLV	174
III		
b ^{0,+} AT	AAAIILFISIVNSLVSRLGVSQVNIPTAAKLVIVAIITISGLVLLAQGNKTNFDN--SFE	212
y ¹ LAT-1	AAACICLLTFINCAVYKWTGLVODIETYAKVVALIAIVAGIVRLGGASVTFEN--SFE	219
y ¹ LAT-2	AAACICLLTFINCAVYKWTGLVODIETYAKVVALIAIVAGIVRLGGASVTFEN--SFE	227
LAT-2	AAICLLLLTVVNCSSVRAWTRVODIETAGKLLALALIITMGIVQICKGSEYFWLEPKNAFE	224
LAT-1	ACCLCVLLLTAVNCSYVKAATRVQDAFAAKLLALALIITMGIVQICKGSEYFWLEPKNFE	234
IV		
b ^{0,+} AT	GA-QLSVGAISLAFYNGLWADGWNQNLNYITEELRNPRNPLPLAIIIGIPLVTACYILMN	271
y ¹ LAT-1	GS-SFVAGDIALALYSALFSYSQWDTIANYVTEIIRNPERNPLPLAIIIGIPLVTACYILMN	278
y ¹ LAT-2	GS-SWDMGNLSLALYSALFSYSQWDTIANYVTEIIRNPERNPLPLAIIIGIPLVTACYILMN	286
LAT-2	NFQEPDIDGLVALAFIQGSFAYGWNFLNYVTEELVDPYKRLPRAIFISIPLVTFVYVFAN	284
LAT-1	GT-KLDVGNIVLALYSALFSYSQWDTIANYVTEIIRNPERNPLPLAIIIGIPLVTACYILMN	293
V		
b ^{0,+} AT	VSYPVTMTATELLOQAVAVTEGDRVLYPASWVPLFVAFSTIGAAANGCTFAAGRLIVVA	331
y ¹ LAT-1	VAYYTVLDMRDLEASDAVAVTEADQIFGIFNWIIPLSVALSCFGLNASIVAAASRLFFVG	338
y ¹ LAT-2	VAYYTVLNI SDVLSDAVAVTEADQIFGIFNWIIPLSVALSCFGLNASIVAAASRLFFVG	346
LAT-2	YAVVTAMSPQDLASNAVAVTEGDKLGVMAWMPISVALSTFGVNGSLFTSSRLFFAG	344
LAT-1	YAVYTTLSTEQMLSEAVAVDFGNYHLGVMWSWIIIVFVGLSCFCFVNSGLFTSSRLFFAG	353
VI		
b ^{0,+} AT	CREGHLMLVLSYISVRRLTPAPAIIFYGIIATYIIPGDISNLYNYSFAAWLFYGLTLL	391
y ¹ LAT-1	SREGHLPDAICMIEHVEFRTPVPSLLENGIMALYLVCVEDIFQLNYSYSYWFVGLSTV	396
y ¹ LAT-2	SREGHLPDLSMIEHVEFRTPVPSLLENGIMALYLVCVEDIFQLNYSYSYWFVGLSTV	406
LAT-2	AREGHLPSVLSMIEHVEFRTPVPSLLENGIMALYLVCVEDIFQLNYSYSYWFVGLSTV	404
LAT-1	SREGHLPDLSMIEHVEFRTPVPSLLENGIMALYLVCVEDIFQLNYSYSYWFVGLSTV	413
VII		
b ^{0,+} AT	GLIVMFRTRKELERPIKVPVPIEVLMTLISVFLVLAIPISKPTWEYLYCVLFLSGLLFF	451
y ¹ LAT-1	QQLYLWKEPDRRPLKLSVFFRIVFCCLCTIFLVAVPLYSDF--INSLIGIALSGLPFFY	457
y ¹ LAT-2	QQLYLWKEPDRRPLKLSVFFRIVFCCLCTIFLVAVPLYSDF--INSLIGIALSGLPFFY	465
LAT-2	QIVLWKKPDIIPRPIKINLLFPPIIYLLFWAFLVFLVSESEP-VVCGIQLAIMLTVGPVY	463
LAT-1	QIVLWKKPDIIPRPIKINLLFPPIIYLLFWAFLVFLVSESEP-VVCGIQLAIMLTVGPVY	472
VIII		
b ^{0,+} AT	FLFVHYKFG-----WAQKISKPIITMHLQMLMEVVPPEEDPE-----	487
y ¹ LAT-1	FLIIRVPEHKRPLVLRIVGSATRYLQVLCMSVAEMDLEDG-----GEMPKQRDPKSN	511
y ¹ LAT-2	FMGVYLPESRRPLFIRNVLAAITRGTLQQLCFVLTLEDVAE-----EKKDERKTD	515
LAT-2	FLGVYVQH--KPKCFSDFIELLTLVSSQKMCVVYVEVERGSGTEAEANDEEQQPMYQP	521
LAT-1	FFGVWVKN--KPKWLLQGFISTTVLQCKLMQVVPQET-----	507
IX		
b ^{0,+} AT	-----	
y ¹ LAT-1	-----	
y ¹ LAT-2	-----	
LAT-2	TPTKDKDVAQGPQP	535
LAT-1	-----	

Fig. 1 Amino acid sequence comparison of the five human members of the family of light subunits of heteromeric amino acid transporters. Multialignment was done using the program CLUSTALW Sequence Alignment from the Baylor College of Medicine. b^{0,+}AT has an amino acid sequence identity of 40%, 40%, 42% and 39% with human y¹LAT-1, y¹LAT-2, LAT-1 and LAT-2, respectively. The horizontal lines indicate the 12 putative transmembrane domains determined by computer analysis. The amino acid residues identical to b^{0,+}AT sequence are indicated in grey boxes. The solid frame box indicates a potential N-glycosylation site, conserved in all members of this family of amino acid transporters, but according to our membrane topology prediction, this site is intracellular and cannot be glycosylated. The conserved cysteine residues, which are shown to form the disulfide bridge between 4F2hc (residue C109 in the human sequence) and the *Xenopus laevis* LAT-1 (residue C164) subunit²⁹, are indicated with an asterisk (cysteine residue 144 in b^{0,+}AT). Mouse xCT, amino acid transporter and subunit of 4F2hc of this family of proteins¹⁰, is not shown in this multialignment because its human counterpart has not been cloned.

Sequence analysis of 3 exons, covering 30% of the coding region of *SLC7A9*, revealed 6 mutations in North American and Italian patients between transmembrane domains III and VII (Table 1 and Fig. 4): 4 missense mutations (G105R, A182T, G195R and G259R) and 2 frameshift mutations (520insT and 596delTG), leading to premature stop codons 24 and 208 bp downstream, respectively. G105R is the most common mutation, with 3 homozygous, 3 homo- or hemizygous and 11 heterozygous patients detected (Table 1). G259R was detected in homozygosity in a daughter of a consanguineous mating (Fig. 5 and Table 1), whereas mutation 596delTG was found in a homo- or hemizygous state in a North American patient (Table 1). A182T was found in 4 unrelated Spanish patients (Table 1). For the Italian and Spanish patients, restriction analysis showed mendelian inheritance of these mutations in all cases. None of these six mutations were identified in 100–130 control chromosomes.

Of the seven non-type I cystinuria-specific mutations described, two are frameshift mutations leading to truncated b^{0,+}AT proteins that lack the last three-quarters of the protein, and three others (G105R, V170M and G195R) are missense mutations of highly conserved amino acid residues (Figs 1 and 4). To demonstrate that one of these missense mutations, V170M (the Libyan Jewish mutation), causes cystinuria, we analysed sodium-independent uptake of L-arginine after transient co-transfection of rBAT with constructs encoding wild-type b^{0,+}AT or V170M b^{0,+}AT in COS cells. The V170M substitution abolished the L-arginine uptake associated with the co-expression of rBAT (Fig. 3). These results demonstrate that mutations in *SLC7A9* cause non-type I cystinuria.

© 1999 Nature America Inc. • http://genetics.nature.com

individual 176-02 (ref. 3), we did not find any mutation despite sequencing the entire coding region. Urine amino acid levels in this individual were consistent with a non-type I carrier, and this family showed linkage to chromosome 19q (ref. 3). We suspect that this chromosome bears a mutation in the non-coding region of *SLC7A9*. This is supported by the fact that *SLC7A9* lies in BAC356357 together with marker B35, and this chromosome has a different allele from the ancestral one in this and neighbouring markers (data not shown).

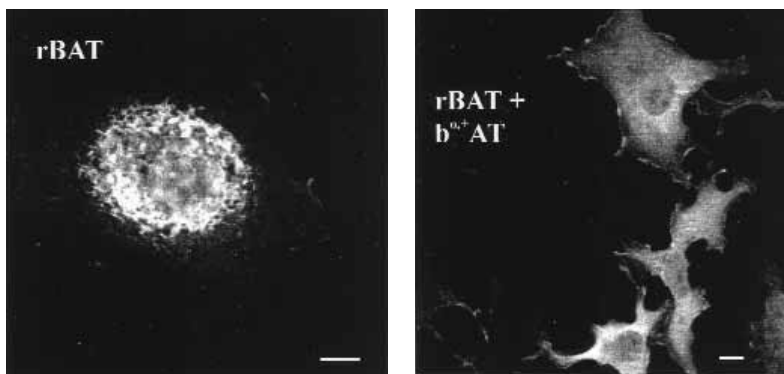


Fig. 2 Localization of rBAT in transfected COS cells. COS-1 cells were transfected with pcDNA3-rBAT, pcDNA3-rBAT and pcDNA3-b^{0,+}AT or with the vector alone (pcDNA3). After 24 h, rBAT was immunolocalized with anti-rBAT MANR5 polyclonal antibody¹⁹. The rBAT-immunodetected signal (white) is almost exclusively visible inside the cell, most probably in the ER and lysosomes, in rBAT-transfected cells. In contrast, in ~10% of the cells transfected with constructs encoding rBAT and b^{0,+}AT the rBAT-specific signal reached the plasma membrane. Background in vector-transfected cells was undetectable (data not shown). Bars, 10 µm.

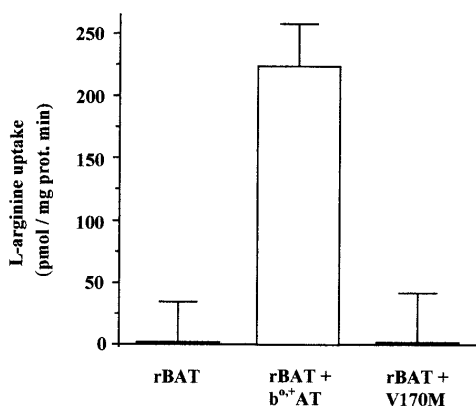


Fig. 3 Analysis of V170M b⁰⁺AT amino acid uptake in COS cells. COS-1 cells were transfected with pcDNA3-rBAT, pcDNA3-rBAT and pcDNA3-b⁰⁺AT or vector alone (pcDNA3). The uptake of 50 μM L-[³H] arginine in the absence of sodium was measured 48 h after transfections. The specific uptake activity (that is, subtracting the uptake in vector-transfected cells) is shown. Data are mean ± s.e.m. from four determinations. The specific uptake in the cells transfected with rBAT and b⁰⁺AT was significantly higher (Student t-test; P ≤ 0.01) than that of rBAT-transfected cells or rBAT- and V170M-transfected cells. The uptake in vector-transfected cells was 590 ± 20 pmol L-arginine/mg protein/min.

We were not able to fully differentiate between the type II and III phenotypes. According to the urinary amino acid profile, most of the patients described above seemed to have inherited type III cystinuria from both parents, but there are some exceptions (Table 1). V.S. carries mutation G105R and appears to be a type II/II cystinuria patient, on the basis of the urine excretion of his parents. This family alone yielded a lod score greater than 2 using markers close to the cystinuria 19q locus⁴. On the other hand, mutation G105R segregates with type III in 10 Italian families. Similarly, mutation V170M in Libyan-Jewish patients associates with type II or III urinary phenotypes¹⁷. Moreover, some mutations in *SLC7A9* (for example, A182T) result in a very mild phenotype similar to type I or mild type III phenotypes, whereas others (for example, G105R and G195R) result in a type III phenotype in some patients who inherited mixed-type cystinuria. These results suggest that types II and III, and in some cases type I, represent allelic differences in *SLC7A9*. Other factors, genetic and environmental, are probably also involved. Finally, mutations G105R in *SLC7A9* and M467T in *SLC3A1* (data not shown) were found in one patient (N.G.). These preliminary results suggest that cystinuria is a digenic disease in some of the mixed type I/non-type I patients, and support the hypothesis of partial genetic complementation¹⁸. Full sequencing of the two *SLC7A9* alleles in this family will be necessary to confirm this.

Studies that we have performed in patients with mutations in *SLC7A9* and with type III/III cystinuria based on the urinary

amino acid profile of their parents show an impairment (~50% of control values) of intestinal absorption of lysine and arginine (ref. 17, and L.d.S. and A.P., unpublished data). This is in agreement with the expression of b⁰⁺AT in the small intestine.

Localization^{19,20} and partial knockout studies²¹ showed that rBAT is necessary for the activity of the amino acid transport b⁰⁺ in the brush-border plasma membrane of epithelial cells in the proximal straight tubule. The functional studies of b⁰⁺AT and rBAT described here, and the fact that mutations in their genes cause non-type I and type I cystinuria, respectively, support the hypothesis that b⁰⁺AT and rBAT are the light and heavy subunits, respectively, of the amino acid transporter b⁰⁺. Consistent with this, it was shown that rBAT and b⁰⁺AT form a disulfide-linked heterodimer, and that a fusion of the two proteins expresses b⁰⁺ transport activity in oocytes (F. Verrey *et al.*, pers. comm.).

It remains to be determined why mutations in *SLC3A1* are recessive, whereas mutations in *SLC7A9* are incompletely recessive. We offer two hypotheses. First, if the active b⁰⁺ transporter is constituted by more than one rBAT and b⁰⁺AT subunits, one mutated allele of b⁰⁺AT might produce a dominant defect, whereas one mutated allele of rBAT would produce a trafficking defect, as previously described²². Second, the light subunit of rBAT (b⁰⁺AT) might associate with a protein other than rBAT, and express cystine transport activity in a different proximal tubular segment. *In situ* hybridization and immunolocalization studies (F. Verrey *et al.*, pers. comm.) show expression of b⁰⁺AT in the epithelial cells of the proximal straight tubule, like rBAT, but higher expression in the proximal convoluted tubule. Most of the renal cystine reabsorption occurs in the proximal convoluted tubule via a low-affinity system not identified at the molecular level²³. If *SLC7A9* also encodes this transport system, a partial

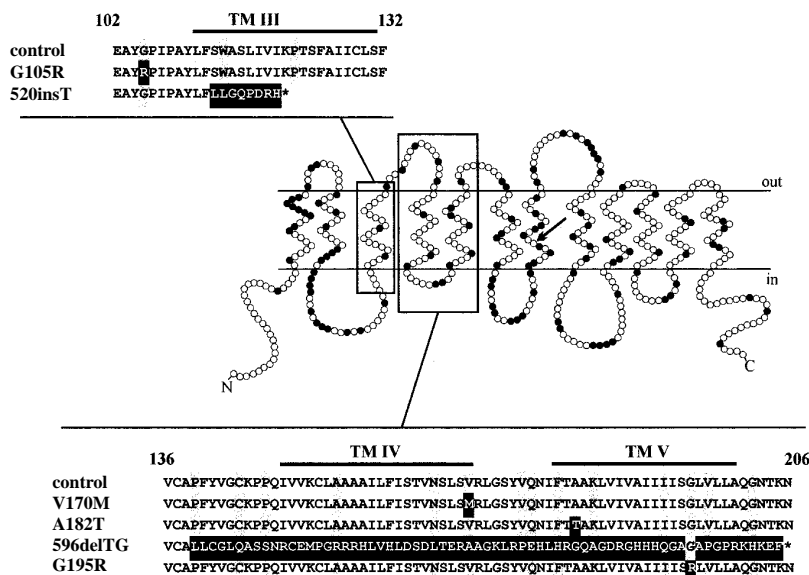


Fig. 4 Schematic representation of the non-type I cystinuria-specific mutations identified in the b⁰⁺AT amino acid transporter. Membrane topology prediction algorithms suggest that b⁰⁺AT contains 12 transmembrane domains with the N and C termini located intracellularly. All mutations have been identified in the part of the protein between transmembrane (TM) III and VII. The missense mutations G105R, V170M (The Libyan Jewish mutation) and G195R change residues that are highly conserved in this family of amino acid transporters. The arrow in TMVII denotes the amino acid residue altered in mutation G259R. Control, wild-type sequence. *, premature stop codon. Grey background denotes amino acid residues conserved in the human members of the family. White characters on black background denote sequence alterations versus wild-type sequence. TM, putative transmembrane domain. Amino acid residue numbers are indicated above the alignments.

Table 1 • Non-type I cystinuria-specific mutations in *SLC7A9*

Mutation	Nucleotide change	Restriction analysis creates	Restriction analysis destroys	Patients	Type of cystinuria	Mutation genetic status
G105R	c496G→A	–	<i>Apal</i>	brothers T.G. and T.G. (USA) M.S. (USA) F.G., R.W. and J.P. (USA) V.R., M.G. and L.F. (Italy) R.L., B.L., A.E., C.S., B.F., R.S. and V.S. ^b (Italy) N.G. (Italy)	unknown unknown unknown non-type I non-type I ^c	homo- or hemizygous ^a homo- or hemizygous ^a heterozygous homozygous heterozygous
520insT ^d	ins T at c520	–	–	G.W. (USA)	unknown	heterozygous
V170M	c693G→A	–	<i>Rsal</i> ^e	23 Libyan Jewish patients ^f (16 independent chromosomes)	non-type I	homozygous in 20 patients heterozygous in 3 patients
A182T	c729G→A	–	<i>KspI</i>	P.M. (Italy) M.C. (Spain) M.R., E.B. and R.P. (Spain)	non-type I ^g non-type I ^h non-type I ^g	heterozygous heterozygous heterozygous
596delTG ^d	del TG at c596	–	–	T.C. (USA)	unknown	homo- or hemizygous ^a
G195R	c768G→A	–	<i>AcI</i>	C.M. (Italy)	non-type I ^b	heterozygous
G259R	c960G→A	<i>Ddel</i> ^e	–	M.F. (Italy)	non-type I	homozygous

All are unrelated patients, unless otherwise indicated. ^aMendelian inheritance was confirmed in all cases, except for these North American patients for whom parent samples were not available. Non-type I patients are type III, except ^bV.S. (type II/II patient) and the ^fLibyan Jewish patients, who showed a urinary phenotype range between type III and type II. ^cMutation transmitted as the non-type I allele in mixed type I/non-type I cystinuria. ^dThese mutations were checked by sequencing in normal chromosomes. ^eRestriction site generated by a mutagenesis primer. ^gMutation transmitted as the type I or a mild non-type I allele in mixed type I/non-type I cystinuria. ^hDoubtful non-type I or mixed type I/non-type I cystinuria. The phenotype of Libyan Jewish patients and patients B.L. (family: F3), P.M. (F25), B.F. (F40), C.S. (F41), A.E. (F43), R.S. (F48), V.S. (F62) and M.R. (F15) have been reported^{2,4,17}.

defect in this major renal reabsorption mechanism would explain the incompletely recessive phenotype of non-type I cystinuria.

We have explained 41 cystinuria chromosomes of 133 independent chromosomes. In most patients, however, we have sequenced only one-third of the *SLC7A9* coding region. In the remaining 92 chromosomes, mutations may occur in *SLC7A9* regions which have not yet been sequenced, or in other genes. An

additional member of the solute carrier family 7 is located, like *SLC7A9*, in the non-type I cystinuria locus and remains to be studied. Full mutational analysis of *SLC7A9* and this new putative amino acid transporter might clarify the subtypes of non-type I cystinuria, and the molecular basis of the disease.

Methods

Cystinuria patients. We studied 23 non-type I cystinuria Libyan Jewish patients, 33 unclassified cystinuria patients from North America and 27 non-type I or mixed type I/non-type I cystinuria patients from Italy, representing 17, 62 and 54 independent chromosomes, respectively. All patients excrete cystine and dibasic amino acids in the range of cystinuria homozygotes², and all but one North American patient and three Libyan Jewish patients have documented production of cystine calculi (refs 2,4,17, and data not shown). Cystinuria in these Libyan Jewish patients was classified as a non-type I disease in a previous study¹⁷. Despite the genetic homogeneity of these Libyan Jewish patients, suggesting a common founder mutation, the range of amino acid urinary excretion in obligate heterozygotes is large enough for some individuals to be classified as type II and

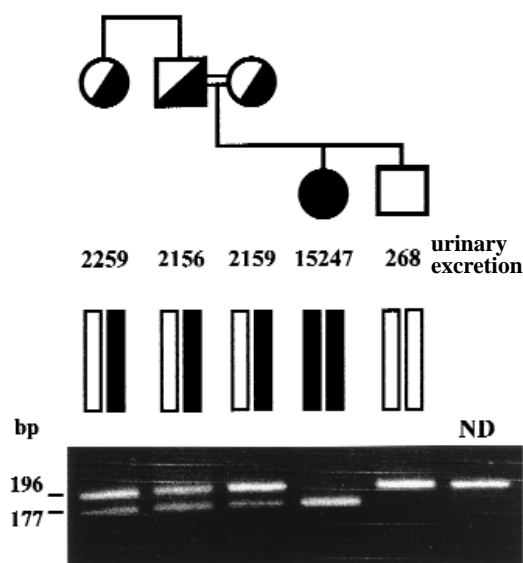


Fig. 5 Mendelian inheritance of mutation G259R of *SLC7A9* in a non-type I cystinuria consanguineous family. Haplotypes (vertical open and filled bars) were obtained with markers from cystinuria non-type I locus on chromosome 19 (*D19S75*, *D19S251*, *D19S213*, *D19S416* and *D19S208*). Open chromosomes are normal, but not necessarily identical, and filled chromosomes are identical cystinuria-transmitting chromosomes. The sum of the urine excretion of cystine, lysine, arginine and ornithine is reported for each individual as $\mu\text{mol/g}$ creatinine. Detection of mutation G259R by the *Ddel* site generated using BR1 and the forward mutagenesis primer BF2 (5'-CTGCCTTTGGCCATTATCCTC-3'; underlined character indicates the mutated nucleotide) is shown. The non-digested (ND) band is 196 bp, which results in two bands of 177 bp and 19 bp (not shown) after digesting the mutated allele with *Ddel*.

some as type III patients¹⁷. The North American patients have not been classified because samples from their parents are not available, but they do not show mutations in the ORF of *SLC3A1* after a mutation search by SSCP. The obligate heterozygotes of the families of the Italian patients, and the four Spanish patients, showed urine phenotypes in the non-type I or mixed type I/non-type I cystinuria ranges². Urine phenotype of the non-type I cystinuria in these patients corresponds to the type III range (refs 2,18). Only the Italian patient V.S. inherited cystinuria from parents excreting cystine and dibasic amino acids over the type III range², who were classified as type II heterozygotes⁴.

EST database searching. We performed dbEST (ref. 24) searches as described^{7,25}. We obtained the cDNA clone corresponding to a partial b⁰⁺AT transcript (IMAGE clone 126710) from Research Genetics and the UK Human Genome Mapping Project (HGMP) Resource Centre.

cDNA library screening. Phage library plating and screening conditions were as described²⁶. Human cDNA clones were isolated from an adult human kidney cDNA library (Stratagene; λ Uni-ZAP XR vector) using a 742-bp 126710 probe, labelled with (α -³²P)dCTP, obtained using primers P6D6 (5'-CTGCCTTTGGCCATTATCATCGGGA-3') and P6R4 (5'-CAGCTGACTTGGC-TACAAGAGA-3'), designed from the EST clone 126710. Nine positive plaques, confirmed by nested-PCR amplification, were excised according to the manufacturer's instructions. One clone was purified and sequenced.

DNA sequencing and computer sequence analysis. We carried out automated sequencing (using Applied Biosystems ABI 377 fluorescent sequencers) using gene-specific oligonucleotide primers. Sequences of these primers are available on request. Sequence assembly and editing was performed using Sequencher (Gene Codes), AutoAssembler (Perkin Elmer-Applied Biosystems) and DNA Strider 1.2 software programs and multiple sequence alignment was performed using ClustalW algorithm, as described^{7,25}. We compared nucleotide and amino acid sequences with the non-redundant sequence databases at the NCBI (National Center for Biotechnology Information) using BLAST version 2.0 as described²⁵. The prediction of transmembrane domains was performed as described⁷.

Northern-blot analysis. We used a human adult poly(A⁺) RNA membrane containing 12 different tissues (Clontech). The same 742-bp b⁰⁺AT PCR-amplified fragment used for the library screening was used as a probe. Hybridization and washing were as recommended by the manufacturer.

Cell culture, transfection, amino acid uptake and immunofluorescence in COS cells. COS-1 cells (a gift from S. Vilaró) were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, antibiotics and glutamine (2 mM). For amino acid uptake measurements, cells were cultured in six multi-well dishes. For immunofluorescence studies, cells were cultured in 10-cm diameter plates with glass coverslips.

For transfection studies, expression vectors pcDNA3, pcDNA3-human rBAT (cloned between the restriction sites *EcoRI-XbaI*), pcDNA3-human b⁰⁺AT and pcDNA3-human V170M b⁰⁺AT (cloned between the restriction sites *EcoRI-XhoI*) were used. At ~60% confluence, we transiently transfected cells with DNA (2 μ g) using the FuGENE 6 transfection reagent (Boehringer) following the manufacturer's protocol. After 48 h, uptake of L-[³H] arginine (50 μ M) was measured as described¹¹. Results of uptake are corrected for protein content, and expressed after subtracting the background values.

For immunofluorescence labelling, the transfected COS-1 cells grown on glass coverslips were rinsed briefly in PBS, fixed in 3% paraformaldehyde phosphate buffer saline (PBS) for 30 min at RT, washed twice in PBS and processed. We used anti-rBAT MANR5 (1:500) as primary antibody¹⁹. Primary antibody was visualized with Oregon green-conjugated goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes) at a 1:100 dilution. Both antibodies were diluted in PBS containing 1% FBS. Finally, coverslips were mounted with immunofluorescence medium (ICN). Confocal microscopy was performed at the Serveis Científico-Tècnics of the University of Barcelona.

RT-PCR amplification and mutation analysis of *SLC7A9* cDNA. For the identification of V170M mutation, RNA from lymphoblastoid cells from

three Libyan Jewish patients and a control was isolated, retrotranscribed with primer P6R7 (5'-CTGAGTATATTTATTTCGTAAGA-3') and PCR-amplified with primers P6F7 (5'-CAGGAGGAAACATGGGGGATACTG-3') and P6R3 (5'-CTGCAGGAGTTCGGTGGCA-3'). We performed a second PCR with primers P6D11 (5'-GGTCATCTCGACAGTGAAGT-3') and P6R1 (5'-CACGTTGATGAGGATGTAGCA-3'). The resulting fragment was sequenced from both sides with primers P6D11 and P6R1. RT-PCR protocols were as described²⁷.

PCR-amplification and mutation analysis of genomic *SLC7A9*. For the screening of V170M mutation, an 84-bp genomic DNA was PCR-amplified with *SLC7A9* forward primer 5'-CATCTGTTCATCTCGACAGTGAACTC-3' and with *SLC7A9* reverse mutagenesis primer 5'-CCA GCTTGCCCGCGGTGAAGATGTTCTGGACGTAGCTTCCCAGCCGTA-3' (the underlined base has been changed to create an *RsaI* site in the wild-type *SLC7A9* sequence, but not in V170M *SLC7A9* sequence). This restriction site does not depend on the V170M-associated c692 T→C polymorphism (nt 5' next to the mutation).

Lymphoblastoid cell lines were not available for any of the North American or for most of the Italian patients studied, therefore mutational screening in these patients was performed with genomic DNA. We screened a PAC library by hybridization in standard conditions, using as a probe a 675-bp cDNA fragment encompassing both the 3' UTR and part of the coding region (nt positions 1,000–1,675 of the cDNA). Four PAC clones from the RPIC5 library were identified (10003N9, 911F19, 989n8 and 852F21). Sequences of exon-intron boundaries in these clones allowed the design of the oligonucleotide primers used to amplify genomic DNA (G105R, 596delTG and 520insT, DF, 5'-AGCCTCCGGTGGGAGG AAG-3', and DR, 5'-GAGTCCCCAGACACCCTCTG-3'; A182T and G195R, LAT3EF, 5'-AAAGGAGACTCTCCAGGG-3', and RevA, 5'-ATGCTTCCTTGGAGATGGGCT-3'; and G259R, BF, 5'-CTGAACGTG GGCTCTCCGTG-3', and BR1, 5'-ACCTCCAGTCTGACACCTG-3'). These primers amplify three exons of *SLC7A9* covering nt 421–663, 664–789 and 935–1,058 of the cDNA (the first ATG starts at nt 186). Patient DNA (100 ng) was amplified with intron-derived oligonucleotide primers for each exon analysed, using the following PCR conditions (total volume of 50 μ l): dNTPs (200 μ M of each), PCR buffer containing MgCl₂ (1.5 mM, final concentration), Taq Gold Polymerase (0.02 units/ μ l, Perkin-Elmer) and primers (0.35 μ M of each). The cycling conditions were set according to the Taq Gold manufacturer's instructions; the annealing temperature was 57 °C for all sets of primers. In the search for *SLC7A9* mutations in North American patients, we sequenced amplified fragments with the same primers used for PCR amplification. For the search of mutations in Italian patients, genomic DNA was analysed by RNA-SSCP technology as described²⁸. After PCR reaction with primers DF and DR, LAT3EF and RevA, and BF and BR1 (the forward primers DF, LAT3EF and BF containing a 5' end tail with the T7 promoter sequence), transcription was carried out with T7 RNA polymerase (10 U) in a final volume (10 μ l) containing DTT (10 mM), Tris (40 mM, pH 7.5), MgCl₂ (6 mM), spermidine (2 mM), NaCl (10 mM), ribonucleotides (5 nmol each), Rnasin (10 U) and of S³⁵-UTP (0.2 μ l, >1,000 μ Ci/ μ mol). We mixed transcribed RNA (2 μ l) with 95% formamide (48 μ l), EDTA (20 mM), 0.05% bromophenol blue and 0.05% xylene cyanol. The mixture was heated to 95 °C for 6 min and then chilled on ice for 10 min. An aliquot of 4.4 μ l was then loaded onto a 6.5% non-denaturing polyacrylamide gel. After electrophoresis (18 W constant power for 16 h), the gel was dried and subjected to autoradiography for 12 h. Bands showing an electrophoretically altered mobility were then sequenced with the same primers used for PCR amplification.

Construction of V170M b⁰⁺AT cDNA. For the construction of the V170M-human b⁰⁺AT we used the QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) according to the manufacturer's protocol. The mutagenic oligonucleotide was 5'-GAACTCACTGAGC(A)TGCGGCTGGGAAG-3' (sense strand, the mutated nt 693 is indicated by parentheses). Proper construction of the mutated cDNA was confirmed by complete sequencing.

Development of three new microsatellite markers in the non-type I cystinuria locus. We started with a contig of cosmids (provided by L. Ashworth) and chromosome 19q13.1 BACs (Research Genetics). All are physically mapped in available restriction maps (<http://www-bio.lnl.gov/rmap>), which are anchored to the metric map of chromosome 19

(ref. 14; available updated at <http://www-bio.lnl.gov/genome-bin/loadmap?region=mq>). A Southern blot containing *EcoRI* cosmid digests was probed with an (AC)₁₀ oligonucleotide. A positive 700-bp fragment from cosmid R32329 was subcloned into pBS (KS; Stratagene) and sequenced with vector primers to give *C17A* marker. The clones that provided *B27A* and *B35* were selected after shotgun subcloning in pBS of BAC277469 (BAC 331g19, Research Genetics Library 193) and BAC356357 (BAC 536n17, Research Genetics Library 193), respectively, and hybridization of the subclones with an (AC)₁₀ oligonucleotide. *B27A* was sequenced with vector primers. As the clone for *B35* was larger, primers flanking the repeat sequence were identified after sequencing out the repeat. The primers used to amplify the three markers were: 5'-TTTTGCCTGATGTG-GACCTA-3' and 5'-TAGGTGGTGAATCATGGCTG-3' for *C17A*; 5'-GGTAGATGTTGCCTGTCC-3' and 5'-CAAGATTGCACCAC-TACATTCC-3' for *B27A*; 5'-TGGTGTTCAGCAAAATAAGTG-3' and 5'-CCACAAACTTTGATGGTGA-3' for *B35*. Information about allele frequencies, heterozygosity, assay conditions, and so on is available at the NCBI dbSNP.

GenBank accession numbers. *SLC7A9*, AF141289; microsatellite markers *B27A*, *B35* and *C17A*, AF139861, AF139862 and AF139863, respectively.

Acknowledgements

We thank the families for contributing; A. Ros for cell culture; J. García for technical assistance; the YAC Screening Center at San Raffaele Biomedical Science Park and the Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona for some of the sequences; and R. Rycroft for editorial help. This research was supported in part by Dirección General de Investigación Científica y Técnica research grant PM96/0060 from Spain to M.P.; BIOMED2 CT98-BMH4-3514 EC grant to V.N., M.P. and P.G. and CT97-BMH4-2284 (EURO-IMAGE) EC grant to X.E. and A.B.; Fundació La Marató-TV3 research grant 981930 to V.N. and M.P.; Generalitat de Catalunya Grants 1997 SGR 121 and 1997 SGR 00085, Italian Telethon Foundation grants (E556) to L.Z.; the Merck Genome Research Institute (MGRI grant 37); and Ministero Italiano della Sanità grant to P.G., E.F. and D.T. are recipients of fellowships from the Ministerio de Educación y Cultura (Spain); M.P., L.F., J.P., M.F., N.R. and R.E. are recipients of fellowships from the Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica (Catalonia, Spain); and J.K.E. was supported by a research fellowship from The National Kidney Foundation.

Received 12 April; accepted 15 July 1999.

- Calonge, M.J. *et al.* Cystinuria caused by mutations in rBAT, a gene involved in the transport of cystine. *Nature Genet.* **6**, 420–425 (1994).
- Calonge, M.J. *et al.* Genetic heterogeneity in cystinuria: the rBAT gene is linked to type I but not to type III cystinuria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **92**, 9667–9671 (1995).
- Wartenfeld, R. *et al.* Molecular analysis of cystinuria in Libyan Jews: exclusion of the *SLC3A1* gene and mapping of a new locus on 19q. *Am. J. Hum. Genet.* **60**, 617–624 (1997).
- Bisceglia, L. *et al.* Localization, by linkage analysis, of the cystinuria type III gene to chromosome 19q13.1. *Am. J. Hum. Genet.* **60**, 611–616 (1997).
- Kanai, Y. *et al.* Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J. Biol. Chem.* **273**, 23629–23632 (1998).
- Mastroberardino, L. *et al.* Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family. *Nature* **395**, 288–291 (1998).
- Torrents, D. *et al.* Identification and characterization of a membrane protein (γ^+ L amino acid transporter-1) that associates with 4F2hc to encode the amino acid transport activity γ^+ L. A candidate gene for lysinuric protein intolerance. *J. Biol. Chem.* **273**, 32437–32445 (1998).
- Pfeiffer, R. *et al.* Amino acid transport of $\gamma(+)$ L-type by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of the glycoprotein-associated amino acid transporter family. *EMBO J.* **18**, 49–57 (1999).
- Pineda M. *et al.* Identification of a membrane protein (LAT-2) that co-expresses with 4F2hc an L type amino acid transport activity with broad specificity for small and large zwitterionic amino acids. *J. Biol. Chem.* **274**, 19738–19744 (1999).
- Sato, H., Tamba, M., Ishii, T. & Bannai, S. Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. *J. Biol. Chem.* **274**, 11455–11458 (1999).
- Bertran, J. *et al.* Expression cloning of a human renal cDNA that induces high affinity transport of L-cystine shared with dibasic amino acids in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* **268**, 14842–14849 (1993).
- Palacín, M., Chillarón, J. & Mora, C. Role of the b^0+ -like amino acid-transport system in the renal reabsorption of cystine and dibasic amino acids. *Biochem. Soc. Transac.* **24**, 856–863 (1996).
- Nakamura, E. *et al.* 4F2(CD98) heavy chain is associated covalently with an amino acid transporter and controls intracellular trafficking and membrane topology of 4F2 heterodimer. *J. Biol. Chem.* **274**, 3009–3016 (1999).
- Ashworth, L.A. *et al.* An integrated metric physical map of human chromosome 19. *Nature Genet.* **11**, 422–427 (1995).
- Feliubadaló, L. *et al.* Recombinant families locate the gene for non-type I cystinuria between markers C13 and D195587 on chromosome 19q13.1. *Genomics* (in press).
- Pras, E. *et al.* Refined mapping of the CSNU3 gene to a 1.8Mb region on chromosome 19q13.1 using historical recombinants in Libyan Jewish cystinuria patients. *Genomics* (in press).
- Pras, E. *et al.* Biochemical and clinical studies in Libyan Jewish cystinuria patients and their relatives. *Am. J. Med. Genet.* **80**, 173–176 (1998).
- Goodyer, P.R., Clow, C., Reade, T. & Girardin, C. Prospective analysis and classification of patients with cystinuria identified in a newborn screening program. *J. Pediatr.* **122**, 568–572 (1993).
- Furriols, M. *et al.* rBAT, related to L-cystine transport is localized to the microvilli of proximal straight tubules and its expression is regulated in kidney by development. *J. Biol. Chem.* **268**, 27060–27068 (1993).
- Pickel, V.M. *et al.* Ultrastructural localization of a neutral and basic amino acid transporter in rat kidney and intestine. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **90**, 7779–7783 (1993).
- Mora, C. *et al.* The rBAT gene is responsible for L-cystine uptake via the b^0+ -like amino acid transport system in a "renal proximal tubular" cell line (OK cells). *J. Biol. Chem.* **271**, 10569–10576 (1996).
- Palacín, M., Estévez, R. & Zorzano, A. Cystinuria calls for heteromultimeric amino acid transporters. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 455–461 (1998).
- Silbernagl, S. The renal handling of amino acids and oligopeptides. *Physiol. Rev.* **68**, 911–1007 (1988).
- Boguski, M.S., Lowe, T.M.J. & Tolstoshev, C.M. dbEST-database for "expressed sequence tags". *Nature Genet.* **4**, 332–333 (1993).
- Borsani, G. *et al.* *SLC7A7*, encoding a putative permease-related protein, is mutated in patients with lysinuric protein intolerance. *Nature Genet.* **21**, 297–301 (1999).
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989).
- Torrents, D. *et al.* Identification of *SLC7A7*, encoding γ^+ LAT-1, as the lysinuric protein intolerance gene. *Nature Genet.* **21**, 293–296 (1999).
- Bisceglia, L., Grifa, A., Zelante, L. & Gasparini, P. Development of RNA-SSCP protocols for the identification and screening of CFTR mutations: identification of two new mutations. *Hum. Mutat.* **4**, 136–140 (1994).
- Pfeiffer, R. *et al.* Functional heterodimeric amino acid transporters lacking cysteine residues involved in disulfide bond. *FEBS Lett.* **439**, 157–162 (1998).

9.1 CLONACIÓ DEL GEN DE CISTINÚRIA DE TIPUS NO I

9.1.1 Cerca de EST

Durant el refinament del *locus* per a la cistinúria de tipus no I, es van cercar EST que mapessin a la zona i que presentessin homologia amb transportadors o proteïnes de membrana. Els gens candidats funcionals obvis per a la cistinúria de tipus no I eren els corresponents a un transportador de cistina i aminoàcids bàsics d'alta afinitat independent de sodi: una subunitat lleugera que s'havia d'unir a rBAT per induir el sistema de transport $b^{0,+}$ i/o una subunitat funcionalment associada al transportador oligomèric rBAT (Palacín *et al.* 1996a). Tots els candidats provisionals van ser descartats a mida que s'avançava en la seqüenciació dels corresponents cDNA, com ja s'ha comentat a l'apartat 8.2. Dels gens que es localitzaven en la regió 19q12-13.1, ens interessaven aquells que s'expressessin a ronyó i intestí. Llavors apareixeren uns candidats funcionals per a la cistinúria: les subunitats lleugeres de transportadors heteromèrics (LSHAT). Després de la identificació de les primeres subunitats de 4F2hc, el 1998, s'obria una via per la cerca de nous transportadors d'aminoàcids d'aquesta família. Amb l'objectiu d'identificar la subunitat lleugera de rBAT, es va realitzar una cerca en bases de dades de EST per tal d'obtenir nous cDNA codificants per proteïnes homòlogues a les ja conegudes, amb la intenció d'identificar nous membres de la família LSHAT. Aquesta cerca es va dur a terme pels doctors Núria Reig i David Torrents, del nostre grup, utilitzant les seqüències de cDNA de la zona codificant de les proteïnes humanes LAT-1 (Kanai *et al.* 1998; Mastroberardino *et al.* 1998), LAT-2 (Pineda *et al.* 1999), γ^+ LAT-1 (Torrents *et al.* 1998) i γ^+ LAT-2 (Nagase *et al.* 1996; Torrents *et al.* 1998), i comparant-les amb les bases de dades de EST (dbEST) utilitzant el programa BLASTn per tal de trobar seqüències de cDNA amb un grau d'identitat significatiu amb el cDNA codificant per les proteïnes d'interès. Les EST que no corresponguessin a cap de les quatre LSHAT, eren nous cDNA que podien ser considerats com a nous membres putatius de la família de les LSHAT. Interessaven les EST humanes que no corresponguessin a cap gen conegut i que tinguessin un grau d'identitat de seqüència superior al 40% amb els cDNA de les permeases conegudes, considerant que una EST corresponia a una d'elles si presentava una identitat entre el 95 i el 100%. Es van trobar EST de 2 nous membres que, per la seva homologia, semblava que pertanyien a aquesta família P6 (SLC7A9) i P5 (SLC7A10). Aquests van passar a ser candidats posicionals, a més de funcionals, perquè ambdós mapaven en la regió crítica de cistinúria de tipus no I, delimitada pel nostre grup (article 1). Un cop identificada una EST d'interès, es buscava el clon d'IMAGE que la contenia, per tal de conèixer la seva extensió i la EST de l'altre extrem del clon, així com es buscaven altres EST que corresponguessin a aquell mateix cDNA i que estiguessin solapades per tal de formar un *cluster* de EST.

En la Figura 10 es mostra el resum dels resultats de la cerca: vam obtenir un conjunt de EST que corresponien a un mateix cDNA, al que vam anomenar P5 (de Permeasa 5), que tenien un 67% d'identitat de seqüència amb la zona amb que solapaven amb el cDNA de LAT-2, i un 59% amb LAT-1; i per altra banda, vam obtenir una EST que no estava continguda en cap *cluster*, que presentava un 55% de identitat amb el cDNA de γ^+ LAT-2 i un 59% amb LAT-1, i a la que vam anomenar P6 (de Permeasa 6). Dins del *cluster* de P5, el clon més interessant era el IMAGE 1509931, que contenia tota la ORF de la possible permeasa, i que en traduir la seqüència de la EST AI123040 a proteïna, corresponia a els darrers 90 aminoàcids de les permeases amb un 23% d'identitat amb γ^+ LAT-1, 22% amb γ^+ LAT-2, 38% amb LAT-1 i 57% amb LAT-2. Pel que fa al clon corresponent a P6, contenia la meitat C-terminal de la proteïna, i tenia una identitat d'aproximadament 44% amb les quatre LSHAT conegudes.

La EST W84528, del *cluster* de P5, va resultar ser idèntica en seqüència a la STS (*Site Tagged Sequence*) G33210, que el servidor del SHGC (*Stanford Human Genome Center*) va relacionar amb el marcador D19S1004 del cromosoma 19, en la regió 19q12-13.2. Amb aquesta informació l'interès per la proteïna P5 va augmentar molt, ja que en aquesta regió cromosòmica era on s'havia mapat el *locus* de cistinúria de tipus no I (Bisceglia *et al.* 1997; Wartenfeld *et al.* 1997) i el fet que el gen de P5 es localitzés en aquella zona feia pensar que es podia tractar de la subunitat de rBAT i la proteïna responsable d'aquesta malaltia. Per tal de verificar la localització de P5 en aquella regió cromosòmica i conèixer la de p6, la doctoranda, conjuntament amb les doctores Núria Reig i Lúdia Feliubadaló vam amplificar una llibreria de BAC i cosmidis d'aquesta regió per PCR amb encebadors específics de P5 i P6, i vam veure que tant l'una com l'altra donaven senyal d'amplificació en aquells DNA, i que, per tant, podrien ser gens veïns localitzats en el *locus* de cistinúria de tipus no I. Posteriorment vem confirmar aquests resultats: vem mapar el gen de P6 en el YAC 877f9 i el BAC356357, el qual es localitza entre els marcadors de microsatèl·lit D19S776 i D19S786, en el *locus* de cistinúria de tipus no I. De manera que vam prosseguir els estudis amb totes

RESULTATS

dues permeases, ja que qualsevol d'elles podia ser la responsable d'aquesta malaltia. Altres grups han confirmat per hibridació fluorescent *in situ* (FISH) la localització de *SLC7A9* a 19q12-13.1 (Pfeiffer *et al.* 1999a; Mizoguchi *et al.* 2001).

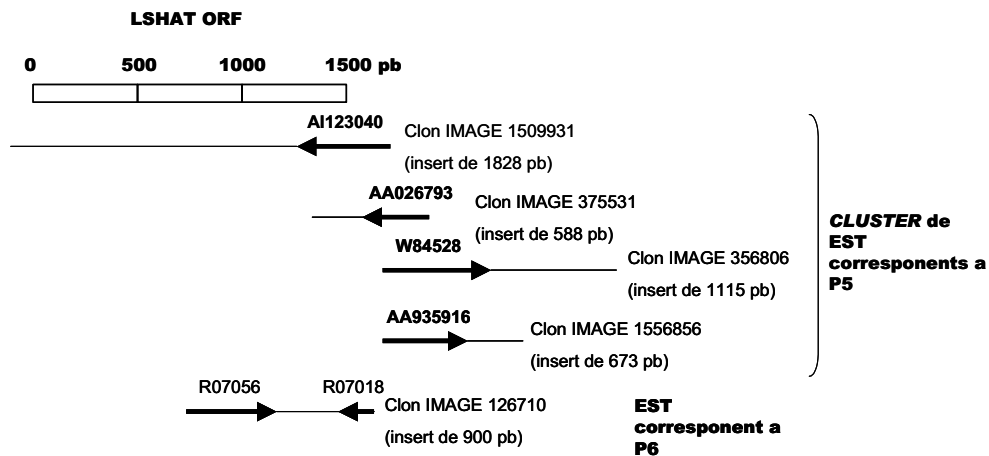


Figura 10. Esquema de les EST homòlogues a LSHAT. Amb una fletxa i traçat gruixut es representa la zona de seqüència de la EST i amb línia prima es representa la longitud de seqüència del clon que la conté, en relació amb la seqüència de la ORF de les quatre LSHAT utilitzades per la cerca. Figura cedida per Núria Reig.

9.1.2 Obtenció del cDNA complet de les noves LSHAT per crivellatge d'una llibreria de cDNA de ronyó

Vam demanar els clons IMAGE que apareixen en la figura 10 a *Research Genetics* per fer sondes per fer *Southern*, *Northern* i crivellatge d'una genoteca. En analitzar la seva seqüència, ens vam adonar que el clon 1509931 corresponia a DNA genòmic, ja que contenia introns i exons, i per tant, no comprenia la totalitat de la ORF de la putativa permeasa 5. A més, els altres clons del *cluster* de P5, van resultar ser erronis per un problema d'identificació de la casa comercial, per tant només teníem informació parcial sobre la seqüència de P5. Pel que fa al clon de P6, aquest també es tractava d'un clon parcial, de manera que, conjuntament amb Núria Reig i Lúcia Feliubadaló, vam procedir a l'obtenció del cDNA complet de P5 i P6 mitjançant diferents aproximacions. Vam intentar dues estratègies en paral·lel: l'amplificació per *Marathon RACE-PCR* amb una llibreria *Marathon-Ready™ cDNA* de ronyó humà (Clontech), i el crivellatge d'una llibreria λ ZAP de cDNA de ronyó humà (Stratagene). La RACE 5' de P6 ens va donar uns quants positius que ens van permetre allargar la seqüència de cDNA cap a 5', però no vam poder obtenir un clon de cDNA sencer per cap de les dues permeases. Per fer el crivellatge amb la llibreria *Uni-ZAP® XR* de ronyó humà vam utilitzar dues sondes específiques per P6 i P5. La sonda de P6 va ser obtinguda per PCR del clon 126710 amb els encebadors P6D6 i P6R4 (veure annex 1), tenia una mida de 742 pb i va ser marcada radioactivament amb $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ mitjançant el mètode de *Random Priming*. El crivellatge de la llibreria de cDNA de ronyó humà ens va permetre obtenir dos clons d'una mida aproximada de 1800 pb, que vam anomenar J25 i B12. Els vam seqüenciar i vam comprovar que contenien el cDNA sencer de la permeasa P6. N'obtinguérem així el cDNA complet, dipositat a GenBank sota la identificació AF141289.

El cDNA de P6 (que es diposità a Genbank com a AF141289) mesura 1814 pb, presenta poliadenilació i una pauta de lectura oberta que codifica per una proteïna de 487 aminoàcids. La seva seqüència va ser sotmesa a anàlisi per BLASTn i BLASTx i vam poder comprovar que la regió 5' del cDNA també mantenia l'homologia esperada amb la família de permeases. En la figura 1 de l'article 2 es mostra un multialineament d'aquesta proteïna amb altres membres humans de la família LSHAT. La seqüència nucleotídica del clon sencer presentava elevada homologia amb les altres 4 LSHAT prèviament clonades: un 41% d'identitat amb γ^+ LAT-1, γ^+ LAT-2 i LAT-1, i un 39% amb LAT-2. Aquesta proteïna, a la que vam anomenar $b^{0,+}\text{AT}$ (*system $b^{0,+}$ aminoàcid transporter*), presentava una topologia predita de 12 segments transmembrana putatius, i la cisteïna que forma part del pont disulfur amb la seva subunitat pesada també està conservada després del segment transmembrana III, com en les altres LSHAT.

La doctora Esperanza Fernández, del nostre grup, va realitzar un *Northern blot* amb la mateixa sonda que vam utilitzar pel crivellatge de la llibreria, per tal de detectar el transcrit de $b^{0,+}\text{AT}$ en mostres de teixits

humans en una membrana comercial (Clontech). Com es mostra en la figura 11, aquesta proteïna s'expressa molt a ronyó i fetge, i també a intestí prim i placenta, com s'observa en exposicions prolongades, i correspon a un sol transcrit de 1,9 kb, que és la mida del clon de cDNA que vam obtenir. El patró d'expressió d'aquesta proteïna coincideix amb el de rBAT, de manera que era raonable pensar que podria tractar-se de la seva subunitat lleugera. A part, aquest patró d'expressió també era compatible amb el que podria tenir una proteïna responsable de cistinúria. L'únic dubte que fos la proteïna responsable era que l'expressió a fetge no es corresponia amb el fenotip cistinúric, ja que no s'ha descrit cap complicació hepàtica en malalts cistinúrics.

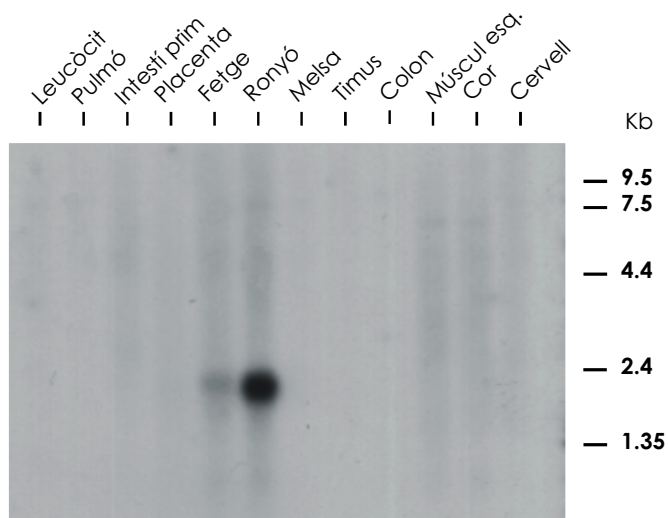


Figura 11: Patró d'expressió de $b^{0,+}AT$ en teixits humans. Figura cedida per Esperanza Fernández.

Pel que fa a l'altre possible permeasa, que havíem anomenat P5 (corresponent a *SLC7A10*), el crivellatge de la genoteca i els experiments de RACE no van donar positius. Més tard el doctor Jesús Purroy va realitzar un altre crivellatge d'aquesta genoteca amb una nova sonda corresponent a la seqüència fins llavors coneguda de P5, per tal d'obtenir-ne el cDNA complet. Va obtenir un clon sencer, que codificava per una nova subunitat de 4F2hc que posteriorment es va anomenar asc-1 (*system asc amino acid transporter*) (Pineda et al. 2004a).

9.2 ANÀLISI DE MUTACIONS EN PACIENTS DE CISTINÚRIA DE TIPUS NO I

Amb l'obtenció del cDNA complet de la proteïna $b^{0,+}AT$ va ser possible començar l'anàlisi de mutacions en pacients de cistinúria de tipus no I. El grup d'Elon Pras a Israel, el de Paolo Gasparini i el de Giuseppe Borsani a Itàlia, i el de Virginia Nunes a l'IRO, integrants del Consorci Internacional de Cistinúria (ICC), vam començar a buscar mutacions al gen codificant per $b^{0,+}AT$, anomenat *SLC7A9*, en pacients de cistinúria de tipus no I de diferents procedències (jueus libanesos, nord americans, italians i espanyols). Vam estudiar famílies cistinúriques classificades com a tipus no I segons el fenotip urinari dels heterozigots obligats o pacients no classificats que no presentaven mutacions al gen *SLC3A1* (que codifica per la subunitat pesada del transportador, rBAT).

Com que encara no coneixíem l'estructura genòmica de *SLC7A9*, vam procedir a la cerca de mutacions en els pacients cistinúrics dels quals disposàvem de RNA. En col·laboració amb el grup d'Elon Pras es posaren a punt les condicions d'amplificació del cDNA de P6 i cadascú cercà mutacions al pacients disponibles. El grup d'Elon Pras va trobar a partir de cDNA la mutació ancestral de la població jueva: La mutació p.V170M, que fou trobada a 16 dels 17 cromosomes independents portadors de cistinúria a jueus libis (veure figura 4 de l'article 2). Aquest resultat concordava amb l'existència d'un efecte fundador per la malaltia en aquesta població, ja suggerit pel desequilibri de lligament trobat per un haplotip al locus del cromosoma 19q (Wartenfeld et al. 1997; Pras et al. 1999).

Com que el nombre de pacients dels que disposàvem de RNA a les poblacions italiana i espanyola era molt baix, el grup de Paolo Gasparini va començar a estudiar l'estructura genòmica, utilitzant 4 PAC (*P1-derived artificial chromosome*) que van resultar positius en un crivellatge de la genoteca RPIC5 amb una

RESULTATS

sonda de P6. Van trobar els límits exó-intró dels exons 4, 5 i 8. Dissenyaren encebadors intrònics per amplificar aquests exons sobre DNA genòmic dels pacients (veure l'apartat de mètodes de l'article 2). Amb aquests encebadors vem buscar les mutacions dels pacients italians, espanyols i nord americans.

Vam trobar 7 mutacions a la zona codificant de *SLC7A9* (taula 1 i figura 4 de l'article 2). Cinc mutacions eren de canvi de sentit (p.G105R, p.V170M, p.A182T, p.G195R i p.G259R), una era una inserció d'un nucleòtid (520insT, actualment c.335dupT) i l'altra, una deleció de dos nucleòtids (596delTG, actualment c.411_412delTG), totes dues modificant la pauta de lectura i causant codons d'aturada prematura. De les cinc mutacions de canvi d'aminoàcid, p.G105R, p.V170M, i p.G195R corresponien a residus conservats a totes les LSHAT descrites i p.G259R corresponia a un residu força conservat, mentre que p.A182T corresponia a un residu poc conservat.

Totes les mutacions on la família estava disponible per l'estudi, presentaven herència mendeliana fent anàlisi per restricció del DNA dels familiars (figura 5 de l'article 2 i figures 15, 17, 18, 19, 23 i 25; apartat 12), i cap d'elles es va trobar en analitzar 100 o més cromosomes control (dades no mostrades).

Els pacients on vam trobar les 7 mutacions inicials foren estudiats per grups diversos i van ser classificats segons criteris heterogenis. Els pacients americans eren cistinúrics de tipus desconegut, donat que els seus familiars no estaven disponibles per a l'estudi del fenotip. Malgrat tot, havien estat analitzats mitjançant SSCP en tota la ORF de *SLC3A1* sense trobar-hi mutacions. Els italians i espanyols sí havien estat classificats, segons l'excreció d'aminoàcids bàsics i cistina dels seus pares. Corresponien a famílies no I o a famílies mixtes (I/no I). El tret no I, segons l'antiga classificació en tres grups (Calonge *et al.* 1995b), correspondria al tipus III, excepte al pacient V.S., que correspondria al tipus II. La cistinúria dels pacients jueus libis era del tipus no I i, tot i ser causada per la mateixa mutació, provocava als heterozigots un rang ampli d'excrecions, des dels tipus II fins als tipus I.

Algunes mutacions s'havien trobat en homozigosi en famílies no I, per tant era clar que el gen *SLC7A9* era responsable de la cistinúria de tipus no I. El que no quedava tan clar, era si estava implicat en altres tipus de cistinúria. De fet, les mutacions p.A182T i p.V170M s'havien trobat associades a l'al·lel tipus I d'algunes famílies mixtes. Per resoldre aquesta qüestió caldria un estudi de mutacions complet del gen a totes les famílies cistinúriques disponibles que no havien estat explicades per mutacions a *SLC3A1*.

És interessant remarcar que s'havien trobat mutacions en aquest gen en pacients de tipus II i III, i fins i tot I, de manera que semblava ser que el diferent fenotip d'aquests tipus de cistinúria era deguda a diferències al·lèliques d'aquest mateix gen. La mutació p.G105R, en un residu conservat, s'havia trobat només com a al·lel tipus no I, en una ocasió en un pacient que antigament s'hauria classificat com a tipus II (el fenotip més greu en heterozigots)(Família F41, apartat 8.2). La mutació p.A182T, en canvi, corresponent a un residu poc conservat, es va trobar en diversos casos associat a fenotip I d'una família mixta (I/no I) o a fenotip no I suau (taula 1 de l'article 2). Es començava a endevinar que la gravetat de les mutacions es podia reflectir en el fenotip dels heterozigots, tot i que probablement modulada per altres factors, ja fossin ambientals o genètics. Un anàlisi més acurat d'aquesta correlació genotip-fenotip es mostra en els següents apartats de Resultats.

En aquest treball es van trobar mutacions a 41 dels 133 cromosomes independents analitzats (31%) ja que només es va analitzar tota la zona codificant dels pacients jueus. A la resta de pacients només es va analitzar el 34% del gen (493 pb dels 1461 pb codificants, veure l'apartat de mètodes de l'article 2). Calia esperar que en un anàlisi més exhaustiu de tota la seqüència del gen *SLC7A9* es trobarien més mutacions que explicarien un tant per cent més elevat dels cromosomes cistinúrics. Tot i així va ser suficient per demostrar que mutacions al gen que codificava per *SLC7A9* causaven cistinúria, fonamentalment de tipus no I.

9.3 FUNCIO DE LA PROTEÏNA $b^{0,+}AT$

L'estudi funcional de l'activitat d'aquesta proteïna de la família de les LSHAT va ser dut a terme per la doctora Núria Reig en col·laboració amb el doctor Raül Estévez, del nostre grup. El primer objectiu era l'estudi de l'activitat de transport per expressió en oòcits de *Xenopus*, per tant, van injectar als oòcits cRNA de $b^{0,+}AT$ sol o juntament amb 4F2hc o amb rBAT per veure si coexpressava alguna activitat de transport amb les subunitats pesades de la família HAT. La sensibilitat d'aquest sistema d'expressió no era suficient per detectar l'activitat de transport deguda a $b^{0,+}AT$, en el cas que aquesta fos la subunitat de rBAT ja que existeix una interacció de rBAT amb una subunitat endògena de l'oòcit. No s'observava inducció d'activitat de $b^{0,+}AT$ amb 4F2hc, el que feia pensar que $b^{0,+}AT$ no funcionava com a subunitat de 4F2hc.

Amb la intenció d'aconseguir un sistema prou sensible per detectar l'activitat de la possible subunitat de rBAT, es va posar a punt la transfecció transitòria en cèl·lules COS. En aquestes cèl·lules es va transfectar rBAT sol, amb $b^{0,+}$ AT o amb el mutant de cistinúria p.V170M de $b^{0,+}$ AT (la mutació trobada en jueus libanesos) per assajar el transport d'arginina a les cèl·lules transfectades (figura 3 de l'article 2). Es va veure que la transfecció de rBAT sol no provocava cap inducció del transport d'arginina respecte les cèl·lules no transfectades, mentre que la cotransfecció de rBAT amb $b^{0,+}$ AT sí que feia augmentar el transport respecte els nivells basals. Aquesta inducció no es donava si es cotransfectava rBAT amb la forma mutada p.V170M, demostrant així que aquesta mutació de *SLC7A9*, produïa una forma no funcional de la proteïna $b^{0,+}$ AT *in vitro*, fet que demostrava que les mutacions trobades en els pacients de cistinúria de tipus no I eren responsables de la malaltia.

També es van fer estudis de immunocitoquímica en les cèl·lules transfectades, com es mostra en la figura 2 de l'article 2. En les cèl·lules transfectades només amb la proteïna rBAT s'observa que aquest té una localització intracel·lular, amb un patró de marcatge puntejat perinuclear, indicatiu d'una localització en el reticle endoplasmàtic o lisosomal. Aquesta dada ja havia estat observada amb anterioritat en el nostre grup (Palacín *et al.* 1996a), i concorda amb el fet que la transfecció de rBAT sol no provoca cap inducció d'activitat de transport. Les cèl·lules COS, a diferència dels oòcits de *Xenopus*, sembla que no expressen $b^{0,+}$ AT i per això rBAT no arriba a la membrana ni pot induir cap activitat de transport. En canvi, en les cèl·lules cotransfectades amb rBAT i $b^{0,+}$ AT s'observa un canvi en la localització de rBAT, ja que presenten un marcatge de membrana. Aquest resultat indica que la presència de la proteïna $b^{0,+}$ AT ajuda al correcte processament de la proteïna rBAT cap a la membrana plasmàtica, i permet així la inducció d'una activitat de transport deguda al complex rBAT/ $b^{0,+}$ AT situat a la membrana. En les cèl·lules que expressen rBAT en absència de $b^{0,+}$ AT, la proteïna rBAT sintetitzada no pot patir un processament correcte degut a la manca d'interacció amb la seva subunitat lleugera, de manera que es formen agregats que probablement són desviats cap al compartiment lisosomal per ser degradats. Una situació similar s'havia observat en oòcits de *Xenopus* injectats amb les subunitats de 4F2hc: LAT-1, LAT-2 i SPRM1, que només podien arribar a la membrana de l'oòcit en presència de 4F2hc (Mastroberardino *et al.* 1998; Nakamura *et al.* 1999; Pineda *et al.* 1999).

El fet que mutacions al gen *SLC7A9* ($b^{0,+}$ AT) causessin cistinúria de tipus no I i mutacions al gen *SLC3A1* (rBAT), causessin cistinúria de tipus I indicava que aquestes dues proteïnes tenien un paper clau en la reabsorció d'aminoàcids bàsics i cistina. De tota manera no quedava clar perquè el fenotip de cistinúria de tipus no I era dominant amb penetrança incompleta mentre que el de cistinúria de tipus I era totalment recessiu, si totes dues proteïnes formaven part del mateix transportador. Estudis realitzats pels grups de Verrey i Kanai, publicats al mateix temps que l'article 2, donaven noves pistes sobre el perquè d'aquesta diferència, ja que observaren un patró de distribució diferent per les proteïnes $b^{0,+}$ AT i rBAT en el túbul proximal: la proteïna $b^{0,+}$ AT es localitza en la membrana apical de les cèl·lules de túbul proximal contornejat (segments S1 i S2) i també en el segment S3 però en menys quantitat (Chairoungdua *et al.* 1999; Pfeiffer *et al.* 1999a; Mizoguchi *et al.* 2001), mentre que el missatger de rBAT presenta justament el patró contrari, principalment es troba al segment S3 i menys en els segments S2 i S1 (Kanai *et al.* 1992; Furriols *et al.* 1993; Chairoungdua *et al.* 1999; Pfeiffer *et al.* 1999a). Tot i que la distribució no fos la mateixa, sí que existia colocalització de les dues proteïnes en el túbul renal, per tant era lògic suposar que formaven el transportador del sistema $b^{0,+}$ localitzat en el segment S3 del túbul i que transportava aminoàcids bàsics i cistina amb alta afinitat. De tota manera, es plantejava la possibilitat que la proteïna $b^{0,+}$ AT participés en la reabsorció de cistina en el segment S1, on s'havia proposat la localització del principal sistema de reabsorció de cistina, de baixa afinitat i alta capacitat (veure Introducció), amb una altra proteïna diferent de rBAT, i que això expliqués el perquè del diferent fenotip dels dos tipus de cistinúria, que podien estar causats per defectes en diferents sistemes de transport.

Aquests resultats indicaven en qualsevol cas que la proteïna $b^{0,+}$ AT era la subunitat lleugera de rBAT, amb el qual probablement s'unia mitjançant un pont disulfur i permetia l'expressió d'activitat de transport a la membrana plasmàtica, i que mutacions al seu gen, *SLC7A9*, trobades en pacients provocaven una pèrdua d'activitat de la proteïna, causant la cistinúria de tipus no I. Una discussió més detallada sobre aquestes qüestions es troba en l'apartat de Discussió General.

10 ANÀLISI DE MUTACIONS A *SLC7A9*

Amb la identificació de la proteïna b^{0,+}AT com a gen de cistinúria de tipus no I es van obrir noves vies d'estudi de la funció del transportador b^{0,+}. La identificació de noves mutacions i el seu anàlisi es recullen a l'article 3:

FUNCTIONAL ANALYSIS OF MUTATIONS IN *SLC7A9*, AND GENOTYPE-PHENOTYPE CORRELATION IN NON-TYPE I CYSTINURIA

Human Molecular Genetics 10:305-316. 2001

International Cystinuria Consortium

Group A: Mariona Font*, Lídia Feliubadaló, Xavier Estivill and Virginia Nunes

Group B: Eliahu Golomb, Yitshak Kreiss and Elon Pras

Group C: Luigi Bisceglia*, Adamo P. d'Adamo, Leopoldo Zelante and Paolo Gasparini

Group D: Maria Teresa Bassi, Alfred L. George Jr., Marta Manzoni, Mirko Riboni, Andrea Ballabio and Giuseppe Borsani

Group E: Núria Reig*, Esperanza Fernández, Antonio Zorzano, Joan Bertran and Manuel Palacín

*Aquests autors han contribuït en la mateixa mesura al treball

Contribució:

- Estudi de mutacions de pacients de cistinúria de tipus no I majoritàriament espanyols, però també alguns italians i un jueu libi. Identificació per DNA-SSCP de 16 de les 28 noves mutacions: p.G63R, p.W69X, p.T123M, p.W230R, p.R333W, p.A354T, IVS5+1G>A (o c.604+1G>T), IVS12+3_IVS12+6delAAGT (o c.1399+3_+6delAAGT), p.R10del, c.553_554delCG (actualment c.368_369delCG), p.A158ins (actualment p.A158dup), c.686_689delACTG (actualment c.501_504delACTG), p.193insl (actualment p.I193dup), c.800_801insA (actualment c.614dupA), p.E244del, c.998delC (actualment c.813delC). Anàlisi de més de 100 cromosomes control per a cada una d'aquestes noves mutacions. A més, identificació, en pacients espanyols, de mutacions ja descrites anteriorment.

- Correlació genotip-fenotip: participació en la reclassificació dels pacients; i anàlisi, per DNA-SSCP o assaig enzimàtic, de la segregació de totes les mutacions en els familiars disponibles i, per tant, obtenció del genotip dels heterozigots que permeteren realitzar la correlació genotip-fenotip.

ARTICLE

Functional analysis of mutations in *SLC7A9*, and genotype–phenotype correlation in non-Type I cystinuria

International Cystinuria Consortium: Group A: Mariona Font^{1,+}, Lúdia Feliubadaló^{1,2}, Xavier Estivill¹ and Virginia Nunes¹; Group B: Eliahu Golomb³, Yitshak Kreiss⁴ and Elon Pras^{4,5}; Group C: Luigi Bisceglia^{6,+}, Adamo P. d'Adamo⁶, Leopoldo Zelante⁶ and Paolo Gasparini⁶; Group D: Maria Teresa Bassi^{7,+}, Alfred L. George Jr^{8,9}, Marta Manzoni⁷, Mirko Riboni⁷, Andrea Ballabio⁷ and Giuseppe Borsani⁷; Group E: Núria Reig^{2,+}, Esperanza Fernández², Antonio Zorzano², Joan Bertran² and Manuel Palacín^{2,§}

¹Centre de Genètica Mèdica i Molecular (IRO), Hospital Duran i Reynals, Autovía de Castelldefels Km 2.7, L'Hospitalet de Llobregat, E-08907 Barcelona, Spain, ²Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avenida Diagonal 645, E-08028 Barcelona, Spain, ³Department of Pathology, Sackler School of Medicine, Tel Aviv University, Tel Aviv 69978, Israel, ⁴Department of Medicine C, ⁵Institute of Human Genetics, Tel Hashomer 52621, Israel (affiliated to the Sackler School of Medicine) Tel Aviv University, Tel Aviv 69978, Israel, ⁶Medical Genetics Service, IRCCS-Hospital 'CSS', San Giovanni Rotondo, Italy, ⁷Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Via Pietro Castellino 111, I-80131 Napoli, Italy and Divisions of ⁸Genetic Medicine and ⁹Nephrology, Vanderbilt University Department of Medicine, Nashville, TN 37232, USA

Received 12 July 2000 ; Revised and Accepted 16 December 2000

Cystinuria (OMIM 220100) is a common recessive disorder of renal reabsorption of cystine and dibasic amino acids that results in nephrolithiasis of cystine. Mutations in *SLC3A1*, which encodes rBAT, cause Type I cystinuria, and mutations in *SLC7A9*, which encodes a putative subunit of rBAT (b^{0,+}AT), cause non-Type I cystinuria. Here we describe the genomic structure of *SLC7A9* (13 exons) and 28 new mutations in this gene that, together with the seven previously reported, explain 79% of the alleles in 61 non-Type I cystinuria patients. These data demonstrate that *SLC7A9* is the main non-Type I cystinuria gene. Mutations G105R, V170M, A182T and R333W are the most frequent *SLC7A9* missense mutations found. Among heterozygotes carrying these mutations, A182T heterozygotes showed the lowest urinary excretion values of cystine and dibasic amino acids. Functional analysis of mutation A182T after co-expression with rBAT in HeLa cells revealed significant residual transport activity. In contrast, mutations G105R, V170M and R333W are associated to a complete or almost complete loss of transport activity, leading to a more severe urinary phenotype in heterozygotes. *SLC7A9* mutations located in the putative transmembrane domains of b^{0,+}AT and affecting conserved amino acid residues with a small side chain generate a severe phenotype, while mutations in non-conserved residues give rise to a mild phenotype. These data provide the first genotype–phenotype correlation in non-Type I cystinuria, and show that a mild urinary phenotype in heterozygotes may associate with mutations with significant residual transport activity.

INTRODUCTION

In 1908, Archibald E. Garrod discussed cystinuria in his Croonian lectures about inborn errors of metabolism (1). Despite this early description, the genes that cause cystinuria were only

described in 1994 and in 1999 (2,3). Cystinuria (OMIM 220100) is a common recessive disorder of renal reabsorption and intestinal absorption of cystine and dibasic amino acids (4). Two types of cystinuria are distinguished on the basis of the cystine and dibasic aminoaciduria of the obligate hetero-

⁺These authors contributed equally to this work

[§]To whom correspondence should be addressed. Tel: +34 93 4034617; Fax: +34 93 4021559; Email: mpalacin@porthos.bio.ub.es

Table 1. Urine amino acid levels in patients with non-Type I cystinuria, obligate heterozygotes and controls

	<i>n</i>	Creatinine ($\mu\text{mol/g}$)				
		Cystine	Lysine	Arginine	Ornithine	Sum
Non-Type I cystinuria						
Homozygotic patients ^a	67–71	1530 \pm 113 ^b (445–3201)	6171 \pm 378 ^b (1952–11309)	3244 \pm 211 ^b (469–5887)	1805 \pm 112 ^b (367–3231)	12681 \pm 639 ^b (4774–22854)
Probands considered to be heterozygotes ^c	6–7	513 \pm 83 (339–771)	2735 \pm 278 ^b (2029–3667)	124 \pm 33 (34–235)	288 \pm 67 (121–519)	3565 \pm 391 ^b (2715–4814)
Obligate heterozygotes	128	430 \pm 33 ^d (87–1069)	1692 \pm 120 ^d (217–4489)	96 \pm 14 ^d (1–360)	172 \pm 19 ^d (17–488)	2390 \pm 162 ^d (440–6594)
Controls	34	40 \pm 3 (18–61)	118 \pm 10 (50–227)	18 \pm 6 (0–72)	21 \pm 4 (1–72)	197 \pm 18 (94–350)

Urinary excretion of cystine, lysine, arginine and ornithine, and the sum of these four amino acids is shown in patients, obligate heterozygotes of non-Type I cystinuria families and in controls. Data (mean \pm SEM) are expressed in $\mu\text{mol/g}$ of creatinine in urine. The 5th–95th percentile of each value is given in parentheses. *n* denotes the number of individuals.

^aPatients considered to have inherited two affected alleles. Controls are relatives of cystinuria patients without the mutations in *SLC3A1* or *SLC7A9* identified in their families, and/or non-transmitting cystinuria.

^bValues significantly higher than those of their obligate heterozygotes at $P \leq 0.05$ (Student's *t*-test).

^cUrine amino acid levels are also shown for probands considered to have inherited one single allele (see Results, 'Identification of non-Type I cystinuria patients').

^dValues significantly higher than those of controls at $P \leq 0.001$ (Student's *t*-test).

zygotes (reviewed in 4,5): Type I heterozygotes are silent, whereas non-Type I heterozygotes (or Type II and III) show a variable degree (higher in Type II and lower in Type III) of urinary hyperexcretion of cystine and dibasic amino acids. Mutations in *SLC3A1*, located on chromosome 2p16.3–21 and encoding the b⁰⁺ transporter-related protein rBAT, cause only Type I cystinuria (2,6). The gene causing non-Type I cystinuria was assigned by linkage to chromosome 19q12–13.1 (7,8), and was identified as *SLC7A9* (3), whose protein product (b⁰⁺AT) heterodimerizes with rBAT (*SLC3A1*) (9). Structural and functional evidence suggested that rBAT and the heavy chain of the cell surface antigen 4F2 (4F2hc; also named CD98) are heavy subunits of heteromultimeric amino acid transporters (HSHAT) (reviewed in 10,11). b⁰⁺AT belongs to a new family of light subunits of these heteromultimeric amino acid transporters (LSHAT) (reviewed in 12,13). Thus, LAT-1, LAT-2, y⁺LAT-1 [*SLC7A7*, the lysinuric protein intolerance gene (14,15)], y⁺LAT-2 and xCT are subunits of 4F2hc (16–22) and b⁰⁺AT is a putative subunit of rBAT (3,9,23).

Here we report the genomic structure of *SLC7A9*, which facilitated an exhaustive mutational analysis of the open reading frame (ORF) of the gene. Twenty-eight new cystinuria-specific *SLC7A9* mutations were found, which, together with the seven previously identified, explain most of the non-Type I alleles studied. In contrast, a survey of mutations in the ORF of the two cystinuria genes, *SLC7A9* or *SLC3A1*, in 27 untyped North American patients explained only 56% of the alleles, leaving open the possibility of there being additional cystinuria genes. Functional analysis of the most frequent *SLC7A9* mutations indicates that an almost complete loss of transport function is associated with a more severe urinary phenotype in heterozygotes. On the contrary, A182T showed a mild urinary phenotype in heterozygotes and significant residual transport activity. This is the first genotype–phenotype correlation to be established in non-Type

I cystinuria, which offers clues to the structure/function relationship among the transporters of the LSHAT family.

RESULTS

Identification of non-Type I cystinuria patients

We have studied 124 cystinuria families (59 Italian, 26 Spanish, 30 North American and 9 Libyan Jewish), potentially representing 240 cystinuria-independent alleles (1 family was consanguineous and 7 probands were classified as non-Type I cystinuria heterozygotes; see Materials and Methods). The rest of the probands (117) were considered to be homozygotes or compound heterozygotes. Sixty-one non-Type I probands (38 Italian, 9 Libyan Jewish, 6 Spanish and 3 North American families) were identified on the basis of the urinary excretion of cystine and dibasic amino acids in the obligate heterozygotes (see Materials and Methods). The remaining 63 probands were untyped (27 North American, 21 Italian and 15 Spanish) because urinary excretion values for their relatives were not available or were of doubtful classification (i.e. inconsistent classification of members of the same family). In order to extend the spectrum of *SLC7A9* mutations we also screened these untyped probands.

The urine levels of cystine, lysine and the sum of cystine and the three dibasic amino acids in the obligate heterozygotes of the non-Type I cystinuria families were higher than the 95th percentile of the control range (Table 1) with a few exceptions (data not shown). In contrast, the urine excretion levels of arginine and ornithine in the obligate non-Type I heterozygotes do not discriminate from controls (Table 1), since high levels were found in 82 of 128 heterozygotes from non-Type I families. In spite of this, the urine levels of arginine and ornithine are the excretion parameters that best discriminate between non-Type I homozygotes and heterozygotes: the values being in the low hundreds ($\mu\text{mol/g}$ of creatinine) in heterozygotes

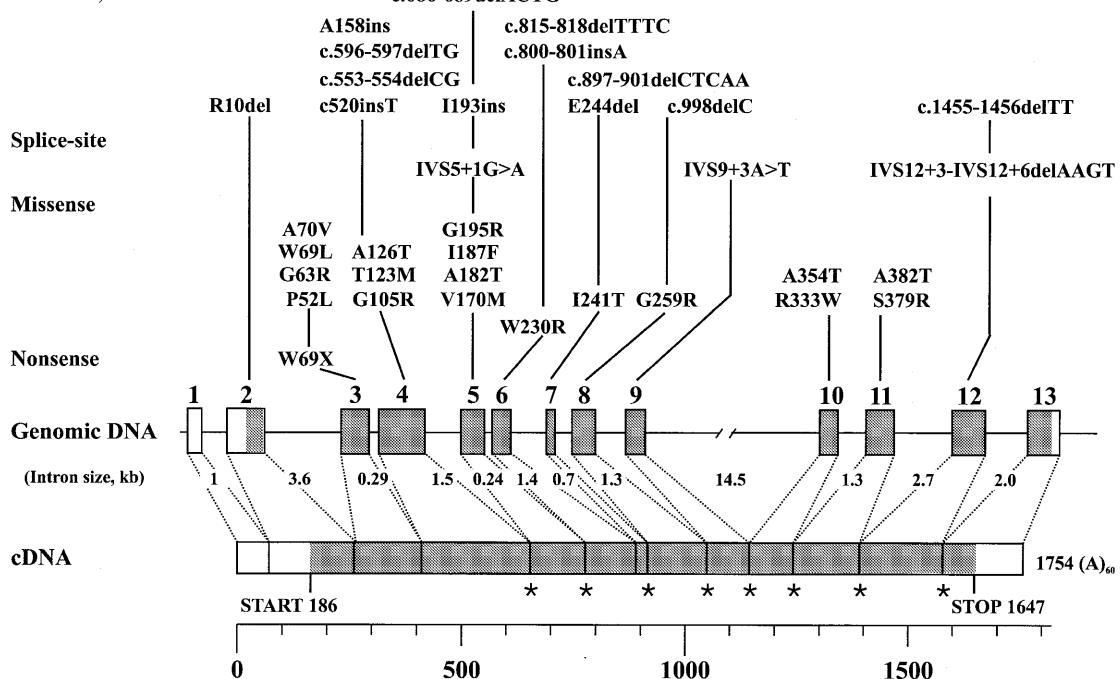
SLC7A9 MUTATIONS**Deletions, insertions**

Figure 1. Schematic representation of *SLC7A9* gene. The 13 exons of *SLC7A9* gene are depicted with an indication of the 37 cystinuria mutations identified (13 deletions or insertions, 4 splice-site, 19 missense and 1 nonsense). The ORF is presented in gray. The eight exon-intron boundaries conserved in *SLC7A7* and *SLC7A8* are indicated by asterisks (26,37,38).

and in the thousands ($\mu\text{mol/g}$ of creatinine) in homozygotes (Table 1). This is consistent with a previous study on the same subgroup of Libyan Jewish cystinuria families (32).

Structure of the *SLC7A9* gene

After screening the RPCI-5 PAC library using an *SLC7A9* cDNA probe, two clones were selected to determine the genomic structure of the *SLC7A9* gene: clone 1003n9, which contains the first nine exons and clone 852f21, spanning the last four exons and extending beyond the 3'-end. The location (Fig. 1) and sequence of all exon-intron boundaries (which agree with the gt-ag consensus sequence; see Table A, available as supplementary material online) were determined by direct sequencing of either the PAC clones or the PCR products obtained by amplification of genomic DNA with cDNA-derived oligonucleotide primers. *SLC7A9* is organized into 13 exons with sizes ranging from 45 to 242 bp. The codon for the translation-initiator methionine (Met¹) is located at position c.186 in exon 2, whereas the termination codon TAA is located at position c.1647 in exon 13 (Fig. 1, nucleotide positions refer to the cDNA). An unfinished nucleotide sequence is now available (accession no. AC008805) which contains a portion of the *SLC7A9* gene. Primers for the amplification of all the *SLC7A9* exons were designed in the intron flanking sequences and are provided as supplementary material online (Table B). Due to the small size of intron 5, exons 5 and 6 were sometimes amplified as a single PCR fragment, as indicated in Table B.

Mutation analysis

Mutation analysis was performed in non-Type I and untyped cystinuria patients. Twenty-eight new mutations in *SLC7A9* were identified, which are summarized in Table 2 together with the seven reported previously (3). All these mutations include nine frameshift (seven deletions and two insertions) and one nonsense mutations that produce early stop codons, three splice-site mutations and 22 changes affecting single amino acid residues (18 missense mutations, and 2 insertions and 2 deletions of single amino acid residues) (Table 2). One of the splice-site mutations (IVS5+1G>A) modifies the GT donor splice site of intron 5. This suggests aberrant splicing in this patient. For the other two splice-site mutations the impact on the mature *SLC7A9* mRNA is less predictable. The location of the *SLC7A9* mutations affecting single amino acid residues in the 12-transmembrane (TM)-domain model of b⁰⁺AT protein is shown in Figure 2. The 18 missense mutations found localize within the putative TM domains I-VII, IX and X (15 mutations) or within the putative intracellular loops 1, 3 and 4 (three mutations). The two single amino acid residue deletions localize within the N-terminal (R10del) or within the intracellular loop 3 (E244del), and the two single amino acid residue insertions localize within TM domains IV (A158ins) and V (I193ins). None of the single amino acid residue mutations lies within the extracellular loops of the b⁰⁺AT protein. Eight single amino acid residue mutations of *SLC7A9* alter residues that are conserved in all the human members of the LSHAT family (Fig. 2).

Table 2. Cystinuria-specific *SLC7A9* mutations

Mutation	Nucleotide change	Exon	Restriction site		Non-Type I cystinuria families		Untyped cystinuria families	
			Creates	Destroys	Number of positive alleles	Frequency	Number of positive alleles	Frequency
Missense								
P52L	c.340 C-T	3	<i>TaqI</i> ^a	–	1/114	0.009		
G63R	c.372 G-A	3	–	<i>ApaI</i>			1/126	0.008
W69L	c.391 G-T	3	<i>MluNI</i> ^a	–			1/126	0.008
A70V	c.394 C-T	3	–	<i>Fnu4HI</i>			2/126	0.016
G105R ^b	c.496 G-A	4	–	<i>ApaI</i>	29/114	0.254	7/126	0.056
A126T	c.561 G-A	4	–	<i>BstUI</i> ^a	1/114	0.009		
T123M	c.553 C-T	4	<i>NlaIII</i> ^a	–	1/114	0.009	2/126	0.016
V170M ^b	c.693 G-A	5	–	<i>RsaI</i> ^a	17/114	0.149		
A182T ^b	c.729 G-A	5	–	<i>KspI</i>	5 ^c /114	0.044	2/126	0.016
I187F	c.744 A-T	5	–	<i>DpnI</i>			2/126	0.016
G195R ^b	c.768 G-A	5	–	<i>AccI</i>	1/114	0.009		
W230R	c.873 T-C	6	<i>BstUI</i> ^a	–	1 ^d /114	0.009		
I241T	c.907 T-C	7	–	–	1/114	0.009		
G259R ^b	c.960 G-A	8	<i>DdeI</i> ^a	–	2/114	0.017		
R333W	c.1182 C-T	10	–	<i>NciI</i>	10/114	0.088	4/126	0.032
A354T	c.1245 G-A	10	–	<i>AccI</i>	1 ^c /114	0.009		
S379R	c.1322 C-G	11	–	<i>AluI</i>			1/126	0.008
A382T	c.1329 G-A	11	–	<i>Cac8I</i> ^a			1/126	0.008
Nonsense								
W69X	c.391 G-A	3	–	<i>NdeI</i>			1/126	0.008
Splice-site								
IVS5+1G→A	c.789+1 G-A	–	–	–			1/126	0.008
IVS9+3 A→T	c.1162+3 A-T	–	–	<i>MaeI</i> ^a	1/114	0.009		
IVS12+3-IVS12+6 delAAGT	c.1584+3 del AAGT	–	–	–	1/114	0.009		
Deletions, insertions								
	Nucleotide or protein change (frameshift and stop codon downstream at)							
R10del	c.213–215delAGA	2	–	–	1 ^d /114	0.009		
c.520–521insT ^b	(14 bp, 8 codons)	4	–	–			1/126	0.008
c.553–554delCG	(254 bp, 84 codons)	4	–	–	1/114	0.009		
c.596–597del TG ^b	(208 bp, 68 codons)	4	–	–			1/126	0.008
A158ins	c.660–661insGCC	4	–	–	1/114	0.009		
c.686–689delACTG	(53 bp, 19 codons)	5	–	–	1/114	0.009		
insI193	c.764–765insCAT	5	–	–	1/114	0.009		
c.800–801insA	(7 bp, 3 codons)	6	–	–	7/114	0.061	1/126	0.008
c.815–818delTTTC	(158 bp, 53 codons)	6	–	–			1/126	0.008
E244del	c.916–918delGGA	7	–	<i>MboII</i>	2/114	0.017	1/126	0.008
c.897–901delCTCAA	19 bp, 7 codons	7	–	–	1/114	0.009		
c.998delC	(19 bp, 6 codons)	8	–	–	1/114	0.009		
c.1455–1456delTT	(187 bp, 62 codons)	12	<i>Thh111III</i>	–			1/126	0.008
Undefined homo- or hemizygous alleles					4/114	0.035	8/126	0.065
Total					90/114	0.789	39/126	0.310

Mendelian inheritance was confirmed in all cases, except for the patients for whom parent DNA samples were not available (four G105R alleles, three c.800–801insA alleles, three R333W alleles and one allele carrying the following mutations: W69L, A182T, I187F, S379R, A382T, IVS5+1G>A, c.596–597delTG and c.815–818delTTTC).

^aRestriction site generated by a mutagenesis primer. Position numbers of the nucleotide change preceded by a c refer to the position of the nucleotide in the cDNA.

^bMutations already reported (3).

^cMutation A354T was found to be transmitted together with A182T in one chromosome; the frequency of the chromosome, but not of the mutations, has been added to the total. 114 non-Type I-independent alleles and 126 untyped-independent alleles from different populations have been analyzed.

^dMutations R10del and W230R were found to be transmitted together in one independent chromosome; the frequency of the chromosome, but not of the mutations, has been added to the total.

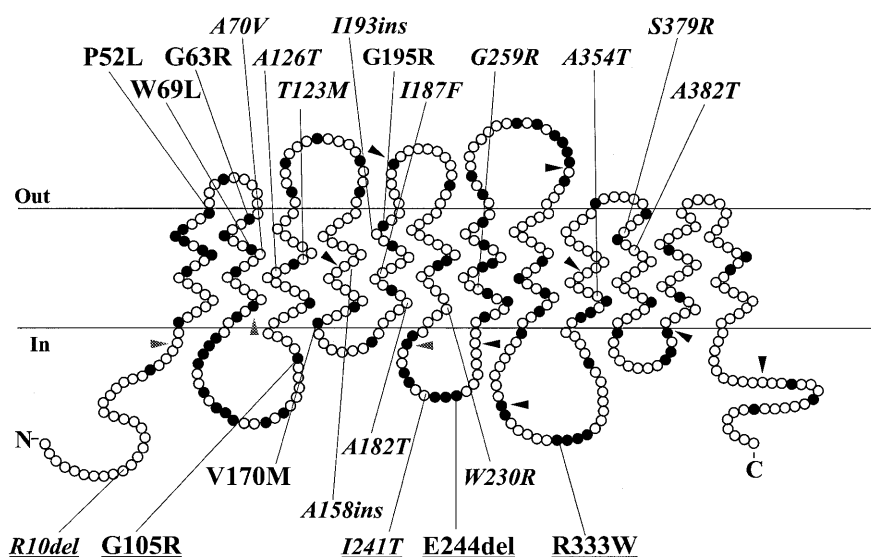


Figure 2. Schematic representation of the cystinuria-specific missense or single amino acid point mutations identified in the b^{o+} AT amino acid transporter. Membrane topology prediction algorithms suggest that b^{o+} AT contains 12 TM domains with the N- and C-termini located intracellularly (3). Twenty-three missense or single amino acid point mutations in *SLC7A9* (b^{o+} AT) are depicted. All the mutations, apart from the five underlined, are located within the putative TM domains of b^{o+} AT. These five mutations are located in the N-terminus or in proposed intracellular loops, and none is present in extracellular loops. Amino acid residues conserved in all the human members of the LSHAT family are indicated in black. Mutations in these conserved residues are indicated in bold, whereas the others are indicated in italics. Arrows indicate the position of the exon-exon boundaries of *SLC7A9* (eight conserved boundaries in *SLC7A7* and *SLC7A8*, black arrows; the other three, gray arrows).

Table 3. Distribution of probands and chromosomes with cystinuria mutations in *SLC7A9* in the four studied populations

Population	Non-Type I probands (chromosomes)			Untyped probands (chromosomes)		
	Analyzed	With mutations	Percentage	Analyzed	With mutations	Percentage
Italian	38 (74) ^a	34 (52)	90 (70)	21 (42)	8 (13)	38 (31)
Libyan Jewish	9 (17) ^b	9 (17)	100 (100)	–	–	–
North American	3 (6)	3 (6)	100 (100)	27 (54)	9 (13)	33 (24)
Spanish	11 (17) ^a	11 (15)	100 (88)	15 (30)	8 (13)	53 (43)
Total	61 (114)	57 (90)	93 (79)	63 (126)	25 (39)	40 (31)

In the non-Type I Italian population, a family from France is included.

^aFive Spanish and two Italian probands have been classified as heterozygotes for *SLC7A9* mutations.

^bOne of these Libyan Jewish families is consanguineous.

In non-Type I cystinuria families, the most frequent mutations were: G105R (25.4%), V170M (14.7%), R333W (8.6%), c.800–801insA (6%) and A182T (4.3%). The frequency of the remaining mutations was <2%. Several mutations were found in the homozygous state: V170M (8 probands, one of which is consanguineous), G105R (7 probands), R333W (2 probands), G259R (1 proband) and A70V (1 proband). In 12 additional probands, for which parental DNA samples were not available, the homozygosity or hemizygoty of their *SLC7A9* mutations was not assessed. The rest of the mutations were found in a compound heterozygous state (17 probands; data not shown) or in a single allele (27 probands, and 7 probands classified as non-Type I heterozygotes; data not shown). None of these mutations was found in 100–200 control chromosomes (data not shown).

Table 3 summarizes the analysis of non-Type I cystinuria mutations. *SLC7A9* mutations were found in 93% of the non-

Type I cystinuria probands, accounting for 79% of their alleles, and in 40% of the untyped probands, covering 31% of their alleles. In the subgroup of 27 untyped North American probands we also screened *SLC3A1* for mutations. Twelve of the North American probands showed at least one mutation in *SLC3A1*, explaining 17 of the carrier alleles (data not shown). In nine of the probands, mutations were detected in *SLC7A9*, accounting for 13 of the carrier alleles. None of these patients showed mutations in both genes. Overall, 78% of the North American patients showed mutations in one of the two genes, accounting for 56% of the carrier alleles, assuming the most common situation where two mutated alleles are necessary to develop cystinuria.

Functional analysis of *SLC7A9* mutations

The four most common (G105R, V170M, A182T and R333W) and two uncommon (A70V and A354T) b^{o+} AT (*SLC7A9*)

missense mutations were tested for amino acid transport activity. The latter two mutations were analyzed because mutation A354T appeared together with A182T in a single allele, and A70V was found in homozygosis in a single patient. Co-transfection of $b^{o+}AT$ and rBAT in human cervical carcinoma (HeLa) cells led to a 7-fold induction of cystine transport over background (i.e., transfected with rBAT alone) (Fig. 3A). This demonstrates functional co-expression of rBAT and $b^{o+}AT$, as described previously (3,23). The Libyan Jewish mutant (V170M) and mutant A354T did not induce L-cystine transport activity (Fig. 3A), and were indistinguishable from those obtained with the transfection of rBAT alone, $b^{o+}AT$ wild-type alone or untransfected cells (Fig. 3A and data not shown). This indicates a complete lack of $b^{o+}AT$ amino acid transport function in patients homozygous for V170M, and strongly suggests that A354T is also a severe cystinuria *SLC7A9* mutation. The most common non-Type I cystinuria mutation (G105R) and mutation R333W almost completely abolished the induced cystine transport (Fig. 3A) retaining only 10% of wild-type $b^{o+}AT$ transport activity (the data from three to five transfection experiments is not shown; $n = 8-14$). Therefore, an almost complete lack of $b^{o+}AT$ amino acid transport function is expected in G105R or R333W homozygotes. In contrast, mutants A70V and A182T showed partial activity (78 and 60% of wild-type transport activity measured in linear conditions for A70V and A182T respectively) (Fig. 3A).

To quantify the $b^{o+}AT$ expression levels induced after transfection experiments with the various constructs tested, we have developed a new polyclonal antibody (870-P6) directed against a human $b^{o+}AT$ peptide from the N-terminal domain of the protein (see Materials and Methods). This serum recognizes two bands (~53 and ~43 kDa) in human $b^{o+}AT$ -transfected HeLa cells. The 43 kDa band is specific since it is present in $b^{o+}AT$ -transfected cells, but not in human rBAT-transfected cells (Fig. 3B) or untransfected HeLa cells (data not shown). This size corresponds to the rat and mouse $b^{o+}AT$ protein bands detected by others (9,23). In contrast, the 53 kDa band is unspecific since it is detected in HeLa cells irrespective of whether $b^{o+}AT$ is transfected (Fig. 3B). Analysis by western blot with 870-P6 Ab in HeLa transfected cells revealed similar or even higher levels of $b^{o+}AT$ protein for mutants A70V, V170M, A182T, R333W and A354T than for the wild-type protein (Fig. 3B). This suggests that intrinsic transport activity or trafficking of $b^{o+}AT$ to the plasma membrane, but not protein stability, is affected in these mutants. In contrast, the levels of G105R $b^{o+}AT$ protein produced in HeLa cells were ~10% of wild-type $b^{o+}AT$ (Fig. 3B). This suggests that either this mutant mRNA is not properly translated or that the mutated mRNA or protein is unstable, or both, but further research is needed to clarify this issue.

Genotype-phenotype correlation in non-Type I cystinuria

The urinary excretion phenotype (urine levels of cystine, lysine, arginine and ornithine) of *SLC7A9* heterozygotes showed clear individual variability for a given mutation (Table 4 and Fig. 4). For instance, there are G105R and V170M heterozygotes with the urinary excretion phenotype near the control range (Table 1) whereas others are near the homozygous range (Tables 1 and 4). In spite of this variability, the urinary excretion phenotype in heterozygotes suggests a

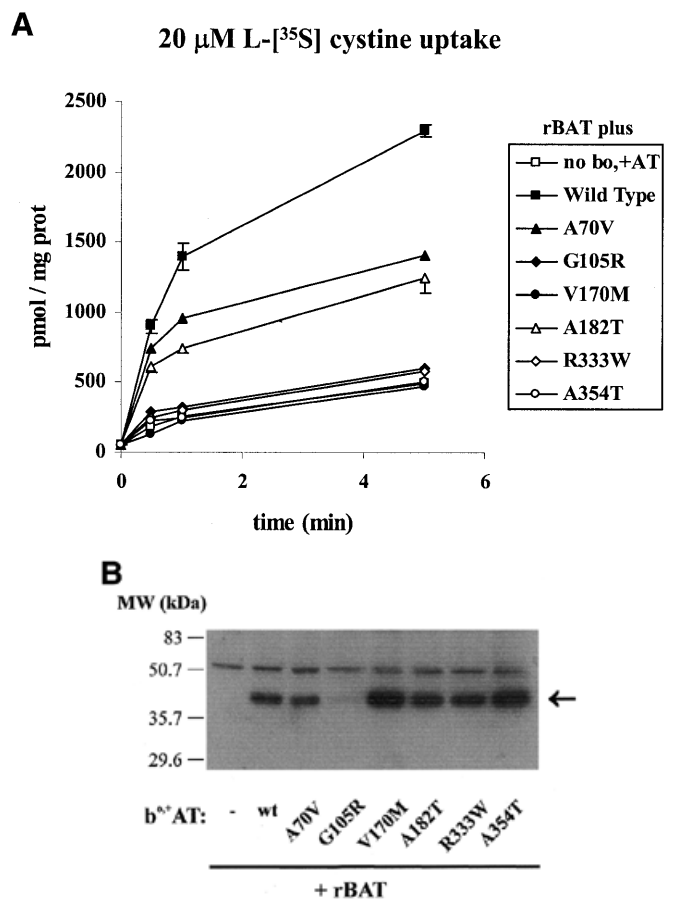


Figure 3. (A) Effect of several *SLC7A9* point mutations on the cystine transport activity elicited by cotransfection of rBAT and $b^{o+}AT$. HeLa cells were transfected with rBAT alone (i.e., background transport activity) or with rBAT together with wild-type $b^{o+}AT$ or the indicated cystinuria $b^{o+}AT$ mutants. Forty hours after the addition of the calcium phosphate-DNA precipitate, 20 μ M [³⁵S]-L-cystine uptake was measured at different times (30 s, 1 and 5 min). Transfection efficiency was 30–55% in all groups. Data (means \pm SEM), expressed in pmol/mg protein, correspond to a representative experiment with four replicas. Error bars are not shown when they are smaller than the symbols. All transport values in the group transfected with rBAT plus $b^{o+}AT$ are significantly higher than those of the other groups with $P \leq 0.05$. All transport values in the groups transfected with rBAT plus A70V or A182T are significantly higher than those of the groups transfected with rBAT alone, or rBAT plus G105R, V170M, R333W or A354T with $P \leq 0.05$. Three other transfection-independent experiments gave qualitatively identical results. (B) Wild-type or mutated $b^{o+}AT$ protein produced in HeLa transfected cells. Cells were transfected with rBAT alone (none), or rBAT plus wild-type (wt) or mutated (A70V, G105R, V170M, A182T, R333W or A354T) $b^{o+}AT$ as in (A). Forty hours later, cells were homogenized, processed for 12% SDS-PAGE and blotted for $b^{o+}AT$ detection with the anti-human $b^{o+}AT$ polyclonal antibody P6-870. The specific $b^{o+}AT$ signal is revealed as a band of 43 kDa (arrow). The unspecific band (53 kDa) is present in untransfected cells (data not shown) or cells transfected with rBAT alone. In parallel, aliquots of the transfected cells were processed for 20 μ M [³⁵S]-L-cystine uptake, and the results obtained were similar to those shown in (A) (data not shown).

varying degree of severity among different mutations. Thus, among the heterozygotes bearing the most common *SLC7A9* mutations, those bearing A182T showed the lowest average (3.5 times the controls) and those bearing R333W showed the highest average (18 times the controls) of the sum of urine levels of cystine and the three dibasic amino acids (Tables 1 and 4). An intermediate phenotype for the same parameter was

Table 4. Urinary excretion of cystine and dibasic amino acids in cystinuria homozygotes and heterozygotes bearing the major *SLC7A9* mutations

		Creatinine ($\mu\text{mol/g}$)				
		Cystine	Lysine	Arginine	Ornithine	Sum
<i>SLC7A9</i> homozygotes						
G105R/G105R	(8)	1159 \pm 144 ^a [673–1964]	4815 \pm 756 ^a [2511–8927]	3236 \pm 677 [1416–7625]	1628 \pm 246 [520–2711]	10837 \pm 1627 [6050–21235]
V170M/V170M	(17)	1929 \pm 156 [930–3314]	9490 \pm 547 [2568–11618]	3664 \pm 332 [1968–7626]	1910 \pm 106 [1048–2337]	14558 \pm 898 [8508–23766]
<i>SLC7A9</i> heterozygotes						
G105R/+	(35)	390 \pm 52 ^{b,c} [26–1538]	1430 \pm 160 ^{b,d} [48–4874]	74 \pm 18 ^b [1–300]	135 \pm 20 ^{b,d} [1–537]	2027 \pm 216 ^{b,c,d} [371–6832]
V170M/+	(16)	354 \pm 72 ^{b,c} [86–1095]	1167 \pm 307 ^{b,d} [76–4443]	36 \pm 11 [0–151]	100 \pm 23 ^b [11–285]	1646 \pm 388 ^{b,c,d} [297–5645]
A182T/+	(11)	212 \pm 67 ^b [38–790]	373 \pm 107 ^b [115–1150]	91 \pm 36 [8–370]	55 \pm 20 [17–195]	707 \pm 174 ^b [327–2063]
R333W/+	(13)	688 \pm 194 ^{b,d} [220–2829]	2470 \pm 408 ^{b,d} [879–4517]	162 \pm 106 [1–1412]	175 \pm 30 ^{b,d} [28–331]	3562 \pm 579 ^{b,d} [1227–7133]
c.800–801insA/+	(12)	451 \pm 81 ^{b,d} [84–1048]	1873 \pm 320 ^{b,d} [122–3266]	77 \pm 16 ^b [10–169]	185 \pm 36 ^{b,d} [25–403]	2577 \pm 394 ^{b,d} [426–3977]

Data ($\mu\text{mol/g}$ creatinine) correspond to the mean \pm SEM from the individuals indicated in parentheses. The highest and lowest excretion values found in each group are given in brackets. All excretion values from G105R or V170M homozygotes are significantly higher than those of controls. Values in G105 homozygotes are significantly different from those in V170M homozygotes^a. Values in carriers significantly different from those of controls^b, R333W heterozygotes^c and A182T heterozygotes^d. In all cases statistical significance is at least $P \leq 0.05$. +, denotes the wild-type allele. Urinary excretion of amino acids in controls is shown in Table 1.

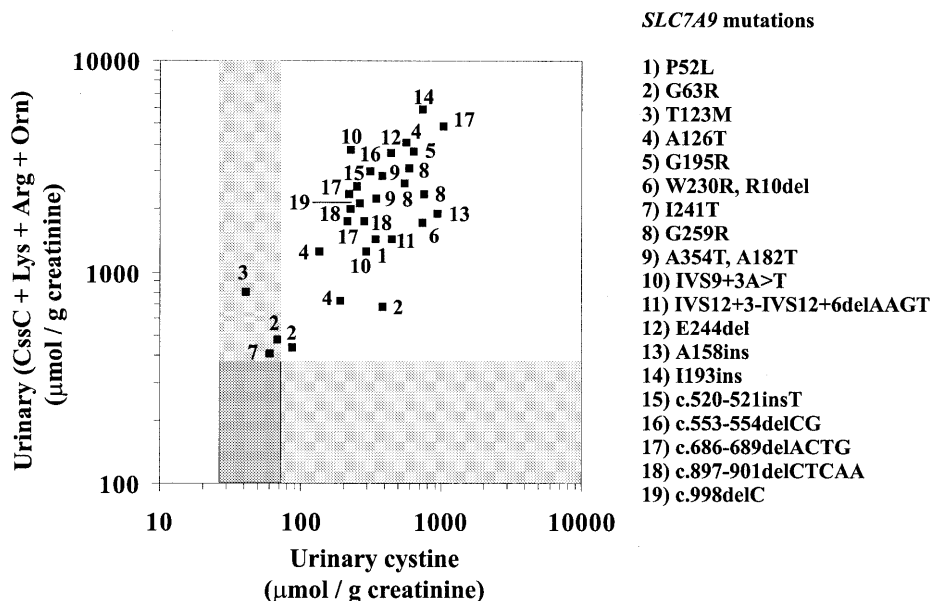


Figure 4. Urine cystine levels versus the sum of urine levels of cystine, lysine, arginine and ornithine in heterozygotes for uncommon cystinuria *SLC7A9* mutations. Urine levels of cystine and the sum of the urine levels of cystine (CysC) and the three dibasic amino acids (Lys, Arg and Orn) are shown for the indicated *SLC7A9* mutations. Thirty heterozygotes carrying 19 different *SLC7A9* mutations are shown as indicated. Heterozygotes for mutations G63R and c.520insT belong to untyped cystinuria families because the other cystinuria trait in the corresponding family is untyped. The 5th–95th percentile range for urine cystine and total urine levels of cystine and dibasic amino acids in controls (see legend to Table 1) is depicted in light gray; the intersection between these two surfaces (dark gray) corresponds to the control range of both parameters together. All urine amino acid levels are expressed in $\mu\text{mol/g}$ of creatinine.

shown by heterozygotes for mutations V170M (8 times the controls), G105R (10 times the controls) or c.800–801insA (13 times the controls) (Table 4). Even though based on single aminoaciduria determinations, a similar ranking of the urinary excretion phenotype might be suggested within heterozygotes

carrying uncommon *SLC7A9* mutations (Fig. 4). Thus, missense mutations T123M and I241T, and two out of the three G63R or A126T heterozygotes were associated with a mild phenotype (urine cystine levels similar to or below 200 $\mu\text{mol/g}$ of creatinine and the sum of urine levels of cystine

and the three dibasic amino acids similar to or below 1000 $\mu\text{mol/g}$ of creatinine—these two limits represent five times the corresponding average value in the controls). In contrast, the other uncommon missense mutations (P2L, G195R, G259R and A354T/A182T), as well as the frameshift mutations, were associated with a more severe phenotype, showing urine cystine levels and the sum of urine levels of cystine and the three dibasic amino acids clearly above the above-mentioned limits (Fig. 4).

Table 4 also shows the urinary excretion of cystine and the three dibasic amino acids in homozygotes of mutations G105R or V170M. The excretion of cystine and lysine was significantly higher in V170M than in G105R homozygotes. Unfortunately, we cannot describe the urinary phenotype of homozygotes of the other most common missense mutations because we found no A182T or c.800–801insA homozygotes or few R333W homozygotes in our cystinuria population.

DISCUSSION

We have determined the genomic structure of *SLC7A9*, thus facilitating an exhaustive mutational analysis in cystinuria patients. Here we describe 28 new *SLC7A9* cystinuria mutations, which, together with those reported previously (3), increase the number of known mutations in *SLC7A9* to 35. Mutation G105R is revealed as the major non-Type I cystinuria allele (25%).

The present study shows individual and mutational variability in the cystinuria urinary excretion phenotype (i.e., urine levels of cystine and the three dibasic amino acids: lysine, arginine and ornithine) of heterozygotes for a given *SLC7A9* mutation. Indeed, in a previous report (32) we showed a wide range in the urinary excretion phenotype of the obligate heterozygotes carrying the major non-Type I cystinuria 19q haplotype among Libyan Jews (i.e., associated with mutation V170M). Thus, some heterozygotes excrete cystine and dibasic amino acids in the urine in the lower range (characteristic of Type III cystinuria), whereas others excrete in the upper range (characteristic of Type II cystinuria) of non-Type I heterozygotes (6,30,32). Similar patterns have been shown here for G105R and R333W heterozygotes. This suggests that Type II and III cystinuria can be caused by the same *SLC7A9* mutations, and therefore other environmental and/or genetic factors affect the urinary excretion of cystine and dibasic amino acids.

In spite of the individual variability, we found a high correlation between amino acid transport function in rBAT/ $b^{0,+}$ AT-transfected HeLa cells and the urinary phenotype of the heterozygotes: A182T with an ~60% residual transport activity is associated with a mild urinary phenotype, whereas G105R, V170M, R333W and A354T with 10% or even lower residual transport activity are associated with a more severe urinary phenotype. The reliability of this correlation is shown by the fact that frameshift mutations and missense mutations affecting highly conserved amino acid residues in the LSHAT family (e.g., P52L, G105R, V170M, G195R, G259R and R333W) are associated with a severe urinary phenotype in heterozygotes, whereas mild missense mutations affect highly variable amino acid residues in the LSHAT family (A70V, T123M, A126T, A182T and I241T) (Table 5). Thus, in the first group of missense mutations, 59 of 67 heterozygotes are

associated with a severe urinary phenotype (the eight exceptions correspond to V170M and G105R heterozygotes) and in the second group 12 of 16 heterozygotes are associated with a mild urinary phenotype (the four exceptions correspond to A182T and A126T heterozygotes) (Table 5). The only mutation that seems not to follow this rule is G63R. Gly at position 63 is located in the N-terminus of the putative TM domain II of the $b^{0,+}$ AT protein and is conserved in all known members of the LSHAT family, but associates with a mild urinary phenotype in two of the three heterozygotes analyzed. Individual variability due to environmental and/or genetic factors might explain the mild urinary phenotype of these two G63R heterozygotes.

The phenotype/genotype correlation in *SLC7A9* mutants suggests that the urinary excretion phenotype of non-Type I heterozygotes will offer valuable clues to the structure/function relationship of the $b^{0,+}$ amino acid transporter and other transporters of the LSHAT family. Thus, most of the non-Type I cystinuria missense mutations of *SLC7A9* are located within the putative TM domains of the $b^{0,+}$ AT protein, and most of them involve residues with a small side chain (i.e., G63R, A70V, A126T, A182T, G195R, G259R and A354T) (Table 5). The importance of a small side chain residue (Gly, Ala or Ser) in the contact regions of α -helices TM domains has been highlighted recently. Thus, highly conserved residues with a small side chain (Gly or Ala) are present in the contact regions of the TM α -helices of AQP1 (25). Moreover, the GlyxxxGly motif (where x represents any residue and Gly can be replaced by Ser) has been reported as a framework for TM helix–helix association (24), and in this sense, helices 3 and 6 of AQP1 contain a GlyxxxGly motif (where Gly can be replaced by Ala). Similarly to AQP1, $b^{0,+}$ AT contains highly conserved Gly and/or Ala residues in the putative TM domains I, II, V, VI, X and XII (data not shown). Moreover, highly conserved helix–helix association motifs (SmxxxSm; where Sm stands for residues with a small side chain: Gly, Ala or Ser) are present in the $b^{0,+}$ AT protein: Gly₄₁xxxGly₄₅ and Gly₄₇xxxSer₅₁ in TM domain I; Ala₂₂₄xxxGly₂₂₈ in TM domain VI; Ala₂₅₅xxxGly₂₅₉ in TM domain VII; Ser₃₁₃xxxAla₃₁₇ in TM domain VIII. Three of the *SLC7A9* missense mutations (G195R, G259R and A354T) are located in the center of putative TM domains of $b^{0,+}$ AT and correspond to amino acid residues with a small side chain (i.e. Gly, Ala or Ser) in all the eukaryotic members of the LSHAT family (Table 5), and mutation G259R involves the conserved SmxxxSm helix–helix association motif in TM domain VII (see above). These three mutations cause a severe urinary phenotype in heterozygotes (e.g. G195R and G259R) or a dramatic loss of transport function when assayed in transfected cells (e.g. A354T). Interestingly, the lysinuric protein intolerance mutation G54V in *SLC7A7* (26) is similar to the *SLC7A9* mutation G259R. Mutation G54V involves a putative SmxxxSm helix–helix association motif in TM domain I of the y^+ LAT-1 protein (Gly₅₄xxxSer₅₈), which is highly conserved in the LSHAT family, and shows no transport activity when assayed in oocytes (26). In contrast to these severe mutations, A70V, A126T and A182T involve residues in putative TM domains with different side chain sizes in the other members of the LSHAT family (Table 5). Mutations A70V and A182T showed substantial residual transport activity, and mutations A126T and A182T are associated with a mild urinary phenotype in 10

Table 5. Genotype–phenotype correlation in *SLC7A9* missense mutations

Missense mutations	Location in the protein	Residues in eukaryotic LSHAT members (number) ^a	Urinary phenotype in heterozygotes ^b	Transport defect (residual activity) ^c
TM domains				
P52L	I	P (all)	Severe (<i>n</i> = 1)	?
G63R	II	G (all)	Mild (<i>n</i> = 2 of 3)	?
A70V	II	A (16) I (5) V (6) T (1) S (1) L (1)	?	Mild (78%)
T123M	III	T (16) S (11) C (3) A (2) G (1)	Mild (<i>n</i> = 1)	?
A126T	III	A (23) Y (7) T (3)	Mild (<i>n</i> = 2 of 3)	?
V170M	IV	V (all)	Severe (<i>n</i> = 9 of 16)	Severe (0%)
A182T	V	A (18) Y (5) G (3) F (3) I (2) V (2)	Mild (<i>n</i> = 8 of 11)	Mild (60%)
G195R	V	G (all)	Severe (<i>n</i> = 1)	?
G259R	VII	S (27) G (5) A (1)	Severe (<i>n</i> = 1)	?
A354T	IX	A (17) S (15) G (1)	Severe (<i>n</i> = 2) ^d	Severe (0%)
Intracellular loops				
G105R	I	G (all)	Severe (<i>n</i> = 34 of 35)	Severe (10%)
I241T	III	V (23) I (8) L (1) M (1)	Mild (<i>n</i> = 1)	?
R333W	IV	R (30) Q (1) M (1) E (1)	Severe (<i>n</i> = 13)	Severe (10%)

Only missense mutations with available phenotype are described.

^aThe number in parentheses indicates the number LSHAT members with this particular amino acid residue at the corresponding position among 33 eukaryotic sequences with at least 30% amino acid identity to b^{o+}AT; these 33 sequences correspond to 24 mammalian sequences, *Schistosoma mansonii* SPRM1, four *Drosophila* putative proteins and four *Caenorhabditis elegans* putative proteins, which are the only known ones that conserved the cysteine residue involved in the disulfide bond with the corresponding heavy subunit (e.g. rBAT or 4F2hc).

^bHeterozygotes excreting cystine and the sum of cystine and the three dibasic amino acids above five times the average of these two parameters in controls are classified as having a severe urinary phenotype. In contrast those below these limits are classified as having a mild urinary phenotype.

^cResidual transport activity is expressed in percentage of the transport activity of wild-type b^{o+}AT.

^dThe two heterozygotes carrying A354T also carry mutation A182T.

out of 14 heterozygotes (Table 5). All this suggests that residues with small side chains, which are conserved in TM domains of transporters of the LSHAT family, may participate in the TM helix–helix association of these proteins.

The data presented here suggest that *SLC7A9* is the main non-Type I cystinuria gene. Thus, after this first exhaustive screening of the ORF of *SLC7A9*, mutations were found in 79% of the carrier chromosomes in non-Type I patients. Cystinuria alleles in which mutations were not found may be explained by mutations in the ORF not detected by SSCP analysis, large deletions or insertions, mutations in the promoter region or mutations in intron sequences that were not screened. However, we cannot rule out the possibility that, at least in some cases, another gene or genes may be involved. The protein products of *SLC3A1* and *SLC7A9*, rBAT and b^{o+}AT, might be subunits of the apical b^{o+} reabsorption system for cystine and dibasic amino acids. This was suggested because the expression of both proteins induced b^{o+} amino acid transport activity in several cell systems (3,9,23). Moreover, both proteins are expressed in the apical plasma membrane of the epithelial cells of the proximal tubule (9,23,27). In contrast to this hypothesis, a reverse expression pattern for rBAT and b^{o+}AT has been shown in the epithelial cells along the proximal tubule of the nephron (higher in the S3 segment and lower in the S1 segment for rBAT, and higher in the S1 segment and lower in the S3 segment for b^{o+}AT) (9,23,27). A high-capacity

low-affinity, and a low-capacity high-affinity reabsorption system for cystine have been reported in the proximal convoluted tubule (S1–S2 segments) and in the proximal straight tubule (S3 segment) respectively (reviewed in ref. 28). At present, it is not clear which of the two cystine reabsorption systems b^{o+}AT is responsible for. If rBAT and b^{o+}AT are the subunits of the same transporter, a defective system b^{o+} would be responsible for Type I and non-Type I cystinuria. Alternatively, non-Type I cystinuria would be caused by a defective reabsorption system of cystine (b^{o+}AT) in the upper part of the proximal tubule (S1–S2 segments), and the low-capacity high-affinity reabsorption system of cystine (rBAT) in the lower part of the proximal tubule (S2–S3 segments) would be responsible for Type I cystinuria. Co-immunoprecipitation studies of both proteins from kidney apical plasma membranes may clarify this issue. In any case, it is clear that rBAT and b^{o+}AT need partners to express full amino acid transport activity (3,9,23,29), but additional apical LSHAT for rBAT and HSHAT for b^{o+}AT have not been found. On the other hand, direct sequencing of the ORF of *SLC7A9* and *SLC3A1* in the 27 North American untyped patients of this study revealed mutations in either gene in 78% of the cases, representing only 56% of the alleles. For the rest (22% of patients and 44% of alleles), mutations outside the ORF of either gene could explain these results. The possibility that other genes may be

involved in cystinuria remains open. Additional LSHAT for rBAT or HSHAT for b^o+AT would be the obvious candidates.

MATERIALS AND METHODS

Patients

We studied 175 cystinuria patients from four populations (80 Italian, 40 Spanish, 32 North American and 23 Libyan Jewish) and from 124 independent families. The appropriate informed consent was obtained from all patients and relatives who participated in the study. Cystinuria diagnosis was first established by the occurrence of cystine calculi and then confirmed by urinary hyperexcretion of cystine and dibasic amino acids, but in some probands (8 homozygotes or compound heterozygotes and 3 non-Type I heterozygotes; see below) diagnosis was based solely on the hyperexcretion of cystine and dibasic amino acids after the patient had presented with a disease other than cystinuria.

Urinary excretion of cystine and dibasic amino acids in the obligate heterozygotes was used to identify 61 non-Type I cystinuria probands (38 Italian, 11 Spanish, 9 Libyan Jewish and 3 North American) among the 124 families studied. Thus, obligate heterozygotes were classified as non-Type I when at least two of the parameters cystine, lysine or the sum of cystine and the three dibasic amino acids in urine were higher than the 95th percentile of these parameters in controls (Table 1). When both parents were considered non-Type I the related patients were classified as having non-Type I cystinuria (36 Italian, 9 Libyan Jews, 6 Spanish and 3 North American families). These non-Type I patients excrete cystine and dibasic amino acids in the urine (Table 1) within the range of cystinuria patients with two mutated alleles (6,30–32). In a few cases the classification of the cystinuria probands was based not only on the urinary excretion profile of the parents but also on the peculiar excretory phenotype of the patient. Thus, in seven families (5 Spanish and 2 Italian) the probands had a urinary amino acid profile similar to the parent transmitting the disease and within the upper range of non-Type I heterozygotes (Table 1). Moreover, the other parent showed a normal urinary excretion phenotype, and therefore the probands were considered to be non-Type I heterozygotes. Urine amino acid levels were determined using morning or 24 h urine, as described (33), and corrected per gram of creatinine excreted.

Structure of the *SLC7A9* gene

The RPCI-5 PAC library was screened using a 675 bp cDNA fragment encompassing both the 3'UTR and part of the coding region as a probe (nucleotide positions 1000–1675 of the *SLC7A9* cDNA, GenBank accession no. AF141289). Four PAC clones were identified, 1003n9, 911f19, 989n8 and 852f21. The location and sequence of all exon–intron boundaries were determined by direct sequencing of either the PAC clones or the products obtained by PCR amplification of genomic DNA with cDNA-derived oligonucleotide primers, using an Applied Biosystem ABI 377 fluorescent sequencer and the ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin Elmer).

Mutation analysis and direct sequencing

Genomic DNA from all patients was amplified by PCR using intron-derived oligonucleotides for each exon, as reported in Table B (available as supplementary material online). Each amplification reaction was performed using 100 ng of patient DNA, dNTPs (200 µM of each), PCR buffer containing MgCl₂ (1.5 mM final concentration), Taq Gold polymerase (0.02 U/µl, Perkin Elmer) and primers (0.35 µM of each), in a final volume of 50 µl. The cycling conditions were set according to the instructions given by the manufacturer of Taq Gold, with annealing temperatures ranging from 55 to 57°C (depending upon the set of primers used). The mutational screening in the Libyan Jewish and the North American probands was performed by direct sequencing, whereas the Italian and the Spanish probands were screened by RNA–SSCP or SSCP respectively, as described (3); bands showing altered mobility in electrophoresis were then sequenced. In all cases, sequencing of both strands of the PCR products was performed with the same set of primers used for the amplification by automated systems. All mutations were checked in controls by direct sequencing (North American and Libyan Jewish populations), by SSCP or restriction analysis (Spanish population) and by restriction analysis (Italian populations). Mutation analysis of *SLC3A1* was carried out by SSCP or direct sequencing of the ORF with nucleotide primers as described previously (34). All the probands included in this study were screened for *SLC7A9* mutations. The 27 North American untyped patients were also screened for *SLC3A1* mutations.

Cells and transfections

HeLa cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 0.1 mg/ml streptomycin (D10) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Transfections were performed by standard calcium phosphate precipitation in 10 cm diameter plates with a mixture of DNA containing 2 µg of pEGFP (green fluorescence protein; Clontech), 9 µg of pCDNA3-rBAT and 9 µg of pCDNA3-b^o+AT (wild-type or mutated b^o+AT) (see below). When rBAT or b^o+AT was transfected alone the DNA transfection mixture contained 2 µg of pEGFP and 18 µg of pCDNA3-rBAT or pCDNA3-b^o+AT. After overnight incubation with the precipitate, cells were extensively washed in phosphate-buffered saline (PBS) and trypsinized, and 150 000 cells in 1 ml of D10 were plated per well on a 24-well plate for uptake measurements (24–48 h later). Transfection efficiency was evaluated by analyzing an aliquot of cells of each individual transfection group for GFP expression by fluorescence-activated cell sorting using an EPICS XL Coulter cell sorter (Serveis Científic-Tècnics, Universitat de Barcelona). The percentage of positive cells was defined as the fraction beyond the region of 99.9% of non-GFP transfected cells. Transfection efficiency of GFP ranged from 30 to 55% in different experiments. Transfections with efficiency <30% were discarded.

Plasmids and site-directed mutagenesis

The wild-type b^o+AT (3) and rBAT (35) were cloned into the pCDNA3 vector (Invitrogen) by conventional techniques (36) at the *EcoRI* and *XhoI* sites for b^o+AT, and the *EcoRI* and *XbaI*

sites for rBAT. Plasmids were obtained by standard CsCl gradient centrifugation.

Mutants were generated using the QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene) following the manufacturer's instructions. The mutagenic oligonucleotides were: (sense strands; mutated nucleotides are indicated in parentheses): 5'-CTGCCATCATATGGG(T)GGCTTGC GGCCCTC-3' for the A70V mutant, 5'-GATGGAGCC-TAC(A)GGCCCATCCCCGC-3' for the G105R mutant, 5'-GAACATCTTACC(A)CGGCCAAGCTGGT-3' for the A182T mutant, 5'-TTACGTGGCGGGC(T)GGGAGGGTCA-CATG-3' for the R333W mutant, and 5'-GCGCCTCACTCC-AGCCCC(A)CCATCATCTTTTAT-3' for the A354T mutant. All mutants generated were completely sequenced in both directions to confirm the presence of the mutation and to rule out any additional undesired changes. The V170M mutant has already been described (3).

Uptake measurements

Twenty-four-well plates, with 1 ml of D10 per well, were placed in a dry incubator at 37°C an hour before the transport assay. At that time, the medium was aspirated and cells were washed twice in 1 ml of uptake solution without amino acid equilibrated at 37°C. Immediately, 200 µl of uptake solution [137 mM methyl gluconate, 2.8 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5.4 mM KCl, 5 mM L-glutamate, 10 mM HEPES pH 7.5 and 20 µM [³⁵S]-L-cystine (2 µCi/ml)] was added and cells were incubated for different periods. After incubation, the uptake medium was removed and cells were washed three times in 1 ml each of cold (4°C) uptake solution without amino acids. Non-specific [³⁵S]-L-cystine binding to the plate was assessed by washing, adding the uptake solution at 4°C and immediately stopping the reaction (zero time). After washing, cells were lysed in 250 µl of lysis buffer (0.1 M NaOH, 0.1% SDS) per well and 100 µl was used to count the radioactivity, and 20 µl was used to measure the protein content in the well using the BCA Protein Assay kit. Radioactivity was measured in a beta scintillation counter (Beckman LS 6000TA; Beckman Instruments).

Generation of anti-human b⁰⁺AT P6-870 antibody and western blot analysis

The antibody P6-870 is a polyclonal rabbit antiserum raised in M.Palacín's laboratory against the peptide MGD TGLRKRRE-DEKSIKS (Research Genetics) corresponding to the 18 N-terminal amino acid residues of human b⁰⁺AT. For western blot analysis, total cell extracts were obtained by scraping semi-confluent wells off a 6-well plate into a buffer containing 25 mM HEPES (pH 7.4), 250 mM sucrose, 2 mM EDTA and a cocktail of protease inhibitors (0.2 U/ml aprotinin, 2 µM leupeptin, 1 mM PMSF and 1 µM pepstatin). The cell suspension (10⁶ cells/ml) was homogenized by passing it 20 times through a 25 gauge needle on ice, and an aliquot was used to measure the protein concentration using a Protein Assay Kit (Bio-Rad). Protein (20 µg) in Laemmli Sample Buffer containing 100 mM dithiothreitol was loaded in each lane for SDS-PAGE (12% polyacrylamide), and then transferred to Immobilon (Millipore Iberica). Membranes were then blocked with 5% non-fat dry milk in PBS for 1 h at 37°C. P6-870 Ab was used at a 1:1000 dilution in 1% non-fat dry milk in PBS (overnight incubation at

4°C). Then, three washes were performed in PBS containing 0.3% Tween-20 at 37°C for 10 min each. Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody (Sigma) was used as secondary antibody at 1:5000 dilution in 1% non-fat dry milk in PBS (1 h incubation at room temperature). Finally, membranes were washed three times in PBS containing 0.3% Tween-20 at room temperature for 10 min each. Antibody binding was detected using ECL western blot detection system (Amersham).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material relating to this paper is available at <http://www.hmg.oupjournals.org>.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the families for contributing to this project. We also thank M. Jiménez and A. Casillas for their technical help, R. Rycroft for editorial help and the YAC Screening Center at San Raffaele Biomedical Science Park. This research was supported in part by Dirección General de Investigación Científica y Técnica research grants PM96/0060 and PM99/0172 from Spain to M.P. and V.N., BIOMED2 CT98-BMH4-3514 EC grant to V.N., M.P. and P.G. and CT97-BMH4-2284 (EURO-IMAGE) EC grant to X.E. and A.B., Fundació La Marató-TV3 research grant 981930 to V.N. and M.P., Generalitat de Catalunya grants 1997 SGR 121 and 1997 SGR 00085 to A.Z., M.P. and X.E., support of the Comissionat per a Universitats i Recerca de la Generalitat de Catalunya to M.P., Italian Telethon Foundation grants (E556) to L.Z., the Merck Genome Research Institute (MGRI grant no. 37) and Ministero Italiano della Sanità grant to P.G. M.F., L.F. and N.R. are recipients of fellowships from the Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica (Catalonia, Spain). E.F. is recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación y Cultura (Spain).

REFERENCES

- Garrod, A.E. (1908) Inborn errors of metabolism. *Lancet*, **2**, 1–7.
- Calonge, M.J., Gasparini, P., Chillarón, J., Chillón, M., Gallucci, M., Rousaud, F., Zelante, L., Testar, X., Dallapiccola, B., DiSilverio, F. *et al.* (1994) Cystinuria caused by mutations in rBAT, a gene involved in the transport of cystine. *Nature Genet.*, **6**, 420–425.
- International Cystinuria Consortium (1999) Non-type I cystinuria caused by mutations in SLC7A9, encoding a subunit (b⁰⁺AT) of rBAT. *Nature Genet.*, **23**, 52–57.
- Segal, S. and Thier, S.O. (1995) Cystinuria. In Scriver, C.R., Sly, W.S. and Beaudet, A.L. (eds), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*, Vol. III, 7th edn. McGraw-Hill, New York, NY, pp. 3581–3601.
- Palacín, M., Goodyer, P., Nunes, V. and Gasparini, P. (2001) Cystinuria. In Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. and Valle, D. (eds), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*, Vol. III. McGraw-Hill, New York, NY, 4909–4932.
- Calonge, M.J., Volpini, V., Bisceglia, L., Rousaud, F., DeSantis, L., Brescia, E., Zelante, L.L., Testar, X., Zorzano, A., Estivill, X. *et al.* (1995) Genetic heterogeneity in cystinuria: the rBAT gene is linked to type I but not to type III cystinuria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **92**, 9667–9671.
- Bisceglia, L., Calonge, M.J., Totaro, A., Feliubadalo, L., Melchionda, S., Garcia, J., Testar, X., Gallucci, M., Ponzzone, A., Zelante, L., Zorzano, A. *et al.* (1997) Localization, by linkage analysis, of the cystinuria type III gene to chromosome 19q13.1. *Am. J. Hum. Genet.*, **60**, 611–616.
- Wartenfeld, R., Golomb, E., Katz, G., Bale, S.J., Goldman, B., Pras, M., Kastner, D.L. and Pras, E. (1997) Molecular analysis of cystinuria in

- Libyan Jews: exclusion of the *SLC3A1* gene and mapping of a new locus on 19q. *Am. J. Hum. Genet.*, **60**, 617–624.
9. Pfeiffer, R., Loffing, J., Rossier, G., Bauch, C., Mier, C., Eggermann, T., Loffing-Cueni, D., Kühn, L.C. and Verrey, F. (1999) Luminal heterodimeric amino acid transporter defective in cystinuria. *Mol. Biol. Cell*, **10**, 4135–4147.
 10. Palacín, M., Estévez, R. and Zorzano, A. (1998) Cystinuria calls for heteromultimeric amino acid transporters. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **10**, 455–461.
 11. Palacín, M., Estévez, R., Bertran, J. and Zorzano, A. (1998) Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol. Rev.*, **78**, 969–1054.
 12. Verrey, F., Jack, D.L., Paulsen, I.T., Saier, M.H. and Pfeiffer, R. (1999) New glycoprotein-associated amino acid transporters. *J. Memb. Biol.*, **172**, 181–192.
 13. Palacín, M., Bertran, J. and Zorzano, A. (2000) Heteromeric amino acid transporters explain inherited aminoacidurias. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, **9**, 547–553.
 14. Torrents, D., Mykkanen, J., Pineda, M., Feliubadaló, L., Estévez, R., de Cid, R., Sanjurjo, P., Zorzano, A., Nunes, V., Huoponen, K. *et al.* (1999) Identification of *SLC7A7*, encoding γ +LAT-1, as the lysinuric protein intolerance gene. *Nature Genet.*, **21**, 293–296.
 15. Borsani, G., Bassi, M.T., Sperandeo, M.P., De Grandi, A., Buoninconti, A., Riboni, M., Manzoni, M., Incerti, B., Pepe, A., Andria, G. *et al.* (1999) *SLC7A7*, encoding a putative permease-related protein, is mutated in patients with lysinuric protein intolerance. *Nature Genet.*, **21**, 297–301.
 16. Kanai, Y., Segawa, H., Miyamoto, K., Uchino, H., Takeda, E. and Endou, H. (1998) Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J. Biol. Chem.*, **273**, 23629–23632.
 17. Mastroberardino, L., Spindler, B., Pfeiffer, R., Skelly, P.J., Loffing, J., Shoemaker, C.B. and Verrey, F. (1998) Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family. *Nature*, **395**, 288–291.
 18. Torrents, D., Estévez, R., Pineda, M., Fernández, E., Lloberas, J., Shi, Y.B., Zorzano, A. and Palacín, M. (1998) Identification and characterization of a membrane protein (γ +L amino acid transporter-1) that associates with 4F2hc to encode the amino acid transport activity γ +L. A candidate gene for Lysinuric Protein Intolerance. *J. Biol. Chem.*, **273**, 32437–32445.
 19. Pfeiffer, R., Rossier, G., Spindler, B., Meier, C., Kuhn, L. and Verrey, F. (1999) Amino acid transport of γ (+)-L-type by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of the glycoprotein-associated amino acid transporter family. *EMBO J.*, **18**, 49–57.
 20. Pineda, M., Fernández, E., Torrents, D., Estévez, R., López, C., Camps, M., Lloberas, J., Zorzano, A. and Palacín, M. (1999) Identification of a membrane protein (LAT-2) that co-expresses with 4F2hc an L type amino acid transport activity with broad specificity for small and large zwitterionic amino acids. *J. Biol. Chem.*, **274**, 19738–19744.
 21. Segawa, H., Fukasawa, Y., Miyamoto, K., Takeda, E., Endou, H. and Kanai, Y. (1999) Identification and functional characterization of a Na^+ -independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J. Biol. Chem.*, **274**, 19745–19751.
 22. Sato, H., Tamba, M., Ishii, T. and Bannai, S. (1999) Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. *J. Biol. Chem.*, **274**, 11455–11458.
 23. Chairoungdua, A., Segawa, H., Kim, J.Y., Miyamoto, K., Haga, H., Fukui, Y., Mizoguchi, K., Ito, H., Takeda, E., Endou, H. and Kanai, Y. (1999) Identification of an amino acid transporter associated with the cystinuria-related type II membrane glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, **274**, 28845–28848.
 24. Russ, W.P. and Engelman, D.M. (2000) The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association. *J. Mol. Biol.*, **296**, 911–919.
 25. Murata, K., Mitsuoka, K., Hirai, T., Walz, T., Agre, P., Bernard Heymann, J., Engel, A. and Fujiyoshi, Y. (2000) Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature*, **407**, 599–605.
 26. Mykkanen, J., Torrents, D., Pineda, M., Camps, M., Yoldi, M.E., Horelli-Kuitunen, N., Huoponen, K., Heinonen, M., Oksanen, J., Simell, O. *et al.* (2000) Inactivating mutations of γ +LAT-1 amino acid transporter gene in Lysinuric protein intolerance (LPI). *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 431–438.
 27. Furiols, M., Chillarón, J., Mora, C., Castelló, A., Bertran, J., Camps, M., Testar, X., Vilaró, S., Zorzano, A. and Palacín, M. (1993) rBAT, related to L-cystine transport is localized to the microvilli of proximal straight tubules and its expression is regulated in kidney by development. *J. Biol. Chem.*, **268**, 27060–27068.
 28. Silbernagl, S. (1988) The renal handling of amino acids and oligopeptides. *Physiol. Rev.*, **68**, 911–1007.
 29. Chillarón, J., Estévez, R., Samaržija, I., Waldegger, S., Testar, X., Lang, F., Zorzano, A., Busch, A. and Palacín, M. (1997) An intracellular trafficking defect in type-I cystinuria rBAT mutants Met467Thr and Met467Lys. *J. Biol. Chem.*, **272**, 9543–9549.
 30. Kelly, S. (1978) Cystinuria genotypes predicted from excretion patterns of amino acids. *Am. J. Med. Genet.*, **2**, 175–190.
 31. Goodyer, P.R., Clow, C., Reade, T. and Girardin, C. (1993) Prospective analysis and classification of patients with cystinuria identified in a newborn screening program. *J. Pediatrics*, **122**, 568–572.
 32. Pras, E., Kochba, I., Lubetzky, A., Pras, M., Sidi, Y. and Kastner, D.L. (1998) Biochemical and clinical studies in Libyan Jewish cystinuria patients and their relatives. *Am. J. Med. Genet.*, **80**, 173–176.
 33. Turnell, D.C. and Cooper, J.D. (1982) Rapid assay for amino acids in serum or urine by pre-column derivation and reversed-phase liquid chromatography. *Clin. Chem.*, **28**, 527–531.
 34. Bisceglia, L., Calonge, M.J., Dello Strologo, L., Rizzoni, G., de Sanctis, L., Gallucci, M., Beccia, E., Testar, X., Zorzano, A., Estivill, X., Zelante, L. *et al.* (1996) Molecular analysis of the cystinuria disease gene: identification of four new mutations, one large deletion and one polymorphism. *Hum. Genet.*, **98**, 447–451.
 35. Bertran, J., Werner, A., Chillarón, J., Nunes, V., Biber, J., Testar, X., Zorzano, A., Estivill, X., Murer, H. and Palacín, M. (1993) Expression cloning of a human renal cDNA that induces high affinity transport of L-cystine shared with dibasic amino acids in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.*, **268**, 14842–14849.
 36. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd Edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
 37. Bassi, M.T., Sperandeo, M.P., Incerti, B., Bulfone, A., Pepe, A., Surace, E.M., Gattuso, C., De Grandi, A., Buoninconti, A., Riboni, M. *et al.* (1999) *SLC7A8*, a gene mapping within the lysinuric protein intolerance critical region, encodes a new member of the glycoprotein-associated amino acid transporter family. *Genomics*, **62**, 297–303.
 38. Sperandeo, M.P., Bassi, M.T., Riboni, M., Parenti, G., Buoninconti, A., Manzoni, M., Incerti, B., Larocca, M.R., Di Rocco, M., Strisciuglio, P. *et al.* (2000) Structure of the *SLC7A7* gene and mutational analysis of patients affected by lysinuric protein intolerance. *Am. J. Hum. Genet.*, **66**, 92–99.

10.1 ANÀLISI DE L'ESTRUCTURA GENÒMICA DEL GEN RESPONSABLE DE LA CISTINÚRIA DE TIPUS NO I (*SLC7A9*)

Després de la identificació de les 7 primeres mutacions a *SLC7A9* que el determinaven com a gen de cistinúria de tipus no I, els grups integrants del Consorci Internacional de Cistinúria (ICC) vem seguir cercant mutacions per tal de poder descartar o no la possibilitat que existís un altre gen implicat en aquesta malaltia i vem establir la primera correlació genotip-fenotip en la cistinúria de tipus no I (article 3). Vem realitzar un estudi en profunditat de tota l'ORF i les regions exó-intró del gen, els resultats d'aquest estudi es resumeixen a l'article 3.

Per facilitar l'anàlisi de mutacions de tota la regió codificant del gen *SLC7A9* es va analitzar la seva estructura genòmica, mitjançant PCR llarga amb encebadors exònics que permetien obtenir la seqüència de les zones intròniques pròximes als exons. Amb aquesta estratègia el nostre grup ja havia definit l'estructura genòmica de rBAT (Purroy *et al.* 1996). El gen *SLC7A9* està format per 13 exons (figura 1 de l'article 3), que s'expandeixen unes 40 kb. La distribució de 8 d'ells està conservada respecte altres gens de la família LSHAT, com els gens *SLC7A7* i *SLC7A8* (Bassi *et al.* 1999; Sperandeo *et al.* 2000).

10.2 ANÀLISI DE MUTACIONS: *SLC7A9* ÉS EL PRINCIPAL GEN CAUSANT DE CISTINÚRIA DE TIPUS NO I

La cerca de mutacions es va fer en la zona codificant del gen *SLC7A9*, mitjançant diferents estratègies: en el cas dels jueus libanesos, es va seqüenciar el cDNA de b^{0,+}AT obtingut a partir de RT-PCR de RNA de limfòcits dels pacients; en els altres casos es va fer amplificant DNA genòmic dels exons de *SLC7A9* i seqüenciant en el cas dels pacients nord americans o analitzant-lo per RNA-SSCP i DNA-SSCP (*Single Strand Conformation Polimorphism*) en els pacients italians i espanyols respectivament.

El coneixement de l'organització exònica va permetre dissenyar encebadors intrònics específics de cada exó per analitzar la totalitat de la regió codificant del gen *SLC7A9* en els pacients: 61 probands tipus no I i 63 probands no classificats. Es van identificar 28 noves mutacions, que juntament amb les 7 ja identificades en l'article 2, feien un total de 35 mutacions. Es van trobar mutacions en el 93% de pacients de tipus no I analitzats (79% dels al·lels no I) i en el 41% de pacients no classificats (31% dels al·lels), indicant que *SLC7A9* era el principal gen causant de la cistinúria de tipus no I.

D'entre totes les mutacions trobades, resumides en la taula 2 de l'article 3, n'hi ha 18 de canvi d'aminoàcid, una que provoca l'aparició d'un codó d'aturada, 4 en llocs de *splicing* i 13 insercions i delecions. Algunes d'aquestes mutacions són freqüents, com les *missense* p.G105R, p.V170M, p.A182T i p.R333W (actualment se sap que causa error de *splicing*, veure més avall), i la inserció c.614dupA (descrita inicialment com c800-8001insA, actualment se sap que causa error de *splicing*, veure apartat 12.4), d'altres s'han trobat només en un dels 240 al·lels independents analitzats en aquest article. La distribució de les mutacions trobades en la proteïna es representa en la figura 2 de l'article 3, on es pot observar que totes les mutacions de canvi d'aminoàcid afecten a residus que es troben en segments transmembrana o bé en llaços intracel·lulars, però cap d'elles en les zones extracel·lulars. Més endavant vem trobar la p.L283F i la p.E282K que localitzen al quart llaç extracel·lular putatiu.

10.3 CORRELACIÓ GENOTIP-FENOTIP

L'anàlisi de mutacions va aportar informació sobre quin tipus de cistinúria era causada per *SLC7A9* i quin per *SLC3A1*. Ens va permetre establir la primera correlació genotip-fenotip en la cistinúria de tipus no I, per als heterozigots amb mutacions a *SLC7A9*: vem correlacionar les dades genètiques amb els valors d'excreció dels aminoàcids arginina, ornitina, lisina, i cistina dels portadors obligats, obtenint una bona correlació per la majoria de mutacions. Es va observar que existien diferències al·lèliques significatives: els portadors d'algunes mutacions, com la freqüent p.A182T, presentaven una excreció d'aminoàcids lleugera o moderada; mentre que els portadors de mutacions com la p.R333W, p.G105R i p.V170M presentaven un fenotip molt més sever (taula 4 de l'article 3).

Malgrat que en alguns casos els portadors d'una mateixa mutació presentaven graus variables d'excreció, en la majoria de casos existia un grau de severitat variable en funció de la mutació, i es va observar que les mutacions de canvi de sentit (*missense*) que afectaven residus conservats entre els diferents membres de la família LSHAT, en general provocaven fenotips més severos en els heterozigots, mentre que aquelles

RESULTATS

mutacions que afectaven residus poc importants (no conservats) provocaven excreció moderada en els heterozigots (Figura 4 i Taula 5 de l'article 3). En analitzar la funció de la proteïna mutada en cèl·lules HeLa, s'observà que les mutacions severes causaven l'abolició total del transport de cistina, i les mutacions lleus només reduïen el transport, com ja s'ha comentat.

A més, es va observar que algunes de les mutacions afectaven residus petits conservats en altres membres de la família i localitzats en segments transmembrana, i per la severitat del fenotip associat a aquestes mutacions es podia suggerir que aquests residus tinguessin algun paper en l'empaquetament entre hèlix transmembrana (veure Discussió General). Així es podien explicar les diferències de fenotip entre cistinúria de tipus II i tipus III, totes dues es deuen a mutacions en el gen *SLC7A9*, però els pacients classificats clàssicament com a tipus II probablement tenen mutacions més severes en la proteïna $b^{0,+}AT$ que els pacients classificats com a tipus III, tot i que també hi ha casos de variabilitat individual entre individus que porten una mateixa mutació, com la p.G105R, on alguns portadors presenten elevats nivells d'hiperexcreció (tipus II) i d'altres presenten un fenotip més suau (tipus III) i fins i tot en un cas va associat a fenotip I (veure article 5). Aquesta variabilitat individual pot ser deguda a factors ambientals o genètics.

10.4 ANÀLISI FUNCIONAL DE MUTACIONS A $B^{0,+}AT$

Aquesta correlació genotip-fenotip ens va portar a plantejar-nos què passava amb la funció de la proteïna, de manera que algunes de les mutacions trobades van ser analitzades funcionalment expressant-les en oòcits de *Xenopus i/o* en cèl·lules HeLa, per tal de demostrar que eren responsables directes del defecte de transport. La doctora Núria Reig va construir les formes mutants comunes de $b^{0,+}AT$ p.G105R, p.A182T, p.R333W i p.V170M, i dues formes no comunes, p.A354T i p.A70V, la primera es va trobar en un sol al·lel juntament amb p.A182T i la segona es va trobar en homozigosi en un sol cas. Es va estudiar la funció d'aquestes formes mutants de $b^{0,+}AT$ cotransfectant-les amb rBAT en cèl·lules HeLa i comparant les seves activitats amb la inducció de transport deguda a la cotransfecció de rBAT amb $b^{0,+}AT$ salvatge. Els resultats de l'anàlisi es presenten en la figura 3A de l'article 3. El que observem és que les mutacions p.V170M i p.A354T presenten una manca total d'inducció de transport, les mutacions p.R333W i p.G105R presenten només un 10% de l'activitat del salvatge, i les mutacions p.A182T i p.A70V presenten activitat parcial, amb un 60% i un 78% de l'activitat de la proteïna salvatge, respectivament. La quantitat de proteïna present en les cèl·lules transfectades es mostra a la figura 3B: és un *Western blot* utilitzant un anticòs policlonal contra la proteïna $b^{0,+}AT$ desenvolupat en el nostre laboratori per la doctora Esperanza Fernández, que reconeix una banda específica d'aproximadament 43 kDa. S'observa que tots els mutants s'expressen en quantitats semblants en les cèl·lules transfectades, excepte el mutant p.G105R, on s'observa menys quantitat de proteïna suggerint que potser *in vivo* aquesta forma es degrada o pràcticament no es tradueix (ja que el mRNA sembla que és estable, veure apartat 12.3). Per tots els altres mutants analitzats, la disminució d'activitat observada no es deu a una manca de proteïna, sinó a un problema funcional o de tràfic cap a la membrana. Es va realitzar una petita caracterització cinètica dels dos mutants que retenien activitat parcial: es va estudiar el transport d'arginina del mutant p.A182T i el de cistina del mutant p.A70V, i s'observà que no presentaven diferències significatives d'afinitat aparent respecte la proteïna $b^{0,+}AT$ salvatge.

La p.A182T i la p.A70V afectaven a la V_{max} , suggerint que potser es tractava de mutants de tràfic i el defecte de transport es devia a que arribava un nombre menor de transportadors a la membrana. Les altres mutacions analitzades provocaven una pèrdua total de l'activitat de la proteïna. Els resultats de transport s'adiuen amb els observats en l'excreció d'aminoàcids en orina, ja que el mutant p.A182T presentava un fenotip menys sever que la resta, com correspon al fet que aquesta proteïna retinguí parcialment la funció, mentre que els portadors de mutacions com la p.G105R, p.V170M i p.R333W presentaven una important hiperexcreció d'aminoàcids, com correspon al fet que aquests mutants tinguin la funció totalment anul·lada. Posteriorment, vam tenir la possibilitat de fer estudis de RNA d'alguns pacients i vam observar que l'al·lel c.997C>T (conegut com p.R333W) en transcriure's pateix dos processos erronis de *splicing*: un *skipping* de l'exó 9 i 10 [r.874_1074del201] i un *skipping* de l'exó 10 [r.978_1074del97]. L'exó 10 és el que conté el canvi nucleotídic a genòmic, però no es detecta mai la presència de mRNA amb l'exó 10 mutat. Es tracta d'una mutació que afecta un element exònic activador de *splicing* o ESE (*Exonic Splicing Enhancer*). En cas de traduir-se aquests dos transcrits originarien dues proteïnes diferents: p.T292_Y358del67 (delecció en pauta), p.R327fsX2 (trencament de pauta) respectivament. Per tant, en aquest cas la correlació d'aquest canvi amb un transport defectuós no es pot associar al fenotip dels pacients, encara que l'estudi del transport ha estat útil per conèixer la importància d'aquest residu en la funció proteica. En el cas de la p.G105R i la p.V170M sí que es detecta el transcrit amb la mutació puntual: [r.311g>a] i [r.508g>a] respectivament. No hem pogut veure l'efecte en el mRNA en les altres 3 mutacions estudiades: p.A182T, p.A70V i p.A354T.

En resum, en aquest estudi, el gen *SLC7A9* es presenta com el principal gen de cistinúria de tipus no I, explicant el 79% de cromosomes no I analitzats. La resta de cromosomes podien ser explicats per mutacions en regions no traduïdes del gen, o per grans delecions o insercions que no havien estat detectades pels mètodes d'anàlisi utilitzats; de tota manera, no es podia descartar del tot la participació d'altres gens en la cistinúria. L'estudi de mutacions en pacients de cistinúria i la correlació genotip-fenotip considerant la funció de la proteïna i els valors d'excreció d'aminoàcids, aporta dades preliminars sobre la relació estructura-funció d'aquesta família de transportadors (veure Discussió General).

11 LA NOVA CLASSIFICACIÓ DE LA CISTINÚRIA GENÈTICA

Article 4:

COMPARISON BETWEEN *SLC3A1* AND *SLC7A9* CYSTINURIA PATIENTS AND CARRIERS: A NEED FOR A NEW CLASSIFICATION

Journal of American Society of Nephrology 13:2547-2553 (2002)

L. Dello Strologo, E. Pras, C. Pontesilli, E. Beccia, V. Ricci-Barbini, L. de Sanctis, A. Ponzzone, M. Gallucci, L. Bisceglia, L. Zelante, M. Jiménez-Vidal, M. Font, A. Zorzano, F. Rousaud, V. Nunes, P. Gasparini, M. Palacín, G. Rizzoni

Contribució:

- Conjuntament amb Maite Jiménez-Vidal i Luigi Bisceglia, identificació de les mutacions a *SLC7A9* i *SLC3A1* en els diferents pacients i familiars. Anàlisi de més de 100 cromosomes control per a cada una d'aquestes noves mutacions.
- Conjuntament amb Maite Jiménez-Vidal recopilació de totes les dades genètiques i fenotípiques per fer la correlació genotip-fenotip (tipus A/B i I/no I).

Comparison between *SLC3A1* and *SLC7A9* Cystinuria Patients and Carriers: A Need for a New Classification

LUCA DELLO STROLOGO,* ELON PRAS,[†] CLAUDIA PONTESILLI,*
 ERCOLE BECCIA,[‡] VITTORINO RICCI-BARBINI,[‡] LUISA DE SANCTIS,[§]
 ALBERTO PONZONE,[§] MICHELE GALLUCCI,^{||} LUIGI BISCEGLIA,^{||}
 LEOPOLDO ZELANTE,^{||} MAITE JIMENEZ-VIDAL,[#] MARIONA FONT,[#]
 ANTONIO ZORZANO,** FERRAN ROUSAUD,^{††} VIRGINIA NUNES,[#]
 PAOLO GASPARINI,^{‡‡} MANUEL PALACÍN,** and GIANFRANCO RIZZONI*

*Division of Nephrology and Dialysis, Bambino Gesù Children's Hospital and Research Institute, Rome, Italy;
[†]Danek Gartner Institute, Sheba Medical Center, Israel; [‡]Urology Department, IRCCS CSS, S. Giovanni Rotondo Hospital, Italy; [§]Pediatrics Department, Turin University, Turin, Italy; ^{||}Urology Department, Campus Biomedico University, Rome Italy; ^{||}Medical Genetics Service, IRCCS CSS, S. Giovanni Rotondo Hospital, Italy; [#]Medical and Molecular Genetics, Duran y Reinalds Hospital, Barcelona, Spain; **Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain; ^{††}Nephrology Service, Fundació Puigvert, Barcelona, Spain; and ^{‡‡}Tigem Medical Genetic, Second University of Naples, Naples, Italy.

Abstract. Recent developments in the genetics and physiology of cystinuria do not support the traditional classification, which is based on the excretion of cystine and dibasic amino acids in obligate heterozygotes. Mutations of only two genes (*SLC3A1* and *SLC7A9*), identified by the International Cystinuria Consortium (ICC), have been found to be responsible for all three types of the disease. The ICC set up a multinational database and collected genetic and clinical data from 224 patients affected by cystinuria, 125 with full genotype definition. Amino acid urinary excretion patterns of 189 heterozygotes with genetic definition and of 83 healthy controls were also included. All *SLC3A1* carriers and 14% of *SLC7A9* carriers showed a normal amino acid urinary pattern (*i.e.*, type I phenotype). The

rest of the *SLC7A9* carriers showed phenotype non-I (type III, 80.5%; type II, 5.5%). This makes the traditional classification imprecise. A new classification is needed: type A, due to two mutations of *SLC3A1* (rBAT) on chromosome 2 (45.2% in our database); type B, due to two mutations of *SLC7A9* on chromosome 19 (53.2% in this series); and a possible third type, AB (1.6%), with one mutation on each of the above-mentioned genes. Clinical data show that cystinuria is more severe in males than in females. The two types of cystinuria (A and B) had a similar outcome in this retrospective study, but the effect of the treatment could not be analyzed. Stone events do not correlate with amino acid urinary excretion. Renal function was clearly impaired in 17% of the patients.

Cystinuria is an autosomal recessive disorder that is characterized by an impaired transport of cystine, lysine, ornithine, and arginine in the proximal renal tubule and in the epithelial cells of the gastrointestinal tract. High cystine concentration in the urinary tract most often causes the formation of recurring renal stones that are resistant to medical treatment. Urine acidification and concentration facilitate stone formation (1).

Traditionally, cystinuria has been divided into three subtypes: types I, II, and III (2). Type I heterozygotes show a normal amino acid urinary pattern, whereas type II and III are characterized by an increase of cystine, lysine, ornithine, and

arginine urinary excretion. Type II has been described as having a more severe impairment of intestinal transport than type III, as demonstrated by a lack of increase in plasma level after an oral load of cystine or lysine (2,3). Subtype non-I grouped previous subtypes II and III (4).

In 1994 a first gene, *SLC3A1* in chromosome 2 (5,6) encoding rBAT, the mutations of which are responsible for type I cystinuria, was identified (7–9). Thereafter, the defect associated with the most common cystinuria-specific *SLC3A1* mutation was described (10) and over 50 mutations in *SLC3A1* were reported (11). A second locus gene that is responsible for type non-I cystinuria was mapped on chromosome 19 (12–15). In 1999, the gene responsible for type non-I cystinuria, *SLC7A9* encoding for bo,+AT, was identified (15,16). This second gene encodes a subunit that associates with rBAT to form the active transporter (17,18). This gene appears to cause both type II and III cystinuria (13), supporting the grouping of these subtypes in type non-I (16,19). Over 30 mutations in *SLC7A9* have been described so far (19).

Despite the increasing knowledge of the genetic and physi-

Received March 14, 2002. Accepted June 23, 2002.

Correspondence to Dr. Luca Dello Strologo, Nephrology and Dialysis Dept., Bambino Gesù Children's Hospital and Research Institute, Piazza S. Onofrio 4, 00165 Rome, Italy. Phone: 39-06-68592393; Fax: +39-06-68592602; E-mail: dellostrologo@opbg.net

1046-6673/1310-2547

Journal of the American Society of Nephrology
 Copyright © 2002 by the American Society of Nephrology

DOI: 10.1097/01.ASN.0000029586.17680.E5

ologic characteristics of the carriers involved in cystinuria, clinical data in homozygotes are very scanty. Large series are not available in the literature. In this study, we present clinical data combined with mutation analysis of 224 patients and the amino acid urinary patterns of 47 and 142 *SLC3A1* and *SLC7A9* heterozygotes, respectively, compared with those of 83 healthy control relatives of the affected subjects in whom the mutation identified in the proband was not detected. Excretion patterns in heterozygotes with known mutations do not fully correspond to the classification used up to now. We propose a new cystinuria classification based on molecular analysis and not on urinary cystine and dibasic amino acid excretion patterns.

Material and Methods

The Institutional Review Board at each of the participating centers approved the study and participants gave informed consent.

All subjects meeting the following criteria were reported to the database:

- Cystine urinary excretion higher than 1040 $\mu\text{mol/g}$ creatinine in a single urine sample or in a 24-h collection and at least one identified cystine stone (emitted or surgically removed).
- Siblings of cystinuric patients defined as above in whom the same genetic mutations were identified or with an amino acid urinary pattern compatible with the diagnosis of cystinuria, even in the absence of stone identification.

Two classifications were attempted:

1. On the basis of parents' amino acid urinary excretion, as previously published (19). Patients were classified as type I when both parents showed a normal urine amino acid pattern, type non-I when urinary excretion of both parents was above normal, and mixed type when urinary excretion was above normal in one of the parents and normal in the other. If urinary excretion in one or both parents was not available, they were defined as unclassified.

Type non-I patients were classified as type II or III according to Kelly (20). Patients were therefore classified as type II when obligate heterozygotes in their families had urine excretion of cystine over 750 $\mu\text{mol/g}$ of creatinine, lysine over 4000 $\mu\text{mol/g}$ of creatinine, and the sum of cystine and the three dibasic amino acids over 4500 $\mu\text{mol/g}$ of creatinine. Patients were classified as type III when obligate heterozygotes in their families had urine excretion of amino acids above normal but below the above-mentioned limits.

2. On the basis of genetic findings. Patients with two mutations in *SLC3A1* (one on each allele) were defined as type A, whereas patients with two mutations in *SLC7A9* were defined as type B. Patients with one mutation on *SLC3A1* and one on *SLC7A9* were defined as type AB. The remaining patients with only one or zero mutations detected were not considered for this classification.

The database includes the following entries: personal data (gender, age, and presence of siblings), anamnestic data (age at first stone emission, number of emitted stones, type and number of surgical interventions [extracorporeal shock wave lithotripsy being excluded due to its low efficacy in treating the stones]), laboratory data (including creatinine plasma levels and amino acid urinary excretion), and genetic data (screening for mutations in *SLC3A1* and *SLC7A9*). To compare patients of different ages, number of emitted stones and surgical interventions were considered as events *per year* of life.

Heterozygotes

The urinary levels of cystine and dibasic amino acids of the parents of the patients (obligated heterozygotes) and of siblings whose carrier status was genetically proven were also introduced when available in the database.

Controls

Amino acid urinary excretions were measured in 83 healthy subjects, relatives of the affected patients, who agreed to undergo genetic analysis and who were found not to carry the mutations of the probands and/or the affected chromosome.

Genetic Analysis

All patients included in the database agreed to undergo genetic analysis. So far, 210 patients have been analyzed by means of single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and/or direct sequencing, as described previously (16,19).

Statistical Analyses

Comparisons between proportion of males and females have been performed through the binomial test. Comparison between groups was performed by means of Mann-Whitney or with *t* test as appropriate. ANOVA for multiple comparisons (Bonferroni test) was used when needed. Correlation between amino acid urinary excretion and stone events was evaluated with Spearman rank correlation coefficient. Each test was considered significant if $P < 0.05$.

Results

Database

Data on 224 patients from 150 families were collected in the database; 125 were male patients, and 99 were female patients. Most were from Italy (69.6%); 16.5% were from Spain, and 13.9% were from Israel.

According to the parents' urinary amino acids, classification was as follows: 31% of the patients were type I, 30% were type non-I, 10% were mixed type, and the remaining 29% were unclassified. In 125 patients, a complete genetic classification was possible: 45.2% were type A, 53.2% were type B, and only 1.6% were type AB (*i.e.*, two patients from one family).

Clinical symptoms were almost identically represented in the groups when either the clinical or genetic classification was considered; to provide data from a larger series, the figures concerning clinical aspects of the disease refer to the urinary amino acid-based classification. Clinical manifestations of cystinuria were early events in all patients. Average age at detection of first renal stone was 13.1 yr (median, 15; SD, \pm 9.3) for type I and 11.7 yr (median, 14; SD, \pm 8) for type non-I ($P = \text{NS}$). Male and female patients had a similar average age at onset (13.6 yr for type I in male patients [median, 15] and 12.4 yr for type I in female patients [median, 12]; 12.1 yr for type non-I in male patients [median, 14] and 11.08 yr for type non-I in female patients [median, 10.5]), but if we look at the gender distribution in the first 3 yr of life, 35 male patients and only 14 female patients reported having had disease-related symptoms ($P = 0.003$). All patients except one had their first renal stone detected before the age of 40 (Figure 1). Twelve siblings of affected patients with increased urinary excretion of cystine and dibasic amino acids who did not develop renal

stones were also included in the database. Two of them are over 40 yr of age (one is 43 and the other is 65). In 10 of the 12 patients, full genetic confirmation of the disease was obtained (*i.e.*, two mutations were identified in *SLC3A1* or *SLC7A9*). In two patients, a single mutation was identified in *SLC3A1* in one and in *SLC7A9* in the other.

On average, renal stone emissions occurred one every 4 yr, with no difference between type I and non-I. Male patients had on average one emitted stone every 3 yr, and female patients had one every 5 yr ($P = 0.02$; Figure 2). Total stone events (spontaneously emitted stones plus those surgically removed) resulted as follows: male patients had on average 0.42 episodes per year (type I, 0.47/yr; type non-I 0.44/yr; $P = NS$), and female patients averaged 0.21 episodes per year (type I, 0.17/yr; type non-I, 0.27/yr; $P = NS$). Disease figures are similar if we only consider fully genotyped patients with a full report of data (Table 1).

Urinary amino acid excretion in the patients was very similar in the two types of cystinuria. Excretion patterns in patients with genetic confirmation of the disease are reported in Table 2; no significant difference was evident between type A and B patients in the urinary excretion of cystine and dibasic amino acids. Type A male and female patients had similar amino acid urinary excretion, whereas type B female patients in this set of patients excreted a higher amount of cystine than male patients. The sum of cystine and dibasic amino acids was also significantly higher. No significant correlation was found between the level of amino acid urinary excretion and the incidence of stone events.

Seventeen percent of the patients had mild renal insufficiency, but only one of them reached end-stage renal failure: 146 patients (out of 176 with reported data) had a plasma creatinine below 120 $\mu\text{mol/L}$ and in 6 it was higher than 200 $\mu\text{mol/L}$. In Fig 3 plasma creatinine for all patients older than 15 is reported.

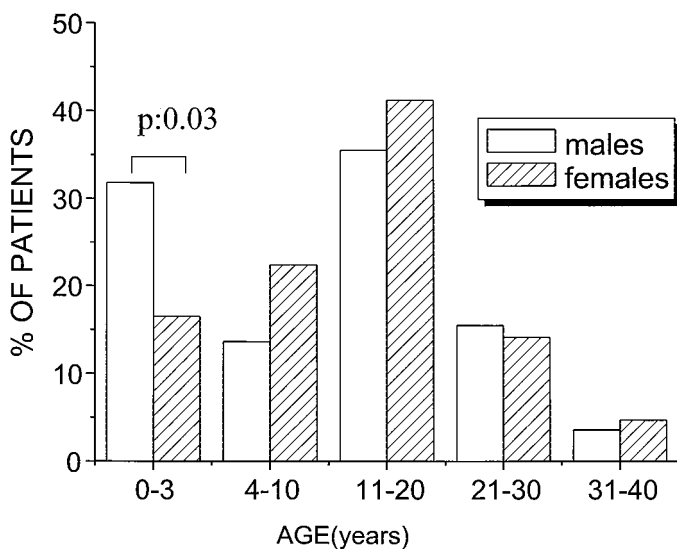


Figure 1. Age at first stone discovery.

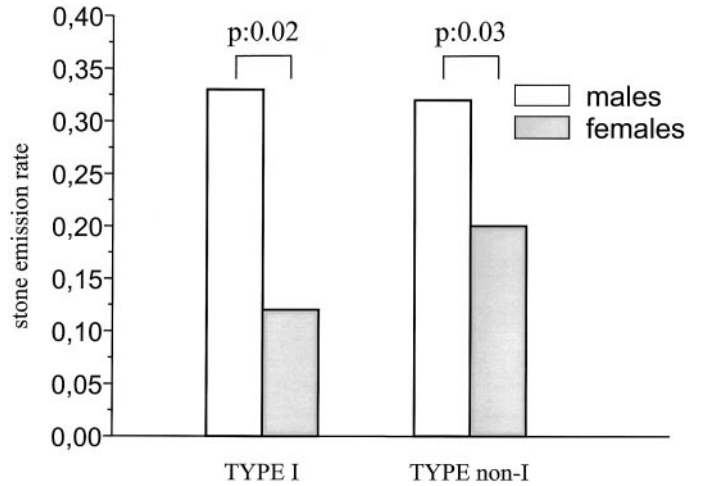


Figure 2. Stone emission rates in male and female patients: cystinuria types classified according to parents urinary excretion.

Genetic Analysis

Genetic analysis has so far been completed in 188 out of 224 patients: in 125 patients (67%) two mutations have been identified, in 52 one mutation has been detected and in 11, from 6 families, no mutations have yet been detected. This means that 84.5%, 83.7%, and 74.0% of type I, type non-I, and unclassified cystinuria independent alleles have been explained. Stratifying the genotyped patients according to amino acid urinary excretion reveals that 34.6% were type I, 33.5% were type non-I, 12.2% were mixed type (I/non-I), and 19.7% remained unclassified. The mixed-type group was composed of 23 patients from 14 families. In two of these families, we detected mutations in both *SLC3A1* and *SLC7A9*: one mutation in each gene in one family and one mutation in *SLC3A1* and two mutations in *SLC7A9* in each allele in the other family. Two and one *SLC7A9* mutations were identified in four and six families, respectively. In the remaining two families one *SLC3A1* mutation was identified.

Unexplained alleles in the 188 studied patients could be due to mutations outside the coding region or mutations that escape SSCP analysis. Linkage studies of the families with an incomplete genotype do not exclude the *SLC3A1* and *SLC7A9* loci (data not shown). Therefore, additional cystinuria loci for these families is unlikely. A manuscript with a complete report of the newly identified mutations is in preparation.

Controls

Amino acid urinary excretion of the controls is reported in Table 3.

Heterozygotes with Genetic Classification

Table 3 provides a report of the cystine and dibasic amino acid urine levels of 47 type A and 142 type B carriers. The attribution of these subjects to each group was genetically confirmed. The difference in urinary excretion between the two sets is obviously very significant, but it is worth noting that, although the sums of cystine and dibasic amino acids in type A

Table 1. Disease figure for types A and B

	<i>n</i>	Age at First Stone Average (\pm SD)	Spontaneous Emissions Average (\pm SD)	Total Stone Events Average (\pm SD)
Type A	48	12.2 (\pm 8.9)	0.31 (\pm 0.72)	0.35 (\pm 0.73)
Type B	59	12.8 (\pm 10.8)	0.34 (\pm 0.6)	0.39 (\pm 0.63)

Table 2. Excretion patterns

	Type A $\mu\text{mol/g}$ Creatinine				Type B $\mu\text{mol/g}$ Creatinine			
	M (\pm SD) (<i>n</i> = 33)	F (\pm SD) (<i>n</i> = 22)	<i>P</i>	Overall (\pm SD) (<i>n</i> = 55)	M (\pm SD) (<i>n</i> = 43)	F (\pm SD) (<i>n</i> = 29)	<i>P</i>	Overall (\pm SD) (<i>n</i> = 72)
Cystine	1812 (1176)	2295 (1693)	NS	2013 (1418)	1540 (1012)	1934 (959)	0.05	1704 (1003)
Lysine	7259 (3911)	8495 (5057)	NS	7753 (4403)	5715 (3352)	7025 (3438)	NS	6269 (3427)
Ornithine	2928 (2835)	2197 (1899)	NS	2644 (2518)	1818 (1202)	2415 (1663)	NS	2068 (1434)
Arginine	2780 (2341)	2988 (1975)	NS	2863 (2185)	2776 (1755)	3251 (1912)	NS	2976 (1825)
Sum	15156 (8422)	15980 (9088)	NS	15489 (8618)	11442 (5057)	14627 (5945)	0.01	12781 (5633)

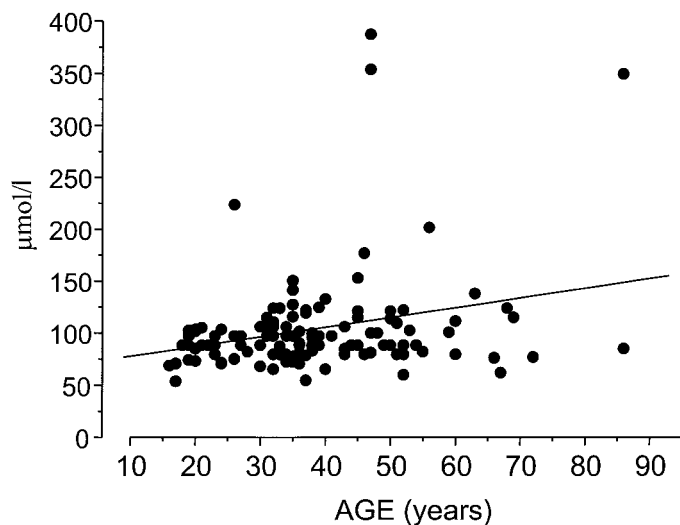


Figure 3. Plasma creatinine in patients over 15 yr of age. One patient, in renal replacement therapy, is not reported in the figure.

heterozygotes were within the range of the controls, these values were within the 95th percentile of the controls in 14% of those of type B (Figure 4). If the classification were based solely on urinary excretion patterns, these findings would lead to an erroneous classification of the offspring. The overlapping was also confirmed when we log plotted cystine and lysine according to Rosenberg (21) (Figure 5). It is important to note that 5.5% (*i.e.*, eight individuals) and 80.5% of type B heterozygotes had amino acid urine levels within the range of type

II and type III heterozygotes, respectively, in accordance with the classification of Kelly (20). Therefore, according to the old classification system, mutations in *SLC7A9* were associated with the three phenotypic types of cystinuria.

Discussion

Cystinuria prevalence has been estimated to vary from 1:2500 in a Libyan-Jewish population to 1:100,000 in Sweden (1). Screening tests for cystinuria in Japan identified six patients out of 110,000 students. None of these showed stone formation in a 7-yr follow-up (22). In Quebec, 17 patients were diagnosed through a neonatal screening program (23). These patients were followed, and four of eight patients with type I cystinuria developed cystine stone in their first decade (24).

The relative rarity of this condition accounts for the absence of large series reports in the literature. Most of the available clinical data concerning cystinuria deal with specific problems: surgical techniques, the effect of medical or surgical treatment on the occurrence of stone relapses, and the effect of diet (25–30). Our multinational database presently collects data on 224 patients, most of whom have been screened for genetic mutations, allowing a complete genetic definition of the two alleles in 60%. This represents the largest series reported so far. It is not a Registry, as we are not collecting all possible cases; therefore, it cannot provide a disease prevalence. Moreover, it is possible that subjects exist with mutations on both alleles of either chromosome 2 or 19 but without renal stone formation or detection. These patients would not be reported to the database, as it has not been set up as a screening program. Twelve such

Table 3. Amino acid urinary excretion

	Controls <i>n</i> = 83 μmol/g creatinine			Type A <i>n</i> = 47 μmol/g creatinine			Type B <i>n</i> = 142 μmol/g creatinine		
	Mean	5 th to 95 th	SD	Mean	5 th to 95 th	SD	Mean	5 th to 95 th	SD
Cystine	52	23 to 109	26	70	21 to 160	46	475	59 to 1298	413
Lysine	181	35 to 499	151	171	28 to 359	123	1692	144 to 4311	1309
Ornithine	28	7 to 70	23	26	5 to 62	26	172	11 to 509	216
Arginine	17	0 to 48	24	24	0 to 51	27	85	0 to 296	142
Total	277	93 to 620	172	300	100 to 555	153	2435	338 to 5923	1798

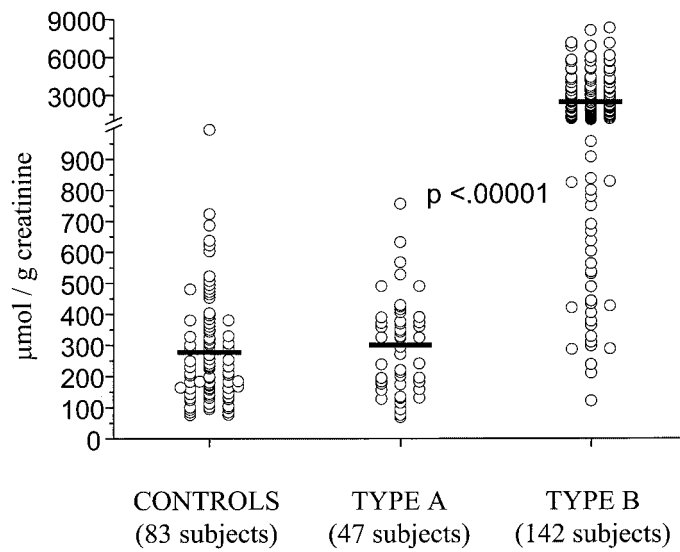


Figure 4. Sum of cystine, lysine, ornithine, arginine in parents of probands (obligated heterozygotes), with a precise genetic characterization and in controls (relatives of the affected, without the mutation of the probands).

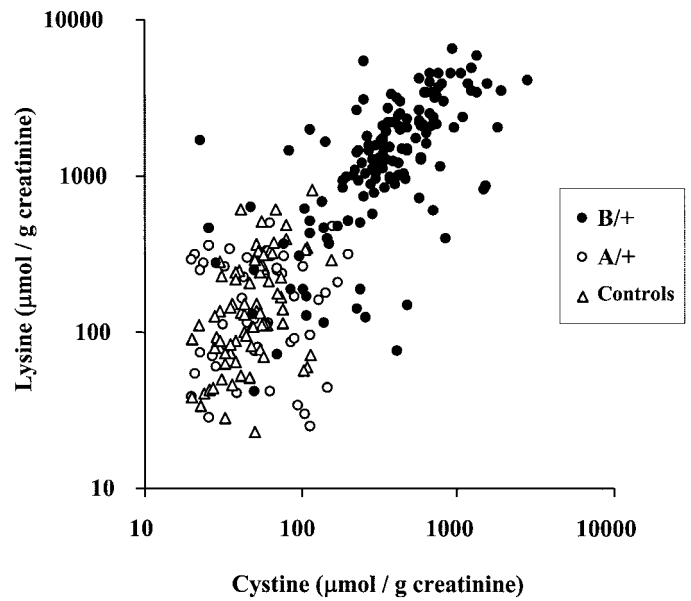


Figure 5. Distribution of genetically confirmed heterozygotes according to log plotting of cystinuria and lysinuria.

patients were indeed detected when the siblings of symptomatic patients were being studied.

Our data show that renal stones occur early in life when cystinuria is symptomatic; the great majority of the patients had their first stone identified before the age of 30 yr (82.9% in the first two decades). Only one patient was diagnosed after the age of 40; however, two other patients included in the database with a negative history for renal stones are older than that. The proportion of the two subtypes of cystinuria (I and non-I) is almost identically represented in the database. The age at onset, the clinical outcome and the severity of the disease do not differ in the two subtypes. Indeed, no difference in stone emissions or number of interventions per year is evident between the two subtypes. We may not, however, exclude that the treatment received by the patients might have influenced the outcome, blunting differences between patients. Severe cases may indeed have received a stronger treatment.

No differences in the age of onset could be detected between male and female patients, but an early appearance of the stones was more likely to occur in male patients than in female

patients. Male patients are more severely affected than female patients. In fact, male patients produce significantly more renal stones. The differences in severity between the genders, in addition to marked intrafamilial differences between siblings sharing the same mutations (31) suggest that other lithogenic factors, both genetic and environmental, play a role in determining the final phenotype.

Amino acid urine excretion was also similar for patients with mutations in *SLC3A1* and those with mutations in *SLC7A9*. Stone event frequency did not correlate with urinary excretion of any of the considered amino acids or with the sum of urinary dibasic amino acid and cystinuria. As urinary excretion of cystine is always well above the solubility threshold, mild differences in urinary excretion of cystine and/or dibasic amino acid might not induce significant differences in stone formation and, again, other factors and/or treatment, may play a determinant role.

Type B female patients (*i.e.*, bearing two mutated *SLC7A9* alleles) excreted a higher amount of cystine than did the male patients. We have no explanation for this finding.

Renal insufficiency, defined as plasma creatinine higher than 120 $\mu\text{mol/L}$, was identified in 17% of our patients. It is important to note that renal function was only studied by measuring plasma creatinine, which is a rather imprecise method, but it is reliable enough to obtain a picture of the occurrence of chronic renal failure in this disease. Renal function was previously studied in 40 patients (19 female and 21 male) (32) by means of a gamma camera renography (indicators were $^{51}\text{Cr-EDTA}$ in 29 cases, $^{99\text{m}}\text{Tc-DTPA}$ in 5, and iothexol in 1). The conclusion of the authors was that renal function was impaired in 70% of the patients after a mean follow-up of 25.9 yr (range, 1 to 52 yr).

In previous studies, mutations in *SLC3A1* have been associated with type I disease, and type II and III disease (type no-I) have been attributed to mutations in *SLC7A9*. However, in this study an analysis of the urinary amino acid excretion patterns in heterozygotes demonstrated that a *SLC7A9* carrier status was compatible with a normal amino acid urinary pattern in 14% of the cases. This makes the classification of cystinuria used so far imprecise. Genetic classification would, therefore, be a more appropriate way to classify patients with cystinuria. The classification we propose is therefore as follows:

TYPE A: Cystinuria caused by mutations in both alleles of *SLC3A1* (chromosome 2). In this type, heterozygotes show a normal amino acid urinary pattern.

TYPE B: Cystinuria caused by mutations in both alleles of *SLC7A9* (chromosome 19). In this type heterozygotes usually (but not always) show an increase of cystine and dibasic amino acid urinary excretion but may also have a normal pattern as demonstrated in 14% of our cases.

TYPE AB: Cystinuria caused by one mutation in *SLC3A1* and one mutation in *SLC7A9*. This type would involve the offspring of one parent carrier of a mutation on chromosome 2 and of another parent with a mutation on chromosome 19. Interestingly, the observed prevalence of AB patients was much lower than expected. Considering a similar frequency of mutations in *SLC7A9* and *SLC3A1*, we would expect one third of the patients to suffer from type A disease, one third from B disease, and one third from AB disease. Indeed, the prevalence of type A disease is similar to that of type B disease; however, type AB is extremely rare (only two patients from one family in our database). Two explanations could account for this low prevalence. The first, type AB patients may suffer from a mild phenotype and therefore, in most cases, escape detection. Alternatively, these patients may actually represent type B disease (two mutations in *SLC7A9*, one of which was detected, the other yet to be defined) and a coincidental carrier state for an *SLC3A1* mutation. Indeed, one patient from our database has three mutations, M467T in *SLC3A1* and two missense mutations in *SLC7A9*, one in each allele.

In conclusion, no clinical differences were evident in this retrospective study between cystinuria type A (due to *SLC3A1* mutations) and B (due to *SLC7A9* mutations). Male patients are more severely affected than female patients. Renal function is clearly impaired in 17% of patients. Renal stone formation cannot be directly correlated with amino acid urinary excretion, suggesting the importance of cofactors of lithogenesis. A

type B carrier status was compatible with a normal amino acid urinary pattern in 14% of cases. A reliable classification of cystinuria requires the identification of the mutations in both alleles. The existence of type AB cystinuria is possible but needs to be confirmed.

Acknowledgments

Part of these data were presented at the 2001 Congress of the International Society of Nephrology, San Francisco, October 10 to 17, 2001. We thank Lidia Feliubadaló for her critical reading of the article and Vincenzo Maria Di Ciommo for his help with statistical procedure. This research was supported in part by BIOMED BMH4 CT 98–3514 to V Nunes, M Palacín, and G Rizzoni, by La Marató de TV3 Grant N° 981932 to F Rousaud, V Nunes, and M Palacín, and by the support of the Comissionat per a Universitats i Recerca de la Generalitat de Catalunya (Spain) to M Palacín. M Font is the recipient of a fellowship from the Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica, Catalonia, Spain.

References

1. Segal S, Thier SO: Cystinuria, In: *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 6th edition, edited by Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, New York, McGraw-Hill Book Co, 1989, pp 2479–2496
2. Rosenberg LE, Downing S, Durant JL, Segal S: Cystinuria: Biochemical evidence for three genetically distinct diseases. *J Clin Invest* 45: 365–371, 1966
3. Rosenberg LE, Crawhall JC, Segal S: Intestinal transport of cystine and cysteine in man: Evidence for separate mechanisms. *J Clin Invest* 46: 30–34, 1967
4. Palacín M, Goodyer P, Nunes V, Gasparini P. Cystinuria, In: *The Molecular and Metabolic Bases of Inherited Disease*, 8th edition, Edited by Scriver CR, Beaudet AL, Sly SW, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, McGraw-Hill. New York, 2001, pp 4909–4932
5. Calonge MJ, Nadal M, Calvano S, Testar X, Zelante L, Zorzano A, Estivill X, Gasparini P, Palacin M, Nunes V: Assignment of the gene responsible for cystinuria (rBAT) and of markers D2S119 and D2S177 to 2p16 by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 95: 633–636, 1995
6. Zhang XX, Rozen R, Hediger MA, Goodyer P, Eydoux P: Assignment of the gene for cystinuria (*SLC3A1*) to human chromosome 2p21 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 24: 413–414, 1994
7. Calonge MJ, Gasparini P, Chillaron J, Chillon M, Gallucci M, Rousaud F, Zelante L, Testar X, Dallapiccola B, Di Silverio F: Cystinuria caused by mutations in rBAT, a gene involved in the transport of cystine. *Nat Genet* 6: 420–425, 1994
8. Calonge MJ, Volpini V, Bisceglia L, Rousaud F, de Sanctis L, Beccia E, Zelante L, Testar X, Zorzano A, Estivill X: Genetic heterogeneity in cystinuria: The *SLC3A1* gene is linked to type I but not to type III cystinuria. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9667–9671, 1995
9. Gasparini P, Calonge MJ, Bisceglia L, Purroy J, Dianzani I, Notarangelo A, Rousaud F, Gallucci M, Testar X, Ponzzone A: Molecular genetics of cystinuria: Identification of four new mutations and seven polymorphisms, and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 57: 781–788, 1995
10. Chillaron J, Estevez R, Samarzija I, Waldegger S, Testar X, Lang F, Zorzano A, Busch A, Palacin M: An intracellular trafficking

- defect in type I cystinuria rBAT mutants M467T and M467K. *J Biol Chem* 272: 9543–9549, 1997
11. Palacin M, Borsani G, Sebastio G: The molecular bases of cystinuria and lysinuric protein intolerance. *Curr Opin Genet Dev* 11: 328–335, 2001
 12. Feliubadalo L, Bisceglia L, Font M, Dello Strologo L, Beccia E, Arslan-Kirchner M, Steinmann B, Zelante L, Estivill X, Zorzano A, Palacin M, Gasparini P, Nunes V: Recombinant families locate the gene for non-type I cystinuria between markers C13 and D19S587 on chromosome 19q13.1. *Genomics* 60: 362–365, 1999
 13. Bisceglia L, Calonge MJ, Totaro A, Feliubadalo L, Melchionda S, Garcia J, Testar X, Gallucci M, Ponzzone A, Zelante L, Zorzano A, Estivill X, Gasparini P, Nunes V, Palacin M: Localization, by linkage analysis, of the cystinuria type III gene to chromosome 19q13.1. *Am J Hum Genet* 60: 611–616, 1997
 14. Wartenfeld R, Golomb E, Katz G, Bale SJ, Goldman B, Pras M, Kastner DL, Pras E: Molecular analysis of cystinuria in Libyan Jews: Exclusion of the SLC3A1 gene and mapping of a new locus on 19q. *Am J Hum Genet* 60: 617–624, 1997
 15. Pras E, Kreiss Y, Frishberg Y, Prosen L, Aksentijevich I, Kastner DL: Refined mapping of the CSNU3 gene to a 1.8-Mb region on chromosome 19q13.1 using historical recombinants in Libyan Jewish cystinuria patients. *Genomics* 60: 248–250, 1999
 16. Feliubadalo L, Font M, Purroy J, Rousaud F, Estivill X, Nunes V, Golomb E, Centola M, Aksentijevich I, Kreiss Y, Goldman B, Pras M, Kastner DL, Pras E, Gasparini P, Bisceglia L, Beccia E, Gallucci M, de Sanctis L, Ponzzone A, Rizzoni GF, Zelante L, Bassi MT, George AL Jr, Palacin M: Non-type I cystinuria caused by mutations in SLC7A9, encoding a subunit (bo,+AT) of rBAT. International Cystinuria Consortium. *Nat Genet* 23: 52–57, 1999
 17. Chillaron J, Roca R, Valencia A, Zorzano A, Palacin M: Heteromeric amino acid transporters: Biochemistry, genetics, and physiology. *Am J Physiol Renal Physiol* 281: F995–F1018, 2001
 18. Fernández E, Carrascal M, Rousaud F, Abián J, Zorzano A, Palacín M, Chillarón J: The rBAT-bo,+AT heterodimer is the main apical reabsorption system for cystine in kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* DOI 10.1152/ajprenal.00071.2002 (online ahead of publication), 2002
 19. Font MA, Feliubadalo L, Estivill X, Nunes V, Golomb E, Kreiss Y, Pras E, Bisceglia L, d'Adamo AP, Zelante L, Gasparini P, Bassi MT, George AL Jr, Manzoni M, Riboni M, Ballabio A, Borsani G, Reig N, Fernandez E, Zorzano A, Bertran J, Palacin M: Functional analysis of mutations in SLC7A9, and genotype-phenotype correlation in non-Type I cystinuria. *Hum Mol Genet* 10: 305–316, 2001
 20. Kelly S: Cystinuria genotypes predicted from excretion patterns. *Am J Med Genet* 2: 175–190, 1978
 21. Rosenberg LE: Cystinuria: Genetic heterogeneity and allelism. *Science* 154: 1341–1343, 1966
 22. Ito H, Murakami M, Miyauchi T, Mori I, Yamaguchi K, Usui T, Shimazaki J: The incidence of cystinuria in Japan. *J Urol* 129: 1012–1014, 1983
 23. Goodyer PR, Clow C, Reade T, Girardin C: Prospective analysis and classification of patients with cystinuria identified in a newborn screening program. *J Pediatr* 122: 568–572, 1993
 24. Goodyer P, Saadi I, Ong P, Elkas G, Rozen R: Cystinuria subtype and the risk of nephrolithiasis [see comments]. *Kidney Int* 54: 56–61, 1998
 25. Salas SM, Martin X, Gelet A, Sanseverino R, Marechal JM, Michel DJ: [Long-term results of endourological treatment with and without ESWL in cystine lithiasis]. *Arch Esp Urol* 44: 273–280, 1991
 26. Singer A, Das S: Therapeutic dilemmas in management of cystine calculi. *Urology* 37: 322–326, 1991
 27. Perazella MA, Buller GK: Successful treatment of cystinuria with captopril [see comments]. *Am J Kidney Dis* 21: 504–507, 1993
 28. Norman RW, Manette WA: Dietary restriction of sodium as a means of reducing urinary cystine. *J Urol* 143: 1193–1195, 1990
 29. Chow GK, Strem SB: Contemporary urological intervention for cystinuric patients: immediate and long-term impact and implications. *J Urol* 160: 341–344, 1998
 30. Joly D, Rieu P, Mejean A, Gagnadoux MF, Daudon M, Jungers P: Treatment of cystinuria. *Pediatr Nephrol* 13: 945–950, 1999
 31. Dello Strologo L, Carbonari D, Gallucci M, Gasparini P, Bisceglia L, Zelante L, Rosaud F, Nunes V, Palacin M, Rizzoni G: Inter and intrafamilial clinical variability in patients with cystinuria type I and identified mutation. *J Am Soc Nephrol* 8: 388A, 1997
 32. Lindell A, Denneberg T, Granerus G: Studies on renal function in patients with cystinuria. *Nephron* 77: 76–85, 1997

**Access to UpToDate on-line is available for additional clinical information
at <http://www.jasn.org/>**

En l'article 5 es presenten 40 mutacions noves de cistinúria (24 a *SLC3A1* i 16 a *SLC7A9*). Deu mutacions de *SLC7A9* que s'associen amb fenotip I en heterozigots, i la primera mutació de *SLC3A1* (dupE5-E9) que s'associa amb fenotip no I en heterozigots. A més també es presenten dues famílies amb cistinúria mixta que tenen mutacions als dos gens, el fenotip d'excreció d'aminoàcids en orina dels quals indica una contribució d'herència digènica, descrita per primera vegada en la cistinúria:

NEW INSIGHTS INTO CYSTINURIA: FORTY NEW MUTATIONS, GENOTYPE-PHENOTYPE CORRELATION AND DIGENIC INHERITANCE CAUSING PARTIAL PHENOTYPE

Journal of Medical Genetics 42(1):58-68 (2005)

Mariona Font-Llitjós*, Maite Jiménez-Vidal*, Luigi Bisceglia*, Michele Di Perna, Luisa de Sanctis, Ferran Rousaud, Leopoldo Zelante, Manuel Palacín[&] i Virginia Nunes[&]

*Aquests autors han contribuït en la mateixa mesura al treball

[&]Autors senior del treball

Contribució:

- Estudi de mutacions de pacients de cistinúria de tipus I, no I i no classificats majoritàriament espanyols, i alguns italians. Posada a punt de la tècnica de PCR multiplex per *SLC7A9* i posterior anàlisi dels pacients. Identificació per DNA-SSCP, RT-PCR i PCR multiplex semiquantitativa de 10 noves mutacions, entre les que hi ha els dos primers grans reordenaments descrits a *SLC7A9*. A *SLC7A9*: p.Y232C, c.171C>T, c.605-3C>A, c.586C>T, c.235+3_c.235+293del, c.1224+4166_c.1399+119dup(4972), c.1224+4166_c.1399+119del(4972). A *SLC3A1*: p.T189M, p.P441R, c.1221dupT. Anàlisi de més de 100 cromosomes control per a cada una d'aquestes noves mutacions. A més, identificació, en pacients espanyols, de mutacions ja descrites anteriorment tant a *SLC7A9* com a *SLC3A1*. Entre elles, identificació de la dupE5-E9 en 5 famílies, que és la primera mutació de rBAT amb fenotip no I.

- Anàlisi de l'efecte del RNA de les mutacions a *SLC7A9*: c.235+3_c.235+293del (*skipping* E3), c.586C>T (r.=/r.585_604del) i c.614dupA (*skipping* E5 i 6), i a *SLC3A1*, la dupE5-E9 (r.892_1617dup726)

- Correlació genotip-fenotip: Anàlisi, per DNA-SSCP o assaig de restricció, de la segregació de totes les mutacions en els familiars disponibles i, per tant, obtenció del genotip dels heterozigots que permeteren realitzar la correlació genotip-fenotip.

MEDICAL GENETICS IN PRACTICE

New insights into cystinuria: 40 new mutations, genotype–phenotype correlation, and digenic inheritance causing partial phenotype

M Font-Llitjós*, M Jiménez-Vidal*, L Bisceglia*, M Di Perna, L de Sanctis, F Rousaud, L Zelante, M Palacín, V Nunes

J Med Genet 2005;42:58–68. doi: 10.1136/jmg.2004.022244

See end of article for authors' affiliations

Correspondence to: Dr Virginia Nunes, Centre de Genètica Mèdica i Molecular (IRO-IDIBELL), Hospital Duran i Reynals, Gran Via Km 2.7, s/n, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona E-08907, Spain; vnunes@iro.es

Received in revised form 3 September 2004
Accepted for publication 8 September 2004

* These authors contributed equally to the study

Objective: To clarify the genotype–phenotype correlation and elucidate the role of digenic inheritance in cystinuria.

Methods: 164 probands from the International Cystinuria Consortium were screened for mutations in *SLC3A1* (type A) and *SLC7A9* (type B) and classified on the basis of urine excretion of cystine and dibasic amino acids by obligate heterozygotes into 37 type I (silent heterozygotes), 46 type non-I (hyperexcretor heterozygotes), 14 mixed, and 67 untyped probands.

Results: Mutations were identified in 97% of the probands, representing 282 alleles (86.8%). Forty new mutations were identified: 24 in *SLC3A1* and 16 in *SLC7A9*. Type A heterozygotes showed phenotype I, but mutation DupE5-E9 showed phenotype non-I in some heterozygotes. Type B heterozygotes showed phenotype non-I, with the exception of 10 type B mutations which showed phenotype I in some heterozygotes. Thus most type I probands carried type A mutations and all type non-I probands carried type B mutations. Types B and A mutations contributed to mixed type, BB being the most representative genotype. Two mixed cystinuria families transmitted mutations in both genes: double compound heterozygotes (type AB) had greater aminoaciduria than single heterozygotes in their family.

Conclusions: Digenic inheritance is an exception (two of 164 families), with a limited contribution to the aminoaciduria values (partial phenotype) in cystinuria. Further mutational analysis could focus on one of the two genes (*SLC3A1* preferentially for type I and *SLC7A9* for type non-I probands), while for mixed probands analysis of both genes might be required, with priority given to *SLC7A9*.

Cystinuria is an autosomal inherited metabolic disorder characterised by impaired transport of cystine and dibasic amino acids in the proximal renal tubule and the gastrointestinal tract. A high cystine concentration in the urinary tract most often causes the formation of recurring renal cystine stones because of the low solubility of this amino acid. The overall estimated prevalence of the disease is 1/7000 neonates, ranging from 1/2500 neonates in Libyan Jews to 1/100 000 in the Swedish population.¹

Cystinuria is classified into three types according to the urine phenotype in heterozygotes: type I (MIM220100), type non-I (MIM600918), and mixed. In type I cystinuria, heterozygotes have a normal pattern of amino acid excretion in the urine (phenotype I), which implies that the disease is transmitted by an autosomal recessive trait. In non-type I cystinuria, heterozygotes have a variable degree of hyperexcretion of cystine and dibasic amino acids (phenotype non-I), indicating that the disease is transmitted in a dominant mode with incomplete penetrance.² Patients with mixed type cystinuria, who inherit phenotype I and non-I alleles from either parent, have also been described.³

Two genes responsible for cystinuria have been identified. Mutations in *SLC3A1*, located on chromosome 2p16.3–21 and encoding the b⁰⁺ transporter related protein rBAT, have up to now been shown to cause only type I cystinuria,^{4–7} and not type non-I.^{8,9} The gene causing type non-I cystinuria was assigned by linkage analysis to 19q12–13.1,^{9,10} confined to a 1.3 Mb region¹¹ and identified as *SLC7A9*,² the protein product of which (b⁰⁺AT) heterodimerises with rBAT (*SLC3A1*) in kidney brush border membranes.¹² The rBAT/b⁰⁺AT heteromeric complex is responsible for the b⁰⁺ amino acid transport

system. This transporter belongs to the heteromeric amino acid transporter (HAT) family, which is formed by a heavy subunit (rBAT or 4F2hc) linked by a disulphide bridge to a range of light subunits (b⁰⁺AT in the case of rBAT).¹³ At present, 79 *SLC3A1* and 50 *SLC7A9* mutations—including nonsense, missense, splice site, and frameshift mutations and large rearrangements in both genes—have been described.^{1,2,6,8,14–27}

Despite the classification of the disease described above, we found that some *SLC7A9* heterozygotes presented a urinary excretion phenotype near the control range, resembling *SLC3A1* heterozygotes that are phenotypically silent.²¹ Since then, phenotype I heterozygotes carrying *SLC7A9* mutations have been reported, and two *SLC7A9* mutations (I44T and P261L) have been associated with this phenotype.^{24,28} These findings make the existing cystinuria classification imprecise because type I cystinuria could be caused by mutations in *SLC7A9* instead of *SLC3A1*. Consequently, a new scheme based only on genetic aspects has recently been proposed²⁸: type A, caused by two mutations in *SLC3A1* (rBAT); type B, caused by two mutations in *SLC7A9* (b⁰⁺AT); and the possibility of type AB, with one mutation on each of the above genes (that is, cystinuria with digenic inheritance). However, it remains unclear whether type AB implies a digenic inheritance of the disease. Given a similar frequency of mutations in *SLC7A9* and *SLC3A1*,²⁸ we would expect half

Abbreviations: DHPLC, denaturing high performance liquid chromatography; HAT, heteromeric amino acid transporter; RT-PCR, reverse transcriptase polymerase chain reaction; SSCP, single strand conformation polymorphism

to be from AB disease. The prevalence of type A disease is similar to that of type B disease, but type AB is extremely rare.²⁸ Two explanations could account for this low prevalence. Type AB patients may have a mild phenotype and escape detection. Alternatively, these individuals may represent type B or type A disease with a coincidental mutation in the other subunit gene. In this case, type AB carriers might be obligate heterozygotes with the possibility of digenic inheritance causing some effects at the phenotypical level.

We focused our study on an exhaustive mutational analysis of a large cohort of patients with extensive genotype–phenotype correlations in order to clarify the cystinuria classification from a genetic point of view. Special emphasis was placed on *SLC7A9* alleles that segregate as a silent phenotype in obligate heterozygotes, on mixed cystinuria families, and on possible digenic cases. Here we report the following: 40 new cystinuria specific mutations (24 in *SLC3A1* and 16 in *SLC7A9*); 10 *SLC7A9* mutations that associate with phenotype I in heterozygotes; the first *SLC3A1* mutation (dupE5-E9) that associates with phenotype non-I in heterozygotes; and two families with mixed cystinuria which carry mutations in both genes and whose amino acid excretion phenotype in urine indicates a contribution of digenic inheritance, described for the first time in cystinuria.

METHODS

Patients: phenotypic and genetic classification

The institutional review board of the participating centres approved the study and participants gave their informed consent.

Amino acid excretion was determined using morning urine samples or in a 24 hour collection, as described,²⁹ and corrected per gram of creatinine excreted. All subjects who fulfilled the following criteria were included in the study:

- urine cystine excretion more than 1040 $\mu\text{mol/g}$ creatinine in a single urine sample or in a 24 hour collection, and at least one identified cystine stone (emitted or surgically removed);
- siblings of cystinuria patients, defined above, with the same genetic mutations, even in the absence of stone identification.

We studied 164 independent patients and their relatives of the International Cystinuria Consortium (ICC) database. These probands were from Italy (91), Spain (50), Israel (12), Belgium (4), Portugal (3), Switzerland (2), England (1),

and Germany (1). Information on genotype or phenotype for some of these patients is available elsewhere.^{2 14 15 20–22 28}

For phenotype–genotype correlation studies two classifications were established, one based on urinary amino acid excretion and the other on the genetic findings.

Classification based on urinary amino acid excretion

Patients were classified as type I, type non-I, mixed, and untyped on the basis of the urinary excretion values of cystine and dibasic amino acids (lysine, arginine, and ornithine) by the obligate heterozygotes. Thus heterozygotes were considered *phenotype non-I* when at least two of the indices (cystine, lysine, arginine, ornithine, or the sum of cystine and the three dibasic amino acids in the urine) were above the 95th centile in controls; they were considered *phenotype I* when these indices were within the control range.

Type I

Both parents showed a normal urine amino acid pattern (heterozygotes with excretion values within the control range—that is, phenotype I).

Type non-I

Urinary excretion of both parents was above controls (that is, phenotype non-I heterozygotes). In a few cases, the probands had a urinary amino acid profile similar to the parent transmitting the disease and within the upper range of the non-I heterozygote phenotype. In these cases, when the other parent showed a normal urinary excretion phenotype, the probands were considered to be heterozygotes with non-I cystinuria.

Mixed

Urinary excretion was above the control values in one of the parents (phenotype non-I) and normal in the other (phenotype I).

Untyped

Urinary excretion values for one or both parents were not available or were of doubtful classification (that is, inconsistent classification of members of the same family).²¹

Using these criteria, the 164 studied probands were classified as 37 type I, 46 type non-I, 14 mixed, and 67 untyped (table 1).

Table 1 Cystinuria type and genetic frequencies of the probands

Genotype	Cystinuria type					Total probands (%)
	I	Non-I	Non-I carriers*	Mixed	Untyped	
AA	29†			2	25†	56 (34.1)
AA(B)				1		1 (0.6)
BB	1	34‡		7	23†	65 (39.6)
B+			3			3 (1.8)
BB(A)				1		1 (0.6)
A?	5			1	5	11 (6.7)
B?	2	7		2§	11	22 (13.3)
??		2			3	5 (3.0)
Total probands (%)	37 (22.6)	43 (26.2)	3 (1.8)	14 (8.5)	67 (40.9)	164 (100)
Total alleles	74	89	28	134		
Explained alleles (%)	67 (90.5)	78 (87.6)	25 (89.3)	112 (83.6)		

*Heterozygote probands with cystine lithiasis.

†Includes one family with two mutations in the same chromosome in addition to the mutation found in the other chromosome.

‡Includes two families with two mutations in the same chromosome in addition to the mutation found in the other chromosome.

§Includes two families with two mutations found in one chromosome and no mutation found in the other chromosome.

For patients AA(B) and BB(A), two alleles causing the disease and two explained alleles in each case have been taking into account in the calculations.

A, allele *SLC3A1* mutated; B, allele *SLC7A9* mutated; +, normal allele; ?, unknown allele.

Table 2 New *SLC3A1* and *SLC7A9* mutations

Type	Nucleotide change	Amino acid change/predicted consequence	Exon or intron	Detection method	
<i>SLC3A1</i> new mutations					
Missense	c.266T→C	L89P	Exon 1	SSCP	
	c.368T→G	M123R	Exon 1	DHPLC	
	c.371A→G	Y124C	Exon 1	DHPLC	
	c.388T→C	S130P	Exon 1	DHPLC/SSCP	
	c.410A→G	D137G	Exon 1	DHPLC	
	c.446T→A	L149Q	Exon 2	DHPLC	
	c.566C→T	T189M	Exon 2	SSCP	
	c.1043A→C	H348P	Exon 6	DHPLC	
	c.1230C→A	N410K	Exon 7	DHPLC	
	c.1322C→G	P441R	Exon 7	SSCP	
	c.1364C→T	S455L	Exon 8	DHPLC	
	c.1366C→T	R456C	Exon 8	DHPLC/SSCP	
	c.1367G→A	R456H	Exon 8	SSCP	
	c.1520C→T*	S507L	Exon 9	SSCP	
	c.1702G→A	G568S	Exon 10	DHPLC	
	c.1998C→G	C666W	Exon 10	DHPLC	
	Nonsense	c.1865T→G*	L622X	Exon 10	SSCP
		c.1035G→A	Aberrant splicing†	Exon 6	SSCP
	Silent	c.1012-23C→G	D338_Y378delfsX5	Intron 5	SSCP and RT-PCR
	Splice	c.664delT	W222fsX3	Exon 3	SSCP
Frameshift	c.1221dupT	P408fsX18	Exon 7	SSCP	
	c.1699_1700delAG	R567fsX8	Exon 10	SSCP	
In frame deletion	c.1966_1968delCTT	L656del	Exon 10	SSCP	
Large rearrangements	c.892_1332del	E298_M444del	Intron 4-7	PCR	
<i>SLC7A9</i> new mutations					
Missense	c.184G→A	V62M	Exon 3	DHPLC	
	c.562G→A	V188M	Exon 5	DHPLC	
	c.695A→G	Y232C	Exon 6	SSCP	
	c.847C→T	L283F	Exon 8	DHPLC	
	c.947C→T	A316V	Exon 9	DHPLC	
	Silent	c.171C→T	Aberrant splicing‡	Exon 3	SSCP
		c.235+3_+293del	L30fsX10	Intron 3	RT-PCR
	Splice	c.586C→T	L196_G202delfsX5	Exon 5	SSCP and RT-PCR
		c.604+2T→C	L160X	Intron 5	SSCP
	Frameshift	c.605-3C→A	I203fsX27	Intron 5	DHPLC, SSCP
c.1399+1G→T		K447fsX22§	Intron 12	DHPLC	
c.1400-3C→G		K447fsX22§	Intron 12	DHPLC	
c.151delT		S51fsX38	Exon 3	DHPLC	
Large rearrangements	c.1265_1266delTG	L424fsX62	Exon 12	DHPLC	
	c.1224+4166_1399+119dup(4972)	K386fsX78	Exon 12	Multiplex	
	c.1224+4166_1399+119del(4972)	V409fsX9	Exon 12	Multiplex	

In addition to the 40 listed new mutations, a deletion of the 3' end of *SLC3A1* has been identified in one chromosome of one patient, but the limits of this deletion have not been studied.

When RT-PCR is indicated in the detection method, the effect of the mutation has been determined at the mRNA.

*These two mutations are located in the same chromosome.

†Mutation eliminates an SF2/ASF exonic splicing enhancer motif.

‡Mutation may create an alternative donor splice site 64 bp upstream of the consensus donor site, resulting in the deletion of 22 amino acid residues (N58_G79del22).

§The same protein product prediction but different genomic change.

bp, base pair; RT-PCR, reverse transcriptase polymerase chain reaction.

Classification based on the genetic findings

Patients were classified as type A, type B, type AB, and type ?? on the basis of the genetic findings.

Type A

Probands have mutations in *SLC3A1* (A? for one mutated allele identified and AA for two mutated alleles identified).

Type B

Probands have mutations in *SLC7A9* (B? for one mutated allele identified and, BB and B+ for two mutated alleles identified).

Type AB

Individuals have one mutation in *SLC3A1* and one in *SLC7A9*. Probands with more than two mutated alleles were classified as AA(B) or BB(A), depending on the distribution of mutations in the two genes.²⁸

Type ??

No mutations are found in the probands.

Mutational analysis

Probands and their relatives have been analysed for mutations in *SLC3A1*, *SLC7A9*, or in both genes. Mutations in this cohort of patients have been reported previously.^{2 6 8 14 20-22} Genomic DNA or total RNA was isolated from peripheral blood lymphocytes following standard protocols. Patients with type I or type non-I cystinuria were initially screened for mutations in *SLC3A1* and *SLC7A9*, respectively. Patients not fully genotyped were also analysed for the other cystinuria gene. Untyped patients were analysed for both genes as well. Mutational screening of the whole coding region, all intron/exon boundaries, and some intron sequences (on average 50 base pairs (bp) on each side of the exons) was carried out by polymerase chain reaction (PCR), reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) (when RNA samples were available), single strand conformation polymorphism

Table 3 Type of mutations distributed by allele in families with mixed cystinuria

Genotype	Families	Alleles	
		Phenotype I	Phenotype non-I
		Explained	Explained
AA	2	2	2
AA(B)*	1	1	1
BB	7	7	7
BB(A)†	1	1	1
A?	1	1	0
B?	2	0	2
Total	14	12	13

The urine phenotype of the obligate heterozygotes was used to classify the phenotype associated to each allele.
 *The proband carries three mutations, two mutations A (one in each *SLC3A1* allele) and one mutation B in one of the *SLC7A9* alleles (see fig 2B).
 †The proband carries three mutations, two mutations B (one in each *SLC7A9* allele) and one mutation A in one of the *SLC3A1* alleles (see fig 2A).

(SSCP), or Southern blot as described elsewhere,^{14, 21} and by denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) or semiquantitative multiplex PCR as described below. Direct sequencing was also carried out in all the individuals analysed to confirm the results obtained, to identify the mutated position in the gene, and to screen for mutations not detectable by these techniques. Southern blotting or semiquantitative multiplex PCR was used in patients with no mutations or only one mutation found with the other techniques, including direct sequencing. All the mutations described were checked on 100 control chromosomes to discard polymorphisms. Mutations listed or newly described here follow the nomenclature of the Human Genome Variation Society (www.genomic.unimelb.edu.au/mdi/mutnomen/). All new mutations have been introduced in the HGMD database (www.hgmd.org/).

DHPLC analysis

Samples for DHPLC analysis were amplified in a final reaction volume of 50 µl, using 100 ng genomic DNA, 10× PCR buffer with 15 mM MgCl₂ (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), 200 µM dNTPs, 0.30 µM primer, and 1.5 units AmpliTaq Gold™ (Applied Biosystems). PCR cycling conditions consisted of an initial denaturation step at 95°C for 12 minutes followed by 35 cycles at 94°C for 30 seconds; the annealing temperature range was 55–57°C for 30 seconds, followed by 72°C for 30 seconds, and ending with a final elongation step at 72°C for eight minutes. DHPLC analysis was carried out on an automated DHPLC instrument (Transgenomic Inc, Santa Clara, California, USA).

Heteroduplex formation was induced by mixing an aliquot of unpurified PCR amplicon from patients and wild type sample in a 1:1 ratio. The mixed samples were heated to 95°C for five minutes and cooled slowly over 25 minutes to 35°C. Usually, 7–10 µl of reannealed DNA duplexes were injected

Table 5 Distribution of alleles per genotype

Probands	Alleles	
	Type A	Type B
AA	112	–
AA(B)*	2	–
BB	–	130
B+	–	3
BB(A)*	–	2
A?	11	–
B?	–	22
Total	125	157
% of total alleles	38.5	48.3
% of identified alleles	44.3	55.7

*In probands with mutations in both genes only the two mutated allele in the same gene have been used for calculations.

onto the column and then run at predetermined temperatures on the WAVE® system. The resolution temperature (Tr) for each of the 12 PCR amplicons of genomic DNA from *SLC3A1* and 13 from *SLC7A9* analysed was predicted by using WaveMaker software (Transgenomic). The primers used for PCR amplification and DHPLC conditions are reported in table 1s in Supplementary Material, available online at the JMG website (www.jmg.com/supplemental). Fragments that showed variation in retention time or chromatogram shape from that of an unaffected control amplicon were then sequenced following the Big Dye Terminator protocol (PE-ABI, Foster City, California, USA) and analysed on an ABI 3100 DNA sequencer (Applied Biosystems).

Semiquantitative multiplex PCR analysis in *SLC7A9*

We undertook multiplex analysis for *SLC7A9* in 13 patients from independent families in which no mutations or only one mutation had been found with the other techniques. This

Table 4 Distribution of alleles per phenotype

Probands	Alleles					
	Phenotype I			Phenotype non-I		
	Explained	Total	%	Explained	Total	%
I	67	74	90.5	–	–	–
non-I	–	–	–	78	89	87.6
Mixed	12	14	85.7	13	14	92.9
Total	79	88	89.7	91	103	88.3

Table 6 Urine excretion of cystine and dibasic amino acids in heterozygotes bearing the *SLC3A1* mutation dupE5-E9

dupE5-E9 heterozygote	Phenotype	Urine amino acid concentrations ($\mu\text{mol/g creatinine}$)				
		Cystine	Lysine	Arginine	Ornithine	Sum
F14-C119	non-I	57	481	318*	94*	950*
F77-SR	non-I	218*	1090*	33	30	1371*
F79-A145	non-I	167*	1595*	43	100*	1905*
F79-A148	non-I	998*	1762*	12	133*	2905*
F106-D18	I	53	150	<1	<1	253
F106-D20	untyped	NA	345	<1	35	-
Type A heterozygote (n)†	I (47)	70 (7)	171 (18)	24 (4)	26 (4)	300 (23)
[5th, 95th centile]		[21, 160]	[28, 359]	[0, 51]	[5, 62]	[100, 555]
(+/-) (n)†	Control (83)	52 (3)	181 (16)	17 (3)	28 (3)	277 (19)
[5th, 95th centile]		[23, 109]	[35, 499]	[0, 48]	[7, 70]	[93, 620]

Type A heterozygotes are those carrying mutations in *SLC3A1* other than dupE5-E9. Controls are members of the fully genotyped ICC cystinuria families not carrying the identified type A or type B mutations.

*Values above the 95th centile in controls.

†These values (mean (SEM)) have been reported previously.²⁹

F, family; n, number of individuals; NA, not analysed; <1, below the level of detection.

method was used previously for the analysis of large rearrangements in *SLC3A1*.²⁰ Primer pairs for each of the 13 exons of *SLC7A9* were used (table 2s in Supplementary Material). One primer of each pair was labelled with FAM fluorescence (Invitrogen, San Diego, California, USA). As an external double dose control, a primer pair amplifying exon 5 from *DSCR1* (Down syndrome critical region gene 1) in chromosome 21 was added, together with the other set of 13 primer pairs. In a final volume of 20 μl , we mixed 100 ng DNA, 0.2 mM dNTPs, 1.5 U Taq (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), 0.01% gelatine, PCR buffer with 1.5 mM MgCl_2 , and a mix of primers. The reaction started with an initial denaturation of five minutes at 94°C, followed by 23 cycles of 94°C for 25 seconds, 58°C for 25 seconds, and 72°C 25 seconds. A final extension of seven minutes at 72°C was used. The PCR products were loaded on a 48-well acrylamide gel together with an external fluorescent size standard (TAMRA-Gs500) and run in an ABI PRISM 377 DNA sequencer (Applied Biosystems). The results were processed by GENESCAN™ software (fig 1s in Supplementary Material). To confirm the duplication of exon 12 in family 73, we amplified a 518 bp fragment (only in the carriers) with 5 pmol of primers F11 (5'-ATGATTGAAATTGGAGGAGGG-3') and R10d (5'-CCTAATAAGCAGTCTACAAGA-3'), following standard methods, for 36 cycles of 94°C 30 seconds, 58°C 30 seconds, 74°C 30 seconds, plus five minutes at 74°C. To confirm the deletion in family 94, we amplified a 251 bp fragment using 5 pmol of primer F13 (5'-CAGACCATACTGTAAAGGACC -3') and R13 (5'-CGTGGGCATGTGTCTCTCT -3'), following standard methods, for 36 cycles, 10 cycles of 94°C 30 seconds, 60°C 30 seconds, 74°C 30 seconds, 26 cycles of 90°C 30 seconds, 59°C 30 seconds, 74°C 30 seconds, plus seven minutes at 74°C.

RESULTS

Identification of 40 new cystinuria specific mutations in *SLC3A1* and *SLC7A9*

Mutational analysis was carried out exhaustively in 164 families that transmit cystinuria and which are included in the ICC database. We identified 24 new mutations in *SLC3A1* and 16 in *SLC7A9* (table 2). None of these mutations was identified in 100 control chromosomes tested (data not shown). They included five frameshift mutations (three in *SLC3A1* and two in *SLC7A9*) and one nonsense mutation in *SLC3A1* which produce early stop codons; seven splice mutations (one in *SLC3A1* and six in *SLC7A9*); 22 changes that affect single amino acid residues (16 and five missense mutations in *SLC3A1* and *SLC7A9*, respectively, and one

deletion of a single amino acid residue in *SLC3A1*); two silent changes affecting the coding region of the gene (one in *SLC3A1* and one in *SLC7A9*); and three large rearrangements (one in *SLC3A1* and two in *SLC7A9*).

The two large *SLC7A9* rearrangements were detected in two patients by semiquantitative multiplex PCR analysis: a 5 kb deletion (c.1224+4166_c.1399+119del) and a 5 kb duplication (c.1224+4166_c.1399+119dup), both affecting exon 12, originated by the crossing over of two 195 bp sequences which differ by one nucleotide and are separated by 4778 bp (fig 2s in Supplementary Material). The abnormal multiplex exon pattern in these two patients is shown in fig 3s in Supplementary Material. These two mutations were confirmed by PCR primers which specifically amplify the mutated allele in both cases (fig 2s in Supplementary Material). The protein product expected from the 5 kb duplication would have a frameshift from residue K386 with the addition of 78 missense residues before the first stop codon (p.K386fsX78). The 5 kb deletion affects intron 11 and the first 100 bp of the 175 bp of exon 12, and most probably results in the skipping of exon 12, because the donor splice site is deleted and there are no potential donor sites around. The protein product of this deletion would have a frameshift from residue V409, adding nine missense residues before the first stop codon (p.V409fsX9), and lacking the last transmembrane domains XI and XII. However, RNA was not available from these patients to confirm the predicted changes.

Two of the splice mutations were localised outside the splice consensus sequences, and were checked to produce aberrant splicing by RT-PCR:

- 586C→T in *SLC7A9* is a silent exonic mutation that creates alternative donor site 20 bp upstream of the consensus donor site. The resultant RNA (r.585_604del) is expected to produce a frameshift from residue L196 of b⁰⁺AT (p.L196_G202delfsX5) (data not shown);
- c.1012-23C→G in *SLC3A1* localises in intron 5 and produces the skipping of exon 6 (r.1012_1136del), which is expected to result in a frameshift from residue D338 of rBAT (p.D338_Y378delfsX5) (data not shown).

The rest of the new splice mutations affect the consensus donor or acceptor splice site sequences, thereby indicating aberrant splicing.

The two silent mutations located in exonic regions (that is, no amino acid change) are predicted to create splicing defects, but it was not possible to check this by RT-PCR:

Table 7 Urine excretion of cystine and dibasic amino acids in heterozygotes carrying the type B mutations (*SLC7A9*) associated with phenotype I

	Phenotype	n	Urine amino acid concentrations (µmol/g creatinine)				
			Cystine	Lysine	Arginine	Ornithine	Sum
<i>Common mutations</i>							
A182T/††	I	6	82 (16)	151 (52)	31 (7)	21 (6)	285 (57)
	Non-I	5	373 (135)*	1865 (1022)*	151 (60)*	138 (50)*	2527 (1090)*
T123M/+	I	2	29, 229*	271, 140	8, 25	19, 10	327, 404
	Non-I	2	NA	2596*, 734*	42, 17	176*, 53	NA
V170M/+	I	4	112 (16)*	254 (54)	6 (2)	18 (5)	391 (64)
	Non-I	12	441 (87)*	1471 (391)*	46 (14)	129 (28)*	2087 (475)*
c.614dupA/‡‡	I	1	260*	122	19	25	426
	Non-I	18	607 (95)*	2249 (260)*	90 (14)*	220 (31)*	3165 (342)*
G105R/+	I	1	26	456	35	13	530
	Non-I	31	524 (75)*	1685 (181)*	69 (13)*	184 (32)*	2461 (249)*
R333W/+	Non-I	19	634 (139)*	2371 (330)*	137 (74)*	163 (28)*	3304 (482)*
<i>Uncommon mutations</i>							
G63R/+	I	2	60, 59	330, 322	11, 14	41, 38	442, 433
	Non-I	1	202*	504*	25	19	750*
A126T/+	I	1	140*	455	ND	8	603
	Non-I	2	308*, 338*	1144*, 1373*	ND, 102*	0, 237*	1452*, 2050*
G195R/+	I	1	116*	428	ND	19	563
	Non-I	1	439*	1948*	63*	247*	2697*
Y232C/+	I	1	108	125	11	42	286
W69X/+	I	1	51	249	55*	22	377
Heterozygotes B+ [5th, 95th centile]	Non-I	127	534 (37) [138, 1348]	1930 (113) [498, 4492]	76 (13) [0, 337]	198 (20) [21, 522]	2758 (154) [807, 6081]

Values are mean (SEM) µmol/g creatinine or individual values. R333W is a common mutation with phenotype non-I in all the heterozygotes studied. Urine excretion of amino acids for heterozygotes with one mutated *SLC7A9* allele (B+) with phenotype non-I is also shown. Urine amino acid levels in controls are shown in table 6. *Individual or mean values greater than 95th centile in controls (see table 6). †A182T is not associated with mutation A354T in these alleles. ‡c.614dupA is the present nomenclature for mutation c.800-801insA. NA, not analysed; ND, not detectable.

- c.171C→T in *SLC7A9* may create an alternative donor splice site 64 bp upstream of the consensus donor site;
- c.1035G→A in *SLC3A1* localizes in a putative exonic splicing enhancer (ESE) for SF2/ASF with a score prediction of 2.36, while the mutation reduces the ESE prediction to 0.44 (that is, below threshold = 1.96), suggesting aberrant splicing.³⁰

In the ICC cohort of patients M467T is the most common *SLC3A1* mutation, accounting for 26.4% of the total type A alleles, and together with T216M (6.4%), DupE5-E9 (4.0%), c.163delC (4.0%), R270X (4.0%), and c.765+1G→T (3.2%) represents 48.0% of total type A alleles (table 3s in

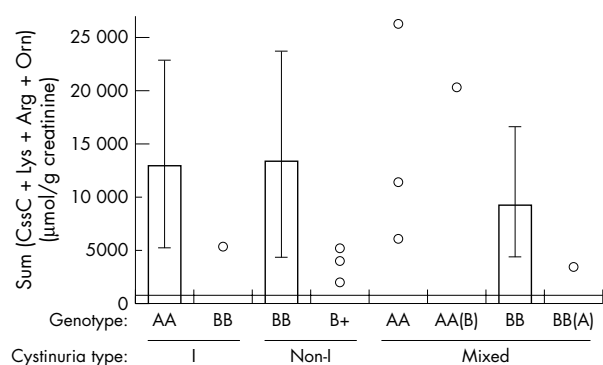


Figure 1 Sum of the urine of cystine and dibasic amino acids in patients with cystinuria classified by genotype and phenotype. Average (histograms) or individual data (dots), expressed as µmol/g creatinine, correspond to the sum of the urine levels of cystine and dibasic amino acids shown in table 8. Vertical lines represent the 5th and 95th centile of the values of the corresponding group. Horizontal line = 95th centile in the control group (detailed in table 6).

Supplementary Material). For *SLC7A9* the most common alleles are: G105R (27.4%), R333W (12.1%), V170M (11.5%) (17 alleles in the Libyan-Jewish population and one in the Italian population), c.614dupA (the Human Genome Variation Society nomenclature for mutation c.800-801insA) (7.0%) (eight alleles from Spain, two from Italy, and one from England), A182T (5.1%), T123M (3.8%) and c.605-3C→A (2.5%), which account for 69.4% of total type B alleles. Other *SLC3A1* or *SLC7A9* mutations were identified in three or fewer independent alleles.

The new mutations, together with those previously reported by the ICC (table 3s in Supplementary Material) and by others,^{15-19, 23-27} make a total of 103 and 66 mutations identified in *SLC3A1* and *SLC7A9*, respectively: 28 frameshift (14 in *SLC3A1* and 14 in *SLC7A9*), seven nonsense (five in *SLC3A1* and two in *SLC7A9*), 18 splice (seven in *SLC3A1* and 11 in *SLC7A9*), 89 missense (59 in *SLC3A1* and 30 in *SLC7A9*), two silent (one in *SLC3A1* and one in *SLC7A9*), five deletions or insertions of a single amino acid residue (one in *SLC3A1* and four in *SLC7A9*), 18 large rearrangements (14 in *SLC3A1* and four in *SLC7A9*), and two cystinuria specific sequence variants in the promoter region of *SLC3A1*.

Distribution of cystinuria alleles per phenotype and genotype

The 164 cystinuria probands studied were classified on the basis of the urinary excretion of cystine and dibasic amino acids in obligate heterozygotes (urine phenotype) (see Methods) and also following the genetic classification proposed by Dello Stroligo *et al*²⁸ (type A, mutations in *SLC3A1*; type B, mutations in *SLC7A9*) (table 1). Potentially, these probands represent 325 cystinuria independent alleles (three probands were classified as non-I cystinuria heterozygotes, see below). In all, 282 alleles were characterised (that is, 86.8%). Thus 13.2% of the potential alleles were not

Table 8 Urine amino acid levels in patients classified by genotype and type of cystinuria

Genotype	Cystinuria type	n	Urine amino acid concentrations ($\mu\text{mol/g}$ creatinine)			
			Cystine	Lysine	Arginine	Ornithine
AA	I	34	1655 [647, 3404]	6577 [2651, 11635]	3144 [226, 8373]	1743 [587, 3441]
AA	Mixed	3	782, 2117, 5556	3308, 5715, 11418	1234, 2817, 7025	718, 1636, 1918
AA(B)	Mixed	1†	2569	9836	2952	5172
BB	I	1	2692	2280	111	304
BB	Non-I	37	1623 [498, 3304]	6510 [1717, 14670]	3447 [499, 6151]	2198 [295, 4766]
B+	Non-I carriers	3	257*, 441*, 801	1638*, 2450, 3873	23*, 123*, 145*	43*, 274*, 285*
BB	Mixed	11	1824 [431, 3181]	4581 [1573, 8723]	1540 [211, 3506]	1329 [470, 2449]
BB(A)	Mixed	1	425	3270	489	603

The mean of the amino acid levels for each group is indicated, with the exception of categories with less than four patients, where individual data are shown. When applicable, the 5th and 95th centile limits are shown in square brackets.

*Data below the 5th centile of values in individuals BB with type non-I cystinuria.

†A sister of this patient has the same genotype and she is in dialysis, and therefore urine amino acid levels are not available. Genotypes are as described in the legend to table 1.

n, number of patients.

identified. The alleles explained were 90.5% in type I probands, 87.6% in non-I, 89.3% in mixed, and 83.6% in untyped. In 126 probands (76.8%) we identified two mutations, in 33 (20.1%) one mutation, and in five (3.0%) no mutations. Of the fully explained probands, 56 (34.1%) and 68 (41.5%) carry two mutations in *SLC3A1* (probands AA) and *SLC7A9* (probands BB and B+) respectively.

Table 3 describes the type of mutation identified in each allele of the 14 mixed cystinuria probands, which potentially represent 14 phenotype I and 14 phenotype non-I alleles. This

table shows that all the possible genotypes in cystinuria are found in mixed families, BB being the most representative genotype.

Data in tables 1 and 3 allow calculation of the number of explained alleles classified by phenotype and genotype (tables 4 and 5): 89.7% and 88.3% of the phenotype I and non-I alleles have been explained, respectively. Alleles identified as type A and type B were 125 and 157, respectively. This represents 44.3% (type A) and 55.7% (type B) of the alleles identified.

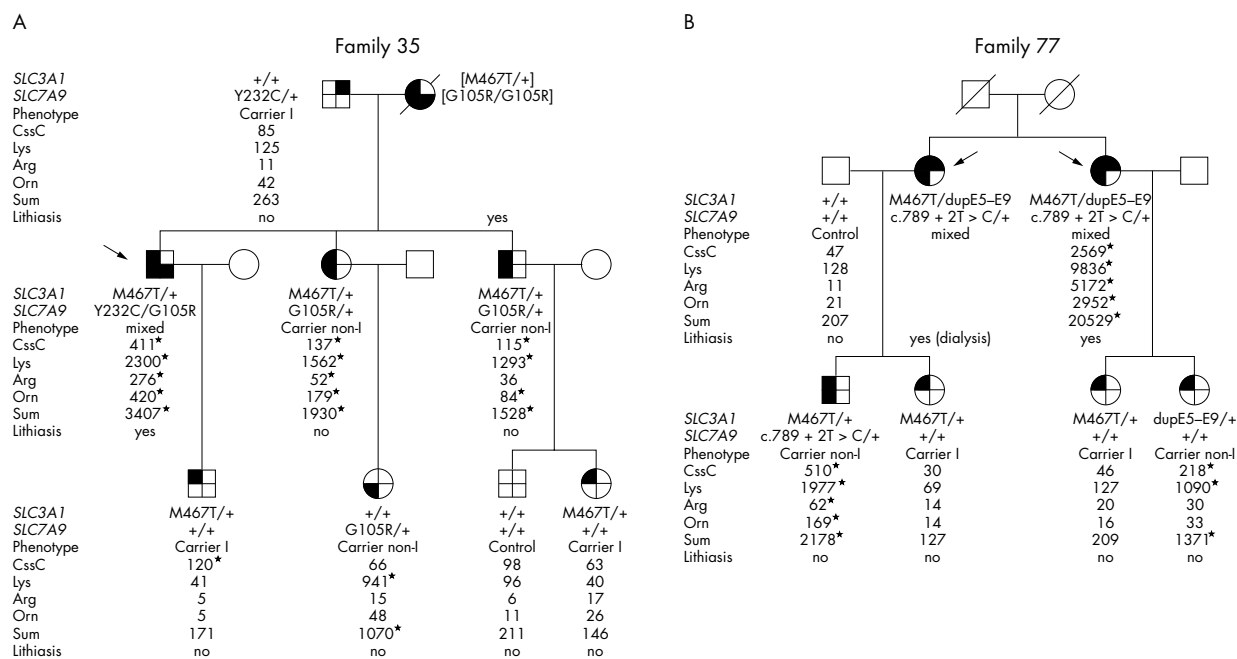


Figure 2 Pedigrees of families with patients that carry mutations in *SLC3A1* and *SLC7A9*. (A) Pedigree of patient BB(A) (family 35). The probands (arrow) have two mutated alleles in *SLC7A9* (G105R/Y232C) (type B mutations) and one in *SLC3A1* (M467T/+) (type A mutation), and present cystine calculi (lithiasis). Double heterozygotes carrying G105R/+ and M467T/+ had greater amino acid excretion in the urine than single carriers (G105R/+ or M467T/+), indicating an impact of digenic inheritance on the urine phenotype. (B) Pedigree of patients AA(B) (family 77). The two patients (arrows) within the family carry two mutated alleles in *SLC3A1* (M467T/dupE5-E9) (type A mutations) and one mutation in *SLC7A9* (c.789+2T→C) (type B mutation) and have cystine calculi (lithiasis). One of the patients is on dialysis as indicated. The other had amino acid excretion values in urine that were above the 89th centile values in patients AA. Again, this indicates that digenic inheritance contributes to the urine phenotype. None of the double carriers in either family had lithiasis. Urine amino acid excretion values for cystine (CssC), lysine (Lys), arginine (Arg), ornithine (Orn), and the sum of the four amino acids are expressed in $\mu\text{mol/g}$ creatinine. To facilitate interpretation, symbols are divided in four sectors. The upper and lower ones represent *SLC3A1* and *SLC7A9* alleles respectively. When mutated the sectors are black. *Values above the 95th centile of corresponding amino acid urine values in controls (table 6).

Genotype–phenotype correlation

Most type A alleles segregate with cystinuria type I, but type A mutations explained phenotype non-I in obligate heterozygotes in three mixed cystinuria families (tables 1 and 3). To our knowledge this is the first description of *SLC3A1* mutations with phenotype non-I in heterozygotes. Type B alleles segregated mainly with phenotype non-I (tables 1 and 3). However, in agreement with previous reports,^{24, 28} *SLC7A9* mutations also segregated with phenotype I in heterozygotes. Thus one type I proband carries two type B mutations (BB), and two other type I probands carry one type B mutation (B?) (table 1). Moreover, the phenotype I allele in eight mixed cystinuria probands was explained by type B mutations (seven BB and one BB(A) probands; table 3).

SLC3A1 dupE5-E9 show phenotype non-I in most of the heterozygotes

Recently, Schmidt *et al.*²⁷ described a cystinuria specific *SLC3A1* rearrangement (c.(891+1524_1618–1600)dup; that is, duplication of exons 5 to 9; dupE5-E9) that results in the in frame duplication of amino acid residues E298 to D539 of the rBAT protein (p.E298_D539dup) as demonstrated by our own RNA studies (not shown) and by Schmidt *et al.*²⁷ Five probands of the ICC database carry this duplication. Four are compound heterozygotes with *SLC3A1* mutations (M467T, Spanish family 79; R452W, Spanish family 14; c.765+1G→T; Spanish family 92; c.1749delA, Belgian family 106). Two patients in the fifth family (Italian family 77) are compound heterozygotes with *SLC3A1* mutations dupE5-E9 and M467T, and also carry the *SLC7A9* mutation c.789+2T→C in one allele (fig 2B). Amino acid levels in urine for six single dupE5-E9 carriers of families were available (table 6). Interestingly, four of these carriers (F14-C119, F77-SR, F79-A145, and F79-A148) showed excretion of cystine and dibasic amino acids within the range of phenotype non-I heterozygotes. In contrast, carrier F106-D18 showed amino acid levels in urine within the control range like most of *SLC3A1* heterozygotes. Cystine in urine was not analysed in the other carrier in this family but the urine excretion of the other amino acids was within the control range, indicating phenotype I. To our knowledge dupE5-E9 is the first *SLC3A1* mutation that shows phenotype non-I in heterozygotes.

SLC7A9 mutations that show phenotype I in heterozygotes

SLC7A9 mutations with phenotype I in heterozygotes are shown in table 7. A182T, G105R, V170M, and c.614dupA are common *SLC7A9* mutations (table 3s in Supplementary Material). Six of the 11 A182T carriers showed phenotype I as the average urine levels of cystine, lysine, and the sum of the four amino acids were below the fifth centile of values in heterozygotes B+ with phenotype non-I (table 7). In contrast, the other five A182T carriers had amino acid levels in the urine above the 95th centile in controls (phenotype non-I) and within the range of values for B+ heterozygotes with phenotype non-I. The proportion of heterozygotes with phenotype I carrying the other common *SLC7A9* mutations was variable: T123M (two of four), V170M (four of 16), c.614dupA (one of 19), and G105R (one of 32). In contrast, carriers of the common and severe mutation R333W²¹ showed phenotype non-I in all cases. Moreover we describe carriers of six uncommon *SLC7A9* mutations that also show phenotype I (G63R, A126T, G195R, Y232C, and W69X) (table 7). Interestingly, in some of the *SLC7A9* heterozygotes with phenotype I, urine levels of cystine but not of dibasic amino acids were above than 95th centile of control values and within the lower range of values of B+ heterozygotes (phenotype non-I). All phenotype I alleles with common or uncommon *SLC7A9* mutations belong to mixed (and

untyped) families except for family F112, which transmit type I cystinuria (the proband is a G105R/T123M compound heterozygote).

Urine amino acid excretion in patients with cystinuria classified by genotype and phenotype

Table 8 shows the excretion of cystine and dibasic amino acids in urine of patients in relation to their allele genotype (A or B) and their cystinuria type. Three groups of patients were numerous enough for statistical comparisons: patients AA with type I (n = 34), patients BB with type non-I (n = 37), and patients BB with mixed type (n = 11). The average urine levels of cystine and the three dibasic amino acids, as well as the 5th and 95th centile of these values, were very similar for patients AA with type I and BB with type non-I. This is shown graphically for the sum of the urine excretion of the four amino acids in fig 1. The average and the 95th centile of urine excretion of lysine, arginine, and ornithine, and the sum of the four amino acids were lower in patients BB with mixed type than in patients AA with type I and patients BB with type non-I. Similarly, patients BB with type I cystinuria showed urine excretion values for dibasic amino acids within the lower limit of excretion values in patients BB with type non-I and AA with type I. In contrast, urine cystine levels were very similar in all these groups. This probably reflects the fact that most of the cystinuria patients reached the limit of solubility of cystine in urine (300 mg/l or 1.2 mM),³¹ and this resulted in an underestimation of this amino acid in the urine when the sample was not previously diluted to dissolve cystine microcrystals. Indeed, the 95th centile of cystine levels in urine in these four groups of patients (up to ~3400 μmol/g creatinine) represents 3.4 mM, assuming 1 g creatinine/litre of urine.

Three patients with cystine urolithiasis were classified as heterozygotes for *SLC7A9* mutations (B+) on the basis of their urine amino acid concentrations (table 8, fig 1), which were similar to that of the parent transmitting the mutation (data not shown) and within the range of excretion of heterozygotes B+ with phenotype non-I (table 7). Moreover, these three patients excreted less arginine and ornithine than the fifth centile of patients BB with mixed cystinuria (table 8).

Only three AA patients with mixed cystinuria were identified in the ICC database (table 8, fig 1). The two patients with higher amino acid excretion values are siblings (family 14) and compound heterozygotes (dupE5-E9/R452W), and one of them had very substantial aminoaciduria. The expected severe defect of mutations R452W (that is, a non-conservative amino acid substitution) and dupE5-E9 (the only *SLC3A1* mutation that associated with phenotype non-I in heterozygotes) might contribute to the severe urine phenotype in this patient. The third patient (family 79), who had the lowest amino acid excretion values in urine (within the lower range of patients AA (type I)), is a compound heterozygote (dupE5-E9/M467T). Patient homozygotes for M467T or compound heterozygotes carrying M467T showed lower amino acid excretion values in urine (mean (SEM), μmol/g creatinine, n = 20: 1414 (136) for cystine, 5753 (669) for lysine, 1718 (404) for arginine, 1227 (160) for ornithine, and 9859 (1222) for the sum of the four amino acids) than AA patients without this mutation (n = 33: 2376 (291) for cystine, 9173 (835) for lysine, 3655 (378) for arginine, 3526 (505) for ornithine, and 18 730 (1517) for the sum of the four amino acids). Indeed, three patients homozygous for M467T had amino acid concentrations in urine (sum of the four amino acids: 5613, 6433, and 8113 μmol/g creatinine⁶) that were among the lowest in patients AA. Thus the mild phenotype of M467T might contribute to the low amino acid excretion values in the compound heterozygote dupE5-E9/M467T.

Digenic inheritance causing a partial phenotype in two cystinuria families

Patient BB(A) (family 35; fig 2A) is a compound heterozygote of *SLC7A9* mutations (Y232C/G105R) that also carries the *SLC3A1* mutation M467T. Mutations Y232C and M467T showed phenotype I, whereas G105R showed phenotype non-I in the heterozygotes of this family. Patient BB(A) was then classified as presenting mixed cystinuria. This patient had very low urine amino acid levels, which were similar to the fifth centile of these values in patients BB (type non-I). Two members of this family are double carriers (AB) (G105R/+ for *SLC7A9* and M467T/+ for *SLC3A1*). Digenic cystinuria without urolithiasis is suggested in these two double carriers, as they had higher urinary excretion values than the single heterozygotes (G105R/+ or M467T/+) within the family. Patient AA(B) (family 77; figs 1 and 2B) had very high amino acid concentrations in the urine and at the time of this study her sister was on dialysis. Both carry *SLC3A1* mutations dupE5-E9 and M467T and the *SLC7A9* mutation c.789+2T→C. M467T showed phenotype I, whereas dupE5-E9 showed phenotype non-I in the heterozygotes identified in this family. Patients AA(B) were then classified as having mixed cystinuria. The type B mutation seems to contribute to the severe phenotype in these patients. Thus one of these patients (M467T/dupE5-E9 and c.789+2T→C/+) excreted larger amounts of amino acids than patient M467T/dupE5-E9 (family 79) (compare patient AA(B) and patient AA (mixed) with the lowest aminoaciduria in table 8 and fig 1). In contrast, the mild mutation M467T did not seem to aggravate the urine phenotype of the double carrier in family 77 (M467T/+ and c.2789+2T→C/+). Thus the aminoaciduria in this double carrier was lower than that of two single c.782+2T→C heterozygotes (family 58), which had the greatest aminoaciduria (the sum of the urine levels of the four amino acids was 8112 and 8307 mmol/g creatinine) among the heterozygotes B+ in our database.

DISCUSSION

We describe 40 new cystinuria mutations (24 in *SLC3A1* and 16 in *SLC7A9*) which bring the total number of cystinuria specific mutations identified to 103 in *SLC3A1* and 66 in *SLC7A9*. The mutations include missense, nonsense, splicing defects, frameshift, deletions and insertions of a single amino acid residue, and large rearrangements. To our knowledge, the present study represents the largest percentage of cystinuria alleles explained in any large cohort of patients reported (86.8%; 282 of 325 alleles). In a recent study,²⁷ only 64.7% of the alleles were explained (75 of 116 alleles). In the ICC database, the coverage of identified alleles is similar for probands with different cystinuria types (on average 89.3%). The percentage of explained alleles in untyped patients was lower (83.6%), which might be attributed to the presence of *SLC7A9* carriers with cystine urolithiasis.

The greater number of characterised alleles allows a general summary of the cystinuria mutations in the ICC database, which includes patients of mainly Italian, Spanish, or Libyan-Jewish origin. Type A (*SLC3A1*) and type B (*SLC7A9*) mutations accounted for 44.3% and 55.7% of the explained alleles, respectively. To our knowledge, these are the first relative frequencies of type A and type B alleles to be reported, but they must be viewed with caution. The ICC database is not a registry, as we did not collect all possible cases.²⁸ The ICC was very active in collecting phenotype non-I cystinuria cases in order to identify the *SLC7A9* gene,^{2 10 11} and the prevalence of type B mutations might be overestimated. M467T and G105R were the most common type A and type B mutations (26.4% and 27.4% of each type of alleles, respectively). This is consistent with reports on other smaller cohorts of patients with cystinuria.^{16 23 25} The five most

common type A and type B mutations accounted for 44.8% and 63.1% of the identified alleles of each type (A or B), respectively. Moreover, 55 *SLC3A1* and 45 *SLC7A9* mutations covered the 125 type A and the 157 type B explained alleles, respectively, showing that *SLC3A1* has greater genetic heterogeneity than *SLC7A9* in the ICC database.

The present search for mutations was very careful (SSCP, DHPLC, direct sequencing, and specific search for large rearrangements of *SLC3A1* and *SLC7A9*) and covered the whole coding region and all intron/exon boundaries. The unexplained cystinuria alleles (13.2%) may be the result of mutations in intronic or promoter regions not yet identified in the two known cystinuria genes or they may reflect unidentified genes. Also, *SLC3A1* or *SLC7A9* polymorphisms in combination with cystinuria specific mutations might result in full blown cystinuria, for the following reasons.

First, the promoter region of these genes was not analysed in this study, but a small contribution of mutations in these regions is expected. Indeed, two cystinuria specific sequence variants in the promoter region of *SLC3A1* have been reported,¹⁹ but functional studies should be done to confirm these mutations.

Second, intronic mutations affecting sequences other than the splice-site consensus ones could explain these alleles, but RNA studies would be necessary to assess this.

Third, a third cystinuria gene cannot be discounted but it would be relegated to a very small proportion of patients (no mutations were found in any of the two cystinuria genes in only 3% of the probands), and seems improbable. Co-immunoprecipitation studies and the *SLC7A9* KO model showed that the protein products of *SLC3A1* (rBAT) and *SLC7A9* (b⁰⁺AT) heterodimerise in mouse kidney brush border membranes, but a significant part of rBAT heterodimerises with an unknown light subunit (X).^{12 32} This may also be true in human kidney brush borders.¹² Therefore, the gene coding for X could be a candidate for cystinuria. However, the similar hyperexcretion of amino acids detected in urine of patients AA and BB does not support this hypothesis. If X were coded by a cystinuria gene one would expect a greater degree of aminoaciduria in patients AA than in patients BB—b⁰⁺AT mutations would affect system b⁰⁺ only, whereas rBAT mutations would affect system b⁰⁺ and the transport activity of the rBAT/X heteromeric complex.

Finally, *SLC3A1* or *SLC7A9* polymorphisms in combination with cystinuria specific mutations might result in full blown cystinuria, as has been suggested.³³ Cystinuria association and functional analysis of these polymorphisms are required to demonstrate their contribution to the disease.

Some heterozygotes for the *SLC3A1* mutation dupE5-E9—which results in the duplication of the rBAT fragment E298-D539—presented with phenotype non-I (table 6). All other *SLC3A1* mutations, including very severe ones (for example, c.163delC which produces a frameshift with an early stop codon, eliminating the transmembrane and the extracellular domains of rBAT (p.Q55fsX51); or c.431_2055del, which eliminates 80% of the rBAT residues towards the C-terminus (p.G144_C685del)) showed phenotype I.^{6 18 22 25 34} This indicates that mutation dupE5-E9 has a dominant negative effect on the rBAT/b⁰⁺AT heteromeric complex.

Because 14% of *SLC7A9* heterozygotes showed phenotype I we proposed a classification of cystinuria on the basis of genotype rather than phenotype.²⁸ Rozen and coworkers identified two type I heterozygotes carrying the *SLC7A9* mutations I44T and P261L, respectively.²⁴ Here we report 10 more of these *SLC7A9* mutations. Four showed phenotype I in several carriers (A182T, T123M, G63R, and V170M). Mutations A182T and T123M affect non-conserved amino acid residues in the family of the light subunits of HATs. Moreover, A182T is a mild mutation with aberrant trafficking

to the plasma membrane³⁵ and substantial residual transport activity (60%).²¹ Similarly, A126T and P261L, with a single type I carrier identified, also involve non-conserved amino acid residues. Interestingly, patients BB with mixed or type I cystinuria (that is, with type B heterozygotes with phenotype I in their families) also presented with a mild urine phenotype (table 8 and fig 1). This agrees with the mild urine phenotype reported for patients with mixed cystinuria.³⁶ Seven of the 11 patients BB (mixed) and the patient BB (type I) carry A182T or T123M. The mild amino acid transport defect of these mutations could be the underlying cause of the mild urine phenotype of these patients. In contrast, other mutations with phenotype I in heterozygotes (I44T, G63R, G105R, V170M, G195R, and Y232C) involved fully conserved amino acid residues or resulted in large protein changes (W69X, with b^{0,+}AT truncated after the first transmembrane domain; c.614dupA, a mutation shown by mRNA studies to result in skipping of exons 5 and 6 (r.479_709del), producing a frameshift at residue 160 (p.L160fsX1); data not shown). Moreover, G105R and V170M have little amino acid transport function.²¹ Interestingly, a very small proportion of heterozygotes who carry severe and common mutations like c.614dupA (one of 19 carriers) and G105R (one of 32 carriers) had phenotype I, but one quarter of the V170M heterozygotes manifested phenotype I (all from a Libyan Jewish origin). This indicates that, in addition to the residual functional activity of b^{0,+}AT mutants, other factors (environmental or genetic) contribute to the urine phenotype of carriers of *SLC7A9* mutations.

Only three patients in the ICC database are double compound heterozygotes with mutations in both genes (two patients with mutations M467T and dupE5-E9 (AA), and c.789+2T→C (B), and one patient with mutations Y232C and G105R (BB), and M467T (A)). One patient AA(B) has previously been reported but with no description of the associated urine phenotype.³⁷ The degree of aminoaciduria of these type of patient and their relatives in the ICC database indicates that digenic inheritance in cystinuria has only a partial effect on the phenotype, restricted to a variable impact on the aminoaciduria, for the following reasons.

First, in family 77, the severe aminoaciduria in one of the patients AA(B) indicates that the type B mutation c.789+2T→C, associated with high aminoaciduria in heterozygotes, contributes to the urine phenotype; no information is available from the other patient AA(B) as she is on dialysis.

Second, in family 35, the mild aminoaciduria of patient BB(A) indicates that M467T, associated with mild aminoaciduria in homozygotes and compound heterozygotes, does not contribute to the urine phenotype in the patient, but two double compound heterozygotes in this family (M467T/+, G105R/+; that is, AB) showed greater aminoaciduria than the single heterozygotes within the family, suggesting a contribution of both mutations to the urine phenotype.

Third, none of the individuals AB had cystine urolithiasis. Given that almost 90% of the alleles of the ICC cohort of patients have been identified, and that the frequency of type A and B alleles is similar in this cohort, if digenic inheritance was the rule in cystinuria, we would expect 25% AA patients, 25% BB patients, and 50% AB patients. Furthermore, the few AB individuals identified did not have cystine urolithiasis. This indicates that digenic inheritance, affecting the phenotype, is an exception in cystinuria. However, we cannot discard the possibility that some combinations of mutations A and B produce enough cystine hyperexcretion to cause urolithiasis. In this regard, the urolithiasis activity of individuals B/+, with a low penetrance for cystine urolithiasis (three of 192 genotyped patients; 1.7%), might be aggravated by the addition of the effect of one type A allele.

A working hypothesis on the biogenesis of the rBAT/b^{0,+}AT heterodimer and the urine phenotypes in cystinuria may explain the apparent lack of full digenic inheritance in cystinuria. In the first place, the rBAT protein is produced in excess in the kidney, and therefore an rBAT mutation in heterozygosis (for example, the mouse cystinuria model with the *SLC3A1* mutation D140G³⁸ and all human cystinuria rBAT mutations with the exception of dupE5-E9) does not lead to hyperexcretion of amino acids (phenotype I). Secondly; b^{0,+}AT controls the expression of the functional rBAT/b^{0,+}AT heterodimeric complex—interaction with b^{0,+}AT stabilises rBAT and the excess of rBAT is degraded, as shown in transfected cells.^{35–39} As a result, a half dose of b^{0,+}AT (heterozygotes of severe human *SLC7A9* mutations or of the *SLC7A9* knockout mice³²) results in a significant decrease in the expression of rBAT/b^{0,+}AT heterodimer complex (system b^{0,+}), which causes hyperexcretion of cystine and dibasic amino acids. In this scenario, the lack of a full phenotype because of digenic inheritance indicates that in double heterozygotes (AB), the mutated rBAT, with trafficking defects,^{18–40–41} does not interact with, or does not compromise, the heterodimerisation and trafficking to the plasma membrane of the half dose of wild type b^{0,+}AT with the half dose of wild type rBAT. Thus AB individuals behave as B heterozygotes with a variable degree of aminoaciduria, which could be greater than that of the single heterozygotes within the family, depending on the particular combination of mutations. We are currently studying the hypothesis that the phenotype non-I associated to the *SLC3A1* mutation dupE5-E9 reflects heterodimerisation with b^{0,+}AT, which results in a non-active heteromeric complex.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the families who participated in this study. We also thank L Sánchez for technical help and Tanya Yates for editorial help. This work was supported in part by the Spanish Ministry of Science and Technology (PM99-0172-CO-01/02 and SAF2003-08940-01/02), BIOMED (BMH4 CT98-3514), the Spanish Institut de Salut Carlos III (networks G03/054, C03/07, and C03/08), the Generalitat de Catalunya (2001 SGR00399; 2001 SGR00118), and the Marató de TV3 (98130) to VN and MP, by the Comissionat per a Universitats i Recerca to MP, and by the Ministero Italiano della Salute (Ricerca Corrente 2001) to LZ. MF-L was a recipient of a predoctoral fellowship from the Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica from the Generalitat de Catalunya. MJ-V was supported by the BIOMED BMH4 CT98-3514 and EUGINDAT (LSHM-CT-2003-502852).



Supplementary material: Supplementary figures and tables can be accessed at the JMG website (www.jmg.com/supplemental)

Authors' affiliations

M Font-Llitjós, M Jiménez-Vidal, V Nunes, Centre of Medical and Molecular Genetics (IRO), Hospital Duran i Reynals, Barcelona, Spain
M Jiménez-Vidal, M Palacin, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona
L Bisceglia, M D Perna, L Zelante, Medical Genetics Service, IRCCS-Hospital "CSS", San Giovanni Rotondo, Italy
L de Sanctis, Department of Paediatrics, Regina Margherita Children's Hospital, University of Torino, Italy
F Rousaud, Urology Service Fundació Puigvert, Barcelona

Competing interests: none declared

REFERENCES

- 1 **Palacin M, Goodyer P, Nunes V, Gasparini P.** Cystinuria. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th ed, vol III. New York: McGraw-Hill, 2001:4909–32.
- 2 **Feliubadalo L, Font M, Purroy J, Rousaud F, Estivill X, Nunes V, Golomb E, Centola M, Aksentjevich I, Kreiss Y, Goldman B, Pras M, Kasner DL, Pras E,**

- Gasparini P, Bisceglia L, Beccia E, Gallucci M, de Sanctis L, Ponzone A, Rizzoni GF, Zelante L, Bassi MT, George AL, Palacin M, et al. Non-type I cystinuria caused by mutations in SLC7A9, encoding a subunit (b₀+AT) of rBAT. International Cystinuria Consortium. *Nat Genet* 1999;**23**:52-7.
- 3 **Goodyer PR**, Clow C, Reade T, Girardin C. Prospective analysis and classification of patients with cystinuria identified in a newborn screening program. *J Pediatr* 1993;**122**:568-72.
 - 4 **Bertran J**, Werner A, Moore ML, Stange G, Markovich D, Biber J, Testar X, Zorzano A, Palacin M, Murer H. Expression cloning of a cDNA from rabbit kidney cortex that induces a single transport system for cystine and dibasic and neutral amino acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;**89**:5601-5.
 - 5 **Lee WS**, Wells RG, Sabbag RV, Mohandas TK, Hediger MA. Cloning and chromosomal localization of a human kidney cDNA involved in cystine, dibasic, and neutral amino acid transport. *J Clin Invest* 1993;**91**:1959-63.
 - 6 **Calonge MJ**, Gasparini P, Chillaron J, Chillon M, Gallucci M, Rousaud F, Zelante L, Testar X, Dallapiccola B, Di Silverio F, Barcelo P, Estivill X, Zorzano A, Nunes V, Palacin M. Cystinuria caused by mutations in rBAT, a gene involved in the transport of cystine. *Nat Genet* 1994;**6**:420-5.
 - 7 **Calonge MJ**, Nadal M, Calvano S, Testar X, Zelante L, Zorzano A, Estivill X, Gasparini P, Palacin M, Nunes V. Assignment of the gene responsible for cystinuria (rBAT) and of markers D2S119 and D2S177 to 2p16 by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 1995;**95**:633-6.
 - 8 **Gasparini P**, Calonge MJ, Bisceglia L, Purroy J, Dianzani I, Notarangelo A, Rousaud F, Gallucci M, Testar X, Ponzone A, et al. Molecular genetics of cystinuria: identification of four new mutations and seven polymorphisms, and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 1995;**57**:781-8.
 - 9 **Wartenfeld R**, Golomb E, Katz G, Bale SJ, Goldman B, Pras M, Kasner DL, Pras E. Molecular analysis of cystinuria in Libyan Jews: exclusion of the SLC3A1 gene and mapping of a new locus on 19q. *Am J Hum Genet* 1997;**60**:617-24.
 - 10 **Bisceglia L**, Calonge MJ, Totaro A, Feliubadalo L, Melchionda S, Garcia J, Testar X, Gallucci M, Ponzone A, Zelante L, Zorzano A, Estivill X, Gasparini P, Nunes V, Palacin M. Localization, by linkage analysis, of the cystinuria type III gene to chromosome 19q13.1. *Am J Hum Genet* 1997;**60**:611-16.
 - 11 **Feliubadalo L**, Bisceglia L, Font M, Dello Strologo L, Beccia E, Arslan-Kirchner M, Steinmann B, Zelante L, Estivill X, Zorzano A, Palacin M, Gasparini P, Nunes V. Recombinant families locate the gene for non-type I cystinuria between markers C13 and D19S587 on chromosome 19q13.1. *Genomics* 1999;**60**:362-5.
 - 12 **Fernandez E**, Carrascal M, Rousaud F, Abian J, Zorzano A, Palacin M, Chillaron J. rBAT-b₀+AT heterodimer is the main apical reabsorption system for cystine in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;**283**:F540-8.
 - 13 **Chillaron J**, Roca R, Valencia A, Zorzano A, Palacin M. Heteromeric amino acid transporters: biochemistry, genetics, and physiology. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;**281**(6):F995-1018.
 - 14 **Bisceglia L**, Calonge MJ, Dello Strologo L, Rizzoni G, de Sanctis L, Gallucci M, Beccia E, Testar X, Zorzano A, Estivill X, Zelante L, Palacin M, Gasparini P, Nunes V. Molecular analysis of the cystinuria disease gene: identification of four new mutations, one large deletion, and one polymorphism. *Hum Genet* 1996;**98**:447-51.
 - 15 **Pras E**, Golomb E, Drake C, Aksentjevich I, Katz G, Kasner DL. A splicing mutation (891+4A→G) in SLC3A1 leads to exon 4 skipping and causes cystinuria in a Moslem Arab family. *Hum Mutat* 1998;(suppl 1):S28-30.
 - 16 **Gitomer WL**, Reed BY, Ruml LA, Sakhaee K, Pak CY. Mutations in the genomic deoxyribonucleic acid for SLC3A1 in patients with cystinuria. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;**83**:3688-94.
 - 17 **Gitomer WL**, Reed BY, Ruml LA, Pak CY. 335-base deletion in the mRNA coding for a dibasic amino acid transporter-like protein (SLC3A1) isolated from a patient with cystinuria. *Hum Mutat* 1998;(suppl 1):S69-71.
 - 18 **Saadi I**, Chen XZ, Hediger M, Ong P, Pereira P, Goodyer P, Rozen R. Molecular genetics of cystinuria: mutation analysis of SLC3A1 and evidence for another gene in type I (silent) phenotype. *Kidney Int* 1998;**54**:48-55.
 - 19 **Boutros M**, Ong P, Saadi I, Hiou-Tim F, Vicaneck C, Rozen R, Goodyer P. The human rBAT promoter mutations in cystinuria [abstract]. *Am J Hum Genet* 1999;**65**(suppl):A94.
 - 20 **Purroy J**, Bisceglia L, Jaeken J, Gasparini P, Palacin M, Nunes V. Detection of two novel large deletions in SLC3A1 by semi-quantitative fluorescent multiplex PCR. *Hum Mutat* 2000;**15**:373-9.
 - 21 **Font M**, Feliubadalo L, Estivill X, Nunes V, Golomb E, Kreiss Y, Pras E, Bisceglia L, d'Adamo AP, Zelante L, Gasparini P, Bassi MT, George AL, Manzoni M, Riboni M, Ballabio A, Borsani G, Reig N, Fernandez E, Zorzano A, Bertran J, Palacin M. Functional analysis of mutations in SLC7A9, and genotype-phenotype correlation in non-Type I cystinuria. *Hum Mol Genet* 2001;**10**:305-16.
 - 22 **Bisceglia L**, Purroy J, Jimenez-Vidal M, d'Adamo AP, Rousaud F, Beccia E, Penza R, Rizzoni G, Gallucci M, Palacin M, Gasparini P, Nunes V, Zelante L. Cystinuria type I: identification of eight new mutations in SLC3A1. *Kidney Int* 2001;**59**:1250-6.
 - 23 **Harnevik L**, Fjellstedt E, Molbaek A, Tiselius HG, Denneberg T, Soderkvist P. Identification of 12 novel mutations in the SLC3A1 gene in Swedish cystinuria patients. *Hum Mutat* 2001;**18**:516-25.
 - 24 **Lederc D**, Boutros M, Suh D, Wu Q, Palacin M, Ellis JR, Goodyer P, Rozen R. SLC7A9 mutations in all three cystinuria subtypes. *Kidney Int* 2002;**62**:1550-9.
 - 25 **Botzenhart E**, Vester U, Schmidt C, Hesse A, Halber M, Wagner C, Lang F, Hoyer P, Zerres K, Eggemann T. Cystinuria in children: distribution and frequencies of mutations in the SLC3A1 and SLC7A9 genes. *Kidney Int* 2002;**62**:1136-42.
 - 26 **Schmidt C**, Albers A, Tomiuk J, Eggemann K, Wagner C, Capasso G, Lahme S, Hesse A, Lang F, Zerres K, Eggemann T. Analysis of the genes SLC7A9 and SLC3A1 in unclassified cystinurics: mutation detection rates and association between variants in SLC7A9 and the disease. *Kidney Nephrol* 2002;**57**:342-8.
 - 27 **Schmidt C**, Vester U, Wagner CA, Lahme S, Hesse A, Hoyer P, Lang F, Zerres K, Eggemann T. Significant contribution of genomic rearrangements in SLC3A1 and SLC7A9 to the etiology of cystinuria. *Kidney Int* 2003;**64**:1564-72.
 - 28 **Dello Strologo L**, Pras E, Pontesilli C, Beccia E, Ricci-Barbini V, de Sanctis L, Ponzone A, Gallucci M, Bisceglia L, Zelante L, Jimenez-Vidal M, Font M, Zorzano A, Rousaud F, Nunes V, Gasparini P, Palacin M, Rizzoni G. Comparison between SLC3A1 and SLC7A9 cystinuria patients and carriers: a need for a new classification. *J Am Soc Nephrol* 2002;**13**:2547-53.
 - 29 **Turnell DC**, Cooper JD. Rapid assay for amino acids in serum or urine by pre-column derivatization and reversed-phase liquid chromatography. *Clin Chem* 1982;**28**:527-31.
 - 30 **Cartegni L**, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR. ESEfinder: a web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res* 2003;**31**:3568-71.
 - 31 **Dahlberg PJ**, van den B, Kurtz SB, Wilson DM, Smith LH. Clinical features and management of cystinuria. *Mayo Clin Proc* 1977;**52**:533-42.
 - 32 **Feliubadalo L**, Arbones ML, Manas S, Chillaron J, Visa J, Rodes M, Rousaud F, Zorzano A, Palacin M, Nunes V. Slc7a9-deficient mice develop cystinuria non-I and cystine urolithiasis. *Hum Mol Genet* 2003;**12**:2097-108.
 - 33 **Schmidt C**, Tomiuk J, Botzenhart E, Vester U, Halber M, Hesse A, Wagner C, Lahme S, Lang F, Zerres K, Eggemann T, Bachmann H, Bokenkamp A, Fischbach M, Frund S, Pistor KG, Zappel HF. Genetic variations of the SLC7A9 gene: allele distribution of 13 polymorphic sites in German cystinuria patients and controls. *Clin Nephrol* 2003;**59**:353-9.
 - 34 **Horsford J**, Saadi I, Raelson J, Goodyer PR, Rozen R. Molecular genetics of cystinuria in French Canadians: identification of four novel mutations in type I patients. *Kidney Int* 1996;**49**:1401-6.
 - 35 **Reig N**, Chillaron J, Bartoccioni P, Fernandez E, Bendahan A, Zorzano A, Kanner B, Palacin M, Bertran J. The light subunit of system b₀+ is fully functional in the absence of the heavy subunit. *Embo J* 2002;**21**:4906-14.
 - 36 **Goodyer P**, Saadi I, Ong P, Elkas G, Rozen R. Cystinuria subtype and the risk of nephrolithiasis. *Kidney Int* 1998;**54**:56-61.
 - 37 **Harnevik L**, Fjellstedt E, Molbaek A, Denneberg T, Soderkvist P. Mutation analysis of SLC7A9 in cystinuria patients in Sweden. *Genet Test* 2003;**7**:13-20.
 - 38 **Peters T**, Thaete C, Wolf S, Popp A, Sedlmeier R, Grosse J, Nehls MC, Russ A, Schlueter V. A mouse model for cystinuria type I. *Hum Mol Genet* 2003;**12**:2109-20.
 - 39 **Bauch C**, Verrey F. Apical heterodimeric cystine and cationic amino acid transporter expressed in MDCK cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;**283**:F181-9.
 - 40 **Chillaron J**, Estevez R, Samarzija I, Waldegger S, Testar X, Lang F, Zorzano A, Busch A, Palacin M. An intracellular trafficking defect in type I cystinuria rBAT mutants M467T and M467K. *J Biol Chem* 1997;**272**:9543-9.
 - 41 **Pineda M**, Fernandez E, Torrents D, Estevez R, Lopez C, Camps M, Uoberas J, Zorzano A, Palacin M. Identification of a membrane protein, LAT-2, that co-expresses with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transport activity with broad specificity for small and large zwitterionic amino acids. *J Biol Chem* 1999;**274**:19738-44.

11.1 CLASSIFICACIÓ GENÈTICA

Tradicionalment, la cistinúria es classificava en tres subtipus (I, II i III) segons l'excreció de cistina i aminoàcids bàsics dels heterozigots obligats (veure Introducció). Amb la identificació del gen de $b^{0,+}AT$ com a responsable de la majoria de casos de cistinúria de tipus no I, només dos gens apareixien com a responsables de cistinúria: el gen *SLC3A1* (codificant per rBAT) era responsable de cistinúria de tipus I (Calonge *et al.* 1994) i el gen *SLC7A9* (codificant per $b^{0,+}AT$) era responsable principalment de cistinúria de tipus no I (abans II i III) (articles 2 i 3). La cistinúria de tipus I era considerada totalment recessiva, i els heterozigots no presentaven hiperexcreció de cistina ni aminoàcids bàsics, mentre la cistinúria de tipus no I era considerada dominant amb penetrança incompleta. Com es mostra en l'article 3, es va realitzar una correlació genotip-fenotip atribuint la severitat dels símptomes en els heterozigots a les diferents mutacions del gen *SLC7A9*. Malgrat la classificació fenotípica de la malaltia descrita a l'apartat 5.2.1, trobàvem que alguns heterozigots de *SLC7A9* presentaven un fenotip d'excreció urinari prop del rang control, semblant al fenotip dels heterozigots de *SLC3A1* que fins aquell moment eren tots silenciosos (article 3). Des de llavors, hem publicat altres heterozigots amb mutacions a *SLC7A9* i fenotip I (articles 4 i 5), i un altre grup ha publicat dues mutacions de *SLC7A9* (p.I44T i p.P261L) associades a aquest fenotip (Leclerc *et al.* 2002). Aquests dades feien imprecisa la classificació de cistinúria utilitzada fins llavors perquè la cistinúria de tipus I podia estar causada per mutacions a *SLC7A9* en comptes de *SLC3A1* i la no I podia estar causada per la mutació dupE5-E9 de *SLC3A1*. Aquest fet va motivar la proposta d'una nova classificació de la cistinúria basada en el genotip per part de l'ICC (article 4):

- **Tipus A:** els pacients presenten mutacions en el gen *SLC3A1* als 2 al·lells (AA). Els heterozigots (A+) generalment presenten excreció d'aminoàcids normal (excepte la dupE5-E9).
- **Tipus B:** els pacients presenten mutacions als 2 al·lells del gen *SLC7A9* (BB). Els heterozigots (B+) generalment mostren hiperexcreció de cistina i aminoàcids bàsics, i alguns poden arribar a fer càlculs.
- **Tipus AB:** els pacients que presenten una mutació a *SLC3A1* i una altra a *SLC7A9*. Fins al moment no s'ha demostrat en cap pacient que la digènia causi un desenvolupament complet de la cistinúria.

Les manifestacions clíniques de la malaltia, l'emissió de pedres i els valors d'excreció urinària de cistina i aminoàcids bàsics en els pacients homozigots dels dos tipus (A i B) són molt similars entre ells, i molt més alts que els dels individus controls. Les diferències apareixen en els valors d'excreció dels heterozigots obligats, ja que els heterozigots de tipus A presenten valors d'excreció semblants als individus normals, i per tant, és una forma recessiva de la malaltia; excepte per la mutació dupE5-E9, que es trobà més tard (article 5). Mentre que els individus heterozigots de tipus B presenten un rang molt més ampli d'excreció urinària, que va des de la normalitat fins a valors clarament superiors als controls, però per sota dels que es donen en els homozigots (taules 2 i 3, article 4). El 14% d'individus B+ estudiats en aquesta taula presenten valors d'excreció urinària dins del rang de la normalitat, i per tant, es classificarien com a tipus I seguint el criteri tradicional. Així les mutacions en el gen *SLC7A9* (B) eren responsables dels tres tipus de cistinúria coneguts (I, nol i mixt), com es planteja també en un altre estudi (Leclerc *et al.* 2002).

La gran variabilitat d'excreció urinària que s'observa en els individus heterozigots de tipus B es pot explicar segons la correlació genotip-fenotip que es presenta en l'article 3. Segons l'impacte que tinguin les mutacions en la funció de la proteïna $b^{0,+}AT$, aquestes es manifestaran amb una excreció més suau o més severa en els individus portadors. No s'ha pogut fer una correlació entre el tipus de cistinúria i l'edat de manifestació dels símptomes clínics, així com tampoc s'han pogut correlacionar els valors d'excreció urinària amb la incidència de càlculs de cistina (article 4). Com que els valors d'excreció de cistina en els pacients sempre estan molt per sobre del seu límit de solubilitat, és d'esperar que lleugeres diferències en aquests valors no causin diferències significatives en la formació de càlculs, sinó que és probable que altres factors pro- o anti-litogènics tinguin una rellevància més important, com podrien ser factors genètics o ambientals (dieta, tractaments...). L'hiperexcreció de cistina causada per mutacions a *SLC3A1* o a *SLC7A9* és condició necessària per la precipitació d'aquesta i la formació de càlculs de cistina en el sistema urinari. Tot i així, no tots els cistinúrics presenten càlculs a la mateixa edat, ni amb la mateixa recurrència o quantitat, i alguns d'ells mai arriben a formar càlculs. En la resta de pacients el desenvolupament de la litiasi és variable; el debut de la litiasi succeeix als 11-20 anys de vida en el 35-40% dels pacients. El 15% de nenes i 30% de nens debuten en els tres primers mesos de vida (article 4).

RESULTATS

En general, la litiasi parteix d'uns nuclis inicials (cristalls) que, per agregació amb altres cristalls, formen petits càlculs que van creixent i/o agregant-se amb altres càlculs, mentre es mantinguin en una solució supersaturada. Tant la nucleació com els passos següents depenen de nombrosos factors, com ara el pH, la força iònica, i altres soluts petits o macromoleculars. Aquests factors depenen de l'ambient i del fons genètic de cada individu. Aquesta variabilitat entre individus pot explicar les diferències d'excreció o símptomes clínics en membres d'una mateixa família o individus que tenen la mateixa mutació en qualsevol dels dos gens, ja que les proteïnes rBAT i b^{0,+}AT determinen els valors d'excreció urinària, però altres factors determinaran el risc de formació de càlculs. Per exemple, s'ha observat que els homes tenen més simptomatologia que les dones, cosa que es pot atribuir a les diferències anatòmiques del tracte urinari. Tenim un cas en l'ICC de germans amb hàbits alimentaris molt similars i concentracions de cistina també molt semblants. En aquest cas, l'única variable diferencial que van trobar-hi, fou el pH urinari: el germà no litíasiàtic tenia el pH urinari naturalment més elevat que el seu germà altament litíasiàtic (Ferran Rousaud, comunicació personal).

11.2 RESULTAT DE L'ANÀLISI DE MUTACIONS EXHAUSTIU DELS DOS GENS

Vem realitzar un anàlisi de mutacions exhaustiu d'una cohort gran de pacients (de l'ICC) i vem fer una correlació de genotip-fenotip extensa, per aclarir la classificació de cistinúria des d'un punt de vista genètic. L'èmfasi especial el vem posar en al·lels de *SLC7A9* que segreguen com fenotip silenciós en heterozigots obligats, en les famílies de cistinúria mixtes, i en els possibles casos de digènia.

En l'article 5 la doctoranda, conjuntament amb Maite Jiménez i Gino Bisceglia, presentem 40 noves mutacions en 164 pacients de cistinúria, principalment italians i espanyols, inclosos en la base de dades de l'ICC: 24 a *SLC3A1* i 16 a *SLC7A9* (taula 2, article 5). Aquestes mutacions inclouen 5 *frameshift* (3 a *SLC3A1* i 2 a *SLC7A9*) i 1 mutació sense sentit a *SLC3A1* que produeixen codons d'aturada prematurs, 7 mutacions de *splicing* (1 a *SLC3A1* i 6 a *SLC7A9*), 22 canvis que afecten un residu d'aminoàcid (16 i 5 mutacions de canvi de sentit a *SLC3A1* i *SLC7A9* respectivament, i la supressió d'un residu d'aminoàcid a *SLC3A1*), 2 canvis exònics silenciosos (un a *SLC3A1* i un a *SLC7A9*) i 3 grans reordenaments (1 a *SLC3A1* i 2 a *SLC7A9*). En les taules 7 i 8 es mostren totes les mutacions publicades fins al moment dels dos gens: 105 a *SLC3A1* (rBAT) i 66 a *SLC7A9* (b^{0,+}AT).

Després de fer un primer crivellatge per SSCP i un segon crivellatge per seqüenciació directa dels tipus no I clars, en els que no s'havien trobat mutacions en cap dels 2 gens (*SLC7A9* i *SLC3A1*), quedava un 21% dels al·lels no I sense explicar. A part de les possibles mutacions al promotor també vem pensar que aquest percentatge de pacients no explicats podia ser degut a grans delecions o insercions del gen que no podien ser detectades per la tècnica de SSCP-HD. Per això vem començar a cercar grans reordenaments genòmics (delecions o insercions) a *SLC7A9* en aquests pacients. Els resultats d'aquesta cerca es mostren en l'article 5.

Mutacions de tipus A (SLC3A1)							
Canvi nucleotídic	Efecte proteïna	I/E	Publicació	Canvi nucleotídic	Efecte en la proteïna	I/E	Publicació
Mutacions de canvi de sentit				Mutacions de canvi de sentit			
c.266T>C	L89P	E1	Font et al., 2004	c.1998C>G	C666W	E10	Font et al., 2004
	I105R	E1	Guillén et al., 2004	c.2017T>C	C673R	E10	Egoshi et al., 2000
c.364C>T	P122S	E1	Gitomer et al., 2000	c.2019C>G	C673W	E10	Bisceglia et al., 2001
c.368T>G	M123R	E1	Font et al., 2004	c.2033T>C	L678P	E10	Calonge et al., 1994
c.371A>G	Y124C	E1	Font et al., 2004	Pèrdua de sentit			
c.383C>A	P128Q	E1	Pras et al., 1995	c.503C>A	S168X	E2	Bisceglia et al., 2001
c.388T>C	S130P	E1	Font et al., 2004	c.808C>T	R270X	E4	Pras et al., 1995
c.410A>G	D137G	E1	Font et al., 2004	c.1383T>G	Y461X	E8	Bisceglia et al., 2001
c.446T>A	L149Q	E2	Font et al., 2004	c.1447G>T	E483X	E8	Bisceglia et al., 1996
c.451T>A	Y151N	E2	Bisceglia et al., 1996	c.1865T>G	L622X	E10	Font et al., 2004
c.452A>G	Y151C	E2	Harnevik et al., 2001	Promotor			
c.542G>A	R181Q	E2	Calonge et al., 1994	c.1-194G>C		Prom	Boutros et al., 2000
c.566C>T	T189M	E2	Font et al., 2004	c.1-265G>A	60% activitat prom	Prom	Boutros et al., 2000
c.647C>T	T216M	E3	Bisceglia et al., 1996	Splicing			
c.649>C	S217R	E3	Saadi et al., 1998	c.765+1G>T	W255fsX	I3	Bisceglia et al., 2001
c.759C>G	N253K	E3	Harnevik et al., 2001	c.766-2A>G	L256_K297del	I3	Bisceglia et al., 2001
c.802G>A	E268K	E4	Miyamoto et al., 1995	c.891+4A>G	L256_K297del	I4	Pras et al., 1998
c.809G>T	R270L	E4	Saadi et al., 1998	c.1011G>A	P337fsX	E5	Saadi et al., 1998
c.1021A>G	T341A	E6	Miyamoto et al., 1995	c.1012-23C>G	D338_Y378delfsX5	I5	Font et al., 2004
c.1043A>C	H348P	E6	Font et al., 2004	c.1035G>A	p.D338fsX4	E6	Font et al., 2004
c.1037T>C	L346P	E6	Egoshi et al., 2000	c.1136+2T>C	Y378fsX	I6	Harnevik et al., 2001
c.1084C>T	R362C	E6	Bisceglia et al., 1996	c.1500+1G>T	I500fsX3	I8	Horsford et al., 1996
c.1085G>A	R362H	E6	Harnevik et al., 2001	Trencament de pauta de lectura			
c.1093C>T	R365W	E6	Gasparini et al., 1995	c.163delC	Q55fsX50	E1	Gitomer et al., 1998
c.1094G>T	R365L	E6	Albers et al., 1999	c.664delT	W222fsX3	E3	Font et al., 2004
c.1094G>A	R365Q	E6	Schmidt et al., 2004	c.782_804del	N261fsX15	E4	Gitomer et al., 1998
c.1192G>C	G398R	E7	Harnevik et al., 2001	c.979_980delGA*	L325fsX2	E5	Horsford et al., 1996
c.1230C>A	N410K	E7	Font et al., 2004	c.1221dupT	P408fsX18	E7	Font et al., 2004
c.1259C>G	S420C	E7	Gitomer et al., 1998	c.1306insC	P336fsX6	E7	Pras et al., 1995
c.1322C>G	P441R	E7	Font et al., 2004	c.1601_1602delAC	H534fsX4	E9	Gitomer et al., 2000
c.1334T>C	I445T	E8	Egoshi et al., 2000	c.1670insAT		E10	Guillén et al., 2004
c.1353C>T	R452W	E8	Endsley et al., 1997	c.1699_1700delAG	R567fsX8	E10	Font et al., 2004
c.1355G>A	R452Q	E8	Bisceglia et al., 2001	c.1749delA	T583fsX14	E10	Gasparini et al., 1995
c.1364C>T	S455L	E8	Font et al., 2004	c.1749_1751del**		E10	Botzenhart et al., 2002
c.1366C>T	R456C	E8	Font et al., 2004	c.1767delA		E10	Botzenhart et al., 2002
c.1367G>A	R456H	E8	Font et al., 2004	c.1811_1812delTG*	L604fsX4	E10	Saadi et al., 1998
c.1373G>A	G458E	E8	Gitomer et al., 1998	c.1820delT	L607fsX3	E10	Egoshi et al., 2000
c.1381T>C	Y461H	E8	Endsley et al., 1997	c.1898_1899insTA	V633fsX	E10	Egoshi et al., 2000
c.1400T>C	M467T	E8	Calonge et al., 1994	c.1999-2000delTT	F667fsX25	E10	Harnevik et al., 2001
c.1400T>A	M467K	E8	Calonge et al., 1994	c.2021insT*	Y674fsX20	E10	Gitomer et al., 1998
c.1442G>T	G481V	E8	Harnevik et al., 2001	Delecions en pauta			
c.1444G>A	E482K	E8	Harnevik et al., 2001	c.1966_1968delCTT	L656del	E10	Font et al., 2004
c.1520C>T	S507L	E9	Font et al., 2004	Grans reordenaments			
c.1523C>G	P508A	E9	Botzenhart et al., 2002	c.1_1332del	M1_Q460delfsX3	E1-7	Saadi et al., 1998
c.1529A>G	Q510R	E9	Harnevik et al., 2001	c.114_1306del	G38_M435delfsX6	E1-7	Pras et al., 1995
c.1607T>G	V536G	E9	Gitomer et al., 1998	c.198_1575del	A66_T525fsX10	E1-9	
c.1640C>G	S547W	E10	Bisceglia et al., 2001	c.431_765del	G144_W255delfsX12	E2-3	Gitomer et al., 1997
c.1690C>T	L564F	E10	Bisceglia et al., 2001	c.431_2055 del	G144_C685del	E2-10	Purroy et al., 2000
c.1691G>C	R584T	E10	Harnevik et al., 2001	c.431_2055 del	G144_C685del	E2-10	Saadi et al., 1998
c.1702G>A	G568S	E10	Font et al., 2004	c.431-3_463del +468_474 dup/ins	I145_K203del	E2	Gitomer et al., 1998
c.1744T>C	Y582H	E10	Gasparini et al., 1995	c.(891+1524 _1618-1600)dup	p.E298_D539dup	E5-9	Schmidt et al., 2003
c.1796T>C	F599S	E10	Harnevik et al., 2001	c.892_1332del	E298_M444del	I4-7	Font et al., 2004
c.1799G>A	G600E	E10	Harnevik et al., 2001	c.892-2055del (del 3')	E298_C685del	E5-10	Bisceglia et al., 1996
c.1843C>A	P615T	E10	Calonge et al., 1994	c.1618-2055del deleció	V540_C685del	E10	Purroy et al., 2000
c.1934G>C	G645A	E10	Gitomer et al., 1998	179,311bpdel (chr.2p)	M1_C685del	E7-10	Horsford et al., 1996
c.1943T>C	F648S	E10	Gasparini et al., 1995			E1-10	
c.1955C>G	T652R	E10	Calonge et al., 1994				

Taula 7. Mutacions de tipus A (SLC3A1). Es llisten les 105 mutacions de rBAT publicades fins ara. I/E, intró o exó afectat.

RESULTATS

Canvi nucleotídic	Efecte en la proteïna	I/E	Publicació	Canvi nucleotídic	Efecte en la proteïna	I/E	Publicació
c.131T>C	I44T	E3	Leclerc et al., 2002	Mutacions de Splicing			
c.155C>T	P52L	E3	Font et al, 2001	c.586C>T	L196_G202delfsX5	E5	Font et al., 2004
c.184G>A	V62M	E3	Font et al., 2004	c.604+1G>A	L160X	E5	Font et al, 2001
c.187G>A	G63R	E3	Font et al, 2001	c.604+2T>C	L160X	I5	Font et al., 2004
c.206G>T	W69L	E3	Font et al, 2001	c.605-3C>A	I203fsX27	I5	Font et al., 2004
c.209C>T	A70V	E3	Font et al, 2001	c.874-17G>A		E9	Leclerc et al., 2002
c.311G>A	G105R	E4	ICC, 1999	c.977+3A>T	A290fsX45	E9	Font et al, 2001
c.368G>A	T123M	E4	Font et al, 2001	c.1399+1G>T	K447fsX22	I12	Font et al., 2004
c.376G>A	A126T	E4	Font et al, 2001	c.1399+3_+6delAAGT	K447fsX22	E12	Font et al, 2001
c.419T>C	F140S	E4	Schmidt et al., 2002	c.1400-3C>G	K447fsX22	I12	Font et al., 2004
c.508G>A	V170M	E5	ICC, 1999	Trencament de la pauta de lectura			
c.544G>A	A182T	E5	ICC, 1999	c.151delT	S51fsX38	E3	Font et al., 2004
c.559A>T	I187T	E5	Font et al, 2001	c.335dupT	S113fsX8	E4	ICC, 1999
c.562G>A	V188M	E5	Font et al., 2004	c.368_369delCCG	T123fsX84	E4	Font et al, 2001
c.583G>A	G195R	E5	ICC, 1999	c.411_412delITG	139fsX68	E4	ICC, 1999
c.671C>T	A224V	E6	Botzenhart et al., 2002	c.501_504delACTG	L168fsX19	E5	Font et al, 2001
c.688T>C	W230R	E6	Font et al, 2001	c.562delG	V188fsX75	E5	Schmidt et al., 2002
c.695A>G	Y232C	E6	Font et al., 2004	c.614dupA	L160fsX1	E6	Font et al, 2001
c.722T>C	I241T	E7	Font et al, 2001	c.630_633delITTC	F211fsX51	E6	Font et al, 2001
c.775G>A	G259R	E8	ICC, 1999	c.712_716delCTCAA	N239fsX6	E7	Font et al, 2001
c.782C>T	P261L	E8	Leclerc et al., 2002	c.813delC	N271fsX6	E8	Font et al, 2001
c.844G>A	E282K	E8	No publicada	c.1009delA	fsX	E8	Harnevik et al., 2003
c.847C>T	L283F	E8	Font et al., 2004	c.1265_1266delITG	L424fsX62	E12	Font et al., 2004
c.947C>T	A316V	E9	Font et al., 2004	c.1270_1271delTT	L424fsX62	E12	Font et al, 2001
	V330M	E10	Harnevik et al., 2003	Petites dels/ins en pauta			
c.992C>T	A331V	E10	Botzenhart et al., 2002	c.28_30delAGA	R10del	E2	Font et al, 2001
c.997C>T	R333W*	E10	Font et al, 2001	c.475_477dupGCC	A158dup	E4	Font et al, 2001
c.1060G>A	A354T	E10	Font et al, 2001	c.579_581dupCAT	I193dup	E5	Font et al, 2001
c.1137C>G	S379R	E11	Font et al, 2001	c.730_732delGAA	E244del	E7	Font et al, 2001
c.1144G>A	A382T	E11	Font et al, 2001	c.784_786del	L262del	E8	Botzenhart et al2002
Pèrdua de sentit				Grans reordenaments			
c.206G>A	W69X	E3	Font et al, 2001	c.1_478del (a)	p.0	E1-4	Schmidt et al., 2003
c.1306G>T	E436X	E12	Leclerc et al., 2002	c.1_1464del (a)	p.0	E1-13	Schmidt et al., 2003
Mutacions de Splicing				c.1224+4166_	K432fsX78	E12	Font et al., 2004
c.171C>T	N58_G79del22	E3	Font et al., 2004	c.1399+119dup			
c.235+3_+293del	L30fsX10	E3	Font et al., 2004	c.1224+4166_	V409fsX9	E12	Font et al., 2004
				c.1399+119del			

Taula 8. Mutacions de SLC7A9. Es llisten les 66 mutacions de b⁰+AT publicades fins ara. I/E, intró o exó afectat

11.2.1 Anàlisi de grans reordenaments de *SLC7A9* mitjançant *Southern blot*

Primer es van posar a punt les condicions per a fer *Southern* per un mètode quimioluminiscent d'Amersham Biosciences dels pocs pacients dels quals disposàvem de suficient DNA. Un cop conegut el patró salvatge pels enzims de restricció: *BamHI*, *EcoRI*, *HindIII* i *XbaI*, vam analitzar els 15 pacients espanyols en els que faltava trobar una o les 2 mutacions. No vam trobar cap deleció ni inserció en els pacients estudiats amb aquesta tècnica. La majoria de mostres eren molt antigues i el DNA estava degradat per tant calia utilitzar una altra tècnica. Per això, vam decidir posar a punt la tècnica de PCR Multiplex semiquantitativa per *SLC7A9*, tècnica que ja havia estat utilitzada pel nostre grup per la cerca de reordenaments a *SLC3A1* (Purroy *et al.* 2000).

11.2.2 Anàlisi de grans reordenaments de *SLC7A9* mitjançant PCR Multiplex semiquantitativa

Aquesta tècnica es basa en una PCR semiquantitativa i permet detectar canvis de dosi dels exons amplificats i conèixer si un determinat exó està deletat o duplicat. Es poden detectar delecions i insercions que afecten des de 1 base fins el gen sencer. Es requereix poc DNA i és especialment útil per estudiar gens de mida petita o mitjana. S'amplifiquen simultàniament els 13 exons de *SLC7A9* junt amb l'exó 5 de *DSCR1* (localitzat al cromosoma 21, que s'utilitza com a control extern de doble dosi) en una mateixa reacció (veure materials i mètodes).

En la taula 9 es mostren tres controls normals independents com a exemple de la reproduïbilitat del mètode.

Exó <i>SLC7A9</i>	Dades Genescan			Corregit per <i>DSCR1-E5</i>			Mitjana	Quocient/Mitjana		
	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1 + C2 + C3	C1	C2	C3
1	3448	4477	4315	1,32	1,21	1,32	1,28	1,03	0,94	1,03
2	2834	3891	4089	1,09	1,05	1,25	1,13	0,96	0,93	1,11
3	5247	4606	6182	2,01	1,25	1,89	1,72	1,17	0,73	1,10
4	3566	4227	4615	1,36	1,14	1,41	1,3	1,04	0,87	1,08
5	3555	5420	4979	1,36	1,46	1,52	1,45	0,94	1,01	1,05
6	5059	6381	6218	1,94	1,73	1,90	1,86	1,04	0,93	1,02
7	3046	3859	3642	1,17	1,04	1,11	1,11	1,06	0,94	1,00
8	3973	4910	4565	1,52	1,33	1,39	1,41	1,08	0,94	0,98
9	2445	3677	3656	0,94	0,99	1,12	1,02	0,92	0,97	1,10
10	2480	3842	3642	0,95	1,04	1,11	1,03	0,92	1,01	1,07
11	2343	3085	2895	0,90	0,83	0,88	0,87	1,03	0,95	1,01
12	3704	4969	4406	1,42	1,34	1,35	1,37	1,04	0,98	0,99
13	2722	3686	3493	1,04	1,00	1,07	1,04	1,00	0,96	1,03
<i>DSCR1-E5</i>	2613	3700	3273	1	1	1	1	1	1	1

Taula 9. Exemple dels càlculs en 3 controls. Els valors presentats s'han obtingut de la següent manera: cada exó correspon a un pic del cromatograma (figura 12 A). L'àrea sota el pic és una mesura de la quantitat de DNA. El valor de cada àrea es divideix per la del control de doble dosi extern (exó 5 de *DSCR1*). Es fa la mitjana dels 3 valors. Finalment cada valor es divideix per la mitjana del seu exó. C1, C2 i C3 són individus control.

L'assignació de pics és important abans de continuar amb altres càlculs. Els pics petits adjacents i els pics d'encavalcament poden representar una diferència en les proporcions dels exons si no es tenen en compte. Un cop les condicions de PCR s'han establert, el rendiment de cada mostra depèn de les mateixes variables que qualsevol altre PCR.

Els tres controls normals independents mostrats (taula 9), i els resultats presentats per als dos experiments mostren que el mètode és reproduïble. Pels valors absoluts, cada reacció és dependent de la màquina de PCR i de la combinació d'encebadors (taula 1, article 5), ja que una lleugera variació en el rendiment d'amplificació de qualsevol dels exons pot influir en les proporcions d'altres exons, i en els resultats finals.

Mitjançant aquesta tècnica vam trobar 2 grans reordenaments nous a *SLC7A9* en dos pacients espanyols amb cistinúria de tipus no I (2 dels 13 pacients analitzats per Multiplex). El patró d'exons de multiplex és anormal en aquests dos pacients com es mostra en la figura 12. A52 tenia aproximadament una dosi triple per a l'exó 12 i B60 tenia exactament la meitat de dosi de l'exó 12 respecte el DNA control. L'experiment

RESULTATS

es repetí incloent-hi familiars i els resultats anormals es confirmaren (figura 12 B). En la família 73 el cromatograma que correspon a la duplicació de l'exó 12 també es trobava en el pare (A50) i un germà afectat (A55), així la segregació de les dues mutacions en aquesta família (p.A182T i dupE12) concordava perfectament (veure pedigrí a la figura 19 de l'apartat 12).

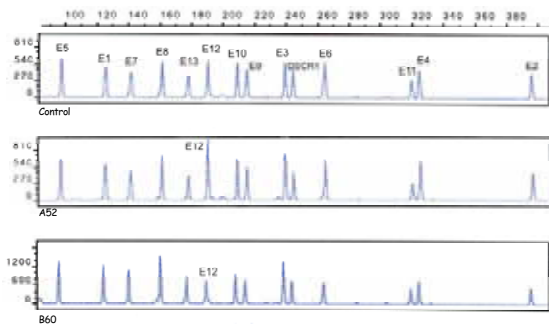


Figura 12. Resultats de 2 experiments realitzats en la família 73 i el proband B60.

A) L'assignació de les àrees dels pics es feu amb el programa GENESCAN™. Es pot observar a simple vista que els probands A52 i B60 presenten el pic que correspon a l'exó 12 major i menor respectivament, comparant amb el control. A dalt es mostra la mida de cada fragment (des de 98 pb de l'exó 5 fins a 400 pb de l'exó 2). En cada experiment de multiplex s'amplificaven 8 DNA de pacients, i com a mínim 2 DNA control.

B) Els pacients A52 i B60 presentaven uns valors anormals: A52 tenia la dosi corresponent a 3 còpies de l'exó 12 i B60 presentava la meitat de dosi del mateix exó. Es va repetir l'experiment incloent tots els familiars de que disposàvem. La segregació en la família 94 (pacient B60) no es va poder realitzar perquè no disposàvem de DNA dels familiars.

Exó SLC7A9	F 73						F 94
	A50	A51	A52	A53	A54	A55	B60
1	0,99	1,11	0,79	0,94	0,71	0,87	1,03
	1,09	0,88	1,00	0,83	0,83	0,78	1,08
2	1,04	1,06	1,04	1,24	1,04	1,16	1,03
	0,70	0,76	0,77	0,77	0,75	0,72	1,23
3	1,27	1,37	1,24	1,56	1,39	1,57	1,19
	0,91	1,13	1,11	1,24	0,95	1,11	1,31
4	1,26	1,25	1,10	1,36	1,14	1,28	1,07
	0,93	0,82	0,87	0,88	0,78	0,83	1,32
5	0,79	1,25	0,75	0,92	0,78	0,94	0,84
	1,08	0,83	0,93	0,74	0,72	0,80	1,16
6	1,06	1,33	1,03	1,24	1,04	1,24	1,07
	0,90	0,88	0,88	0,85	0,74	0,81	1,20
7	0,91	1,06	0,91	1,10	0,87	1,03	1,10
	0,96	0,88	1,08	0,89	0,70	0,77	1,02
8	0,91	1,04	0,89	1,21	0,95	1,07	1,11
	1,15	1,00	1,03	0,90	0,57	0,61	1,23
9	1,02	1,16	0,99	1,16	1,02	1,09	1,18
	0,95	0,98	0,98	0,95	0,94	0,99	1,35
10	1,13	1,24	0,99	1,11	1,07	1,18	1,15
	0,93	1,01	0,95	1,00	0,95	1,03	1,04
11	1,05	1,21	1,01	1,07	0,90	1,05	1,07
	1,01	0,91	0,97	0,85	0,97	0,91	1,05
12	1,59	1,05	1,48	1,06	0,95	1,56	0,63
	1,47	0,91	1,37	0,78	0,89	1,40	0,51
13	0,90	1,08	0,92	0,89	0,92	0,98	1,09
	1,02	1,01	0,91	0,88	0,93	0,92	0,97

Aquests dos reordenaments s'han estudiat amb profunditat: es tracta d'una deleció de 5kb (c.1224+4166_c.1399+119del4972) i una duplicació de 5 kb (c.1224+4166_c.1399+119dup4972). Ambdós reordenaments són causats per la recombinació entre 2 seqüències de 195 pb que només difereixen en un nucleòtid i estan separades 4778 pb. La primera seqüència es troba a l'intró 11 i la segona conté gran part de l'exó 12 (figura 13). Es va realitzar anàlisi de BLASTx amb aquesta seqüència repetida i no presenten homologia amb cap altra regió del genoma (només hi ha aquestes 2 repeticions dins del gen SLC7A9). La seqüència de les repeticions (Rep1 i 2) està a l'annex 2.

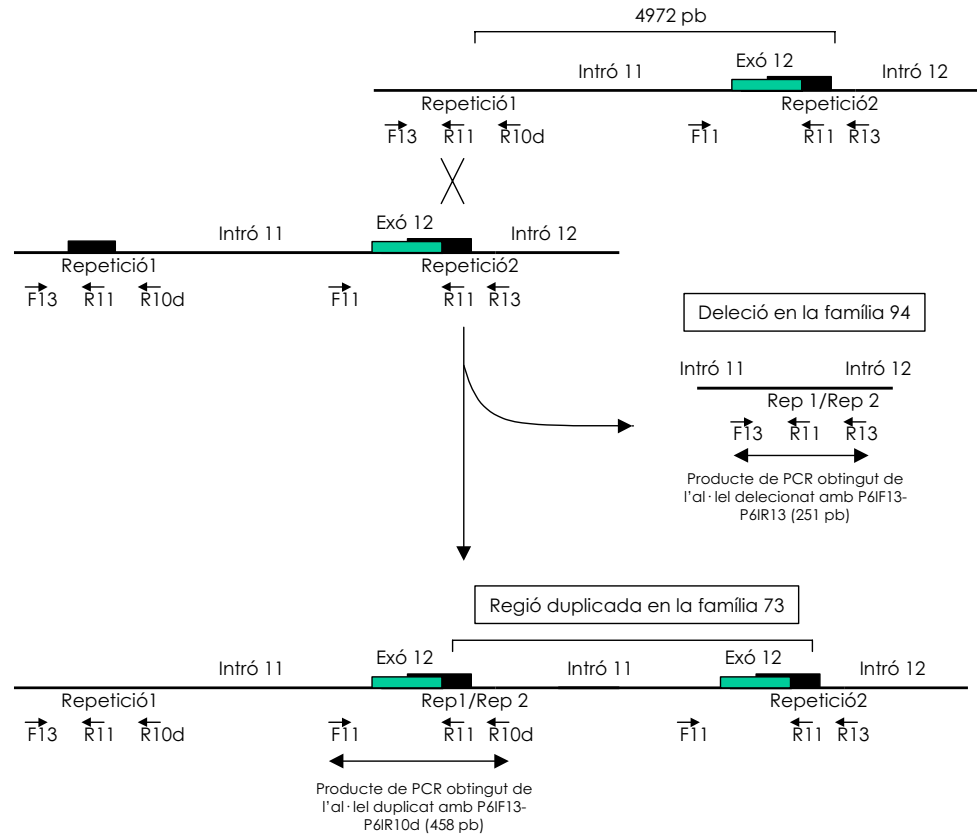


Figura 13. Regió genòmica de SLC7A9 en la que s'han trobat la delecció i la duplicació de 5kb. Rep 1 i 2 són les seqüències de 195 pb que es troben a 5 kb de distància i difereixen només en 1 nucleòtid. Aquestes Rep són responsables dels grans reordenaments trobats en els 2 pacients cistinúrics de tipus no I, com a conseqüència d'una recombinació entre ambdues seqüències. Es mostren els encebadors dissenyats per comprovar ambdues mutacions per PCR estàndard: F11 (P6IF11), F13 (P6IF13), R11 (P6IR11), R10d (P6IR10d). Les seqüències dels encebadors i les condicions de PCR estan a la taula 24 de l'apartat 22.2.4 de Materials i Mètodes.

Les dues mutacions van ser confirmades pel mètode de PCR estàndard no quantitativa amb encebadors que amplificaven específicament l'al·lel mutat en els dos casos: P6IF13-P6IR13 dissenyats per amplificar l'al·lel deleccionat en la família 94, i el P6IF13-P6IR10d i P6IF11-P6IR10d per amplificar l'al·lel duplicat en la família 73 (figures 13 i 14). Les seqüències dels encebadors i les condicions de PCR estan a la taula 24 de l'apartat 22.2.4 de Materials i Mètodes. El producte de proteïna esperat de la duplicació de 5 kb tindria un *frameshift* a partir del residu K432 amb l'addició de 78 residus sense sentit abans del primer codó d'aturada (p.K432fsX78). La delecció de 5 kb afecta l'intró 11 i els primers 100 pb dels 175 pb de l'exó 12, i molt probablement ocasiona el *skipping* de l'exó 12, perquè es deleciona el lloc DS5' i no hi ha cap lloc donant potencial al voltant. El producte de proteïna d'aquesta delecció tindria un *frameshift* a partir del residu V409, amb l'addició de 9 residus sense sentit afegint abans del primer codó d'aturada (p.V409fsX9). En ambdós casos, la proteïna resultant si fos estable estaria mancada dels dos últims dominis TM putatius, chi i XII. Tanmateix, no disposàvem de RNA d'aquests pacients per confirmar els canvis predits.

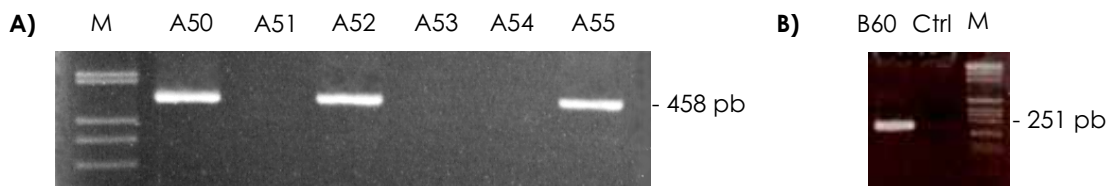


Figura 14. PCR estàndard per comprovar les mutacions. Ambdues mutacions han estat confirmades mitjançant PCR estàndard no quantitativa, amb encebadors dissenyats especialment per amplificar només l'al·lel mutat, tant el deleccionat com el duplicat. **A)** Producte de PCR obtingut de l'al·lel duplicat utilitzant 5 picomols dels encebadors P6IF13 i P6IR10d en un volum final de 25 µl. **B)** Producte de PCR obtingut de l'al·lel deleccionat utilitzant 5 picomols dels encebadors P6IF13 i P6IR13 en un volum final de 25 µl. Les seqüències dels encebadors i les condicions de PCR estan a la taula 24 de l'apartat 22.2.4 de Materials i Mètodes.

RESULTATS

En el crivellatge de mutacions a *SLC7A9* posterior als estudis de multiplex vem trobar mutacions en alguns d'aquests pacients. En 3 probands, vem trobar la única mutació de rBAT associada a fenotip no I: la dupE5-E9. Aquests pacients pertanyen a les famílies mixtes AA: F14, F77, F79 (taula 6, article 5).

Pel que fa a la sensibilitat del mètode, aquesta tècnica permet detectar deleccions i insercions des d'un nucleòtid al gen sencer. Alguns exons en la PCR multiplex mostraven pics múltiples. En la majoria de casos la presència d'aquests pics dobles eren deguts a l'addició de bases extres durant la PCR. Les seves àrees es comptaven juntes en els càlculs.

La tècnica és reproducible i pot ser molt útil per identificar mutacions, juntament amb altres tècniques de detecció de mutacions com l'anàlisi de SSCP. Utilitza una quantitat molt petita de mostra. Aquest mètode es pot utilitzar per trobar grans reordenaments genòmics en cas de no disposar de RNA i/o en cas de tenir poc DNA que no permeti fer *Southern*s (es requereixen 40-60 vegades menys DNA que pel *Southern*). Permet detectar deleccions o insercions en DNA de baixa qualitat, vells i fragmentats ja que es basa en l'amplificació de fragments petits, en aquest cas fins a 400 pb. Permet detectar deleccions del gen sencer, a diferència de la tècnica de RT-PCR que només amplificaria l'al·lel normal, en aquests casos, i és independent de l'expressió a limfòcits perquè s'analitza directament el DNA genòmic; però no detecta errors de *splicing*, que sí es detecten per RT-PCR. La dificultat de posar a punt les condicions de PCR pot variar d'un gen a un altre, però en cas de resultar massa difícil o si el gen té massa exons per considerar fiable la reacció hi ha la possibilitat de dividir els exons en dos grups, cada un amb el seu propi control de reacció intern, com es va fer per *SLC3A1* (Purroy et al. 2000).

11.2.3 Mutacions de *splicing* en zones no consens

Dues de les mutacions de *splicing* publicades a l'article 5 es localitzen fora de les seqüències consens de *splicing*, i es van comprovar per RT-PCR: i) c.586C>T a *SLC7A9* és una mutació exònica silenciosa que crea un donador de *splicing* a 20 pb a 5' del donador natural que resulta en una molècula de mRNA que conté una deleció de 20 nucleòtids [r.=; r.585_604del]. S'espera que el RNA resultant produeixi un canvi en la pauta de lectura a partir del residu L196 de b⁰⁺AT (p.L196_G202delfsX5) (veure figura 24 de Resultats). ii) c.1012-23C>G a *SLC3A1* localitza en un ISE (*Intronic Sequence Enhancer*) de l'intró 5 i produeix el *skipping* de l'exó 6 [r.1012_1136del], que s'espera que ocasioni un *frameshift* a partir del residu D338 de rBAT (p.D338_Y378delfsX5) (Maite Jiménez, tesi doctoral).

Hem trobat també dues mutacions silencioses situades en regions exòniques que no es troben en població control i que sembla que podrien afectar el *splicing*, però no ha estat possible comprovar-les per RT-PCR. i) c.171C>T a *SLC7A9* podria crear un donador de *splicing* a 64 pb *upstream* del donador consens (DS5'); o podria afectar una seqüència exònica reguladora de *splicing* (ESE o ESS), però els resultats del programa *ESEfinder* no prediuen que afecti cap ESE, encara que sembla que aquest programa només detecta el 50% dels llocs ESE (veure més avall) ii) c.1035G>A a *SLC3A1* es localitza en un ESE putatiu per a SF2/ASF. La mutació redueix la predicció del possible ESE de 2.36 a 0.44 (p.e., per sota el llindar = 1.96), suggerint un *splicing* aberrant (Cartegni et al. 2003).

11.3 FREQUÈNCIES AL·LÈLIQUES

En la cohort de l'ICC de pacients la p.M467T és la mutació de *SLC3A1* més comuna, que explica un 26,4% del total d'al·lels de tipus A, i juntament amb p.T216M (6,4%), DupE5-E9 (4,0%), c.163delC (4,0%), p.R270X (4,0%) i c.765+1G>T (3,2%) representen un 48,0% del total d'al·lels de tipus A (taula 10). Per a *SLC7A9* els al·lels més comuns són: p.G105R (27,4%), p.R333W (12,1%), p.V170M (11,5%), c.614dupA (7,0%), p.A182T (5,1%), p.T123M (3,8%) i c.605-3C>A (2,5%), que expliquen un 69,4% del total d'al·lels de tipus B. Les resta de mutacions de *SLC3A1* o *SLC7A9* s'identificaren en tres o menys al·lels independents (taula 11).

Mutacions de tipus A (SLC3A7)							
Canvi nucleotídic	Efecte en la proteïna	(n)	F	Canvi nucleotídic	Efecte en la proteïna	(n)	F
c.410A>G	D137G	1	0,008	c.1744T>C	Y582H	1	0,008
c.1699_1700delAG	R567fsX8	1	0,008	c.1012-23C>G	D338_Y378delfsX5	1	0,008
c.664delT	W222fsX3	1	0,008	c.1221dupT	P408fsX18	1	0,008
c.542G>A	R181Q	1	0,008	c.503C>A	S168X	1	0,008
c.1702G>A	G568L	1	0,008	Del 3'	Del ^{&}	1	0,008
c.1998C>G	C666W	1	0,008	Del 5'	Del ^{&}	2	0,016
c.1364C>T	S455L	1	0,008	c.1749delA	T583fsX14	2	0,016
c.1035G>A	D338fsX4	1	0,008	c.388T>C	S130P	2	0,016
c.1043A>C	H348P	1	0,008	c.1447G>T	E483X	2	0,016
c.446T>A	L149Q	1	0,008	c.1366C>T	R456C	2	0,016
c.368T>G	M123R	1	0,008	c.892-1332del	E298_M444del	2	0,016
c.1690C>T	L564F	1	0,008	c.266T>C	L89P	2	0,016
c.1230C>A	N410K	1	0,008	c.1084C>T	R362C	2	0,016
c.1865T>C,	L622X, S507L*	1	0,008	c.891+4A>G	L256_K297del	2	0,016
c.1520C>T							
c.566C>T	T189M	1	0,008	c.1640C>G	S547W	2	0,016
c.1367G>A	R456H	1	0,008	c.451T>A	Y151N	2	0,016
c.1966_1968delCTT	L656del	1	0,008	c.1093C>T	R365W	2	0,016
c.2019C>G	C673W	1	0,008	c.1322C>G	P441R	3	0,024
c.2033T>C	L678P	1	0,008	c.1353C>T	R452W	3	0,024
c.1355G>A	R452Q	1	0,008	c.1400T>A	M467K	3	0,024
c.1943T>C	F648S	1	0,008	c.765+1G>T	L256_K297del	4	0,032
c.1618_2055del	V540_C685del	1	0,008	c.808C>T	R270X	5	0,040
c.431_2055 del	G144_C685del	1	0,008	c.163delC	Q55fsX51	5	0,040
c.766-2A>G	L256_K297del	1	0,008	DupE5-19	E298_D539dup	5	0,040
c.1093C>T,	R365W, T652R*	1	0,008	c.647C>T	T216M	8	0,064
c.1955C>G							
c.371A>G	Y124C	1	0,008	c.1400T>C	M467T	33	0,264
c.1383T>G	Y461X	1	0,008	Total		125	1

Taula 10. Freqüència de les mutacions a SLC3A7 identificades en els 164 probands de la base de dades de l'ICC. No s'inclou un al·lel M467T perquè es tracta del tercer al·lel mutat en el pacient BB(A). *) Dos mutacions en el mateix cromosoma. &) Delecions amb límits per definir. (n) Nombre d'al·lells independents. F, freqüència.

Mutacions de tipus B (SLC7A9)							
Canvi nucleotídic	Efecte en la proteïna	(n)	F	Canvi nucleotídic	Efecte en la proteïna	(n)	F
c.977+3A>T#	A290fsX45	1	0,006	c.184G>A	V62M	1	0,006
c.1265_1266delITG	L424fsX62	1	0,006	c.206G>T#	W69L	1	0,006
c.1399+1G>T	447fsX22	1	0,006	c.206G>A#	W69X	1	0,006
c.475_477dupGCC#	A158dup	1	0,006	c.695A>G	Y232C	1	0,006
c.579_581dupCAT#	I193dup	1	0,006	c.235+3_235+293del	L30fsX9	1	0,006
c.151delT	S51fsX38	1	0,006	c.1060G>A#	A354T	1	0,006
c.368_369delCG#	T123fsX84	1	0,006	c.562G>A	V188M	1	0,006
c.501_504delACTG#	L168fsX19	1	0,006	c.604+1G>A [§] #	L160X	2	0,013
c.630_633delTTTC#	F211fsX51	1	0,006	c.604+2T>C	L160X	2	0,013
c.813delC#	N271fsX6	1	0,006	c.209C>T#	A70V	2	0,013
c.376G>A#	A126T	1	0,006	c.583G>A#	G195R	2	0,013
c.947C>T	A316V	1	0,006	c.544G>A#,	A182T,	2	0,013
				c.1060G>A#	A354T*		
c.1144G>A#	A382T	1	0,006	c.775G>A#	G259R	2	0,013
c.171C>T	N58_G79del22	1	0,006	c.688T>C, 28_30del	W230R,	3	0,019
				AGA#	R10del*		
c.586C>T	L196_G202delfsX5	1	0,006	c.730_732delGAA#	E244del	3	0,019
c.712_716delCTCAA#	N239fsX6	1	0,006	c.605-3C>A	I203fsX27	4	0,025
c.1224+4166_1399+119del	K432fsX78	1	0,006	c.368G>A#	T123M	6	0,038
c.1224+4166_1399+119dup	V409fsX9	1	0,006	c.544G>A#	A182T	8	0,051
c.187G>A#	G63R	1	0,006	c.614dupA#	L160fsX1	11	0,070
c.131T>C#	I44T	1	0,006	c.508G>A#	V170M	18	0,115
c.1400-3C>G	447fsX22	1	0,006	c.997C>T#	R333W	19	0,121
c.847C>T	L283F	1	0,006	c.311G>A#	G105R	43	0,274
c.155C>T#	P52L	1	0,006	Total		157	1

Taula 11. Freqüència de les mutacions a SLC7A9 identificades en els 164 probands de la base de dades de l'ICC. No s'inclou un al·lel c.604+2T>C perquè es tracta del tercer al·lel mutat en el pacient AA(B).*) Dues mutacions en el mateix al·lel. #) Nomenclatura actual (*The Human Genome Variation Society nomenclature*, www.genomic.unimelb.edu.au/mdi/mutnomen/) (p.e., per la mutació comú c.800-801insA, també anomenada c.799-800insA, la nomenclatura correcta és c.614dupA). §) En un pacient han estat considerats dos al·lells c.604+1G>A, encara que no es descarta hemizigosi (deguda a una delecio a l'altre al·lel). (n) Nombre d'al·lells independents. F, freqüència.

RESULTATS

11.4 DISTRIBUCIÓ D'AL·LELS DE CISTINÚRIA SEGONS EL FENOTIP I GENOTIP

Els 164 probands de cistinúria estudiats es classificaren segons els valors d'excreció urinària d'aminoàcids dibàsics i de cistina als heterozigots obligats (fenotip urinari) i segons la nova classificació genètica proposada a l'article 4 (tipus A, mutacions en *SLC3A1*; tipus B, mutacions en *SLC7A9*). Potencialment, aquests probands representen 325 al·lells independents de cistinúria (3 probands es classificaren com heterozigots de cistinúria de tipus no I, veure figura 15, apartat 12). Vem caracteritzar un total de 282 al·lells (86,8%). Encara queda un 13% dels al·lells per explicar. El total d'al·lells explicats es mostren en la taula 1 de l'article 5: un 90,5% dels probands de tipus I, un 87,6% de tipus no I, un 89,3% de tipus mixt i un 83,6% de no classificats. En 126 probands (76,8%) vem identificar els 2 al·lells mutats, en 33 (20,1%) un al·lel mutat i en 5 (un 3,0%) cap mutació. Dels probands completament explicats, 56 (34,1%) i 68 (41,5%) transmeten dues mutacions a *SLC3A1* (probands AA) i *SLC7A9* (probands BB i B+) respectivament.

Mentre quedin al·lells no explicats, no es podrà assegurar que no hi ha més gens de cistinúria, però aquests percentatges deixen poc marge a altres possibles gens, si tenim en compte que s'han analitzat principalment les zones codificants i els límits exó-intró d'aquests gens, ja que la multiplex s'ha realitzat en els pacients espanyols i alguns italians, però no tots. En tot cas, si hi hagués algun altre gen implicat en la cistinúria, tindria un impacte molt minoritari. En total, en aquests 3 articles, hem descrit 52 noves mutacions a *SLC7A9* causants de cistinúria (article 2, 3 i 5), juntament amb la p.E282K (no publicada, taula 8 i apartat 11.5.2 de Resultats) d'un total de 66 descrites fins ara (revisat a l'article 5).

11.5 CORRELACIÓ GENOTIP-FENOTIP

Les dades en les taules 1 i 3 de l'article 5 permeten calcular el nombre d'al·lells explicats classificats segons el fenotip i el genotip (taules 4 i 5, article 5): El 89,7% i el 88,3% dels al·lells associats a fenotip I i no I respectivament han estat explicats. Els al·lells explicats de tipus A i B són 125 (44,3%) i 157 (55,7%) respectivament.

La majoria dels al·lells de tipus A segreguen amb la cistinúria de tipus I, excepte la mutació dupE5-E9 que es troba associada a fenotip no I en els heterozigots obligats de 3 famílies de cistinúria de tipus mixt (taules 1 i 3 de l'article 5). Aquesta és la primera descripció d'una mutació de *SLC3A1* que es troba associada a fenotip no I en heterozigots.

Els al·lells de tipus B segregaven principalment amb fenotip no I (taules 1 i 3 de l'article 5), excepte el 14% dels al·lells B de l'ICC (article 4) (i el 12% dels al·lells B independents). Així, un proband BB, i dos probands B? són de tipus I (taula 1 de l'article 5). A més, l'al·lel amb fenotip I de 8 probands de cistinúria de tipus mixt és explicat per mutacions de tipus B (7 probands BB i un BB(A); taula 3 de l'article 5) (veure pedigrís a les figures 18 i 19). La taula 3 de l'article 5 descriu el tipus de mutació identificat a cada al·lel dels 14 probands de cistinúria de tipus mixt, que potencialment representen 14 al·lells amb fenotip I i 14 amb fenotip no I. Aquesta taula mostra que tots els genotips possibles en la cistinúria es troben en famílies mixtes, essent el genotip BB el més representatiu.

11.5.1 La dupE5-E9 de *SLC3A1* va associada a fenotip no I en la majoria dels heterozigots

Recentment, Schmidt i col·laboradors han descrit un reordenament de *SLC3A1*: c.891+1524_1618-1600dup (duplicació d'exons 5 a 9; dupE5-E9) que resulta en una duplicació en pauta dels residus E298 a D539 de la proteïna rBAT (p.E298_D539dup) com es mostra per estudis de RNA ((Schmidt *et al.* 2003b) i en l'apartat 12, (r.892_1617dup726)). Aquesta duplicació sembla que es forma per una petita inversió de 25 pb (acompanyada de la deleció de 2 pb) en l'intró 9 que juntament amb unes seqüències repetitives de tipus Alu promouen una estructura de la cromatina en aquesta regió que estimula la recombinació desigual entre les seqüències dels introns 4 i 9. Cinc probands de la base de dades de l'ICC tenen aquesta duplicació en heterozigosi. Quatre són heterozigots compostos amb mutacions a *SLC3A1* (p.M467T, F79; R452W, F14; c.765+1G>T, F92; c.1749delA, F106). Dos pacients de la cinquena família (F77) són heterozigots compostos amb les mutacions de *SLC3A1* dupE5-E9 i p.M467T, i una mutació a *SLC7A9*, c.604+2T>C, (figura 2b, article 5). Els valors d'aminoàcids a orina per a sis portadors de la dupE5-E9 d'aquestes famílies es presenten en la taula 6 (article 5). Quatre d'aquests portadors (F14-C119, F77-SR, F79-A145 i F79-A148) mostren excreció d'aminoàcids dibàsics i cistina dins del rang dels heterozigots de tipus no I. En canvi, el portador F106-D18 mostra valors d'aminoàcids en orina dins del rang control com

la gran majoria d'heterozigots de *SLC3A1*. No disposem del valor de cistina en orina de l'altre portador d'aquesta família però l'excreció en orina dels altres aminoàcids està dins del rang control, indicant fenotip I. La dupE5-E9 és la primera mutació de *SLC3A1* que mostra fenotip no I en heterozigots.

11.5.2 Onze mutacions de *SLC7A9* mostren fenotip I en heterozigots

En la taula 7 de l'article 5 es mostren les mutacions de *SLC7A9* que s'associen a fenotip I en alguns heterozigots. La p.A182T, p.G105R, p.V170M i c.614dupA són mutacions de *SLC7A9* comunes (taula 11). Sis dels onze portadors de p.A182T (55%) mostren fenotip I ja que els valors urinaris de cistina, lisina i la suma dels quatre aminoàcids estan per sota el 5è percentil dels valors d'heterozigots B+ amb fenotip no I (taula 7, article 5). En canvi, els altres cinc portadors de p.A182T mostren un nivell d'aminoàcids en orina per sobre del 95è percentil en controls (fenotip no I) i dins del rang de valors per a heterozigots B+ amb fenotip no I. La proporció d'heterozigots de tipus I que tenen les altres mutacions comunes de *SLC7A9* és variable: p.T123M (50%), p.V170M (25%), c.614dupA (5%) i p.G105R (3%). En canvi, els portadors de la mutació comuna i severa p.R333W (articles 3 i 5) mostren en tots els casos fenotip no I. A més, hem descrit portadors de sis mutacions de *SLC7A9* poc freqüents que també s'associen a fenotip I (p.G63R, p.A126T, p.G195R, p.Y232C i p.W69X) (taula 7, article 5). Més tard vem trobar la mutació p.E282K associada a fenotip I en una família espanyola. És interessant el fet que en alguns dels heterozigots de *SLC7A9* amb fenotip I, els nivells de cistina en orina, però no d'aminoàcids dibàsics, és més alt que el 95è percentil dels valors control i dins del rang més baix dels valors d'heterozigots B+ (fenotip no I). Tots els al·lels de tipus I amb mutacions a *SLC7A9*, comunes o no comunes, pertanyen a famílies mixtes (i no classificades) (pedigrís, figures 19 i 25) amb l'excepció de la família F112 que és de tipus I (el proband és un heterozigot compost de p.G105R/p.T123M) (pedigrí, figura 18). De fet, és l'únic cas en que la p.G105R es troba associada a fenotip I, i podria ser que els valors d'excreció del pare (portador de la p.G105R) no fossin correctes (errors en la presa o la mesura de la mostra).

11.5.3 Excreció d'aminoàcids a l'orina en pacients de cistinúria segons el genotip i el fenotip

La taula 8 de l'article 5 mostra l'excreció d'aminoàcids dibàsics i cistina a l'orina dels pacients, considerant el seu genotip (A o B) i el fenotip de cistinúria (I, no I o mixt). Disposàvem de 3 grups de pacients prou nombrosos per realitzar comparacions estadístiques (pacients AA de tipus I (n= 34), pacients BB de tipus no I (n=37) i pacients BB de tipus mixt (n= 11)). Els valors mitjans de cistina i els tres aminoàcids dibàsics a l'orina, així com el 5è i 95è percentil d'aquests valors són molt similars per als pacients AA de tipus I i BB de tipus no I. Això es mostra gràficament per a la suma de l'excreció d'orina dels quatre aminoàcids en la figura 1 de l'article 5. La mitjana i el 95è percentil d'excreció a l'orina de lisina, arginina i ornitina, i la suma dels quatre aminoàcids són més baixos en pacients BB de tipus mixt que en pacients AA amb tipus I i pacients BB de tipus no I. L'únic pacient BB amb cistinúria de tipus I té també uns valors d'excreció d'aminoàcids dibàsics dins del límit baix dels valors d'excreció en pacients BB de tipus no I i AA de tipus I. En canvi, els valors de cistina a l'orina eren molt similars en els grups estudiats. Això probablement reflecteix que la majoria dels pacients de cistinúria arriben al límit de solubilitat de la cistina en orina (300 mg/l o 1.2 mM) (Dahlberg *et al.* 1977), i això fa que es subestimi aquest aminoàcid en orina quan la mostra no es dilueix prèviament per dissoldre microcristalls de cistina. En efecte, el 95è percentil de nivells de cistina en orina en aquests grups de pacients (fins a ~3400 μ mol/g creatinina) representa 3.4 mM, considerant 1 g creatinina/L d'orina.

Tres pacients amb urolitiasi de cistina es van classificar com heterozigots per a mutacions de *SLC7A9* (B+) pels seus valors d'aminoàcids en orina (taula 8 i figura 1, article 5), que eren similars als del pare que transmetia la mutació (pedigrís, figura 15) i estan dins del rang d'excreció d'heterozigots B+ amb fenotip no I (taula 7, article 5). A més, aquests tres pacients excreten menys arginina i ornitina que el 5è percentil de pacients BB amb cistinúria mixta (taula 8, article 5).

RESULTATS

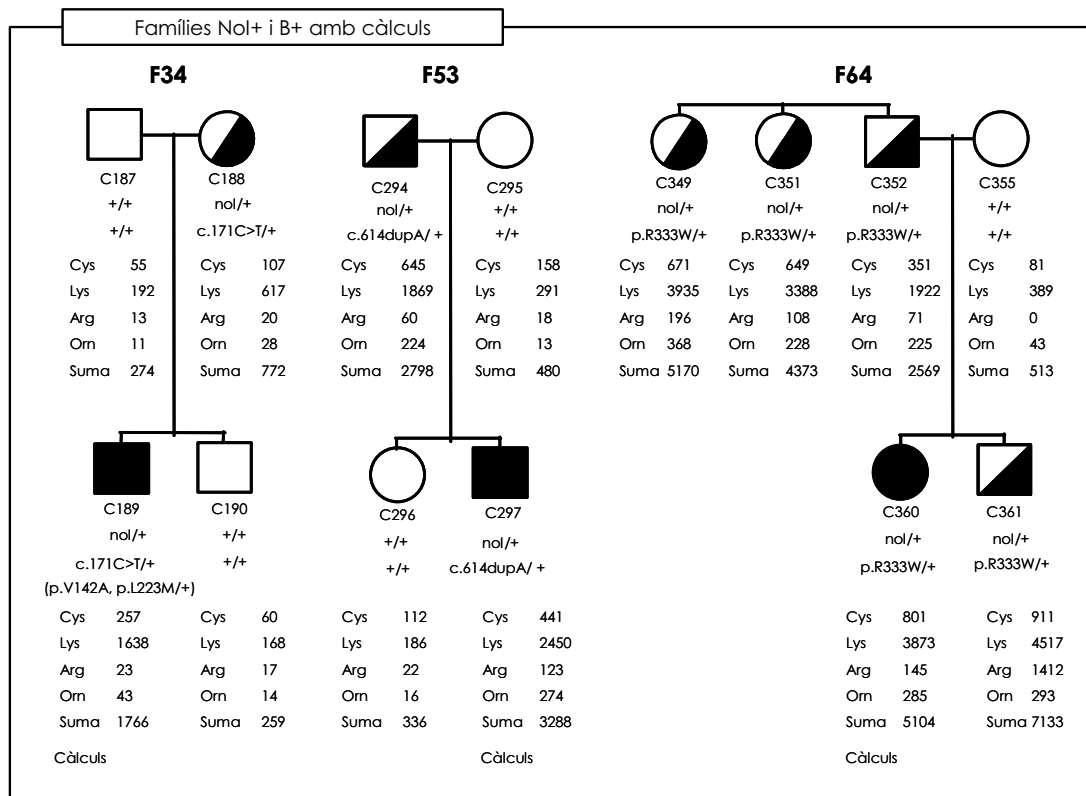


Figura 15. Pedigrís de les tres famílies de l'ICC amb pacients que presenten càlculs essent heterozigots per *SLC7A9* (B+). Les mutacions són: la c.171C>T, c.614dupA i p.R333W. Quadrat, home; Cercle, dona; □ i ○, no tipat o normal; ■ i ●, pacient; meitat negra, portador no I. Es mostra el nº d'individu, a sota el fenotip i a sota el genotip. F, família; Cys, cisteïna; Lys, lisina; Arg, arginina; Orn, ornitina.

Només hem identificat 3 pacients AA en dues famílies de cistinúria mixta en la base de dades de l'ICC (taula 7 i figura 1, article 5; veure pedigrís a la figura 19 de l'apartat 12). En les dues famílies l'al·lel no I va associat a la dupE5-E9. Els dos pacients amb valors d'excreció d'aminoàcid més alts són germans (F14) heterozigots compostos per dupE5-E9/p.R452W, i un d'ells mostra una aminoacidúria molt elevada. El defecte sever esperat per les mutacions p.R452W (substitució d'aminoàcid no conservativa) i la dupE5-E9 (l'única mutació de *SLC3A1* que s'associa amb fenotip no I en heterozigots) podria contribuir al sever fenotip urinari d'aquest pacient. El tercer pacient (F79), que té l'excreció d'aminoàcids més baixa (dins del rang baix de pacients AA (tipus I)), és un heterozigot compost de dupE5-E9/p.M467T. Els pacients homozigots per la p.M467T o els heterozigots compostos que tenen la p.M467T mostren els valors d'excreció d'aminoàcids en orina més baixos que els dels pacients AA sense aquesta mutació (article 5). En efecte, tres pacients homozigots per la p.M467T mostren uns nivells entre els més baixos en pacients AA (les sumes dels quatre aminoàcids són 5613, 6433 i 8113 $\mu\text{mol/g}$ creatinina). Per això, el fenotip suau de p.M467T podria contribuir als valors d'excreció d'aminoàcid baixos d'aquest heterozigot compost: dupE5-E9/p.M467T.

Més tard va arribar una altra família mixta AA (F126): que té la p.R452W en homozigosi o hemizigosi. Sigui com sigui el portador no I (el pare) té la p.R452W. El més probable és que es tracti d'una família AAB ja que en la resta de pacients amb aquesta mutació a *SLC3A1* s'associen a fenotip I. Una opció menys plausible seria que es tracti d'una altra mutació *SLC3A1* amb fenotip no I.

11.5.4 Herència digènica que provoca un fenotip parcial en dues famílies de cistinúria

Com s'ha comentat, s'han estudiat casos en els que en una mateixa família, els fenotips I i no I coexisteixen (famílies mixtes)(veure pedigrís a la figura 19 de l'apartat 12). Hi ha 2 famílies de l'ICC que a

més de ser mixtes, tenen mutacions als dos gens.

El pacient BB(A) (F35; figura 2a, article 5) és un heterozigot compost p.Y232C/p.G105R (*SLC7A9*) que també és portador de la mutació de *SLC3A1* p.M467T. Les mutacions p.Y232C (B) i p.M467T (A) mostren fenotip I, mentre que p.G105R (B) mostra fenotip no I als heterozigots d'aquesta família. Per tant, aquest pacient BB(A) presenta cistinúria de tipus mixt, amb valors d'excreció molt baixos, similars al 5è percentil dels valors en pacients BB de tipus no I. Dos membres d'aquesta família són portadors dobles AB (p.M467T/+ i p.G105R/+). Aquests dos portadors dobles presenten valors d'excreció urinaris més alts que els heterozigots simples dins de la família (p.G105R/+ o p.M467T/+) suggerint que l'herència digènica agreuja el fenotip cistinúric sense arribar a causar urolitiasi.

El pacient AA(B) (F77; figures 1 i 2b, article 5) mostra valors d'aminoàcids molt elevats en orina i en l'època de realització d'aquest estudi la seva germana estava en diàlisi. Ambdós tenen 2 mutacions a *SLC3A1* (dupE5-E9 i p.M467T) i la mutació de *SLC7A9* c.604+2T>C (nomenclatura correcta de la c.789+2T>C). La p.M467T s'associa a fenotip I, mentre que la dupE5-E9 mostra fenotip no I als heterozigots d'aquesta família. Per tant, aquests pacients AA(B) han estat classificats com a cistinúria mixta. La mutació de tipus B sembla que contribueix al fenotip sever en aquests pacients. Així, un d'aquests pacients (p.M467T/dupE5-E9; c.604+2T>C/+) excreta quantitats més grans d'aminoàcids (Cys, 2569; Lys, 9836; Arg, 2952; Orn, 5172) que el pacient p.M467T/dupE5-E9 (F79, tipus mixt) (Cys, 784; Lys, 3308; Arg, 1234; Orn, 718) (taula 7 i figura 1, article 5). En canvi, la mutació suau p.M467T no semblava agreujar el fenotip del portador doble en la família 77 (p.M467T/+ i c.604+2T>C/+). De fet, l'aminoacidúria en aquest portador doble és més baixa que la dels dos heterozigots simples de c.604+2T>C de l'ICC (F58), que mostren l'aminoacidúria més elevada entre els heterozigots B+ en la nostra base de dades.

RESULTATS

12 RESUM MUTACIONS

En aquest apartat es descriuen les mutacions i polimorfismes identificats a *SLC7A9*. S'han utilitzat moltes tècniques diferents per a l'anàlisi dels gens en els pacients espanyols de cistinúria en aquesta tesi: DNA-SSCP/HD, seqüenciació directa, digestions amb enzims de restricció, PCR Multiplex semiquantitativa, RT-PCR.

Les mutacions noves juntament amb aquelles prèviament publicades per l'ICC i per altres grups fan un total de 105 i 66 mutacions identificades a *SLC3A1* i *SLC7A9* respectivament (taules 7 i 8): 30 *frameshift* (15 a *SLC3A1* i 15 a *SLC7A9*), 7 sense sentit (5 a *SLC3A1* i 2 a *SLC7A9*), 18 de *splicing* (7 a *SLC3A1* i 9 a *SLC7A9*), 91 de canvi de sentit (60 a *SLC3A1* i 31 a *SLC7A9*), 3 silencioses (1 a *SLC3A1* i 2 a *SLC7A9*), 5 delecions o insercions d'un residu d'aminoàcid (1 a *SLC3A1* i 4 a *SLC7A9*), 18 grans reordenaments (14 a *SLC3A1* i 4 a *SLC7A9*), i 2 variants de seqüència específiques de cistinúria a la regió de promotor de *SLC3A1* (figura 16). Totes són mutacions causatives ja que, cosegrecuen amb la malaltia i no apareixen en la població control (per cada una d'elles s'han analitzat un mínim de 100 cromosomes control i en cap cas s'ha identificat la mutació). Les mutacions identificades de *SLC3A1* i *SLC7A9* per l'ICC han estat introduïdes a la base de dades de mutacions HGMDB (*Human Genome Mutation Database*) (www.hgmd.org).

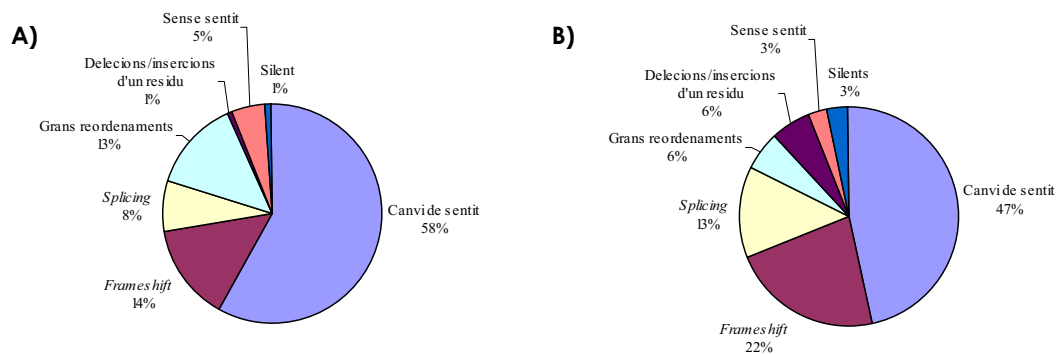


Figura 16. Distribució de les totes les mutacions publicades a *SLC3A1* (A) i *SLC7A9* (B) segons el tipus de mutació. Es mostren els percentatges de cada tipus de mutació. Aproximadament la meitat de mutacions són de canvi de sentit (58% en A i 47% en B). L'altre 50% són principalment mutacions de canvi de pauta de lectura, de *splicing* i grans reordenaments. Les delecions d'un residu en pauta i les mutacions sense sentit representen menys d'un 10% del total de mutacions.

Hem establert la primera correlació genotip-fenotip de cistinúria, treball que donà lloc a les publicacions 2, 3 i 5 presentades en aquesta memòria. A mesura que s'anava ampliant el nombre de pacients caracteritzats genèticament, es va poder ampliar l'estudi de correlació genotip-fenotip i vam adonar-nos que la classificació, tenint en compte el fenotip, era imprecisa i per això vam proposar classificar els pacients en funció dels resultats genètics (article 4). A les figures 15, 17, 18, 19 i 23 es presenten les famílies estudiades per la doctoranda.

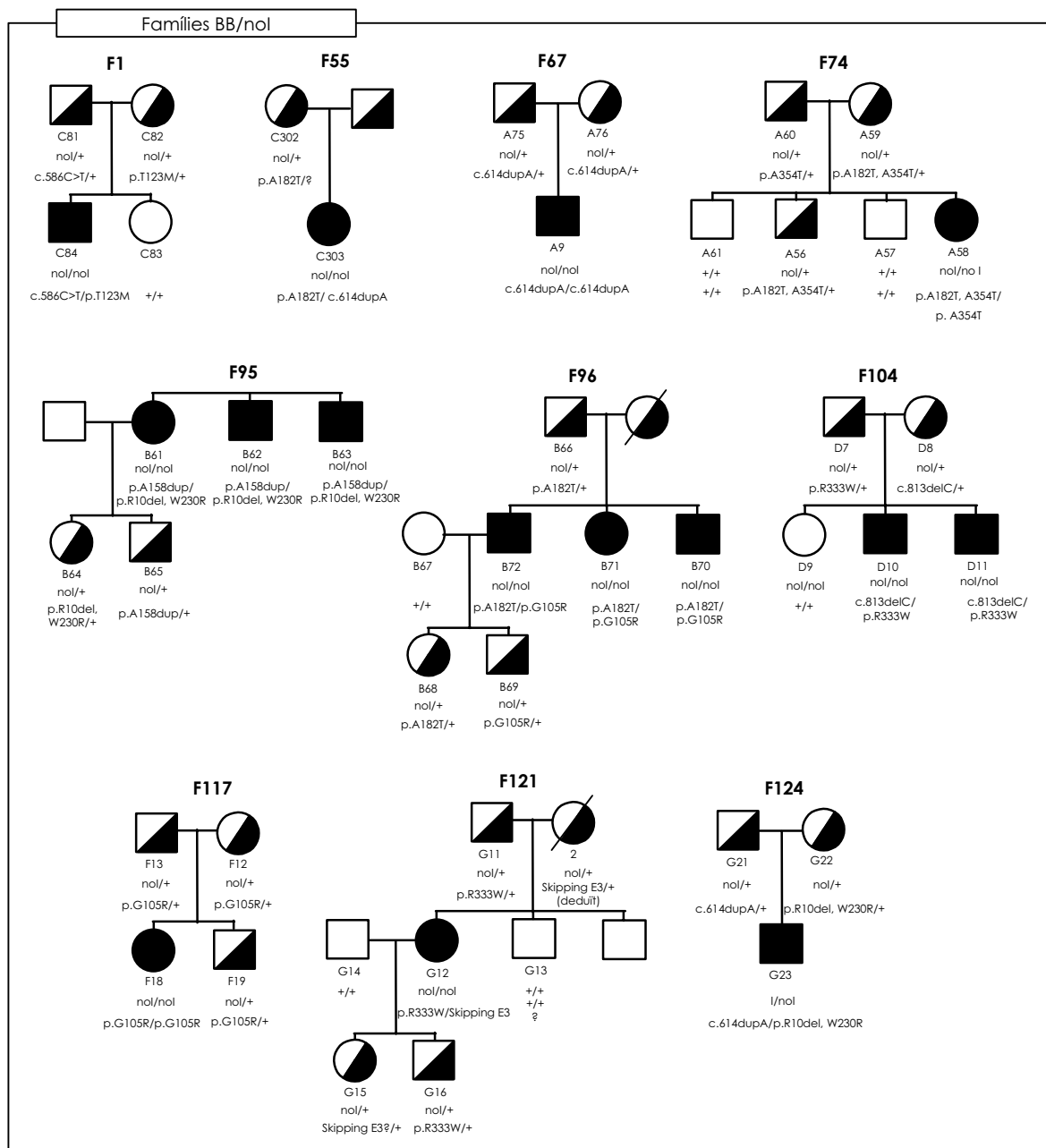


Figura 17. Pedigrís de les famílies espanyoles BB amb fenotip Nol estudiades. Quadrat, home; cercle, dona; □ i ○, no tipat o normal; ■ i ●, pacient; meitat negra, portador no I punt; negre, portador I. Es mostra el nº d'individu, a sota el fenotip i a sota el genotip.

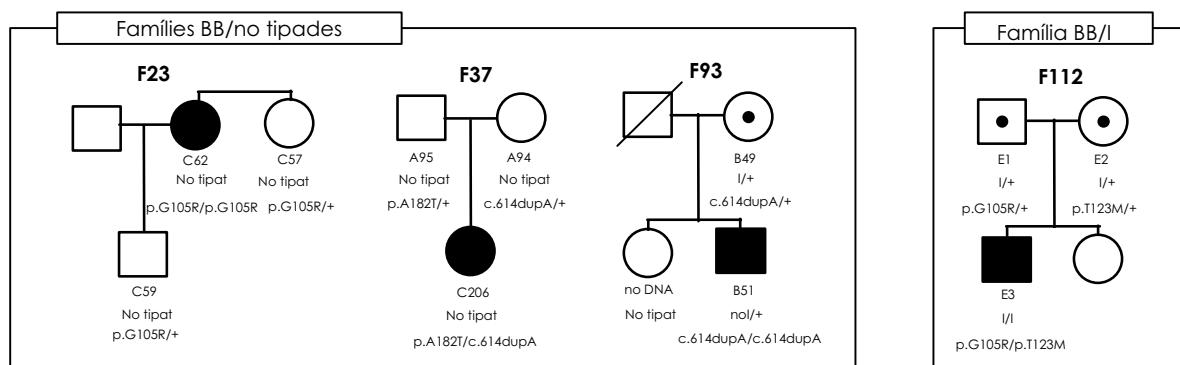


Figura 18. Pedigrís de les famílies espanyoles BB no tipades i de tipus I estudiades. Quadrat, home; cercle, dona; □ i ○, no tipat o normal; ■ i ●, pacient; meitat negra, portador no I punt; negre, portador I. Es mostra el nº d'individu, a sota el fenotip i a sota el genotip.

RESULTATS

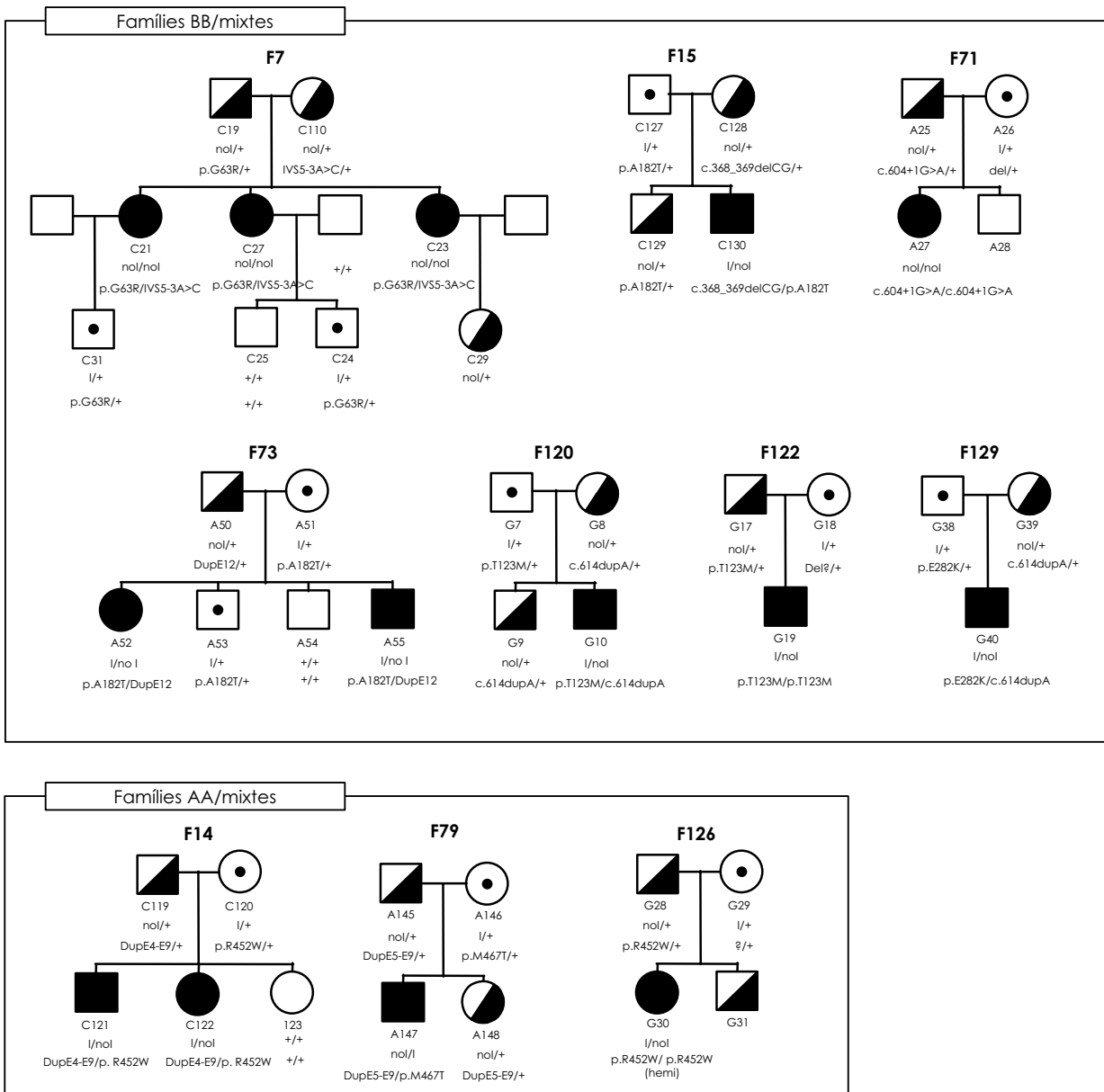


Figura 19. Pedigrís de les famílies de tipus mixte estudiades a Barcelona (BB i AA). Quadrat, home; cercle, dona; □ i ○, no tipat o normal; ■ i ●, pacient; meitat negra, portador no l punt; negre, portador l. Es mostra el nº d'individu, a sota el fenotip i a sota el genotip. Els pedigrís de les dues famílies mixtes amb herència digènica estan a l'article 5.

12.1 DESCRIPCIÓ DE LES NOVES MUTACIONS TROBADES A *SLC7A9* PER L'ICC

Vint-i-nou de les 51 mutacions a *SLC7A9* recollides en els articles 2, 3 i 5 han estat identificades i caracteritzades, fins on s'ha pogut, per la doctoranda (figura 20), en pacients de cistinúria de tipus no I i no classificats: 25 mutacions identificades en famílies espanyoles, 1 mutació d'*splicing* en l'únic al·lel llibi que faltava per explicar i 3 mutacions en famílies italianes. Es van analitzar més de 100 cromosomes control per a cada una d'aquestes mutacions analitzades.



Figura 20. Patró de SSCP i seqüència de 26 noves mutacions trobades per la doctoranda. La majoria d'aquestes mutacions s'han trobat en pacients espanyols, excepte la p.G63R, la c.605-3C>A, la delACTG (en pacients italians), la c.1399+3_+6delAAGT (en 2 germans jueus libis) i la p.A354T (en un pacient belga).

RESULTATS

Tot i que les mutacions es localitzen al llarg de tot el gen *SLC7A9* i només en 2 dels 13 exons (el primer i l'últim que no són codificants, E1 i E13) no s'ha identificat cap mutació, s'observa una tendència a l'agrupament en determinades regions: Si ens fixem en la distribució de les mutacions (figures 21 i 22A), veiem que no hi ha un *hot spot* de mutació, es distribueixen per tot el gen de manera similar, essent els exons 3, 4 i 5 els que presenten més diversitat de mutacions (figura 22 A, barres llises). Però en analitzar-ho respecte el nombre d'al·lels mutats observem que els exons 4, 5, 6 i 10 són els que tenen més al·lels mutats (figura 22 A, barres ratllades).

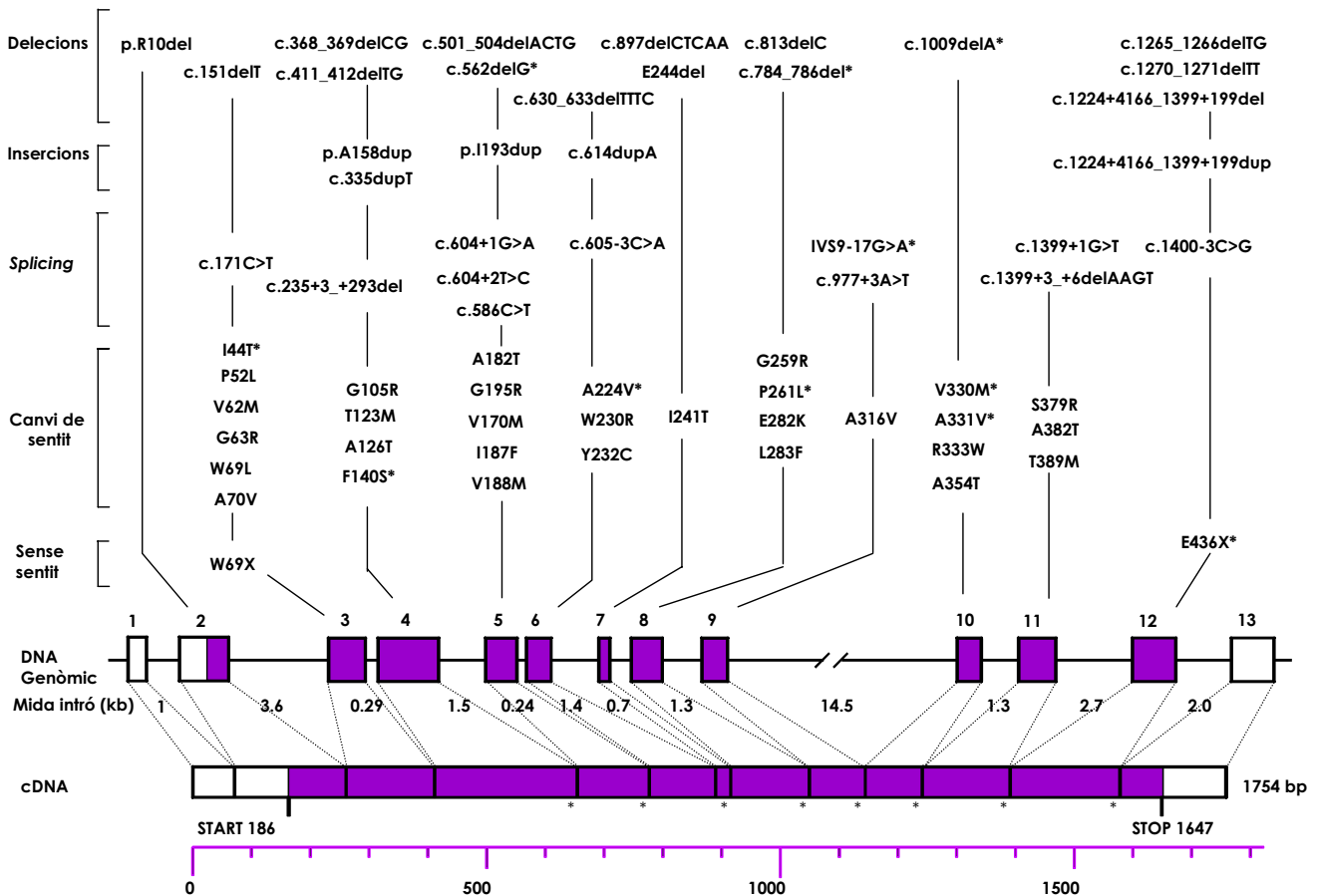


Figura 21. Distribució de les diferent mutacions per exons en el gen *SLC7A9*. El 80% de les mutacions (52) han estat identificades per l'ICC. Les mutacions identificades per altres grups estan marcades amb un asterix.

Quan es miren els resultats separant per poblacions, observem que en el cas de la població espanyola, la majoria d'al·lels mutats es concentren en els exons 4, 5 i 6 (figura 22 B), essent els al·lels majoritaris de l'exó 6 els corresponents a la mutació c.614dupA que es troba principalment en la població asturiana. És a dir que en els pacients espanyols caldria iniciar la cerca de mutacions en els exons 4 i 5, i concretament, es podria començar analitzant la presència de la p.G105R i la p.T123M (E4) i la p.A182T (E5), i si la mostra prové d'Astúries la c.614dupA (E6) i la 10delR, W230R (E1, E6) que representen el 83% i 17% del total d'al·lels B d'aquesta població respectivament. En el cas de la població italiana, els al·lels mutats es concentren en els exons 4, 5 i 10 (figura 22 C), per tant en aquesta població seria convenient iniciar la cerca en aquests exons, i concretament, es podria començar analitzant la presència de la p.G105R (E4) i la p.R333W (E10). Pel que fa la població jueva, tots els individus amb mutacions a B analitzats tenen la p.V170M i només un proband té la c.1399+3_+6del AAGT a l'exó 11 i la p.V170M a l'altre al·lel (figura 22 D).

És interessant remarcar el fet que la majoria de famílies de l'ICC amb fenotip mixt són espanyoles, ja que en aquesta població és on s'han trobat precisament dues de les mutacions més freqüents, que a més

sovint van associades a fenotip I, la p.A182T i la p.T123M.

El fet de conèixer les freqüències al·lèliques per les diferents mutacions de grups grans de pacients en diferents poblacions permet direccionar la cerca de mutacions estalviant temps i diners.

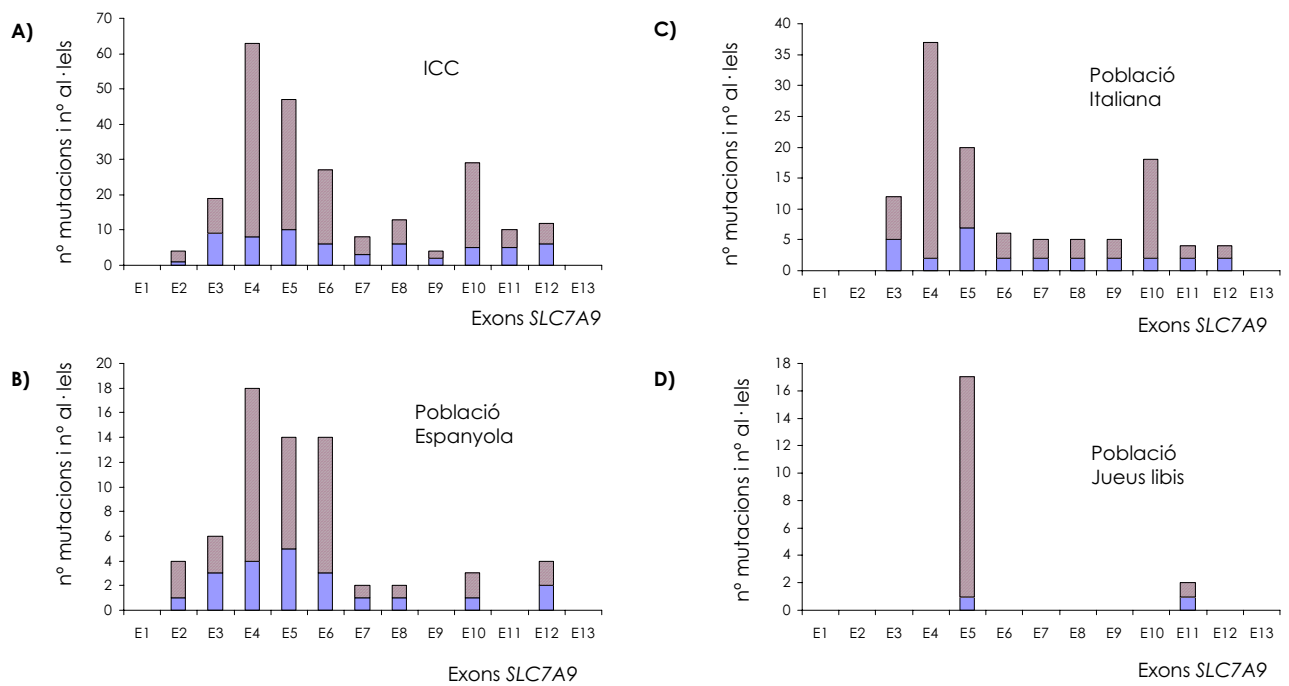


Figura 22. Distribució de les mutacions al llarg del gen SLC7A9. A) En aquesta figura es representen el nombre de mutacions diferents trobades en els pacients de l'ICC en cada exó (barres llises) i el nombre d'al·lèls mutats (barres ratllades). En l'exó 4 hi ha les mutacions p.G105R (43 al·lèls) i p.T123M (6 al·lèls), en l'exó 5 les mutacions p.V170M (18 al·lèls) i p.A182T (8 al·lèls), en l'exó 6 les mutacions c.614dupA (11 al·lèls), c.605-3C>A (4 al·lèls) i p.W230R (3 al·lèls), i en l'exó 10 la p.R333W (19 al·lèls). També es mostra la distribució en la població espanyola (B), italiana (C) i jueva (D).

RESULTATS

12.2 DESCRIPCIÓ DE LES NOVES MUTACIONS TROBADES A *SLC3A1* EN PACIENTS ESPANYOLS

En la figura 23 es presenten els pedigrís de les famílies de tipus A estudiades per la doctoranda. Totes aquestes famílies han estat estudiades completament per *SLC7A9*, sense trobar cap mutació, ja que es tractava de famílies no tipades i/o sense cap mutació en el moment de començar l'anàlisi de mutacions a *SLC7A9*. La doctoranda també va trobar la dupE5-E9 a *SLC3A1* en 5 famílies espanyoles, i va cercar mutacions en tot el gen *SLC3A1* en les famílies F110, F123, F128 i F130, identificant 3 noves mutacions a *SLC3A1*, c.1221dupT, p.P441R i p.T189M, a part de mutacions ja descrites prèviament. A més s'ha estudiat en RNA la dupE5-E9 i c.1749delA de *SLC3A1*.

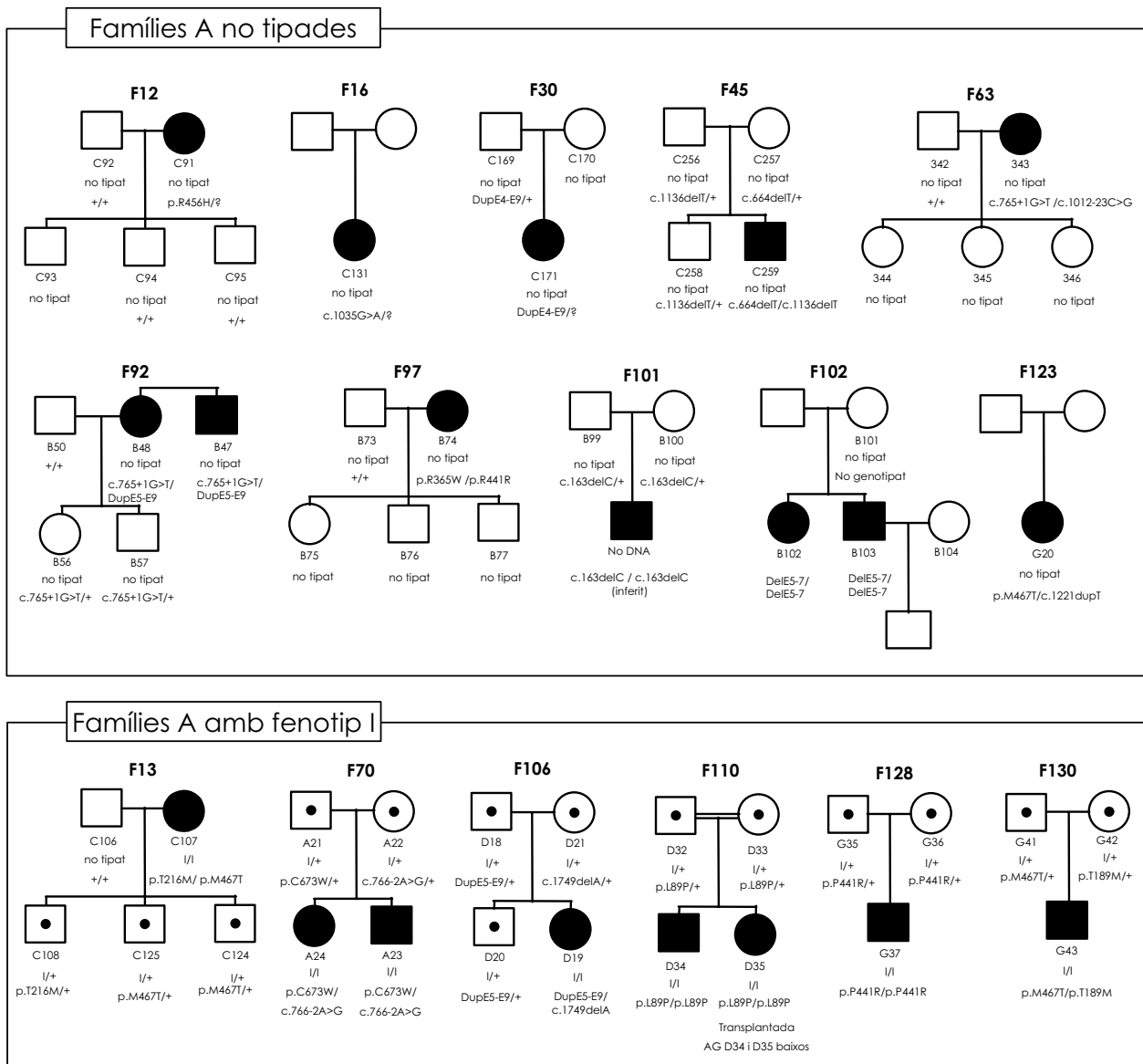


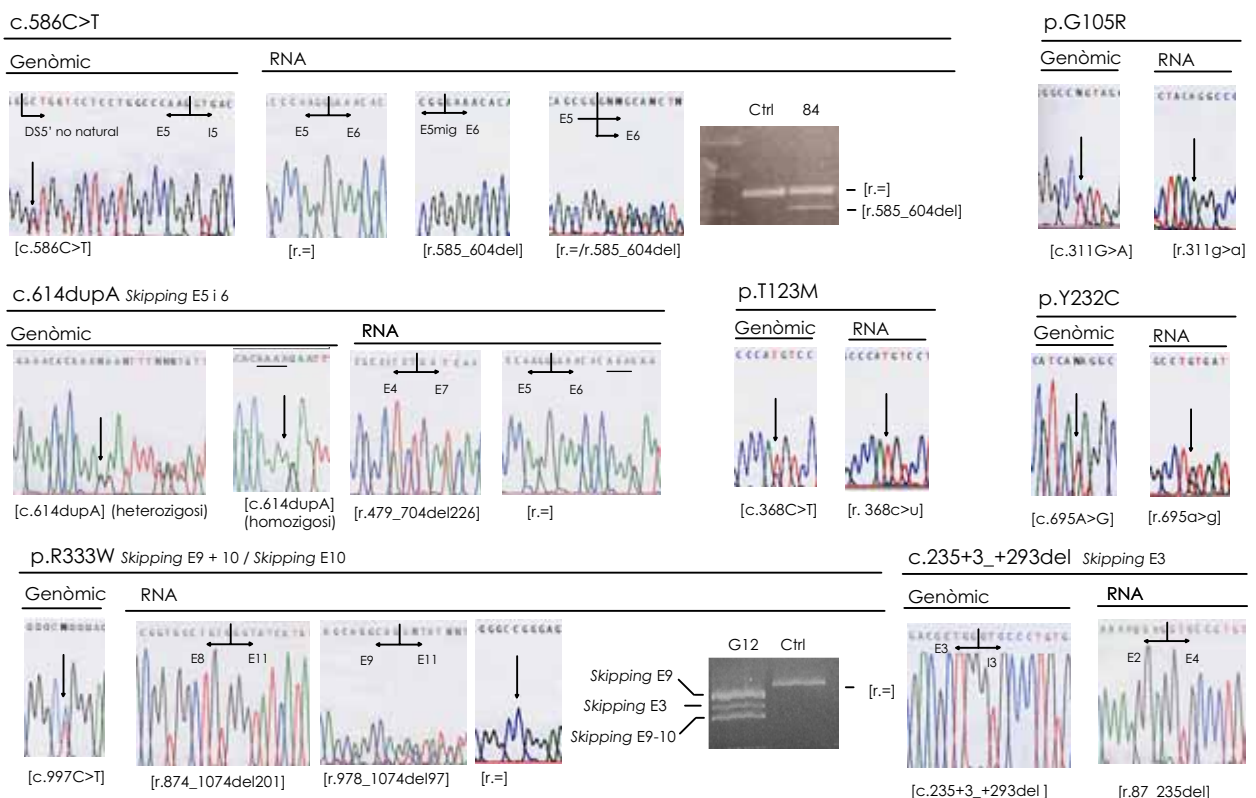
Figura 23 Pedigrís de famílies de tipus A estudiats per la doctoranda. En la majoria d'aquestes famílies, que són principalment no tipades, es van buscar mutacions a tot el gen *SLC7A9*, ja que es tractava de famílies no tipades. A més, a rBAT s'han identificat les mutacions de les famílies F30, F92, F123, F128 i F130; i la dupE5-E9 en 5 de les famílies amb aquesta mutació. Quadrat, home; cercle, dona; □ i ○, no tipat o normal; ■ i ●, pacient; meitat negra, portador no I punt; negre, portador I. Es mostra el nº d'individu, a sota el fenotip i a sota el genotip.

12.3 ESTUDIS DE RNA EN ELS PACIENTS

Les mutacions en els al·lels no explicats podien ser degudes a mutacions en les zones intròniques les quals no havien estat estudiades. Una possibilitat per detectar mutacions de *splicing* produïdes per mutacions al mig dels introns (ISE i ISS) o dins dels exons (ESE i ESS) era estudiar el mRNA d'aquests pacients. El problema era que disposàvem de mostres de RNA de molt pocs pacients. A més, l'amplificació per RT-PCR sovint era difícil ja que aquests gens tenen transcripció il·legítima en limfòcits.

Es va analitzar el mRNA de 8 mutacions de *SLC7A9*: p.G105R, p.T123M, p.V170M (aquesta es va analitzar a Israel), p.Y232C, p.R333W, c.614dupA, c.235+3_+293del, i c.586C>T i 3 mutacions de *SLC3A1*: c.1012-23C>G (*skipping* E6) (Maite Jiménez, tesi doctoral), c.1749delA (*skipping* E5,6 i 7), i dupE5-E9 (veure taula 12 i figura 24).

Mutacions a *SLC7A9* (B)



Mutacions a *SLC3A1* (A)

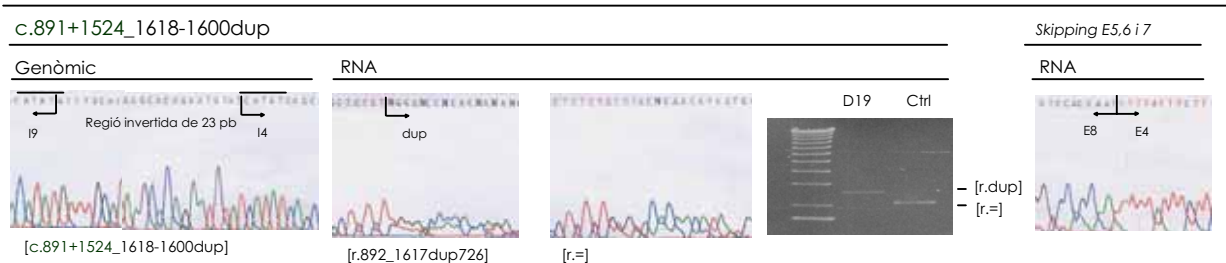


Figura 24. Gels de cDNA i seqüències de genòmic i de cDNA de les mutacions analitzades en RNA. Els encebadors utilitzats per realitzar les diferents RT-PCR estan a la taula 24 de materials i mètodes. Els gels de RNA mostrats són dels individus C84, G12 (pedigrís, figura 17) i D19 (pedigrís, figura 23).

Els mRNA portadors de les mutacions p.G105R, p.T123M, p.V170M i p.Y232C semblen estables ja que per RT-PCR de pacients heterozigots compostos es detecten els al·lels [r.311g>a], [r.368c>u], [r.508g>a] [r.695a>g] en la mateixa proporció que l'al·lel normal, però cal tenir en compte que no s'han

RESULTATS

fet estudis quantitativs (figura 24). En expressar la proteïna *in vitro* d'uns quants mutants (figura 3B, article 3) s'observà que tots els mutants s'expressaven en quantitats semblants en les cèl·lules transfectades, excepte el mutant p.G105R, que tenia menys quantitat de proteïna, indicant que probablement no es tradueix o pateix una degradació ràpida. En el cas de les mutacions c.586C>T, p.R333W, c.614dupA i c.235+3_c.235+293del, es produeix un *splicing* erroni (veure apartat següent).

12.4 MUTACIONS DE *SPlicing* FORA DELS LLOCS CONSENS

En aquesta memòria es presenten 12 noves mutacions de *splicing* del gen *SLC7A9* identificades per l'ICC de les 13 publicades (taula 8). Vuit afecten les seqüències consens: i) 6 mutacions puntuals: 4 afecten un donador de *splicing* (c.604+1G>A, c.604+2T>C, c.977+3A>T, c.1399+1G>T) i 2 afecten un acceptor (c.605-3C>A i c.1400-3C>G); i ii) 2 delecions d'un donador de *splicing* (c.235+3_c.235+293del i c.1399+3_+6delAAGT). També s'ha publicat una mutació al lloc de branca de l'intró 9: c.874-17G>A (Leclerc *et al.*, 2002). Les altres 4 són mutacions exòniques, que després d'estudiar el seu efecte a mRNA, en tres d'elles s'ha observat que afecten seqüències reguladores de *splicing*: la mutació silent c.586C>T, la *missense* p.R333W i la *frameshift* c.614dupA (veure figura 24 i taula 12). Les dues últimes són la segona i quarta mutació més freqüents en la nostra cohort de pacients (veure taula 8). També hem identificat una altra mutació silent que probablement crea un donador de *splicing* alternatiu, encara que no s'ha pogut comprovar en RNA: c.171C>T.

Mutacions <i>SLC7A9</i>			
Canvi proteïna	Canvi genòmic	Canvi RNA	Efecte <i>Splicing</i>
p.G105R	c.311G>A	[r.311g>a]	normal
p.T123M	c.368C>T	[r.368c>u]	normal
p.V170M	c.508G>A	[r.508g>a]	normal
p.L160fsX1	c.614dupA	[r.479_704del226]	<i>Skipping</i> E5-E6
p.R333W (p.T292_Y358del67, p.R327fsX2)	c.997C>T	[r.874_1074del201, r.978_1074del97]	<i>Skipping</i> E10, <i>Skipping</i> E9-E10
p.Y232C	c.695A>G	[r.695a>g]	normal
p.L30fsX10	c.235+3_c.235+293del	[r.87_235del]	<i>Skipping</i> E3
p.L196_G202delfsX5	c.586C>T	[r.=/r.585_604del]	<i>Splicing</i> erroni
p.N58_G79del22	c.171C>T	no RT	<i>Splicing</i> erroni predit
Mutacions <i>SLC3A1</i>			
p.D338_Y378delfsX5	c.1012-23C>G	[r.1012_1136del]	<i>skipping</i> de E6
p.T583fsX14	c.1749delA		<i>skipping</i> E5, 6 i 7
p.E298_D539dup	c.891+1524_1618-1600dup	[r.892_1617dup726]	normal
p.D338fsX4	c.1035G>A	no RT	<i>Splicing</i> erroni predit

Taula 12. Mutacions analitzades en RNA. Hem analitzat l'efecte en el RNA de 8 mutacions de *SLC7A9* i 3 de *SLC3A1*. Els encebadors utilitzats per realitzar les diferents RT-PCR estan a la taula 25 de materials i mètodes. En aquesta taula a més hem afegit dues mutacions silents que probablement afecten el *splicing* encara que no s'ha pogut demostrar.

Els 2 canvis exònics silenciosos a *SLC7A9*: c.171C>T i c.586C>T no es trobaven en controls (106 cromosomes analitzats) i segregaven en concordança amb l'altra mutació, però només disposàvem de RNA d'un dels pacients, cosa que ens va permetre demostrar el que ja havíem previst mitjançant programes de predicció de *splicing*: la c.586C>T provoca un *splicing* aberrant entre l'exó 5 i el 6 degut a que es crea un donador d'*splicing* alternatiu 20 pb abans d'acabar-se l'exó 5 (a 5' del donador natural) (article 5 i figura 24). S'ha pogut comprovar per RT-PCR que part de les molècules de hnRNA (*heterogeneous nuclear RNA*) pateixen un procés de *splicing* erroni que resulta en una molècula de mRNA que conté una deleció de 20 nucleòtids que va de la posició 585 a 604 del cDNA [r.=; r.585_604del], i provoca un canvi en la pauta de lectura, la proteïna predita estaria formada per 195 residus més 5 aminoàcids sense sentit afegits (p.L196_G202delfsX5) (article 5). Les 3 mutacions restants presenten *skippings* de diferents exons:

En el cas de la p.R333W s'ha vist que el canvi detectat a genòmic no és present en RNA sinó que es produeixen dos *skippings* alternatius: un *skipping* dels exons 9 i 10 i un de l'exó 10 [r.874_1074del201; r.978_1074del97], que en cas de traduir-se originarien dues proteïnes diferents: p.T292_Y358del67 (deleció en pauta), p.R327fsX2 (trencament de pauta) respectivament. Els resultats del programa *ESEfinder* per aquest canvi (c.997C>T) prediuen que es localitza en dos ESE putatius per al factor SF2/ASF i redueix

la predicció d'aquests possibles ESE: de 2,60 a 0,07 i de 2,24 a 0,78, per sota el llindar (llindar= 1.96), suggerint un *splicing* aberrant (annex 3, Resultats de *ESEfinder*).

La c.614dupA tampoc s'observa a RNA, només es detecta un *skipping* dels exons 5 i 6 [r.479_704del226] que provoca un canvi en la pauta de lectura, suggerint que totes les mol·lècules de RNA són anormals. En traduir-se la proteïna predita estaria formada per 161 residus, l'últim sense sentit (p.160fsX1) (article 3). També sembla que hauria d'afectar un ESE, però el programa *ESEfinder* no el prediu (annex 3, Resultats de *ESEfinder*), encara que sembla que aquest programa només prediu el 50% d'ESE (veure més avall).

La c.235+3_+293del és una deleció de 290 nucleòtids a partir de la posició 3 del donador de *splicing* de l'intró 3 que produeix un *skipping* de l'exó 3, detectat per RT-PCR: [r.87_235del] (figura 24). El canvi de pauta de lectura provocat per aquesta deleció intrònica produiria una proteïna truncada de només 39 residus, els 10 últims sense sentit (article 5), i per tant es produiria una proteïna sense cap segment TM (p.L30fsX10).

Com ja s'ha comentat, la p.R333W i la c.614dupA són mutacions molt freqüents en la cohort de l'ICC i estan associades a fenotips severos en heterozigots. La c.235+3_293del s'ha trobat només en una família i va associada a fenotip sever també (F121, pedigrí a la figura 17).

Pel que fa a rBAT, només s'han estudiat 3 mutacions exòniques per RT-PCR i d'aquestes la c.1749delA presenta un *skipping* dels exons 5, 6 i 7 (figura 24). Aquest al·lel a part de contenir la c.1749delA (comprovat per RT) deu presentar una segona mutació en algun dels introns 4, 5, 6 o 7, que provoqui el *skipping*, ja que el canvi c.1749delA està en l'exó 10, molt allunyat de la zona de *skipping*. Aquest pacient només té dos polimorfismes en homozigosi en els exons 1 i intró 7 (c.114C>A i c.1332+7T>C respectivament). El més probable és que es tracti d'una mutació localitzada en una enhancer de *splicing* intrònic (ISE), i aquest canvi podria ser el fins ara considerat polimorfisme c.1332+7T>C. De totes maneres el més probable és que es tracti d'un altre canvi, en heterozigosi, encara no identificat en un d'aquests quatre introns, ja que el *skipping* s'ha detectat en un al·lel. Maite Jiménez trobà també una mutació intrònica, la c.1012-23C>G a *SLC3A1*, que produeix el *skipping* de l'exó 6, i que podria estar localitzada en un enhancer de *splicing* intrònic (ISE), ja que es troba al mig d'un motiu ric en A i C, fet que fa que aquesta regió pugui ser un ISE, com s'ha vist per a altres seqüències riques en A i C (ACEs o A/C rich ISEs) (Coulter *et al.* 1997). A més, la mutació c.1035G>A a *SLC3A1*, segons el programa de predicció *ESEfinder*, estaria localitzada al mig d'un ESE reconegut pel complex SF2/ASF (Liu *et al.* 1998). L'altra mutació de *SLC3A1* estudiada per RT-PCR és la dupE5-E9: s'ha confirmat l'existència de mRNA amb la duplicació en pauta (figura 24).

Tres de les vuit (37,5%) mutacions puntuals de *SLC7A9* analitzades a RNA en aquest estudi resulten ser mutacions de *skipping* o *splicing* erroni (veure taula 12 i figura 24). Fa més d'una dècada es va publicar un estudi que postulava que el 15% de mutacions puntuals que ocasionen les malalties genètiques humanes eren de *splicing* (Krawczak *et al.* 1992). És probable que aquest valor estigués subestimat perquè l'anàlisi es limitava a mutacions en les seqüències de lloc de *splicing* clàssiques, els únics elements de *splicing* àmpliament reconeguts en l'època. Actualment se sap que també existeixen mutacions que interrompen elements de *splicing* exònics (ESE i ESS). Donades les prediccions recents que la majoria d'exons humans contenen ESE (Liu *et al.* 2001; Fairbrother *et al.* 2002), s'ha observat que una fracció significativa de mutacions exòniques que provoquen malaltia en realitat són mutacions de *splicing* en zones no consens (Cooper and Mattox 1997; Caceres and Kornbliht 2002; Cartegni *et al.* 2002). L'efecte d'una mutació sobre l'expressió gènica s'assumia generalment basant-se en la seva localització dins del gen. Així, fins fa poc s'assumia que les mutacions exòniques provocaven malaltia perquè afectaven només la codificació: les mutacions silencioses s'havien ignorat com a potencial causants de malaltia, les de canvi de sentit (*missense*) se suposava que creaven una alteració significativa en la funció de la proteïna, i les sense sentit (*nonsense*) s'assumia que portaven a expressió de proteïnes truncades no funcionals o amb canvi de funció o la pèrdua de funció provocada per NMD (*Nonsense-mediated mRNA decay*), que és un procés conservat que permet la detecció de codons d'acabament prematurs dins una molècula de mRNA i aquesta és degradada més per evitar la producció de polipèptids truncats potencialment nocius. Però una fracció significativa de mutacions exòniques provoquen malaltia per un *splicing* anormal més que per un efecte directe sobre el potencial de codificació (Cartegni *et al.* 2002). La caracterització de nombroses mutacions en RNA al gen de la neurofibromatosis NF1 (Ars *et al.* 2000) i al gen de l'ataxia-telangiectasia ATM (Teraoka *et al.* 1999) mostrà que el 43-48% d'aquestes mutacions causen alteracions de *splicing*.

RESULTATS

Com que s'ha analitzat el RNA de 5 de les 6 mutacions de *SLC7A9* més freqüents (excepte la cinquena més freqüent, p.A182T) (taula 11), podem fer una estimació de la contribució de les mutacions que afecten el *splicing* en aquest gen respecte el total d'al·lels mutats en els pacients de l'ICC. La p.R333W i la c.614dupA són la segona i la quarta mutació més freqüents a *SLC7A9* dins el nostre grup de pacients, i juntament amb les altres mutacions de *splicing* que afecten les seqüències consens de *splicing*, representen un 28% del total de al·lels B. Aquest percentatge de *splicing* erroni del gen *SLC7A9* segurament està infravalorat perquè hi deuen haver més mutacions que afecten ESE. La prova definitiva de si una mutació que provoca malaltia afecta el *splicing* és l'anàlisi directa del mRNA i de l'estabilitat del mRNA per detectar NMD. Caldria analitzar el RNA de totes les mutacions exòniques identificades per saber si afecten algun ESE. Tot i així aquest percentatge representa més del triple dels al·lels amb mutacions de *splicing* en les zones consens (7,6%).

Idealment, el RNA s'hauria d'analitzar en el teixit afectat perquè algunes mutacions de *splicing* en *cis* poden tenir efectes específics de tipus cel·lular (Slaugenhaupt *et al.* 2001). Desafortunadament, sovint no es disposa dels teixits apropiats per analitzar el *splicing*. Nosaltres només disposàvem de RNA extret de limfòcits de sang perifèrica, per tant podria ser que els *skippings* i *splicings* erronis detectats a mRNA no es donin en el tipus cel·lular diana de la malaltia, o bé que les mutacions que suposadament no afecten el *splicing* a limfòcits sí que l'afectin en les cèl·lules de l'epiteli renal, ja que el *splicing* d'aquests gens podria estar regulat per factors de *splicing* específics de teixit. Com alternatives, les mutacions que afecten ESE o ESS s'han identificat utilitzant la transfecció transitòria de minigens o amb assaigs de *splicing in vitro* que comparen el *splicing* de l'exó mutat i del salvatge (McCarthy and Phillips 1998; D'Souza *et al.* 1999; Pagani *et al.* 2000; Cartegni and Krainer 2002).

En l'annex 3 es mostren els resultats del programa de predicció d'ESE (a <http://exon.cshl.org/ESE>) per les mutacions de *SLC7A9*. S'introdueixen les seqüències salvatges i mutades dels diferents exons i el programa mostra la probabilitat que un determinat canvi genòmic afecti una seqüència enhancer exònica (ESE) d'unió a les proteïnes: SF2/ASF, SC35, SRp40 i SRp55. De les 7 mutacions analitzades per RNA, susceptibles de ser ESE (estan en zones exòniques), totes les prediccions excepte 1 són correctes. El programa no va predir el *splicing* erroni demostrat per RT-PCR de la c.614dupA (figura 24). Cartegni i Krainer (2002) pronosticaren que un 50% de les mutacions exòniques que produeixen el *skipping* d'un exó afecten llocs d'unió a una de les quatre proteïnes SR utilitzades per aquest programa SELEX. Per tant, les altres 50% interrompen llocs d'unió a unes altres proteïnes. Aquest podria ser el cas de la c.614dupA. L'anàlisi d'ESE i del mecanisme de *splicing* mediat per ESE s'ha centrat en llocs d'unió a proteïna SR rics en purines. Donat que es continuen identificant ESE addicionals, és probable que la diversitat així com el nombre d'ESE involucrats en malalties humanes encara estigui subestimat.

Segons les dades de l'*ESEfinder* (annex 3), podria donar-se un *splicing* erroni en 5 mutacions més del total de mutacions de *SLC7A9* identificades fins el moment (a part de les mutacions de *splicing* clàssiques i de les comprovades per RNA): p.R10del, p.52L, c.368_369delCG, p.E244del i p.A331V. I probablement alguna altra mutació interromp llocs d'unió a altres factors no detectats pel programa.

L'habilitat per identificar elements exònics auxiliars de *splicing* basant-se en la seqüència permetria la identificació de moltes mutacions que provoquen malaltia. Les mutacions es podrien distingir de polimorfismes i es podrien reconèixer les variants exòniques que afecten ESE o ESS.

13 POLIMORFISMES IDENTIFICATS EN ELS PACIENTS ESPANYOLS

Els al·lels de cistinúria que queden per explicar, podrien contenir polimorfismes en la zona promotora o en la resta del gen, que conjuntament amb mutacions a l'altre al·lel provoquin cistinúria.

13.1 POLIMORFISMES EXÒNICS I INTRÒNICS DE *SLC7A9*

En total a l'ICC, hem identificat 22 polimorfismes diferents a *SLC7A9* (4 al promotor) i d'aquests, dos són polimorfismes de canvi d'aminoàcid a *SLC7A9* que sempre estan en un mateix al·lel, p.V142A (c.425T>C, nomenclatura publicada c.T610C, article 3) i p.L223M (c.667C>A, nomenclatura publicada c.C852A article 3), que podrien tenir algun efecte en el fenotip d'aquests pacients i fins i tot causar malaltia en combinació amb una altra mutació (taula 13).

Família	Fenotip	Genotip	Pacient	Mutacions	Polimorfisme B
15	Mixt	BB	C130	A182T/c.368_369delCG	V142A, L223M (het)
95	Nol/Nol	BB	B61	R10del,W230R/A158dup	(V142A, L223M) (hom)
7	Mixt	BB	C23	G63R/c.605-3C>A	V142A, L223M (het)
34	Nol/+	B+	C189	c.171C>T/?	V142A, L223M (het)
52	Mixt	B?	C292	R10del,W230R/?	(V142A, L223M) (hom)
56	Nol/Nol	B?	C306	I193dup/?	V142A, L223M (het)
8	Nol/Nol	B?	C1	c.501_504delACTG/?	(V142A, L223M) (hom)
119	Nol/+	B+	G6	c.614dupA	V142A, L223M (het)
32	Q	B?	C180	T123M/?	V142A, L223M (het)
13	I/I	AA	C107	M467T/T216M	V142A, L223M (het)
14	Mixt	AA	C121	dupE5-E9/ p.R452W	V142A, L223M (het)
14	Mixt	AA	C122	dupE5-E9/ p.R452W	(V142A, L223M) (hom)
79	Mixt	AA	A147	M467T/dupE5-E9	V142A, L223M (het)
92	Q	AA	B47	c.765+1G>T/dupE5-E9	V142A, L223M (het)
97	Q	AA	B74	R365W/P441R	V142A, L223M (het)
78	Q	??	A140		(V142A, L223M) (hom)
54	Q	??	C299		V142A, L223M (het)
72	Q	??	A31		V142A, L223M (het)
80	Q	??	A151		V142A, L223M (hom)
107	Q	??	D24		V142A, L223M (het)
109	Q	??	D31		V142A, L223M (het)
118	Mixt	??	F22		V142A, L223M (hom)
131	Nol/+	??	D31		V142A, L223M (hom)

Taula 13. Pacients de cistinúria en els que s'ha trobat els dos polimorfismes de canvi d'aminoàcid de *SLC7A9* (p.V142A, p.L223M). hom, homozigosi; het, heterozigosi.

En realitzar el test de chi quadrat de contrast d'homogeneïtat per aquests dos polimorfismes entre els grup de pacients no acabat d'explicar i el grup control i va sortir altament significatiu (amb una significació de $p < 0,005$) pels al·lells totals i $p < 0,01$ pels al·lells trobats en homozigots) (taula 14).

c.425T>C c.667C>A	Pacients		Controls		χ^2
	Al·lells	F (%)	Al·lells	F (%)	
Al·lells totals	21 (CA) / 19 (TC)	52,5	25 (CA) / 91 (TC)	21,6	13,70
Al·lells en homozigosi	12 (CA) / 28 (TC)	30,0	14 (CA) / 102 (TC)	12,1	6,88

Taula 14. Test chi quadrat pels polimorfismes p.V142A, L223M de *SLC7A9*. El test s'ha realitzat amb 20 de les 25 famílies no acabades d'explicar (figura 25). Les altres 5 famílies no s'han inclòs ja que la F133 encara no s'ha acabat d'analitzar per mutacions a *SLC7A9* i la F46, F47, F75 i F119 no fan càlculs i s'han descartat. De totes maneres, contant aquestes 4 últimes també surt significatiu ($\chi^2 = 8,30$, al·lells totals i 4,26 al·lells en homozigosi). F, freqüència del polimorfisme en cada població.

La variant p.V142A està localitzada a 2 residus del residu cisteïna que forma el pont disulfur. Sis de les 9 LSHAT tenen prolina excepte b^{0,+}AT, xCT i asc-2. Aquest canvi però és un canvi conservatiu, que sembla que no hagi d'afectar en la formació del pont disulfur. Pel que fa a la p.L223M, situat en el mateix al·lel, els resultats de l'*ESEfinder* prediuen *splicing* anormal per aquesta variant (annex 3), sembla que el canvi exònic, c.667C>A, afecta dos possibles ESE, reduint la probabilitat de 2,50 a -0,02 i de 1,96 a -0,55, per sota el llindar (llindar = 1.96), suggerint un *splicing* aberrant. Caldria comprovar-ho analitzant el mRNA per aquesta variant.

El fet d'acumular mínim 2 canvis aminoacídics en totes les molècules de b^{0,+}AT podria tenir algun efecte en la funció del transportador. En la taula 15 es presenten algunes famílies amb pacients homozigots. Es mostren les segregacions dels polimorfismes i els valors d'excreció d'aminoàcids de cada individu. És interessant el fet que en la F14 (AA) el pacient C122 presenta uns valors d'excreció el doble de grans que el pacient C121, ambdós tenen les mateixes mutacions a rBAT, però al C122 aquests polimorfismes en homozigosi i el C121 els té en heterozigosi. En la F52 (mixta) el pacient B? té uns valors baixos per ser homozigot, però molt més elevats que el pare que transmet la mutació (B+) aquest individu també és homozigot per la p.V142A i fa càlculs. Pel que fa a la F78, no s'ha trobat cap mutació a *SLC7A9* ni a *SLC3A1* després d'un anàlisi exhaustiu. En el pacient s'han trobat aquestes variants en homozigosi, però si

RESULTATS

ens fixem amb els aminogrames dels pares (taula 15) són clarament de tipus no I i això no concorda amb la presència d'aquests polimorfismes en heterozigosi, que s'associen a fenotip silent. Per això, podria ser que una altra mutació sigui la responsable del fenotip (família endogàmica). En el cas de la F8 (B?), els valors d'excreció no són similars en tots el membres de la família amb la mutació a B, sembla que els afectes són el C2 i el C116, que tenen el polimorfisme en heterozigosi, per tant hi ha d'haver una altra mutació a B. De totes maneres, no sabem si l'individu C1 fa càlculs; si en fes podria ser degut als dos polimorfismes en homozigosi, com passa en les altres famílies. Però per aclarir el paper d'aquestes variants, calen estudis de mRNA i funcionals, com ja s'ha comentat.

F	Fenotip	Gen	Indiv	Cys	Lys	Arg	Orn	Suma	Mutacions	Polimorfisme B
8	Nol/Nol	B?	C2	283	2692	1425	1611	6011	c.501_504delACTG/?	V142A, L223M (het)
	I/+	-	C114	52	128	0	23	202		V142A, L223M (het)
	Nol/Nol	B?	C116	566	4986	3925	1946	11423		V142A, L223M (het)
	I/Nol	B?	C1	1056	5065	189	441	6751		V142A, L223M (hom)
14	Nol/+	A+	C119	57	481	318	94	950	dupE5-E9/+ p.R452W/+ dupE5-E9/ p.R452W dupE5-E9/ p.R452W	V142A, L223M (het)
	I/+	A+	C120	26	128	nd	14	168		V142A, L223M (het)
	I/Nol	AA	C121	2117	5715	2817	1636	12285		V142A, L223M (het)
	I/Nol	AA	C122	5556	11418	7025	1918	25917		V142A, L223M (hom)
52	Nol/+	B+	C290	180	713	12	91	996	p.R10del, p.W230R/? +/? p.R10del, p.W230R/?	V142A, L223M (het)
	I/+	-	C291	40	134	41	30	245		V142A, L223M (het)
	mixt	B?	C292	32	4307	27	373	4739		V142A, L223M (hom)
78	Nol/+	-	A133	570	981	585	122	2258		V142A, L223M (het)
	Nol/+	-	A134	266	959	37	66	1328		V142A, L223M (het)
	Nol/Nol	-	A140	2945	11722	5957	3101	23725		V142A, L223M (hom)

Taula 15. Segregacions i valors d'aminogrames de les famílies fenotipades que contenen els dos polimorfismes de canvi d'aminoàcid a *SLC7A9* en homozigosi. F, família; Cys, cisteïna; Lys, lisina; Arg, arginina; Orn, ornitina; hom, homozigosi; het, heterozigosi.

També hem identificat 10 variants exòniques silents: c. 1-38C>T, c.216C>T (Cys 71, exó 3), c.399C>T (Ser132, exó 4), c.411T>C (Cys136, exó 4), c.420C>T (F139, exó 4), c.497C>T (Ser169, exó 5), c.687C>T (Leu229, exó 6), c.972G>A (Ala324, exó 9), c.1143C>T (Ala381, exó 11) i c.1365C>T (Val455, exó 12). I sis variants intròniques: IVS1+17G>C, IVS3+22T>G, IVS4+10T>C, IVS5+10G>A, IVS5+24T>C i IVS9+51A-G. Totes elles s'han identificat en controls en proporcions similars als pacients.

13.2 ESTUDI DE MUTACIONS DEL PROMOTOR DEL GEN *SLC7A9*

Quan encara hi havia un 20% d'al·lels de tipus no I en els que no havíem trobat mutacions a cap dels 2 gens (*SLC7A9* i *SLC3A1*), vem analitzar el promotor de *SLC7A9* d'alguns d'aquests pacients (els espanyols principalment), ja que podia ser que hi hagués una mutació molt freqüent, o diverses mutacions, en aquesta zona. Per aquesta raó es van dissenyar encebadors de la regió promotora a partir de la seqüència de la base de dades pública del NCBI. Vem realitzar seqüenciació directa de les 1500 pb a 5' del codó d'inici de *SLC7A9* en 10 pacients, i vem trobar 4 polimorfismes: c.1-172A>T, c.1-323G>T, c.1-617G>T i c.1-1314G>A (taula 16).

Pacient	Fenotip	Genotip	F	c.1-172A>T	c.1-323G>T	c.1-617G>T	c.1-1314G>A
C171	Q	A? (dupE5-E9)	30	ta	tg	tg	ga
C139	Q	B? (p.244delE)	24	ta	tg	tg	gg
C180	Q	B? (p.T123M)	32	tt	tt	tt	gg
C306	Nol/Nol	B? (p.193insI)	56	ta	tg	tg	ga
C189	Nol/+	B+ (c.171C>T)	34	aa	gg	gg	gg
C174	III/III	B? (W69X)	31	tt	tt	tt	gg
C292	Mixt	B? 10delR,W230R	52	aa	gg	gg	gg
A31	Q	??	72	aa	gg	gg	ga
A151	Q	??	80	aa	gg	gg	gg
D31	Q	??	109	ta	tg	tg	gg

Taula 16. Distribució de les variants de promotor a *SLC7A9* en 10 pacients espanyols no acabats d'explicar.

Vem realitzar el test de chi quadrat de contrast d'homogeneïtat i hi ha diferències significatives en 3 de les 4 variants analitzades. En les taules de contingència de 2 x 2 hi ha només un grau de llibertat, i a una

significació de 0,05 el valor de chi quadrat hauria de ser major de 3,84 per considerar-se que la diferència és significativa (taula 17). Les variants c.1-313G>T i c.1-617G>T sembla que es troben sempre en el mateix cromosoma, ja que sempre apareixen juntes tant en controls com en pacients. Els pacients tenen una freqüència al·lèlica per c.1-313G>T i c.1-617G>T major que els controls. Mentre que en el cas de la variant c.1-1314G>A els pacients tenen una G en aquesta posició en una proporció molt més gran que els controls. Tot i així, per saber si aquestes variants tenen un paper en la malaltia, a part dels estudis de segregació, caldria fer estudis de transcripció d'aquestes variants. Podria ser que algun d'aquests polimorfismes estigués lligat a alguna mutació a *SLC7A9*.

Polimorfisme	F. Pacients	F. Controls	Chi quadrat	
c.1-172A>T	10 (T) /12 (A)	9 (T) /21 (A)	1,31	
c.1-313G>T	10 (T) /12 (G)	8 (T) / 36 (G)	5,00	p=0,05
c.1-617G>T	10 (T) /12 (G)	8 (T) / 36 (G)	5,00	p=0,05
c.1-1314G>A	4 (A) /18 (G)	25 (A) / 31 (G)	4,74	P=0,05

Taula 17. Variants nucleotídiques trobades al promotor de *SLC7A9* en pacients cistinúrics i anàlisi estadístic. Hem trobat 4 variants nucleotídiques en una zona promotora de 1500 pb. 3 d'aquestes variants es troben més freqüentment en pacients que en controls (p=0,05).

Aquestes 4 variants no afecten cap de les caixes d'unió a factors de transcripció predites *in silico* amb els programes: MatInspector/TRANSFAC, TSSG, TESS, TFSEARCH (veure annex 4). En aquest annex també es mostren els inicis de transcripció predits pels programes *Core-Promoter* (CG a c.1-468_469, amb una probabilitat de 0.689 i 0.686 respectivament) i *NNPP/Eukaryotic* (A a c.1-482). La TATA box ha estat predita pel programa TSSG a c.1-514.

Queden unes quantes famílies mal classificades o no classificades, i algunes ben classificades, que els falta una o les dues mutacions per identificar (veure figura 25). La majoria de les classificades pels valors d'excreció d'aminoàcids semblen en realitat portadores de tipus Nol, però com queda el dubte que siguin famílies mixtes, per això s'han estudiat exhaustivament pels dos gens. N'hi ha algunes que fan pedres, però la majoria d'aquestes famílies no en fan o no sabem si en fan. De les famílies que se sap, les que tenen càlculs tenen la p.V142A, p.L223M en homozigosi (F52, F78, F80, F118) o heterozigosi (F56). Fet que fa pensar que aquestes dos polimorfismes o alguna mutació no identificada associada a aquest al·lel, són responsables de la malaltia en aquests pacients.

Pel que fa a les variants de promotor, es troben en altres pacients que no sabem si fan pedres, en homozigosi (F31, F32) i en heterozigosi (F24, F72, F109) i a la F56, que fa pedres, en heterozigosi. Tots aquests pacients, excepte dos (F21, F31) tenen també la p.V142A, p.L223M en heterozigosi.

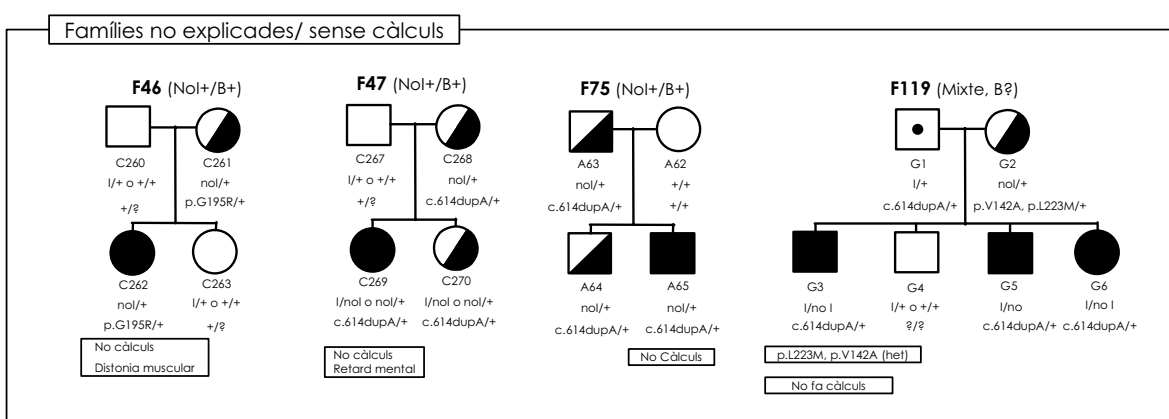


Figura 24bis. Pedigrís de les famílies que falten per explicar que no fan càlculs. La majoria de famílies estan mal tipades o no es poden classificar bé degut a que no se sap si són B+ o B? i d'algunes no sabem si fan càlculs. Quadrat, home; Cercle, dona; □ i ○, no tipat o normal; ■ i ●, pacient; punt negre, portador I; meitat negre, portador no I.

RESULTATS

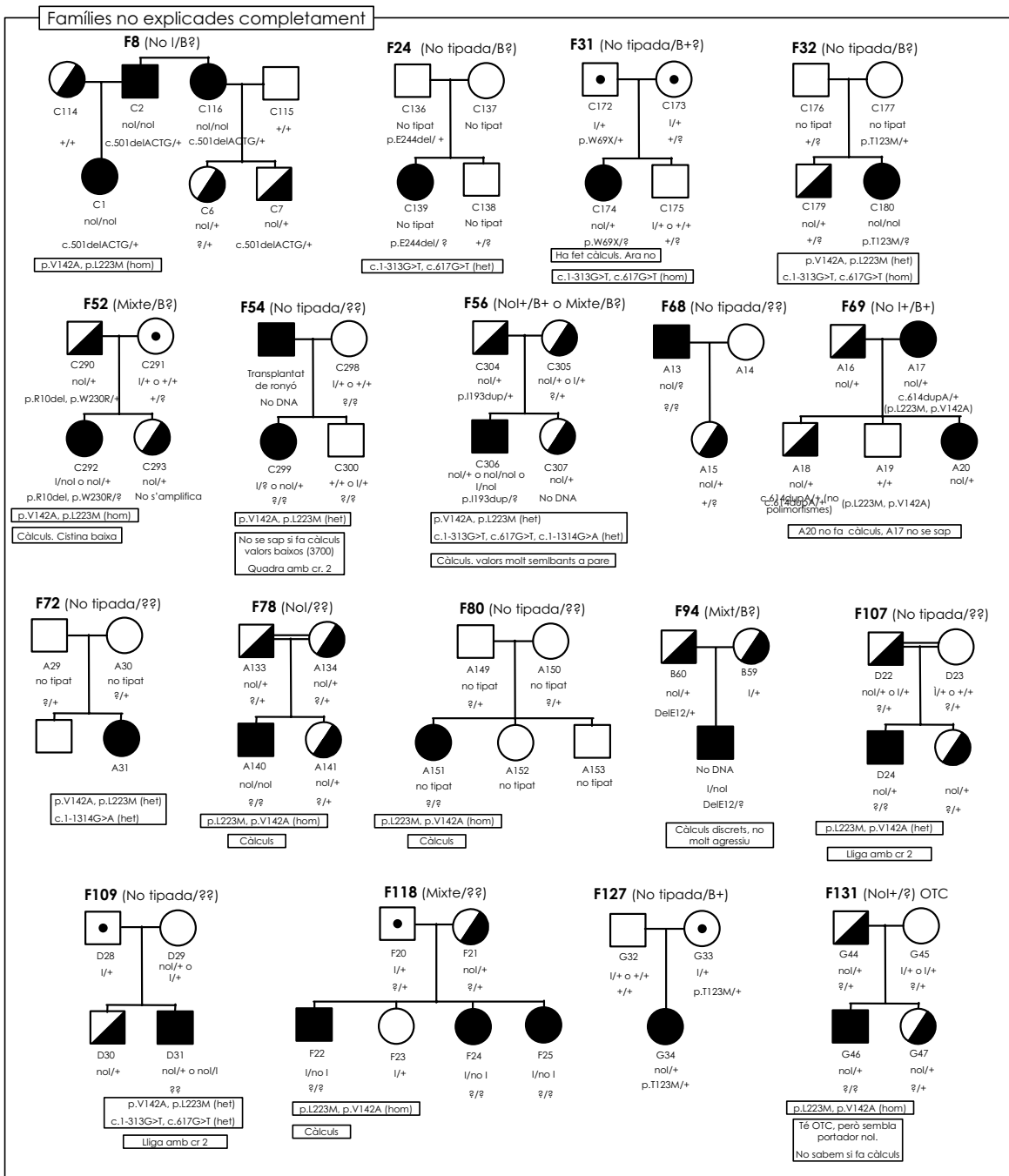


Figura 25. Pedigrís de les famílies que falten per explicar. La majoria de famílies estan mal tipades o no es poden classificar bé degut a que no se sap si són B+ o B- i d'algunes no sabem si fan càlculs. Quadrat, home; Cercle, dona; □ i ○, no tipat o normal; ■ i ●, pacient; punt negre, portador I; meitat negre, portador no I.

14 ALTRES GENS CANDIDATS DE CISTINÚRIA (ASC-1, LAT-2)

14.1 ASC-1

Article 6:

THE AMINO ACID TRANSPORTER ASC-1 IS NOT INVOLVED IN CYSTINURIA

Kidney International 2004 Oct;66(4):1453-64

Marta Pineda, Mariona Font, Maria Teresa Bassi, Marta Manzoni, Giuseppe Borsani, Valeria Marigo, Esperanza Fernández, Rafael Martín del Río, Jesús Purroy, Antonio Zorzano, Virginia Nunes i Manuel Palacín

Contribució:

- Primer intent de clonació de P5 conjuntament amb Núria Reig: seqüenciació dels clons: AA026793, AI123040, W84528 i AA935916 obtinguts *in silico* i obtenció de la seqüència 3' de cDNA de *SLC7A10*. Disseny dels encebadors per fer la sonda. Crivellatge d'una genoteca *Uni-ZAP*[®] XR de ronyó humà, sense obtenir positius.
- Caracterització genètica dels pacients de cistinúria. Disseny dels encebadors intrònics per amplificar tots els exons (taula 1) i anàlisi per DNA-SSCP dels pacients de cistinúria no explicats completament.
- Anàlisi estadístic de les freqüències dels polimorfismes entre pacients i controls (taula 2).

The amino acid transporter asc-1 is not involved in cystinuria

MARTA PINEDA, MARIONA FONT, MARIA TERESA BASSI, MARTA MANZONI, GIUSEPPE BORSANI, VALERIA MARIGO, ESPERANZA FERNÁNDEZ, RAFAEL MARTÍN DEL RÍO, JESÚS PURROY, ANTONIO ZORZANO, VIRGINIA NUNES, and MANUEL PALACÍN

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Spain; Medical and Molecular Genetics Center, Institut de Recerca Oncològica, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; IRCCS.E. Medea, Bosisio Parini, Italy; Department of Biomedical Science and Biotechnology, University of Brescia, Brescia, Italy; Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Naples, Italy; Servicio de Neurobiología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain; and Parc Científic de Barcelona, Spain

The amino acid transporter asc-1 is not involved in cystinuria.

Background. The human amino acid transporter asc-1 (*SLC7A10*) exhibits substrate selectivity for small neutral amino acids, including cysteine, is expressed in kidney, is located close to the cystinuria B gene and presents sequence variants (e.g., E112D) in some cystinuria patients. We have cloned human asc-1, assessed its transport characteristics, localized its expression in kidney, searched for mutations in cystinuria patients, and tested the transport function of variant E112D.

Methods. We used an EST-based homology cloning strategy. Transport characteristics of asc-1 were assessed by coexpression with 4F2hc in *Xenopus* oocytes and HeLa cells. Localization of asc-1 mRNA in kidney was assessed by in situ hybridization. Exons and intron-exon boundaries were polymerase chain reaction (PCR)-amplified from blood cell DNA and mutational screening was performed by single-stranded conformational polymorphism (SSCP).

Results. Asc-1 reaches the plasma membrane in HeLa cells, unlike in oocytes, most probably by interaction with endogenous 4F2hc and presents similar transport characteristics to those in oocytes coexpressing asc-1/4F2hc. Asc-1 mediates a substantial efflux of alanine in a facilitated diffusion mode of transport. Expression of asc-1 mRNA localized to Henle's loop, distal tubules, and collecting ducts. Finally, *SLC7A10* polymorphisms were identified in cystinuria probands and the *SLC7A10* sequence variant E112D showed full transport activity.

Conclusion. The lack of expression of asc-1 in the proximal tubule indicates that it plays no role in the bulk of renal reabsorption of amino acids. No mutations causing cystinuria have been found in *SLC7A10*. The facilitated diffusion mode of transport and the expression in distal nephron suggest a role for asc-1 in osmotic adaptation.

Key words: *SLC7A10*, asc-1, cystinuria, heteromeric amino acid transporter.

Received for publication August 8, 2003

and in revised form March 9, 2004

Accepted for publication May 4, 2004

© 2004 by the International Society of Nephrology

Heteromeric amino acid transporters (HATs) are composed of a heavy subunit (rBAT or 4F2hc) and the corresponding light subunit, linked by a disulfide bridge [1, 2]. At present only one light subunit ($b^{0,+}$ AT) of rBAT has been identified [3], whereas six subunits of 4F2hc with different amino acid transport activities have been reported [4]. In addition, two homologous proteins of these light subunits (asc-2 and AGT-1) form complexes with as yet unidentified heavy subunits [5, 6]. The amino acid transport function associated to asc-2 and AGT-1 has been studied in oocytes expressing a fusion protein of these light subunits with rBAT and 4F2hc [5, 6]. HATs serve for amino acid transport systems with an obligatory exchange mode of transport, with a few exceptions. Thus, the following heterodimeric complexes mediate exchange of amino acids: $b^{0,+}$ AT/rBAT (system $b^{0,+}$) [7], LAT-1/4F2hc and LAT-2/4F2hc (system L isoforms) [8–10], y^+ LAT-1/4F2hc and y^+ LAT-2/4F2hc (system y^+ L isoforms) [11–13], and xCT/4F2hc (system x_c^-) [14, 15]. In contrast, oocytes expressing asc-1/4F2hc or asc-2 fusion proteins with rBAT or 4F2hc show induction of amino acid efflux to amino acid-free medium, suggesting a facilitated diffusion in addition to exchange mode of transport [6, 16]. The transport characteristics of asc-1 resembles system asc described in trout lymphocytes and hepatocytes, whereas asc-2 appears to be the system asc found in trout red blood cells [17].

Three HATs ($b^{0,+}$ AT/rBAT, y^+ LAT-1/4F2hc, and LAT-2/4F2hc) are involved in renal reabsorption of amino acids. System $b^{0,+}$ (i.e., the $b^{0,+}$ AT/rBAT heterodimeric complex) is the main apical reabsorption system for cystine and also mediates renal reabsorption of dibasic amino acids. This is evidenced by coimmunoprecipitation studies of rBAT and $b^{0,+}$ AT in kidney brush-border membranes [3] and by the fact that mutations in rBAT (encoded by *SLC3A1*) or in $b^{0,+}$ AT (encoded by *SLC7A9*) cause cystinuria [18, 19]. Moreover, the knock-out of *Slc3a1* and *Slc7a9* in mice also results in cystinuria

[20, 21]. Cystinuria is an inherited amino aciduria characterized by hyperexcretion of cystine and dibasic amino acids in urine [22]. The basolateral system y^+L in kidney proximal tubule (i.e., $y^+LAT-1/4F2hc$) mediates the efflux of dibasic amino acids, as evidenced by the fact that mutations in y^+LAT-1 (encoded by *SLC7A7*) cause lysinuric protein intolerance, an inherited dibasic amino aciduria [23, 24]. Finally, *LAT-2/4F2hc* (a system L isoform) has been suggested to have major role in the transepithelial flux of L-cystine in the proximal tubule because it mediates the basolateral efflux of cysteine (i.e., the reduced form of cystine), as evidenced in the renal proximal tubule cell line OK [25].

Asc-1 exhibits substrate selectivity for L- and D- small neutral amino acids, including D-serine, glycine, and L-cysteine [16]. Human *asc-1* is expressed mainly in placenta, brain, kidney, and heart [26]. In brain, *asc-1* is restricted to neuronal structures, with the highest expression in presynaptic complexes, suggesting a role in the synaptic clearance of D-serine [27]. Because D-serine is an agonist at the strychnine-insensitive glycine binding site on the NMDA receptors and these receptors have been related to some important physiologic and pathophysiologic processes (e.g., learning, schizophrenia, depression, epilepsy), alteration of the clearance of D-serine via *asc-1* might have profound physiological consequences [28]. In kidney, it has been suggested that *SLC7A10* could be an additional gene for cystinuria, and therefore with a role in renal reabsorption of cystine/cysteine [29]. *SLC7A10* is located in the vicinity of *SLC7A9*, the cystinuria B gene, within the 19q13.1 region [26], and *SLC7A10* sequence variants (e.g., E112D) that associate with a few cystinuria patients have been reported [29]. To understand the physiological role of *asc-1* in kidney and to test its possible involvement in cystinuria we assessed its transport characteristics, localized its expression in kidney, searched for mutations in *SLC7A10* in cystinuria patients, and finally tested the transport function of the sequence variant E112D.

METHODS

cDNA isolation

Using the amino acid sequence of y^+LAT-1 protein as a query in a tBLASTn search versus dbEST [30], we identified a highly similar human EST (AI123040, corresponding to IMAGE clone 1509931) mapping to chromosome 19q13.1 in the previously defined cystinuria type B locus [19, 31]. The insert of the IMAGE clone was then used as a probe to screen a human kidney cDNA library. A full length cDNA clone of 1807 bp was obtained, encoding the previously reported human *asc-1* protein [26], and was cloned in pBluescript SK⁻.

Oocytes, injections, and uptake measurements

Oocyte origin, management, injections, and uptake measurements were as described elsewhere [32]. Defolliculated stage VI oocytes were injected with 10 ng/oocyte of human 4F2hc or *asc-1* alone or in combination. Synthesis of human 4F2hc cRNA was as described [32]. Human *asc-1* cRNA was obtained by cutting *asc-1* in pBluescript SK⁻ with *XhoI* and using T3 polymerase.

Plasmid construction and site-directed mutagenesis

To create a N-*myc*-tagged *asc-1*, *asc-1* cDNA was polymerase chain reaction (PCR)-amplified with primers 5'-TATATAGTCGACATGGCCGGCCACACGCAG-3' (containing a *SalI* site) and 5'-ATATTGCGGCCGCAA AACGACGGCCAGTGAATTG-3' (containing a *NotI* site). The PCR product was digested with *SalI* and *NotI* and cloned into pNKS2-*myc*. For construction of the *asc-1*(E112D) mutant, the QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit was used (Stratagene, La Jolla, CA, USA), following the manufacturer's protocol. The mutagenic primer was (sense strand, the mutated nucleotide is indicated by parenthesis) 5'-CGCCTACGTACAGA (C)ATCTTCGGGGGCC-3'. The success of mutagenesis was checked by the loss of a *BglII* site. Proper construction of plasmids and mutated cDNA were confirmed by complete sequencing. All sequences carried out in this work were performed as described [9]. For expression in HeLa cells, 4F2hc-pCMV2, rBAT-pCDNA3 [33], *asc-1*-pCDNA3 (wild-type and the E112D mutant), cloned between the restriction sites *EcoRI* and *XhoI*) and N-*myc* tagged *asc-1*-pCDNA3 (cloned between the restriction sites *HindIII* and *NotI*) were used.

Patients

We studied 22 cystinuria patients (21 Spanish and one Italian) from independent families, in which no mutations or only one mutation had been found after an exhaustive analysis of *SLC3A1* or *SLC7A9*. Urinary excretion of cystine and dibasic amino acids in the obligate heterozygotes was used to classify most of the probands in cystinuria subtypes. Most of these independent probands excrete cystine and dibasic amino acids in the urine in the range of cystinuria homozygotes or compound heterozygotes and above the control range. In addition, two Spanish independent probands had a urinary amino acid profile similar to their parents transmitting the disease and within the upper range of *SLC7A9* heterozygotes that produced cystine calculi.

Analysis of *SLC7A10* gene

DNA was extracted from peripheral blood samples obtained after informed consent following standard procedures. The *SLC7A10* gene has 11 exons. The eleven

Table 1. Conditions used for *SLC7A10* exons amplification

Exon	Name	Primer sequences (5' to 3')	Temp (°C)	Enhancer ^a
1	P5IF1	GGACAGACGGGGCA GCGCA	66	2×
	P5IR1 ^b	CCTCGTTCGGAGCG GCTGC	66	
2	P5IF2	ACAGAAGGCCGGGCT GCGAA	64	0.5×
	P5IR2	CCATTCCCAAGAGGG TGTCC	64	
3	P5IF3	TCTGGGACGCTTGAG CCACT	64	2×
	P5IR3 ^b	GGGCAGGTGGCTGAT CTGTA	64	
4	P5IF4 ^b	CATGGTCCACTGTGA AAGGT	60	1×
	P5IR4 ^b	TCAGTCTCTCGAAGT GTCCT	62	
5	P5IF5	GTAGGGCCGAGTCGG GGTAA	66	2×
	P5IR5 ^b	AGAGGGCCTGGCT GCTTC	64	
6	P5IF6	TGCACCCTCAGGAGC TGACG	66	0.5×
	P5IR6	CACAGTAGAGAGGCCAT GTGTA	66	
7	P5IF7 ^b	CCTTACACATGGCCTC TCTAC	64	No
	P5IR7 ^b	CCCACGGCATGACT GGTGC	64	
8	P5IF8 ^b	GCTGAGACCCAGGA TGTGG	62	1×
	P5IR8 ^b	AGGTCCTGCATTGCC GGGTA	64	
9	P5IF9	GGCCAGGGCTCATC CTGCA	64	1×
	P5IR9	GCAGGGGTGGCTCT GGCAG	66	
10	P5IF10 ^b	CCCTGCACCATCGGT GTTTC	64	No
	P5IR10	AGGGAGGTCTGGTCT CCAGG	66	
11	P5IF11 ^b	GCTGCCTCGTTGAG GGACT	62	1×
	P5IR11	CAGAAACAAGTCTTCA GTCTC	60	

^aFinal relative concentration of "polymerase chain reaction (PCR) Enhancer Solution" from 10× stock solution.

^bDifferent sequence from Leclerc *et al* (2001).

pairs of primers used for their amplification are detailed in Table 1. PCR conditions are the following: 94°C 30 seconds, 58°C 30 seconds, 68°C 45 seconds; 35 cycles. Each amplification reaction was performed using 100 ng of patient DNA, deoxynucleoside triphosphates (dNTPs) (200 μm of each), PCR Enhancer System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for all exons but seven and ten that needed PCR buffer containing MgCl₂ (1.5 mmol/L as a final concentration) (Table 1), Taq polymerase (0.02 units/mL) (Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA), and primers (0.35 mmol/L of each), in a final volume of 50 μL. The mutational screening of the probands was performed by DNA-single-stranded conformational polymorphism (SSCP). We ran premade 12.5% acry-

lamide SSCP gels (ExcelGel DNA Analysis Kit) (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) at 5°C. A 20-minute prerun at 100 V, 23 mA, and 5 W was performed, followed by a 3-hour 20-minute run at 600 V, 30 mA, and 18 W. Silver staining of these gels was completed with the DNA Silver Staining Kit on an automatic gel stainer (Pharmacia Biotech). Our group had previously used this technique for the analysis of *SLC3A1* and *SLC7A9* (International Cystinuria Consortium, 1999); bands showing an altered mobility in electrophoresis were then sequenced. In all cases, sequence on both strands of the PCR products was performed with the same set of primers used for the amplification by automated systems. Sequences were then analyzed using the program Sequencher version 3.0 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA). All sequence variants were checked in controls by restriction and/or SSCP analysis.

Statistical analysis

Hardy-Weinberg equilibrium of the different genotypes was evaluated for each polymorphism by chi-squared (Table 2). Control genotypes follow Hardy-Weinberg equilibrium (data not shown), so we can assume no stratification for our population. Statistical significance of differences between distributions for genotypes was evaluated using Fisher exact test with a 2 × 2 contingency table, comparing the patient group versus control group. Significance was considered when $P < 0.05$.

HeLa cell transfections

HeLa cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 100 U/mL penicillin, and 0.1 mg/mL streptomycin (D10) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The DMEM medium contained 340 μmol/L Arg, 666 μmol/L Lys, 200 μmol/L cystine, 4.0 mmol/L Gln, 399 μmol/L Gly, 800 μmol/L Ile, 800 μmol/L Leu, 201 μmol/L Met, 400 μmol/L Phe, 400 μmol/L Ser, 798 μmol/L Thr, 78 μmol/L Trp, 397 μmol/L Tyr, and 803 μmol/L Val. Transfections were performed by standard calcium phosphate precipitation in 10 cm diameter plates with a mixture of DNA containing 2 μg of green fluorescence protein (pEGFP) (Clontech, Palo Alto, CA, USA), 9 μg of *asc-1*-pCDNA3, and 9 μg of 4F2hc-pCMV2 or rBAT-pCDNA3. When 4F2hc, rBAT or *asc-1* (wild-type or E112D mutant) were transfected alone the DNA transfection mixture contained 2 μg of pEGFP and 18 μg of 4F2hc-pCMV2, rBAT-pCDNA3, or *asc-1*-pCDNA3. After overnight incubation with the DNA-calcium phosphate coprecipitate, cells were extensively washed with phosphate-buffered saline (PBS) and trypsinized. Then 150,000 cells in 1 mL of D10 were plated per well on a 24-well plate for uptake and efflux measurements, 300,000 cells on a 12-well

Table 2. Sequence variants found in *SLC7A10* gene in cystinuric patients

Sequence variants	Allelic frequencies (%)				
	Patients		Controls		
	This study	Leclerc et al (2001)	This study	χ^2	Leclerc et al (2001)
IVS4 + 48C→G	2.3 (1/44)	—	8.2 (9/110)	1.63	—
IVS4-21C→G	2.3 (1/44)	—	8.2 (9/110)	1.63	—
IVS6-11T→C	55 (22/40)	30 (6/20)	56.5 (52/92)	0.01	>1
IVS8-17G→A	2.3 (1/44)	—	3.1 (2/64)	0.07	—
c.1473G→T (T458T)	4.8 (2/42)	5.0 (1/20)	7.3 (7/96)	0.28	>1
c.435G→C (E112D)	—	5.0 (1/20)	—	—	0 (0/238)
c.267G→A (S56S)	—	5.0 (1/20)	—	—	0 (0/238)
IVS7 + 20G→T	—	5.0 (1/20)	—	—	0 (0/204)

The sequence variants found in this study and the described by Leclerc et al [29] are shown. The ratios between parentheses indicate the number of positive alleles versus the total number of alleles analysed. χ^2 compares the frequency of the sequence variants identified in the present study in patient and control populations. None of the frequencies reaches the level of significance ($\chi^2 > 3.84$ for $P \leq 0.05$; 1 degree of freedom).

plate for amino acid content measurement, or 600,000 cells on a 6-well plate for Western-blotting analysis. Cells were then kept at 33°C or 37°C for 48 hours before experiments. Transfection efficiency was checked by analyzing an aliquot of cells of each individual transfection group for GFP expression by fluorescence-activated cell sorting using an EPICS XL Coulter cell sorter (Serveis Científico-Tècnics, Parc Científic de Barcelona, Spain). The percentage of positive cells was defined as the fraction beyond the region of 99.9% of non-GFP transfected cells. Transfection efficiency of GFP ranged from 40% to 80% in different experiments. Transfections with an efficiency <40% were discarded.

Localization of *asc-1* and 4F2hc expression by confocal microscopy

For immunofluorescence labeling, transfected HeLa cells grown on glass coverslips were rinsed briefly in PBS, fixed in 3% paraformaldehyde-PBS for 10 minutes, incubated in 50 mmol/L NH_4Cl -PBS for 10 minutes, and then in 20 mmol/L glycine-PBS for 10 minutes. To immunolocalize *myc-asc-1* or 4F2hc, cells were incubated in 0.1% Triton X-100 in PBS for 10 minutes. Otherwise, to immunolocalize surface 4F2hc, cells were not permeabilized. Then, cells were washed three times in PBS, blocked in 10% fetal bovine serum (FBS)-PBS for 30 minutes, and exposed to primary antibody 9E10 anti-*myc* (ATCC, Manassas, VA, USA) diluted 1/500 in 10% FBS-PBS or antibody CD98 anti-4F2hc (Immunotech, Marseille, France) diluted 1/50 in 10% FBS-PBS. Coverslips were washed three times, and incubated with 7.5 mg/mL Texas red-conjugated goat antimouse (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) for 1 hour. Finally, coverslips were washed three times in PBS and mounted with immunofluorescence medium (Valeant, Costa Mesa, CA, USA). Confocal microscopy was performed at the Serveis Científico-Tècnics of the Parc Científic de Barcelona.

Uptake and efflux measurements in HeLa-transfected cells

A total of 24-well plates, with 1 mL of D10 medium per well, were placed in a dry incubator at 37°C 1 hour prior to the transport experiment. For uptake measurements, cells were washed twice with 1 mL of the transport medium [137 mmol/L *N*-methyl-*D*-gluconate (NMDG) or 137 mmol/L NaCl, 2.8 mmol/L CaCl_2 , 1.2 mmol/L MgSO_4 , 5.4 mmol/L KCl, and 10 mmol/L HEPES, pH 7.5, equilibrated at 37°C]. Subsequently, 200 μL of the transport medium with substrate [50 $\mu\text{mol/L}$ L-[^3H]alanine or L-[^3H]serine (2.5 $\mu\text{Ci/mL}$)] was added and cells were incubated for different periods. To determine linear transport rates, cells were incubated for 1 minute (linear conditions; data not shown). After incubation, the uptake medium was removed and cells were washed three times in 1 mL of cold (4°C) transport medium. Nonspecific binding was assessed by quick addition and immediate removal of the transport medium at 4°C. After washing, cells were lysed by addition of 250 μL 0.1 mol/L NaOH, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) per well, 100 μL were used to count radioactivity and 20 μL were used to measure the protein content in the well using the BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA). Radioactivity was measured in a beta scintillation counter (Beckman LS 6000TA; Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA).

For efflux measurements, transfected HeLa cells were preloaded by incubation in transport medium containing 50 $\mu\text{mol/L}$ L-[^3H]alanine (5 $\mu\text{Ci/mL}$) for 5 minutes. The cells were then washed three times with ice-cold transport medium and incubated in the efflux solution in the presence or absence of 1 mmol/L L-alanine, L-serine, L-leucine, or L-proline. The radioactivity in the medium and the remaining radioactivity in the cells were measured. Efflux rates were measured at 15 seconds and expressed as released nmol alanine/mg protein and were calculated as follows: [radioactivity released into the medium/total radioactivity in the system] \times [intracellular

content of alanine expressed in nmol/mg protein] where [total radioactivity in the system] = [radioactivity remaining in cells] + [radioactivity released to the medium].

Amino acid content of transfected HeLa cells

Cells in 12-well plates were washed three times with 2 mL of ice-cold PBS. For deproteinization, 200 μ L of 10% sulfosalicylic acid were added per well. The mixture was centrifuged at 12,000g for 5 minutes. The supernatant was removed and stored at -20° C before assay of intracellular amino acids. The pellet was dissolved in 1 mL of 0.1 N NaOH for protein determination by using the BCA Protein Assay Kit (Pierce). Total intracellular amino acid content was determined by cation exchange chromatography on an automatic Amino Acid Analyzer (Beckman model 6300). The cell amino acid content is expressed as nmol amino acid/mg protein.

Northern blot analysis

A human adult poly(A⁺) membrane from Clontech was used. A band of 389 pb (corresponding to human asc-1 cDNA region nt 1241-1630) was amplified from human asc-1 cDNA using primers 5'-CTGCACTCCACAGGCCCATCAA-3' and 5'-CACCTCCTCAATAAA CAAC-3'. The band was purified, labeled with [α -³²P] deoxycytidine triphosphate (dCTP) (Amersham Pharmacia Biotech) using random oligonucleotide-priming labeling kit (Amersham Pharmacia Biotech), and used as a probe. Hybridization and washing conditions were as recommended by Clontech.

In situ hybridization

Sense and antisense cRNA probes were labeled with digoxigenin-11-UTP (Roche Molecular Biochemicals, Basel, Switzerland) by transcription of an asc-1 fragment (26-239 nt of the cDNA) cloned in pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA), using the mMessage mMachine transcription kit (Ambion, Austin, TX, USA). Preparation of kidney sections and in situ hybridization were performed as described [9].

RESULTS

Asc-1 required 4F2hc for its functional expression in *Xenopus* oocytes

As shown in Figure 1, asc-1 by itself did not induce L-[³H]alanine transport. Expression of 4F2hc alone resulted in a significant induction of L-alanine transport, whereas the co-expression of 4F2hc and asc-1 resulted in greater L-alanine uptake. This indicates that 4F2hc is indispensable for the functional expression of asc-1. The asc-1/4F2hc coexpressed transport of L-alanine was sodium-independent (Fig. 1) and was completely abolished by a 100-fold excess of L-neutral amino acids of

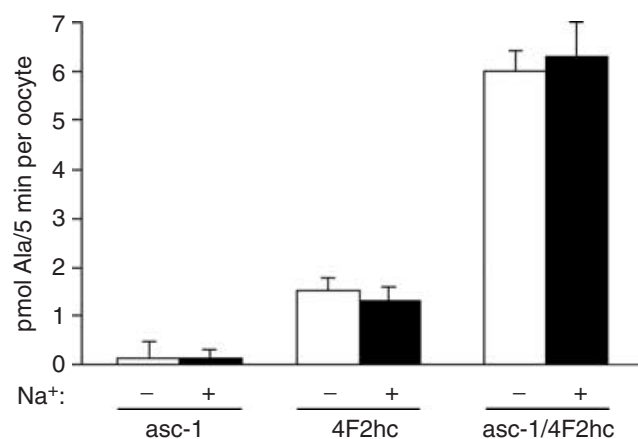


Fig. 1. Coexpressed alanine transport activity by asc-1/4F2hc in *Xenopus* oocytes. Oocytes were injected with asc-1 cRNA, 4F2hc cRNA or their combination. Three days after injection, the uptake of 50 μ mol/L L-[³H]alanine in the absence (\square) or presence (\blacksquare) of 100 mmol/L NaCl was determined for 5 minutes. Amino acid uptakes rates (pmol/5minutes per oocytes) were calculated by subtracting the uptake of the noninjected group from that of the cRNA-injected groups. The amino acid uptake activity of uninjected oocytes was 2.4 ± 0.3 and 2.9 ± 0.4 pmol/5minutes per oocytes in the absence and in the presence of sodium, respectively. Data (mean \pm SEM) correspond to a representative experiment with seven to eight oocytes per group ($N = 9$ independent experiments).

small side chain (e.g., alanine, serine, threonine, and cysteine) (data not shown). Other L-neutral amino acids (e.g., leucine, histidine, valine, and asparagine) inhibited transport to a lower extent, and L-dicarboxylic (e.g., glutamate) and dibasic (e.g., lysine and ornithine) amino acids did not inhibit transport at all (data not shown). These results are in full agreement with previous studies with mouse and human asc-1 in oocytes [16, 26].

As stated above, expression of 4F2hc alone resulted in a variable but significant induction of alanine transport in oocytes (4.3 ± 1.2 pmol/5 minutes per oocyte in nine independent experiments). This 4F2hc-induced transport of alanine showed characteristics of system asc: (1) sodium independence (Fig. 1) and (2) a similar amino acid pattern of inhibition than that of asc-1/4F2hc-induced transport (data not shown). This suggests that 4F2hc induced system asc by interaction with an endogenous asc subunit. This is in agreement with the report of system asc transport activity in *Xenopus* oocytes [34]. This 4F2hc-induced transport compromises the level of induction of system asc transport activity by coexpression of asc-1 with 4F2hc over background conditions (2.8 ± 0.3 -fold over 4F2hc-expressing oocytes) ($N = 9$).

Functional expression of asc-1 in HeLa cells

In order to express the asc-1 amino acid transport activity in an expression system with lower background than oocytes, HeLa cells were transiently transfected with asc-1 and 4F2hc alone or together. As shown in Figure 2A, transfection of 4F2hc did not result in the induction of L-alanine transport over background (e.g., nontransfected

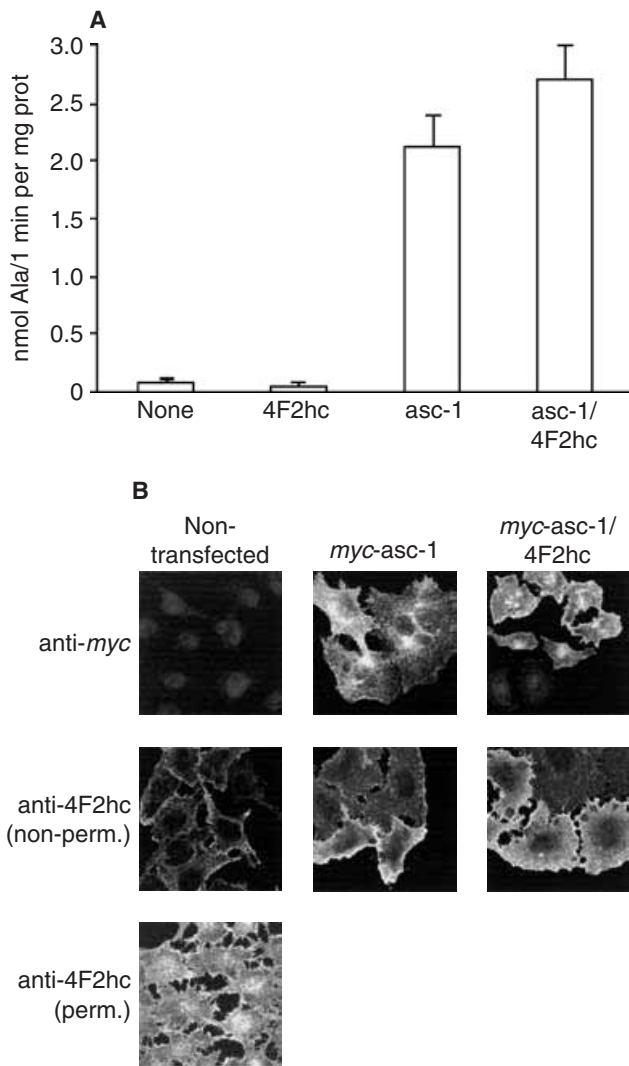


Fig. 2. In HeLa cells, *asc-1* induces alanine transport due to the interaction with endogenous 4F2hc. (A) Transfection of human *asc-1* in HeLa cells resulted in increased L-[³H]alanine transport. Cells were transfected with 4F2hc or *asc-1* alone or in combination, and grown for 48 hours. Cells transfected with 4F2hc alone showed identical levels of transport as untransfected HeLa cells. In contrast, transfection with human *asc-1* or *asc-1*/4F2hc increased the L-[³H]alanine transport (35- and 41-fold over background, respectively). (B) Localization of 4F2hc and *myc-asc-1* in transfected HeLa cells. HeLa cells were transfected with N-*myc*-tagged *asc-1* alone or in combination with 4F2hc and processed for immunocytochemistry. Two days after transfection, cells were fixed, permeabilized, and incubated with antibody 9E10 anti-*myc* or CD98 anti-4F2hc, or not permeabilized and incubated with antibody CD98 anti-4F2hc. The N-*myc* epitope did not significantly affect amino acid transport activity (70% to 85% of the *asc-1*-induced transport in two separate experiments; data not shown). The induced uptake of 50 $\mu\text{mol/L}$ L-alanine in nmol/1 minute per mg protein was 0.07 ± 0.08 for 4F2hc, 2.0 ± 0.3 for *myc-asc-1*, and 2.3 ± 0.2 for *myc-asc-1*/4F2hc-transfected cells.

cells). In contrast, *asc-1*- or *asc-1*/4F2hc-transfected cells showed induction of L-alanine transport in a similar level (~40-fold higher than transport in cells transfected with 4F2hc alone). This suggests that endogenous 4F2hc is used for the functional expression of *asc-1*. We have obtained similar results with other 4F2hc light subunits

like LAT-2 and xCT transfected in HeLa cells (data not shown).

The expression of *myc-asc-1* and 4F2hc in HeLa cells was next studied. Nontransfected HeLa cells showed expression of 4F2hc at the cell surface in nonpermeabilized cells (Fig. 2B). Moreover, permeabilized HeLa cells showed also intracellular expression of 4F2hc (Fig. 2B). Detection of *myc-asc-1* with anti-*myc* antibodies requires permeabilization of the cells, because the *myc* tag was fused to the N-terminus of *asc-1*, with a predicted location inside the cell. *Myc-asc-1* showed expression at the cell membrane both in HeLa cells transfected with *myc-asc-1* alone or cotransfected with *myc-asc-1*/4F2hc (Fig. 2B). Transfection of *myc-asc-1* alone or cotransfected with 4F2hc resulted in a higher expression of 4F2hc at the cell membrane (Fig. 2B). These results strongly suggest that *asc-1* uses endogenous 4F2hc to express its transport activity in HeLa cells.

The functional properties of *asc-1* were examined in HeLa cells transfected with *asc-1* alone. The *asc-1*-mediated amino acid transport was sodium independent. Thus, the induced uptake of 50 $\mu\text{mol/L}$ L-[³H]alanine (calculated by subtracting the uptake in 4F2hc-transfected cells) in the absence and in the presence of sodium was 1.2 ± 0.1 and 1.4 ± 0.2 nmol/mg of protein, respectively). Similar to alanine, *asc-1* induced sodium independent L-serine uptake in transfected HeLa cells (data not shown). The uptake of L-[³H]alanine was saturable and followed Michaelis-Menten kinetics with a K_m value of 35.4 ± 5.0 $\mu\text{mol/L}$ (Fig. 3A). The inhibition pattern of *asc-1*-induced L-alanine uptake is shown in Figure 3B. A 100-fold excess of L- and D-neutral amino acids with small side chain, including the analogue AIB, almost abolished completely the *asc-1*-induced transport. Dicarboxylic and dibasic amino acids, proline, tyrosine, and the N-methyl derivative of AIB (MeAIB) did not inhibit at all. Other neutral amino acids produced a variable degree of inhibition. This inhibition pattern is identical to that described previously for mouse and human *asc-1* in oocytes [16, 26].

To study the exchange mode of transport of *asc-1*, the efflux of L-[³H]alanine was studied. Efflux measurements in cells require preloading of cells with the labeled substrate and the consequent appearance rate of the radiotracer in the medium. HeLa cells transfected with *asc-1* or 4F2hc were incubated for 5 minutes with 50 $\mu\text{mol/L}$ L-alanine, and the intracellular content of amino acids were assessed. As shown in Figure 4A, no significant differences in the intracellular content of the most abundant preferred amino acid substrates of *asc-1* were observed between *asc-1*-transfected and 4F2hc-transfected (control) cells. Similarly, transfection of *asc-1* did not alter the intracellular concentration of other amino acids (data not shown). The intracellular content of L-alanine determined was used to calculate the efflux rate of L-alanine in the following experiments

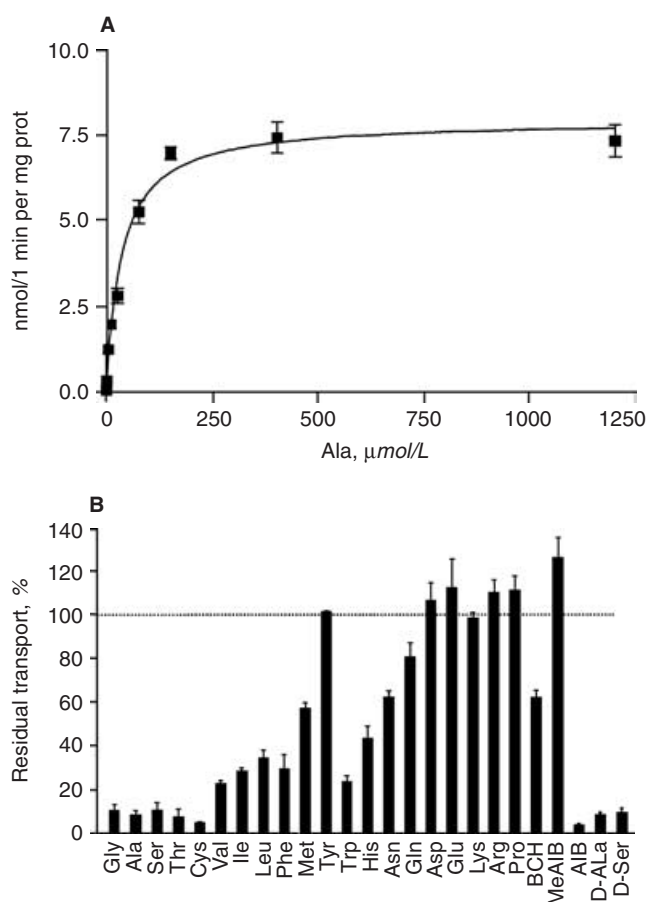


Fig. 3. Characteristics of alanine transport induced by asc-1 in transfected HeLa cells. HeLa cells were transfected with 4F2hc or asc-1 and incubated for 2 days. (A) Kinetic analysis of L-alanine transport induced by asc-1. The uptake of L-[^3H]alanine in the absence of sodium was determined for 1 minute at different substrate concentrations (1, 5, 10, 25, 75, 150, 400, and 1200 $\mu\text{mol/L}$). The transport activity level in 4F2hc-transfected cells was subtracted from that of asc-1-transfected cells. Data (mean \pm SEM) correspond to a representative experiment with four replicas per group. Kinetic parameters were: $V_{\text{max}} = 8.0 \pm 0.3$ nmol 1 min mg protein; $K_m = 35.4 \pm 5.0$ $\mu\text{mol/L}$ (GraphPad Prism program). (B) Inhibition pattern of L-[^3H]alanine transport in asc-1-transfected HeLa cells. The uptake of L-[^3H]alanine in the absence of sodium for 1 minute was measured in the absence (control) or in the presence of 5 mmol/L of the indicated amino acids or analogues. The induced transport was 0.06 ± 0.02 and 3.2 ± 0.3 nmol alanine/1 minute per mg protein in 4F2- and asc-1-transfected cells, respectively. Data (mean \pm SEM) represent percentages of the amino acid residual transport in the presence of the inhibitor. Data correspond to two to three independent experiments, with four replicas per group.

where HeLa cells were preloaded with 50 $\mu\text{mol/L}$ L-[^3H]alanine for 5 minutes (Fig. 4B). Efflux of L-alanine in 4F2hc-transfected cells was not affected by the presence of amino acids in the medium. In contrast, in asc-1-transfected cells, L-alanine and L-serine (i.e., substrates of asc-1), but not L-leucine and proline, transstimulated efflux of L-alanine. Thus, efflux to medium containing L-alanine or L-serine was $\sim 70\%$ greater than to amino acid-free medium. Interestingly, efflux of L-alanine from asc-1-transfected cells in amino acid-free medium (or

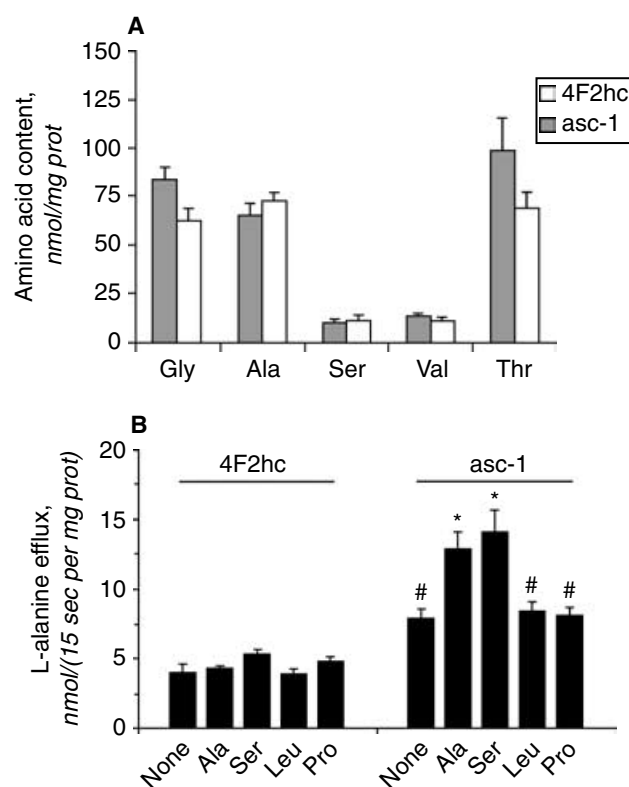


Fig. 4. Exchange of intracellular alanine by asc-1 in transfected HeLa cells. HeLa cells were transfected with 4F2hc or asc-1 and incubated for 2 days. (A) Intracellular content of the most abundant small neutral amino acids after 5 minutes' incubation with 50 $\mu\text{mol/L}$ L-alanine. The amino acid content expressed as nmol/mg protein was measured in triplicates from four independent transfection experiments. After incubation with alanine, 4F2hc- and asc-1-transfected cells showed similar intracellular content of small neutral amino acids, which are substrates of system asc. No significant differences were found in the intracellular content of the other amino acids (data not shown). (B) To monitor exchange of intracellular alanine, cells were loaded by incubation with 50 $\mu\text{mol/L}$ L-[^3H]alanine for 5 minutes. Then, the efflux rate of alanine to extracellular medium containing no amino acids or L-alanine (Ala), L-serine (Ser), L-leucine (Leu), or L-proline (Pro) at 1 mmol/L was measured. The efflux in 4F2hc-transfected cells was not transstimulated by the presence of amino acids in the extracellular medium. In contrast, in asc-1-transfected HeLa cells, the efflux was transstimulated by substrate amino acids (e.g., L-Ala and L-Ser) ($*P \leq 0.05$), but not by nonsubstrate amino acids (e.g., L-Leu and L-Pro). As shown, efflux of alanine in asc-1-transfected cells was higher than in 4F2hc-transfected cells regardless the presence of amino acids ($\#P \leq 0.05$). This suggests that asc-1/4F2hc does not act as an obligatory amino acid exchanger. Data, expressed as nmol alanine/mg protein in 15 seconds, represent the mean \pm SEM from three independent experiments with four replicas each.

in medium containing L-leucine or proline) was also greater than in 4F2hc-transfected cells. Thus, 30% to 40% of the L-alanine efflux via asc-1 was independent of the presence of asc-1 substrates in the medium.

Role of *SLC7A10* in cystinuria

SLC7A10 has been proposed as a candidate gene for cystinuria for several reasons [29]: (1) the chromosomal

location of *SLC7A10* in 19q13.1, in the vicinity of the cystinuria type B gene (*SLC7A9*), (2) *asc-1* mRNA is expressed in kidney, (3) cysteine is a substrate for *asc-1*, and (4) three cystinuria-specific *SLC7A10* sequence variants have been detected. To check this hypothesis we studied localization of the *SLC7A10* mRNA expression in kidney and searched for mutations of this gene in our cohort of cystinuria patients.

Initially, we studied the tissue distribution of expression of *asc-1* in human tissues by Northern blot. Multiple hybridizing bands at 1.3 kb, 2.0 kb, 4.6 kb, and 6.0 kb were detected in various tissues including brain, kidney, skeletal muscle, heart, liver, and placenta (data not shown). A similar expression pattern has been described previously [26]. In kidney, the 2.0 kb transcript was expressed predominantly (data not shown). Expression of *asc-1* mRNA in human kidney was assessed by in situ hybridization (Fig. 5). The *asc-1* mRNA localized to distal tubules and collecting ducts in the renal cortex, and more conspicuously in thin limbs of Henle's loops, distal tubules, and collecting ducts in the renal medulla. In contrast, no signal was detected in glomeruli or proximal tubules. This suggests that *SLC7A10* has no role in cystinuria since the bulk (~99%) of renal reabsorption of cystine occurs in the proximal tubule [35]. Beside this, the description of cystinuria-specific sequence variants in *SLC7A10* [29] fosters us to search for mutations in this gene in 22 patients with cystinuria with incomplete description of mutations after an exhaustive analysis of the two cystinuria genes known so far (*SLC3A1* and *SLC7A9*). Mutational analysis was performed in the exon-intron boundaries and the coding region of the gene. Table 2 summarizes the five *SLC7A10* sequence variants identified in these patients. Four of them correspond to intronic sequence variants, which do not likely affect splicing as predicted by the compilation of Senapathy, Shapiro, and Harris [36]. The last identified sequence variant is a silent G→T transversion affecting residue T458. This last variant and IVS6-11T→C were also identified in the study of Leclerc et al [29]. In contrast, the other previously described variants, including 435G→C, the only one that results in an amino acid residue change (E112D), has not been identified in our selection of patients. The five identified variants in the present study were also present in control population, with similar frequency that in the patients studied (Table 2).

In order to test further a role of *SLC7A10* in cystinuria, the amino acid transport function associated with the sequence variant E112D was assessed. As shown in Figure 6A, *asc-1* (E112D)- and wild-type *asc-1*-transfected cells induced similar uptake of 50 $\mu\text{mol/L}$ L-[^3H]alanine and L-[^3H]serine. Moreover, the induced efflux of L-alanine by *asc-1* (E112D)- and wild-type *asc-1*-expressing cells were also similar in both transstimulated (medium containing L-alanine or L-serine) and

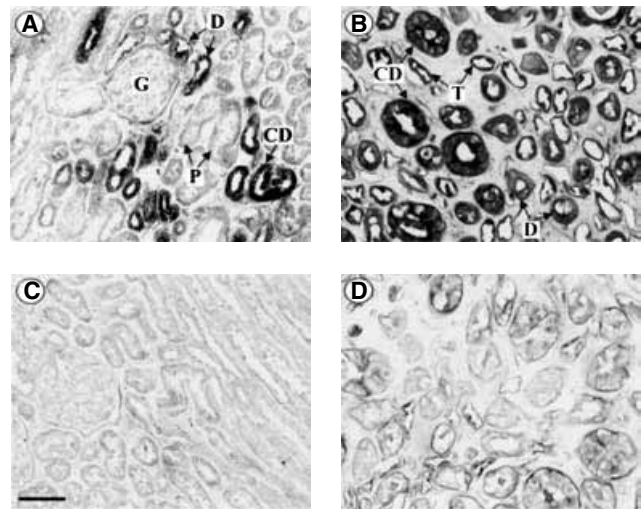


Fig. 5. In situ hybridization of *asc-1* mRNA in human adult kidney. Paraffin-embedded sections of human kidney cortex (A and C) and outer medulla (B and D) were incubated with antisense (A and B) or sense (C and D) *asc-1* cRNA probes as described in the **Methods** section. *Asc-1* mRNA-specific detection is restricted to distal tubules (D), collecting ducts (CD) and thin limbs of the loop of Henle (T). No signal is detected in glomerulus (G), or proximal tubule (P). This localizes the *asc-1* mRNA expression in the distal nephron (bar, 100 μm).

nontransstimulated conditions (amino acid-free medium or medium containing L-leucine) (Fig. 6B). In all, these results do not support the involvement of *SLC7A10* in cystinuria.

DISCUSSION

In the present study, we have shown that *asc-1/4F2hc* expressed in HeLa cells induces transport of amino acids with characteristics of a high-affinity ($\mu\text{mol/L}$ range) and nonstereospecific system *asc*, as described previously in oocytes [16, 26]. *Asc-1/4F2hc* transporter shows preferred selectivity for small neutral amino acids (i.e., glycine, alanine, serine, threonine, and cysteine). Here we show that *asc-1/4F2hc* mediates significant nontransstimulated efflux of alanine (up to 40% of the total efflux in the presence of *asc-1* substrates in the medium). Similar behavior was also suggested for mouse *asc-1/4F2hc* expressed in oocytes [16]. It has to be mentioned that in the family of HATs, the distant member *asc-2* (with amino acid identity of 21% between mouse *asc-1* and *asc-2*) also induces system *asc* transport activity, with very high-affinity (low $\mu\text{mol/L}$ range), stereospecificity and preferred selectivity for glycine, alanine, serine, and threonine [6]. Similar to *asc-1*, *asc-2* also mediates significant facilitated diffusion in addition to the exchange transport mechanism. In the context of a cell expressing concentrative neutral amino acid transporters (e.g., systems A, B⁰, B^{0,+}) the facilitated diffusion mode of transport induced by *asc-1* and *asc-2* suggests a role in the net efflux of small

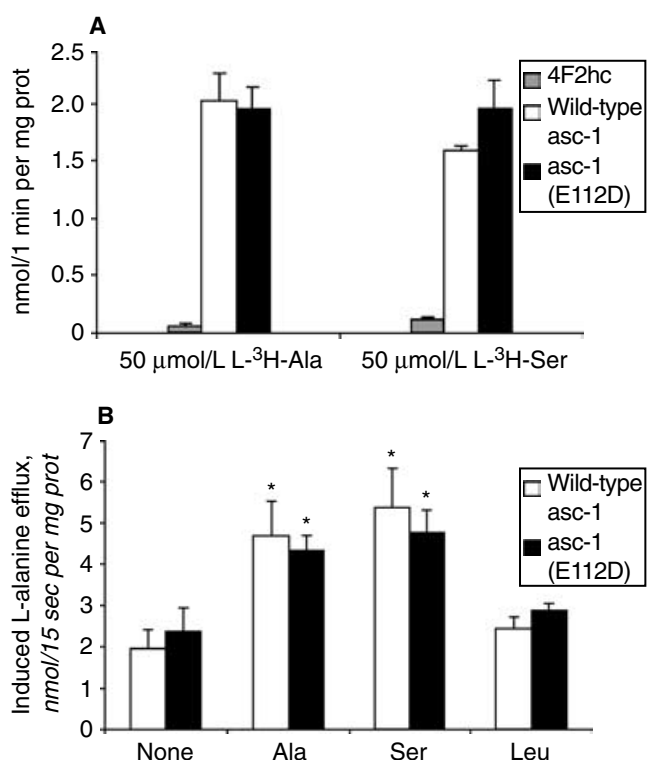


Fig. 6. The E112D mutation in asc-1 does not affect the induced asc transport activity in transfected HeLa cells. Cells were transfected with 4F2hc, wild-type asc-1 or E112D asc-1 and incubated for 2 days. (A) Analysis of the alanine and serine induced uptake by asc-1 (E112D) mutant. The transport activity induced by L-³H]alanine and L-³H]serine in the absence of sodium for 1 minute was measured in transfected cells. No significant differences were observed in the induced uptake in wild-type asc-1- and asc-1 (E112D)-expressing cells. Data (mean \pm SEM) are from a representative experiment with four replicas per group. A second independent experiment gave similar results. (B) System asc induced by asc-1 (E112D) in transfected HeLa cells presents transstimulation. Cells were loaded by incubation with 50 μ mol/L L-³H]alanine for 5 minutes. Then, the efflux rate of alanine to extracellular medium containing no amino acids or L-alanine (Ala), L-serine (Ser,) or L-leucine (Leu) at 1 mmol/L was measured. The induced efflux in wild-type asc-1- and asc-1 (E112D)-transfected cells was calculated by subtracting the efflux in 4F2hc-transfected cells. To express the efflux rate as nmol alanine/mg protein in 15 seconds, the percentage of radioactivity released was corrected by the intracellular content of alanine (see the **Methods** section). Similar to the efflux in wild-type asc-1-transfected cells, the efflux in asc-1 (E112D)-transfected cells was transstimulated by L-alanine and L-serine ($P \leq 0.05$), but not by L-leucine. Data represent the mean \pm SEM from two independent experiments with four replicas each. Efflux in 4F2hc-transfected cells to medium containing no amino acids, or 1 mmol/L Ala, Ser, or Leu were 2.6 ± 0.1 , 2.7 ± 0.3 , 3.4 ± 0.1 , and 2.6 ± 0.3 nmol alanine/mg protein in 15 seconds, respectively. The intracellular alanine content after 5 minutes' incubation with 50 μ mol/L alanine was 65 ± 9 , 71 ± 4 , and 77 ± 6 in 4F2hc-, wild-type asc-1-, and asc-1 (E112D)-transfected cells, respectively ($N = 2$).

neutral amino acids for these transporters. In contrast, the other members of the HAT family behave as obligatory exchangers [1].

The characteristics of asc-1 suggested *SLC7A10* as a candidate gene for cystinuria [29]. In fact, the exhaustive mutational analysis of the coding region and the exon-intron boundaries of the two cystinuria genes (*SLC3A1*

and *SLC7A9*) in the cohort of patients of the International Cystinuria Consortium have failed to explain $\sim 13\%$ of the alleles [31] (and manuscript in preparation). The unexplained alleles might correspond to mutations in the promoter or intronic sequences of *SLC3A1* or *SLC7A9*, or to mutations in unidentified genes. The present study does not support a role for *SLC7A10* in cystinuria for several reasons. First, here we showed that human asc-1 is not expressed in proximal tubule. The bulk of the renal reabsorption of amino acids occurs in the proximal tubule [37]. Moreover, transporters that play a major role in renal reabsorption of amino acids mainly localized to the proximal tubule: (1) the apical transporter $b^{0,+}$ AT/rBAT [3, 38–41], (2) the basolateral transporter y^+ LAT-1/4F2hc [38], (3) the basolateral transporter LAT-2/4F2hc [9, 38, 42], and (4) transporter EAAC1 [43], responsible for apical dicarboxylic amino acid reabsorption as evidenced by the corresponding knockout mice [44]. Second, the exhaustive mutational analysis of the coding region and the exon-intron boundaries of *SLC7A10* identified polymorphisms but not cystinuria-specific mutations in 22 patients, which are not completely explained by mutations in either of the two cystinuria genes. Third and finally, none of the three previously reported variants in *SLC7A10* associated with cystinuria predicts a dramatic change in the protein asc-1 [29]: a silent mutation affecting residue serine 56, an intronic change which is not likely to affect splicing, and a conservative missense mutation (E112D) affecting a nonconserved residue in the family of light subunits of HATs [16]. In the present study, the expression of asc-1 (E112D) in HeLa cells demonstrated full transport function. All this reveals that transporter asc-1 plays neither a role in cystinuria and, most probably, nor a role in renal reabsorption of cystine.

4F2hc acts as an ancillary protein to express asc-1 transport activity in foreign expression systems. Thus, expression of asc-1 in oocytes does not result in induction of amino acid transport, whereas coexpression with 4F2hc does [16, 26] (and present study). In HeLa cells, intracellular endogenous 4F2hc serves for this purpose. Indeed, transfection of asc-1 alone brings intracellular endogenous 4F2hc to the cell membrane and results in the induction of asc transport activity (present study). However, the functional coexpression of a light subunit and a heavy subunit of HATs in a foreign expression system is not a proof that these subunits heterodimerize in the native tissue. Thus, coexpression of rBAT or 4F2hc with $b^{0,+}$ AT resulted in functional induction of amino acid transport [19, 40, 45], whereas in kidney all $b^{0,+}$ AT heterodimerizes with rBAT and not with 4F2hc [3]. Indeed, heterodimerization in native tissues or cells has also been demonstrated for LAT-1/4F2hc [46, 47] and LAT-2/4F2hc [48]. Renal expression of asc-1 localized to thin limbs of Henle's loop, distal tubules, and collecting ducts. This localization does not coincide with the restrictive

distribution of rBAT in proximal tubules [39, 41, 49]. In human kidney, 4F2hc has been localized to the basolateral domain of epithelial cells of proximal tubules [50]. Thus, expression of 4F2hc has not been reported in distal nephron, but it could be underestimated due to the high proximal expression of 4F2hc necessary to heterodimerize with γ^+ LAT-1 and LAT-2, which are also highly and specifically expressed in proximal nephron [9, 38, 42]. If *asc-1* forms heterodimers with 4F2hc, it is expected that this transporter will have a basolateral location in distal nephron. Alternatively, *asc-1* might heterodimerize with an unknown heavy subunit. This possibility has been suggested for *asc-2* and AGT-1. These two subunits do not interact functionally with 4F2hc or rBAT in foreign expression systems, and their functional expression at the cell surface was accomplished by fusion with these heavy subunits [5, 6]. Moreover, AGT-1 and *asc-2* form a subgroup with low amino acid identity with the other light subunits (24% to 33%). The amino acid identity between the light subunits interacting with 4F2hc or rBAT ranges from 39% to 70%. Indeed, *asc-1* has 62% amino acid sequence identity with LAT-2. Then, even though the interaction of *asc-1* with unidentified heavy subunits has not been ruled out, it seems unlikely.

Recycling of L- and D-alanine and L-serine has been described between Henle's loops and vasa recta in the juxtamedullary nephrons of the rat kidney [51–53]. The flux of L- and D-alanine from vasa recta to the loops can be partially inhibited by L-phenylalanine [53]. These characteristics resemble those of the transport activity induced by *asc-1/4F2hc* in oocytes [16, 26] and HeLa cells (present study). The location of *asc-1* in the thin limbs of Henle's loop strongly suggests that this transporter may be responsible for the basolateral fluxes of small neutral amino acids between tubule epithelial cells and vasa recta during recycling. The recycling of amino acids has been suggested to play a role in osmotic regulation [51]. Moreover, free amino acids are believed to participate in the osmotic adaptation of medullary cells, even though with a lower quantitative contribution than trimethylamines and polyols. In general, the content of free amino acids in renal medulla changes according to the diuretic state [54]. Taurine, alanine and proline are the main free amino acids involved in the increase of amino acid concentration in hypertonic medulla [55]. Two concentrative amino acid transporters may participate in this process: the Na^+/Cl^- /taurine transporter (TAUT) [56] and system A [likely due to isoforms ATA2 and/or NAT3 (also named ATA3)], which are expressed in kidney [57, 58]. In this sense, hypertonic Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells show increased expression of TAUT mRNA [56] and system A transport activity [59, 60]. It has been suggested that free amino acids may play a role in the initial stage of the cellular adaptation in

renal medulla, while the slowly accumulating trimethylamines and polyols predominate when these cells are fully adapted [61]. Indeed, the hypertonic activation of betaine [60] and *myo*-inositol carriers [62] is slower than the transitory stimulation of system A in MDCK cells. On the other hand, hyposmolarity reduces the intracellular content of amino acids in MDCK by stimulating their release [63]. Beta-alanine, glycine, alanine, and serine, preferred substrates of transporter *asc-1/4F2hc* [16], are among the most affected amino acids. Net efflux through transporter *asc-1/4F2hc*, due to its facilitated diffusion mode of transport, might be responsible for the release of small neutral amino acids after their hypertonic-induced transient accumulation or in hyposmotic conditions.

Interestingly, *asc-2*, but not *asc-1*, is expressed in mouse kidney, specifically in the collecting duct [6, 16]. Similarly to *asc-1*, *asc-2* also shows significant facilitated diffusion mode of transport [6]. Moreover, *asc-2* is not found in the human genome. Thus, BLAST search in the human genome sequence, using *asc-2* as a query, revealed all the identified light subunits of heteromeric amino acid transporters but not the human ortholog of *asc-2*. This suggests that mouse *asc-2* might have a role in osmotic adaptation in distal nephron similar to that suggested for human *asc-1*. Interestingly to this regard, analysis of *asc-1* and *asc-2* gene sequences revealed the presence of tonicity-responsive enhancers (TonEs). TonE motifs and TonE binding protein (TonEBP) mediate the hypertonicity-induced increase in the transcription of several genes like betaine transporter (BGT1), *myo*-inositol transporter (SMIT), and aldose reductase [55]. TonE consensus sequences TGGAAANNYYN (Y is C or T; N is any nucleotide) are located upstream and within the first intron of human *asc-1* and mouse *asc-2*. One TonE element is present at ~4 kb upstream of both human *asc-1* and mouse *asc-2* exon 1, and one and six TonE elements are located within the large first intron of human *asc-1* and mouse *asc-2*, respectively. In addition, four and nine less restricted TonE consensus sequences (YGGAAANNYYN) [64] are also present within the 10 kb upstream to the first exon 1 of human *asc-1* and within the first intron of mouse *asc-2*, respectively. Further research is needed to assess the role of *asc-1* and *asc-2* in kidney, but their expression in human and mouse distal nephron, facilitated diffusion mode of transport and the presence of TonE elements in their coding genes suggests a role in osmotic adaptation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the patients that participated in this work. We also thank Robin Rycroft for editorial help. We thank Amparo Latorre and Sandra Mañas for technical assistance. We thank the Serveis Científic-Tècnics del Parc Científic de Barcelona for help in in situ hybridization analysis and the Fundació Institut d'Urologia, Nefrologia i Andrologia-Puigvert

for donating human tissue. This study was supported by the Dirección General de Investigación Científica y Técnica (Spain) (Grants PM99-017-CO-01/02 and SAF2003-08940-01/02), by Generalitat de Catalunya (support of the Comissionat per a Universitat i Recerca and Grants 2001SGR00118 and 2001SGR00399), and by Instituto de Salud Carlos III (networks G03/054, C03/07, and C03/08).

Reprint requests to Manuel Palacín, Departament de Bioquímica y Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avda. Diagonal 645, Barcelona E-08028, Spain.
E-mail: mpalacin@bio.ub.es

REFERENCES

- CHILLARON J, ROCA R, VALENCIA A, et al: Heteromeric amino acid transporters: Biochemistry, genetics, and physiology. *Am J Physiol Renal Physiol* 281:F995-F1018, 2001
- PALACIN M, KANAI Y: The ancillary proteins of HATs: SLC3 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch* 447:490-494, 2003
- FERNANDEZ E, CARRASCAL M, ROUSAUD F, et al: rBAT-b(0,+)-AT heterodimer is the main apical reabsorption system for cystine in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:F540-F548, 2002
- VERREY F, CLOSS E, WAGNER C, et al: SLC7 family. *Pflugers Arch* 447:532-542, 2004
- MATSUO H, KANAI Y, KIM JY, et al: Identification of a novel Na⁺-independent acidic amino acid transporter with structural similarity to the member of a heterodimeric amino acid transporter family associated with unknown heavy chains. *J Biol Chem* 277:21017-21026, 2002
- CHAIROUNGDU A, KANAI Y, MATSUO H, et al: Identification and characterization of a novel member of the heterodimeric amino acid transporter family presumed to be associated with an unknown heavy chain. *J Biol Chem* 276:49390-49399, 2001
- REIG N, CHILLARON J, BARTOCCIONI P, et al: The light subunit of system b(0,+)-AT is fully functional in the absence of the heavy subunit. *Embo J* 21:4906-4914, 2002
- MEIER C, RISTIC Z, KLAUSER S, et al: Activation of system L heterodimeric amino acid exchangers by intracellular substrates. *Embo J* 21:580-589, 2002
- PINEDA M, FERNANDEZ E, TORRENTS D, et al: Identification of a membrane protein, LAT-2, that Co-expresses with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transport activity with broad specificity for small and large zwitterionic amino acids. *J Biol Chem* 274:19738-19744, 1999
- MASTROBERARDINO L, SPINDLER B, PFEIFFER R, et al: Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family. *Nature* 395:288-291, 1998
- PFEIFFER R, ROSSIER G, SPINDLER B, et al: Amino acid transport of y + L-type by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of the glycoprotein-associated amino acid transporter family. *Embo J* 18:49-57, 1999
- KANAI Y, FUKASAWA Y, CHA SH, et al: Transport properties of a system y + L neutral and basic amino acid transporter. Insights into the mechanisms of substrate recognition. *J Biol Chem* 275:20787-20793, 2000
- BROER A, WAGNER CA, LANG F, BROER S: The heterodimeric amino acid transporter 4F2hc/y+LAT2 mediates arginine efflux in exchange with glutamine. *Biochem J* 349:787-795, 2000
- SATO H, TAMBA M, ISHII T, BANNAI S: Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. *J Biol Chem* 274:11455-11458, 1999
- BASSI MT, GASOL E, MANZONI M, et al: Identification and characterization of human xCT that co-expresses, with 4F2 heavy chain, the amino acid transport activity system xc. *Pflugers Arch* 442:286-296, 2001
- FUKASAWA Y, SEGAWA H, KIM JY, et al: Identification and characterization of a Na⁺-independent neutral amino acid transporter that associates with the 4F2 heavy chain and exhibits substrate selectivity for small neutral D- and L-amino acids. *J Biol Chem* 275:9690-9698, 2000
- ALBI JL, CANALS P, GALLARDO MA, SANCHEZ J: Na⁺-independent L-alanine uptake by trout cells. Evidence for the existence of at least two functionally different acs systems. *J Membr Biol* 140:189-196, 1994
- CALONGE MJ, GASPARINI P, CHILLARON J, et al: Cystinuria caused by mutations in rBAT, a gene involved in the transport of cystine. *Nat Genet* 6:420-425, 1994
- FELIUBADALO L, FONT M, PURROY J, et al: Non-type I cystinuria caused by mutations in SLC7A9, encoding a subunit (bo,+AT) of rBAT. International Cystinuria Consortium. *Nat Genet* 23:52-57, 1999
- PETERS T, THAETE C, WOLF S, et al: A mouse model for cystinuria type I. *Hum Mol Genet* 12:2109-2120, 2003
- FELIUBADALO L, ARBONES ML, MANAS S, et al: Slc7a9-deficient mice develop cystinuria non-I and cystine urolithiasis. *Hum Mol Genet* 12:2097-2108, 2003
- PALACIN M, GOODYER P, NUNES V, GASPARINI P: Cystinuria, in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, New York, McGraw-Hill, 2002 (<http://www.genetics.accessmedicine.com>, online edition)
- TORRENTS D, MYKKANEN J, PINEDA M, et al: Identification of SLC7A7, encoding y+LAT-1, as the lysinuric protein intolerance gene. *Nat Genet* 21:293-296, 1999
- BORSANI G, BASSI MT, SPERANDEO MP, et al: SLC7A7, encoding a putative permease-related protein, is mutated in patients with lysinuric protein intolerance. *Nat Genet* 21:297-301, 1999
- FERNANDEZ E, TORRENTS D, CHILLARON J, et al: Basolateral LAT-2 has a major role in the transepithelial flux of L-cystine in the renal proximal tubule cell line OK. *J Am Soc Nephrol* 14:837-847, 2003
- NAKAUCHI J, MATSUO H, KIM DK, et al: Cloning and characterization of a human brain Na⁺-independent transporter for small neutral amino acids that transports D-serine with high affinity. *Neurosci Lett* 287:231-235, 2000
- HELBOE L, EGEBJERG J, MOLLER M, THOMSEN C: Distribution and pharmacology of alanine-serine-cysteine transporter 1 (asc-1) in rodent brain. *Eur J Neurosci* 18:2227-2238, 2003
- DANYSZ W, PARSONS AC: Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: Physiological significance and possible therapeutic applications. *Pharmacol Rev* 50:597-664, 1998
- LECLERC D, WU Q, ELLIS JR, et al: Is the SLC7A10 gene on chromosome 19 a candidate locus for cystinuria? *Mol Genet Metab* 73:333-339, 2001
- BOGUSKI MS, TOLSTOSHEV CM, BASSETT DE, JR.: Gene discovery in dbEST. *Science* 265:1993-1994, 1994
- DELLO STROLOGO L, PRAS E, PONTESILLI C, et al: Comparison between SLC3A1 and SLC7A9 cystinuria patients and carriers: A need for a new classification. *J Am Soc Nephrol* 13:2547-2553, 2002
- ESTEVEZ R, CAMPS M, ROJAS AM, et al: The amino acid transport system y+L/4F2hc is a heteromultimeric complex. *FASEB J* 12:1319-1329, 1998
- FONT MA, FELIUBADALO L, ESTIVILL X, et al: Functional analysis of mutations in SLC7A9, and genotype-phenotype correlation in non-type I cystinuria. *Hum Mol Genet* 10:305-316, 2001
- CAMPA MJ, KILBERG MS: Characterization of neutral and cationic amino acid transport in *Xenopus* oocytes. *J Cell Physiol* 141:645-652, 1989
- VOLKL H, SILBERNAGL S: Mutual inhibition of L-cystine/L-cysteine and other neutral amino acids during tubular reabsorption. A microperfusion study in rat kidney. *Pflugers Arch* 395:190-195, 1982
- SENAPATHY P, SHAPIRO MB, HARRIS NL: Splice junctions, branch point sites, and exons: Sequence statistics, identification, and applications to genome project. *Methods Enzymol* 183:252-278, 1990
- SILBERNAGL S: The renal handling of amino acids and oligopeptides. *Physiol Rev* 68:911-1007, 1988
- BAUCH C, FORSTER N, LOFFING-CUENI D, et al: Functional cooperation of epithelial heteromeric amino acid transporters expressed in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 278:1316-1322, 2003
- FURRIOLS M, CHILLARON J, MORA C, et al: rBAT, related to L-cysteine transport, is localized to the microvilli of proximal straight tubules, and its expression is regulated in kidney by development. *J Biol Chem* 268:27060-27068, 1993
- CHAIROUNGDU A, SEGAWA H, KIM JY, et al: Identification of an amino acid transporter associated with the cystinuria-related type II membrane glycoprotein. *J Biol Chem* 274:28845-28848, 1999

41. PFEIFFER R, LOFFING J, ROSSIER G, et al: Luminal heterodimeric amino acid transporter defective in cystinuria. *Mol Biol Cell* 10:4135–4147, 1999
42. ROSSIER G, MEIER C, BAUCH C, et al: LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine. *J Biol Chem* 274:34948–34954, 1999
43. SHAYAKUL C, KANAI Y, LEE WS, et al: Localization of the high-affinity glutamate transporter EAAC1 in rat kidney. *Am J Physiol* 273:F1023–F1029, 1997
44. PEGHINI P, JANZEN J, STOFFEL W: Glutamate transporter EAAC1-deficient mice develop dicarboxylic aminoaciduria and behavioral abnormalities but no neurodegeneration. *Embo J* 16:3822–3832, 1997
45. RAJAN DP, KEKUDA R, HUANG W, et al: Cloning and expression of a b(0,+)-like amino acid transporter functioning as a heterodimer with 4F2hc instead of rBAT. A new candidate gene for cystinuria. *J Biol Chem* 274:29005–29010, 1999
46. MANNION BA, KOLESNIKOVA TV, LIN SH, et al: The light chain of CD98 is identified as E16/TA1 protein. *J Biol Chem* 273:33127–33129, 1998
47. NAKAMURA E, SATO M, YANG H, et al: 4F2 (CD98) heavy chain is associated covalently with an amino acid transporter and controls intracellular trafficking and membrane topology of 4F2 heterodimer. *J Biol Chem* 274:3009–3016, 1999
48. MERLIN D, SITARAMAN S, LIU X, et al: CD98-mediated links between amino acid transport and beta 1 integrin distribution in polarized columnar epithelia. *J Biol Chem* 276:39282–39289, 2001
49. PICKEL VM, NIRENBERG MJ, CHAN J, et al: Ultrastructural localization of a neutral and basic amino acid transporter in rat kidney and intestine. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:7779–7783, 1993
50. QUACKENBUSH EJ, GOUGOS A, BAUMAL R, LETARTE M: Differential localization within human kidney of five membrane proteins expressed on acute lymphoblastic leukemia cells. *J Immunol* 136:118–124, 1986
51. DANTZLER WH, SILBERNAGL S: Amino acid transport by juxtamedullary nephrons: Distal reabsorption and recycling. *Am J Physiol* 255:F397–F407, 1988
52. DANTZLER WH, SILBERNAGL S: Amino acid transport: Microinfusion and micropuncture of Henle's loops and vasa recta. *Am J Physiol* 258:F504–F513, 1990
53. DANTZLER WH, SILBERNAGL S: Specificity of amino acid transport in renal papilla: Microinfusion of Henle's loops and vasa recta. *Am J Physiol* 261:F495–F504, 1991
54. BECK FX, BURGER-KENTISCHER A, MULLER E: Cellular response to osmotic stress in the renal medulla. *Pflugers Arch* 436:814–827, 1998
55. HANDLER JS, KWON HM: Transcriptional regulation by changes in tonicity. *Kidney Int* 60:408–411, 2001
56. UCHIDA S, KWON HM, YAMAUCHI A, et al: Molecular cloning of the cDNA for an MDCK cell Na(+)- and Cl(-)-dependent taurine transporter that is regulated by hypertonicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:8230–8234, 1992
57. HATANAKA T, HUANG W, WANG H, et al: Primary structure, functional characteristics and tissue expression pattern of human ATA2, a subtype of amino acid transport system A. *Biochim Biophys Acta* 1467:1–6, 2000
58. GU S, ADAN-RICE D, LEACH RJ, JIANG JX: A novel human amino acid transporter, hNAT3: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic structure, expression, and functional characterization. *Genomics* 74:262–272, 2001
59. HORIO M, YAMAUCHI A, MORIYAMA T, et al: Osmotic regulation of amino acids and system A transport in Madin-Darby canine kidney cells. *Am J Physiol* 272:C804–C809, 1997
60. CHEN JG, COE M, McATEER JA, KEMPSON SA: Hypertonic activation and recovery of system A amino acid transport in renal MDCK cells. *Am J Physiol* 270:F419–F424, 1996
61. LAW RO: Alterations in renal inner medullary levels of amino nitrogen during acute water diuresis and hypovolaemic oliguria in rats. *Pflugers Arch* 418:442–446, 1991
62. HANDLER JS, KWON HM: Regulation of renal cell organic osmolyte transport by tonicity. *Am J Physiol* 265:C1449–C1455, 1993
63. SANCHEZ OLEA R, PASANTES-MORALES H, LAZARO A, CEREJIDO M: Osmolarity-sensitive release of free amino acids from cultured kidney cells (MDCK). *J Membr Biol* 121:1–9, 1991
64. MIYAKAWA H, WOO SK, CHEN CP, et al: Cis- and trans-acting factors regulating transcription of the BGT1 gene in response to hypertonicity. *Am J Physiol* 274:F753–F761, 1998

14.1.1 Clonació del gen d'asc-1, *SLC7A10*

El crivellatge *in silico* a càrrec de David Torrents i Núria Reig, prèviament esmentat, proporcionà un altre EST (a part dels que donaren lloc a la identificació de *SLC7A9*) AA026793 que pertanyia a una altra subunitat lleugera de la família de LSHAT. Una cerca a les bases de dades els va permetre trobar altres EST que solapaven amb AA026793: AI123040, W84528 i AA935916 i un EST de ratolí: AI120079. Els clons IMAGE que contenien aquests EST van ser seqüenciats per la doctoranda conjuntament amb Núria Reig, obtenint la seqüència 3' del cDNA però no la ORF sencera (figura 10). Els alineaments semblaven indicar que els clons contenien seqüències intròniques. Vem utilitzar una sonda obtinguda amb els encebadors P5D13 i P5R1, dissenyats a partir de la seqüència del clon IMAGE 1509931 corresponent a l'EST AI123040, per hibridar una genoteca de cDNA de ronyó en λ ZAP. No vam obtenir cap positiu. Posteriorment, el doctor Jesús Purroy va realitzar un nou crivellatge d'aquesta genoteca amb una nova sonda corresponent a la seqüència fins llavors coneguda de P5, per tal d'obtenir-ne el cDNA complet. Va obtenir un clon sencer, que codificava per una nova subunitat de 4F2hc que posteriorment es va anomenar asc-1 (*system asc amino acid transporter*).

14.1.2 Localització de l'expressió d'asc-1 en ronyó humà

La doctora Marta Pineda realitzà els experiments de localització d'asc-1 en ronyó humà mitjançant hibridació *in situ* en talls procedents de còrtex i de la part interna de la medul·la externa. Tal com es mostra en la figura 6 de l'article 6, l'expressió del missatger d'asc-1 es localitza en túbuls distals i col·lectors, presents tant al còrtex com en la medul·la renal, i en la branca estreta de la nansa de Henle, present en la medul·la. En canvi, no es detectà senyal en glomèruls o túbuls proximals. La manca d'expressió d'asc-1 en túbul proximal, on es dona la major part de la reabsorció renal d'aminoàcids, suggeria que asc-1 no estava implicat en la cistinúria. La possible funció d'asc-1 es discutirà en la Discussió General.

14.1.3 Paper del gen *SLC7A10* (asc-1) en cistinúria

L'any 2001 va sortir una publicació que apuntava la possibilitat que *SLC7A10*, de la mateixa família de permeases que *SLC7A9*, fos també responsable d'alguns casos de cistinúria (Leclerc *et al.* 2001). Goodyer i col·laboradors hipotetitzaren que el gen d'asc-1, *SLC7A10*, podia ser un gen de cistinúria degut a tres fets principals: i) la localització cromosòmica del gen de asc-1 en la regió 19q13.1, al costat del gen de cistinúria *SLC7A9*, al *locus* refinat de la cistinúria de tipus no I (Leclerc *et al.* 2001), Font i Reig, apartat 9.1.1; Bassi, resultats no publicats); ii) l'expressió d'asc-1 a ronyó; i iii) l'activitat de transport induïda d'aminoàcids neutres de mida petita, entre ells la cisteïna.

El gen *SLC7A10* s'expressa sobretot a ronyó i cervell, però també a placenta, cor, múscul esquelètic, pulmó, fetge i pàncrees (Nakauchi *et al.* 2000). Tot i que aquest perfil d'expressió inclou molts teixits no afectats pel fenotip cistinúric, es podria argumentar que altres transportadors poden suplir-lo en aquests teixits, però no al ronyó. En ronyó es localitza a la nansa de Henle, el túbul distal i el conducte col·lector, zones on no es produeix una apreciable reabsorció de cistina. *SLC7A10* codifica per asc-1, una LSHAT que s'uneix a 4F2hc per induir un transport d'aminoàcids neutres petits. Tampoc es tracta, doncs, d'un bon candidat funcional, però la seva localització cromosòmica i la publicació que apuntava la possibilitat que *SLC7A10*, un membre de la mateixa família de permeases de *SLC7A9*, fos també responsable d'alguns casos de cistinúria (Leclerc *et al.* 2001) impulsaren el nostre grup a cercar-hi mutacions en pacients que fins al moment no havien estat explicats per *SLC3A1* i *SLC7A9*. En aquell moment encara restaven un 20% d'al·lèls de tipus no I en les que no s'havia trobat mutacions a cap dels 2 gens responsables de cistinúria (*SLC7A9* i *SLC3A1*). Per aquest motiu la doctoranda buscà mutacions en la regió codificant i en els límits exó-intró de *SLC7A10* en aquests pacients de cistinúria no explicats pel mètode de SSCP en 39 pacients espanyols en els que encara els falta un al·lel o els 2 per explicar, malgrat que sospitàvem que probablement *SLC7A10* no estaria implicat en cistinúria.

RESULTATS

14.1.4 Anàlisi de mutacions de *SLC7A10* per SSCP en famílies noves de tipus no I

Per cercar mutacions la doctoranda dissenyà encebadors intrònics (taula 1, article 6) i va seguir la mateixa estratègia utilitzada per *SLC7A9* (articles 2, 3 i 5): SSCP de DNA genòmic de pacients de cistinúria i posterior seqüenciació automàtica per caracteritzar les bandes anòmales obtingudes.

La taula 2 de l'article 6 presenta les variants de seqüència trobades a *SLC7A10* en aquests pacients, juntament amb les variacions descrites anteriorment per Goodyer i col·laboradors (Leclerc *et al.* 2001). Vem trobar una variant silent en el residu T458 i quatre variants de seqüència intròniques, que molt probablement no afecten el *splicing* del gen (Senapathy *et al.* 1990) encara que caldria estudiar el mRNA per comprovar-ho. Aquestes variants de seqüència identificades es trobaven també en la població control amb la mateixa freqüència (taula 2, article 6). Per altra banda, el grup de Goodyer havia descrit també la variant silent T458, una altra silent en el residu S56, dues variants intròniques i una que ocasionava el canvi p.E112D.

A la taula 18 es presenten les variants al·lèliques trobades a *SLC7A10* en pacients espanyols. Dels 16 individus amb una mutació B (*SLC7A9*) o cap mutació identificada i un amb una mutació a A, 13 tenien polimorfismes a *SLC7A10*.

Pacient	Fam.	Fenotip/	IVS4+48C>G	IVS4-21C>G	IVS6-11C>T	IVS8-17G>A	c.1374G>T
C171	F30	A?/Q	cc	cc	tt	gg	GG
C139	F24	B?/Q	cc	cc	cc	gg	GG
C294	F53	B+/Nol+	cc	cc	cc	gg	GG
C2	F8	B?/Nol	cc	cc	cc	gg	GG
C180	F32	B?/Q	cc	cc	tc	gg	GG
B59	F94	B?/mixt	cc	cc	tc	gg	GG
C306	F56	B?/Nol	cc	cc	tc	gg	GT
C189	F34	B+/Nol+	cc	cc	tc	ga	GG
C360	F64	B+/Nol+	cg		tt	gg	GG
C174	F31	B?/Q	cc	cc	tt	gg	GG
C292	F52	B?/mixt	cc	cc	tt	gg	GG
A31	F72	??/Q	cc	cc	tc	gg	GT
A151	F80	??/Q	cc	cc	tc	gg	GG
D24	F107	??/Q	cc	cc		gg	GG
D31	F109	??/Q	cc	cc	tc	gg	GG
F22	F118	??/mixt	cc	cc	tc	gg	GG

Taula 18. Combinacions al·lèliques de les variants de *SLC7A10* en els pacients cistinúrics estudiats. Dels 16 individus amb una mutació a B, a A, o cap mutació identificada, 13 tenen polimorfismes a *SLC7A10*. Bases intròniques en minúscules i exòniques en majúscules. Q, no classificada per fenotip. Es mostren en fons gris els canvis respecte la seqüència salvatge. Els pedigrís d'aquestes famílies es mostren a la figura 25.

La chi quadrat mostrada a la taula 2 de l'article 6 es va realitzar en 21 pacients, 5 dels quals en aquell moment eren A?. Més tard vem trobar la mutació dupE5-E9 en 4 dels individus A?, que van passar a ser AA (A147, D19, B48 i 122), per tant vem realitzar un segon test χ^2 sense aquests pacients, per saber si hi havia diferències significatives entre pacients i controls i tampoc vem trobar cap valor de χ^2 major de 3,84 (en taules de contingència de 2x2, i a una significació de 0,05 el valor de chi quadrat hauria de ser major de 3,84 per considerar-se que la diferència és significativa) (taula 19).

Polimorfisme	Pacients		Al·lels		χ^2
	Al·lels	F	Al·lels	F	
IVS4+48C>G	1 (G) / 29 (C)	3,3%	9 (G) / 101 (C)	8,2%	0,84
IVS4-21C>G	1 (G) / 29 (C)	3,3%	9 (G) / 101 (C)	8,2%	0,84
IVS6-11C>T	15 (T) / 15 (C)	50%	52 (T) / 60 (C)	46,4%	0,20
IVS8-17G>A	1 (G) / 29 (A)	3,3%	2 (G) / 62 (A)	3,1%	0,01
c.1374G>T	2 (G) / 28 (T)	6,7%	6 (G) / 92 (T)	6,1%	0,01

Taula 19. Test chi quadrat per polimorfismes a *SLC7A10*. F, freqüència del polimorfisme en cada població.

Per tal de conèixer el paper de *SLC7A10* en cistinúria la doctora Marta Pineda, del nostre grup, va caracteritzar l'activitat de transport associada amb la variant p.E112D d'asc-1, la única descrita que suposava canvi d'aminoàcid. El residu E112 es localitza intracel·lularment abans del segment transmembrana III segons els estudis de topologia del transportador homòleg xCT (Gasol *et al.* 2004). En la figura 5A de l'article 6 s'observa que no hi ha diferències significatives en la captació d'alanina i serina induïda per asc-1 o la variant asc-1-p.E112D. Per altra banda, la inducció de sortida d'alanina radioactiva en presència de diferents aminoàcids tampoc era diferent en asc-1 respecte asc-1-p.E112D (figura 5B de l'article 6), indicant que aquesta variant no afecta la funció de transport de la proteïna.

14.2 LAT-2

Una altra LSHAT, LAT-2, codificada pel gen *SLC7A8*, situat al cromosoma 14q11.2, podia ser un bon candidat funcional per la cistinúria ja que en cèl·lules OK polaritzades, LAT-2 és responsable, almenys en part, del flux transepitelial de cistina, ja que mitjança l'eflux basolateral net de cisteïna (veure l'apartat 3.2.2) (Fernández *et al.* 2003). LAT-2 presenta un transport independent de sodi d'aminoàcids neutres, tant de cadena gran com de cadena petita, quan s'expressa amb 4F2hc en oòcits de *X. laevis* (Pineda *et al.* 1999). A ronyó, LAT-2 s'expressa a la membrana basolateral de les cèl·lules epitelials del túbul proximal (Pineda *et al.* 1999; Rossier *et al.* 1999).

Es van dissenyar encebadors per amplificar tots els exons del gen *SLC7A8* (veure annex 1) i es buscaren mutacions en la regió codificant i en els límits exó-intró i les regions no traduïdes (UTR, *untranslated regions*) de *SLC7A8* en 39 probands de cistinúria no explicats (37 espanyols i 2 italians). Hem trobat 11 variants de seqüència, 9 canvis d'un sol nucleòtid i 2 delecions de dinucleòtids: c.121T>A (5'UTR, a l'exó 1), IVS4+10G>T, IVS8+8C>A i IVS8+41C>T, (als introns 4 i 8), c.1855C>T, c.1879C>T i c.1915G>A i (a l'exó 9), IVS9+10A>C (a l'intró 9) i c.2381C>T, c.2413delTC i c.2458delTG (a l'exó 11, 3'UTR). Tres dels 11 canvis són variants exòniques silents. Les altres 8 es troben en regions no codificants (1 a 5'UTR, 4 mutacions intròniques i 3 a 3'UTR). Les dues delecions identificades a l'exó 11, es troben en la zona 3' no traduïda, per tant no tenen cap efecte de trencament de la pauta de lectura.

En la figura 26 es mostra el patró de bandes de SSCP obtingut per l'exó 11a. En aquest exó vem detectar una gran variabilitat de patrons produïda per combinacions al·lèliques de les 3 variants de seqüència identificades.

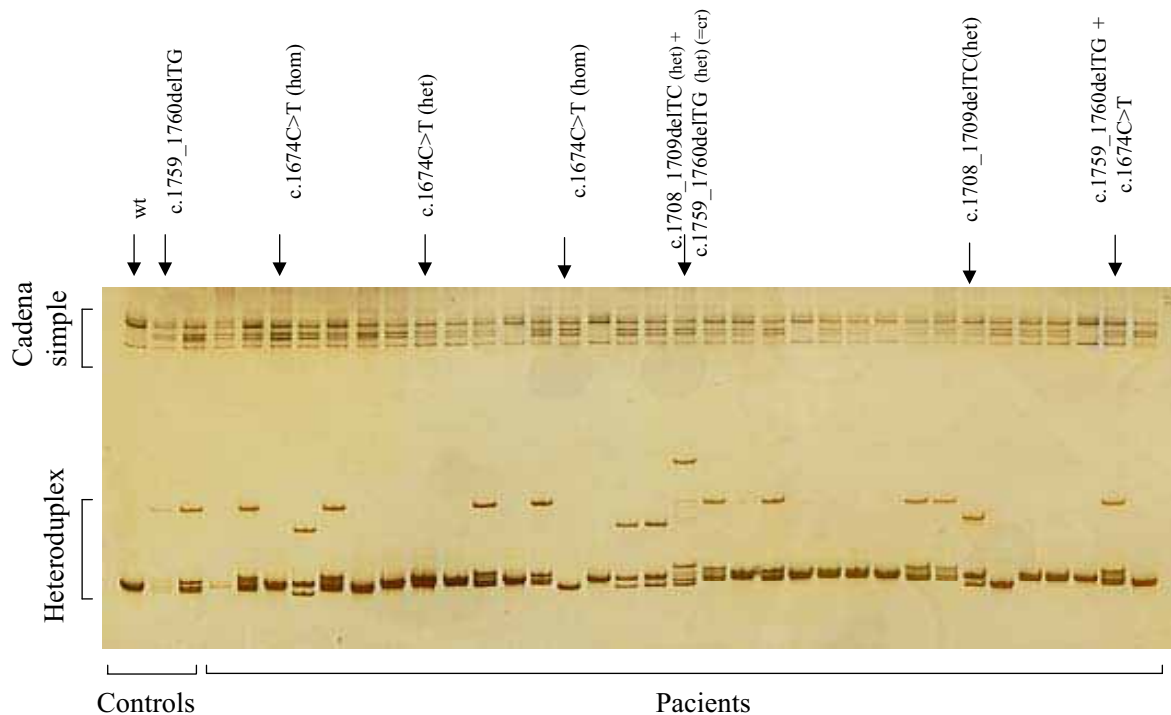


Figura 26. Patró de SSCP de l'exó 11a de *SLC7A8* en pacients cistinúrics als que els faltava una o les dues mutacions per identificar. Gel de SSCP del 12,5% (*Excel Gel DNA Analysis Kit*, Amersham Biosciences 17-1198-07). Es mostren les cadenes senzilles (a dalt) i els heterodúplex (a baix). S'indiquen els diferents polimorfismes. El patró de delecions era força atractiu, però en seqüenciar les bandes es veié que es tractava de delecions en zones no codificants.

RESULTATS

A la taula 20 es mostren les diferents variants de seqüència trobades a *SLC7A8*. La IVS8+8A>C es la única variant que es troba en una proporció més gran en pacients que en controls ($p \leq 0,05$). Els pacients que tenen la IVS8+8A>C en heterozigosi són 3 B? (C139, C294 i C2) i un ?? (A31). La vuitena base dels introns no pertany a la seqüència donadora consens, és a dir que en principi no afecta el *splicing*. Podria ser que aquest canvi estigui associat a un canvi intrònic o de promotor que sí que afecti la proteïna. De totes maneres s'haurien de realitzar estudis de mRNA (RT-PCR) per comprovar-ho. Hi ha dos polimorfismes més trobats en pacients, IVS4+10G>T (al pacient C2) i IVS8+41C>T (al pacient C151) que no s'han trobat en controls, en fer el test de χ^2 no surt significatiu per aquestes dues variants.

Polimorfisme	Pacients		Controls		χ^2
	Al·lels	F (%)	Al·lels	F (%)	
c.1-588T>A	7 (A) / 23 (T)	23,3	21 (A) / 73 (T)	22,3	0,01
IVS4+10G>T	1 (T) / 29 (G)	3,3	0 (T) / 96 (G)	0	2,54
IVS8+8C>A	4 (A) / 26 (C)	13,3	3 (A) / 89 (C)	3,2	4,25
IVS8+41C>T	1 (T) / 29 (C)	3,3	0 (T) / 92 (C)	0	3,08
c.1170C>T	12 (T) / 18 (C)	40	16 (T) / 58 (C)	21,6	3,67
IVS9+10A>C	14 (C) / 16 (A)	46,7	33 (C) / 41 (A)	44,6	0,04
c.1674T>C	6 (C) / 24 (T)	20	17 (C) / 75 (T)	18,5	0,22
c.1708_1709delTC	3 (del) / 27 (wt)	10	13 (del) / 79 (wt)	14,1	0,34
c.1759_1760delTG	5 (del) / 25 (wt)	16,7	11 (del) / 81 (wt)	12	0,44

Taula 20. Variants nucleotídiques trobades a *SLC7A8* en pacients cistinúrics i anàlisi estadístic. Hem trobat 11 variants nucleotídiques en aquest gen: 8 en zones no codificants (1 a 5'UTR, 4 mutacions a intròniques i 3 a 3'UTR). Les altres 3 localitzen dins dels exons però són silencioses. La IVS8+8A>C es troba més freqüentment en pacients que en controls ($p \leq 0,05$).

Malgrat que les freqüències són iguals en pacients i en controls, hi ha pacients que presenten una distribució al·lèlica força diferent (taula 21).

Pac	Fam	G/P	c.1-588 T>A	IVS4+10 G>T	IVS8+8 C>A	IVS8+41 C>T	IVS9+10 A>C	c.1170 C>T	c.1674 T>C	c.1708_1709 delTC	c.1759_1760 delTG
C171	F30	A?/Q	TA	gg	cc	cc	aa	TT	TT	no	no
C139	F24	B?/Q	TA	gg	ca	cc	ac	CC	TT	no	delTG
C294	F53	B+ /No I+	TT	gg	ca	cc	ac	CC	CT	no	delTG
C2	F8	B?/NoI	AA	gg	ca	ct	ac	CC	TT	delTC	delTG
C180	F32	B?/Q	TA	gg	cc	cc	aa	TT	TT	no	no
B59	F94	B?/mixt	TT	gg	cc	cc	ac	TT	CT	no	delTG
C306	F56	B?/NoI	TT	gg	cc	cc	cc	CC	TT	no	no
C189	F34	B+ /No I+	TT	gg	cc	cc	aa	TT	TT	no	no
C360	F64	B+ /No I+	TT	gg	cc	cc	ac	CT	CT	no	no
C174	F31	B?/Q	TT	gg	cc	cc	ac	CC		no	no
C292	F52	B?/mixt	TT	gg	cc	cc	ac	CT	TT	no	no
A31	F72	??/Q	TT	gg	ca	cc	ac	CC	CT	no	delTG
A151	F80	??/Q	TA	gt	cc	cc	ac	CC	TT	no	no
D24	F107	??/Q	TT	gg	cc	cc	ac	CT	CT	no	no
D31	F109	??/Q	TA	gg	cc	cc	ac	TT	TT	no	no
F22	F118	??/mixt	TA	gg	cc	cc	ac	TC	TT	delTC/delTC	no

Taula 21. Combinacions al·lèliques de les variants de *SLC7A8* en els pacients cistinúrics estudiats. Dels 16 individus amb una mutació a B, a A, o cap mutació identificada, tots ells tenen polimorfismes a *SLC7A10*. Es mostren en fons gris els canvis respecte la seqüència salvatge. Bases intròniques en minúscules i exòniques en majúscules. G/P, Genotip/Fenotip. Els pedigrís d'aquestes famílies es mostren a la figura 25.

Totes aquestes combinacions al·lèliques s'han trobat també en la població general. En l'anàlisi d'aquestes variants en població general vem trobar el canvi p.A343T en heterozigosi en un individu control i una

variant silent (c.1146C>T) en 5 individus control que no estaven presents en el nostre grup de pacients.

La cerca de mutacions duta a terme en aquest gen en la zona codificant, en pacients no explicats, tampoc ha permès trobar-hi cap mutació, només variants al·lèliques aparentment neutres. De tota manera, alguna variant en aquest transportador basolateral renal de cistina i altres aminoàcids neutres, com la IVS8+8C>A, podria modular el fenotip cistinúric (veure Discussió General).

15 ESTUDI DE *KNOCKOUTS*

15.1 *KNOCKOUT DE SLC3A1 (rBAT)*

Inicialment, la doctoranda començà a generar el KO de *Slc3a1* (rBAT) juntament amb el doctor Jesús Purroy (veure tesi doctoral de Jesús Purroy). L'interès de fer un *knockout* de *Slc3a1* radicava en que d'aquesta manera obtindríem un model animal que reproduís el fenotip que es troba en humans (cistinúria de tipus A, amb fenotip I majoritàriament) i podríem utilitzar-lo com a diana terapèutica per estudiar l'efecte de fàrmacs sobre els ratolins mutants. El nostre grup ja ha generat un ratolí *knockout* per *Slc7a9*, que és un model de cistinúria de tipus B (i majoritàriament no I) (Feliubadaló *et al.* 2003). També era interessant la possibilitat de creuar ratolins *Slc3a1*^{-/-} amb ratolins *Slc7a9*^{-/-} per veure l'efecte de complementació gènica i estudiar-ne el fenotip. Juntament amb Jesús Purroy vam generar la construcció, però donat que un altre grup ja tenia aquests KO pràcticament acabat el nostre grup va decidir començar el *knockout* de *Slc7a8*.

15.2 *KNOCKOUT DE SLC7A8 (LAT-2)*

L'interès del nostre grup per generar un ratolí *knockout* de *Slc7a8* (LAT-2) era múltiple: *SLC7A8* pertany a la mateixa família de LSHAT que *SLC7A9* (cistinúria de tipus B). Sabem que 4F2hc/LAT-2 participa en el pas transepitelial (d'apical a basolateral) de cistina (Fernández *et al.* 2003), però desconeixem la seva funció en múscul esquelètic i cor, on té una notable expressió (Pineda *et al.* 1999). Aquest transportador media l'intercanvi d'aminoàcids neutres de qualsevol mida a través de la membrana. La reducció parcial de l'expressió de LAT-2 en les cèl·lules OK ha mostrat que LAT-2 facilita la sortida neta de cisteïna i l'entrada neta d'alanina, serina i treonina (Fernández *et al.* 2003). Això probablement és degut a la particular concentració d'aminoàcids en l'interior de la cèl·lula OK, que deriva del seu metabolisme i de la dotació de transportadors d'aminoàcids. Per això no podem predir el seu paper fisiològic en un altre tipus cel·lular.

Tots aquests resultats van fer postular que el transportador 4F2hc/LAT-2 tindria un paper actiu en la sortida d'aminoàcids neutres a través de la membrana basolateral en el ronyó. Especialment podria contribuir a la sortida de cisteïna, cosa que afavoriria encara més el transport de cistina a través del transportador b^{0,+} (afectat en la cistinúria) a la membrana apical. L'aproximació genètica semblava la més adequada per dilucidar la funció d'aquesta proteïna *in vivo*. És per això que vam creure necessari disposar d'un model animal per entendre la funció fisiològica d'aquest transportador en els teixits on s'expressa i la possible implicació de LAT-2 en el fenotip cistinúric.

15.3 GENERACIÓ DEL VECTOR PEL *KNOCKOUT DE SLC7A8 (LAT-2)*

Per a construir el vector de direcció gènica calia partir de seqüències homòlogues a *Slc7a8*, el gen que volíem anul·lar. Era necessari, doncs, clonar una part de *Slc7a8* de ratolí. La zona més prometedora per anul·lar la funció d'un gen és la part 5', donat que com abans s'interrompi la pauta de lectura de la proteïna, menys possibilitats hi ha que aquesta mantingui alguna funció.

Inicialment, la doctora Esperanza Fernández, hibridà una genoteca de DNA genòmic de ratolí *Lambda FIX® II* (Stratagene) amb una sonda de 408 pb, de les quals 114 pb pertanyen a la zona no traduïda, amplificada amb els encebadors b2c2M8D (5'-GGGCGTTCTAATTGGAAACT-3') i b2c2M9R (5'-GGTGACGCCTAGCTCAG-3'), situats a la zona 5' del cDNA. Obtingué uns quants clons que, després de ser confirmats en els crivellatges secundari i terciari, foren seqüenciats. Els clons contenien un fragment genòmic que incloïa el promotor, la zona 5'UTR i part de l'exó 1 que en ratolí és molt més llarg que

RESULTATS

l'humà. Aquest crivellatge es feu abans de conèixer l'estructura genòmica del gen murí. La doctoranda va reamplificar els clons obtinguts 3 anys abans per la doctora Esperanza Fernández, i la qualitat dels clons no va permetre realitzar els subclonats necessaris per la generació del vector. Per tant, vam decidir utilitzar la seqüència del gen murí introduïda a la base de dades de Celera (<http://www.celera.com/>) per dissenyar més encebadors en aquesta regió 5' del gen que ens permeteren amplificar els braços d'homologia amb la Taq *Expand High Fidelity* que té activitat *proofreading* que corregeix errors de seqüència.

La figura 27 mostra l'alineament de les proteïnes humana i murina. Aquesta figura mostra l'elevada conservació entre les dues proteïnes homòlogues (el 84% d'identitat de seqüència proteica).

Humà	MEEGARHRNNTTEKKHPGGGESDASPEAGSGGGGVALKKEIGLVSACGIIVGNIIGSGIFV	60
Ratolí	MEK <u>G</u> AR <u>Q</u> RNNTAKNH <u>P</u> GS-DTSPEAEASSGGGGVALKKEIGLVSACGIIVGNIIGSGIFV	59
Humà	SPKGVLENAGSVGLALIVWIVTGFITVVGALCYAELGVTIPKSGGDYSYVKDIFGGLAGF	120
Ratolí	SPKGVLENAGSVGLALIVWIVT <u>G</u> IIT <u>A</u> VGALCYAELGVTIPKSGGDYSYVKDIFGGLAGF	119
Humà	LRLWIAVLVIYPTNQAVIALTFSNYVLQPLFPTCFPPESGLRLLAAICLLLLTWVNCSSV	180
Ratolí	LRLWIAVLVIYPTNQAVIALTFSNYVLQPLFPTCFPPESGLRLLAAICLLLLTWVNCSSV	179
Humà	RWATRVQDIFTAGKLLALALIIIMGIVQICKGEYFWLEPKNAFENFQEPDIGLVALAFLQ	240
Ratolí	RWATRVQDIFTAGKLLALALIIIMGIVQICKGE <u>F</u> FWLEPKNAFENFQEPDIGLVALAFLQ	239
Humà	GSFAYGGWNFLNYVTEELVDPYKNLPRAIFISIPLVTFVYVFANVAVVTAMSPQELLASN	300
Ratolí	GSFAYGGWNFLNYVTEELVDPYKNLPRAIFISIPLVTFVYVFAN <u>I</u> AYVTAMSPQELLASN	299
Humà	AVAVTFGEKLLGVMAMWIMPISVALSTFGGVNGSLFTSSRLFFAGAREGHLPSVLAMIHVK	360
Ratolí	AVAVTFGEKLLGVMAMWIMPISVALSTFGGVNGSLFTSSRLFFAGAREGHLPSVLAMIHVK	359
Humà	RCTPIPALLFTCISTLLMLVTSDMYTLINYVGFINYLFYGVTVAGQIVLRWKKPDIIPRPI	420
Ratolí	RCTPIPALLFTC <u>L</u> STLLMLVTSDMYTLINYVGFINYLFYGVTVAGQIVLRWKKPDIIPRPI	419
Humà	KINLLFPPIIYLLFWAFLLVFSWSEPVVCGIGLAIMLTGVPVYFLGVYVQHKKPKCFSDFI	480
Ratolí	<u>K</u> V <u>S</u> LLFPPIIYLLFWAFLL <u>I</u> F <u>S</u> WSEPVVCGIGLAIMLTGVPVYFLGVYVQHKKPKCF <u>N</u> DFI	479
Humà	ELLTLVSQKMCVVVYPEVERGSGTEEANEDMEEQQQPMYQPTPTKDKDVAGQPQP	535
Ratolí	<u>K</u> S <u>L</u> TLVSQKMCVVVY <u>P</u> <u>Q</u> - <u>E</u> G <u>N</u> S <u>G</u> A <u>E</u> E <u>T</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>H</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>T</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>--</u>	531

Figura 27. Alineament de les proteïnes LAT-2 humana i murina. La seqüència proteica és pràcticament idèntica en la major part de la proteïna en les dues espècies. Els aminoàcids no conservats entre l'home i el ratolí es localitzen principalment en els extrems N i C terminals (subratllats).

15.3.1 Característiques del vector

En el disseny del vector es van seguir les pautes clàssiques per a un vector de reemplaçament (veure apartat 6.3.3.1 de la Introducció). Donat que l'esquelet del vector no té rellevància per la recombinació homòloga, s'utilitzà un sistema de 2 vectors derivats de *pBlueScript*, amb els marcadors de selecció, dissenyats per Hans Burghardt, del nostre grup: un vector contenia el gen de neomicina (pBS II KO5') i l'altre el de la timidina quinasa (pBS II KO3').

La doctoranda va construir un vector amb uns braços d'homologia de 6,1 kb (braç d'homologia esquerra, BE) i de 2,3 kb (braç d'homologia dret, BD), en el que es va substituir 257 pb de la zona promotora i l'exó 1 del gen *Slc7a8* pel gen *PGKNeobpA*, impeding molt probablement la transcripció del gen. I en cas que, per atzar, es produís la transcripció d'aquesta regió en l'al·lel delecionat, la primera metionina en pauta està a 202 aminoàcids de la metionina iniciadora per tant es produiria una proteïna a la que li faltarien 202 aminoàcids del N-terminal d'un total de 531 aminoàcids.

El gen *PGKneo* permet la selecció positiva dels recombinants, mentre que el gen *PGKtk*, situat fora de la regió d'homologia dreta (BD), permet la selecció negativa de les cèl·lules on la recombinació hagi estat a l'atzar. (figura 28).

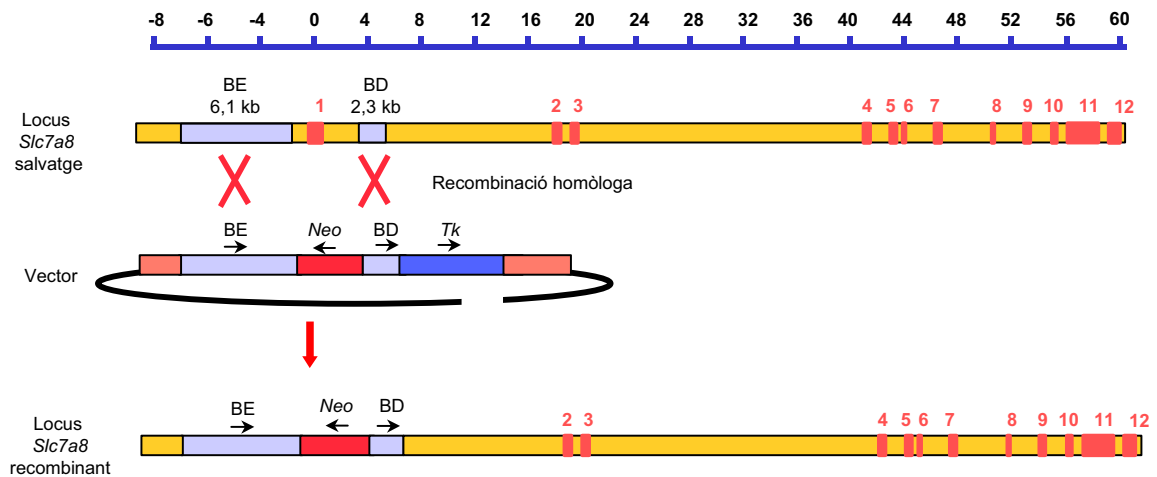


Figura 28. Esquema del vector dissenyat per generar el *knockout* de *Slc7a8* i del locus *Slc7a8* de ratolí. Es mostren els loci salvatge i recombinant (producte de la recombinaçió amb el vector). En vermell es senyalen els exons. BE, braç d'homologia esquerra; BD, braç d'homologia dret; Neo, gen de resistència a la neomicina; Tk, gen de timidina quinasa. Les fletxes mostren l'orientació 5' > 3'.

El resultat fou un vector amb les característiques següents (figura 28 i 29):

- ~ 16 kb de longitud total
- braç esquerre d'homologia (BE) de 6,1 kb (*NotI-NotI*) que acaba a 257 pb *upstream* de l'inici de transcripció.
- braç dret d'homologia (BDH) de 2,3 kb (*BglII- EcoRI*) dins l'intró 1.
- marcador de selecció positiva: gen de resistència a la neomicina, amb el promotor fort del gen de la fosfoglicerat quinasa i el senyal de poli-A del gen de l'hormona de creixement bovina.
- marcador de selecció negativa: gen de timidina quinasa del virus *herpes simplex*, amb el promotor fort del gen de la fosfoglicerat quinasa i el senyal de poli-A del gen de l'hormona de creixement bovina.

La figura 29 esquematitza els subclonatges seguits per a la construcció del vector final.

RESULTATS

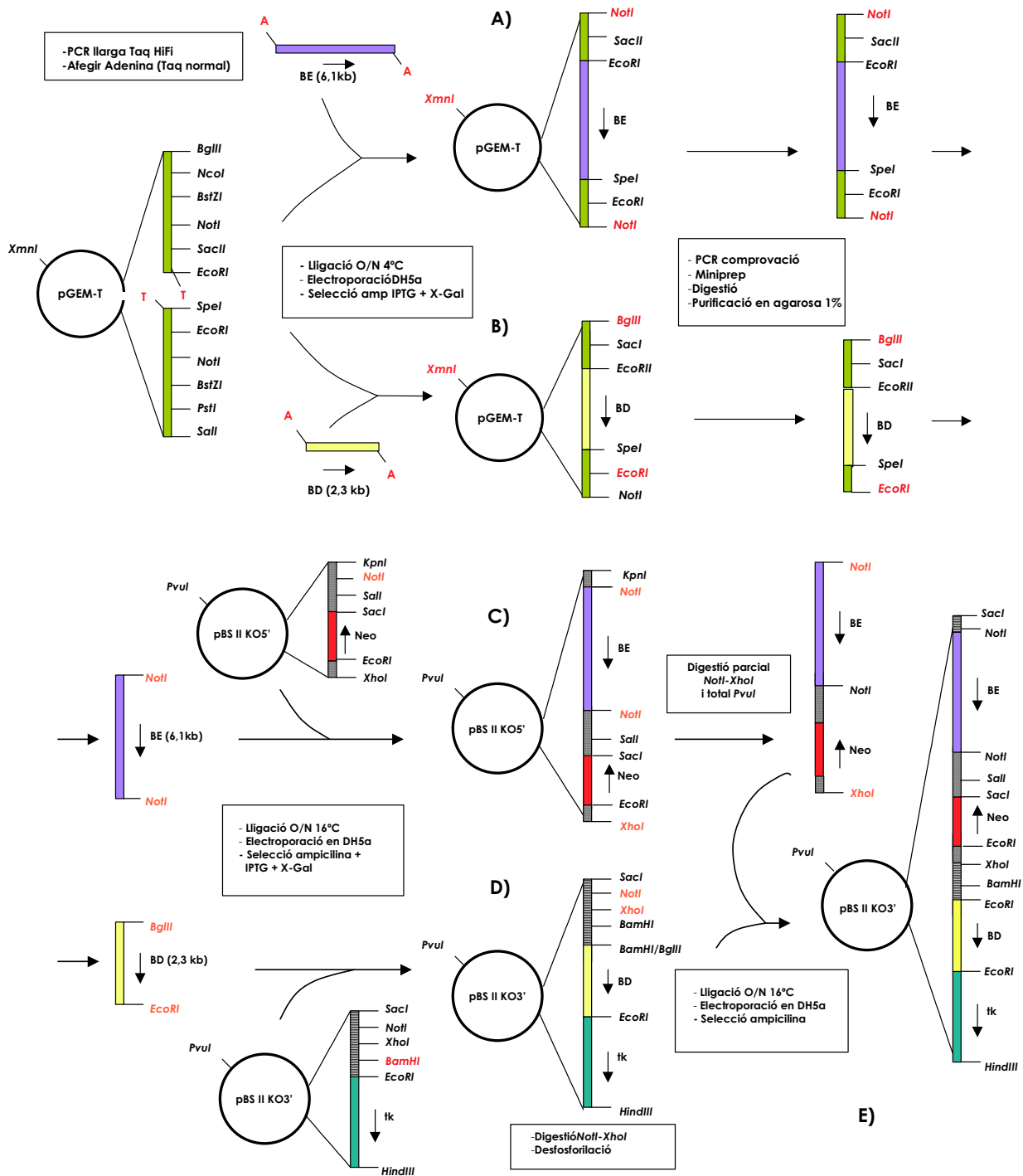


Figura 29. Esquema dels subclonatges realitzats per a l'obtenció de la construcció pel KO de *Slc7a8*.

Un fragment que comprenia part del promotor (BE) i un fragment que comprenia part de l'intró 1 (BD) (veure també figura 28) van ser subclonats al vector pGEM-T per obtenir els clons **A** i **B** respectivament. Es va digerir el clon **A** amb *NotI* i es va inserir al vector pBS II KO5', prèviament digerit amb *NotI*, que conté el gen de selecció positiva (Neo) per obtenir el clon **C**. Es va digerir el clon **B** amb *BglII* i *EcoRI* i es va inserir al vector pBS II KO3', que contenia el gen de selecció negativa (TK), digerit prèviament amb *BamHI* i *EcoRI*, per obtenir el clon **D**. Es va fer una digestió parcial amb *NotI* i total amb *XhoI* i *PvuI* del clon **C**. Es va purificar el fragment BE-Neo *NotI*-*XhoI* i es va inserir al clon **D**, prèviament digerit amb *NotI* i *XhoI*, obtenint el vector final **E**. Els passos de lligació, electroporació i selecció dels clons estan detallats a la secció de materials i mètodes.

Per realitzar el primer crivellatge de cèl·lules ES per PCR necessitàvem obtenir un vector amb el braç dret allargat cap a 3'. La figura 30 mostra com es va generar el control positiu per realitzar el crivellatge per PCR.

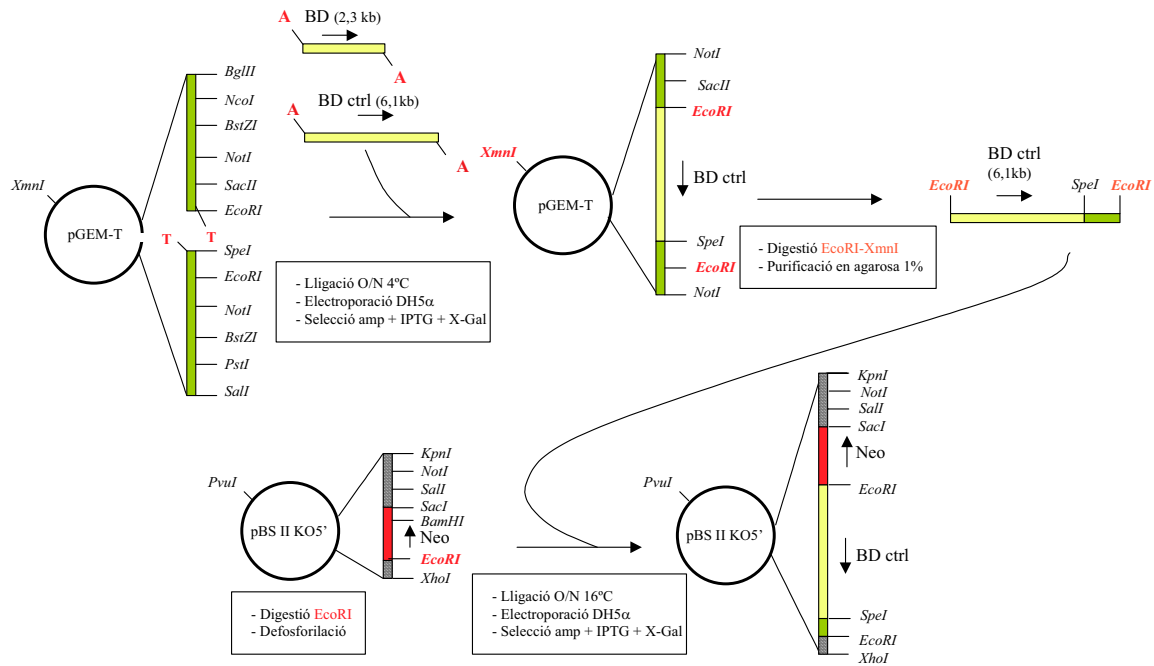


Figura 30. Esquema dels subclonatges realitzats per a l'obtenció de la construcció utilitzada com a control positiu en el crivellatge dels clons ES amb *Slc7a8* recombinat. Es va subclonar a pGEM-T un fragment de 6 kb que contenia la BD sencera (allargada 200 pb per 5' i diverses kb a 3'). Es feu una digestió del clon amb *EcoRI* i *XmnI* (per evitar la religació del vector T) i es va purificar la banda *EcoRI-EcoRI* per subclonar-la a pBS II KO5', prèviament liniaritzat amb *EcoRI*.

15.4 TRANSFECCIÓ DE LA CONSTRUCCIÓ EN CÈL·LULES ES

La fase de recombinació homòloga entre la construcció i el gen endogen, per modificar un al·lel de *Slc7a8* en cèl·lules embrionàries ES, es va realitzar a l'empresa GenOway (Lyon). Les cèl·lules emprades per al direccionament gènic eren de la soca 129Ola (derivades de la soca 129P2/OlaHsd), que és la soca amb major èxit en la colonització de la línia germinal. Aquestes cèl·lules van ser electroporades amb l'esmentat vector linealitzat amb *PvuI*, seleccionades per a la integració del vector amb G418 i enriquides per a la recombinació homòloga amb ganciclovir. Per l'experiència prèvia en el laboratori amb el KO de *slc7a9*, en la que en els experiments de transfecció, selecció, expansió s'obtingueren només 3 clons positius de 384 clons, vam decidir demanar que ens enviessin 300 clons.

Els DNA enviats per GenOway eren de molt mala qualitat i fou molt difícil obtenir positius per PCR. Dels 278 clons que GenOway ens va enviar només 7 van resultar ser positius de recombinació homòloga a 3' del gen després d'un crivellatge per PCR llarga (amb els encebadors Neo26F-mkBDR + 2, apartat 26.3 i annex 1), però en analitzar-los per *Southern blot*, per comprovar la recombinació homòloga, no es detectà cap clon recombinant: no es detectava la banda recombinant esperada ni amb *DraIII* (sonda 5', exterior esquerra) ni amb *SstI* (sonda 3', exterior dreta) (figura 31). Quan vam utilitzar la sonda neo en les mateixes membranes, no hibridava enlloc. Vam hibridar la membrana junt una membrana control amb DNA extret de cèl·lules ES utilitzades per la generació del *knockout* de *Slc7a9*, que contenien Neo, que va donar positiu per neo.

La possibilitat que la PCR estigués contaminada amb el control positiu estava descartada perquè l'amplificat a partir del control positiu és 200 pb més gran que els dels clons recombinants (figura 30). A més, s'havien comprovat per seqüenciació directa. Una explicació possible era que els clons no eren purs, estaven contaminats amb cèl·lules salvatges, per tant podíem detectar l'al·lel recombinant per PCR però no per *Southern blot*.

RESULTATS

Degut a aquests problemes, vam acordar que GenOway repetiria els experiments d'electroporació i ens van enviar 305 clons en una segona tanda. Aquest cop, però, vam extreure el DNA nosaltres.

En el segon crivellatge de 305 clons per PCR van sortir 4 positius (clons 5, 39, 149 i 167) i en la posterior comprovació dels clons per *Southern* 5' i 3' van resultar positius els clons 5, 39 i 167. El clon 39 presentava igual intensitat de banda corresponent a l'al·lel recombinant que de salvatge, però el 5 i el 167 presentaven molta menys intensitat de la banda recombinant (figura 31). Era possible que hi hagués contaminació de cèl·lules salvatges altre cop, per tant abans d'injectar-les es van intentar subclonar al Centro Nacional de Biotecnología (CNB, Madrid) pel grup de Lluís Montoliu. S'expandiren i es cariotiparen a GenOway i al CNB, per donar una idea de les seves possibilitats de contribuir a la línia germinal (Longo *et al.* 1997).

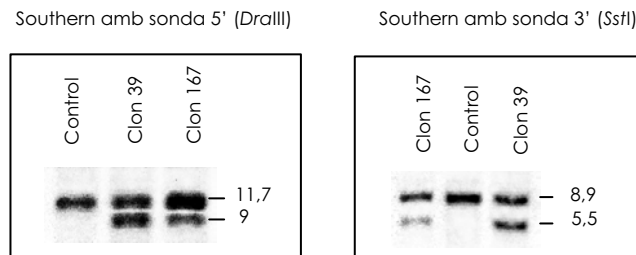


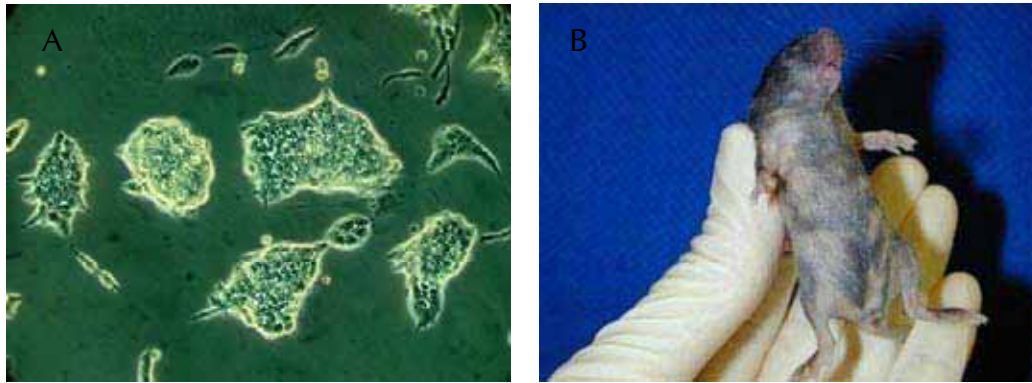
Figura 31. Southern 5' i 3' realitzats sobre clons positius (recombinants) del crivellatge per PCR. Les condicions per generar les dues sondes es detallen en la secció de Materials i Mètodes. El Southern 5' i 3' es realitzaren amb els enzims de restricció *DraIII* i *SstI* respectivament. Les bandes recombinants són les petites en ambdós casos. Es mostra el patró de bandes d'un control i dels dos clons dels que s'han obtingut quimeres.

La subclonació dels clons 5 i 167 fou problemàtica degut a la dificultat de reproduir les condicions de cultiu de GenOway. Es van poder derivar 25 subclons del clon 167 i només 2 del clon 5. El clon 5 estava diferenciat i el seu aspecte i dinàmica de cultiu no era el d'una cèl·lula ES habitual. El 167 tenia molt millor aspecte. Ens van enviar els DNA i vam realitzar altres *Southern*s d'aquests subclons. Tots els subclons del clon 167 eren bons, mentre que els dos del clon 5 eren salvatges, però en expandir-los per injectar es van morir tots els clons.

15.5 TRANSFERÈNCIA CÈL·LULES ES RECOMBINANTS A BLASTÒCITS

El cariotip mostrà que els 3 clons eren euploids, però el seu cultiu en diferents condicions de les utilitzades per GenOway (cultiu de les cèl·lules ES en absència de *feeders* (MEF)) era difícil i portà molts problemes. El grup del doctor Lluís Montoliu al CNB (Madrid) va microinjectar el clon 39 a blastòcits de la soca C57BL/6J, segons la suggerència de GenOway d'utilitzar 5 cèl·lules per blastòcit, que és un nombre relativament baix (es poden injectar fins a 7-10 cèl·lules per blastòcit). Aquests foren transferits a femelles pseudogestants. S'obtingueren 9 ratolins quimèrics del clon 39. Els ratolins però presentaven un grau baix de quimerisme ($q < 35-40\%$). Es van fer quatre sessions més d'injeccions, aquest cop amb 8-10 cèl·lules per blastòcit, dos pel clon 39 i dos pel 167 (clon original, sense subclonar). L'aspecte morfològic del clon 167 (figura 32 A) era molt millor que la del clon 5, i ambdós eren pitjors que el del clon 39. Aquest cop no es va obtenir cap quimera del clon 39, de fet no va néixer cap cria. Sembla que en elevar el nombre de cèl·lules d'aquest clon no es va permetre el desenvolupament dels embrions. Del clon 167 s'obtingueren 2 quimeres mascle amb un bon percentatge de quimerisme ($> 50\%$), per tant semblava que la transmissió en la línia germinal estava pràcticament assegurada (figura 32 B).

Figura 32. A) Fotografia de cèl·lules ES del clon 167 en cultiu abans de ser microinjectades. B) Fotografia d'una de



les dues quimeres obtingudes a partir del clon 167, que presenta un grau de quimerisme superior al 50%. Per detectar les possibles quimeres cal esperar de 7 a 10 dies després del part, fins que es pot avaluar bé el color del pèl. Les quimeres tenen pèl negre (de les cèl·lules provinents de la soca C57BL/6j, que actua com embrió receptor) amb taques agouti (marró) i xinilla (més clares) (provinents de les cèl·lules 129Ola). El genotip de la soca receptora és: P<+>/P<+>: B/B: Tyr<+>/Tyr<+> i el de la soca de cèl·lules ES és: A<w>/A<w>:p/p:Tyr<c-ch>/Tyr<c-ch>.

Cal tenir present però, que el clon 167 utilitzat fou l'original (sense subclonar) i per tant el percentatge de cèl·lules mutades que calia esperar era baix.

La taula 22 mostra les principals dades dels 5 experiments de microinjecció duts a terme amb 5 cèl·lules/blastòcit pel clon 39, i dels 4 experiments duts a terme amb 8-10 cèl·lules/blastòcit pels clons 39 i 167.

	Clon 39		Clon 167
	5	8-10	8-10
Cèl·lules ES/blastòcit	5	8-10	8-10
Nº femelles C57BL/6j utilitzades	50	20	20
Nº femelles C57BL/6j amb tap vaginal	29	17	17
Nº blastòcits recuperats	638 (22 per femella)	462 (27 per femella)	398 (23 per femella)
Nº blastòcits microinjectats	255 (40%)	88 (19%)	109 (27%)
Nº blastòcits transferits	251	87	109
Nº femelles pseudogestants	17	6	7
Nº femelles gestants	13	3	4
Nº cries nascudes	43	0	13
Nº quimeres deslletades totals	9	0	2
Nº quimeres mascle	7 (q < 35%)	0	2 (q > 50%)

Taula 22. Dades dels experiment d'injecció de cèl·lules ES a blastòcits

Es van realitzar 5 tandes d'injecció de 5 cèl·lules per blastòcit amb el clon 39. En detectar un percentatge de quimerisme (q) molt baix, es va decidir realitzar 2 tandes d'injecció addicionals amb els clons 39 i 167 (sense subclonar) amb 8-10 cèl·lules per blastòcit. Es van obtenir 11 quimeres (9 mascles) amb graus de quimerisme força baixos.

Les cèl·lules ES utilitzades són, com la gran majoria de les que s'utilitzen per a KOs, 40 XY (mascles) per tant el fet de tenir un biaix important de mascles entre les quimeres és bona senyal. El percentatge de quimerisme obtingut és baix pel que solen obtenir al CNB (majoritàriament entre el 50 i el 100% de quimerisme), encara que amb altres cèl·lules ES. Se sol utilitzar el criteri del ~50% per decidir si una quimera pot transmetre o no per línia germinal el genotip de les cèl·lules ES (encara que hi ha molts casos descrits en la literatura de quimeres mascles que transmeten amb un percentatge de quimerisme < 50%). En aquest cas teníem almenys 6 quimeres (encara que 2 d'elles femelles) amb un 20% o més de quimerisme, 2 de les quals rondant el 50%. Segons el doctor Khader Thiam de GenOway, aquests percentatges són suficients perquè hi hagi colonització de la línia germinal. A diferència d'altres cèl·lules ES, aquestes tendeixen a colonitzar la panxa de les quimeres (i no el dors, com sol ser el cas en altres cèl·lules ES) la qual cosa també pot influir en una infravaloració del percentatge de quimerisme ja que el color agouti de les cèl·lules ES és difícil d'apreciar a l'abdomen, habitualment pobrament pigmentat. Les panxes d'aquestes quimeres semblaven tenir un alt percentatge de quimerisme (derivat de l'al·lel dominant A<w> "white-belly", l'efecte del qual és precisament aquest, l'aclariment de la pigmentació

RESULTATS

abdominal) (figura 32 B). Malgrat que les cèl·lules E14-1 són mascle, van néixer 2 quimeres femella derivades del clon 39. Com reflecteix la taula 23, aquestes femelles foren fèrtils, però cap d'elles transmeté les cèl·lules 129P2 a la línia germinal (els mascle tampoc). Aquest fenomen està descrit a la literatura (Nagy *et al.* 2003), i també es donà en la generació del KO *Slc7a9*. En tots els casos les cries resultaren homozigotes salvatges i no foren creuades. Les quimeres fenotípicament mascle resulten d'una conversió sexual d'embrions XX a causa de la colonització de cèl·lules ES XY o de l'incorporació de cèl·lules ES XY a un embrió que ja era XY. Les quimeres fenotípicament femelles resulten d'una contribució limitada de cèl·lules ES XY a un blastòcit XX, el qual tendeix a generar ovaris els gàmetes del qual seran majoritàriament derivats de XX. Però també poden ser hermafrodites. En aquest cas són habitualment estèrils. També podrien ser resultat d'unes cèl·lules ES 39 XO (si haguessin perdut el cromosoma Y, com s'ha donat en algun cas en altres experiments realitzats al CNB, però això ja es va descartar en realitzar el cariotip del clon 39 i verificar que les cèl·lules eren 40XY (tret que haguessin perdut el cromosoma Y a posteriori, cosa poc probable). En qualsevol cas, no havíem d'esperar res d'aquestes dues femelles però les vam posar a creuar.

Donada la baixa eficiència reproductiva de la soca 129P2, es van creuar les quimeres amb ratolins de la soca C57BL/6J, per obtenir la generació F₁. La quimera més bona del clon 39 (mascle amb un 40% de quimerisme) va morir abans de poder-la creuar. Les 9 quimeres restants (7 del clon 39 i 2 del clon 167) foren creuades quan tenien almenys 8 setmanes: Es van creuar 2 femelles C57BL/6J per cada quimera mascle i 1 mascle C57BL/6J per cada quimera femella. Tenint en compte el color del pèl d'aquestes soques, els ratolins de la F₁ de color negre són descendents de les cèl·lules C57BL/6J (salvatges) de la quimera. La taula 23 resumeix els resultats dels creuaments on s'observa que el rendiment de transmissió de les quimeres creuades és nul: de 456 cries de ratolí obtingudes dels creuaments totes van sortir salvatges (negres), és a dir que cap de les quimeres ha transmès les cèl·lules mutades a línia germinal.

Quimera	Clon ES	Quimerisme	sexe	n. ventrades (n. creuaments)	n. fills nascuts	n. fills deslletats	n. fills transmesos (no-agouti)
Q1 (6391)	39	35%	f	3 (4)	22	22	0
Q2 (6392)	39	5-10%	m	9 (13)	54	54	0
Q3 (6393)	39	10%	m	7 (14)	45	45	0
Q4 (9050)	39	10-15%	m	12 (14)	89	84	0
Q5 (6395)	39	10-15%	m	12 (14)	68	68	0
Q6 (6396)	39	10-15%	m	5 (13)	42	42	0
Q7 (6397)	39	20%	f	3 (3)	29	28	0
Q8 (6481)	39	35%	m	0 (14)	0	0	0
Q9	39	40%	m	-	-	-	-
Q57 (9470)	167	>50%	m	5 (18)	32	32	0
Q58 (9444)	167	>50%	m	10 (14)	75	74	0

Taula 23. Rendiment reproductiu de les quimeres de *Slc7a8*. El més destacable d'aquesta taula és que cap de les quimeres va transmetre les cèl·lules 129P2 a la línia germinal. f, femella; m, mascle.

Es van dissenyar les condicions de PCR per realitzar la genotipació de tots els ratolins de les diverses generacions, amb tres encebadors: un directe, mL2kBE2/f (BEF) que anella al braç esquerre d'homologia del vector, i dos reversos, l'un mKBER2 (R2) anellant a l'intró 2 (en una zona només present a l'al·lel salvatge), i l'altre NeoR1(NR) anellant al gen *neo^r* (només present a l'al·lel recombinat). Així, en una sola PCR es poden detectar l'al·lel salvatge, de 410 pb, i l'al·lel recombinat, de 336 pb.

La manca de transmissió de les quimeres, pot ser degut les variacions en les condicions de cultiu de les cèl·lules ES entre els dos centres on s'ha realitzat la transfecció de la construcció i selecció dels clons (GenOway) i la transferència de cèl·lules ES recombinants a blastòcits (CNB). Per això, repetirem els experiments de transfecció, selecció i transferència a blastòcits de les cèl·lules ES fins a obtenir heterozigots en un mateix centre (GenOway).

Discussió general

L'objectiu principal d'aquesta tesi ha estat clonar i caracteritzar genèticament el gen *SLC7A9* en pacients de cistinúria de tipus no I amb la intenció d'identificar les mutacions responsables de la malaltia, per poder oferir un bon diagnòstic, i analitzar la base molecular de l'heterogeneïtat fenotípica que s'observa en la cistinúria. D'altra banda, l'anàlisi del gen també ha ajudat en la comprensió de les relacions existents entre l'estructura i la funció gèniques i ens ha permès obtenir una correlació entre el genotip i el fenotip bioquímic i clínic, la qual cosa ens ha estat de gran utilitat per proposar una nova classificació, basada en el genotip, més precisa que la fenotípica que s'havia utilitzat fins ara.

16 BASES MOLECULARS DE LA CISTINÚRIA

16.1 DOS *LOCI* IMPLICATS EN CISTINÚRIA

Les bases moleculars de la cistinúria es van començar a conèixer amb el clonatge del cDNA de la proteïna rBAT (Bertran *et al.* 1992b; Tate *et al.* 1992; Wells and Hediger 1992). La caracterització del transport induït per rBAT en oòcits de *X. laevis* indicà que aquell sistema transportava amb alta afinitat aminoàcids bàsics i alguns neutres, entre ells la cistina (Bertran *et al.* 1992a). El tipus de transport i el seu clonatge a partir de ronyó, convertiren el seu gen humà, *SLC3A1*, en candidat per la cistinúria. La cerca de mutacions, primer a RNA i després a DNA genòmic de pacients de cistinúria, resultà en la descripció d'un conjunt de mutacions (Calonge *et al.* 1994). Des de llavors s'han descrit 105 mutacions de rBAT (revisat a l'article 5). Però el percentatge de pacients explicats amb mutacions a *SLC3A1* en aquella època era baix i, de fet, només s'havien trobat mutacions als pacients de tipus I. *SLC3A1* es mapà al cromosoma 2p (Zhang *et al.* 1994; Calonge *et al.* 1995a) prop dels marcadors *D2S177* i *D2S119* i l'anàlisi de lligament de la cistinúria en aquesta regió resultà positiu però heterogeni: només les famílies de tipus I/II estaven lligades al *locus* del cromosoma 2 (Calonge *et al.* 1995b). Aquest resultat rebutjava la hipòtesi de l'al·lelisme com a única causa de l'heterogeneïtat fenotípica de la cistinúria i calia cercar l'altre o altres *loci* de cistinúria.

Per a la cerca inicial de nous *loci* per tot el genoma, es van triar grups de germans de famílies de tipus III/III, el conjunt fenotípic més nombrós no lligat al cromosoma 2. Quan s'arribà a un *locus* candidat, s'estengué l'anàlisi a les seves i altres famílies, i a altres marcadors de la regió. Així el nostre grup va identificar el *locus* de la cistinúria de tipus no I entre els marcadors *D19S414* i *D19S220* al cromosoma 19q12-13.1 (Bisceglia *et al.* 1997). Paral·lelament, el grup d'Elon Pras va identificar aquest mateix *locus*, entre els marcadors *D19S409* i *D19S208* utilitzant famílies jueves líbies, que no estaven lligades al *locus* del cromosoma 2 (Wartenfeld *et al.* 1997).

Si assumíem que la cistinúria era causada pel mateix gen als *loci* identificats pels dos grups, la combinació de tots els recombinants donava lloc a una regió menor, delimitada pels marcadors *D19S414* i *D19S208*, separats per unes 3,8 Mb. Aquesta distància encara era excessiva. Els dos grups reduïren la regió analitzant més marcadors polimòrfics i més famílies. Així, el nostre grup va situar nous límits als marcadors *C13* i *D19S587* (article 1), i el grup d'Elon Pras, utilitzant recombinants històrics, als marcadors *D19S430* i *D19S874* (Pras *et al.* 1999). La col·laboració dels dos grups, en el marc de l'ICC permeté una última reducció de la regió, utilitzant nous marcadors polimòrfics generats a partir de clons de la regió, per a genotipar les famílies jueves líbies. Així, el *locus* genètic per a la cistinúria de tipus no I quedà refinat en una regió de 1,3 Mb al cromosoma 19q13.1, entre *C17A* i *D19S874*.

Malgrat que el segon *locus* de cistinúria començà a cercar-se utilitzant grups de germans de famílies tipus III/III, de seguida es veié que la cistinúria també segregava juntament amb els marcadors del cromosoma 19q12-13.1 a les famílies tipus II/II (Bisceglia *et al.* 1997). Les dues famílies tipus II/II ja proporcionaven un LOD score superior a 3, indicant lligament. Aquest resultat apuntava en direcció a la manca d'heterogeneïtat genètica entre els tipus II i III de cistinúria. Malgrat això, encara quedava la possibilitat que dos o més gens diferents, situats al *locus* de cistinúria, fossin responsables d'aquesta malaltia de manera independent. Però, el fet que en una família amb cistinúria (F41) el mateix cromosoma portador de cistinúria de tipus III en un heterozigot obligat (mare d'un pacient cistinúric), semblés responsable del fenotip II/+ d'un dels seus fills (veure l'apartat 8.2 de Resultats i Discussió) feia pensar que en aquella família els fenotips II/+ i III/+ es devien a una mateixa mutació al cromosoma 19 i que altres factors, ambientals o genètics, marcarien la gradació en l'excreció urinària d'aminoàcids bàsics i cistina. Més

DISCUSSIÓ GENERAL

endavant, vem observar que no es tractava d'un cas aïllat i que existia una gran variabilitat fenotípica per una mateixa mutació a *SLC7A9*, fins i tot entre individus d'una mateixa família. Una explicació, és la possible influència dels polimorfismes de l'altre al·lel 19, com poden ser les variants p.V142A i p.L223M, però encara no s'ha realitzat un estudi complet d'aquestes variants (veure més avall).

Per resoldre definitivament la qüestió de l'al·lelisme, calia analitzar el gen o gens responsables. Vam començar a utilitzar la nomenclatura "tipus no I" per englobar els tipus II i III de cistinúria, associats al *locus* 19q13.1.

16.2 HETEROGENEÏTAT GENÈTICA DE LA CISTINÚRIA

Durant el refinament del *locus* per a la cistinúria de tipus no I, es van buscar EST mapats a la zona que presentessin homologia amb transportadors o simplement proteïnes de membrana. Tots els candidats provisionals van ser descartats a mida que s'avançava en la seqüenciació dels corresponents cDNA.

Quan estàvem arribant al màxim refinament del *locus* que les famílies i marcadors disponibles permetien, apareixeren uns candidats funcionals per a la cistinúria: les subunitats lleugeres de transportadors heteromèrics (LSHAT). Des del clonatge de LAT-1 i la seva identificació com a subunitat lleugera de 4F2hc (Kanai *et al.* 1998; Mastroberardino *et al.* 1998), començà la cerca d'altres subunitats a les bases de dades i genoteques de cDNA. El principal candidat funcional per la cistinúria de tipus no I era la subunitat lleugera que s'havia d'unir a rBAT per induir el sistema de transport $b^{0,+}$. Identificades les 4 primeres LSHAT (LAT1, γ +LAT1, γ +LAT2 i LAT2), es trobaren seqüències parcials de dues noves LSHAT putatives. Per PCR i transferència *Southern* vam localitzar totes dues dins el *locus* refinat de la cistinúria de tipus no I, i passaren a ser també candidats posicionals. Altres grups han confirmat per hibridació fluorescent *in situ* (FISH) la localització de *SLC7A9* a 19q12-13.1 (Pfeiffer *et al.* 1999a; Mizoguchi *et al.* 2001). L'anàlisi de *Northern* apuntava com a millor candidat *SLC7A9*, ja que tenia l'expressió màxima a ronyó, i també s'expressava a fetge, intestí prim i placenta, teixits on s'expressa rBAT. Vem aïllar el cDNA complet en una genoteca de ronyó humà i resultà codificar per una proteïna de 487 aminoàcids, amb una topologia predita de 12 segments transmembrana, i alta homologia a les altres LSHAT clonades (article 2).

La cerca de mutacions al nou gen, *SLC7A9*, entre els pacients de cistinúria disponibles a l'ICC, resultà en la descripció de 7 mutacions noves. La mutació p.V170M fou trobada a 16 dels 17 cromosomes portadors de cistinúria a les famílies jueves líbies, on el desequilibri de lligament per un haplotip suggeria un efecte fundador. Totes les mutacions on la família estava disponible per l'estudi, segregaven junt amb fenotip cistinúric, i cap d'elles es trobà a 100 o més cromosomes control. Per tot l'anterior i amb la comprovació que el mutant $b^{0,+}$ AT-p.V170M abolia la funció de transport de la corresponent proteïna, quedava demostrat que mutacions a *SLC7A9* causaven cistinúria.

Les mutacions inicials es trobaren a famílies tipus no I, mixtes o no classificades. Algunes s'havien trobat en homozigosi en famílies no I, per tant era clar que *SLC7A9* era responsable de la cistinúria de tipus no I. El que no quedava tan clar, era si estava implicat en altres tipus de cistinúria. De fet, la mutació p.A182T s'havia trobat associada a l'al·lel tipus I d'algunes famílies mixtes. Per resoldre aquesta qüestió calia un estudi de mutacions complet del gen a totes les famílies cistinúriques disponibles que no havien estat explicades per mutacions a *SLC3A1*. Es va resoldre l'estructura genòmica de *SLC7A9* i hi vam cercar mutacions (article 3). Vem trobar 52 noves mutacions del total de 66 mutacions descrites a *SLC7A9*. Aquestes mutacions es van trobar en pacients de tots els tipus (article 2, 3 i 5). En l'article 5, es van analitzar també mutacions a rBAT. El total de mutacions trobades per l'ICC expliquen: el 90,5% dels al·lells tipus I, el 87,6% dels al·lells tipus no I, el 89,3% el de tipus mixt i el 83,6% dels al·lells de pacients no classificats. La cobertura d'al·lells identificats és similar pels probands amb diferents tipus de cistinúria (89,3%). El percentatge d'al·lells explicats en pacients no classificats és més baix (83,6%), la qual cosa es podria atribuir a la presència de portadors de *SLC7A9* amb urolitiasi de cistina.

En aquesta memòria es presenta el percentatge més alt d'al·lells de cistinúria explicats en qualsevol cohort gran de pacients (un 86,8%; 282 de 325 al·lells) (figura 33 A). En un estudi recent d'una cohort gran de pacients, només un 64,7% dels al·lells foren explicats (75 de 116 al·lells) (Schmidt *et al.* 2003b) (figura 33 B).

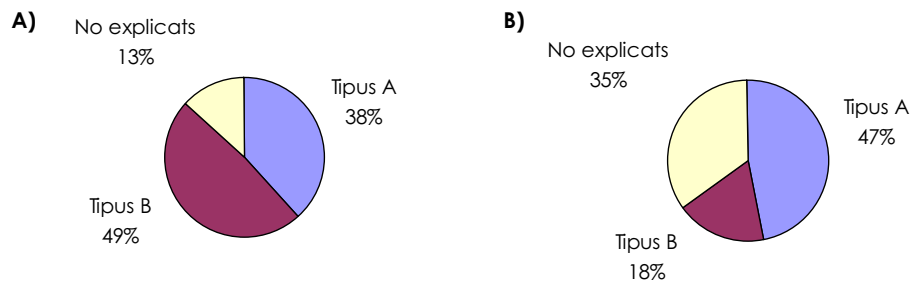


Figura 33. Percentatge d'al·lels explicats de tipus A (*SLC3A1*) i B (*SLC7A9*) en el grup de pacients A) de l'ICC i B) d'un altre grup gran de pacients publicat recentment (Schmidt *et al.* 2003b). Com es pot observar, el grau de detecció de l'ICC és molt elevat. La gran proporció d'al·lels de tipus B en la cohort de l'ICC és deguda probablement al fet que es van recopilar moltes famílies de tipus no I per identificar el gen *SLC7A9*.

L'elevat nombre d'al·lels caracteritzats permet fer un resum general de les mutacions de cistinúria en la base de dades de l'ICC. Les mutacions de tipus A (*SLC3A1*) i B (*SLC7A9*) representen un 44,3% i un 55,7% dels al·lels explicats respectivament (i un 38% i un 49% respecte el total d'al·lels (figura 33 A)). Cal tenir present que la base de dades de l'ICC no és un registre, ja que l'ICC fou molt actiu en la col·lecció de famílies amb cistinúria de tipus no I, per tal de poder identificar el gen *SLC7A9* (Bisceglia *et al.* 1997; Feliubadaló *et al.* 1999a; Feliubadaló *et al.* 1999b), i la prevalença de mutacions de tipus B és probable que estigui sobrevalorada (figura 33). La p.M467T i p.G105R són les mutacions de tipus A i B més comunes (un 26,4% i un 27,4% de cada tipus d'al·lels respectivament). Això és coherent amb les publicacions sobre altres cohorts més petites de pacients amb cistinúria (Gitomer *et al.* 1998b; Harnevik *et al.* 2001; Botzenhart *et al.* 2002). Les 6 mutacions més comunes de tipus A i B expliquen un 47% i un 66% dels al·lels identificats de cada tipus respectivament (figura 34).

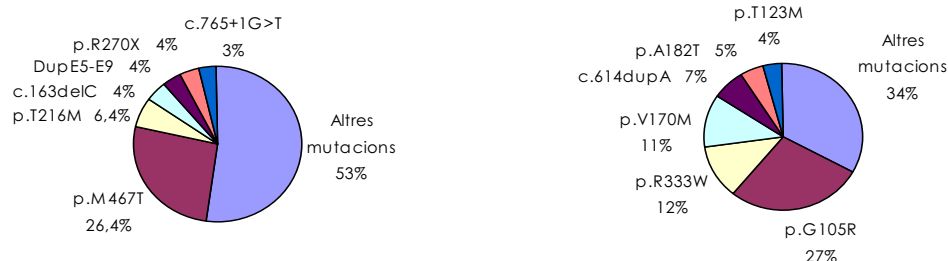


Figura 34. Distribució d'al·lels mutats en l'ICC. Es mostren les freqüències al·lèliques de les 6 mutacions més freqüents de A) *SLC3A1* i B) *SLC7A9*.

A més, 55 mutacions de *SLC3A1* i 45 de *SLC7A9* expliquen 125 dels al·lels de tipus A i 157 de tipus B respectivament, mostrant que *SLC3A1* té una heterogeneïtat genètica més gran que *SLC7A9* en la base de dades de l'ICC.

Tot i que les mutacions es localitzen al llarg de tot el gen *SLC7A9* i només en 2 dels 13 exons (el primer i l'últim que no són codificants, E1 i E13) no s'ha identificat cap mutació, s'observa una tendència a l'agrupament en determinades regions: els exons 3, 4 i 5 presenten més diversitat de mutacions. Però en analitzar-ho respecte el nombre d'al·lels mutats observem que els exons 4, 5, 6 i 10 són els que tenen més al·lels mutats. En el cas de la població espanyola, observem que la majoria d'al·lels mutats es concentren en els exons 4, 5 i 6, essent els al·lels majoritaris de l'exó 6 els corresponents a la mutació c.614dupA que es troba principalment en la població asturiana. En el cas de la població italiana, els al·lels mutats es concentren en els exons 4, 5 i 10. Pel que fa la població jueva, tots els individus amb mutacions a B analitzats tenen la p.V170M i només un proband té la c.1399+3₋+6del AAGT a l'exó 11 i la p.V170M a

DISCUSSIÓ GENERAL

l'altre al·lel. És interessant remarcar el fet que la majoria de famílies de l'ICC amb fenotip mixt són espanyoles, ja que en aquesta població és on s'han trobat precisament dues de les mutacions més freqüents, que a més tenen fenotip lleu, és a dir que sovint van associades a fenotip I, la p.A182T i la p.T123M.

El fet de conèixer les freqüències al·lèliques per les diferents mutacions de grups grans de pacients en diferents poblacions permet direccionar la cerca de mutacions estalviant temps i diners.

16.3 CARACTERÍSTIQUES CLÍNiques DELS PACIENTS CISTINÚRICS DE L'ICC

Clínicament, no s'observen diferències evidents entre la cistinúria de tipus A i B. Les dades recollides per l'ICC mostren que els càlculs renals ocorren a una edat primerenca, quan la cistinúria és simptomàtica. La gran majoria dels pacients presenten el seu primer càlcul abans dels 30 anys d'edat (el 82,9% en les primeres dues dècades). Només un pacient va ser diagnosticat després dels 40. Tanmateix, hi ha dos pacients en la base de dades amb un historial negatiu de formació de càlculs que són majors de 40. La proporció dels dos subtipus de cistinúria (I i no I) és semblant en la base de dades de l'ICC (88 al·lèls amb fenotip I i 103 amb fenotip no I, taula 4 de l'article 5). L'any d'establiment, les conseqüències clíniques i la severitat de la malaltia no difereix en els dos subtipus, ni tampoc hi ha diferències evidents en la formació de càlculs ni en el nombre d'intervencions per any. Tanmateix no hem d'excloure que el tractament rebut pels pacients ha d'haver influït les conseqüències, eliminant les diferències entre pacients, ja que els casos severs han d'haver rebut un tractament més fort. No s'ha pogut realitzar una correlació entre el tipus de cistinúria i l'edat de manifestació dels símptomes clínics, així com tampoc s'han pogut correlacionar els nivells d'excreció urinària amb la incidència de càlculs de cistina (article 4). L'excreció d'aminoàcids en orina era també similar per als pacients amb mutacions a *SLC3A1* o a *SLC7A9*. Les dones pacients de tipus B, excreten major quantitat de cistina que els homes, encara que no tenim explicació per a aquest fet, però els càlculs apareixen més aviat en els homes que en les dones. De fet, els homes estan afectats més severament que les dones i produeixen més càlculs que les dones de manera significativa. Les diferències en severitat entre gèneres es pot atribuir a les diferències anatòmiques del tracte urinari.

La freqüència de càlculs no correlaciona amb l'excreció urinària de cap dels aminoàcids considerats o de la suma de tots ells. Com que els valors d'excreció de cistina en els pacients sempre estan molt per sobre del seu límit de solubilitat, és d'esperar que lleugeres diferències en l'excreció urinària de cistina i/o aminoàcids dibàsics no causin diferències significatives en la formació de càlculs, sinó que és probable que altres factors pro- o anti-litogènics han de jugar un paper important, com podrien ser factors genètics o ambientals (dieta, tractaments...). A més la variabilitat observada, d'excreció o símptomes clínics, entre membres d'una mateixa família o individus que tenen la mateixa mutació en qualsevol dels dos gens (Dello Strologo *et al.* 1997) suggereix també que altres factors, genètics i ambientals, juguen un paper en la determinació del risc de formació de càlculs.

16.4 CORRELACIÓ GENOTIP-FENOTIP EN LA CISTINÚRIA

Per realitzar aquest estudi era molt important l'aportació de dades clíniques fiables, ja que el fenotip està assignat en base als valors d'aminoacidúria que presenten els pacients i els seus familiars. Les dades genètiques inicials suggerien una correlació perfecta entre el fenotip de cistinúria i el gen mutat de cistinúria (les mutacions a *SLC3A1* i mutacions a *SLC7A9* causaven cistinúria de tipus I i no I respectivament) (Calonge *et al.* 1995b; Gasparini *et al.* 1995)(i article 2). L'anàlisi de mutacions exhaustiu realitzat pel nostre grup ha aportat informació addicional sobre quin tipus de cistinúria és causada per *SLC7A9* i quin per *SLC3A1*. En primer lloc vem establir una correlació genotip-fenotip per als individus heterozigots per mutacions a *SLC7A9*: la majoria d'heterozigots amb una mutació a *SLC7A9* presenten fenotip no I (hiperexcreció d'aminoàcids dibàsics i cistina; i dintre del no I, els antics II i III), però aproximadament el 14% d'heterozigots amb mutacions de *SLC7A9* presenten fenotip I (heterozigots silenciosos) en la cohort de l'ICC (article 4 i 5) (figura 35). La majoria d'aquests pertanyen a famílies espanyoles.

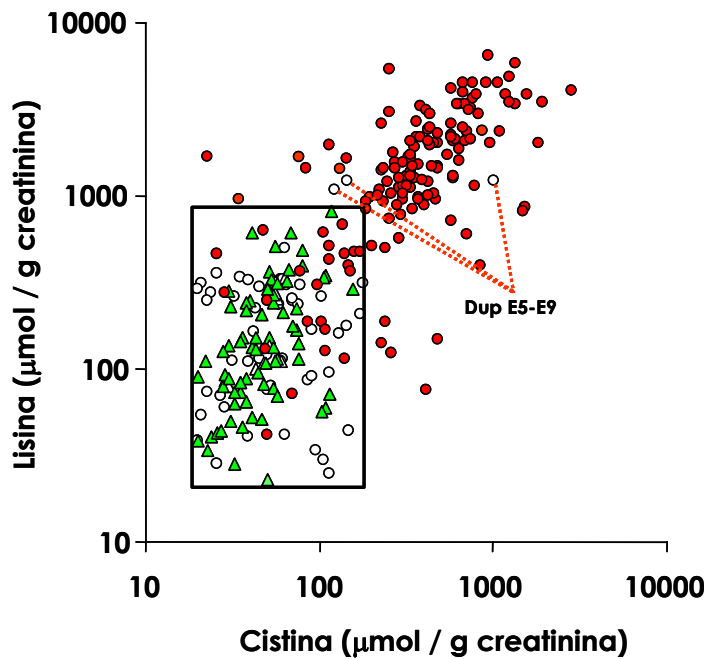


Figura 35. Distribució dels heterozigots A/+ (*SLC3A1*) i B/+ (*SLC7A9*) en funció dels valors de lisina i cistina en orina (en $\mu\text{mol} / \text{g}$ creatinina). El 14% dels heterozigots B/+ presenta valors dins del rang dels controls. Tres portadors de la DupE5-E9 de rBAT (A/+) presenten fenotip no I. Els cercles vermells representen heterozigots B/+ (n=142), els cercles blancs són heterozigots A/+ (n=53) i els controls es representen en triangles verds (n=83). Figura adaptada de l'article 4.

Aquest fet va motivar la proposta d'una nova classificació de la cistinúria basada en el genotip (article 4).

16.5 NOVA CLASSIFICACIÓ DE CISTINÚRIA: TIPUS A I TIPUS B

En l'ICC, la majoria de mutacions a rBAT (*SLC3A1*) causen cistinúria de tipus I (heterozigots silents), només una mutació, la dupE5-E9, va associada a fenotip no I en 3 heterozigots (4% dels al·lels A independents de l'ICC). En el cas de *SLC7A9* ($b^{0,+}AT$) la majoria de portadors (88%, al·lels independents) presenten cistinúria de tipus no I (heterozigots hiperexcretors de cistina i aminoàcids bàsics), mentre que el 12% restant tenen fenotip I (articles 4 i 5). És per això que ara classifiquem la cistinúria segons el gen que la causa: els pacients amb dues mutacions a *SLC3A1* s'anomenen AA (i els portadors, A+); els pacients amb dues mutacions a *SLC7A9* s'anomenen BB (i els portadors, B+); els individus amb una mutació a cada gen, s'anomenen AB (article 4).

El que abans es considerava una complementació gènica entre els dos gens relacionats amb la cistinúria, ara es pot explicar tenint en compte que els pacients de tipus AB fenotípicament correspondrien a individus BBA, AAB, o heterozigots de tipus B, amb el conseqüent ampli rang d'hiperexcreció que això comporta segons la severitat de la mutació.

La figura 36 resumeix la classificació doble (fenotípica i genètica) per a probands de cistinúria de l'ICC.

DISCUSSIÓ GENERAL

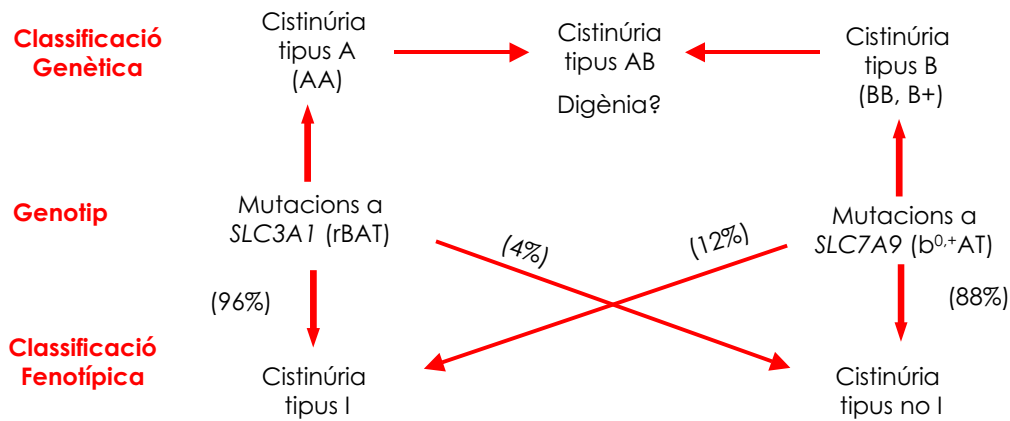


Figura 36. Correlació genotip-fenotip. Els percentatges s'han extret dels resultats publicats a l'article 5 i fan referència a al·lels independents de l'ICC. La majoria de pacients de cistinúria de tipus I tenen dues mutacions a *SLC3A1* (individus AA). La majoria de pacients de cistinúria de tipus no I (incloent-hi els heterozigots de tipus no I amb urolitiasi) tenen mutacions a *SLC7A9* (individus BB i B+). Els pacients de famílies mixtes tenen mutacions en ambdós gens: 3 famílies a *SLC3A1* (2 probands AA i 1 AAB) o 12 a *SLC7A9* (11 probands BB i un BBA). Només 2 dels 126 probands plenament genotipats tenen mutacions als dos gens (probands AAB i BBA), suggerint un petit paper per a herència digènica en la cistinúria.

16.5.1 Famílies de tipus B

La majoria de famílies estudiades per la doctoranda són de tipus B. Les mutacions amb error de sentit que afecten un aminoàcid conservat, en general causen fenotips més severos que aquelles que afecten un aminoàcid poc o gens conservat (article 3). En analitzar la funció de la proteïna mutada en cèl·lules HeLa, s'ha vist que les mutacions severes causen l'abolició total del transport de cistina, i les mutacions lleus només redueixen el transport.

Les mutacions que provoquen canvis en la pauta de lectura i en conseqüència canvis dramàtics en la seqüència de $b^{0,+}AT$, és esperable que produeixin proteïnes mal plegades que possiblement són degradades després de la seva síntesi, com s'ha observat en el cas de mutants de $\gamma^{+}LAT-1$ (LPI), c.1291delCTTT i c.1548delC, que quan es coexpressen amb 4F2hc no assolixen la membrana plasmàtica suggerint que aquests mutants són degradats o que perden la interacció amb 4F2hc o altres proteïnes necessàries pel tràfic a la membrana plasmàtica. Podria ser que el fenotip observat en molts dels heterozigots de $b^{0,+}AT$ fos degut a que aquest transport és sensible a meitat de dosi de $b^{0,+}AT$, com sembla que passa en el cas del model de ratolí *Stones* (els heterozigots amb meitat de dosi són hiperexcretors) i en el cas de la mutació B més freqüent, la p.G105R (*in vitro* pràcticament no s'observa proteïna, i en pacients està associat a fenotip sever en 31 de 32 heterozigots)(veure figura 39). Per tant, sembla que la reducció de la quantitat de proteïna que arriba a la membrana en aquests casos podria ser suficient per afectar la funció del transportador. Contràriament, la p.W69X que produiria una proteïna molt petita o no seria estable, va associada a fenotip I en l'únic pacient amb aquesta mutació de l'ICC. Per altra banda, el fet que determinades proteïnes mutants que no es degraden, presentin hiperexcreció d'aminoàcids, podria indicar un efecte dominant negatiu del mutant sobre la proteïna salvatge.

Algunes mutacions a *SLC7A9* causen fenotips tan lleus, que les excrecions dels seus heterozigots arriben a caure dins els valors dels portadors tipus I. Les mutacions de *SLC7A9* que s'han trobat associades a fenotip I en alguns heterozigots són 13: p.I44T, p.G63R, p.G105R, p.T123M, p.A126T, p.V170M, p.A182T, p.G195R, p.Y232C, p.P261L, p.E282K, p.W69X i c.614dupA (apartat 11.5.2 de Resultats). Rozen i col·laboradors van identificar dos portadors de tipus I per les mutacions de *SLC7A9*: p.I44T i p.P261L (Leclerc *et al.* 2002). El nostre grup ha identificat les 11 mutacions de *SLC7A9* restants associades a fenotip I amb freqüències variables: en l'article 5 en vem publicar 10, i posteriorment vem identificar la p.E282K a una família espanyola, l'únic portador de la qual té fenotip I. No hi ha una explicació definida de per què aquestes mutacions s'associen a fenotip I ja que algunes mostren activitat de transport residual i altres no tenen cap activitat de transport quan s'expressen en sistemes d'expressió heteròlegs (article 3). Quatre d'aquestes mutacions s'associen a fenotip I en uns quants portadors: p.A182T, p.T123M, p.G63R i p.V170M. Les mutacions p.A182T i p.T123M afecten residus d'aminoàcid no conservats en la família de les LSHAT. A més, la p.A182T és la mutació de *SLC7A9* que es troba més freqüentment associada a fenotip I en heterozigots (6 de 11 heterozigots en la cohort de l'ICC). És una mutació suau que presenta una activitat de transport residual del 60% en cèl·lules HeLa (article 3) i mostra un 100% d'activitat quan

es reconstitueix el mutant en liposomes indicant que p.A182T presenta un defecte de tràfic cap a la membrana plasmàtica (Reig *et al.* 2002). Les mutacions p.A126T i p.P261L, amb només un portador tipus I identificat, també impliquen residus no conservats. Set dels onze pacients BB de tipus mixt i el pacient BB de tipus I tenen la p.A182T o la p.T123M. El defecte de transport d'aminoàcids lleu d'aquestes mutacions podria ser la causa del fenotip urinari suau d'aquests pacients. En canvi, les altres mutacions en heterozigots amb fenotip I (p.I44T, p.G63R, p.G105R, p.V170M, p.G195R i p.Y232C) impliquen residus plenament conservats o ocasionen canvis grans en la proteïna (p.W69X, amb b⁰⁺AT truncat després del primer domini TM si no es dóna la NMD; c.614dupA, els estudis de mRNA mostren que aquesta mutació resulta en un *skipping* dels exons 5 i 6 [r.479_709del] que en traduir-se produïrien un *frameshift* a partir del residu 160 (p.L160fsX1) (veure figura 24 i article 5). A més, la p.G105R i la p.V170M presenten molt poca activitat de transport d'aminoàcids en cèl·lules HeLa (article 3). Una proporció molt petita d'heterozigots amb mutacions severes i comunes com la c.614dupA (1 de 19 portadors) i la p.G105R (1 de 32 portadors) mostren fenotip I, però el 25% dels heterozigots de p.V170M s'associen a fenotip I (tots d'origen jueu libi). Això indica que, a més a més de l'activitat funcional residual dels mutants de b⁰⁺AT, altres factors ambientals i/o genètics contribueixen al fenotip urinari dels portadors de mutacions de *SLC7A9*.

La majoria de portadors B amb fenotip I pertanyen a famílies mixtes, excepte en una família BB, en la que els dos portadors obligats són de tipus I. És interessant remarcar que els pacients BB de tipus mixt (I/nol) o tipus I també presenten un nivell d'aminoacidúria en el rang més baix dels pacients BB de tipus no I (article 5). Aquestes dades estan d'acord amb el fenotip urinari suau ja publicat per a pacients amb cistinúria mixta (Goodyer *et al.* 1998). Això suggereix que, a més a més de la variabilitat individual i poblacional, les mutacions de *SLC7A9* suaus solen associar-se a fenotip silenciosos en heterozigots B.

16.5.2 Pacients heterozigots per *SLC7A9* (B+)

Tres pacients (1,8%) de la cohort de l'ICC són heterozigots de *SLC7A9* (B+) formadors de càlculs de cistina (taula 7 i figura 36). Un és portador de la p.R333W (F64), un altre es portador de la c.614dupA (F53) i l'altre es portadora de la c.171C>T (F34)(veure figura 15 de Resultats), la p.R333W i la c.614dupA són dues mutacions freqüents amb fenotip molt sever que hem demostrat que afecten regions exòniques reguladores de *splicing* i causen el *skipping* dels exons 9-10 i 10 en la p.R333W i l'*skipping* de l'exó 5 i 6 en la c.614dupA, ambdós produint canvis severos en la proteïna si s'arriben a traduir.

S'ha vist com la mateixa mutació de *SLC7A9* en heterozigosi pot donar lloc a unes concentracions d'aminoàcids molt variables, des del tipus I, al tipus no I més sever (Pras *et al.* 1998b; Leclerc *et al.* 2002) (i article 3 i 5). A més, les mateixes mutacions de *SLC3A1* o de *SLC7A9* a germans afectes poden causar una litiasi força mòrbida a un/s i cap càlcul a l'altre (Dahlberg *et al.* 1977; Pras *et al.* 1998b; Botzenhart *et al.* 2002), fins i tot amb valors d'excreció d'aminoàcids similars (Ferran Rousaud, comunicació personal), o causar-hi valors d'excreció o de reabsorció tubular molt allunyats (Langen *et al.* 2000). És probable, doncs, que polimorfismes de *SLC3A1* i *SLC7A9* (com la p.V142A i la p.L223M) o altres factors, aliens als dos *loci* de cistinúria, tinguin un paper considerable en l'excreció d'aminoàcids i en la litiasi de cistina. El pacient B+ de la F34 també té aquests dos polimorfismes en heterozigosi.

La variabilitat fenotípica observada entre portadors i pacients amb una mateixa mutació podria explicar-se també, en alguns casos, per l'expressió diferencial de trànscripats amb *skippings* diferents, com és el cas de la p.R333W, que presenta 2 trànscripats: un amb el *skipping* de E9-10 [r.874_1074del201] i un altre amb el *skipping* del 10 [r.978_1074del97], que produeixen: una deleció en pauta (p.T292_Y358del67) i un trencament de la pauta de lectura (p.R327fsX2) respectivament. És probable que una de les dues proteïnes sigui més funcional que l'altre, si no s'arriben a degradar.

16.5.3 Famílies de tipus A

El 94% d'heterozigots per mutacions a *SLC3A1* presenten fenotip I. Recentment hem pogut establir la primera correlació genotip-fenotip per una mutació de rBAT, la dupE5-E9, que presenta un fenotip no I en la majoria d'heterozigots (4 dels 6 fenotipats) (article 5). La dupE5-E9 és la conseqüència d'una reordenament del gen *SLC3A1* que ocasiona la duplicació dels exons 5 a 9: c.891+1524_1618-1600dup (inicialment publicada per Schmidt i col·laboradors (Schmidt *et al.* 2003b)). Per estudis de RT-PCR s'observa que el trànscrip és estable i conté aquests exons duplicats (Schmidt *et al.* 2003b) (r.892_1617dup726)(figura 24 de Resultats). La proteïna resultant, si es tradueix i és estable, té una duplicació en pauta dels residus d'aminoàcid E298 a D539 de la proteïna rBAT. També hem identificat

DISCUSSIÓ GENERAL

una família mixte que té la mutació p.R352W associada a fenotip no I. Totes les altres mutacions de *SLC3A1* de l'ICC, incloent les més severes (p.e., la c.163delC que produeix un *frameshift* amb un codó d'aturada prematur, que eliminaria els dominis TM i extracel·lular de rBAT (p.Q55fsX51); o la c.431_2055del, que eliminaria un 80% dels residus de rBAT cap a l'extrem C-terminal (p.G144-C685del)) mostren fenotip I (revisat a l'article 5). Això indica que la mutació dupE5-E9 podria tenir un efecte dominant negatiu en el complex heteromèric rBAT/b^{0,+}AT. L'estudi funcional d'aquesta mutació revelarà si el fenotip no I reflecteix heterodimerització amb b^{0,+}AT, resultant en un complex heteromèric no actiu, i pot proporcionar més informació estructural i funcional del complex heterotetramèric (rBAT/b^{0,+}AT)₂ que s'observa mitjançant les tècniques de BN PAGE, cromatografia d'exclusió molecular i *crosslinking* (veure més avall). Recentment, s'ha publicat un article d'una mutació de rBAT que també s'associa a fenotip no I en una família espanyola: la c.1767delA (Guillén *et al.* 2004). Els valors d'aminogrames en aquesta família són baixos comparats amb els valors d'homozigots de l'ICC. Sembla que es tractaria de la primera mutació de rBAT que produeix cistinúria en heterozigosi, ja que tant la mare com la tia del pacient també tenen la mutació i presenten pedres recorrents i valors d'excreció similars. També es podria pensar que aquesta família en realitat és AB, és a dir, que probablement té també una mutació a *SLC7A9*, ja que s'hereten de manera independent en estar en cromosomes diferents (cr. 2 i 19) i per tant les dues generacions poden tenir el mateix genotip. Però sembla que no han analitzat el gen *SLC7A9* en aquesta família i no podem saber si és la primera família A+ o la primera família AB+ amb càlculs.

16.5.4 Famílies mixtes

Com que el 14% d'heterozigots amb mutacions a *SLC7A9* poden causar fenotip I, una part de les famílies BB presenten un progenitor tipus I i l'altre tipus no I. Així el 71,4% de famílies mixtes són de tipus B (7 BB, 1 BBA i 2 B?). I el 28,6% restant són portadores de la mutació freqüent de *SLC3A1*, la dupE5-E9, que s'associa sovint a fenotip no I (2 AA, 1 AAB i 1 A?). Algunes descripcions de famílies mixtes (tipus I/no I) suggerien heterogeneïtat genètica donat que els valors d'excreció d'aminoàcids i/o d'absorció intestinal dels afectes eren inferiors als dels homozigots de qualsevol altre tipus (famílies recessives o dominants incompletes pures) (Morin *et al.* 1971; Goodyer *et al.* 1993; Goodyer *et al.* 1998). En la cohort de l'ICC les famílies mixtes també tenen nivells més baixos d'excreció (figura 37, pacients BB-mixtes). Aquest resultat no costa de justificar en el marc d'una família BB on una de les mutacions és lleu (causa el tipus I) i l'altre és més greu (causa el tipus no I). Els probands amb aquestes dues mutacions encara conservarien una activitat de transport significativa (com es mostra en cèl·lules HeLa a l'article 3) catalitzada per la proteïna b^{0,+}AT amb la mutació lleu, provocant una excreció urinària lleugerament menor a la d'altres cistinúrics.

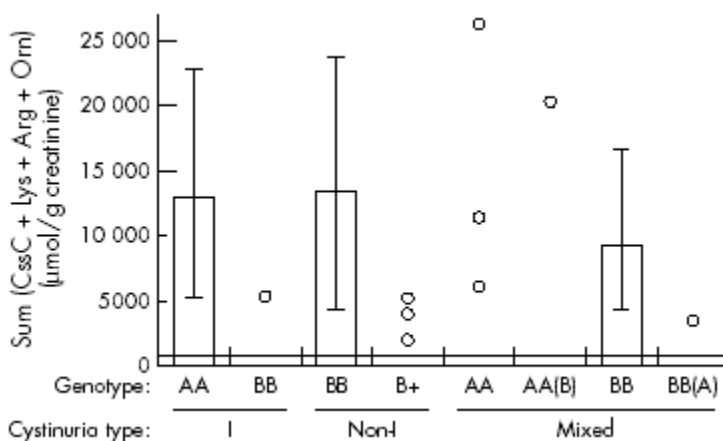


Figura 37. Suma dels valors d'aminoàcids bàsics i cistina en l'orina de pacients de cistinúria classificats segons el genotip i el fenotip. Les mitjanes (histogrames) o les dades individuals (cercles), expressats en μmol/g de creatinina, corresponen a la suma dels valors mostrats en la taula 8 de l'article 5. Les línies verticals representen el 5è i 95è percentil dels valors de cada grup. La línia horitzontal és el 95è percentil del grup control (detallat a la taula 6 de l'article 5).

16.5.5 Digènia amb fenotip parcial

Des del descobriment d'almenys dos fenotips diferenciats de cistinúria, s'ha especulat sobre la seva base genètica. L'estudi de l'afectació dels pacients els pares dels quals (heterozigots obligats) pertanyien a fenotips diferents (famílies mixtes) va donar lloc a especulacions sobre el possible al·lelisme de les mutacions que causaven la cistinúria recessiva (I) i dominant amb penetrança incompleta (no I) (Rosenberg 1966; Morin *et al.* 1971). El 1995 el nostre grup va demostrar l'heterogeneïtat genètica de la cistinúria (Calonge *et al.* 1995b; Gasparini *et al.* 1995). Un cop descoberts els dos gens principals (si no

únics) de cistinúria (Calonge *et al.* 1994) (i article 2), quedava per esbrinar si els individus amb una mutació a *SLC3A1* i l'altra a *SLC7A9* (AB) eren afectes degut a la digènia o calia esperar una altra mutació en un dels dos gens.

Amb les dades obtingudes de l'estudi exhaustiu de les famílies sabem que els individus amb una mutació a *SLC3A1* i una altra a *SLC7A9* no són afectes de cistinúria. Fins ara només hem trobat tres pacients amb mutacions als dos gens en la base de dades de l'ICC. Prèviament ja s'havia publicat un pacient AA(B) però sense la descripció del fenotip urinari associat (Harnevik *et al.* 2003). El grau d'aminoacidúria d'aquest tipus de pacients i dels seus familiars, i el fet que cap dels individus AB presenti urolitiasi de cistina, indica que l'herència digènica en la cistinúria té només un efecte parcial sobre el fenotip, restringit a un impacte variable en l'aminoacidúria.

Els individus AB, és a dir, amb una mutació a *SLC3A1* i una altra a *SLC7A9* presenten fenotip de portador de tipus no I i no arriben a formar càlculs. Donat que gairebé un 90% dels al·lells de la cohort de pacients de l'ICC han estat identificats, i que la freqüència dels al·lells de tipus A i B són similars en aquesta cohort, si l'herència digènica fos la regla en la cistinúria, esperaríem un quart de pacients AA, un quart de pacients BB i una meitat de pacients AB, segons les proporcions mendelianes. Però l'herència digènica, que afecta el fenotip, és una excepció en la cistinúria. L'explicació més plausible és que els individus AB no són afectes, i per tant, no són presents als reculls de famílies cistinúriques. Si assumim una freqüència de mutació a *SLC3A1* igual que a *SLC7A9*, igual a 0,006 (prevalença de la malaltia 1:7000), la probabilitat d'AAB, sumada a la d'BBA és 42 cops menor que la d'AA o la de BB. Aquesta proporció quadra molt millor amb les dades.

Per tant, quan ens trobem amb un pacient AB?, cal continuar cercant la tercera mutació. Ja que la majoria de les famílies mixtes de l'ICC són BB o si són AA tenen la mutació dupE5-E9, en pacients AB? es pot dirigir la cerca de la tercera mutació a *SLC7A9* en aquestes famílies, un cop descartada la dupE5-E9 per una PCR senzilla amb els encebadors rBAT-I9-for1 i rBAT-I4-rev (annex 1).

Tanmateix, no podem descartar la possibilitat que algunes combinacions de mutacions A i B produeixin prou hiperexcreció de cistina per provocar urolitiasi. Cal tenir en compte que hi ha individus B/+ que presenten urolitiasi de cistina (3 de 192 pacients genotipats; un 1,6%), i que el seu fenotip es podria agreujar amb l'addició de l'efecte d'un al·lel de tipus A.

És probable que el fenotip no I associat a la mutació de *SLC3A1* dupE5-E9 sigui a causa de l'heterodimerització amb $b^{0,+}AT$, que formi un complex heteromèric no actiu. És per això que la combinació de la dupE5-E9 amb qualsevol mutació a *SLC7A9* també podria causar cistinúria en individus AB. Cal estudiar amb més profunditat aquesta mutació, i la recentment publicada c.1767delA per resoldre aquesta qüestió.

Els estudis inicials d'expressió de rBAT i $b^{0,+}AT$ en cèl·lules COS (article 2), en cèl·lules MDCK transfectades establement (Bauch and Verrey 2002), i en cèl·lules HeLa (Reig *et al.* 2002) han demostrat que rBAT i $b^{0,+}AT$ es necessiten mútuament per assolir la membrana apical d'aquestes cèl·lules. A més, la presència de $b^{0,+}AT$ estabilitzava la proteïna rBAT i permet la maduració de les N-glicosilacions (Bauch and Verrey 2002; Reig *et al.* 2002). Per altra banda, la proteïna $b^{0,+}AT$ sola és estable i catalíticament activa quan s'expressa en proteoliposomes en absència de rBAT (Reig *et al.* 2002). Aquests resultats han permès proposar un model de biogènesi per aquest transportador heterodimèric on la proteïna $b^{0,+}AT$ actua com a xaperona per rBAT (figura 38).

El model sobre la biogènesi de l'heterodímer rBAT/ $b^{0,+}AT$ (figura 38) permet fer diverses hipòtesis que permeten explicar el perquè la majoria de mutacions a *SLC3A1* presenten un fenotip recessiu mentre que la majoria de mutacions a *SLC7A9* presenten un fenotip parcialment dominant. Una de les hipòtesis seria que mutacions a $b^{0,+}AT$ tingui un efecte dominant negatiu sobre rBAT, però no a la inversa. Aquesta possibilitat no ha estat explicada experimentalment. Per altra banda el KO de $b^{0,+}AT$ causa també un fenotip dominant incomplet, el que fa pensar que un defecte de dosi també produeix hiperexcreció. La hipòtesi més probable és que la proteïna rBAT és produïda en excés respecte $b^{0,+}AT$ en el túbul proximal, i que $b^{0,+}AT$ controla l'expressió del complex heterodimèric funcional rBAT/ $b^{0,+}AT$. La interacció amb $b^{0,+}AT$ estabilitza rBAT, i l'excés de rBAT es degrada, com es mostra en cèl·lules transfectades (Bauch and Verrey 2002; Reig *et al.* 2002). Per això, encara que les mutacions en heterozigosi a rBAT (excepte la dupE5-E9, la c.1767delA i potser la p.R452W) provoquessin la degradació de la proteïna mutada, el seu excés permetria l'expressió necessària de l'heterodímer rBAT/ $b^{0,+}AT$ en la membrana plasmàtica, i per tant no es produiria hiperexcreció d'aminoàcids (fenotip I). En canvi, mutacions a $b^{0,+}AT$ en heterozigosi (heterozigots de mutacions severes de *SLC7A9* humanes o dels ratolins *knockout* de *Slc7a9* (Feliubadaló *et al.* 2003)) provocarien una disminució significativa de l'expressió del complex heterodimèric rBAT/ $b^{0,+}AT$ en la membrana plasmàtica causant hiperexcreció de

DISCUSSIÓ GENERAL

cistina i aminoàcids dibàsics (fenotip no I). Això està d'acord amb el fet que, en els heterozigots portadors de mutacions a $b^{0,+}AT$ es donin fenotips I i no I, en funció de la severitat de la mutació.

La manca d'un fenotip complet degut a herència digènica en cistinúria també es podria explicar amb aquest model de biogènesi de l'heterodímer (figura 38) i els fenotips urinaris en cistinúria: en els heterozigots dobles (AB), la proteïna rBAT mutada, amb defectes de tràfic (Chillarón *et al.* 1997; Saadi *et al.* 1998; Pineda *et al.* 1999), no compromet l'heterodimerització i el tràfic cap a la membrana plasmàtica de la meitat de dosi de $b^{0,+}AT$ salvatge amb la meitat de dosi de rBAT salvatge. Per tant, els individus AB es comporten com heterozigots B (B+) amb un grau variable d'aminoacidúria, que pot ser major que el dels heterozigots simples dins de la família, depenent de la combinació particular de mutacions. La demostració d'aquesta hipòtesi requereix l'estudi en profunditat de mutacions a rBAT i $b^{0,+}AT$ en la biogènesi (incloent la mutació dominant negativa de rBAT dupE5-E9).

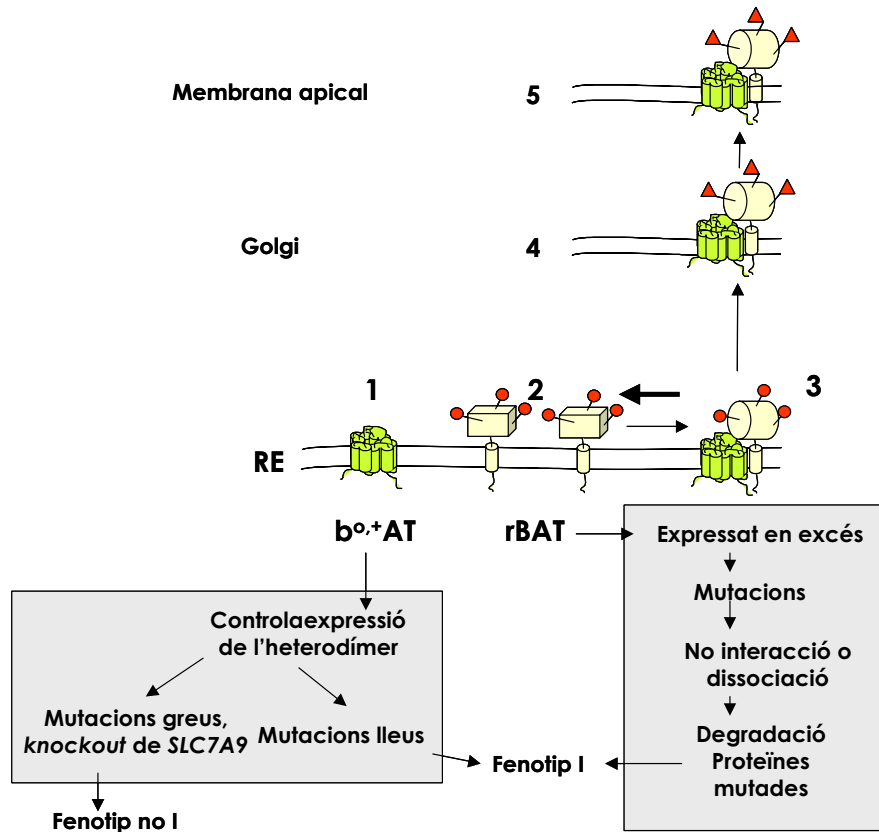


Figura 38. Model hipotètic de biogènesi del transportador rBAT/ $b^{0,+}AT$. 1) La proteïna $b^{0,+}AT$ es plega i assoleix una conformació funcional, mentre que 2) rBAT es troba en una conformació inestable susceptible de degradació. 3) La interacció entre $b^{0,+}AT$ i rBAT permet aquest d'assolir una conformació més estable, 4) la maduració de la N-glicosilació de rBAT i 5) el tràfic de l'heterodímer cap a la membrana plasmàtica. $b^{0,+}AT$ és la subunitat catalítica i controla l'expressió de l'heterodímer, per tant les mutacions severes que es carreguen part o tota la proteïna (p.e. *knockout Stones*) o les puntuals que produeixen una abolició del transport donen un fenotip no I, perquè no arriba prou proteïna a la membrana o la que arriba no és funcional. Per altra banda, les mutacions lleus a $b^{0,+}AT$ deuen arribar a la membrana i conserven activitat residual (fenotip I). En canvi la proteïna rBAT s'expressa en excés i en estar mutada no pot interaccionar bé amb $b^{0,+}AT$ i es degrada, però hi ha suficient rBAT salvatge per formar l'heterodímer i tenir una funció normal (fenotip I).

Els ratolins *knockout* són l'eina perfecta, per abordar el problema de la digènia. Dins del projecte europeu EUGINDAT, estem tenim una col·laboració científica amb l'empresa *Ingenium* que tenen el ratolí amb una mutació puntual a *Slc3a1* (homozigot per a la mutació p.D140G) que desenvolupa cistinúria de tipus I amb urolitiasi (*Pebbles*) (Peters *et al.* 2003). La idea és analitzar les combinacions derivades dels creuament d'aquest ratolí amb el KO *Stones* (Feliubadaló *et al.* 2003) Pretenem establir creuaments que ens permetin obtenir: i) animals heterozigots per als dos gens *Slc3a1*^{+/+} i *Slc7a9*^{+/+}, ii) els heterozigots d'un gen i homozigots per a l'altre (analitzarem les dues combinacions possibles) i iii) els dobles homozigots.

En tots els casos analitzarem quins són els valors d'hiperexcreció per a cada grup i la contribució de cada genotip a la formació de pedres. De forma simultània realitzarem estudis de transport d'aminoàcids en algun dels diferents models a fi d'aclarir el paper de cada una de les subunitats en la reabsorció renal d'aminoàcids.

17 AL·LELS QUE QUEDEN PER EXPLICAR EN CISTINÚRIA

La cerca de mutacions ha estat molt acurada (SSCP, DHPLC, seqüenciació directa, cerca de grans reordenaments a *SLC3A1* i *SLC7A9*) i cobria tota la regió codificant i tots els límits d'intró-exó. Aproximadament el 13% dels al·lels de pacients cistinúrics de l'ICC no han estat explicats per mutacions en la regió codificant ni els límits exó-intró en els gens de cistinúria identificats fins al moment, *SLC3A1* i *SLC7A9* (articles 4 i 5). Els al·lels de cistinúria no explicats poden ser deguts a mutacions en regions intròniques (afectant reguladors intrònics de *splicing*, regulació de la transcripció, etc.) o del promotor encara no identificades als dos gens de cistinúria coneguts, o a mutacions a altres gens no identificats. També podria ser que certs polimorfismes de *SLC3A1* o *SLC7A9* en combinació amb mutacions causessin cistinúria.

Aquestes quatre possibilitats no han estat confirmades ni excloses. En l'ICC, no s'han fet estudis funcionals de les variants de seqüència de promotor ni anàlisi funcional dels polimorfismes candidats que demostrin el seu paper en la malaltia.

17.1 MUTACIONS EN LES REGIONS PROMOTORES

La regió promotora d'aquests gens no ha estat analitzada de manera exhaustiva, però una contribució petita de mutacions en aquestes regions és esperable.

La regió promotora de *SLC7A9* només s'ha analitzat en pacients espanyols. S'han detectat 3 polimorfismes que presenten distribucions significativament diferents en pacients i controls: les variants c.1-313G>T i c.1-617G>T, que es troben sempre en el mateix cromosoma, tenen una freqüència al·lèlica en pacients major que en controls. Mentre que en el cas de la variant c.1-1314G>A els pacients tenen una G en aquesta posició en una proporció molt més gran que la població control. Aquestes 3 variants no afecten cap de les caixes d'unió a factors de transcripció predites *in silico*.

En el cas de rBAT, també s'han publicat 2 variants de seqüència específiques de cistinúria a la regió de promotor de *SLC3A1*: c.1-265G>A i c.1-194G>C (Boutros *et al.* 1999). c.1-265G>A localitza en un lloc AP-2 i mitjançant experiments de transfecció s'ha vist que disminueix l'activitat del promotor a un 60% respecte el salvatge (Boutros *et al.* 1999) i taula 7 de Resultats).

S'haurien de fer estudis d'expressió en ronyó de malalts per saber si aquestes variants del promotor contribueixen en la malaltia.

17.2 MUTACIONS EN REGIONS INTRÒNIQUES

Els exons es defineixen pels llocs consens de *splicing* clàssics que són seqüències curtes i degenerades situades als límits exó-intró: el lloc d'empalmament de 5' o donador de *splicing* (5' splice donor), el lloc d'empalmament de 3' o acceptor de *splicing* (3' splice acceptor) i el lloc de branca (*branch site*). Paradoxalment, a eucariotes superiors, el requeriment per un *splicing* acurat es troba en aquests elements intrònics en *cis* poc conservats. Aquests elements són necessaris però no suficients per definir els límits exó-intró. L'eliminació d'aquests introns durant el *splicing* del pre-mRNA és un procés altament precís i complex. El reconeixement inexacte dels límits d'exó-intró o el fracàs en treure un intró genera mRNA aberrants que poden ser inestables o codificar per a isoformes defectuoses de la proteïna. El paper potencial del *splicing* com a modificador de malalties humanes s'ha revisat a (Nissim-Rafinia and Kerem 2002; Faustino and Cooper 2003).

Tanmateix els exons s'empalmen correctament encara que estiguin separats per desenes de milers de nucleòtids intrònics. El spliceosoma ha de reconèixer els llocs d'empalmament correctes abans de fer les reaccions de tall i unió. Els llocs consens de *splicing*, curts i degenerats, contenen només la meitat de la informació necessària per a la identificació del lloc d'empalmament (Lim and Burge 2001). Existeixen seqüències de lloc d'empalmament "falses" que s'assemblen als llocs d'empalmament clàssics però que

DISCUSSIÓ GENERAL

no s'utilitzen mai. Els llocs d'empalmament falsos poden superar en nombre, per un ordre de magnitud, a les seqüències bones dins d'un pre-mRNA (Sun and Chasin 2000). Existeixen elements auxiliars en *cis* (*cis elements*), coneguts com activadors de *splicing* exònics i intrònics (ESE i ISE) i silenciadors de *splicing* exònics i intrònics (ESS i ISS), que són importants per a la identificació del lloc d'empalmament correcte i són diferents de les senyals clàssiques de *splicing*.

Aquests al·lells que falten per explicar podrien ser mutacions intròniques que afectin elements reguladors de *splicing* en *cis* (ISS i/o ISE), però actualment no disposem de RNA d'aquests pacients per realitzar els estudis. Fins ara només s'ha trobat una mutació intrònica la c.1012-23C>G a *SLC3A1*, que produeix el *skipping* de l'exó 6, i que podria estar localitzada en un enhancer de *splicing* intrònic (ISE), ja que es troba al mig d'un motiu ric en A i C, fet que fa que aquesta regió sembli un ISE, com s'ha vist per a altres seqüències riques en A i C (ACEs o A/C rich ISEs, Coulter et al., 1997). Per RT-PCR s'ha observat que la c.1749delA presenta un *skipping* dels exons 5, 6 i 7. Aquest al·lel a part de contenir la c.1749delA (comprovat per RT) deu presentar una segona mutació en algun dels introns 4, 5, 6 o 7, que provoqui el *skipping*, ja que el canvi c.1749delA està en l'exó 10, molt allunyat de la zona de *skipping*. Per tant, el més probable és que es tracti d'una altra mutació localitzada en un enhancer de *splicing* intrònic (ISE), i aquest canvi podria ser el fins ara considerat polimorfisme c.1332+7T>C, encara que sembla que hauria de ser un altre polimorfisme en heterozigosi en un d'aquests 4 introns. La recollida de RNA de pacients, permetrà en un futur, trobar més mutacions intròniques (ISE, ISS) o exòniques (ESE, ESS).

També podria ser que algunes mutacions intròniques afectessin zones reguladores de la transcripció com passa en el gen *SLC7A7* implicat en LPI (homòleg a *SLC7A9*, de cistinúria). Els estudis amb gen monitor luciferasa fent transfeccions transitòries, mostraren que els primers dos introns del gen contenen elements activadors transcripcionals (*enhancers*) (Mykkanen et al. 2003).

17.3 POLIMORFISMES DE *SLC3A1* O *SLC7A9*

Finalment, els polimorfismes de *SLC3A1* o *SLC7A9* en combinació amb mutacions específiques de cistinúria podrien ocasionar cistinúria, com ja vem suggerir el nostre grup (congrés ESHG, Strasburg 2002) i (Schmidt et al. 2003a). Caldria fer un anàlisi funcional d'aquests polimorfismes que demostrï la seva contribució a la malaltia.

A *SLC7A9*, hem identificat dos polimorfismes de canvi d'aminoàcid (p.V142A i p. L223M) que podrien tenir algun efecte en el fenotip d'aquests pacients i fins i tot causar malaltia en combinació amb una altra mutació, o fins i tot en absència d'altres mutacions, si aquests polimorfismes es troben en homozigosi, com es dona en diverses famílies amb càlculs no explicades de l'ICC

A *SLC3A1*, la variant p.F266S també és candidata a tenir un efecte en el fenotip. Detectem aquest canvi a 5 al·lells cistinúrics d'un total de 94 al·lells analitzats (mentre que només 1 en un total de 108 controls). El fet que es trobi en diversos pacients de tots els tipus, fa molt interessant el seu estudi perquè podria aportar noves dades en la correlació fenotip-genotip. Com que afecta un residu altament conservat en les seqüències de rBAT s'ha analitzat l'impacte d'aquest mutant funcionalment (Maite Jiménez, tesi doctoral). En estudis preliminars no s'observen diferències respecte a la proteïna salvatge, amb el que no sembla implicat en la malaltia. Tot i així farien falta més estudis, tant funcionals com de mRNA (podria ser que afectés un ESE), per descartar-ho definitivament.

A més algun d'aquests polimorfismes podria afectar un ESE o ESS. Els ESE semblen ser molt predominants, i poden estar presents en molts, si no tots, els exons incloent-hi els constitutius. Els ESE també poden activar el *splicing* inhibint ESS adjacents (Kan and Green 1999; Zhu et al. 2001).

Per identificar elements de *splicing* auxiliars addicionals s'estan utilitzant diferents aproximacions complementàries (Ladd and Cooper 2002). Una anàlisi computacional recent en genoma humà identificava 10 ESE, 5 dels quals són nous, analitzant seqüències hexamèriques enriquides en els exons que són flanquejats per llocs de *splicing* dèbils. Els 10 ESE funcionaven autònomament activant el *splicing* d'un exó dèbil *in vivo* (Fairbrother et al. 2002). En una aproximació diferent, els ESE diana de quatre proteïnes SR diferents s'identificaven utilitzant l'evolució sistemàtica funcional de lligands per enriquiment exponencial (Liu et al. 1998; Liu et al. 2000). Les seqüències consens obtingudes d'aquests experiments s'utilitzaren per desenvolupar un programa de predicció d'ESE (a <http://exon.cshl.org/ESE>), utilitzat en aquesta tesi (veure apartat 13.1 i annex 3). Aquest programa prediu que precisament el polimorfisme c.667C>A (p.L223M) podria afectar dos seqüències ESE putatives d'unió al factor SF2/ASF fent disminuir la probabilitat de 2,50 a -0,02 i de 1,96 a -0,55, per tant aquest polimorfisme podria causar un defecte en el *splicing*. Altres polimorfismes, no detectats pel programa, també podrien afectar el *splicing*, ja que aquest només detecta el 50% dels ESE (Cartegni et al. 2002).

17.4 ALTRES MEMBRES DE LSHAT COM A CANDIDATS DE CISTINÚRIA

Com s'ha comentat a l'apartat 16.2, no queda gaire "espai" per un tercer gen de cistinúria. D'altra banda, les dades indiquen que la reabsorció de cistina és major al túbul proximal contornejat, i menor al proximal recte (Völk and Silbernagl 1982; Silbernagl 1988), coincidint amb l'expressió del complex $b^{0,+}$ AT-rBAT (Fernández *et al.* 2002), fet que demostra que l'holotransportador $b^{0,+}$ AT-rBAT és el principal sistema de reabsorció renal de cistina. Tot i així no es pot descartar l'existència d'un tercer gen de cistinúria i/o gens moduladors del fenotip, encara que sembla improbable, però explicaria una proporció molt petita de pacients (només tenim un 3% dels probands sense mutacions a cap dels dos gens de cistinúria) (article 5).

Tal com s'ha comentat en la Introducció, durant la realització d'aquesta tesi han estat clonats i caracteritzats 10 membres de la família de subunitats lleugeres de transportadors d'aminoàcids heteromèrics (LSHAT). En la present tesi també s'han analitzat els gens dels membres LAT-2 i asc-1, en pacients de cistinúria per tal d'esbrinar la seva possible implicació en la malaltia. Vem trobar variants de seqüència a *SLC7A8* i *SLC7A10* a pacients en els que s'havia trobat una o cap mutació a *SLC7A9* i *SLC3A1*. S'ha descartat la implicació de *SLC7A10* en la malaltia però no queda clara la implicació de LAT-2 en el fenotip cistinúric. Recentment, s'ha clonat una altra LSHAT, arpAT, que sembla no tenir res a veure amb la malaltia.

17.4.1 *SLC7A10* (asc-1)

En aquesta tesi també ha estat caracteritzada genèticament la LSHAT asc-1. L'expressió d'aquesta subunitat juntament amb 4F2hc en oòcits de *Xenopus* indueix transport d'aminoàcids neutres petits (glicina, alanina, serina, treonina, cisteïna) independent de Na^+ i d'elevada afinitat, d'acord amb les característiques descrites pel sistema asc (veure Introducció i article 6).

Malgrat que els transportadors de la família HAT no presenten una estereoselectivitat marcada, asc-1 se'n diferencia perquè transporta D-aminoàcids (D-alanina i D-serina) amb elevada afinitat (Fukasawa *et al.* 2000). A diferència de la majoria de LSHAT, asc-1 no es comporta com a intercanviador obligatori. En l'article 6 es mostra com 4F2hc/asc-1 permet la sortida d'alanina intracel·lular en absència d'aminoàcids a l'exterior de la cèl·lula. En el context d'una cèl·lula, on s'expressen transportadors concentratius (p.e., sistemes A, B⁰, B^{0,+}), la difusió facilitada induïda per asc-1 suggereix per aquest transportador un paper en la sortida d'aminoàcids neutres de mida petita.

També podria ser que asc-1 formés complexes amb alguna subunitat pesada desconeguda fins al moment, de manera semblant al que ha estat descrit per asc-2 i AGT-1 (veure Introducció). Aquestes proteïnes però no indueixen activitat de transport ni amb rBAT ni 4F2hc en oòcits de *Xenopus*, i la seva activitat s'ha hagut d'estudiar mitjançant proteïnes de fusió amb les subunitats pesades (Chairoungdua *et al.* 2001; Matsuo *et al.* 2002).

17.4.1.1 Polimorfismes a *SLC7A10* (asc-1)

Com s'ha comentat en l'apartat 14.1 de Resultats, el fet que asc-1 mapés a 19q13.1 dins el *locus* proposat per la cistinúria de tipus I (al costat del gen responsable de cistinúria *SLC7A9*), la seva expressió en ronyó i el fet que 4F2hc/asc-1 permetés el transport de cisteïna, portaren a Leclerc i col·laboradors a proposar el gen *SLC7A10* com a candidat de cistinúria (Leclerc *et al.* 2001). Aquest grup detectà 5 variants de seqüència en el gen d'asc-1 en pacients de cistinúria: IVS6-11T>C, c.1473G>T, c.267G>A, IVS7+20G>T i p.E112D. *SLC7A10* s'expressa sobretot a ronyó i cervell, però també a placenta, cor, múscul esquelètic, pulmó, fetge i pàncrees (Nakauchi *et al.* 2000). Tot i que aquest perfil d'expressió inclou molts teixits no afectats pel fenotip cistinúric, es podria argumentar que altres transportadors poden suplir-lo en aquests teixits, però no al ronyó. La proteïna asc-1 transporta aminoàcids neutres petits, a més, al ronyó, el mRNA de *SLC7A10* es localitza a la nansa de Henle, el túbul distal i el conducte col·lector (article 6), zones on no es produeix una apreciable reabsorció de cistina. Tampoc es tractava, doncs, d'un bon candidat funcional, però la seva localització cromosòmica, en la regió acotada per la cistinúria de tipus no I i la publicació d'alguns canvis a pacients cistinúrics, per aquest grup canadenc (Leclerc *et al.* 2001) impulsà el nostre grup a cercar-hi mutacions en pacients que fins al moment no havien estat explicats per *SLC3A1* i *SLC7A9* (article 6).

En aquesta memòria es descarta el paper d'asc-1 en la cistinúria per diverses raons:

DISCUSSIÓ GENERAL

- Hem identificat 5 variants nucleotídiques silents a *SLC7A10* que no estan associades a fenotip cistinúric en pacients de l'ICC. Quatre d'elles corresponen a canvis intrònics (IVS4+48C>G, IVS4-21C>G, IVS6-11C>T, IVS8-17G>A) i una és un canvi exònic silent, c.1374G>T. Aquesta última variant i la IVS6-11T>C van ser prèviament identificades per Leclerc i col·laboradors (Leclerc *et al.* 2001). Cap de les altres variants descrites en aquell treball, incloent la c.435G>C, l'única que resulta en un canvi aminoacídic (p.E112D), no han estat identificades en els nostres pacients. Tots els canvis identificats en la nostra cohort es trobaven en la mateixa proporció que en la població control.
- En els estudis funcionals realitzats per la doctora Marta Pineda de la variant p.E112D descrita per Leclerc i col·laboradors aquesta presenta la mateixa funció de transport que la proteïna salvatge (article 6).
- A més, la manca d'expressió d'asc-1 al túbul proximal, indica que aquest transportador no té un paper quantitativament important en la reabsorció renal dels aminoàcids neutres, si tenim en compte que el 99% de la reabsorció d'aminoàcids té lloc en el túbul proximal. L'expressió al túbul distal i tub col·lector suggereix que asc-1 té un paper en el transport basolateral de L- i D-aminoàcids neutres petits.

Recentment, un altre grup també ha descartat asc-1 com a gen de cistinúria (Schmidt *et al.* 2004).

17.4.1.2 Funció fisiològica d'asc-1

En l'apartat d'Introducció s'ha descrit que la major part de la reabsorció d'aminoàcids es dona en el túbul proximal de la nefrona (Silbernagl 1988). La reabsorció en nefrones distals afecta diferents aminoàcids, entre ells D- i L-alanina, glicina i L-serina. Per altra banda s'ha descrit reciclatge d'aminoàcids des dels vasos sanguinis a l'interior dels túbuls. Aquest procés s'ha descrit per alguns aminoàcids, d'entre els quals hi ha L- i D-alanina i L-serina. A més, el flux de D- i L-alanina s'inhibeix parcialment per fenilalanina (Dantzler and Silbernagl 1991), característiques que recorden el transport induït per asc-1 (Fukasawa *et al.* 2000). Així, la localització d'asc-1 en nefrona distal i la seva activitat de difusió facilitada suggereixen que podria jugar un paper important en el procés de reciclatge d'aminoàcids. Aquest reciclatge d'aminoàcids s'ha suggerit que podria ser important per la regulació de la pressió osmòtica en les cèl·lules epitelials del túbul renal, degut als canvis que es produeixen en la concentració osmòtica del fluid intratubular al llarg del túbul renal (Dantzler and Silbernagl 1988).

Malgrat que les trimetilamines (p.e., betaïna, glicerofosfocloina) i els polialcohols (p.e., sorbitol, mio-inositol) s'han descrit com els osmolits més importants en la medul·la renal, els aminoàcids lliures també s'han descrit com a reguladors osmòtics a curt termini, variant la seva concentració en funció de la diuresi (Beck *et al.* 1998). Així per exemple la hiposmolaritat estimula la sortida d'aminoàcids en cèl·lules MDCK (línia cel·lular renal derivada de cèl·lules col·lectores) (Sanchez Olea *et al.* 1991). D'entre els aminoàcids alliberats en aquestes condicions es troben β -alanina, glicina, alanina i serina, substrats de 4F2hc/asc-1 (Fukasawa *et al.* 2000).

Se sap que la transcripció dels gens que codifiquen pel transportador de betaïna (BGT1), el transportador de mio-inositol (SMIT) i l'aldosa reductasa (enzim implicat en la síntesi de sorbitol) està regulada per la proteïna TonEBP (TonE binding protein), que s'uneix a les seqüències TonE (*tonicity enhancer*) identificades a 5' dels promotors dels gens d'aquestes proteïnes (Handler and Kwon 2001). A *SLC7A10* (asc-1), la doctora Marta Pineda detectà diverses seqüències consens TonE (Handler and Kwon 2001): una està localitzada 4 Kb a 5' de l'exó 1 i una altra en el primer intró (que comprèn ~10 Kb). La cerca de seqüències TonE consens menys restrictives (Miyakawa *et al.* 1998) permeté identificar 4 seqüències addicionals dins la regió de 10 Kb a 5' de l'exó 1 (article 6).

Tenint en compte el mecanisme de transport per difusió facilitada induït per 4F2hc/asc-1, el nostre grup ha suggerit que aquest transportador podria regular la concentració d'aminoàcids intracel·lulars en resposta als canvis osmòtics: en condicions d'hiposmolaritat podria participar en la sortida neta d'aminoàcids, mentre que en condicions d'hiperosmolaritat, podria regular la concentració intracel·lular d'aminoàcids a llarg termini, quan la concentració de trimetilamines i polialcohols augmenta (article 6).

De manera similar al que s'ha proposat per LAT-2, l'expressió d'asc-1 en múscul esquelètic podria estar relacionada amb la sortida d'alanina en condicions de caquèxia o dejuni (Felig 1975). Per altra banda, en cultius de cèl·lules musculars i cardíques han estat descrits mecanismes d'adaptació osmòtica que impliquen canvis en la concentració d'aminoàcids (Rasmusson *et al.* 1993; Chen *et al.* 1994). L'expressió detectada d'asc-1 a múscul esquelètic i cor suggereixen un possible paper en la regulació osmòtica també

en aquests teixits (Marta Pineda, tesi doctoral).

Degut a l'expressió d'asc-1 a cervell i l'elevada afinitat per la D-serina s'ha suggerit que aquesta proteïna podria estar implicada en la mobilització de D-serina en el cervell (Fukasawa *et al.* 2000; Wolosker *et al.* 2002), la qual s'ha proposat que és un modulador endogen dels receptors de glutamat de tipus NMDA (N-metil-D-aspartat) (Hashimoto and Oka 1997; Mothet *et al.* 2000). Per tant, el transportador asc-1 és candidat a ser responsable de la regulació de les concentracions extracel·lulars de D-serina. Seria necessari determinar la localització cel·lular d'asc-1 en el cervell. Això permetria estudiar el paper d'asc-1 en les alteracions descrites del contingut de D-serina en cervell associades a envelliment i malalties com l'Alzheimer (Kumashiro *et al.* 1995; Hashimoto and Oka 1997; Iwama *et al.* 1997) (Marta Pineda, tesi doctoral).

17.4.2 SLC7A8 (LAT-2)

D'entre els diversos factors genètics que poden determinar el risc de nefrolitiasi, es podria plantejar que una altra LSHAT, LAT-2, implicada en el flux transepitelial de cistina, podria ser un candidat funcional per la cistinúria (veure l'apartat 14.2) o podria ser un modulador de litiasi. LAT-2, està codificat pel gen *SLC7A8*, situat al cromosoma 14q11.2.

En humans i rosegadors LAT-2 presenta una expressió abundant en ronyó, intestí i placenta, encara que també s'ha detectat en cervell, fetge, melsa, cor, múscul esquelètic, ovari i testicle (Pineda *et al.* 1999; Rossier *et al.* 1999; Segawa *et al.* 1999; Rajan *et al.* 2000b). Així, LAT-2 es localitza preferentment en epitelis (re)absortius.

L'expressió de LAT-2 s'ha detectat a la membrana basolateral de les cèl·lules epitelials d'intestí i del túbul proximal de ronyó, en gradació decreixent des del segment S1 a S3 (Pineda *et al.* 1999; Rossier *et al.* 1999; Bauch and Verrey 2002). Aquestes cèl·lules són les responsables de la reabsorció de la major part del filtrat glomerular i de l'absorció de nutrients. Això suggereix que LAT-2 pot tenir un paper important en (re)absorció d'aminoàcids neutres. Al ronyó, la localització de LAT-2 coincideix amb la descrita per 4F2hc (Quackenbush *et al.* 1986; Rossier *et al.* 1999).

4F2hc/LAT-2 participa al pas transepitelial (apical a basolateral) de cistina (Fernández *et al.* 2003), però desconeixem la seva funció a múscul esquelètic i cor, on té una notable expressió (Pineda *et al.* 1999). El transportador 4F2hc/LAT-2 mitjança l'intercanvi d'aminoàcids neutres de qualsevol mida a través de la membrana. La reducció parcial de l'expressió de LAT-2 a les cèl·lules OK ha mostrat que LAT-2 facilita la sortida neta de cisteïna i l'entrada neta d'alanina, serina i treonina (Fernández *et al.* 2003). Per això, aquest transportador podria estar implicat en el fenotip cistinúric, ja que un defecte en aquest transportador provoca un augment de la cisteïna intracel·lular que podria inhibir l'entrada de cistina per la membrana apical i produir l'acumulació de cistina al túbul. Tot i així els resultats obtinguts en cèl·lules OK podrien deures a la particular concentració d'aminoàcids en l'interior d'aquest tipus cel·lular, que es deriva del seu metabolisme i dotació de transportadors d'aminoàcids. És per això que no podem predir el seu paper fisiològic en cap altre tipus cel·lular. El model *knockout* de LAT-2 que s'ha començat a generar en aquesta tesi pot donar informació sobre el seu paper fisiològic.

17.4.2.1 Polimorfismes a *SLC7A8* (LAT-2)

La implicació de LAT-2 al flux transepitelial net de cistina suggereix un paper en la modulació de la reabsorció d'aquest aminoàcid. Mutacions a aquest gen podrien alterar la reabsorció de cistina i produir una acumulació d'aquest aminoàcid al lumen tubular. Aquest mecanisme seria similar al provocat per una disfunció en l'activitat de transport basolateral y^+L en la lisinúria amb intolerància proteica (LPI) (apartat 4.1 de la Introducció). En la base de dades de pacients cistinúrics de l'ICC, aproximadament un 13% dels al·lels de pacients cistinúrics no estan explicats per mutacions als gens *SLC7A9* ($b^{0,+}AT$) i *SLC3A1* (rBAT). Aquest percentatge és baix per ser explicat per un tercer gen encara que no es pot descartar l'existència d'aquest. En aquests pacients, l'anàlisi per SSCP de la regió codificant de LAT-2 no ha evidenciat cap mutació, només s'ha trobat una variant, de les nou identificades en aquest gen, la IVS8+8C>A, que es troba significativament més representada en pacients que en controls. La vuitena base dels introns no pertany a la seqüència donadora consens, és a dir que en principi no afecta el *splicing*. Podria ser que aquest canvi estigui associat a un canvi intrònic o de promotor que sí que afecti la proteïna. De totes maneres s'haurien de realitzar estudis de mRNA (RT-PCR i activitat de transcripció) per comprovar-ho. Aquests resultats fan pensar que LAT-2 no és un gen de cistinúria. És possible que mutacions a LAT-2 siguin deletèries a causa de la seva expressió a intestí, placenta, fetge, cervell i múscul esquelètic (Pineda

DISCUSSIÓ GENERAL

et al. 1999). Encara que no es pot descartar la possibilitat que algunes variants o alguna combinació de variants de *SLC7A8* (LAT-2) (que afectessin, per exemple, a la K_m intracel·lular de cisteïna o un altre aminoàcid) podrien ser en part, responsables de la variabilitat individual que hi ha en la reabsorció de cistina tant en la població control com en pacients cistinúrics de tipus I i no I, i per tant podria jugar un paper modulador en el fenotip cistinúric.

A més, el fet que no existeixi una correlació entre els nivells d'excreció de cistina i la formació de càlculs, fa pensar que altres gens que no tenen res a veure amb la reabsorció de cistina estiguin implicats en aquest fenomen, com per exemple canals iònics o modificadors de l'agregació de microcristalls.

17.4.2.2 Paper fisiològic de LAT-2

Es desconeix el paper fisiològic de LAT-2 en teixits com cervell, pulmó o múscul esquelètic, com també es desconeix la distribució de la seva expressió en aquests teixits. L'expressió en múscul esquelètic podria estar relacionada amb la sortida d'alanina i glutamina en condicions de caquèxia o dejuni, ja que aquests aminoàcids són utilitzats en aquestes condicions com a substrats gluconeogènics (Felig 1975). Per conèixer les funcions fisiològiques de LAT-2 i la possible implicació d'aquest en el fenotip cistinúric estem generant un ratolí *knockout* per a LAT-2 que esperem que ens ajudi a resoldre quina és la funció d'aquesta proteïna en la reabsorció de cistina i altres aminoàcids al túbul proximal renal i en altres teixits.

17.4.2.3 Ratolí *knockout* per LAT-2

En aquesta tesi es presenta s'ha començat a generar un ratolí *knockout* per a LAT-2, però les quimeres no transmeten les cèl·lules modificades 129P2 a la línia germinal. El percentatge de quimerisme obtingut fou baix, teníem almenys 6 quimeres (encara que 2 d'elles femelles) amb un 20% o més de quimerisme, 2 de les quals rondant el 50%. Se sol utilitzar el criteri del ~50% per decidir si una quimera pot transmetre o no per línia germinal el genotip de les cèl·lules ES, encara que hi ha molts casos descrits en la literatura de quimeres mascles que transmeten amb un percentatge de quimerisme <50%. Totes les quimeres (8 del clon 39 i 2 del clon 167) eren fèrtils, però només es van obtenir 456 cries de ratolí salvatges dels creuaments.

La manca de transmissió de les quimereses, pot ser degut les variacions en les condicions de cultiu de les cèl·lules ES entre els dos centres on s'ha realitzat la transfecció de la construcció i selecció dels clons (GenOway) i la transferència de cèl·lules ES recombinants a blastòcits (CNB). Per això, repetirem els experiments de transfecció, selecció i transferència a blastòcits de les cèl·lules ES fins a obtenir heterozigots en un mateix centre, GenOway. En aquest ratolí podrem analitzar tant el fenotip renal i intestinal com el de teixit muscular. Si el ratolí *knockout null* de LAT-2 no és viable (el transportador s'expressa a placenta) es generarà el condicionat amb expressió específica de múscul esquelètic i de ronyó. Per a això gaudim de la col·laboració externa del Dr. Lluís Montoliu (CNB/CSIC, Madrid).

L'obtenció del ratolí KO *null* o el KO específic de ronyó per a LAT-2, junt amb el KO *null* de $b^{0,+}AT$ (amb fenotip cistinúric i per tant hiperexcretor de cistina i aminoàcids bàsics) ja disponible (veure Introducció) i l'heterozigot KO *null* de $\gamma^{+}LAT-1$ (generat per A. Ballabio i M.P. Sperandeo, Nàpols) ens permetrà estudiar la interacció dels tres transportadors coneguts que mitjancen la reabsorció renal de cistina i aminoàcids bàsics (Chillarón et al. 2001; Fernández et al. 2003). Així, podem realitzar creuaments entre aquests ratolins i veure l'impacte sobre la reabsorció de cistina, aminoàcids bàsics i neutres amb diferents dosis gèniques d'aquests transportadors: si la reducció parcial (heterozigot) o total (homozigot) de l'activitat LAT-2 (i/o parcial de $\gamma^{+}LAT-1$) amplifica l'hiperexcreció de cistina dels ratolins cistinúrics (KO de $b^{0,+}AT$) i/o normals podrem examinar en un projecte futur l'impacte d'una expressió variable de LAT-2 i/o $\gamma^{+}LAT-1$ (p.e., associada a SNPs de LAT-2 i/o $\gamma^{+}LAT-1$) en cistinúria i en la reabsorció renal d'aminoàcids en població humana sana.

En el KO *null* o en el KO específic de múscul esquelètic esperem identificar el paper fisiològic de LAT-2 a múscul. És important esmentar que glicina, glutamina i alanina són substrats de LAT-2, i per tant aquest transportador podria mitjançar l'eflux d'aquests aminoàcids en condicions fisiopatològiques que estimulen la proteòlisi muscular: dejuni, diabetis o caquèxia.

17.4.3 Altres possibles subunitats lleugeres de rBAT

Com s'ha comentat a la Introducció, rBAT i $b^{0,+}AT$ formen al túbul proximal del ronyó l'heterodímer

responsable de l'activitat de transport $b^{0,+}$, que és defectiu en cistinúria, i que probablement representa el sistema de reabsorció renal apical majoritari (sinó únic) de cistina (Fernández *et al.* 2002). L'expressió de les proteïnes rBAT i $b^{0,+}$ AT al túbul proximal de ronyó presenta una gradació inversa: $b^{0,+}$ AT presenta màxima expressió a S1 i va disminuint fins a S3 (Chairoungdua *et al.* 1999; Pfeiffer *et al.* 1999a; Mizoguchi *et al.* 2001), mentre que rBAT augmenta la seva presència de S1 a S3 (Kanai *et al.* 1992; Furriols *et al.* 1993; Chairoungdua *et al.* 1999; Pfeiffer *et al.* 1999a). Això feia pensar que potser aquestes proteïnes no heterodimeritzaven en teixits nadius (Chairoungdua *et al.* 1999; Verrey *et al.* 2000; Chillarón *et al.* 2001). Recentment, estudis de coimmunoprecipitació en membranes apicals de túbul proximal de ronyó humà i de ratolí realitzats al nostre grup han demostrat que tota la proteïna $b^{0,+}$ AT immunoprecipita amb rBAT quan s'usen anticossos anti-rBAT. Per contra, en ronyó de ratolí mascle només part de rBAT immunoprecipita amb $b^{0,+}$ AT quan s'usen anticossos anti- $b^{0,+}$ AT. La proteïna rBAT que queda al sobrenadant té una mobilitat electroforètica en condicions no reductores d'un heterodímer HAT (Fernández *et al.* 2002). Això indica que, al túbul proximal renal, $b^{0,+}$ AT només forma complexos amb rBAT, mentre que rBAT en forma amb $b^{0,+}$ AT i amb una altra proteïna (rBAT/X), possiblement de la família LSHAT. L'expressió del complex $b^{0,+}$ AT-rBAT deu seguir el gradient de la de $b^{0,+}$ AT, és a dir, màxima al segment S1 i disminuint fins el segment S3. L'altra proteïna que heteromeritza amb rBAT no era cap de les LSHAT descrites, ja que només $b^{0,+}$ AT i asc-2 semblen expressar-se, com rBAT, a membranes apicals renals, i a més asc-2 es localitza al túbul col·lector. L'heterodimerització de rBAT amb X es dona en ronyó de ratolins mascles, però no en femelles (E. Fernández i J. Chillarón, comunicació personal). Aquests resultats estan d'acord amb els obtinguts a partir del model de ratolí *knockout* per $b^{0,+}$ AT generat per la Dra. Lúdia Feliubadaló del nostre grup (veure Introducció): en absència de $b^{0,+}$ AT l'expressió de rBAT descendeix a ~50% però es troba en forma d'heterodímer (mobilitat en SDS-PAGE de ~130 kDa) només en ratolins *knockout* mascles (Feliubadaló *et al.* 2003).

No es coneix quina funció pot tenir aquesta proteïna associada a rBAT en els mascles, ni si aquesta associació de rBAT amb una subunitat desconeguda té alguna cosa a veure en les diferències entre gènere que s'observen en la simptomatologia de la cistinúria.

Aquest nou HAT no deu transportar cistina, donat que si ho fes, els cistinúrics de tipus B haurien de presentar una excreció de cistina inferior a la dels cistinúrics tipus A, i les dades de pacients ho descarten (article 5)(Frimpter *et al.* 1962; Crawhall *et al.* 1967) (figura 37).

Com s'ha presentat en la Introducció d'aquesta memòria, estudis recents realitzats pels Drs. J. Chillarón i E. Fernández han identificat en la genoma de ratolí una nova subunitat lleugera de la família LSHAT, que han anomenat arpAT (*Aromatic preferring- amino acid transporter*). arpAT presenta una identitat de seqüència de 32-43 % amb la resta de LSHAT conegudes que heterodimeritzen amb rBAT o 4F2hc. La seva caracterització ha mostrat que al cotransfectar-lo amb rBAT en cèl·lules s'obtenen heterodímers arpAT/rBAT i indueix transport d'aminoàcids neutres (preferentment aminoàcids aromàtics) independent de sodi, transestimulable, estereoselectiu i de baixa afinitat (E. Fernández, J. Chillarón i M. Palacín, manuscrit en preparació). Cap de les LSHAT identificades no presenta aquesta especificitat de substrat (E. Fernández i J. Chillarón i M. Palacín, manuscrit en preparació). Per tant, podria representar una variant del sistema de transport d'aminoàcids T (veure Introducció), ja que es va clonar per RT-PCR a partir de ronyó de ratolí (E. Fernández, Tesi Doctoral). Aquesta activitat de transport s'indueix tant quan arpAT s'expressa sol com amb 4F2hc o rBAT en cèl·lules HeLa, i s'ha demostrat heterodimerització de rBAT/arpAT en aquest sistema d'expressió. Seria possible que arpAT s'unís a 4F2hc, rBAT o una altra subunitat pesada no clonada fins al moment en els diferents teixits on s'expressa, que són cervell, intestí prim, ronyó, fetge i cor. L'ortòleg humà d'arpAT està silenciada en el genoma humà (E. Fernández i J. Chillarón i M. Palacín, manuscrit en preparació)(H.G.S.C. 2004)

És atractiu pensar que la proteïna arpAT pogués ser la subunitat X de rBAT a ratolí. Experiments de *Northern blot* presenten senyal d'arpAT a ronyó, intestí prim, cervell, fetge i cor però en augmentar l'astringència de rentat, només apareix expressió a cervell i intestí prim, perdent el senyal a ronyó (E. Fernández, tesi doctoral). Experiments d'hibridació *in situ* semblen confirmar que arpAT no s'expressa a ronyó (E. Fernández i J. Chillarón i M. Palacín, manuscrit en preparació). En aquest cas, es podria descartar la possibilitat que arpAT fos la subunitat X.

La recerca per BLAST de noves subunitats lleugeres de la família HAT en la genoma humana i de ratolí no revela l'existència de membres addicionals per a aquesta família (Juny 2004), encara que podrien existir nous membres que presentessin baixa homologia a les subunitats identificades fins al moment. En vertebrats s'han descrit 34 seqüències de LSHAT corresponents a 10 membres paràlegs. La identitat de seqüència d'aminoàcids oscil·la entre el 21-70% per als diferents paràlegs a mamífers i del 69-98% per als diferents ortòlegs a vertebrats. També han estat descrites LSHAT a invertebrats: SPRM-1 de *Schistosoma*

DISCUSSIÓ GENERAL

mansoni (Mastroberardino *et al.* 1998), la permeasa de metionina MUP1 i la hipotètica MUP3 de llevat (Isnard *et al.* 1996) i diverses seqüències de *Caenorhabditis elegans* (Veljkovic *et al.* 2004) i *Drosophila melanogaster* (Jack *et al.* 2000). Tots aquests membres conserven seqüències "signatura" específiques i, excepte les seqüències de llevat i algunes de *C. elegans*, conserven el residu de cisteïna conservat al segon llaç extracel·lular putatiu, responsable de la formació del pont disulfur amb la subunitat pesada (revisat a Chillarón *et al.* 2001). En la figura 39 es representa l'arbre filogenètic de les subunitats lleugeres identificades fins al moment, mostrant les proteïnes humanes, de rata i de ratolí conegudes de cadascun dels membres de vertebrats i SPRM-1.

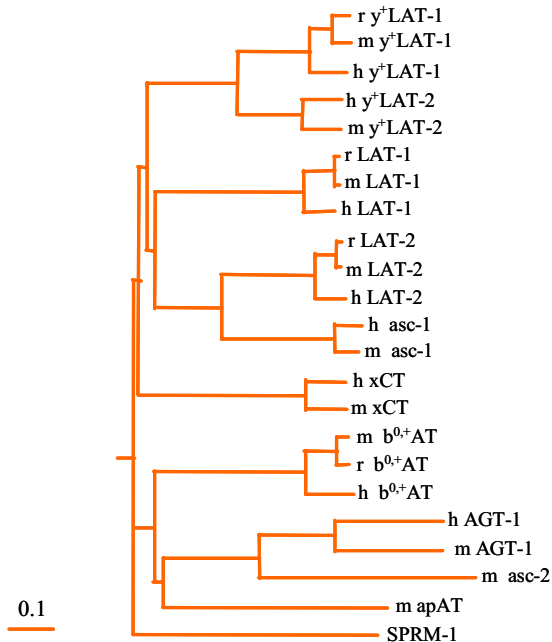


Figura 39. Arbre filogenètic dels membres de la família LSHAT. L'arbre filogenètic ha estat realitzat a partir de les seqüències humanes (h), de rata (r) i de ratolí (m) dels membres de la família LSHAT i SPRM-1 de *Schistosoma mansoni*. En humans, asc-2 està deletionat i arpAT inactivat (H.G.S.C. 2004)(E. Fernández i J. Chillarón i M. Palacín, manuscrit en preparació)

18 FISIOPATOLOGIA DE LA CISTINÚRIA

El coneixement de la base molecular d'una malaltia hereditària no garanteix el coneixement del mecanisme fisiopatològic de la malaltia. Existeixen factors genètics i/o ambientals que afecten el procés de litiasi, és a dir, la hiperexcreció de cistina és condició necessària però no suficient per produir càlculs de cistina (article 4). Per resoldre aquestes qüestions el nostre grup ha generat un model murí de cistinúria (*knockout null* de b⁰⁺AT)(Feliubadaló *et al.* 2003)(veure apartat 5.6.2.1).

18.1 FACTORS MODULADORS DEL FENOTIP LITIÀSIC EN CISTINÚRIA

La cistinúria és una malaltia més complexa del que es pensava fins ara, i resulta de la interacció de diferents factors ambientals i/o genètics. Coneixem els principals, o únics, gens responsables de cistinúria, però encara queda per aclarir quins altres factors ambientals i/o genètics contribueixen al fenotip litiàsic. Aquests factors moduladors tant podrien ser responsables de cistinúria en aquelles famílies en les que no s'ha identificat cap mutació a *SLC7A9* ni a *SLC3A1* com podrien determinar la variabilitat fenotípica dels portadors d'una mateixa mutació.

De fet, en el nostre grup de pacients de l'ICC no vem poder establir una correlació genotip/fenotip litiàsic (article 4). L'hiperexcreció de cistina causada per mutacions a *SLC3A1* o a *SLC7A9* és condició necessària per a la precipitació d'aquest aminoàcid i la formació de càlculs de cistina en el sistema urinari. Tot i així, no tots els cistinúrics presenten càlculs a la mateixa edat, i alguns d'ells no arriben a desenvolupar càlculs

al llarg de la seva vida. Així l'1% de la cohort de pacients homozigots amb mutacions *SLC3A1* o *SLC7A9* estudiats en l'ICC, no produeixen càlculs, i el desenvolupament de litiasi és variable, el debut de la litiasi ocorre entre els 11-20 anys de vida en el 35-40% dels pacients, però una significativa proporció dels pacients debuten entre els tres primers mesos de vida, 15% en nenes i 30% en nens (article 4).

Mentre que les mutacions als gens de cistinúria influeixen directament a l'excreció de cistina i aminoàcids bàsics, l'activitat litiàsica dels cistinúrics no sembla tenir una relació directa amb mutacions a *SLC3A1* o *SLC7A9*, encara que hi ha estudis que suggereixen que les famílies amb una mutació en *SLC3A1* que produeix una proteïna truncada presenten major nombre de càlculs (Dello Strologo *et al.* 1997). De totes maneres, la severitat de la malaltia entre membres de la mateixa família amb la mateixa mutació puntual varia considerablement, degut a altres factors determinants de la litiasi (article 4). No són rars els casos de germans amb les mateixes mutacions que presenten fenotips litiàsics completament diferents (Dello Strologo i Rousaud, resultats no publicats). S'han descrit nombrosos factors que poden incidir en la litiasi de cistina, com els nivells de Na⁺, l'acidesa de l'orina, el volum filtrat, proteïnes activadores o inhibidores de la litiasi, etc. (veure apartat següent). Les variacions d'aquests factors en la població es deuen en part a l'ambient, però també, en major o menor mesura, al fons genètic de cada individu.

- **Factors ambientals moduladors de la litiasi de cistina**

Com s'ha comentat, l'etiopatogenia de la malaltia litiàsica en general és multifactorial. Participen factors tan diferents com: i) factors anatòmics: alteracions anatòmiques congènites o adquirides (cirurgies, etc.), que promouen un estasi urinari local; ii) malalties diverses: com colitis ulcerosa, sarcoïdosi, hiperparatiroidisme primari, etc... que generen secundàriament una disfunció metabòlica que promou la cristal·lització urinària; iii) hàbits dietètics i d'hidratació: una ingesta pobra en líquids o certs mals hàbits dietètics (excés de sal, proteïnes d'origen animal, oxalat, dèficit de magnesi..) poden promoure en el primer cas un volum urinari baix (factor promotor), o excés o defecte de certes substàncies que faciliten la agregació de soluts; iv) estrès: promou la cristal·lització urinària de soluts; v) alteracions metabòliques: es coneix la presència de diverses substàncies presents a l'orina normal, que si estan en excés o defecte poden promoure l'agregació heterogènia i la formació de càlculs; vi) causes genètiques: com la cistinúria, la litiasi de 2,8 dihidroxiadenina, etc; vii) altres causes: taxa de sudoració del pacient, hàbit sedentari, etc. (Mandel 1996; Rousaud and Barceló 1996; Borghi *et al.* 1999; Pak 1999)

Per saber quins factors ambientals modulen el fenotip litiàsic es pot utilitzar el model KO de *slc7a9* (Feliubadaló *et al.* 2003) sotmetent-lo a cada una de les alteracions ambientals acabades d'esmentar i analitzant la seva influència en el fenotip.

- **Factors genètics moduladors de litiasi de cistina**

En aquesta tesi s'han cercat mutacions a la ORF de dos possibles gens moduladors de cistinúria, que pertanyen a la família LSHAT: *SLC7A8* (LAT-2) i *SLC7A10* (asc-1). Experiments d'inactivació parcial de LAT-2 en cèl·lules OK de túbul proximal de sariga han demostrat un paper de LAT-2 en el flux transepitelial de cistina (Fernández *et al.* 2003). Aquesta implicació suggereix que LAT-2 podria actuar com a modulador del transport transepitelial de cistina, i variants en el seu gen, *SLC7A8*, podrien modular el fenotip cistinúric, però caldria realitzar estudis de RNA i d'associació al fenotip cistinúric com ja s'ha discutit en l'apartat 17.4.2.

Les dades del KO *Stones* (*knockout* de *Slc7a9*) fan pensar que els moduladors genètics de litiasi tenen un efecte més important que els ambientals: a partir del mes i mig de vida, aproximadament el 40% dels ratolins homozigots presenten càlculs a la bufeta urinària, i alguns d'ells, també als ronyons. Però altres ratolins no arriben a presentar càlculs, ni tan sols després de dotze mesos de vida (Feliubadaló *et al.* 2003). Aquesta diferència tan notable no es deu a factors ambientals, ja que tots ells es troben establats en les mateixes condicions. La causa més probable de la variació en el fenotip litiàsic és, per tant, genètica. Per cercar de moduladors genètics de litiasi, probablement l'abordatge més convenient passa per la genètica clàssica de mapatge genètic en el model de ratolí *Stones*. Així, es podria aïllar algun/s gen/s majoritari/s implicat/s en la litiasi, si és que hi ha gens majoritaris. Per aquesta aproximació cal un esquema de creuaments organitzat, partint de ratolins *knockout* amb un fons genètic pur. El nostre grup ha establert una línia congènica cistinúrica a C57/BL6. A base de retrocreuaments, s'ha assolit la generació N₁₀ (99,8% d'homozigosi). Les soques congèniques són isogèniques (iguals genèticament) a les soques pures excepte en un segment cromosòmic diferencial seleccionat. Aquesta és la manera més eficient de traslladar una mutació d'un fons genètic mixt a un fons genètic pur. S'estan generant els homozigots, que són els individus d'estudi en fenotips recessius per estudiar el seu percentatge de litiasi. S'espera que el percentatge de litiasi variarà respecte a l'actual, on el 50% del fons genètic és C57BL/6 i l'altre 50% és 129OlaHsd, demostrant l'existència de gens moduladors de la litiasi.

DISCUSSIÓ GENERAL

Els factors de litiasi oxalo-càlcica, la més freqüent de les litiasis renals revisat a (Worcester 1996), podrien tenir algun paper en la litiasi de cistina. Les concentracions urinàries d'oxalat i calci a les persones normals sovint superen el producte de solubilitat. Així i tot, la major part de la població no desenvolupa càlculs d'oxalat de calci. La raó és la presència a l'orina de diversos inhibidors de la formació de càlculs. Aquests inhibidors poden actuar en qualsevol dels processos implicats en la formació de càlculs: nucleació, adhesió dels cristalls a les cèl·lules, agregació i creixement. Hi ha dues classes d'inhibidors: petites molècules com el citrat i el pirofosfat, i macromolècules, com les glicoproteïnes i els glicosaminoglicans. Sembla que les macromolècules tenen la principal activitat inhibidora. Les principals proteïnes que s'han associat a la litiasi són la nefrocalcina, la proteïna Tamm-Horsfall, la uropontina, proteïnes de la matriu del cristall, com el pèptid F1 de la protrombina, proteïnes riques en àcid urònic, com la bikunina, etc. L'estudi d'aquests processos és tan complex, que no s'ha pogut determinar exactament en quines etapes intervenen cadascuna, i en alguns casos, ni tan sols està clar si actuen com a inhibidores o com a potenciadores de la litiasi. Sembla que la majoria actua unint-se al cristall o càlcul, impedint que creixi, s'agregui o s'uneixi a cèl·lules. Algunes d'aquestes proteïnes també podrien modular la litiasi de cistina. Actualment existeix un ratolí KO per l'osteopontina. Un sol gen (*OPN*) codifica per l'uropontina, expressada al ronyó i l'osteopontina, expressada als ossos, que es distingeixen per les seves modificacions postraduccional. Un grup americà ha creuat el KO de l'osteopontina amb el de l'adenina fosforibosiltransferasa, que desenvolupa nefrolitiasi de 2,8-dihidroxiadenina (Tzortzaki *et al.* 2003) D'altra banda, s'ha provat la seva actuació *in vivo* sobre l'oxalat càlcic, induint-ne càlculs mitjançant l'administració d'etilenglicol en ratolins *Opn^{-/-}* i *Opn^{+/+}* (Wesson *et al.* 2003). Els primers presentaven dipòsits intratubulars d'oxalat càlcic, mentre que els segons no resultaren afectats. Seria interessant creuar el model *Stones* amb el KO de l'osteopontina o els d'altres candidats que es poguessin generar. També es podria estudiar l'expressió d'aquestes proteïnes en els ratolins litíasics i no litíasics del model *Stones*, o utilitzar els seus *loci* com a candidats en un estudi de lligament. Abans d'aquestes aproximacions, potser seria convenient realitzar algun assaig d'inhibició de la litiasi *in vitro* amb la cistina i aquests candidats. Així com les proteïnes implicades en la litiasi d'oxalat càlcic són candidates a participar en la de cistina, proteïnes moduladores de la litiasi de cistina aïllades per mitjans genètics amb el nostre KO *Stones*, poden esdevenir candidates a modular la d'oxalat càlcic, de gran rellevància per la seva elevada prevalença a la població humana.

19 PAPER DE LES MUTACIONS DE CISTINÚRIA EN ELS ESTUDIS D'ESTRUCTURA-FUNCIÓ DEL SISTEMA B^{0,+}AT

El fet que mutacions a qualsevol dels gens que codifiquen per rBAT i per b^{0,+}AT causin hiperexcreció d'aminoàcids bàsics i cistina, un fenotip atribuïble al descens o abolició del sistema b^{0,+} (Palacín *et al.* 2000), recolzen la participació d'aquestes dues proteïnes a l'esmentat sistema de transport. La identificació de mutacions *missense* als dos gens de cistinúria (59 mutacions a rBAT i 31 a b^{0,+}AT) ha permès també avançar en el coneixement de les relacions estructura-funció d'aquest transportador.

19.1 MUTACIONS A rBAT

Totes la mutacions de cistinúria de canvi de sentit a rBAT (58 mutacions), excepte una, la L89P, es localitzen al domini extracel·lular de rBAT (Chillarón *et al.* 2001) (i article 5). Malgrat l'homologia del domini extracel·lular de les HSHAT amb les α -glucosidases bacterianes el nostre grup no ha pogut demostrar activitat glucosidasa amb el domini extracel·lular de 4F2hc purificat, utilitzant un substrat "universal" de glucosidases (MUG; 4-Metilumbeliferil- α -D-glucopiranosid). De fet l'expressió de rBAT en oòcits de *Xenopus* tampoc no resulta en la inducció d'activitat glucosidasa (Wells and Hediger 1992). Tant si els dominis extracel·lulars de 4F2hc i rBAT conserven la capacitat d'unir glúcids o d'hidrolitzar-los, aquestes activitats poden estar modificades per mutacions de cistinúria en el domini extracel·lular de rBAT. Nou d'aquestes mutacions es troben pròximes (en seqüència primària) a les posicions dels residus catalítics o facilitadors de les glucosidases (al final de les làmines β 3, β 5 i β 7 del *TIM-barrell* o domini A) (Chillarón *et al.* 2001) (p.T216M, p.S217R, p.T341A, p.L346P, p.H348P, p.P441R, p.I445T, p.R452Q i p.R452W) (figura 5, Introducció). Per estudiar l'impacte d'aquestes mutacions caldrà analitzar primer *in silico* sobre l'estructura del domini extracel·lular de rBAT i posteriorment les mutacions més

rellevants. Si el domini extracel·lular de les HSHAT uneix glúcids és probable que *in vivo* aquestes proteïnes s'ancorin a residus glucídics presents als epiteli en raspall (cas de rBAT) o a la làmina basal de cèl·lules (cas de 4F2hc). En aquest sentit, caldria identificar el lligant natural de les HSHAT si existeix.

rBAT presenta N-glicosilació, la qual podria afectar el tràfic la membrana plasmàtica de l'holotransportador. La mutació p.T216M, que és la segona mutació més freqüent de tipus A (6,4% dels al·lels A de l'ICC) (taula 10), afecta un dels llocs de N-glicosilació de rBAT.

L'anàlisi funcional de la mutació de *SLC3A1* més comuna, p.M467T, mostra un lleu defecte de tràfic que fa que l'arribada a la membrana sigui ineficaç. L'estudi de la p.M467K, mostra un greu defecte de tràfic i/o associació a la subunitat lleugera (ambdós estudiats en oòcits de *Xenopus* per Chillarón et al., 1997). Les HSHAT no són necessàries per a la funció de transport de les subunitats lleugeres (LSHAT), com s'ha demostrat amb la reconstitució de $b^{0,+}$ AT (Reig et al. 2002), encara algunes mutacions de *SLC3A1* també poden afectar el comportament cinètic de l'holotransportador $b^{0,+}$: la mutació específica de cistinúria p.R365W, que produeix un defecte de tràfic sensible a temperatura en cèl·lules HeLa però no en oòcits (aquests es mantenen 18°C), mostra un defecte de l'eflux d'arginina però no de l'influx (Pineda et al. 2004b). Això suggereix dos vies de transport per a la subunitat lleugera $b^{0,+}$ AT, un per a l'entrada de substrats (influx) i altre per la sortida (eflux). També s'han estudiat dos mutants de rBAT, p.C571S, p.C666S, que aboleixen gairebé totalment l'activitat de transport induïda per rBAT (Marta Pineda, tesi doctoral). Aquests dos residus es localitzen en l'extrem C-terminal de la proteïna, i un d'ells s'ha trobat mutat en un malalt de cistinúria (mutació p.C666W, article 5).

19.2 PAPER DE LES MUTACIONS DE $b^{0,+}$ AT EN ELS ESTUDIS ESTRUCTURA-FUNCIÓ DE LES LSHAT

Fins ara dos tipus d'estudis han assenyalat residus rellevants per a la funció dels transportadors HAT. En primer lloc, l'anàlisi de mutacions de γ^+ LAT-1 i $b^{0,+}$ AT en malalts de LPI i cistinúria respectivament ha permès identificar diferents mutacions puntuals. Però mentre que per a LPI no s'ha pogut demostrar cap correlació genotip/fenotip (Mykkanen et al. 2000), en el cas de la cistinúria hem observat que les mutacions que afecten a residus de mida petita (glicina, alanina o serina) conservats en segments TM provoquen una pèrdua dràstica de la funció i s'associen amb nivells elevats d'hiperexcreció de cistina i aminoàcids bàsics en heterozigots (article 3). En segon lloc la mutagènesi dirigida i la "inactivació" de grups sulfidril també aporta informació molt valuosa sobre la estructura i funció de les LSHAT (Gasol et al. 2004; Jiménez-Vidal et al. 2004).

Com s'ha esmentat en la introducció, s'han identificat 30 mutacions diferents en el gen *SLC7A7* en 109 pacients de LPI analitzats fins avui (Palacín et al. 2004), i per algunes d'elles s'ha estudiat la funció de transport en el sistema d'expressió d'oòcits de *Xenopus*. Pel que fa a la proteïna $b^{0,+}$ AT, s'han descrit 66 mutacions diferents en pacients cistinúrics, 37 de les quals afecten a un sol aminoàcid (30 *missense*, 2 *nonsense*, 3 delecions i 2 insercions d'un aminoàcid) (Figura 40).

Si ens fixem en la localització de les mutacions trobades en la proteïna $b^{0,+}$ AT en pacients de cistinúria, podem observar que la majoria de mutacions puntuals afecten residus situats en els segments transmembrana o bé en zones intracel·lulars (figura 40). En el cas de la LPI, la localització de totes les mutacions puntuals trobades en la proteïna γ^+ LAT-1 afecten residus situats en els segments transmembrana o zones intracel·lulars de la proteïna. De manera similar, els residus més rellevats per l'activitat de transportadors com PotE, lactosa/H⁺ i tetraciclina/H⁺ també presenten aquesta localització (revisat a Chillarón et al., 2001). Només cinc mutacions trobades en pacients de cistinúria (amb una freqüència del 0,6% en la base de dades de l'ICC), es localitzen al primer (p.52L, p.V62M i p.G63R) i quart llaç extracel·lular (p.E282K i p.L283F) (figura 40). Per aquest motiu, es va realitzar la caracterització funcional de la mutació p.L283F de $b^{0,+}$ AT. Aquest presenta una disminució de la inducció de l'activitat de transport de cistina en cèl·lules HeLa transfectades amb rBAT salvatge, la qual no es recupera incubant les cèl·lules a 33°C (Maite Jiménez, tesi doctoral). Caldria comprovar si aquest mutant, malgrat ser inactiu, i no recuperar-se a 33°C, assoleix la membrana plasmàtica de manera similar a la proteïna salvatge, per comprovar que no es tracta d'un mutant de tràfic, i realitzar estudis cinètics per determinar si és un residu clau en la funció del transportador. Aquesta mutació està associada a fenotip no I en heterozigots. En canvi, al residu del costat, la p.E282K, trobada recentment, està associada a fenotip I, suggerint que es deu tractar d'una regió no gaire important per a la funció de transport.

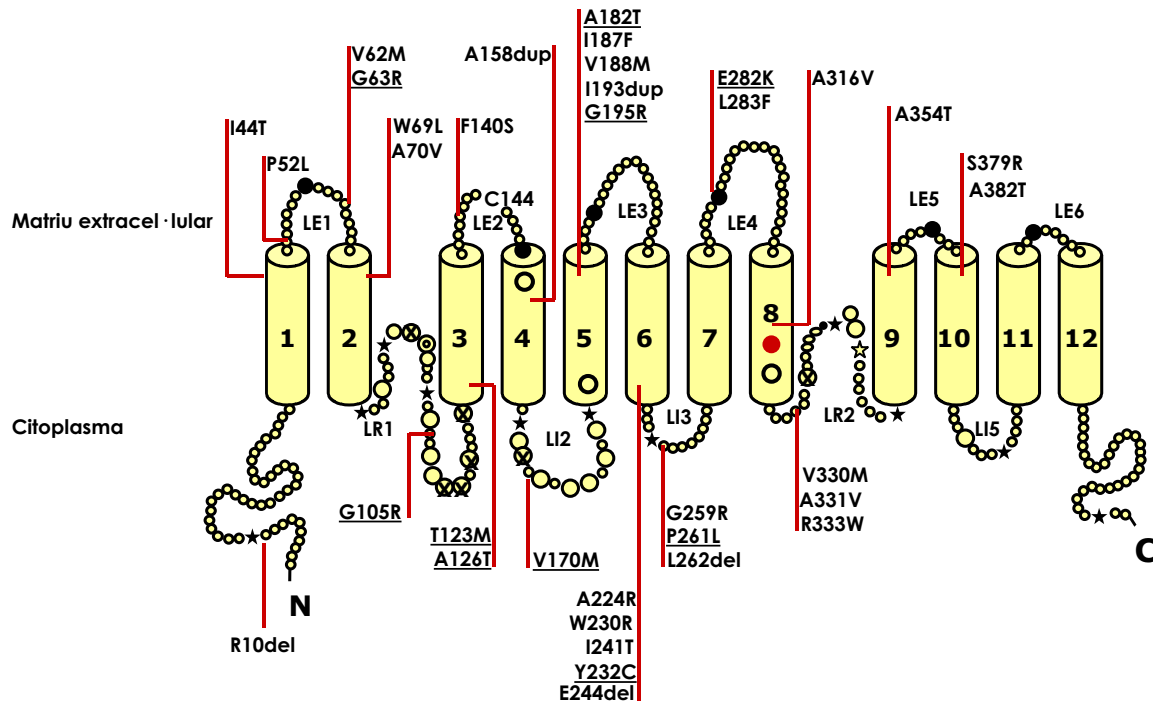


Figura 40. Representació de la topologia de 12 segments TM de $b^{0,+}AT$ amb les 35 mutacions de *SLC7A9* que afecten un sol aminoàcid. Els 12 dominis TM estan numerats. Es numeren els llaços extracel·lulars (LE) i els intracel·lulars (LI) i els llaços reentrants (LR1 i 2) detectats en estudis d'accessibilitat a reactius sulfidril (Gasol et al. 2004). Es senyalen els diferents residus estudiats en els estudis d'accessibilitat en les LSHAT (E. Gasol i M. Jiménez, tesis doctorals). S'indiquen 35 mutacions de cistinúria que afecten a un sol aminoàcid (31 trobades per l'ICC). Es mostren 30 *missense* i 5 delecions o insercions d'un aminoàcid. Les mutacions subratllades s'associen a un fenotip I en alguns heterozigots. La resta de mutacions tenen un fenotip no I, o indeterminat. El residu C144 és la cisteïna 144 involucrada en el pont disulfur amb rBAT. N- i C- indiquen l'extrem NH_2 i el $COOH$ terminals, respectivament.

Com s'explica en l'article 3, les mutacions que afecten residus molt conservats en els altres membres de la família LSHAT, s'associen a fenotips més severos d'excreció urinària en els heterozigots portadors, permetent fer una correlació genotip-fenotip en el cas de la cistinúria de tipus no I. Algunes d'aquestes mutacions afecten residus petits molt conservats (Glicina, Alanina o Serina) situats en segments transmembrana, com és el cas de les mutacions p.A70V, p.A126T, p.G105R, p.G195R, p.G259R, p.A354T, p.S379R i p.A382T de la proteïna $b^{0,+}AT$ i la mutació G54V i p.S386R de la proteïna $y^{+}LAT-1$ (Mykkanen et al. 2000). Les mutacions p.A354T, p.G105R i p.A70V de $b^{0,+}AT$ i p.G54V de $y^{+}LAT-1$ han estat analitzades funcionalment i s'ha vist que p.G54V de $y^{+}LAT-1$ i p.A354T de $b^{0,+}AT$ provoquen una pèrdua total de funció, mentre que p.G105R i p.A70V de $b^{0,+}AT$ mantenen una activitat de transport del 10% i el 78% com ja s'ha comentat anteriorment. Les altres mutacions que afecten aquest tipus de residu provoquen, en general, un fenotip sever en els heterozigots cistinúrics de l'ICC (excepte la p.A126T). La importància dels residus de cadena lateral curta per les regions de contacte entre hèlix transmembrana va ser posada de manifest en estudis amb la proteïna aquaporina-1 (AQP-1) (Murata et al. 2000). Posteriorment s'ha determinat que el motiu GxxxG (on x representa qualsevol residu i Gly pot ser substituïda per Ser o Ala) associat a residus alifàtics (Ile, Val o Leu) en les posicions veïnes és un motiu estructural determinant d'associació entre hèlixs transmembrana (Russ and Engelman 2000; Senes et al. 2000). En les proteïnes de la família LSHAT s'han trobat motius d'aquest tipus en els segments transmembrana I, II, V, VI, VII, VIII i XII. Alguns residus petits conservats en els segments transmembrana dels diferents membres de la família LSHAT podrien participar en la interacció entre hèlix transmembrana (revisat a Chillarón, J. et al., 2001).

Cal comentar també que el llaç intracel·lular 4, entre el domini transmembrana VIII i IX, sembla formar part d'un *reentrant loop* (Emma Gasol, tesi doctoral), que són dominis associats a la via de pas del substrat (Grunewald et al. 2002) i és on es localitza la segona mutació de $b^{0,+}AT$ més freqüent en l'ICC, la p.R333W (12% dels al·lels B), la p.V330M i la p.A331V. Els pacients amb la mutació p.R333W els falta aquest domini ja que es produeixen els *skippings* E10 i E9-10. A pacients de LPI també s'han trobat la

p.L334R i la p.G338D a y^+ LAT-1, en aquest llaç. A més, la importància d'aquesta zona es veu incrementada pel fet que en el segment transmembrana VIII es troba el residu C327 a xCT (corresponent al residu C320 de y^+ LAT-1 i T313 a $b^{0,+}$ AT) que s'ha descrit com a residu proper o pertanyent al lloc d'unió i/o translocació de substrat de xCT (Jiménez-Vidal *et al.* 2004). Els estudis realitzats amb reactius sulfhidril recolzen la vinculació de la C327 amb la via de translocació de substrat de xCT, malgrat la seva localització enmig del segment TM VIII. La Cys327 és diana d'inactivació dels reactius impermeables pCMB i pCMBS, indicant que és accessible a l'entorn aquós. La inactivació és protegible per substrat extracel·lular amb una IC_{50} similar a la K_m . Aquesta protecció també es dona a 4°C, fet que suggereix que no es donen grans canvis conformacionals (Seal and Amara 1998; Chen and Rudnick 2000).

Hi ha un altre residu de xCT important per al cicle de transport, localitzat en el *reentrant loop* situat entre el TM II i el III, que és on es localitza la mutació més freqüent de cistinúria de tipus B, la p.G105R. El treball, desenvolupat per la doctora Emma Gasol en el nostre grup, mostra que l'histidina 110 (H110) també és propera al lloc d'unió o via de translocació de substrat de xCT. La substitució de G96 en la LSHAT $b^{0,+}$ AT, posició homòloga a H110 a xCT, per un residu més petit com la cisteïna (E96C), resulta en un transportador inactiu (Maite Jiménez, tesi doctoral).

L'anàlisi funcional de noves mutacions de $b^{0,+}$ AT o y^+ LAT-1 (o de qualsevol altre LSHAT) seria important per tal de determinar residus crucials per a la funció de transport i/o per a la interacció amb les HSHAT rBAT i 4F2hc.

19.3 CISTINÚRIA I OLIGOMERITZACIÓ DEL COMPLEX rBAT/ $b^{0,+}$ AT

L'estequiometria de les subunitats del transportador rBAT/ $b^{0,+}$ AT pot explicar el fenotip dominant negatiu que presenten la majoria dels portadors de mutacions a $b^{0,+}$ AT (SLC7A9) humans (el 88% dels al·lèls independents B mostren hiperexcreció renal de cistina i aminoàcids bàsics (article 4)) i la dupE5-E9 (el 4% dels al·lèls independents A en l'ICC).

Donat que la unitat bàsica de transport de rBAT/ $b^{0,+}$ AT sembla ser un heterodímer (α - β)₁ (Esperanza Fernández i Maite Jiménez, tesis doctorals), falta conèixer quina és la funció de l'heterotetramerització. Podria tenir altres funcions no relacionades directament amb l'activitat del transportador. En aquest sentit seria interessant estudiar quin paper juga l'estructura quaternària d'aquest transportador a la membrana apical del túbul proximal de ronyó. En un intent preliminar de correlacionar oligomerització i funció de rBAT/ $b^{0,+}$ AT, s'ha purificat el complex en presència i en absència de substrat per a anàlisi de BN-PAGE, però no s'han trobat diferències.

Tot i que s'ha estudiat l'oligomerització d'alguns transportadors, n'hi ha molt pocs dels que es coneix amb exactitud la relació entre l'oligomerització i la funció. S'han suggerit dues funcions principals per a l'oligomerització dels transportadors de membrana: i) canvis dinàmics en l'estat oligomèric modulen la funció i, ii) l'oligomerització podria controlar diferents aspectes de la biologia cel·lular del transportador, com el tràfic a membrana, la interacció amb el citoesquelet, etc.

Quan es cotrasfecten rBAT i $b^{0,+}$ AT en cèl·lules de mamífer, es troben tant a la membrana plasmàtica com en membranes intracel·lulars. Els resultats biofísics suggereixen que rBAT/ $b^{0,+}$ AT ja està oligomeritzat en aquestes localitzacions intracel·lulars. Per tant, l'oligomerització de rBAT/ $b^{0,+}$ AT podria tenir una funció en el seu tràfic, i podria explicar el fenotip dominant amb penetrança incompleta de la cistinúria de tipus no I. En el model de ratolí *knockout* de cistinúria de tipus no I (Stones), els ratolins heterozigots mostren hiperexcreció de cistina i aminoàcids dibàsics, indicant que una reducció del 50% en l'expressió de $b^{0,+}$ AT és suficient per explicar el fenotip parcialment dominant en aquests ratolins. L'acoblament covalent de rBAT amb $b^{0,+}$ AT en el reticle endoplasmàtic és un control de qualitat primerenc per a l'expressió de l'holotransportador; si l'heterotetramerització proporciona un pas nou de control per a la localització a la membrana cal estudiar-ho. En particular, els experiments haurien d'investigar el lloc intracel·lular on l'heterodímer (α - β)₁ s'acobla en estructures (α - β)₂, i l'impacte de mutants mixtos $b^{0,+}$ AT/rBAT i del mutant de rBAT dupE5-E9 en la formació d'heterotetràmers, el tràfic a la membrana plasmàtica, i la seva funcionalitat.

20 PAPER FISIOLÒGIC DELS HAT EN REABSORCIÓ

La majoria de la reabsorció renal d'aminoàcids ocorre al túbul proximal contornejat (segments de S1 i S2) (Silbernagl 1988), i l'absorció d'aminoàcids ocorre a l'intestí prim (Mariotti et al. 2000). La majoria dels transportadors identificats responsables d'aquestes funcions són els mateixos a ronyó i intestí, excepte els transportadors de pèptids protó-dependents: PepT1 i Pept2 s'expressen a intestí prim i a ronyó respectivament. El paper fisiològic de PepT2 a ronyó és desconegut, i la contribució exacta de PepT1 en l'assimilació d'aminoàcids en mamífers i específicament en la nutrició humana no ha estat avaluat encara (Daniel and Kottra 2004). Un estudi més profund del fenotip dels ratolins *knockout* de PepT2 (Rubio-Aliaga et al. 2003) i la generació i estudi del PepT1 podran resoldre aquestes qüestions.

La base molecular de la cistinúria i la LPI ens aporten dades sobre les bases moleculars de la reabsorció d'aminoàcids de dibàsic i cistina. Les mutacions del bescanviador apical $b^{0,+}$ (heterodímer rBAT- $b^{0,+}$ AT) produeixen hiperexcreció d'aminoàcids dibàsics i cistina en cistinúria a humans (Calonge et al. 1994; Feliubadaló et al. 1999b), ratolí (Feliubadaló et al. 2003; Peters et al. 2003) i gos (Henthorn et al. 2000). Les mutacions del bescanviador basolateral y^+L (heterodímer 4F2hc- y^+L AT1) produeixen hiperexcreció de d'aminoàcids dibàsics (Borsani et al. 1999; Torrents et al. 1999). També hi ha malabsorció intestinal d'aminoàcids dibàsics i cistina en la cistinúria i d'aminoàcids dibàsics en LPI (Simell 2001). Això explica que les activitats de transport seqüencials dels sistemes $b^{0,+}$ (apical) i y^+L (basolateral) juguen un paper essencial en (re)absorció renal i intestinal d'aminoàcids. No se sap gaire sobre altres transportadors amb un paper en (re)absorció d'aminoàcids dibàsic. Els pacients de cistinúria sembla que quasi no reabsorbeixen cistina a ronyó, mentre que mantenen un nivell de reabsorció dibàsica significatiu (revisat Fernández et al., 2002). Això suggereix que el sistema $b^{0,+}$ és el principal (si no l'únic) sistema apical de reabsorció per la cistina, però altres sistemes de transport apical a més a més del sistema $b^{0,+}$ contribueixen a la reabsorció renal d'aminoàcids dibàsics. L'estudi de les activitats de transport d'aminoàcid dibàsiques presents en els ratolins *knockout* de *Slc7a9* pot ajudar a identificar aquests transportadors. Experiments en pacients de LPI a Finlàndia (Rajantie et al. 1980a) suggereixen que el sistema y^+L és el sistema d'absorció d'aminoàcids dibàsics basolateral principal a l'intestí prim: una càrrega oral amb dipèptid lisil-glicina augmentava les concentracions de plasma de glicina, però la concentració de lisina en plasma roman gairebé inalterada en pacients amb LPI, mentre que els dos aminoàcids augmentaven en plasma de individus control o en pacients amb cistinúria. Això demostrava el defecte basolateral a LPI, i apuntava un paper per PepT1 en l'assimilació d'aminoàcids. En efecte, com a conseqüència dels defectes renals i intestinals en LPI, els nivells de plasma d'aminoàcids dibàsics són 1/2 a 1/3 o nivells normals (revisats a Simell, 2001), mentre que en cistinúria humana i de ratolí els nivells d'aminoàcid de cistina i dibàsics en plasma es troben només moderadament reduïts (20-30%) (revisat a Palacín et al., 2004). Tots aquests resultats suggereixen que el sistema y^+L té un impacte més alt que el sistema $b^{0,+}$ en reabsorció renal i intestinal d'aminoàcids dibàsics.

La base molecular de la reabsorció renal i intestinal d'aminoàcids zwitteriònics s'està començant a conèixer gràcies a la recent identificació de B^0AT1 (*SLC6A19*) com el gen que provoca la malaltia de Hartnup (Kleta et al. 2004; Seow et al. 2004). B^0AT1 correspon al sistema B^0 (també anomenat NBB, de *Neutral Brush Border*) i catalitza el transport Na^+ -dependent de la majoria dels aminoàcids neutres (Broer et al. 2004). Els pacients amb la malaltia de Hartnup presenten hiperexcreció i malabsorció d'aminoàcids neutres (revisats a Levy et al., 2001). És interessant el fet que aquests pacients també mostren un hiperexcreció moderada d'aminoàcids dibàsics i cistina, suggerint un lligam metabòlic amb el sistema $b^{0,+}$ (revisat a Seow et al., 2004) (figura 41): la Na^+/K^+ -ATPasa basolateral genera el gradient electroquímic de Na^+ , que és utilitzat pels Na^+ -contransportadors apicals (sistema B^0 ; p.e. B^0AT1) i basolateral (sistemes A i ASC) per generar una concentració d'intraepitelial alta d'aminoàcids zwitteriònics. La reducció de l'influx d'aminoàcids zwitteriònics quan B^0AT1 és defectuós (malaltia de Hartnup) sembla que redueix els substrats per a l'intercanvi amb aminoàcids dibàsics i cistina mitjançant el sistema $b^{0,+}$.

Els transportadors esmentats s'expressen molt en la membrana corresponent, apical o basolateral, de les cèl·lules epitelials dels túbuls contornejats proximals a ronyó i dels enteròcits de l'intestí prim (Furriols et al. 1993; Fernández et al. 2002; Dave et al. 2004). L'heterodímer 4F2hc/LAT2 basolateral té un patró similar d'expressió a ronyó i intestí prim (Pineda et al. 1999; Dave et al. 2004). 4F2hc/LAT2 és un bescanviador amb especificitat àmplia per a aminoàcids zwitteriònics petits i grans amb característiques del sistema L (Pineda et al. 1999). Això suggereix que 4F2hc/LAT2 pot tenir un paper en el reabsorció d'aminoàcids zwitteriònics. En efecte, experiments d'antisentit en la línia cel·lular *Opossum Kidney* polaritzada OK, derivat de cèl·lules epitelials de túbul proximals contornejat, demostrà un paper de LAT2 (*SLC7A8*) en el flux transepitelial de cistina, i l'eflux basolateral de cisteïna i l'influx d'alanina, serina i treonina (la concentració intracel·lular de cisteïna augmenta, i la d'alanina, serina i treonina disminueix en

cèl·lules OK en cultiu polaritzat amb LAT2 antisentit) (Fernández *et al.* 2003). El coneixement del paper de LAT2 en la reabsorció serà possible amb la generació del model de ratolí *knockout* de LAT2.

Hi ha evidències de variants fenotípiques de la malaltia de Hartnup, suggerint un *locus* addicional a 5p15.33 (*SLC6A19*) que afecten o modifiquen el fenotip (Tarlow *et al.* 1972; Scriver *et al.* 1987). Dues de les famílies analitzades amb la malaltia de Hartnup aparentment no presenten mutacions a *SLC6A19*, i el lligament a 5p15 ha estat exclòs en una d'elles (Kleta *et al.* 2004). Això suggereix que el defecte d'altres transportadors d'aminoàcids podria ocasionar la malaltia de Hartnup. Hi ha diversos candidats: i) Dins de la família de *SLC6* hi ha dos transportadors orfes relacionats en seqüència a B⁰AT1, XT2 (*SLC6A18*) i XT3 (*SLC6A20*). Aquests tres gens pertanyen a una branca de transportadors d'aminoàcids dins de la família de neurotransmissors de Na⁺,Cl⁻-dependents (Broer *et al.* 2004). *SLC6A18* està localitzat proper a *SLC6A19* dins de 5p15, i per això es podria excloure del lligament amb la malaltia de Hartnup (Kleta *et al.* 2004). És necessari realitzar estudis funcionals i d'expressió en teixits per constatar el paper de XT2 i XT3 en la reabsorció d'aminoàcids. ii) El transportador d'aminoàcids ASCT2 (també anomenat ATB⁰) (*SLC1A5*) s'expressa a la membrana apical del túbul contornejat proximal i a les cèl·lules epitelials d'intestí prim (Avisar *et al.* 2001). Aquest transportador intercanvia la majoria dels aminoàcids zwitteriònics de manera dependent de Na⁺ (Utsunomiya-Tate *et al.* 1996; Kekuda *et al.* 1997; Kanai and Hediger 2003; Kanai and Hediger 2004). El paper de ASCT2 en la reabsorció d'aminoàcids no s'ha avaluat. iii) El lligam metabòlic entre els sistemes b^{0,+}, B⁰ i y^{+L} exigeix un sistema de transport basolateral que mitjanci l'eflux d'aminoàcids neutres (figura 41). El defecte del sistema de transport d'aminoàcids basolateral d'eflux d'aminoàcids zwitteriònics augmentaria la concentració intracel·lular d'aquests aminoàcids ocasionant la seva hiperexcreció en orina i la malabsorció intestinal. Els transportadors candidats per a aquesta funció es poden trobar dins de les famílies *SLC16* i *SLC43*. Els transportadors d'aminoàcids en aquestes famílies transporten per difusió facilitada, i són per això apropiats per mediar l'eflux d'aminoàcids zwitteriònics des de l'elevada concentració intracel·lular fins a l'espai intersticial. TAT1 (*T-type amino acid transporter 1*) (*SLC16A10*) transporta aminoàcids aromàtics de manera Na⁺ i H⁺-independent (Kim *et al.* 2001a; Kim do *et al.* 2002). TAT1 s'expressa en humà a ronyó i intestí prim amb una localització basolateral. La família de *SLC16* (també anomenada MCT, *Monocarboxylate transporters*) conté membres que transporten monocarboxilats i hormones tiroïdees. Vuit transportadors d'aquesta família són transportadors orfes (*MCT5* a *7*, *MCT9*, *MCT11* a *14*) (Halestrap and Meredith 2004). Els models de ratolins de *knockout* nuls per TAT1, i dels seus transportadors orfes relacionats expressats a còrtex de ronyó i intestí prim, poden ajudar a identificar els transportadors basolaterals implicats en reabsorció d'aminoàcids neutres. LAT3 (*L-type amino acid transporter 3*) (Babu *et al.* 2003) i LAT4 (*L-type amino acid transporter 3*) (S. Bodoy, manuscrit en preparació) dins de família de *SLC43* transporten per difusió facilitada aminoàcids zwitteriònics amb les característiques del sistema L. Cap d'aquests dos transportadors no s'expressa en cèl·lules epitelials del túbul contornejat proximal renal ni a l'intestí prim, però la família de *SLC43* té un tercer membre la funció de transport del qual encara no s'ha identificat (EEG1; Stuart *et al.*, 2001). Es requereixen estudis funcionals i d'expressió en teixits per constatar el paper de EEG1 en la reabsorció d'aminoàcids.

La base molecular de la reabsorció renal i intestinal d'aminoàcids acídics és menys coneguda. La majoria d'aminoàcids acídics filtrats (>90%) es reabsorbeix en el segment S1 (en primera part del túbul contornejat proximal) (Silbernagl 1983). S'han descrit dos sistemes de transport acídics apicals: un d'elevada capacitat i baixa afinitat, i l'altre de baixa capacitat i alta afinitat (Hediger and Welbourne 1999). El transportador d'aminoàcids acídics Na⁺/K⁺-dependent EAAT3, que localitza al cromosoma 9p24 (Smith *et al.* 1994b) (també anomenat EAAC1; *SLC1A1*) (sistema X_{AG}) s'expressa a les membranes de vora en raspall dels segments S2 i S3 de la nefrona (Shayakul *et al.* 1997). Les característiques de transport de *SLC1A1* corresponen al sistema d'alta afinitat (Kanai *et al.* 1992). Els ratolins *knockout* nuls de *Slc1a1* desenvolupen aminoacidúria dicarboxílica (Peghini *et al.* 1997), demostrant el paper d'aquest transportador en la reabsorció renal d'aminoàcids acídics. En canvi, no hi ha una demostració directa del paper de *SLC1A1* en l'aminoacidúria dicarboxílica humana. El sistema de transport apical de baixa afinitat per a aminoàcids acídics a ronyó ha estat detectat en preparacions de membranes de vora en raspall (Weiss *et al.* 1978), però no s'ha identificat el gen o gens responsables (Hediger and Welbourne 1999). En membranes basolaterals renals hi ha un sistema de transport d'alta afinitat per a aminoàcids acídics Na⁺,K⁺-dependent (Sacktor *et al.* 1981), però no s'ha identificat el gen o gens responsables. El mRNA d'un altre membre de la família de *SLC1*, GLUT1 (glial high-affinity glutamate transporter) (Pines *et al.* 1992) (també anomenat EAAT2; *SLC1A2*) s'expressa a còrtex de ronyons de rata i intestí prim de porc (Welbourne and Matthews 1999; Fan *et al.* 2004). L'expressió de la proteïna GLUT1 no s'ha estudiat a ronyó i intestí. Els ratolins *knockout* nuls de *Slc1a2* presenten atacs epilèptics espontanis letals (Tanaka *et al.* 1997). Seria interessant analitzar, si és possible (els ratolins de *Slc1a2*^{-/-} presenten supervivència del

DISCUSSIÓ GENERAL

50% després de 6 setmanes), la reabsorció renal i l'absorció intestinal d'aminoàcids acídics en aquest model per constatar el paper de GLUT1 en aquests processos.

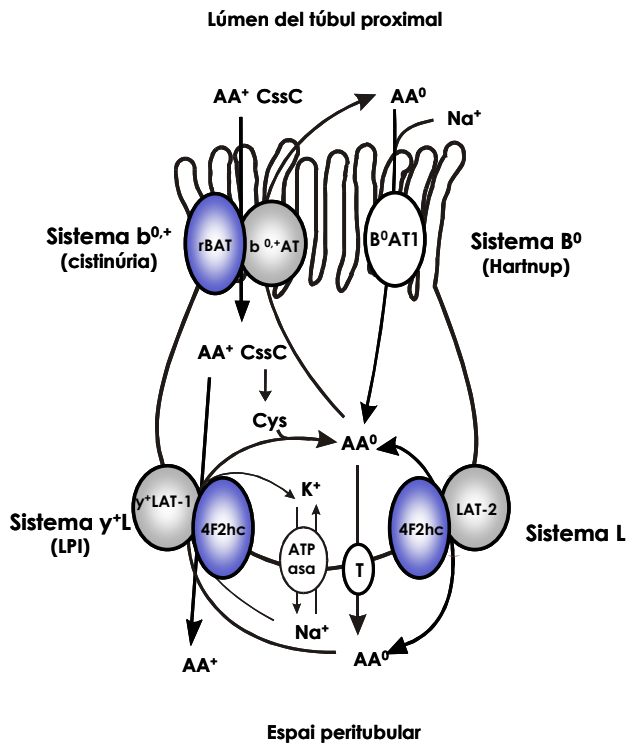


Figura 41. Model de reabsorció d'aminoàcids en una cèl·lula del túbul proximal de la nefrona. AA⁺, aminoàcids bàsics; AA⁰, aminoàcids neutres; CysC, cistina; Cys, cisteïna (Adaptat de Chillarón et al., 2001). En la membrana apical es troben els transportadors rBAT/b⁰⁺AT i B⁰AT1, els defectes dels quals provoquen la cistinúria i la malaltia de Hartnup respectivament. A la membrana basolateral hi ha LAT-2 i γ⁺LAT1, el defecte d'aquest últim provoca Lisinúria amb intolerància a proteïnes (LPI).

Conclusions

I. Acotació del *locus* de cistinúria de tipus no I i clonació de *SLC7A9*

I1. El *locus* de cistinúria de tipus no I se situa al cromosoma 19q13.1, en una zona de 2,3 Mb compresa entre els marcadors *C13* i *D19S587*.

I2. S'ha identificat el gen *SLC7A9* com a responsable de cistinúria; aquest codifica per a la subunitat lleugera de rBAT, $b^{0,+}$ AT. Les mutacions en aquest gen causen pèrdua de funció del sistema de transport $b^{0,+}$.

II. Anàlisi de mutacions als gens *SLC7A9* i *SLC3A1*

II1. El gen *SLC7A9* és el principal responsable de la cistinúria de tipus no I, ja que aproximadament el 88% dels al·lels associats al fenotip no I presenten mutacions en aquest gen.

II2. S'han identificat 52 i 24 mutacions noves a *SLC7A9* i *SLC3A1* en 164 famílies amb cistinúria de la cohort de pacients de l'*Internacional Cystinuria Consortium* (ICC), que juntament a les prèviament publicades eleven el total de mutacions a 66 i 105 a *SLC7A9* i *SLC3A1* respectivament.

II3. Les mutacions identificades en la nostra cohort de pacients expliquen el 90,5%, 87,6% i 89,3% de pacients amb cistinúria de tipus I, no I i mixt, respectivament.

II4. En la cohort de pacients de l'ICC p.M467T i p.G105R són les mutacions més freqüents, representant el 26.4% i el 27.4% dels al·lels mutats identificats a *SLC3A1* i *SLC7A9* respectivament.

II5. L'anàlisi del mRNA de vuit mutacions puntuals de *SLC7A9*, que no afecten zones consens de *splicing*, revela que tres d'elles (les freqüents p.R333W i c.614dupA i la rara c.586C>T) presenten alteracions en el *splicing*. Aquestes mutacions eleven el percentatge d'al·lels amb *splicing* erroni del 7% al 28% aproximadament. Aquest fet fa necessari estudiar en mRNA totes les mutacions de cistinúria identificades en DNA genòmic per poder fer una descripció final de les mutacions causants de cistinúria.

III. Correlació genotip-fenotip en cistinúria

III1. Majoritàriament les mutacions a *SLC3A1* i *SLC7A9* s'associen a fenotips I i no I respectivament, però *SLC7A9* presenta major heterogeneïtat fenotípica que *SLC3A1*: aproximadament el 12% dels heterozigots de *SLC7A9* presenten fenotip I, i només el 4% dels heterozigots de *SLC3A1* (mutació dupE5-E9) presenten fenotip no I. Aquesta dissociació entre genotip i fenotip ha motivat la proposta d'una nova classificació de la cistinúria: tipus A, causat per dues mutacions a *SLC3A1*; tipus B: causat per dues mutacions a *SLC7A9*; i un possible tipus AB, causat per una mutació a cada un dels gens.

III2. Les famílies amb cistinúria de tipus mixt presenten tots els genotips possibles, sent el més freqüent el genotip BB.

III3. L'herència digènica (AB) no dona lloc a un desenvolupament complet de la malaltia (litiasi), encara que pot agreujar l'hiperexcreció d'aminoàcids.

IV. Al·lels no explicats en cistinúria

IV1. Aproximadament el 13% dels al·lels de pacients amb cistinúria de l'ICC no han estat explicats per mutacions a *SLC3A1* o *SLC7A9*.

IV2. S'han identificat dos polimorfismes de canvi d'aminoàcid (p.V142A i p.L223M) i tres a la regió promotora de *SLC7A9* (c.1-313G>T i c.1-617G>T c.1-1314G>A) que presenten freqüències diferents en pacients amb al·lels no explicats que en controls. Això suggereix un possible paper d'aquests polimorfismes en cistinúria o l'existència de mutacions associades a aquests encara no identificades.

IV3. L'anàlisi de mutacions del gen candidat *SLC7A8* (LAT2) no ha mostrat mutacions associades a cistinúria, però sí un polimorfisme (IVS8+8 C>A) que es troba amb major freqüència en pacients

CONCLUSIONS

amb al·lels no explicats que en controls. Això suggereix un possible paper, causatiu o modulador, de LAT2 en el fenotip cistinúric.

IV5. Es descarta la implicació de *SLC7A10* (asc-1) en la cistinúria. No s'han trobat mutacions ni polimorfismes associats al fenotip cistinúric, el gen no s'expressa al túbulo proximal i la variant de seqüència E112D, proposada com a associada a cistinúria, no afecta la funció del transportador.

Materials i Mètodes

Els principals materials d'aquesta tesi són els pacients humans de cistinúria, que es descriuen breument a continuació. També s'ha treballat amb diferents soques d'*E.coli* i ratolí. En aquesta secció es descriuen en detall aquells mètodes que han estat utilitzats en aquesta tesi. Els altres són explicats a les publicacions que hi ha al capítol de resultats, referenciats a la bibliografia o, en el cas dels kits, als manuals dels fabricants.

21 ESTUDI DE PACIENTS DE CISTINÚRIA

Es van incloure en l'estudi tots els individus que complien els següents criteris: 1) Excreció de cistina en orina més gran que 1040 $\mu\text{mol/g}$ creatinina en una sola mostra d'orina o una mostra recollida en 24-h i que com a mínim se'ls hagués identificat una pedra de cistina (emesa o tretada quirúrgicament), i 2) els germans de pacients de cistinúria, definits a dalt, amb les mateixes mutacions genètiques, encara que no se'ls hagués identificat cap pedra.

Per a l'estudi de les bases moleculars de la cistinúria, s'han utilitzat mostres de 164 pacients cistinúrics independents i els seus familiars del Consorci Internacional de Cistinúria, obtingudes als serveis de nefrologia d'hospitals fonamentalment italians (91) i espanyols (50), tot i que hem analitzat algun pacient de Israel (23), Bèlgica (4), Portugal (3), Suïssa (2), Anglaterra (1), Argentina (1), Alemanya (1), i Holanda (2). També s'ha col·laborat amb grups que utilitzaven mostres de pacients dels Estats Units (32). La informació genètica o fenotípica per a alguns d'aquests pacients està disponible a (Bisceglia *et al.* 1996; Pras *et al.* 1998a; Feliubadaló *et al.* 1999b; Purroy *et al.* 2000; Bisceglia *et al.* 2001; Font *et al.* 2001; Dello Strologo *et al.* 2002).

El pacient índex de cada família presentava càlculs de cistina (excepte quatre, que havien estat diagnosticats arran d'estudis metabòlics) i excrecions elevades de cistina, lisina, arginina i ornitina. En cada cas s'intentà disposar del màxim nombre de familiars, per realitzar estudis de lligament genètic i classificar els pacients.

Es determinà l'excreció urinària dels diversos aminoàcids mitjançant cromatografia de bescanvi iònic o cromatografia líquida d'alta pressió de mostres de primera orina del matí o de 24 hores (Turnell and Cooper 1982). Les concentracions d'aminoàcids foren corregides per gram de creatinina, donat que aquesta és un metabolit lliurement filtrat i, en general, no reabsorbit pel ronyó, que a més és funció del pes corporal de l'individu (Levinsky and Lieberthal 1992).

Per a la classificació inicial de les famílies s'utilitzaren els valors d'excreció urinària d'aminoàcids bàsics i de cistina i (lisina, arginina i ornitina) dels portadors obligats, segons els criteris publicats a (Calonge *et al.* 1995b). Inicialment es classificaren en tipus I, II, III o les seves diverses combinacions, aquelles famílies on hi havia prou dades. Un nombre elevat de famílies tenia dades incompletes, unitats no corregides o valors contradictoris entre els diversos aminoàcids, la qual cosa impedí la seva classificació. Al llarg d'aquesta tesi s'ha anat modificant la classificació fenotípica (veure article 3 de Resultats). També hem proposat una nova classificació genètica (veure article 4 de Resultats). Per classificar la majoria dels probands en subtipus de cistinúria vam utilitzar els valors d'excreció urinària de cistina i aminoàcids dibàsics (lisina, arginina i ornitina) en els heterozigots obligats de cada família com es descriu.

Així, quan com a mínim dos dels paràmetres, cistina, lisina, arginina, ornitina o la suma de cistina i els tres aminoàcids dibàsics en orina, eren més alts que el 95 percentil en controls els heterozigots es consideraven fenotip no I. D'aquests, la majoria eren considerats tipus III. Eren considerats tipus II aquells amb una excreció de cistina superior a 750 $\mu\text{mol/g}$ cre, i una excreció de lisina superior a 2000 $\mu\text{mol/g}$ cre. Es consideraven heterozigots amb fenotip I quan aquests paràmetres eren dins del rang control (valors inferiors a 130 $\mu\text{mol/g}$ cre de cistina, 300 $\mu\text{mol/g}$ cre de lisina, 23 $\mu\text{mol/g}$ cre d'arginina i 25 $\mu\text{mol/g}$ cre d'ornitina (suma dels 4 aminoàcids: 478 $\mu\text{mol/g}$ cre)).

. Els pacients es classificaven així:

- **Tipus I:** quan els dos pares mostraven un patró d'aminoàcid d'orina normal (els heterozigots amb valors d'excreció dins del rang control).
- **Tipus no I:** quan l'excreció urinària dels dos pares estava per damunt dels controls (p.e., heterozigots amb fenotip no I). En uns quants casos, els probands tenien un perfil d'excreció urinària similar al d'un dels pares i dins del rang superior dels heterozigots no I. En aquests casos, si l'altre pare presentava un fenotip d'excreció urinària normal, els probands es consideraven heterozigots malalts amb cistinúria no I.

MATERIALS I MÈTODES

- **Tipus Mixt:** Quan un dels trets de cistinúria en la família entrava dins del rang de Tipus I (semblant al rang de control) i l'altre estava per damunt del rang dels controls es classificaven com pacients de cistinúria de Tipus mixt.
- **No classificats:** La resta dels probands els vam anomenar no classificats perquè els valors d'excreció urinària dels seus familiars no estaven disponibles.

Utilitzant aquests criteris, els 164 probands estudiats es classificaren de la manera següent: 37 tipus I, 46 no I, 14 mixtes, i 67 no classificats.

De les prop de 100 famílies de les quals es partí (s'anaren ampliant fins les 165 actuals). A l'article 1 s'utilitzaren 22 de les famílies (20 italianes, una espanyola i una alemanya, de tipus II i III, ja anomenats conjuntament no I). A l'article 2, donat que buscàvem mutacions, la classificació fenotípica va resultar útil per dirigir l'estudi de mutacions cap als pacients amb més probabilitats de trobar-hi mutacions. S'utilitzaren 27 pacients (italians i espanyols) de tipus no I o de famílies mixtes I/no I, a més dels pacients americans i israelians aportats pels altres grups del Consorci Internacional de Cistinúria (ICC). A l'article 3 vam realitzar un estudi de mutacions de 175 pacients cistinúrics de 4 poblacions diferents (80 italians, 40 espanyols, 32 nord americans i 23 jueus libis) aportats per l'ICC, que van permetre realitzar la primera correlació genotip/fenotip de cistinúria de tipus no I. Als articles 4 i 5 es va realitzar amb el mateix grup de pacients de cistinúria del ICC (amb alguns canvis): s'inclouen 224 i 164 famílies en l'article 4 i 5 respectivament. L'anàlisi de mutacions exhaustiu ens va permetre suggerir una nova classificació basada en el genotip. L'anàlisi de mutacions fet a Barcelona, dels gens *SLC3A1*, *SLC7A9*, inicialment es va realitzar en pacients amb fenotip I i no I respectivament. En aquells pacients no classificats, o amb una sola o cap mutació trobada es van analitzar els dos gens.

S'han analitzat els probands i els seus familiars per a mutacions a *SLC3A1*, *SLC7A9* o als dos gens. Inicialment, es van cercar mutacions a *SLC3A1* i *SLC7A9* en els pacients de cistinúria de tipus I o no I respectivament. Els pacients als que els faltaven un o les dues mutacions foren analitzats per a l'altre gen de cistinúria. Els pacients no classificats també foren analitzats pels dos gens.

L'anàlisi es feu principalment per PCR (veure apartat 22.2), SSCP-HD (veure apartat 22.3.2.1), PCR multiplex (veure apartat 22.2.4), per DHPLC (article 5) i RT-PCR en els pocs casos en que es disposava de RNA (veure apartat 23.2). Es va utilitzar la PCR de seqüència (veure apartat 22.2.5.1) per confirmar els resultats obtinguts amb les altres tècniques. També es va utilitzar la seqüenciació directa dels dos gens per cercar mutacions en els individus no genotipats amb les altres tècniques.

Després d'un anàlisi exhaustiu d'aquests 2 gens, es van cercar possibles mutacions en els gens *SLC7A8* i *SLC7A10* en els pacients que quedaven per explicar. A l'article 6, es van estudiar 22 pacients cistinúrics (21 espanyols i 1 italià), en els que faltaven per trobar una o les dues mutacions.

Per saber si els canvis trobats amb aquestes tècniques eren mutacions o polimorfismes (canvis que es troben en població general en una proporció de l'1% com a mínim) es feren anàlisis, amb l'enzim de restricció adequat per cada cas, que ens permetessin testar el canvi en la població normal (mínim 100 cromosomes independents). Si el canvi no es trobava en cap dels individus control es considerava que era una mutació nova. Si el canvi no crea ni destrueix cap diana cal dissenyar oligonucleòtids de mutagènesi (veure apartat 22.4) per testar els controls. Posteriorment, es mirava la segregació de les mutacions en els familiars dels pacients.

22 TÈCNiques GENERALS DE MANIPULACIÓ DE DNA

En la realització d'aquesta tesi s'han aplicat diferents tècniques de manipulació del DNA que són comunes a tots els laboratoris de Biologia Molecular. Tota aquesta metodologia es pot trobar detallada en qualsevol manual de laboratori de Biologia Molecular, com per exemple: "*Molecular Cloning. A Laboratory Manual*" (Sambrook *et al.*, 1989) i "*Current Protocols in Molecular Biology*" (Coligan *et al.*, 2001). En aquest apartat es detallen els protocols de manipulació més utilitzats per la realització d'aquesta tesi: extracció de DNA de sang perifèrica, reacció en cadena de la polimerasa (PCR), electroforesi en gel d'agarosa i de poliàcrilamida, SSCP, purificació del DNA, anàlisi de restricció del DNA, i establiment de línies estables de limfòcits.

22.1 EXTRACCIÓ DE DNA DE SANG

Aquest protocol ha servit per extreure DNA dels pacients de cistinúria i familiars que s'han anat afegint a l'estudi. El DNA s'extreu de leucòcits de sang perifèrica. A partir de 5-20 mL de sang perifèrica fresca (conservada com a màxim una nit a 4°C):

Materials:

- 5-20 mL de sang perifèrica fresca
- sèrum fisiològic
- tampó fosfat salí (PBS)
- solució de lisi de leucòcits: 200-400 µL de SDS al 10% i 500-1000 µL de solució de proteïnasa K
- NaCl saturat a ~5,5 mM
- cloroform
- etanol absolut i al 70%
- tampó TE (10:0,2): 10 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 0,2 mM EDTA, (pH = 8,0), autoclavat

Procediment:

1. S'afegeix sèrum fisiològic fins 50 mL, es barreja per inversió i se centrifuga a 800 x g a 4°C sense fre.
2. S'aspira el sobrenedant amb cura de no perdre la interfase (capa de leucòcits). S'afegeix solució de lisi d'eritròcits fresca del dia fins a 50 mL i s'agita suaument per inversió. Se centrifuga 15 min a 2500 x g a 4°C.
3. Es decanta el sobrenedant. Es repeteix el rentat, però amb tampó fosfat salí (PBS). En aquest punt el precipitat pot ser congelat a -20°C o -80°C, o continuar amb l'extracció.
4. S'afegeix 3-6 mL de solució de lisi de leucòcits, en funció de la mida del precipitat. S'afegeix 200-400 µL de SDS al 10% i 500-1000 µL de solució de proteïnasa K. S'agita amb vòrtex fins obtenir un aspecte homogeni. S'incuba o/n a 37°C en agitació. L'extracció pot continuar automàticament en un extractor (vàrem utilitzar el *340A Nucleic Acid Extractor*, Applied Biosystems) que combina etapes de fenol i fenol-cloroform. Alternativament, es pot seguir un mètode manual de precipitació per sals:
5. S'afegeix a la barreja 1 mL de NaCl saturat a ~5,5 mM. S'agita al vòrtex uns segons i se centrifuga 15 min a 2500 x g a 4°C.
6. Es recull el sobrenedant i es torna a centrifugar.
7. Es recull el sobrenedant i s'hi afegeix un volum igual de cloroform. S'agita enèrgicament per inversió i se centrifuga 15 min a 2500 x g a 4°C sense fre.
8. Es recull la fase superior, en compte de no prendre la interfase.
9. S'afegeixen 2 volums d'etanol absolut i es barreja suaument per inversió fins que apareix una "medusa" de DNA. Es recull ràpidament la "medusa" amb un ganxo de vidre (fet corbant una pipeta Pasteur al bec de Bunsen) i es renta submergint-la en un tub amb 10 mL d'etanol al 70% i movent-la amunt i avall amb compte de no perdre-la.
10. Es deixa assecar la "medusa" 30 s a l'aire i es desenganxa en 300-500 µL de tampó TE (10:0,2). Es deixa ressuspènere o/n en un agitador orbital a T_{amb} , o 2-3 h a 37°C en agitació.

Càlcul de la concentració de DNA i altres valors útils

- $D.O_{.260} \times \text{dilució} \times 50$ (50 µg dsDNA/1 U $D.O_{.260}$) = concentració dsDNA
- $D.O_{.260}/D.O_{.280}$ = 1,7-2,0 (aquesta relació dóna una idea de la puresa de la mostra de dsDNA)
- $D.O_{.260} \times \text{dilució} \times 33$ (33 µg ssDNA/1 U $D.O_{.260}$) = concentració ssDNA
- 1 nucleòtid = 0,33 ng/pmol
- PM dsDNA = n° pb x 650 Daltons/pb

MATERIALS I MÈTODES

22.2 REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*), descrita el 1985 per Mullis (Saiki *et al.* 1985), és l'eina més emprada en aquesta tesi. La tècnica permet la replicació *in vitro* d'un DNA motlle gràcies a la utilització d'oligonucleòtids sintètics (encebadors) per acció de l'enzim DNA polimerasa. Els encebadors s'orienten de manera que es dona una replicació solapada que resulta en un creixement exponencial del fragment (amplificació). En aquest treball s'han utilitzat quatre polimerases diferents, cadascuna amb el seu corresponent tampó: la *Taq DNA polymerase* (Roche 1435094), que no té activitat exonucleasa; la *Expand High Fidelity Taq polymerase* (Roche 1732650), que presenta activitat exonucleasa 3'5' i s'utilitza per amplificar fragments de cDNA que cal que mantinguin elevada fiabilitat de seqüència; i la *DyNAzyme* (Finnzymes F-505S), per algunes reaccions de més difícil amplificació o per minimitzar bandes inespecífiques; *Taq Expand™ 20 kbPlus* (Roche 1811 002) per amplificar fragments molt grans. Les quantitats d'enzim, tampó, DNA motlle, dNTPs i oligonucleòtids s'indiquen en els fulls informatius que acompanyen els enzims. La temperatura d'anellament dels oligonucleòtids depèn de la seva T_m (*melting Temperature*) i la temperatura d'extensió és característica de cada polimerasa. El temps d'extensió recomanat és d'almenys 1 minut per kilobase de DNA amplificat, però pot variar en funció de la polimerasa que s'utilitzi. Cada PCR es realitza en condicions lleugerament diferents, en funció de la longitud i seqüència dels encebadors, la seva correspondència amb la seqüència motlle, la longitud de la seqüència amplificada, el nombre de còpies inicials, la puresa de la mostra, la fidelitat necessària al producte, la quantitat de producte necessari, etc.

S'ha inclòs a la memòria (a l'annex 1) una llista d'encebadors i condicions d'amplificació. La informació per a cada encebador depèn de l'ús més comú que se n'ha fet. Es detallen les condicions de PCR o/i la posició i orientació al gen. A continuació es detallen les condicions de realització de: una PCR típica, una reacció de seqüència, i les tècniques RACE-PCR i PCR-Multiplex.

22.2.1 PCR tipus

En general, la PCR es prepara a la taula de treball i a T_{amb} , encara que també es pot preparar en gel si és necessari. El material de plàstic és estèril i es prenen les precaucions típiques del treball amb DNA. No s'afegeix oli, perquè s'utilitzen termocicladors (Perkin Elmer, models 2400, 9600 o 9700) que mantenen la tapa del tub calenta i no hi ha perill d'evaporació de la barreja de reacció. S'utilitzen tires de tubs de 200 μ L (Robbins Scientific 1044-50-0) amb les tires de taps (Robbins Scientific 1044-72-0) corresponents.

Materials:

- ~100 ng DNA genòmic. Quan el DNA és plasmídic, s'usen quantitats molt menors (per exemple, la dilució 1/500 d'una mini-preparació), ja que el nombre de còpies del motlle és molt més gran.
- $V_i/10$ tampó 10x: Els tampons utilitzats són proporcionats per la casa comercial en acompanyament de l'enzim corresponent. En general, inclouen 15 mM $MgCl_2$, i així procuren una concentració final de Mg^{2+} 1,5 mM. V_f : volum final. Per amplificar zones amb alt contingut de G i C s'ha utilitzat un *kit* especial: *PCRx Enhancer System* (Invitrogen 11495-017).
- 200 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 0,01% gelatina (Sigma G-2500)
- $MgCl_2$, DMSO: Algunes PCR són optimitzades a concentracions de Mg^{2+} superiors a la proporcionada pel tampó. En aquest cas, s'afegeix la quantitat de $MgCl_2$ necessària. També s'ha optimitzat alguna PCR afegint glicerol i DMSO (1-10%), etc. que alteren la temperatura de dissociació (T_m) del DNA, incrementant la quantitat i especificitat del producte.
- 0,35 μ M de cada encebador
- DNA polimerasa: 0,25 U de l'enzim *Taq DNA polimerasa*, 0,4 U de *Expand High Fidelity*, 0,3 U de *DyNAzyme*.
- H_2O_{dd} estèril: S'afegeix la quantitat d'aigua adequada al volum final (V_f) desitjat. A la majoria de les nostres PCR el V_f és 25 μ L

Procediment:

En primer lloc es programa el termociclador. Un cop afegits tots els components, es tapen els tubs, es barregen per inversió i se centrifuguen per fer baixar el contingut. Es posa en marxa l'aparell, es deixa pujar la temperatura a 80°C-94°C i es col·loquen els tubs per a que hi tingui lloc la reacció. El fet d'afegir els tubs quan l'aparell ja és calent és una aproximació a la tècnica *hot start* de les PCR. El *hot start* (Chou *et al.* 1992) serveix per evitar que s'amplifiqui el resultat de la unió inespecífica d'encebadors al DNA

motlle mentre puja la temperatura al primer cicle de la PCR, és important quan s'amplifica DNA genòmic ja que els encebadors poden anellar-se inespecíficament en múltiples regions del genoma. És una alternativa fàcil, ràpida i barata: el tub entra a l'aparell quan aquest ja és calent, la temperatura de la barreja puja molt ràpidament, arribant a la desnaturalització del DNA sense a penes amplificar cap producte d'anellaments inespecífics.

Els primers cicles d'una PCR són els més importants pel que fa a la seva especificitat. Per aquesta raó s'han fet moltes de les PCR utilitzant dos tipus de cicles: als 10 primers cicles s'ha utilitzat una temperatura d'anellament 1°C més alta que a la de la resta de cicles. Així, als primers cicles es prioritza l'especificitat i als últims, l'eficiència d'amplificació. S'ha fet una altra diferència entre els deu primers cicles i la resta, a la temperatura de desnaturalització del DNA. Als primers cicles cal desnaturalitzar tot el DNA genòmic, i s'hi ha utilitzat 94°C. Com més avançada està la PCR, menor és la proporció de motlle que segueix sent el DNA genòmic inicial, i major és la del propi producte amplificat. Aquest producte, de mida petita, es desnaturalitza amb facilitat. Per aquest motiu, als últims cicles s'ha utilitzat 90°C per al tram de desnaturalització. Així es retarda la inactivació de l'enzim, que malgrat ser resistent a altes temperatures, pateix amb cada cicle de desnaturalització. Així també es minimitza la despurinació causada per la baixada del pH a altes temperatures.

Les condicions d'amplificació típiques de les PCR d'aquest treball han estat:

Desnaturalització inicial: 5 min a 94°C	
Desnaturalització: 20 s a 94°C	}
Anellament: 20 s a X°C ⁽¹⁾	
Elongació: Y s a 72-74°C ⁽²⁾	} * 10
Desnaturalització: 20 s a 90°C	
Anellament: 20 s a (X-1) o X°C	}
Elongació: Y s a 72-74°C ⁽²⁾	
Elongació final: 5 min a 74°C	} * Z ⁽³⁾
Repòs: fins que es recull a 15°C	

Notes a les condicions:

1. X varia segons la temperatura de dissociació de l'encebador (T_m), que depèn de la llargada i composició de l'encebador, i de la seva complementarietat al motlle, normalment entre 55°C i 62°C.
2. Y depèn de la llargada del fragment que s'ha d'amplificar, i sol ser aproximadament 1 min per kilobase.
3. Z depèn del nombre inicial de còpies, de l'eficiència d'amplificació de cada cicle, de la quantitat de producte desitjat i de la necessitat o no d'aturar la reacció abans d'arribar a la fase de saturació de la PCR. Normalment varia entre 18 i 36 cicles.

22.2.2 PCR-RACE (Rapid amplification of cDNA ends)

La tècnica de RACE permet amplificar un cDNA específic incloent els extrems 5' i 3' no traduïts. En aquest treball s'ha utilitzat per amplificar els extrems 5' dels cDNA corresponents a les permeases $b^{0,+}$ AT i asc-1 humanes. Es va utilitzar una llibreria comercial de ronyó humà, *Marathon-Ready™ cDNA* (Clontech 639305), seguint les instruccions del fabricant.

22.2.3 PCR ACRS (Amplification created restriction site)

Aquesta tècnica es basa en la creació d'una diana de restricció mitjançant la introducció d'un canvi nucleotídic a l'extrem 3' d'un dels encebadors de la PCR (Haliassos *et al.* 1989). Aquest s'anomena encebador de mutagènesi. Posteriorment es digereixen els fragments amb un enzim de restricció, com es descriu en l'apartat 22.4. Hem utilitzat aquesta tècnica per poder distingir variants de seqüència en zones en les que no es disposa d'enzim de restricció.

MATERIALS I MÈTODES

22.2.4 PCR semiquantitativa Multiplex

S'han amplificat simultàniament els 13 exons de *SLC7A9* junt amb l'exó 5 del gen *DSCR1* (que localitza al cromosoma 21 i que s'ha utilitzat com a control extern de doble dosi) en una mateixa reacció (veure annex 1, encebadors). Un encebador de cada parell està marcat per l'extrem 5' amb el fluorocrom 6-carboxifluoresceïna (6-FAM) (Lifetechnologies). La reacció es realitza amb 23 cicles, això afegit a la gran quantitat d'encebadors que competeixen entre ells fa que la amplificació sigui semiquantitativa, és a dir, es para la reacció en fase la fase exponencial, pels diferents fragments, per tant la quantitat final és proporcional a la quantitat inicial de motlle.

S'ha analitzat el DNA genòmic de limfòcits de 12 pacients espanyols en els que faltava 1 o les 2 mutacions per descriure: 2 de tipus no I, 4 de tipus mixt (no I/I) i 6 no classificats.

Materials:

- DNA genòmic de pacients
- Encebadors marcats amb 6-FAM (un de cada parella)
- Reactius PCR
- Termociclador
- Seqüenciador *ABI PRISM 377* (Perkin Elmer).
- Programa *GENESCAN*TM

Procediment:

1. En un volum final de 20 μ L es barregen 100ng DNA, 0.2 mM dNTPs, 1.5 U *Taq DNA polymerase* (Roche 1435094), gelatina al 0.01%, tampó de PCR amb 1.5 mM MgCl₂ i dels 28 encebadors. La reacció comença amb un desnaturalització inicial de 5 min a 94°C, seguit per 23 cicles de 94°C 25 seg, 58°C 25 seg, 72°C 25 seg. Es realitza una elongació final de 7 min a 72°C.
2. Els productes de la PCR multiplex es carreguen en gels d'acrilamida de 48 pous juntament amb un estàndard de pes molecular extern (6-carboxi-tetrametil-rodamina, TAMRA Gs-500) i s'analitza en un seqüenciador *ABI PRISM 377* (PE Applied Biosystems).
3. Els resultats són processats amb el programa *GENESCAN*TM. La mida i quantitat de cada exó es determina amb el mateix programa (Fig. 2) i l'àrea de cada pic es divideix pel control de dosi doble extern, intern a la reacció (exó 5 de *DSCR1*). Tots els càlculs de les àrees dels pics es realitzen utilitzant el programa Microsoft Excel. En condicions de PCR semiquantitativa l'àrea de cada pic és una mesura de la quantitat de DNA, per tant es poden detectar duplicacions i delecions dels diferents pics. Es realitza una PCR per demostrar les reordenacions detectades per multiplex.
5. En la família 73, es van utilitzar dos PCR addicionals per comprovar la duplicació de l'exó 12 trobada utilitzant la PCR multiplex. Primer, vam amplificar un fragment de 5.2kb que contenia la zona duplicada utilitzant *Taq Expand*TM 20 kbPlus (Roche 1811 002), amb 10 pmols d'encebador P6IF13 i 10 pmols P6IR10d. Per trobar el punt de duplicació vam amplificar un fragment de 518 pb (només en els al·lels amb la duplicació) amb 5 picomols d'encebadors P6IF11 i P6IR10d, segons mètodes estàndard. Per comprovar la delecio en la família 94, vam amplificar un fragment de 251 pb utilitzant 5 picomols dels encebadors P6IF13 i P6IR13, segons mètodes estàndard (taula 24).

Mutació	Nom	Seqüència (5' > 3')	Mida	X	Y	Z	Condicions
Delecio E12	P6IF13	CAGACCATACTGTAAAGGACC	251 pb	60, 59	30 s	26	Taq normal
	P6IR13	CGTGGGCATGTGTCTCTCT					
Duplicació E12	P6IF13	CAGACCATACTGTAAAGGACC	5,2 kb	58	10 min	20	Taq Expand 20 kb plus
	P6IR10d	CCTAATAAGCAGTCTACAAGA	518 pb	58	30 s	26	Taq normal
	P6IF11	ATGATTGAAATTGGAGGAGGG					
P6IR10d	CCTAATAAGCAGTCTACAAGA						

Taula 24. Condicions de les PCR comprovació delecio/duplicació E12 de *SLC7A9* Reacció de seqüència

La reacció de seqüència s'ha utilitzat molt en el transcurs d'aquest treball: per obtenir la seqüència parcial i/o total dels clons humans de les permeases P5 (*SLC7A10*) i P6 (*SLC7A9*); per tal d'identificar noves mutacions i polimorfismes a *SLC3A1*, *SLC7A8*, *SLC7A9* i *SLC7A10* en pacients de cistinúria, o per

confirmar l'existència de canvis nucleotídic descrits amb anterioritat; per conèixer la seqüència de regions genòmiques no introduïdes en les bases de dades; per comprovar la seqüència després d'un clonatge, etc. La seqüenciació dels productes de PCR es realitza de manera automatitzada (*ABI PRISM 377*, PE Applied Biosystems). Aquesta reacció consisteix en una PCR amb amplificació aritmètica en la que s'inclouen dideoxinucleòtids fluorescents. Aquesta tècnica es basa en el mètode de seqüenciació desenvolupat per Sanger i col·laboradors (Sanger *et al.* 1977). De manera simplificada, consisteix en l'amplificació de tots els productes intermitjos entre l'encebador i la totalitat del fragment de DNA que es vol seqüenciar. Aquesta gradació de productes que van augmentant de mida en un sol nucleòtid és possible gràcies l'aturada de la reacció d'amplificació mitjançant la incorporació dels didesoxinucleòsids trifosfat (terminadors). En el cas de la seqüenciació automàtica els dideoxinucleòtids estan marcats amb fluorocroms. D'aquesta manera, al separar per electroforesi tota la gradació de productes truncats, es pot analitzar automàticament la seqüència del fragment amplifcat.

S'ha utilitzat el *kit* d'Applied Biosystems més comú del moment, una barreja que inclou el tampó de reacció, la DNA polimerasa, els dNTP i els terminadors units a molècules fluorescents. Fa uns anys s'utilitzava el *Bigdye terminators cycle sequencing kit v2.0* (Applied Biosystems 4314414). Posteriorment es va utilitzar v3.2 i actualment s'utilitza v3.1.

Les reaccions de seqüència han estat analitzades a la Unitat de DNA de l'IRO.

22.2.5.1 PCR de seqüència

Materials:

- 0,2-2 μg de DNA
- 2 μL de *Big Dye*
- 0,4 μM d'encebador
- $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ estèril fins un V_i de 10 μL

Procediment:

1. Abans de ser seqüenciats, els productes de PCR són purificats com s'explica a l'apartat 22.5, utilitzant el sistema comercial *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen 28106), segons les especificacions del fabricant, amb l'objectiu d'eliminar l'excés de dNTPs i encebadors que podrien interferir en la reacció de seqüència.
2. La quantitat de DNA motlle inicial ha de ser alta perquè la reacció de seqüència només utilitza un encebador i, per tant, només amplifica el DNA de forma aritmètica. Se sol partir d'1 μL – 3 μL de minipreparació de plasmidi (a 200-400 ng/ μL) o de la cinquena-desena part d'un producte de PCR purificat i visualitzat.
3. S'afegeixen encebadors (0,4 μM), el *Bigdye* i $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ estèril fins un V_i de 10 μL . Les condicions d'amplificació segueixen generalment les recomanades per la casa comercial del *kit* de seqüència, donat cada tipus de termociclador. La majoria de les reaccions de seqüència realitzades al nostre laboratori es fan en les mateixes condicions, independentment de l'encebador.

Desnaturalització inicial:3 min a 94°C	}	x 30
Desnaturalització:25 s a 94°C		
Anellament:5 s a 50-53°C ⁽¹⁾		
Elongació:4 min a 60°C ⁽²⁾		
Elongació final:4 min a 72°C		
Repòs:fins que es recull a 15°C		

4. La temperatura d'anellament no és tan crítica a les reaccions de seqüència com a les PCR, atès que l'amplificació no és geomètrica i que sovint es parteix d'un motlle enriquit en la seqüència diana. Són preferibles les elongacions llargues a baixa temperatura, per les característiques de la polimerasa del kit, i per evitar errors de seqüència.
5. Un cop realitzada la reacció de seqüència, la mostra es purifica per eliminar l'excés de terminadors fluorescents, mitjançant una columna de *Sephadex G-50* com es detalla a continuació. Posteriorment es liofilitza. Els productes d'aquestes reaccions s'han analitzat en un seqüenciador automàtic *ABI PRISM 377* (PE Applied Biosystems).

MATERIALS I MÈTODES

22.2.5.2 Purificació dels productes de seqüenciació

Materials:

- *Sephadex G-50/H₂O_{dd}*: 30g *Sephadex G-50* (Farmacia 17-0573-02); 300 mL d'*H₂O_{dd}*. Agitar suaument i canviar la fase líquida com a mínim 3 vegades. Deixar hidratar les boletes unes hores abans d'utilitzar-lo.
- Columnes (*Amersham Biosciences 27-5340-01*).

Procediment:

1. S'empaqueta la columna amb 500 μ L de *Sephadex G-50* en *H₂O_{dd}*.
2. Se centrifuga 1 min a 3200 rpm i s'elimina l'aigua eluïda.
3. S'afegeixen 10 μ L de *H₂O_{dd}* al centre de la columna de *Sephadex*, i se centrifuga 1 min 3200 rpm.
4. Es col·loca la mostra sobre la columna i es torna a centrifugar 3200 rpm durant 1 min. Es recull el producte purificat en un *ependorf* situat a la part inferior.
5. Es liofilitza la mostra al *speed-vac* i es congela.
6. Es ressuspen en 4 μ L de solució de càrrega amb formamida 95% i EDTA 20 mM, sense colorants que podrien interferir en la lectura del làser.

En cas de seqüenciar una minipreparació de DNA plasmídic cal tenir en compte que no totes les soques de *E. coli* permeten obtenir bons resultats, depenent que siguin o no endonucleasa A positives (Taylor et al. 1993).

22.3 ELECTROFORESI

Procés pel qual una mostra de DNA sotmesa a un camp elèctric migra a través d'un gel cap al pol positiu, degut a la càrrega negativa neta dels grups fosfat de la cadena de DNA. La migració depèn del pes molecular segons una funció logarítmica. A la mostra abans de ser carregada en el gel, se l'hi ha d'afegir tampó de càrrega, que conté dos colorants: blau de bromofenol i xilen cianol, que faciliten la càrrega i serveixen de referència de pes molecular durant la carrera. El tampó de càrrega també porta un agent que li confereix densitat a la mostra perquè el DNA no es dilueixi en el tampó en carregar-lo.

22.3.1 Electroforesi de DNA en gel d'agarosa

L'electroforesi en gel d'agarosa no desnaturalitzant és un mètode estàndard que s'utilitza per a separar fragments de DNA. La migració d'aquests fragments en el gel és inversament proporcional al logaritme de la seva massa molecular. El percentatge d'agarosa que s'utilitza depèn del rang de pesos moleculars dels fragments que cal separar. S'utilitza 1% d'agarosa per tal de separar fragments d'entre 0.4 i 6 Kb. Per la separació de fragments més petits es recomana un percentatge superior (2-3%) o l'electroforesi en gel d'acrilamida. Per fragments més grans es pot utilitzar agarosa al 0,5-0,8%. Per gels de 0,5-2% s'utilitza agarosa *low melting*, mentre que pels gels del 3% es fa una barreja 3:1 (*Nusive:low melting*). Per conèixer la mida dels fragments es corre en paral·lel a les mostres un marcador de massa molecular, que conté diferents fragments de mida coneguda. Per la majoria de gels d'agarosa realitzats en aquesta tesi s'ha utilitzat el marcador *1Kb DNA* (Gibco 15615-016) que comprèn mides des de 73 pb fins a 12 kb. Per fragments majors de 12 kb, s'ha utilitzat el marcador λ *HindIII* que comprèn mides de 13 pb fins a 23 kb (Roche). Per quantificar DNA, s'ha utilitzat el marcador *VII* (Roche 1209264).

Materials:

- Agarosa *Nusive*
- Agarosa *Low melting*
- Tris-borat-EDTA (TBE) 5x: 450 mM Tris; 360 mM àcid bòric; 12 mM EDTA. Ajustar pH a 8,3 amb àcid acètic.
- Tampó de càrrega 6x: blau de bromofenol 0,25%; xilen cianol 0,25%; 40% ficoll, 60% glicerol o 60% sacarosa
- Portagels

- Pintes
- Cubeta electroforesi horitzontal
- Font d'electroforesi

Procediment:

1. Es pesa la quantitat necessària d'agarosa i s'afegeix TBE 0,5x. Es barreja i s'escalfa la solució al microones fins que es dissolgui. Es deixa refredar fins a 55°C (es pot guardar a aquesta temperatura durant setmanes).
2. Es deixa gelificar sobre un portagels durant 20-30 min a T_{amb}.
3. Es col·loca el gel a una cubeta d'electroforesi horitzontal amb TBE 0,5x.
4. Es carreguen les mostres amb tampó de mostra (dilució 1/6).

Les condicions de voltatge i temps durant l'electroforesi varien en cada cas, però generalment el voltatge utilitzat ha estat entre 100-120V, excepte per fer *Southern* (30-50V). Generalment, la solució tamponadora amb la que es prepara el gel i es corren les mostres és una solució de TBE a concentració final 0,5x. Un cop finalitzada l'electroforesi, el DNA es visualitza en un transil·luminador de raigs ultraviolat (UV) després de fer una tinció en una solució de bromur d'etidi (agent mutagènic) a una concentració final aproximada de 0,5 µg/L en H₂O_{dd}.

22.3.2 Electroforesi de DNA en gel d'acrilamida

Aquests gels són utilitzats per distingir rangs de pes molecular inferiors. La polimerització de l'acrilamida (agent neurotòxic) és catalitzada per l'APS (persulfat d'amoni) i el TEMED (N,N,N,N'-tetrametiletilediamina). El percentatge d'acrilamida utilitzat depèn del rang de pesos moleculars amb els que es treballa. Generalment hem fet gels de 6 i 8% acrilamida.

Materials:

- Solució stock acrilamida 40%
- TEMED
- APS
- TBE 5x
- Tampó de càrrega 6x
- Vidres
- Pintes
- Cubeta d'electroforesi vertical
- Font d'electroforesi

Procediment:

1. Es renten els vidres amb H₂O_{dd} i s'asseca amb etanol absolut.
2. Es munten els vidres amb els separadors, fixant-los amb pines.
3. Es prepara la quantitat necessària de solució d'acrilamida al 6-8%. S'afegeix APS i TEMED a un percentatge final de 0,5%. Es barreja i es carrega la solució entre els vidres amb una xeringa de 50 mL.
4. Es deixa polimeritzar durant 1h a T_{amb} (com a mínim).
5. Es col·loca el gel a una cubeta d'electroforesi vertical amb TBE 0,5x. Es fa un *pre-run* durant 15-30 min al voltatge desitjat.
6. Es carreguen les mostres amb tampó de mostra.

MATERIALS I MÈTODES

22.3.2.1 Tècnica de SSCP-HD (*Single-Strand Conformation Polymorphism-Heteroduplex*)

La cerca de mutacions en la zona codificant i les zones intròniques colindants dels gens *SLC3A1*, *SLC7A8*, *SLC7A9* i *SLC7A10*, es feu utilitzant la tècnica de SSCP (*Single Strand Conformation Polimorfism-Heteroduplex*) sobre DNA genòmic de pacients de cistinúria. Mitjançant aquest mètode s'aconsegueixen detectar diferències d'un sol nucleòtid presents en una seqüència determinada relativament petita (entre 100-500 pb), gràcies a la formació d'estructures secundàries específiques de seqüència, en condicions d'electroforesi determinades. El mètode de SSCP fou descrit inicialment per Orita *et al.* (1989). Existeixen treballs posteriors en els que optimitzen algunes variables metodològiques (Kukita *et al.* 1997). S'ha seguit la mateixa estratègia que es va utilitzar per analitzar el primer gen de cistinúria: *SLC3A1*, que codifica per rBAT (Calonge *et al.* 1994; Gasparini *et al.* 1995). La doctoranda va posar a punt la tècnica per trobar les condicions òptimes per analitzar cada exó dels gens *SLC7A8*, *SLC7A9* i *SLC7A10* (veure les condicions de PCR i encebadors a l'annex 1). Per *SLC7A9* es van córrer gels del 10% i el 12,5% per cada exó, mentre que per *SLC7A8*, i *SLC7A10* només es van utilitzar gels del 12,5%. Les condicions de carrera eren:

- Pre-run: 100 V / 23 mA / 5 W durant 20 min
- Carrera: 600 V / 30 mA (gels 10%) i 45 mA (gels 12,5%) / 18 W durant 1-3h

. Materials:

- Solució de càrrega per SSCP: 50 mM NaOH, 1 mM EDTA i 0,05% blau de bromofenol, 0,05% xilen cianol, formamida (!)
- 5-50 ng producte de PCR
- Gels de poliacrilamida comercials del 12,5% (*Excel Gel DNA Analysis Kit*, Amersham Biosciences 17-1198-07) i del 10% (*Gel Analysis Kit* Amersham Biosciences 17-1198-06).
- *DNA Sylver Staining Kit* (Amersham Biosciences 17-6000-30)
- *Multiphor II Electrophoresis Unit* (Amersham Biosciences 18-1018-06)
- *Multitemp Thermostatic Circular* (Amersham Biosciences 18-1102-78)

Procediment:

1. S'amplifiquen les mostres per PCR (veure encebadors i condicions de PCR, annex 1)
2. Es visualitza la quantitat de producte de PCR (en gel d'agarosa).
3. Es carreguen 5-50 ng del producte de PCR amb tampó de càrrega, desnaturalitzats prèviament per incubació a 98°C durant 5 min en gels de poliacrilamida del 12,5% i del 10% en condicions no desnaturalitzants. Per l'electroforesi horitzontal s'empra un equip *Multiphor II Electrophoresis Unit* (Amersham Biosciences 18-1018-06) acoblat a un bany d'aigua refrigerat *Multitemp Thermostatic Circular* (Amersham Biosciences 18-1102-78) que manté el gel a la temperatura desitjada: 15°C per gels del 10% i 5°C per gels del 12,5%. Les condicions d'electroforesi depenen de la mida i seqüència de cada fragment i de la concentració del gel. Les condicions per cada exó es descriuen en l'annex 1. Interessa visualitzar tant les cadenes senzilles com els heterodúplex (HD), perquè hi ha mutacions en que els canvis de patró es visualitzen millor en les cadenes senzilles i altres en que es detecta millor el canvi en l'HD. Es tenyeix el DNA mitjançant tinció amb nitrat de plata emprant el sistema comercial *DNA Sylver Staining Kit* (Amersham Biosciences 17-6000-30).
 - Es posa el líquid fixador durant 20-30 min en agitació.
 - Es decanta el fixador i s'afegeix la solució de tinció (nitrat de plata) durant 20-30 min en agitació.
 - Es renta el gel amb H₂O_{dd} (1 min).
 - S'afegeix la solució de revelat (carbonat de sodi, tiosulfat de sodi i formaldehid) durant 5-10 min en agitació.
 - Quan ja es veuen les bandes ben definides es canvia la solució de revelat per una solució que atura la reacció. S'ha de deixar un mínim de 30 min en agitació, però es pot deixar o/n en aquesta solució.

S'analitzen els gels agrupant els diferents pacients segons els patrons de bandes i es seqüencia un fragment de cada patró anòmal. Un cop detectat el canvi en la seqüència, es confirma la mutació o polimorfisme en els altres pacients amb el mateix patró per digestió amb un enzim de restricció o per SSCP-HD. Si es disposa de la família també es realitza la segregació. De la mateixa manera, s'analitzen 100 cromosomes control per determinar si es tracta d'una mutació, com ja s'ha esmentat a l'apartat de

pacients.

22.4 ANÀLISI DEL DNA AMB ENZIMS DE RESTRICCIÓ

Els enzims de restricció són endonucleases bacterianes que presenten especificitat per a seqüències de DNA curtes i actuen trencant els enllaços fosfodiéster d'ambdues cadenes, partint la molècula de DNA. La digestió de DNA amb enzims de restricció es realitza seguint les instruccions de cada casa comercial. Generalment s'utilitzen entre 1 i 5 U d'enzim per μg de DNA i la reacció es du a terme, a la temperatura indicada, en una solució tamponadora òptima per l'enzim a una concentració final 1x. Cal tenir en compte que el volum d'enzim de restricció utilitzat no pot ser superior al 10% del volum final de digestió, ja que el glicerol que conté podria inhibir la reacció enzimàtica. Quan es tracta de digestions dobles o triples i els tampons dels enzims són incompatibles, el DNA digerit s'extreu del tampó i del primer enzim amb fenol-cloroform o bé es purifica amb un *kit* (veure apartat següent). És imprescindible consultar les condicions específiques per cada enzim, com la temperatura òptima, si necessita albúmina, o si té activitat *star*.

22.5 PURIFICACIÓ DE DNA

Els fragments de DNA es purifiquen per tal de poder fer lligacions, PCR de seqüenciació, per utilitzar-los com a sondes, etc. Existeixen molts protocols per purificar DNA, tant en solució com inclòs en gels d'agarosa. En aquesta tesi s'han utilitzat sistemes comercials, basats normalment en la combinació d'una membrana de sílica-gel i tampons amb moltes sals que permeten la unió del DNA i la posterior elució amb aigua. El procés de purificació permet extreure encebadors, nucleòtids, enzims, oli mineral, sals, agarosa, bromur d'etidí, i altres impureses de les mostres de DNA. Per a la purificació de DNA provinent de PCR s'ha utilitzat principalment *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen 28106) i *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen 28706), seguint les instruccions de la casa comercial. Per a la purificació de plàsmids s'han utilitzat *Qiaprep spin miniprep kit* (Qiagen 27106), *Wizard® Plus SV Miniprep* (Promega A1460) i *QIAGEN Plasmid Maxi kit* (Qiagen 12163). També es pot purificar amb fenol-cloroform (veure apartat 26.2)

22.6 ESTABLIMENT DE LÍNIES CEL·LULARS ESTABLES DE LIMFÒCITS HUMANS (LCL)

La doctoranda va immortalitzar limfòcits de famílies amb cistinúria i amb intolerància a proteïnes (LPI). L'establiment de línies permanents de limfoblasts és molt valuós en l'anàlisi molecular i en la caracterització de malalties genètiques humanes, perquè permet obtenir el material necessari per fer estudis genètics sense haver d'extreure sang dels pacients cada vegada. És útil partir d'obtenir suficient mRNA de pacients per estudiar mutacions d'*splicing* i delecions o insercions grans. S'immortalitzen els limfòcits B perifèrics de mostres de sang, amb el virus d'Epstein-Barr (EBV) segons el protocol de Neitzel (Neitzel 1986). El procés consisteix en extreure sang i posar-la en EDTA, separar els limfòcits B perifèrics en un gradient de Ficoll i infectar-los amb l'EBV en presència de ciclosporina A.

Materials:

- Limfòcits de sang perifèrica
- Virus d'*Epstein Barr* (EBV)
- medi RPMI

Procediment:

1. Es parteix de 10 mL de sang, que es mescla amb 5 mL de Ficoll en un falcon de 15 mL.
2. Es centrifuga a 1800 rpm 30 minuts (sense fre).
3. Queden 3 fases: a dalt el sèrum, al mig els limfòcits i a baix el Ficoll. Es recull la capa de limfòcits amb pasteur de plàstic, evitant emportar-se el Ficoll.
4. S'afegeix PBS fins a 15 mL.
5. Es centrifuga a 1100 rpm 10 minuts.

MATERIALS I MÈTODES

6. S'extreu el s/n aspirant i es ressuspèn el precipitat amb 10 mL de medi RPMI sense sèrum. Es dilueix perquè el sèrum conté moltes proteïnes que impedeixen que el virus interaccioni amb el seu receptor.
7. Es centrifuga a 2000 rpm 2 minuts.
8. S'aspira el s/n i es ressuspèn el precipitat suaument.
9. S'afegeix 1 mL d'una alíquota d'EBV prèviament descongelada i atemperada a 37°C, i es barreja amb la pipeta pasteur evitant formar bombolles.
10. S'incuba a T_{amb} (20-25°C) sota campana durant 2 hores, agitant el falcon cada 15-20 min per evitar que sedimentin les cèl·lules..
11. S'afegeixen 6 mL de medi RPMI amb 15% de sèrum.
12. S'afegeixen 10 μ L de ciclosporina (que inhibeix la divisió de les cèl·lules T, els fibroblasts, etc, però no de les B, que són els que interessa immortalitzar).
13. Es transfereixen el contingut del falcon a un flascó i s'incuba a 37°C durant 1-2 dies, sense tancar hermèticament.
14. Es canvia el medi: s'extreu de 6-7 mL de medi antic i s'afegeix el mateix volum de medi nou amb 15% de sèrum.
15. Es van mirant les cèl·lules cada setmana i canviant el medi, disminuint cada vegada el percentatge de sèrum.
16. Es congelen les cèl·lules i es mantenen en nitrogen líquid.

23 TÈCNIQUES GENERALS DE MANIPULACIÓ I DETECCIÓ DEL RNA

Per a la manipulació d'RNA s'han seguit les precaucions típiques per evitar l'acció de les RNAses, les solucions i el material utilitzats han de ser lliures d'RNAses. Per a aquest fi, cal prendre un seguit de mesures:

- ús de guants de cirurgia durant tot el procés.
- material de vidre esterilitzat per calor a 200°C durant un mínim de 4 hores.
- reactius reservats per aquest propòsit (lliures d'RNAses), manipulats amb guants i sense introduir-hi espàtules.
- material de plàstic estèril.
- solucions preparades amb desionitzada Milli-Q (Millipore) prèviament tractada amb DEPC (dietilpirocarbonat) 0.01% (s'incuba l'aigua desionitzada amb el DEPC durant 12 h a 37°C i amb agitació. S'autoclava per inactivar el DEPC que podria modificar químicament les purines de l'RNA).

Durant aquesta tesi s'ha manipulat l'RNA per la cerca de mutacions noves a *SLC7A9* i *SLC3A1* a pacients de cistinúria, i per veure l'efecte que tenien alguns canvis genòmics detectats prèviament pel mètode de SSCP-HD. Les tècniques utilitzades han estat principalment: Extracció d'RNA de sang perifèrica i RT-PCR.

23.1 EXTRACCIÓ DE RNA DE SANG

Aquesta extracció es basa en la descrita per Chomczynski i Sacchi (Chomczynski and Sacchi 1987). Els trets més destacats en són l'aïllament de leucòcits mitjançant una centrifugació amb Ficoll i la inactivació de les RNAses endògenes amb tiocianat de guanidini.

Materials:

- Ficoll (Amersham Biosciences 17-1840-02)
- PBS 1x
- H_2O_{dd} estèril
- *Rneasy Mini kit (20)* (Qiagen 74103) o *Tripure Isolation Reagent* (Roche 1667 165)

Procediment:

1. Es dilueixen 10 mL de sang amb 10 mL de Ficoll (Amersham Biosciences 17-1840-02) en un tub de 50 mL. S'hi afegeix poc a poc la sang diluïda per tal que no es barregin.
2. Se centrifuga 30 min a 770 x g (1800 rpm) a 20°C (sense fre). En aquest pas la temperatura és important per evitar que es trenquin els eritròcits i proporcionar una velocitat òptima d'agregació. Es formen 4 capes: la inferior conté els eritròcits agregats, la següent el Ficoll amb alguns granulòcits, la següent, bastant prima, els leucòcits, i la superior, el plasma diluït.
3. Es recull la capa de leucòcits amb una pipeta Pasteur de plàstic (travessant la fase superior) i es passa a un tub de 50 mL. S'afegeix PBS 1x fins a un volum de 50 mL i se centrifuga a 770 x g (2000 rpm) durant 10 min a 4°C.
4. Es decanta el sobrenedant. Aquí es pot aturar el protocol i conservar el precipitat a -80°C.
5. A partir d'aquí les mostres es mantenen en gel per evitar la degradació del RNA. Es pot fer l'extracció manual o amb el *Rneasy Mini kit* (20) (Qiagen 74103). També s'ha utilitzat la tècnica d'extracció de RNA de Tripure amb *Tripure Isolation Reagent* (Roche 1667 165)
6. Es redissol el precipitat en H₂O_{dd} estèril. En aquest cas no usem aigua-DEPC perquè sembla que les possibles restes de DEPC inhibeixen les PCR.
7. S'escalfa 2 min a 65°C. Se separen 1 µL per llegir l'RNA a l'espectrofotòmetre en una dilució 1/50 i 1 µL més per a veure'l en un gel d'agarosa no desnaturitzant (per a tenir una idea de si està degradat i de la possible contaminació de DNA, n'hi ha prou amb una electroforesi ràpida no desnaturitzant). Es guarda la resta a -80°C.

23.2 RT-PCR

Per a la cerca de mutacions, s'extreu RNA de sang perifèrica humana i es fa transcripció inversa per obtenir cDNA, el qual és analitzat mitjançant PCR i seqüenciació. Donat que *SLC7A9* i *SLC3A1* no s'expressen en leucòcits, cal aprofitar la transcripció il·legítima del seu RNA i, en alguns casos cal fer dues rondes de PCR. Per evitar l'amplificació d'inespecificitats deguda al gran nombre de cicles acumulats, s'empren diferents encebadors a la primera ronda de PCR que a la segona. S'utilitzen els mateixos encebadors que els descrits a l'apartat de materials i mètodes de l'article 3 (veure la secció de Resultats).

A continuació es detallen els encebadors de *SLC7A9* utilitzats per realitzar les diferents RT-PCR (taula 25):

Canvi proteïna	Canvi genòmic	Canvi RNA	Encebadors RT-PCR
p.L30fsX10	c.235+3_235+293del	[r.87_235del]	P6D12-P6R4
p.G105R	c.311G>A	[r.311g>a]	P6D13-P6R13
p.T123M	c.368C>T	[r.368c>u]	P6D13-P6R13
p.V170M	c.508G>A	[r.508g>a]	
p.L196_G202delfsX5	c.586C>T	[r.=/r.585_604del]	P6D9-P6B11
p.L160fsX1	c.614dupA	[r.479_704del226]	P6D9-P6R2
p.Y232C	c.695A>G	[r.695a>g]	P6D14-P6R3
p.R333W (p.T292_Y358del67, p.R327fsX2)	c.997C>T	[r.874_1074del201, r.978_1074del97]	P6D12-P6R4

Taula 25. Encebadors utilitzats per realitzar les RT-PCR de les 8 mutacions de *SLC7A9* de les quals disposàvem de RNA. Les seqüències dels encebadors estan en l'annex 1.

23.2.1 Eliminació del DNA genòmic

Prèviament a la síntesi de cDNA, en alguns casos cal eliminar el DNA genòmic arrossegat en l'extracció amb DNAsa lliure de RNAses.

Materials:

- *Deoxyribonuclease I, Regular & Amplification Grade* (Life Technologies 8068SA/18068015).
- RNA total procedent de limfòcits (2 µg)
- H₂O_{dd} estèril

MATERIALS I MÈTODES

- EDTA 20 mM

Procediment:

1. 1-5 μg RNA total, 1 μL Tampó 10X i 1 μL DNAsa (=1U), quantitat variable, segons el grau de contaminació de DNA genòmic.
2. Afegir $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ fins a un volum final de 10 μL .
3. Deixar a T_{amb} , durant 15 min.
4. Inactivar la DNAsa afegint EDTA (1 μL , per tal de tenir una concentració final >1 mM) i incubar a 65°C durant 10 min.

23.2.2 Transcripció inversa (RT, Retrotranscription).

Aquesta reacció consisteix en la síntesi de cDNA a partir de RNA missatger que actua com a motlle. L'enzim que s'utilitza és la Retrotranscriptasa i s'han seguit les instruccions que indica la casa comercial que el subministra (Farmacia 27-2166-01; Invitrogen 18064-014).

Materials:

- Oligo dT o hexàmers (pd(N₆), Farmacia 27-2166-01)
- Kit de retrotranscripció (Farmacia 27-2166-01; Invitrogen 18064-014)
- RNA total procedent de limfòcits (2 μg)
- Barreja de dNTPs 10 mM (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)
- $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ estèril

Procediment-kit *Superscript*:

1. Recuperar la mostra (11 μL) de RNA lliure de DNA genòmic, afegir 1 μL de pd(N₆) (Farmacia 27-2166-01) i desnaturalitzar la mostra a 70°C durant 10 min.
2. Col·locar la mostra en gel durant 2 min. Fer un pols.
3. Afegir 8 μL de mix: 4 μL tampó 5X, 2 μL DTT 0,1M, 1 μL dNTPs 10 mM, 1 μL Retrotranscriptasa. Es mescla bé.
4. Incubar 10 min a 25°C per afavorir l'anellament dels hexàmers.
5. Incubar la mostra a 42°C durant 2 min i afegir 1 μL Retrotranscriptasa i incubar 50 min.
6. Inactivar la reacció mitjançant la incubació a 72°C durant 15 min.
7. Amplificació del cDNA per PCR: Es realitza una PCR normal com s'especifica a l'apartat 22.2.1, posant de 2 a 3 μL de RT
8. Hem fet RT-PCR de pocs pacients. Per amplificar el gen *SLC7A9* hem utilitzat els encebadors llistats a la taula 25 d'aquesta secció.

24 TÈCNiques GENERALS DE MANIPULACIÓ DE BACTERIS I DE DNA PLASMÍDIC

El treball amb DNA o bacteris requereix la utilització de material estèril per evitar contaminacions amb DNAses, altres bacteris o DNA aliens. Aquest material s'esterilitza a l'autoclau a 1 atmosfera de pressió durant 20 minuts. La manipulació de bacteris es realitza al costat d'un bec Bunsen que proporciona una àrea de treball estèril i/o dins de campanes de flux laminar. Les solucions es preparen amb aigua ultrapura (sistema MiliQ de Millipore) i s'esterilitzen a l'autoclau o per filtració amb filtres de 0.22 μm de diàmetre de porus.

Les eines de manipulació de bacteris més emprades en aquesta tesi han estat:

- crivellatge de genoteques de DNA i de cDNA
- cultiu de bacteris amb plasmidis, i BAC
- preparació de DNA de plasmidi (*Qiaprep spin miniprep kit*, Qiagen 27106) i (*Qiagen Plasmid Maxi Kit*,

Qiagen 12163)

- transformació de bacteris amb plasmidis pel mètode d'electroporació (Dower et al. 1988)
- altres passos per al subclonatge de plasmidis (digestió, purificació, fosfatació i lligació)

24.1 CRIVELLATGE DE GENOTECA cDNA λZAP PER HIBRIDACIÓ

Per tal d'obtenir un cDNA sencer codificant per la proteïna b^{0,+}AT vam utilitzar una llibreria de cDNA de ronyó humà, *Uni-ZAP[®] XR Library* (Stratagene 937250). Aquesta llibreria conté els cDNA inserits dins del genoma del fag λ en el vector UniZAP XR enmig de la seqüència del vector *pBluescript SK(+/-)*, estalviant així el pas de subclonació des del vector Uni-ZAP cap a un vector plasmídic, ja que aquest es pot escindir fàcilment. A part d'això, la presència de la seqüència del vector pBluescript permet la selecció per color en base a l'α-complementació de les seqüències del gen LacZ presents al vector i a la cèl·lula hoste.

Els vectors basats en el fag λ són molt útils per construir genoteques i llibreries de cDNA ja que tenen capacitat per a inserts molt grans, de fins a 20 kb en alguns casos. En el nostre cas concretament, el vector que hem utilitzat permet incloure inserts de fins a 10 kb, mida prou gran com per possibilitar la obtenció d'un cDNA amb la seqüència completa.

Els passos que s'han seguit per obtenir un cDNA complet a partir d'una llibreria basada en el fag λ són els següents:

1. Titulació de la llibreria
2. Plaueig de la llibreria per obtenir calbes fàgiques
3. Transferència de les calbes a una membrana de niló o nitrocel·lulosa
4. Crivellatge de la llibreria per hibridació de la membrana amb una sonda específica homòloga a una regió del cDNA d'interès
5. Identificació de les calbes positives i amplificació d'aquestes per fer un crivellatge secundari
6. Escissió del fagèmid pBluescript SK(-) del vector Uni-ZAP[®] XR
7. Obtenció del plàsmid i comprovació de la seva seqüència

Materials generals:

- Llibreria de cDNA de ronyó humà construïda en el vector **Uni-ZAP[®] XR**

- Bacteris **XL1-Blue MRF'**: aquesta soca d'*E. coli* és sensible a l'infecció per fag λ de la llibreria i també per bacteriòfags del tipus filamentós (M13 o f1) ja que conté l'episoma F', que entre altres coses permet la formació del pili F', necessari per a l'infecció d'aquest darrer grup de fags. És en aquestes cèl·lules on creix i s'amplifica la llibreria, i on es produeix l'escissió del fagèmid pBluescript SK(-) amb l'ajuda de l'infecció pel fag ajudant f1 ExAssist. En l'episoma F' també hi ha les seqüències que permeten la α-complementació LacZ esmentada anteriorment. Són resistents a l'antibiòtic Tetraciclina.

- Bacteris **SOLR**: aquesta soca d'*E. coli* és resistent a l'infecció per fag λ i té fenotip no supressor, que impedeix la replicació a certs fags filamentosos (que continguin una mutació "amber"). S'utilitzen per acollir el fagèmid escindit i per permetre la seva replicació com a plàsmid que podrà ser recuperat i analitzat sense interferències per contaminacions creuades provinents d'altres fags. Són resistents a l'antibiòtic Kanamicina.

- Fags f1 ajudants: D'aquests n'hi ha dos tipus, tot i que nosaltres només hem utilitzat el primer:

- **ExAssist[™]**: Aquest és un fag filamentós de tipus f1, que permet l'escissió del fagèmid pBluescript. Aquest fag pot infectar la soca XL1-Blue MRF'. Si l'infecció es dona conjuntament amb aquest i un fag λ de la llibreria, les proteïnes f1 que proporciona el fag ajudant permeten la síntesi d'una cadena de DNA complementària a la regió que hi ha entre la seqüència f1 i la de terminació, en el genoma del fag λ. Entre aquestes dues regions és on hi ha inserida la seqüència del vector pBluescript SK amb el cDNA com a insert. Per tant es forma un DNA de cadena simple que correspon al plàsmid pBluescript amb l'insert, que es circularitza i s'encapsida gràcies a proteïnes del fag ajudant, com si es tractés d'un fag filamentós. Si s'infecta la soca SOLR amb aquest nou fag, aquest es replica com a plàsmid circular de cadena doble, conservant però, la regió f1 d'origen de replicació del fag. El fag ExAssist no pot replicar-se en la soca SOLR, ja que té una mutació "amber" que no li permet replicar-se en soques amb fenotip no supressor, evitant així contaminacions.

- **VCSM13**: Aquest fag filamentós M13 sí que es pot replicar en la soca SOLR, i permet la obtenció de DNA de cadena senzilla corresponent a la seqüència del vector pBluescript i l'insert. La obtenció de DNA

MATERIALS I MÈTODES

de cadena senzilla pot ser útil per obtenir sondes, o fer mutagènesi dirigida, però nosaltres no l'hem utilitzat en aquest treball.

Tant els fags com els bacteris s'han de mantenir a -80°C

24.1.1 Titulació de la llibreria

Conèixer el títol de la llibreria és essencial a l'hora de començar el crivellatge, hem de conèixer el nombre d'unitats formadores de plaques o calbes (pfu) que hi ha per mil·lilitre de llibreria. I això és important a l'hora de plaquejar els virus a una dilució determinada que permeti una anàlisi còmoda i fiable sense que les calbes formades es solapin.

Materials:

- Llibreria de ronyó humà Uni-ZAP® XR
- Tampó SM autoclavat: 0,1 M NaCl; 8 mM MgSO₄; 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,01% gelatina.
- Medi Luria-Bertani Broth (LB): 10 g de triptona, 5 g d'extracte de llevat, 5 g NaCl. Afegir fins a 1 L H₂O_{dd} i ajustar pH a 7,4 amb 5N NaOH. Autoclavar. Deixar refredar fins a uns 65°C i afegir Tetraciclina (Tc).
- Cultiu dels bacteris XL1-Blue MRF' en 10 mL d'LB amb 50 µg/mL de Tetraciclina, 10 mM MgSO₄ i 0,2% Maltosa
- Plaques de medi LB: afegir 20 g d'agar a 1 L de LB abans d'autoclavar: 5 plaques de 10 cm Ø amb LB-Agar i Tc a 50 µg/mL (la Tc s'afegeix després d'autoclavar, a uns 65°C).
- Top agar: LB amb 0,7% agarosa

Procediment:

1. Es preparen una sèrie de dilucions dels fags λ de la llibreria en tampó SM. El títol aproximat que dóna la casa comercial és de l'ordre d' $1,6 \times 10^{10}$ pfu/mL. Aproximadament, volem obtenir dues plaques amb 100 calbes, dues amb 500 calbes i una amb 1000 calbes. Per tant, es fa una dilució 1/1000 de la llibreria, i d'aquesta es fa una 1/100. D'aquesta dilució darrera, que anomenem dilució -5, es sembra 1 µl per les plaques de 100 calbes, 3 µl per les plaques de 500 i 6 µl per la placa de 1000 calbes.
2. Es centrifuguen els bacteris del cultiu 10 minuts a 2000 rpm, i es ressuspenen les cèl·lules en MgSO₄ 10 mM. El volum amb què es ressuspenen els bacteris depèn del creixement que hi ha hagut durant la nit, ja que diluïm els bacteris amb MgSO₄ 10 mM fins assolir una OD₆₀₀ = 0,5.
3. Es preparen 5 *ependorfs* (un per cada placa) amb 200 µl de bacteris, i aquí s'afegeixen els µl de fag λ que calguin per obtenir els diferents tipus de plaques esmentades en el punt 1.
4. Es deixen 15 minuts de contacte a 37°C entre els bacteris i els fags.
5. Es preparen 15 mL de Top Agar, es fon al microones, i s'aliquota en 5 tubs amb 3 mL en cada un, que és el volum que afegim a cada placa. Per evitar que solidifiqui, mantenim el top agar en un bany a 44°C.
6. Passats els 15 minuts de contacte, s'afegeixen els bacteris i fags en el seu corresponent tub amb top agar, es barregen i es diposita la mescla ràpidament sobre la placa adequadament rotulada indicant la dilució del fag.
7. Es deixen 10 minuts a T_{amb} perquè es solidifiqui el top agar sobre la placa, s'incuba a 37°C cap per avall com una placa normal. Les calbes de lisi són visibles al cap de 6 o 8 hores.
8. Al dia següent es compten les calbes que han aparegut en cada placa, i tenint en compte la dilució de la llibreria sembrada, s'obté el títol real de la llibreria. En el nostre cas, vem obtenir un títol de 8×10^9 pfu/mL.

24.1.2 Plaqueig de la llibreria

Un cop conegut el títol de la llibreria, es pot començar la cerca del cDNA del nostre interès. Cal fer una petita amplificació de la llibreria, per permetre que es formin calbes de lisi que posteriorment seran analitzades. En el nostre cas, vam analitzar un total de 10^6 pfu de la llibreria, plaquejades en 20 plaques de 15 cm Ø amb 50.000 pfu per placa.

Materials:

- Llibreria de ronyó humà Uni-ZAP® XR
- Cultiu dels bacteris XL1-Blue MRF' en 10 mL d'LB amb 50 µg/mL de Tetraciclina, 10 mM MgSO₄ i 0,2% Maltosa
- 20 plaques de 15 cm Ø amb LB-Agar i Tetraciclina a 50 µg/mL
- Top agar: LB amb 0,7% agarosa

Procediment:

1. Se centrifuguen els bacteris del cultiu 10 minuts a 2000 rpm i els ressuspenem en MgSO₄ 10 mM fins assolir una OD₆₀₀ = 0,5.
2. Es preparen 20 tubs corning (un per placa), on hi barregem 50.000 pfu amb 600 µl de bacteris en cada un. En el nostre cas, per cada placa vam utilitzar 6,25 µl de la dilució 1/1000 de la llibreria.
3. Es deixen 15 minuts a 37°C perquè es doni el contacte entre bacteris i virus.
4. Es preparen 8 mL de top agar per placa i es deixen al bany a 44°C.
5. Passats els 15 minuts, s'afegeixen 8 mL de top agar a cada tub on hi havia els bacteris i els fags, es barregen i es diposita la mescla amb cura sobre cada placa de 15 cm Ø.
6. Es deixen 10 minuts a T_{amb} perquè solidifiqui el top agar, i s'incuben les plaques a 37°C.
7. Durant tot el dia, es va controlant l'aparició de calbes de lisi, i quan ja són prou aparents (al cap de 6-8h), cal desar les plaques a la nevera per evitar que hi hagi contaminacions creuades entre clons, ja que si segueixen creixent es podrien solapar les calbes de lisi.

24.1.3 Transferència a una membrana de niló a partir de placa

Per identificar la presència d'un clon de cDNA del nostre interès en la llibreria de ronyó, cal fer un crivellatge d'aquests clons que hem plaquejat, amb una sonda radioactiva específica homòloga a aquest cDNA. Per fer-ho, cal transferir a una membrana el DNA contingut en els fags de les calbes de lisi formades en la placa, per hibridar-la després amb la sonda radioactiva.

Materials:

- Llibreria de cDNA de ronyó humà Uni-ZAP® XR plaquejada en 20 plaques de 15 cm Ø
- Membrana de niló Hybond-N+ (Amersham Biosciences RPN303B)
- Paper Whatmann 3MM
- Tampó de desnaturalització: 1,5 M NaCl i 0,5 M NaOH
- Tampó de neutralització: 1,5 M NaCl i 0,5 M TrisHCl pH 8
- Tampó SSC 2x amb 0,2 M Tris-HCl pH 7,5

Procediment:

1. Es posa a 4°C les 20 plaques de 15 cm Ø amb la llibreria plaquejada quan les calbes de lisi encara no es solapen entre elles. Abans de començar el procés de transferència, es deixen atemperar les plaques a T_{amb}.
2. Es talla les membranes a la mateixa mida que les plaques per poder transferir totes les calbes. Es fan 2 rèpliques, és a dir 2 membranes, de cada placa i verificar la presència de clons positius en ambdues membranes.
3. S'obre una placa i es diposita la primera membrana sobre l'agar, amb pinces i molta cura de no deixar bombolles. Es deixa impregnar la membrana durant 2 minuts sobre l'agar, i es marquen amb una agulla 4 punts asimètrics de referència travessant la membrana i foradant també l'agar. Aquestes marques ens permetran orientar adequadament la membrana sobre la placa quan haguem de recuperar els clons positius. També es marquen amb llapis la membrana per indentificar la cara que conté el DNA. Passats els 2 minuts, es retira la membrana amb molta cura i es diposita sobre un paper Whatmann amb la cara del DNA mirant cap a dalt. Es col·loca la segona membrana de la mateixa manera i es deixa 4 minuts sobre l'agar. Es marca amb l'agulla la

MATERIALS I MÈTODES

segona membrana per els mateixos punts on ja hi ha els forats de l'agar corresponents a la primera membrana. Es repeteix el procés amb totes les plaques, fins a obtenir 40 membranes.

4. Es guarden les plaques 4°C.
5. Es prepara 1 safata amb un paper Whatmann impregnat de tampó de desnaturalització, dues amb un paper Whatmann impregnat de tampó de neutralització i una sense Whatmann, amb tampó SSCx2 i TrisHCl 0,2 M.
6. Es dipositen les membranes 6 minuts sobre el paper Whatmann de la safata que conté el tampó de desnaturalització, 3 minuts en la primera safata de tampó de neutralització, 3 minuts en la segona i una esbandida ràpida en la safata que conté tampó SSCx2 i Tris. Sempre amb la cara del DNA mirant cap a dalt. Es deixen sobre un paper Whatmann sec durant 20 minuts a T_{amb} .
7. Es posen les membranes al forn, protegides amb el paper de la casa comercial, entre dos vidres, durant 2 hores a 80°C per fixar el DNA. Passat aquest temps, les membranes es poden guardar a T_{amb} entre papers Whatmann.

24.1.4 Hibridació de les membranes amb una sonda específica

Un cop tenim les membranes amb el DNA fixat, aquestes són hibridades amb una sonda radioactiva específica homòloga a una regió ja coneguda del cDNA d'interès. Per fer la sonda de P6 (*SLC7A9*) vem utilitzar els encebadors P6D6 i P6R4; i per a P5 (*SLC7A10*) vem utilitzar els encebadors P5D13 i P5R1. Les zones de la membrana on hi ha DNA provinent de clons de la llibreria positius pel DNA d'interès, apareixeran com una marca radioactiva corresponent a la calba de lisi positiva, que és fàcilment recuperable gràcies a les indicacions de referència que hem marcat tant en les membranes com en les plaques.

Materials:

- Membranes de niló amb el DNA de les calbes de lisi transferides fixat
- Tampó SSCx20
- SDS 10%
- Tubs d'hibridació de tipus Roler
- Sonda de DNA marcada amb dCTP $\alpha^{32}P$ pel mètode de *Random Priming* amb l'enzim Klenow polimerasa
- Tampó de prehibridació: Tampó Denhard's x5; DNA d'esperma de salmó 50 μ g/mL; tampó fosfat 50 mM pH 6,8; Pirofosfat 0,1%; SSCx4; SDS 0,5%; Heparina 4% (p/v).
- Tampó d'hibridació: Tampó de prehibridació amb Dextran sulfat 10%.
- Cassets d'exposició, films fotogràfics i líquids de revelat

Procediment:

1. Es mullem les membranes amb el DNA fixat en tampó SSCx2.
2. S'introdueixen les membranes en tubs d'hibridació. Les membranes poden apilar-se i introduir-se en els tubs, així no cal utilitzar-ne tants. En el nostre cas, vam fer piles de 5 membranes i en vam introduir 2 en cada tub.
3. Es Posa 12,5 mL de tampó de prehibridació per tub i es deixa 2 h a 65°C en el forn d'hibridació.
4. En aquesta estona es pot procedir a la desnaturalització de la sonda marcada durant 5 minuts a 98°C.
5. Després de les 2 hores de prehibridació, es substitueix el tampó de prehibridació pel d'hibridació: es prepara la dilució de sonda que volem utilitzar en tampó d'hibridació; nosaltres vam preparar una dilució de 2×10^6 cpm/mL de tampó i en vam utilitzar 12,5 mL per cada tub.
6. Es deixa hibridant o/n a 65°C al forn d'hibridació.
7. Després de la hibridació, es recupera el tampó per reutilitzar la sonda (que es pot guardar a -20°C) i es comencen a fer els rentats de les membranes. Després de cada rentat es treuen les membranes del tub d'hibridació i es posen sobre paper Whatmann per controlar amb un comptador Geiger el nivell de radioactivitat per assegurar-nos que s'estan rentant correctament. Després les tornem a apilar i les introduïm de nou al tub per fer el següent rentat.

Primer rentat amb SSCx2 i SDS 0,1%, 15 minuts a T_{amb}.
 Segon rentat amb SSCx1 i SDS 0,1%, 15 minuts a 52°C.
 Tercer rentat amb SSCx0,5 i SDS 0,1%, 15 minuts a 52°C.
 Quart rentat amb SSCx0,2 i SDS 0,1%, 15 minuts a 52°C.
 Cinquè rentat amb SSCx0,2 i SDS 0,1%, 15 minuts a 60°C.
 Últim rentat amb SSCx0,1 i SDS 0,1%, 15 minuts a 65°C.

8. Es posen les membranes sobre un paper Whatmann per treure l'excés de líquid, i s'emboliquen amb paper de plàstic (glad) amb la pantalla intensificadora d'un casset d'exposició fotogràfica. Es col·loca un film i es deixa exposant a -80°C. Al cap de 2 o 3 dies es pot revelar.
9. Es marquen les calbes positives que es troben en la mateixa posició en les dues membranes rèplica de cada placa. Aquestes són les calbes que s'utilitzaran per fer el crivellatge secundari.

24.1.5 Crivellatge secundari

Un cop hem identificat les calbes positives del crivellatge primari de la llibreria, procedirem a la recuperació i amplificació d'aquestes per fer un crivellatge secundari. Aquest segon crivellatge ens permetrà treballar amb una dilució més gran de la llibreria que ens assegurarà la identificació de clons individuals. Gràcies a les marques fetes amb l'agulla sobre les membranes i les plaques d'agar del crivellatge primari, és fàcil orientar els films sobre les plaques corresponents utilitzant un transil·luminador de llum blanca, i identificar així sobre la placa quines són les calbes positives. Recuperem aquestes calbes, les tornem a plaquejar com hem fet en el plaqueig del crivellatge primari, transferim les noves plaques, hibridem les noves membranes i identifiquem els clons positius resultants de tot el procés.

Materials:

- Films revelats del crivellatge primari
- Llibreria Uni-ZAP®XR plaquejada del crivellatge primari
- Tampó SM autoclavat: 0,1 M NaCl; 8 mM MgSO₄; 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,01% gelatina.
- Cloroform
- Plaques de 10 cm Ø d'LB-agar amb Tetraciclina 50 µg/mL
- Top agar: LB amb 0,7% agarosa
- Cultiu de bacteris XL1-Blue MRF' centrifugat i ressuspès amb MgSO₄ 10 mM a una OD₆₀₀=0,5
- Material per transferència i per hibridació de les membranes (veure apartats anteriors)

Procediment:

1. Se situen els films sobre un transil·luminador de llum blanca sota les plaques orientant-los segons les marques de referència fetes a les membranes i a les plaques. S'identifiquen els clons positius i amb una pipeta Pasteur de plàstic estèril, es piquen els clons emportant-nos l'agar de la placa corresponent a les calbes de lisi positives.
2. Es diposita el tros d'agar en un *ependorf* que conté 1 mL de tampó SM, i s'hi afegeix 20 µl de cloroform per matar els bacteris que haguem pogut picar. Es fa vòrtex per dissoldre bé la mescla de fags recuperats.
3. S'analitzen les calbes picades per PCR per descartar les que no donin una banda amplificada corresponent al cDNA d'interès. En el nostre cas, vam recuperar 38 clons positius del crivellatge primari, i en vam realitzar una PCR amb encebadors corresponents a una regió de l'extrem més 5' conegut del cDNA d'interès. Vam escollir 9 clons que donaven una senyal prou clara en la PCR. Aquests 9 clons van ser sotmesos al crivellatge secundari.
4. Es fan dues dilucions dels clons per plaquejar el crivellatge secundari. Vam diluir 1/1000 i 1/10000 els fags recuperats amb tampó SM. Vam plaquejar 2 µl de la dilució amb 200 µl de cèl·lules XL1-Blue MRF', en plaques de 10 cm Ø. En total, obtenim 18 plaques de 10 cm Ø, corresponents a 9 clons i dues dilucions de cada un. És recomanable anar controlant l'aparició de calbes de lisi per posar a la nevera les plaques on les calbes siguin prou grans, per evitar el solapament. De totes maneres, en aquest pas els fags ja estan molt diluïts i difícilment passarà això, sinó que caldrà incubar tota la nit a 37°C.

MATERIALS I MÈTODES

5. Es transfereixen les calbes a membranes de niló, i s'hibriden aquestes noves membranes. Un cop finalitzat el crivellatge, podem identificar els clons positius i recuperar-los de les plaques del crivellatge secundari com hem fet al punt 1 d'aquest apartat. En aquest cas, degut a que vam plaquejar els clons molt més diluïts que en el crivellatge primari, les calbes estan prou separades com per garantir que estem recuperant només el clon positiu desitjat sense contaminació per altres clons.
6. Es realitza de nou una PCR per amplificar el cDNA d'interès, sobre els clons recuperats del crivellatge secundari. Escollim els clons que ens donin una banda més intensa per posteriors anàlisis.

24.1.6 Escissió del fagèmid pBluescript SK(-) del vector Uni-ZAP® XR

En el vector Uni-ZAP® XR s'ha clonat la zona d'inici de la síntesi de DNA i de finalització del fag f1 a l'inici i al final del vector pBluescript. En co-infectar les cèl·lules XL1-Blue MRF' amb el fag positiu de la llibreria i amb un fag ajudant f1 (ExAssist), aquest darrer aporta les proteïnes necessàries per a l'escissió: es produeix un tall en una de les cadenes en la regió f1 i es sintetitza DNA fins a trobar el senyal de terminació. Aquest DNA de cadena simple es circularitza, i correspon a la seqüència del vector pBluescript amb l'insert de cDNA de ronyó, i la regió de replicació i terminació f1. Les senyals d'empaquetament també es troben en la zona de finalització de la síntesi, amb la qual cosa el fagèmid es secreta fora dels bacteris com si es tractés d'un fag filamentós. Si aquest fag infecta la soca de bacteris SOLR, s'hi replicarà com a plàsmid, que es podrà recuperar fent una miniprep per analitzar-lo.

Materials:

- Clons positius del crivellatge secundari, recollits en tampó SM i cloroform
- Fag ajudant ExAssist
- Cultiu de bacteris XL1-Blue MRF' en LB + tetraciclina 50 µg/mL, maltosa 0,2% i MgSO₄ 10 mM, centrifugat i resuspès amb MgSO₄ 10 mM fins a una OD₆₀₀ = 1
- Cultiu de bacteris SOLR en LB + kanamicina 75 µg/mL, maltosa 0,2% i MgSO₄ 10 mM; centrifugat i resuspès amb MgSO₄ 10 mM fins a una OD₆₀₀ = 1
- LB autoclavat
- Plaques d'LB-agar amb ampicilina 100 µg/mL

Procediment:

1. Es realitza la co-infecció dels bacteris XL1-Blue MRF' en un tub estèril de 10 mL on es barregen 200 µl de bacteris, 250 µl del fag positiu de la llibreria i 1 µl del fag ajudant ExAssist. Això fem per cada un dels fags positius escollits del crivellatge secundari.
2. S'incuba la mescla 15 minuts a 37°C perquè es doni la coinfecció.
3. S'afegeixen 3 mL d'LB i es deixen els tubs a 37°C durant 3 hores perquè es produeixi l'escissió.
4. S'escalfen els tubs a 70°C durant 20 minuts per matar els bacteris, i es centrifuguen 15 minuts a 1000 g per precipitar les restes cel·lulars. En els sobrenedants obtinguts hi haurà els fagèmids escindits.
5. Es preparen dos sèries d'*ependorfs* per infectar els bacteris SOLR amb aquests fagèmids: en una sèrie hi posem 200 µl de bacteris SOLR en MgSO₄ 10 mM i 100 µl de cada sobrenedant, i en l'altra sèrie hi posem 200 µl de bacteris i 10 µl de sobrenedant.
6. S'incuba 15 minuts a 37°C perquè es doni la infecció.
7. Es plaqueja el contingut dels *ependorfs* en plaques d'LB-agar amb ampicilina. Només les cèl·lules que hagin rebut el DNA de pBluescript podran créixer en aquest medi.
8. Es deixen les plaques a 37°C o/n, i l'endemà veurem l'aparició de colònies de bacteris.
9. Es piquen les colònies de bacteris i es preparen cultius de cada un, per obtenir una preparació del plàsmid fent miniprep i també per guardar estocs en glicerol de cada clon que resulti positiu definitivament.

Analitzem els clons per PCR, digestió i seqüenciació. Escollim el clon positiu que contingui la ORF sencera del cDNA del gen d'interès, i en fem estocs de cultiu en glicerol que guardem a -80°C.

24.1.7 Obtenció de DNA plasmídic a partir de cultius bacterians

Per tal de purificar plasmidis a partir de cultius bacterians s'utilitzen diferents *kits* comercials en funció de la quantitat i la qualitat de DNA que es necessiti. Així, si es necessiten preparacions a petita escala per a finalitats analítiques es fan minipreparacions (Qiagen 27106). Si cal obtenir quantitats d'entre 1-5 mg de DNA plasmídic purificat s'utilitzen els *kits* de maxi o mega-preparacions (Qiagen 12163 i 12191, respectivament).

25 GENERACIÓ D'UNA CONSTRUCCIÓ PER AL *KNOCKOUT* DE *SLC7A8*

L'esquema dels subclonatsges per obtenir la construcció estan en la figura 29 de la secció de Resultats.

25.1 OBTENCIÓ DELS BRAÇOS D'HOMOLOGIA DEL VECTOR PER PCR LLARGA

No va ser possible recuperar els fags en condicions, després d'haver estat més de 2 anys en nevera i es va decidir fer la construcció a partir de fragments obtinguts per PCR llarga:

Materials:

- ~ 100 ng DNA genòmic de cèl·lules ES derivades de ratolins de la soca 129P2/OlaHsd.
- V_i/10 tampó 10x de *Expand high fidelity PCR system*
- 200 mM de cada dNTP
- 0,35 μM de cada encebador
- DNA polimerasa⁽⁴⁾
- H₂O_{dd} estèril⁽⁵⁾

Procediment:

1. Es realitza un PCR llarga amb els encebadors mL2kF3 i mkBER2 (braç esquerra, BE: 6,1kb), i mL2kF6 i mkBDR2b (braç dret, BD: 3,2kb).

Braç	Encebador	Seqüència encebador (5' > 3')	Mida	X	Y	Z	Condicions especials
BE	mL2kF3	AGGTCCTGCATTGCCGGGTA	6,1 kb	58	8 min	2	<i>Expand High Fidelity Taq polymerase</i>
	mkBER2	TCAGGTACTTTCTTGCTCGC					
BD	mL2KF6	GTTTATCCACAGCCATTGTAG	2,7 kb	56	3 min	2	<i>Expand High Fidelity Taq polymerase</i>
	mkBDR2b	ACAACCTTCCCGTACCACT					
Ctrl +	mL2kF3	AGGTCCTGCATTGCCGGGTA	3,2 kb	56	6 min	2	<i>Expand High Fidelity Taq polymerase</i>
	mkBER3	ATCGCCTCCACCTCCCTTA					

Taula 26. Condicions de les PCR llargues per obtenir els braços d'homologia de la construcció pel *knockout* de *Slc7a8*. X, Y, Z són els paràmetres de la PCR senyalats a l'apartat 22.2. BE, braç d'homologia esquerra; BD, braç d'homologia dret; Ctrl+, control positiu pel crivellatge de cèl·lules ES recombinants (apartat 26.3).

2. Electroforesi en gel d'agarosa al 0,8%
3. Purificació de DNA de gel d'agarosa amb *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen 28706).

25.2 ENZIMS UTILITZATS PER SUBCLONAR

Quan es generen construccions de fragments de DNA en plasmidis és necessari l'ús diferents enzims. En aquest treball s'han utilitzat enzims de restricció, que tallen el DNA en llocs específics; la fosfatasa alcalina, que talla el fosfat de l'extrem 5' d'un fragment de DNA i evita la relligació del fragment; la T4 DNA lligasa, que uneix fragments de DNA amb extrems compatibles; i la subunitat Klenow de la DNA polimerasa, que transforma un extrem protuberant en un fragment de DNA rom. Aquests enzims han estat utilitzats seguint les instruccions determinades per les cases comercials que els subministren.

MATERIALS I MÈTODES

25.3 DESFOSFORILACIÓ DELS INSERTS (FRAGMENTS D'HOMOLOGIA)

S'ha utilitzat la *Alkaline phosphatase* (PA) (Roche 0713023) i la *Shrimp alkaline phosphatase* (SAP) (Roche 1758250) que desfosforilen els fosfats 5' dels extrems del DNA.

Materials:

- Vector digerit (per evitar que es relligui)
- Tampó 1x
- Fosfatasa: *Alkaline phosphatase* (Roche 0713023); *Shrimp alkaline phosphatase* (Roche 1758250)

Procediment:

1. Es prepara la mescla fins a un V_f de 50 μL :

Reacció de lligació	
DNA de la digestió	25 μL
Tampó 10X	5 μL
Fosfatasa	1 μL
H ₂ O _{dd} estèril	19 μL

2. S'incuba a 37°C durant 1h.
3. S'inactiva l'enzim a 65°C durant 10 minuts (SAP) o s'extreu l'enzim per purificació en columnes de *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen 28106) (AP).

25.4 LLIGACIÓ

Quan tenim tallades dues bandes que volem lligar, cal purificar-les (*kit* de purificació de DNA a partir de gels d'agarosa), i es quantifica el DNA en un gel d'agarosa i el marcador VII, per fer les lligacions a diferents proporcions de vector i insert (3:1, 2:1, 1:1, 1:2). S'han utilitzat tres T4 DNA lligases (Roche 481220; New England Biolabs M0202S)

Materials:

- Vector digerit i desfosforilat
- Insert digerit
- Tampó de lligació 1x
- T4 lligasa (Roche/New England Biolabs)

Procediment:

Normalment s'han de provar diferents proporcions de vector i insert per trobar les condicions més eficients de lligació. En general es fa en un volum final de 10 μL , amb tampó de lligació 1x (1mM ATP final) i amb 1 U d'enzim T4 lligasa, s'afegeixen el/s DNA/s a lligar i s'incuba durant 4-12h a 4°C, 16°C o 37°C. Es convenient tenir aliquidat el tampó de lligació degut a la labilitat de l'ATP, que es degrada al cap d'uns quants cicles de congelació i descongelació.

En la lligació d'extrems roms s'utilitzen agents que la facilitin, per exemple polietilenglicol o més quantitat de lligasa (veure manuals).

Els productes de PCR poden ser lligats directament en els vectors-T gràcies a l'activitat de la *Taq* DNA polimerasa, que afegeix dATP als extrems 3'OH de les cadenes que sintetitza durant la reacció d'amplificació del fragment. En el cas d'utilitzar una altra DNA polimerasa que no afegeix adenines, es poden afegir després de la PCR afegint al tub *Taq* DNA polimerasa i incubant a 74°C 10 min. De totes maneres, aquesta peculiaritat de la *Taq* DNA polimerasa pràcticament no es dona quan els extrems 5' dels encebadors presenten nucleòtids dCTP o dGTP (Costa *et al.* 1994). En el meu cas, només l'encebador mL2kF6 (taula 26) presenta una guanina a l'extrem 5'; la subclonació del fragment mL2kF6-mkBDR2b fou més difícil, però finalment es va poder realitzar.

Per fer la lligació usem la T4 DNA lligasa (Roche/New England Biolabs), i fem un volum de 10 μL de lligació. Fem la següent reacció:

Reacció de lligació	
5x Tampó Lligasa	2 μ L
Vector	X μ L
Insert	Y μ L
Lligasa T4	1 μ L
H ₂ O _{dd} fins a	10 μ L

Cal barrejar molt bé el tampó de la lligasa, ja que té moltes sals, que tendeixen a precipitar. Els cicles de congelació-descongelació poden malmetre'l, per això, cal tenir-lo congelat en petites alíquotes.

Incubació en bany d'aigua a 16°C o/n (aquesta lligasa només funciona a 16°C no es pot utilitzar a 4°C).

25.4.1 Lligació amb pGEM-T

Per obtenir les dianes d'interès per poder clonar els productes de PCR purificats en els vectors cedits pel Hans Burghardt, del nostre grup, es van lligar els fragments directament al vector pGEM-T sense necessitat de digestió prèvia amb enzims de restricció.

Materials:

- T4 DNA Lligasa (Roche 0481220; New England Biolabs M0202S)
- insert
- pGEM[®]-T Easy Vector System I (Promega A1360)

Procediment:

1. Afegir A's als extrems amb Taq polimerasa normal, perquè Taq bifi no n'afegeix
2. Purificar en gel agarosa 1%
3. Lligar o/n 4°C (el vector pGEM-T conté timidines als extrems que s'anellen a les Adenines de l'insert). Es pot fer la lligació en 1 h a T_{amb}, però, la major eficiència s'obté a 4°C tota la nit. Per saber la quantitat d'insert que s'ha d'afegir a la reacció es pot utilitzar la següent fórmula (el T-vector està a 50 ng/ μ L): (ng vector x Kb insert/kb vector) x ratio insert:vector = ng insert.
4. Fer la reacció: Es poden provar altres proporcions de lligacions, però sempre cal fer un control negatiu de lligació, on es relligarà T-vector, i ens permetrà comprovar que la lligació ha funcionat

Lligació amb pGEM-T			
Components	3:1	1:1	Ctrl -
2x llig.tampó	5 μ L	5 μ L	5 μ L
T-easy vector	1 μ L	1 μ L	1 μ L
Producte PCR	3 μ L	1 μ L	-
Lligasa(Promega)	1 μ L	1 μ L	1 μ L
H ₂ O _{dd} estèril	-	2 μ L	3 μ L

5. Cal fer la selecció de cèl·lules transformades per la resistència a ampicil·lina, ja que T-vector té el gen ApR, així en plaques de LBAp50 creixeran tant cèl·lules amb vector sense insert com cèl·lules amb vector recombinant. El vector-T permet realitzar la selecció blau-blanc en presència de IPTG i X-gal.
6. Analitzar aquests transformants és molt fàcil, només cal una digestió amb l'enzim de restricció *EcoRI*, que alliberarà l'insert en cas d'un plàsmid recombinant, o bé linealitzarà T-vector wt (3 Kb).

25.4.2 Obtenció de bacteris competents i transformació

Per tal de mantenir i amplificar plasmidis, aquests s'han transformat en la soca d'*Escherichia coli* DH5 α (Bethesda Research Laboratories, 1986) o XL1-Blue F'. Els bacteris usats s'anomenen competents perquè

MATERIALS I MÈTODES

han estat sotmesos a un procés de sensibilització a la transformació. Un cop els bacteris són transformats, aquests es fan créixer en plaques amb antibiòtic, on només creixeran els bacteris que hagin incorporat el DNA plasmídic exogen.

En el present treball s'han obtingut bacteris competents per a la transformació per xoc elèctric per mitjà d'un electroporador, seguint el protocol que es detalla en el manual d'instruccions. L'elecció d'un o altre mètode depèn de la quantitat de DNA a transformar. Generalment, hem utilitzat la transformació per electroporació quan el DNA prové d'una lligació complicada.

25.4.2.1 Preparació de bacteris competents per electroporació

Materials:

- XL1-BlueF'
- LB: 20 g de bactotripton, 10 g d'extracte de llevat i bacteris, 20 g de NaCl; enrasar fins a 2 L amb H₂O_{dd}. S'afegeixen 20 g d'agar per litre de LB en cas de fer plaques de LB agar.
- Stock de tetraciclina (5 mg/mL): 0,2g, 40 mL de etanol absolut. Protegir de la llum. Es congela a -20°C
- Glicerol 10%: 5 mL glicerol 100%, 45 mL H₂O_{dd}
- 2 L d'H₂O_{dd} freda
- Espectrofotòmetre
- Ultracentrífuga Sorvall RC5C
- Tubs còrex

Procediment:

1. Es pica una colònia de XL1-BlueF' i es prepara un o/n en 30 mL de LB amb 60 µL de Tc (dilució 1/500: 10 µg Tc/mL LB), s'incuba a 37°C.
2. Es reparteix l'o/n en 2 erlenmeyers autoclavats de 2 L que contenen 500 mL de LB amb Tc 1/500 cada un i es deixa a 37°C unes 4-5 hores.
3. Es va llegint l'absorbància a 600 nm a diferents temps, i es claven en gel durant 20-30 min quan l'absorbància està entre 0,5 i 1.
4. Es reparteix en 6 tubs còrex clavats en gel i s'equilibren amb una balança.
5. Es fa una centrifugació en una ultracentrífuga Sorvall RC5C a 7000 rpm 15 min a 4°C (amb el rotor 10).
6. Es renten els precipitats amb un litre d'H₂O_{dd} freda repartit en els 6 tubs. S'equilibren.
7. Es centrifuga a 7000 rpm 15 min a 4°C.
8. Es renten altre cop amb mig litre d'H₂O_{dd} freda. S'equilibren.
9. Es centrifuga a 7000 rpm 15 min a 4°C.
10. Es reparteixen les cèl·lules en 2 tubs còrex de 15 mL i s'afegeix 10 mL de glicerol al 10% a cada un.
11. Es centrifuga a 7000 rpm 15 min a 4°C amb el rotor 4.
12. Es ressuspèn el *pellet* amb 1 mL de glicerol 10% clavat en neu carbònica i es fan aliquotes de 50 µL.
13. Es comprova si s'han contaminat plaquejant-les amb LB ampilina. Si no creix res, no estan contaminades.

25.4.2.2 Transformació per electroporació

Materials:

- Vectors (pGEM-T-BE, pGEM-T-BD).
- Cèl·lules electrocompetents fetes al laboratori o *electroMAX™ DH5α-E™ cells* (Invitrogen 11319-019).
- Cubetes (Bio-Rad 165-2089, 0,1 cm gap). Aquestes cubetes permeten obtenir una elevada eficiència d'electroporació d'*E. coli* i altres bacteris.
- Medi SOC: 2 g de bactotripton, 0,55 g d'extracte de llevat, 1 mL de solució NaCl 1M (10 mM), 1 mL

de solució KCl 1M (10 mM), H₂O_{dd} fins a 100 mL. Remoure fins que es dissolgui. Autoclavar. Refredar fins a 55°C. Afegir 1 mL Mg²⁺ 2M (1M MgCl₂, 1M MgSO₄) i 1 mL de glucosa 2M. Ajustar el pH a 7.0. Filtrar.
- Plaques d'agar amb ampicilina, X-gal (bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosid) i IPTG (isopropiltio-β-D-tiogalactòsid).

Procediment:

1. Es descongelen les alíquotes de cèl·lules electrocompetents *E.coli* XL1-Blue F' o *electroMAX™ DH5α-E™* (conservades en glicerol a -80°C).
2. En un *ependorf* es barregen 20 μL d'una dilució 1/6 de l'estoc de cèl·lules electrocompetents amb 1-2 μL de lligació. Cal fer una dilució 1/10 de les lligacions, ja que el tampó de la lligasa és molt concentrat i té moltes sals i faria petar les cèl·lules. Si la lligació es fa amb *pGEM[®]-T Easy Vector System I* (Promega A1360) no cal diluir la lligació.
3. Es col·loca en el fons d'una cubeta d'electroporació prèviament atemperada a 4°C evitant la formació de bombolles d'aire.
4. Es prepara l'aparell d'electroporació *Gene-Pulser II* (Bio-Rad 165-2111). Les condicions d'electroporació de bacteris són: 200 Ohms; 2,5 KV; 25 μF.
5. Ràpidament es ressuspenen les cèl·lules en 500 μL-1 mL de medi LB o SOC
6. S'incuba a 37°C en agitació de 220 rpm durant 30 min-1 hora.
7. Es sembra en una placa d'agar amb ampicilina, X-gal i IPTG (Selecció blanc-blau) i s'incuba a 37°C o/n.

Nota: Cal tenir les cubetes d'electroporar fredes (posant-les en gel). I les cèl·lules descongelades, però, mantingudes en gel.

25.5 COMPROVACIÓ DELS CLONS POSITIVS EN ELS DIFERENTS PASSOS DE SUBCLONACIÓ PER OBTENIR LA CONSTRUCCIÓ

1. Es piquen algunes o totes les colònies blanques (amb insert) (depenent de la quantitat) en 60 μL de LB ampicilina.
2. S'incuben 30-45 min a 37°C (no cal agitació).
3. Es realitzen 2 PCR específiques per cada braç (2 μL de cada pou) amb els encebadors mL2kF5-mL2kBE1/r (b) pel BE i mkBDF1-mkBDR2 pel BD.

Braç	Nom	Seqüència 5' > 3'	Mida	X	Y	Z	Condicions
BE	mL2kF5	GATGTGTATCCCAGGCTTGA	260 pb	57	25 s	26	H
	mL2kBE1/r(b)	CCAACACACAGGAGGCTGAA					
BD, Ctrl +	mkBDF1	ACCCCAATCTCAGCCCTCCA	1,5 kb	58	3 min	26	H
	mkBDR2	CTCTGTTGCTGGCGTCTTTG					

Taula 27. PCR de comprovació dels clons en els diferents passos de subclonatge realitzats fins a obtenir la construcció final. L'orientació dels clons, es determinava per digestió amb enzims de restricció i per seqüenciació directe.

4. Minipreps dels clons positius: Es prepara el DNA de plàsmid amb el kit: *Qiaprep spin miniprep kit* (Qiagen 27106) seguint les instruccions del fabricant.
5. Comprovació per digestió dels clons amb *EcoRI*, que allibera els inserts. Els clons bons són: els que alliberen el fragment de 6,1 kb (en el cas de *pGEM-T-BE*) i els que alliberen l'insert de 2,3 kb (*pGEM-T-BD*).
6. Digestió de KO5'neo (cedit per Hans Burghardt, del nostre grup) i *pGEM-T-BE* amb *NotI*. Digestió de KO3' amb *BamHI* i *EcoRI* i *pGEM-T-BD* amb *BglII* i *EcoRI*.
7. Es purifiquen, per extracció de gel, les bandes BE (6,1 kb) i BD (2,3 kb).

MATERIALS I MÈTODES

8. Es desfosfaten els vectors i es fan les lligacions pertinents (*Bam*HI i *Bgl*II tenen extrems compatibles). Es fa PCR i es piquen uns quants clons per fer minipreps. La lligació KO3'-BD és direccional, és a dir tots els clons estan orientats de la manera adient. En canvi, amb els clons KO5'.BE s'ha de fer una selecció dels que s'han lligat en l'orientació correcta. Es digereixen els clons per comprovar que tot és correcte i es seqüencien els clons bons per assegurar-se.
9. Es digereixen KO5'neo-BE i KO3'BD amb
10. Repetició dels passos de desfosforilació, lligació, electroporació, i comprovació de positius.
11. Comprovació de la construcció amb diferents enzims i per seqüenciació directa.
12. Maxipreps amb el kit: *Qiagen Plasmid Maxi Kit* (Qiagen 12163)

La generació del control positiu per al crivellatge de clons ES transfectats es va fer seguint els mateixos passos que pel disseny de la construcció (a la figura 30 de Resultats es mostren els subclonats seguits per obtenir-lo).

26 OBTENCIÓ DE CLONS DE CÈL·LULES ES MODIFICADES

En aquest apartat es detallen els protocols que s'ha utilitzat per al treball amb les cèl·lules mare embrionàries (ES, *embryonic stem*) de ratolí. Es va enviar 50 µL de Maxiprep a <350 µg/mL de la construcció (clon anomenat D8) pel *knockout* de *Slc7a8* a l'empresa GenOway (Lyon) linealitzat amb *Pvu*I. Es va transfectar la construcció per electroporació en cèl·lules ES de baix passatge, derivades de ratolins d'una soca 129Ola. Es feu la selecció positiva-negativa amb G418 i ganciclovir: les cèl·lules que no incorporen el DNA exogen per recombinació homòloga comencen a morir a causa de la selecció doble, es van desprendre deixant només clons de cèl·lules recombinants.

Seguidament es comenten les tècniques de manipulació de cèl·lules ES (fet a GenOway) i es detallen els protocols utilitzats per la doctoranda per l'anàlisi de les cèl·lules modificades: extracció de DNA genòmic de cèl·lules ES, crivellatge dels clons ES per PCR, comprovació dels clons positius per *Southern*.

26.1 TÈCNiques DE MANIPULACIÓ DE CÈL·LULES ES

El punt fonamental a tenir en compte durant la manipulació de les cèl·lules ES és la necessitat de mantenir-les capaces de colonitzar la línia germinal. Amb aquest objectiu, cal mantenir les cèl·lules en tot moment en condicions de cultiu que afavoreixen la divisió cel·lular alhora que retenen la seva capacitat totipotencial (Hogan *et al.* 1994). S'ha d'aconseguir que les cèl·lules retinguin un cariotip normal per a formar cèl·lules germinals funcionals amb alta eficiència. Unes condicions subòptimes de cultiu permetrien la selecció involuntària de variants amb reordenaments cromosòmics i/o mutacions que augmentessin la seva taxa de creixement i disminuïssin la seva capacitat de diferenciació. Condicions subòptimes com ara: la presència en quantitats limitants d'algun nutrient o factor de creixement; el cultiu massa perllongat a alta densitat, que afavoreix la seva diferenciació en endoderm envoltant les colònies de cèl·lules ES. Per minimitzar el risc d'acumular anomalies cromosòmiques, s'ha de congelar vials estoc de cada nova línia cel·lular tan aviat com sigui possible. Com s'ha comentat a l'apartat 6.3.1 de la Introducció, el manteniment totipotent de les cèl·lules ES implica el seu cultiu amb factor inhibidor de la leucèmia (LIF) i/o sobre una monocapa de cèl·lules nodridores (MEF). En aquest cas, GenOway, no va utilitzar cèl·lules nodridores. També és convenient utilitzar sèrums d'alta qualitat testats per al manteniment totipotent de cèl·lules ES. Convé mantenir l'estoc de cèl·lules ES en el passatge més baix possible, i per tant, congelar-les com més aviat millor després de cada manipulació.

Es congelen 4×10^6 cèl·lules en 1 mL de medi de congelació en vials. Es passen ràpidament a -70°C i a les 24 h aprox. es guarden en N_2 líquid.

26.2 PREPARACIÓ DE DNA A PARTIR DE CÈL·LULES ES

Materials:

- TNE: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH = 8,0, autoclavat
- SDS 10%
- Proteïnasa K (10 mg/mL): 100 mg proteïnasa K (fúngica > 20 U/mg, Life Technologies 25530-015); 5 mL Tris-HCl 20 mM, pH = 8,0; 5 mL glicerol. Es guarda a -20°C
- Fenol:cloroform:isoamil alcohol 25:24:1 a pH 8,0 (Sigma P2069)
- Isopropanol
- TE (10:0,2): 10 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 0,2 mM EDTA, (pH = 8,0), autoclavat

Procediment:

1. S'afegeix 1 mL de TNE en les cèl·lules de les plaques de 24 pous i s'incuben 30 min a 37°C.
2. Es ressuspenen les cèl·lules profusament amb la pipeta. No cal tripsinitzar.
3. S'afegeixen 50 µL de SDS 10%, es barreja suaument i es transfereixen en tubs *eppendorf* de 2 mL.
4. S'afegeixen 20 µL de proteïnasa K (a 10mg/mL), es barregen per inversió. I s'incuben 3h a 55°C. També es pot fer la incubació o/n a 55°C.
5. S'afegeix un volum de fenol-cloroform per cada volum de solució de DNA (fenol:cloroform:isoamil alcohol 25:24:1 a pH 8,0, Sigma P2069). Per a l'extracció de DNA genòmic intacte és aconsellable utilitzar el fenol-cloroform a pH bàsic. S'agiten profusament i energèticament per inversió durant 3 min (no utilitzar vòrtex).
6. Se centrifuguen a 10,000 rpm durant 5 min en una centrífuga de sobretaula i es passa la fase aquosa (superior) a un tub de 2 mL net. Es descarta la fase orgànica.
7. S'afegeixen 700 µL (0,7 volums) d'isopropanol i es barregen els tubs suaument per inversió fins que apareix la medusa blanca de DNA. No es pot utilitzar vòrtex. Se centrifuga 10 min a màxima velocitat en una centrífuga de sobretaula i es passa la fase aquosa (superior) a un tub de 2 mL net. Es descarta la fase orgànica.
8. Es fa un rentat amb 1 mL etanol 70% i es torna a centrifugar a 13,000 rpm durant 5-10 min en una centrífuga de sobretaula. S'elimina el sobrenedant (amb una bomba de buit), vigilant de no perdre el precipitat de DNA, es deixa evaporar la resta a l'aire una estona i es ressuspèn en 100 µL de TE (10:0,2).
9. Es deixen evaporar les traces d'etanol incubant els tubs oberts 20 min a 65°C.
10. Si el nombre de mostres es petit i es veu clarament el precipitat, es pot modificar l'últim pas per a que el DNA quedi més net de sals: un cop es visualitzi el DNA, es pesca immediatament (com més es trigui, més es compacta el precipitat i pitjor es renta) amb una nansa de vidre (feta a la flama a partir d'una pipeta Pasteur) i es renta submergint-lo i agitant-lo en un tub de 10 mL amb etanol 70%. S'escorre una mica a la paret del tub, es deixa eixugar a l'aire un parell de minuts i se submergeix en 100 µL de TE (10:0,2) deslliurant-lo de la nansa.
11. Per a que el DNA es ressuspengui millor, es pot posar 45 min a 65°C, 3 h a 37°C o o/n a T_{amb} en un agitador orbital.
12. Es guarden les mostres a 4°C.

26.3 CRIVELLATGE DELS CLONS ES PER PCR EXTERNA AL BRAÇ PETIT (REGIÓ 3')

Per augmentar la qualitat de les cèl·lules ES recombinants, el temps de manteniment del clons congelats mentre dura el crivellatge ha de ser mínim.

Per posar a punt la PCR pel crivellatge, cal fer una construcció d'un control positiu (figura 29 de Resultats) i cal trobar les condicions idònies d'amplificació del plàsmid D2 sol (1 ng) i de la barreja de DNA plasmídic control i DNA genòmic, de la següent manera:

- No DNA
- 1 equivalent de DNA control positiu.
- 10 equivalents de DNA control positiu.
- 100 equivalents de DNA control positiu.

MATERIALS I MÈTODES

- 150 ng de DNA genòmic.
- 150 ng of DNA genòmic + 1 equivalent de DNA control positiu.
- 150 ng of DNA genòmic + 10 equivalents de DNA control positiu.
- 150 ng of DNA genòmic + 100 equivalents de DNA control positiu.

1 (còpia) equivalent de DNA control és la quantitat de DNA control que conté el mateix nombre de còpies que tindria en 150 ng DNA genòmic. Es calcula amb la següent fórmula:

$$1 \text{ còpia equivalent} = \text{mida del vector control (pb)} * 150 \text{ ng} / 6 \times 10^9 \text{ pb.}$$

En aquest cas el vector control té 7795 pb i per tant 1 còpia equivalent de vector té una massa de $1,95 \times 10^{-4}$ ng. Per tant, es feu un banc de dilucions a partir de la miniprep D2 de 203 ng/ μ L fins a obtenir l'1 eq (2×10^{-4} ng/ μ L), el 10 eq. (2×10^{-3} ng/ μ L) i el 100 eq. (2×10^{-2} ng/ μ L).

Aquest protocol permet posar a punt les condicions per a una PCR prou sensible per detectar 1 còpia equivalent de DNA control en DNA genòmic. Això és important per la fiabilitat del crivellatge de les cèl·lules ES.

Vam posar a punt les condicions per la PCR de comprovació dels clons positius amb dos parells d'encebadors: Neotk-mkBDR+1 i Neo26F-mkBDR+2 (veure annex 1)

26.4 COMPROVACIÓ DE CLONS RECOMBINANTS PER SOUTHERN

La comprovació de clons recombinants es feu per anàlisi de *Southern*. Es va digerir els DNA dels clons positius per la PCR amb *SstI* (Invitrogen 15222-011) o/n a 37°C, per confirmar la recombinació a 3' observada per PCR, i amb *DraIII* (Roche 1843 539) o/n a 37°C, per comprovar que tots els clons havien patit la recombinació correctament a 5'. En els dos casos es digerien 6-12 μ g de DNA de cada clon en un volum total de 60 μ L. Per a les 2 digestions es van utilitzar 30 unitats (U) d'enzim (d'un estoc a 10 U/ μ L). Les digestions es van separar en gels d'agarosa al 0,8%. Els patrons de digestió *SstI* són: al·lel salvatge: 8,9 kb i recombinant: 5 kb. Els patrons de *DraIII* són: al·lel salvatge: 11,7 kb i recombinant: 9 kb (figura 31 de Resultats).

26.4.1 Anàlisi de *Southern*

En aquesta tesi s'ha utilitzat sovint la tècnica de *Southern*, sobretot durant el crivellatge de les cèl·lules ES per a la construcció *knockout* de *Slc7a8*. Per aquesta raó incloc la nostra adaptació del protocol original.

26.4.1.1 Electroforesi

Es corre un gel d'agarosa del 0,8% en TBE 0,5x a 45V o/n. Cada carril conté 6-12 μ g de DNA genòmic digerit. Es fotografia el gel amb un reple a cada costat (a prop dels marcadors de mida molecular), si és possible sense treure'l del portagels (n'hi ha de transparents als raigs ultraviolats).

26.4.1.2 Transferència alcalina

La transferència de DNA a la membrana es feu seguint protocols de transferència alcalina.

Materials:

- Solució despurinant: 0,25 M HCl
- Solució desnaturalitzant: 0,4 M NaOH
- SSC 20x: 3 M NaCl; 0,3 M citrat de sodi. Ajustar el pH a 7,0 amb HCl
- H₂O_{dd}
- Membrana de niló carregada positivament (Hybond-N+, Amersham Biosciences RPN303B)
- Aparell per fer transferència al buit: *Vacugene* (Amersham Biosciences 17-1440-02)

Procediment:

1. Es posa el gel (sense treure'l del portagels) en una safata amb HCl 0,25 M en agitació a T_{amb} fins que viri el color del blau de càrrega (20-30 min). Aquest pas serveix per trencar a trossos el

DNA i permetre la correcta transferència dels fragments de major mida molecular. Es treu l'HCl decantant la safata.

- Es fan 3 rentats amb H₂O_{dd} (afegir i buidar) i s'afegeix NaOH 0,4 M. Es deixa en agitació a T_{amb} fins que torni a virar (20-30 min) el blau al color inicial. Es decanta i es torna a afegir NaOH 0,4 M (20-30 min). La membrana de niló carregada positivament (Hybond-N+, Amersham Biosciences RPN303B), també es remulla en NaOH 0,4 M abans de la transferència.
- S'han utilitzat dos procediments al llarg de la tesi: la transferència per capil·laritat o/n i la transferència de 2 h per força de buit, amb l'ajut d'un aparell *Vacugene* (Amersham Biosciences 17-1440-02), seguint les instruccions del fabricant.
- Un cop realitzada la transferència, es marquen amb llapis els pous a la membrana travessant el gel. Es pot tornar a tenyir el gel amb bromur d'etidi i mirar-lo als raigs ultraviolats per assegurar-se que la transferència ha anat bé.
- Es renta la membrana amb una passada ràpida per SSC 2x i es deixa assecar sobre paper de filtre. La transferència alcalina sobre membranes Hybond-N+ permet la fixació del DNA a la membrana sense necessitat de fixar-la amb ultraviolat (2 min) o 2h a un forn a 80°C.

26.4.1.3 Marcatge radioactiu de les sondes (dsDNA) per random priming

Aquest mètode està basat en el treball de Feinberg i Vogelstein (1984), que utilitza hexàmers a l'atzar com a encebadors de la síntesi de DNA mitjançant el fragment *Klenow* de la DNA polimerasa I d'*E. coli*. Els valors d'activitat específica obtinguts en el marcatge varien de 0,5-2 x 10⁹ cpm/μg.

Es marca la sonda seguint protocols estàndard o, si s'usa un joc comercial, segons les instruccions del fabricant. S'ha utilitzat un sistema comercial de marcatge *MegaPrime DNA Labelling System* (Amersham Biosciences RPN 1607). En aquest cas s'utilitzen nanòmers com encebadors, que permeten un marcatge més ràpid 10-30 min amb alta activitat específica (1-3 x 10⁹ dpm/μg).

Materials:

- Producte de PCR purificat
- *MegaPrime DNA Labelling System* (Amersham Biosciences RPN 1607)
- [α-³²P]dCTP

Procediment:

- Es realitzen PCR per obtenir les sondes pels *Southern*s per analitzar les cèl·lules ES modificades. Les condicions de PCR són les següents (HiFi, Taq *High Fidelity*; N, Taq normal):

Condicions de PCR per obtenir les sondes per analitzar els clons de cèl·lules ES modificades							
<i>Southern</i>	Nom	Seqüència (5' > 3')	Mida	X	Y	Z	Cond.
5' (<i>Drall</i>)	mL2SS5'for4	TCACAGGAACGGTTTCTGCT	400 pb	58	25 s	26	HiFi
	mL2SS5'rev1	GGCACAAGGGTAATCTAGCA					
3' (<i>SstI</i>)	mL2SS3'for	CAGAAGAGGGCAGGACAC	430	58	25 s	26	HiFi
	mkBDR + 2	AGGCTGAAAGAGTAGGGCTG					
Neo	Neo30F	AAGAACTCGTGAAGAAGGCGATAGAAGGCG	500 pb	72	2 min	20	N; DMSO
	Neo30R	AGGATCTCCTGTATCTCACCTTGCTCCTG					

- Desnaturalitzar 25-50 ng de dsDNA durant 5 min a 98°C i clavar en gel.
- Afegir fins a un V_i de 50 μL:

Reaccions de marcatge radioactiu de les sondes	
DNA purificat (25-50ng)	X μL
<i>Random primers</i>	5 μL
Tampó amb dATP, dGTP i dTTP	10 μL
Enzim 4 U de <i>Klenow</i>	2 μL
[α- ³² P]dCTP	5 μL
H ₂ O _{dd} fins a	50 μL

MATERIALS I MÈTODES

5 μL de [α - ^{32}P]dCTP (800 o 3000 Ci/mmol) 250 μCi mirar

4. Incubar 10-30 min a 37°C.

Marcatge radioactiu: valors útils

- 1 Ci = $3,7 \times 10^{10}$ Becquerel (Bq, desintegracions per segon) = $2,22 \times 10^{12}$ desintegracions per minut (dpm)
- Comptes per minut (cpm) = dpm/eficiència de comptatge
- Vida mitja del ^{32}P = 14,3 dies. El màxim rang d'emissió en l'aire és de 610 cm; en l'aigua de 0,8 cm.

26.4.1.4 Eliminació de la radioactivitat lliure en les reaccions de marcatge de dsDNA

S'afegeixen 50 μL de tampó SSC 3x a les sondes acabades de marcar ($V_i = 100 \mu\text{L}$). Es purifiquen les sondes en columnes de *Sephadex G-50* (Farmacia 17-0573-02) en SSC 3x.

Materials:

- *Sephadex G-50/SSC 3x*: 30g *Sephadex G-50*; 300 mL de SSC 3x. Agitar suaument i canviar la fase líquida com a mínim 3 vegades. Deixar hidratar les boletes unes hores abans d'utilitzar-lo.
- SSC 3x: 450 mM NaCl; 45 mM citrat de sodi. Ajustar el pH a 7,0 amb HCl.
- Xeringa de 10 mL
- Comptador β Wallac 1209 rackbeta
- Vials

Procediment:

1. S'empaqueta 10 mL de *Sephadex G-50/SSC3x* en una columna formada per una xeringa de 10 mL de volum tapada per la part inferior amb cotó.
2. Es centrifuga a 1800 rpm (700 x g) durant 4 min. Es descarta el volum eluït de la columna i es col·loca un tub *ependorf* sense tapa en la part inferior.
3. S'afegeix a la part superior de la columna la reacció de marcatge diluïda en SSC3x fins a un volum final de 100 μL .
4. Es centrifuga a 1800 rpm (700 x g) durant 4 min.
5. Es determina l'activitat específica obtinguda i l'eficiència de marcatge mitjançant el comptatge de 2 μL de la solució abans i després de purificar i es llegeix al comptador β Wallac 1209 rackbeta amb un programa específic per detectar la radiació de P-32. Perquè la hibridació sigui correcta, interessa tenir una concentració de radioactivitat específica considerable, de $2\text{-}3 \cdot 10^6$ cpm/mL de tampó.

26.4.1.5 Hibridació

S'han utilitzat diferents solucions de prehibridació i/o hibridació durant aquest treball. Per una banda, solucions més elaborades, basades en la utilització de dextran sulfat per incrementar la taxa d'unió de la sonda a la seva seqüència específica, i per altra banda solucions més simples com tampó fosfat i SDS, basades en el treball de Church i Gilbert (1984).

Materials:

- SSC 20x
- SDS 10%
- tub d'hibridació
- Solució d'hibridació de Church: 0,5 M Na^+ (en proporcions adequades de 1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i 1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ per obtenir un pH final de 7,2); 7% SDS; 0,5 mM EDTA (opcional). Generalment es mescla 1 volum de 1 M de 1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 3 volums de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i 4 volums de 14% SDS
- DNA d'esperma de salmó

Procediment:

1. En una safata amb SSC 2x es remulla la membrana, s'enrotlla evitant que es formin bombolles i s'introdueix a un tub d'hibridació petit (14,5 cm de llargada), on es deixa desenrotllar en compte per a que no es facin bombolles entre les membranes ni entre elles i el vidre (impedirien una correcta hibridació). Es treu l'excés de SSC 2x amb el tub cap per avall.
2. Es desnaturalitza DNA d'esperma de salmó durant 5 min a 98°C i es clava en gel 5 min o s'afegeix ràpidament (a 100 µg/mL) al tampó de prehibridació prèviament escalfat a 65°C. A cada tub es posen 5-10 mL de tampó de prehibridació (tampó fosfat 0,5M pH7,2 + SDS 7%), que en el nostre cas és el mateix que el tampó d'hibridació. Es prehibrida les membranes en un forn d'hibridació durant unes 2 h com a mínim a 65°C.
3. Es desnaturalitza la sonda durant 5 min a 98°C i es deixa en gel per impedir-ne la renaturalització o s'afegeix ràpidament. Es barreja amb 5 mL de tampó de hibridació, millor nou però també es pot afegir en el de prehibridació. Es posa el/s tub/s al forn d'hibridació i es deixa o/n a 65°C.
4. El nombre i astringència dels rentats depèn de cada tipus de sonda. En aquest cas vam utilitzar: La fórmula empírica que descriu el comportament de dissociació de sondes grans (no oligonucleotídiques) és:
5. $T_d = 79,8 + [18,5 \times \log M] + [0,58 \times (\%G + C)] - 820/\text{longitud sonda} - [50 \times (\% \text{formamida})]$
6. On M és la molaritat del sodi. D'aquesta manera es poden calcular les condicions dels rentats posteriors a la hibridació, segons la molaritat del catió sodi en cada dilució de SSC (1x = 0,15M).

Sonda 5'

- 1er rentat: 20 min a Tamb amb tampó 1: SSC 2x, 0,1% (p/v) SDS
 2on rentat: 20 min a Tamb amb tampó 2: SSC 1x, 0,1% (p/v) SDS
 3er rentat: 20 min a Tamb amb tampó 3: SSC 0,5x, 0,1% (p/v) SDS
 4art rentat: 5-10 min a Tamb amb tampó 3: SSC 0,5x, 0,1% (p/v) SDS

Sonda 3'

- 1er rentat: 20 min a Tamb amb tampó 1: SSC 2x, 0,1% (p/v) SDS
 2on rentat: 20 min a Tamb amb tampó 2: SSC 1x, 0,1% (p/v) SDS
 3er rentat: 20 min a Tamb amb tampó 3: SSC 0,5x, 0,1% (p/v) SDS
 4art rentat: 2-5 min a Tamb amb tampó 4: SSC 0,1x, 0,1% (p/v) SDS

Sonda Neo

- 1er rentat: 20 min a Tamb amb tampó 1: SSC 2x, 0,1% (p/v) SDS
 2on rentat: 20 min a Tamb amb tampó 2: SSC 1x, 0,1% (p/v) SDS
 3er rentat: 20 min a Tamb amb tampó 3: SSC 0,5x, 0,1% (p/v) SDS
 4art rentat: 2-5 min a Tamb amb tampó 4: SSC 0,1x, 0,1% (p/v) SDS

7. Després de l'últim rentat la radioactivitat que queda adherida a les membranes a penes és detectada pel nostre comptador Geiger-Müller (1-5 cpm). Es treu l'excés de líquid de les membranes sobre paper de filtre i es col·loquen entre plàstics sobre l'intensificador d'un xassís fotogràfic, eliminant-hi les bombolles. Es col·loca una pel·lícula entre els filtres i l'altre intensificador, i es deixa exposar a -80°C o/n. Alternativament s'exposa en un xassís especial (Bio-Rad 170-7843) durant 2-4 hores.
8. Detecció: Es revelen les pel·lícules al cap de 2-3 dies. Alternativament es visualitza amb el *Phosphorimager* o *Personal Molecular Imager® FX System* (Bio-Rad 170-9401) amb el programa *Quantity One* al cap de només unes hores d'exposició.

27 DISSENY D'ENCEBADORS

Els oligonucleòtids han de ser específics del cDNA o DNA genòmic que s'ha d'amplificar i es dissenyen seguint les consideracions generals de disseny d'encebadors per PCR (Sambrook et al., 1989) tenint en compte que la seva *T_m* ha de ser el més alta possible. En els últims anys s'han dissenyat amb l'ajut del programa *Oligo™* (veure apartat 31.3). El llistat d'encebadors dissenyats per la doctoranda es detalla en l'annex 1: per cDNA de p6, cDNA de p5, encebadors intrònics de LAT-2 i asc-1, encebadors multiplex de p6, encebadors de mutagènesi, encebadors de promotor humà, encebadors de LAT-2 de ratolí.

28 EINES BIOINFORMÀTIQUES PER L'ANÀLISI DE SEQÜÈNCIES

28.1 BASIC LOCAL ALIGNMENT TOOLS (BLAST)

Els programes BLAST es fan servir per cercar en les bases de dades de proteïnes i DNA per similitud de seqüència. Aquests programes comparen una seqüència de proteïna o DNA problema contra totes les seqüències de la base de dades, en qualsevol combinació possible, amb seqüències de DNA que sovint són traduïdes a proteïna abans de fer la comparació. Els programes BLAST combinen velocitat i sensibilitat. El temps requerit per obtenir els resultats és proporcional a la mida de la seqüència i de la base de dades utilitzada en la cerca. Els programes més recents *Gapped* BLAST són encara més sensibles que el BLAST original, ja que creen petits forats on la seqüència pot ser interrompuda, i d'aquesta manera poden trobar amb més facilitat similituds de seqüència allà on hi ha petites insercions, delecions o errors de seqüència. Els resultats dels programes de BLAST són presentats com una llista d'alineaments de més a menys qualitat entre les seqüències trobades a la base de dades i la seqüència problema enviada. *Gapped* BLAST el podem trobar a <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/>. Diferents subprogrames poden ser emprats contra diferents bases de dades. Les següents bases de dades varen ser utilitzades en aquest treball amb *Gapped* BLAST: i) **non-redundant** (o nr), la qual compila seqüències de DNA no redundants que solen correspondre a cDNA sencers (no EST), i seqüències de proteïnes (seqüències de DNA del GeneBank traduïdes i seqüències de les bases de dades de proteïna com SwissProt, EMBL, Spupdate i PRI). ii) base de dades de **genòmic**, que comprenen totes les seqüències conegudes, més o menys ordenades i localitzades, que fan referència al genoma de determinada espècie, concretament la humana i ratolí en el nostre cas. iii) *Expressed Sequence Tag Database (dbEST)*, que són seqüències curtes corresponents a gens expressats seleccionats a l'atzar de llibreries de cDNA de diferents teixits i organismes (Boguski *et al.* 1993). Aquestes seqüències estan introduïdes a l'*Expressed Sequence Tag Database (dbEST)*, una divisió del GeneBank, junt amb la informació disponible sobre la font de la llibreria de cDNA, la longitud del clon de cDNA i la localització cromosòmica del gen a què correspon. Aquesta informació està disponible a http://www.ncbi.nlm.nih.gov/irx/dbST/dbest_query.html.

Les possibilitats del programa BLAST són:

- **BLASTn**: compara una seqüència problema de DNA amb les seqüències presents en bases de dades de DNA.
- **BLASTp**: compara una seqüència problema de proteïna amb les seqüències presents en bases de dades de proteïnes.
- **BLASTx**: tradueix a proteïna una seqüència problema de DNA segons les sis pautes de lectura possibles i les compara amb les seqüències existents en bases de dades de proteïnes.
- **tBLASTn**: compara una seqüència peptídica problema contra les seqüències peptídiques obtingudes de la traducció de DNA de bases de dades.
- **tBLASTx**: tradueix tant la seqüència problema de DNA, com les seqüències de DNA de les bases de dades i compara totes les seqüències peptídiques resultants.

28.2 ALINEAMENT MÚLTIPLE DE SEQÜÈNCIES AMB CLUSTALW

Aquest programa compara diverses seqüències de DNA o de proteïnes i mostra el millor alineament possible entre elles. L'adreça utilitzada per fer alineaments ha estat la del *European Bioinformatic Institute (EBI; http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/)*, la qual permet fer alineaments múltiples de fins a trenta seqüències de DNA o proteïna, indica els residus o nucleòtids conservats, determina el percentatge d'identitat entre les seqüències enviades i permet la construcció d'arbres filogenètics.

28.3 CERCA DE ESE (ENHANCER SPLICING ELEMENTS) AMB L'ESEFINDER®

L'ESEfinder® és un programa dissenyat per Cartegni L., Wang J., Zhu Z., Zhang MQ, Krainer AR, que permet identificar possibles elements exònics reguladors (positius) de *splicing* en una seqüència de cDNA. L'adreça per utilitzar el programa ESEfinder® és <http://exon.cshl.org/ESE/>.

29 WEBS D'INTERÈS

29.1 WEBS DE CISTINÚRIA

- Scrivere i col·laboradors han establert una base de dades de mutacions de cistinúria a l'adreça web: <http://data.mch.mcgill.ca/cysdb/>.

29.2 ALTRES LLOCS WEB D'INTERÈS

- Pàgina del NCBI, que permet l'accés a diferents bases de dades: de publicacions (MEDLINE Entrez), de dbSNP, de gens (GenBank)...: <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/>

- *Celera Genomics*: pàgina privada que, prèvia subscripció, permet accedir a totes les seqüències disponibles dels projectes de seqüenciació de genomes. <http://www.celera.com/>

- Nomenclatura per la descripció de variants de seqüència de *The Human Genome Variation Society*: <http://www.genomic.unimelb.edu.au/mdi/mutnomen/> (veure apartat següent).

- *HUGO Gene Nomenclature Committee*: conté la base de dades dels gens humans descrits. Mostra el nom del gen, el símbol aprovat, la seva localització i el nombre de accés a la seqüència amb l'enllaç corresponent. <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature>

- Base de Dades de Mutacions de Genètica Humana (HGMD, Human genetic mutation database): <http://www.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0.html>;

- Base de dades de ratolins transgènics per fer *knockout* condicionals amb el sistema Cre/LoxP, consultable a la pàgina d'Internet <http://www.mshri.on.ca/nagy/cre.htm>.

- *Biology and Biotechnology Research Program del Lawrence Livermore National Laboratory* (LLNL). Mapes físics del genoma (consultable des de l'adreça http://bbrp.llnl.gov/genome/html/chrom_map.html)

- IMAGE Consortium (Integrated Molecular Analysis of Genomes and their Expression Consortium): <http://image.llnl.gov>

30 NOMENCLATURA DE MUTACIONS

El sistema de nomenclatura per a la descripció de variants de seqüència (mutacions, polimorfismes) en seqüències de DNA i proteïna, utilitzat en aquesta tesi és el proposat per: Antonarakis i den Dunnen (Antonarakis 1998; den Dunnen and Antonarakis 2000; den Dunnen and Antonarakis 2001).

Aquestes recomanacions de nomenclatura estan plenament acceptades i permeten una descripció uniforme i inequívoca de variants de seqüència. Aquestes normes de nomenclatura de mutacions estan disponibles a la pàgina web: *Nomenclature for the description of sequence variations* de *The Human Genome Variation Society*, <http://www.genomic.unimelb.edu.au/mdi/mutnomen/>

Aquesta pàgina web, s'actualitza periòdicament, amb noves aportacions de la comunitat científica.

30.1 NOMENCLATURA DE DNA

A continuació exposo un resum de la nomenclatura bàsica utilitzada en aquesta tesi. La numeració dels canvis de seqüència s'ha fet utilitzant sempre com a referència el cDNA, no el genòmic:

- el nucleòtid +1 és l'A del codó d'iniciació de traducció d'ATG. No hi ha cap nucleòtid 0, el nucleòtid 5' del codó d'iniciació de traducció d'ATG és -1. Si la seqüència de referència és el genòmic la numeració hauria de ser purament arbitrària, p.e., començar amb +1 basant-se en la numeració utilitzada a l'arxiu de referència de les base de dades. Quan la seqüència genòmica completa no se sap, s'hauria d'utilitzar una seqüència de referència de cDNA
- Nomenclatura dels nucleòtids intrònics:
 - Començament de l'intró: el nombre de l'últim nucleòtid de l'exó anterior, un signe + i la posició dins l'intró. p.e., c.77 + 1G, c.77 + 2T, etc.

MATERIALS I MÈTODES

- Final de l'intró: el nombre del primer nucleòtid de l'exó següent, un signe - i la posició a l'intró, p.e.,c.78-1G.
- Al mig de l'intró: la numeració canvia de "c.77+.." a "c.78-.."

30.1.1 Descripció de canvis de nucleòtid

- Les **substitucions** es designen amb el caràcter ">".
 - c.76A>C denota que al nucleòtid 76 una A s'ha substituït per una C.
 - c.88+1G>T denota el canvi de G a T en la posició +1 d'un intró (el següent exó comença en la posició 89 del cDNA).
Nota: Les variants polimòrfiques es descriuen a vegades com c.76A/G, però això no es recomanable.
- Les **delecions** es nomenen amb una "del" després del primer i el darrer nucleòtid delecionats.
 - c.7_8del (alternativament c.7_8delTG) denota una deleció de TG en la seqüència ACTTTGTGCC que passa a ACTTTGCC.
- Les **duplicacions** es nomenen amb una "dup" després del primer i el darrer nucleòtid afectats per la duplicació.
 - c.7_8dup (o c.7_8dupTG) denota una duplicació de TG en la seqüència de repetició en tàndem de TG d'ACTTTGTGCC que passa a ACTTTGTGTGCC.
Nota: Aquest canvi no s'hauria de descriure com a inserció, p.e.,c.8_9insTG
- Les **insercions** es nomenen amb una "ins" després dels nucleòtids que flanquegen el lloc d'inserció, seguit pels nucleòtids introduïts.
Nota: les insercions que dupliquen s'haurien de descriure com duplicacions.
- la **variabilitat de repeticions de seqüència curtes** es nomenen com:
 - c.7(TG)3-6, descrivint que el dinucleòtid TG que va des de la posició 7 a la 12 en la seqüència ACTCGATGTGTGCC es troba repetit de 3 a 6 vegades en la població.
- Les **insercions/delecions (indels)** es descriuen com una deleció seguida d'una inserció després dels nucleòtids afectats.
 - c.112_117delinsTG (alternativament c.112_117delAGGTCAinsTG) denota la substitució dels nucleòtids de 112 a 117 (AGGTCA) i la inserció de TG.
- Les **inversions** es nomenen amb "inv" després del primer i el darrer nucleòtid afectats per la inversió.
 - c. 203_506inv (o 203_506inv304) denota que els 304 nucleòtids des de la posició 203 a 506 s'han invertit.
- Les **translocacions** es descriuen amb el format "t(X;4)(p21.2;q34)" seguit per la numeració habitual, indicant el punt d'interrupció de translocació exacte. Les seqüències dels punts d'interrupció de translocació haurien de ser sotmeses a una base de dades de seqüència (*Genbank*, *EMBL*, *DDJB*) i s'hauria de donar el nombre d'accés.
 - t(X;4)(p21.2;q35)(c.857+101_857+102) denota un punt d'interrupció de translocació a l'intró entre els nucleòtids de cDNA 857+101 i 857+102, unint els cromosomes en la posició Xp21.2 i 4q34
- Els **canvis a al·lels diferents** (p. e. en malalties recessives) es descriuen com [canvi al·lel 1]+[canvi al·lel 2]
 - [c.76A>C]+[c.76A>C] denota un canvi en homozigosi d'A a C al nucleòtid 76.
 - [c.76A>C]+[?] denota un canvi d'A a C al nucleòtid 76 a un al·lel i un canvi desconegut a l'altre al·lel.
 - [c.76A>C]+[=] denota un canvi d'A a C al nucleòtid 76 a un al·lel i una seqüència normal a l'altre al·lel.
Nota: les descripcions mixtes del tipus [c.76A>C]+[g.91C>G] no s'haurien d'utilitzar. Nosaltres per simplificar hem fet servir: c.76A>C/c.76A>C, c.76A>C/? i c.76A>C/+, per descriure els genotips.

- **Dues variacions en un al·lel** es descriuen com "[primer canvi; segon canvi]"
 - [c.76A>C; c.83G>C] denota un canvi d'A a C al nucleòtid 76 i un canvi de G a C al nucleòtid 83 al mateix al·lel.
Nota: les descripcions mixtes del tipus [c.76A>C; g.91C>G] no s'haurien d'utilitzar.

30.2 NOMENCLATURA DE RNA

Cal tenir en compte que les descripcions de canvis en el RNA, com en la proteïna, descriuen la conseqüència i no la natura de la mutació.

Els canvis de seqüència de RNA es descriuen bàsicament com els de DNA amb les modificacions següents:

- S'utilitza una "r." per indicar que un canvi es descriu en RNA.
- Els nucleòtids són designats per les bases en minúscula: a (adenina), c (citosina), g (guanina) i u (uracil) (FER-HO AMB LES MEVES MUT!!!)
 - r.78u>a denota que al nucleòtid 78 U passa a ser una A.
- Quan un canvi afecta el processament del RNA, produint dos o més trànscrips, aquests es descriuen entre claudàtors, separats per una ","
 - [r.=, r.73_88del] denota que el canvi de nucleòtid c.76A>C provoca l'aparició de dues molècules de RNA, un trànscrip normal i un que conté una deleció dels nucleòtids 73 a 88 (canvi del lloc donador d'*splicing* a dins de l'exó).
 - [r.76a>c, r.73_88del] denota que el canvi de nucleòtid c.76A>C provoca l'aparició de dues molècules de RNA, una porta aquesta variació i l'altre té una deleció dels nucleòtids 73 a 88 provocada per la mateixa mutació genòmica (canvi del lloc donador d'*splicing* a dins de l'exó).
 - [r.88g>a; r.88_89ins88+1_88+45] denota el canvi de nucleòtid c.88G>A provoca una inserció dels nucleòtids intrònics 88+1 a 88+45 (canvi del lloc donador d'*splicing* a dins de l'intró).
- Els canvis de seqüència que afecten el lloc d'iniciació de transcripció (promotor, lloc de "cap" o "cap-site", exó 1) poden afectar la quantitat de RNA trànscrip. Quan no hi ha proves experimentals disponibles, l'efecte sobre nivell de RNA es podria comunicar com "r.?" (desconegut). Quan les dades experimentals mostren que no es transcriu gens de RNA, es recomana la descripció "r.0".

30.3 NOMENCLATURA DE PROTEÏNA

Cal tenir en compte que les descripcions de canvis en la proteïna descriuen la conseqüència i no la natura de la mutació. Els canvis de seqüència proteica es descriuen bàsicament com els de DNA amb les modificacions següents:

Nota: el canvi d'aminoàcid descrit pot, en casos rars, estar uns quants nucleòtids a 5' del canvi en el DNA (p. e. una deleció de canvi de pauta de lectura que no afecta immediatament la traducció).

- El codi d'aminoàcids de tres lletres és preferible, "X" designa un codó d'acabament de traducció. En aquest cas no hem seguit les recomanacions dels autors i hem utilitzat el codi d'una lletra.
- Numeració d'aminoàcid: la Metionina d'inici de traducció es numera com +1

30.3.1 Descripció de canvis d'aminoàcid

MATERIALS I MÈTODES

- **Substitucions:**
 - *Canvi de sentit:* p.W26C (p.Trp26Cys) denota que l'aminoàcid Triptòfan-26 (Trp, W) canvia a Cisteïna (Cys, C).
 - *Canvi sense sentit:* p.W26X (p.Trp26X) denota que l'aminoàcid Triptòfan-26 (Trp, W) canvia a codó d'aturada (X).
 - *Canvi de la metionina iniciadora (Met1):* p.M1? (p.Met1?) denota que l'aminoàcid Metionina-1 (Met, M) canvia i que es desconeix la conseqüència d'aquest canvi. Quan les dades experimentals mostren que no hi ha proteïna, es recomana la descripció p.0.
 - *Canvi del codó d'aturada:* p.X471Qxt16 (p.X471Glnext16) denota un canvi al codó d'aturada (X) en la posició 471, convertint-lo en un codó de Glutamina (Gln, Q) que afegeix una cua de 16 aminoàcids nous a l'extrem C-terminal de la proteïna abans del següent codó d'aturada.
Nota: Les variants polimòrfiques es descriuen de vegades com p.36L/I (p.36Leu/Ile) o p.L36L (p.Leu36Leu), però no és recomanable.
- Les **deleccions** es nomenen amb "del" després del primer i últim aminoàcid delectat.
 - p.K2del (p.Lys2del) en la seqüència MKMGHQQQCC denota una delecció de l'aminoàcid Lisina-2 (Lys, K) passant a MMGHQQQCC.
 - p.C28_M30del (p.Cys28_Met30del) denota una delecció de tres aminoàcids, des de la Cisteïna-28 fins a la Metionina-30.
 - p.Q8del (p.Gln8del) en la seqüència MKMGHQQQCC denota una delecció de l'aminoàcid Glutamina-8 (Gln, Q) passant a MKMGHQQQCC.
 - Si una delecció crea un aminoàcid nou en el punt de delecció el canvi es descriu com a insercions/deleccions, p. e. p.C28_M30delinsW (p.Cys28_Met30delinsTrp) (veure indels).
- Les **duplicacions** es nomenen amb "dup" després del primer i últim aminoàcid afectat per la duplicació.
 - p.G4_Q6dup (p.Gly4_Gln6dup) en la seqüència MKMGHQQQCC denota una duplicació dels aminoàcids que van de la Glicina-4 (Gly, G) a la Glutamina-6 (Gln, Q) (p.e., MKMGHQGHQQQCC).
 - les duplicacions-insercions de repeticions en tàndem curtes es descriuen com una duplicació, p. e. una inserció que duplica HQ en la seqüència de repetició en tàndem d'HQ de MKMGHQHQCC passant a MKMGHQHQHQCC es descriu com p.H7_Q8dup (p.His7_Gln8dup), no com p.Q8_C9insHQ (p.Gln8_Cys9insHisGln).
- Les **insercions** es nomenen amb "ins" després dels nucleòtids que flanquegen el lloc d'inserció, seguit pels nucleòtids introduïts. Les insercions que dupliquen s'haurien de descriure com duplicacions.
 - p.K2_M3insQSK (p.Lys2_Met3insGlnSerLys) denota que la seqüència GlnSerLys (QSK) és introduïda entre els aminoàcids Lisina-2 (Lys, K) i Metionina-3 (Met, M), convertint MKMGHQQQCC en MKQSKMGHQQQCC.
 - si una inserció crea un aminoàcid nou en el punt d'inserció el canvi es descriu com a inserció/delecció, p. e. p.C28delinsWV (p.Cys28delinsTrpVal).
- **Variabilitat de repeticions de seqüència curta**, p. e. es designa com p.(Q)3-6 (p.(Gln)3-6) que quan les Glutamina (Gln, Q) entre la posició 6 i 8 en la seqüència MKMGHQQQCC es troba repetida de 3 a 6 vegades en la població.
- Les **insercions/deleccions (indels)** són descrites com una delecció seguida d'una inserció després dels nucleòtids afectats:
 - p.C28_K29delinsW (p.Cys28_Lys29delinsTrp) denota una delecció de 3 pb que afecta els codons de Cisteïna-28 i Lisina-29, substituint-los per un codó Triptòfan.
 - p.C28delinsWV (p.Cys28delinsTrpVal) denota una inserció de 3 pb al codó Cisteïna-28, generant codons per a Triptòfan (Trp, W) i Valina (Val, V).
- **Mutacions de trencament de pauta de lectura:** es nomenen posant "fsX" després de l'aminoàcid(s) afectat(s) pel canvi. Aquesta descripció pot anar seguida d'un "nombre" que indica en quina posició hi ha el nou codó d'aturada.
 - p.R97fsX23p.(Arg97fsX23) (p.A97fs alternatiu) denota un canvi de pauta amb l'Arginina-97 com el primer aminoàcid afectat i que acaba amb un codó d'aturada al cap de 23

residus sense sentit.

Nota: Es recomana posar el primer aminoàcid que es canvia a causa del canvi de pauta. El canvi en el DNA podria ser un o més triplets *upstream* (abans).

- p.R97_W99delfsX5 (p.Arg97_Trp99delfsX5) (p.R97_W99delfs alternatiu) denota un canvi de pauta en el que es delecionen els aminoàcids des de l'Arginina-97 al Triptòfan-99 i que acaba amb un codó d'aturada a 5 residus.

31 PROGRAMES INFORMÀTICS MÉS UTILITZATS

31.1 SEQUENCHER™

El *Sequencher*™ és un programa de Macintosh o PC que permet alinear seqüències homòlogues de DNA. A més a més dels trets comuns als programes GCG, MacVector, i GeneWorks, com ara l'entrada de seqüències i un editor d'alineament de múltiples seqüències, el *Sequencher*™ ofereix eines especialitzades per treballar amb els arxius de seqüència provinents dels seqüenciadors automàtics, especialment d'Applied Biosystems.

- El *Sequencher*™ permet importar els cromatogrames (representacions gràfiques de la intensitat fluorescent de cada banda en el gel de seqüenciació) directament de la màquina d'ABI. Així, no només analitza un arxiu de text, sinó que pot avaluar la qualitat de la seqüència nucleòtid per nucleòtid.
- Quan s'alineen múltiples seqüències i es detecten canvis de base, els cromatogrames també es poden alinear i les decisions es poden prendre basant-se en la qualitat de la seqüència més que en la base que es repeteix més sovint.
- El *Sequencher*™ també ofereix eines automatitzades per a extreure les seqüències de vectors i les dades de seqüència de baixa qualitat dels extrems.
- També permet traduir a proteïna i fer mapes de restricció.
- El *Sequencher*™ permet manejar un gran nombre de seqüències i *contigs* llargs si es té prou RAM (com a mínim 10 mbar per a contigs majors de 2000 pb).
- Aquest programa s'ha utilitzat per l'anàlisi de totes les seqüències, humanes i de ratolí, estudiades en aquesta tesi.

31.2 STRIDER

El *DNA Strider* és un programa d'anàlisi de seqüències de DNA i proteïna per Macintosh. El programa consta d'un editor de seqüència multifinestra i de diverses funcions d'anàlisi de DNA i proteïna. L'editor pot utilitzar 4 tipus diferents de seqüències (DNA, DNA degenerat, RNA i proteïna amb codi d'una lletra) i pot manejar simultàniament 6 seqüències de qualsevol tipus de fins a 32.5 kb cadascuna. La numeració negativa de les bases es permet per a seqüències de DNA. Totes les funcions d'anàlisi de restricció i traducció clàssiques són presents i es poden executar en qualsevol ordre en qualsevol seqüència oberta o part de la seqüència. El tret principal del programa és que la mateixa funció d'anàlisi es pot repetir unes quantes vegades sobre seqüències diferents, així generant finestres múltiples a la pantalla (Marck 1988).

Aquest programa s'ha utilitzat bàsicament per conèixer el mapa de restricció de les seqüències amb les que hem treballat.

31.3 OLIGO™

Programa que permet conèixer les propietats bàsiques dels oligonucleòtids (T_m , formació de *hairpins*, anellaments...). La majoria d'encebadors s'han dissenyat manualment, però en molts casos s'ha fet ús d'aquesta eina per ajudar fer el disseny.

Annexos

ANNEX 1: LLISTA D'ENCEBADORS

A la llista següent es detalla els encebadors usats per a l'anàlisi dels gens *SLC7A9*, *SLC7A8* i *SLC7A10* humans. Quan els encebadors han estat usats per a PCR, s'inclou les condicions d'amplificació (X, Y, Z), segons el mètode descrit a l'apartat 22.2.1 de la secció de Materials i mètodes. Quan pertanyen al cDNA humà de *SLC7A9*, s'inclou la seva posició a l'esmentat cDNA, segons la seqüència identificada a Genbank com AF141289.

Taula 28. Encebadors intrònics de <i>SLC7A9</i>							
Exó	Nom	Seqüència (5' > 3')	Mida	X	Y	Z	Cond. especials
1	P6IF1(-)	ATTTCTAGGGTTGGACCGTG	127	58	25	33	N
	P6IR1(-)	GGCCAGGAGAGCCATGAG					
2	P6IF1N	ATGACTGACTTTGACTCTGGG	400	58	25	23	N
	P6IR1b	TCTTCTGCCGTGCTACTAGGG					
3	P6IF2	CGCCCTCTTCCTTCCTCC	240	56,5	25	23	H
	P6IR2	TAGCAGCTGCCTGGCGTG					
4	P6IF3	AGCCTCCGGTGGGAGGAAG	405	59-58	25	23	H
	P6IR3	GAGTCCCCAGACACCCTCTG					
5	P6IF4	AAAGGAGACTCTCTCCAGGG	290	57	25	23	D
	P6IR4b	TGCTTCCTTGGAGAGATGGGCT					
6	P6IF5	TCCCGTGGAGATACTCA	227	56	25	23	H
	P6IR5	TGGAGTTAAAGTCACCTGGAG					
7	P6IF6	AGTCAAGGTGTGTGACGCTTG	141	59-58	25	23	N
	P6IR6	AGGAGAAGAGAAATCAGGCTG					
8	P6IF7	CTGAACGTGGGTCTCCGTG	235	59-58	25	23	H
	P6IR7	ACCTCCAGTGCTGACACCTG					
9	P6IF8	GACCCTCAGGACTCATCTCG	216	56	25	23	N
	P6IR8	TAGCTGTGTGTCTTCCTCG					
10	P6IF9	GGAGCACAAGTCCTCAGTGG	209	56	25	23	
	P6IR9	GCCTTGAAGATAGGCTGGTAG					
11	P6IF10	TTCGGTCTTCTGTGACATGAG	252	54	25	23	
	P6IR10	AGCCACTCGTACTCTGGG					
12	P6IF11	ATGATTGAAATTGGAGGAGGG	192	55	25	23	
	P6IR11	TGGAGTCAGGACAGGTGAGG					
13	P6IF12	CCTCACCCACAACAACCTCC	178	55	25	23	
	P6IR12	AAATTCAGCTGACTTGGCTAC					

Taula 29. Encebadors per PCR-multiplex a <i>SLC7A9</i>				
Exó	Nom	Seqüència (5' > 3')	Mida	Quantitat (pmol/20ul)
1	P6IF1(-)/fam	FAM-CATTTCTAGGGTTGGACCGTG	127	2,8 x 2
	P6IR1(-)	GGCCAGGAGAGCCATGAG		
2	P6IF1N	ATGACTGACTTTGACTCTGGG	400	2 x 2
	P6IR1b/fam	FAM-TCTTCTGCCGTGTCACTAGGG		
3	*P6IF2/fam	FAM-CTCCTAATCTTTCTGTGCCTCA	242	2,35 x 2
	*P6IR2b	GGTAGCAGCTGCCTGGCGT		
4	*P6F3/fam	FAM-GGAGCTTGGCACAATGATCAC	328	2,1 x 2
	*P6IR3c	GCTCTCACCAGAGACTCACT		
5	*P6F4/fam	FAM-CTTCCAGTGTTTCATCTCGACA	98	2,6 x 2
	*P6R13	ATGGCCACGATCACCAGCTTG		
6	P6IF5	TCCCGTGGAGATACTCA	267	1,85 x 2
	*P6IR5/fam	FAM-CCCAGAAAGGAGAACTCATTGT		
7	P6IF6	AGTCAAGGTGTGTGACGCTTG	143	1,5 x 2
	*P6IR6/fam	FAM-CAGGAGAAGAGAAATCAGGCT		
8	*P6D8	CGGCGTGCTACATCCTCATGA	163	1,15 x 2
	*P6IR7/fam	FAM-CAGGAGAAGAGAAATCAGGCT		
9	P6IF8	GACCCTCAGGACTCATCTCG	217	1,35 x 2
	P6IR8/fam	FAM-TAGCTGTGTGTCTTCCTCG		
10	P6IF9/fam	FAM-GGAGCACAAGTCCTCAGTGG	211	2,1 x 2
	P6IR9	GCCTTGAAGATAGGCTGGTAG		
11	P6IF10/fam	FAM-TTCGGTCTTCTGTGACATGAG	323	2,75 x 2
	P6IR10b	GTCAGATTGGAAGTGAAGGCA		
12	P6IF11	ATGATTGAAATTGGAGGAGGG	192	1,5 x 2
	*P6IR11/fam	FAM-GCTTGCTGATGATTGGAGCCA		
13	*P6IF12/fam	FAM-CCCTCACCCACAACAACCTCC	180	2,2 x 2
	P6IR12	AAATTCAGCTGACTTGGCTAC		
Ctrl	DSCR1-E5F	GTCAAGGGTCATATGCAGGTA	247	1,9 x 2
	DSCR1-E5R/fam	FAM-GAACCCAACTCACCTGAGCA		

Taula 30. Encebadors intrònics de <i>SLC7A8</i>		
Exó	Nom	Seqüència (5' > 3')
1a	L2IF1a	CCCTCGCTAAAGAGAAGCAC
	L2IR1a	GCCAGGGGAGACATACATTT
1b	L2IF1b	GCACAGAGCAGAACCATCCT
	L2IR1b	TCACAGGAGGACCAGGAGAG
2	L2IF2	CCGTCCTGTCTCTACTGTCT
	L2IR2	CCTTCTGAATGTCTTCCTCCT
3	L2IF3	CTGATGGCTCTGCGTCCCT
	L2IR3	CCAGCCTGAGTGACAGAGTG
	L2IR3b	GGCAGGAGGATCACTTGAGC
4	L2IF4	CAGGATGAGGGAGCAGTTCT
	L2IR4	CTCAGGGTGTGGCATACTTC
5	L2IF5	GGTTCCTGGAGACAAGACA
	L2IR5	GGACACCTGCTCCCTCTTTC
6	L2IF6	GCAGAAAGACAGAAGACACC
	L2IR6	CAGCAGGCAAGTCTATGTCT
7	L2IF7	GGTGACCTCTCCTTTGCTTA
	L2IR7	GACAGAGACAAGCCCACCAT
8	L2IF8	GGTAGGCAAGGATGAAGGAG
	L2IR8	GACTAGGCACAAAGAGAGGG
9	L2IF9	GCCCCTAATCTGTAATACCAG
	L2IR9	GCTAGAACCATAGAGGAAGG
10	L2IF10	CCTACACAGTTCATACGCCT
	L2IR10	CTGACCACTGCATTCCAGCC
11a	L2IF11a	GTGGGATACTCAGCATTGGC
	L2R11a	GGAGTGTGGGCAGCACTGG
11b	L2F11b	CAAAGAACCAGCCTCTCACC
	L2R11b	GGCTGGGTTTCTGCAATCTG
11c	L2F11c	CCAAGCCAGGCGGTTGAGGA
	L2R11c	CAGATCCGTCCTGAGGGTTA
11d	L2F11d	CAGTGGAGGGTAGGTTCTTG
	L2R11d	GGCATCTCACCAACTATGGG
11e	L2F11e	GGAATACACAGGAGCCCTTC
	L2IR11e	GCCTGGTGACTCTGTCTCAA

Taula 31. Encebadors dissenyats pel knockout de <i>slc7a8</i>				
Nom	Seqüència (5' > 3')	Sen- tit	Temp (°C)	Posició a DNA genòmic
Braç esquerra <i>slc7a8</i>				
mKBEF4	CCTTGCCAGCCCAGTGTGT	Dir	64°C	Extern a BE per 5'
mL2KF5	GATGTGTATCCCAGGCTTGA	Dir	62°C	Extern a BE per 5'
mL2KBE1/f	GAGATACCCATGTTCCACCA	Dir	61°C	BE
mL2KBE2/f	CAGCCGAAAGGGAAGCAC	Dir	65°C	BE
mL2KBE1/r(b)	CCAACACACAGGAGGCTGAA	Rev	65°C	BE
mKBER4	TCAGGTACTTTCTTGCTCGC	Rev	60°C	Extern a BE per 3'
mKBER5	ATCGCCTCCACCTTCCCTTA	Rev	62°C	Extern a BE per 3'
mKBER2	TCAGGTACTTTCTTGCTCGC	Rev	60°C	Extern a BE per 3'
mKBER3	ATCGCCTCCACCTTCCCTTA	Rev	62°C	Extern a BE per 3'
mKBER6	CAGCCCTCCTAATGAAACAG	Rev	60°C	Extern a BE per 3'
Braç dret <i>slc7a8</i>				
mL2KF9	AGACTCTGCTTTGCTCGCCC	Dir	64°C	Extern a BD per 5'
mL2KF7	GCTCGATTATCTGGTCTTA	Dir	58°C	Extern a BD per 5'
mL2KF6	GTTTATCCACAGCCATTGTAG	Dir	59°C	Extern a BD per 5'
mL2KF8	GTGTTTCATGCCCTGCTGGT	Dir	62°C	BD- Seqüenciació
mKBDF1	ACCCCAATCTCAGCCCTCCA	Dir	64°C	BD- Seqüenciació
mKBDF2	GGCAGGTCTATGGAGTTTCT	Dir	62°C	BD- Seqüenciació
mL2KF2	GCCTTGCTCTCATTGTCTGGA	Dir	67°C	Extern a BD per 3'
mL2KR2	CCAGCCAGTCTCCGAAGAT	Rev	60°C	Extern a BD per 3'
mKBDR1	CCAGGCTCCCAACAGTCTTT	Rev	62°C	BD- Seqüenciació
mKBDR2b	ACAACCTTCCCGTACCACT	Rev	62°C	BD-Seq/construcció
mL2KR6	CTTGTCATCACCCACTTAGA	Rev	58°C	Extern a BD
mL2KR7	GACACTTACCCTGGAACCGT	Rev	58°C	Extern a BD
mL2KBD1/r	GAAGTGATGAGGTAGAAGGG	Rev	57°C	BD
mL2KR5	CTGTGAGCGTGACAAAGGA	Rev	60°C	Extern a BD per 3'
Marcadors de selecció				
TKF4	CGTACCAGCGAAGAAGGGGC		66°C	vector
TKR4	GTTTATGGTTCGTGGGGGT		60°C	vector
TkR1	ACGCTGTTGACGCTGTTAAG-		60°C	vector
Neotk	AGGGGAGGAGTAGAAGGTGG		64°C	vector
NeoF1	TACCCGCTTCCATTGCTCAG		62°C	vector
NeoR1	GGGAAGACAATAGCAGGCAT		60°C	vector
Control positiu				
mKBDR+	GGTGTCTCGTGCCCTTCT			vector
mKBDR+1	CAAACCTGCTGTGACTCCA			vector
mKBDR+2	AGGCTGAAAGAGTAGGGCTG			vector

Taula 32. Encebadors de cDNA de SLC7A9				
Nom	Seqüència (5' > 3')	T (°C)	Posició a cDNA	Aplicació
Sentit Directe				
P6D1	CATCAGCGTCAGGCGCCTCA	68	1214-1233	Clonatge/Cerca de mutacions
P6F1	GGTCTTGTCTGCTGCTGCTG	64		Cerca de mutacions
P6D2	CTGCTAACGGGACCTGCTTCA	66	1132-1142	Clonatge/Cerca de mutacions
P6D3	CCGTCTCTTGTAGCCAAGTCA	64	1656-1676	Clonatge/Cerca de mutacions
P6D4	CGATTACCATGCACCTTCAGA	62	1588-1608	Clonatge/Cerca de mutacions
P6D5	CCGGAGGAAGACCCTGAGTA	64	1629-1648	Clonatge/Cerca de mutacions
P6D6	CTGCCTTTGGCCATTATCATCGGGA	76	939-963	RACE-PCR
P6D7	CCTATCAAGGTGCCCGTA	56	1401-1418	Clonatge/Cerca de mutacions
P6D8	CGGCGTGCTACATCCTCATGA	66	976-996	Multiplex
P6D9	CATCTGCCTCAGCTTCTCCGA	66	566-586	Clonatge/Cerca de mutacions
P6D10	CTAGTCCAGGCCGAGCTTGCA	68	84-104	Clonatge/Cerca de mutacions
P6D11	CAGCTCCTCCGGCTCTGCA	64	32-50	Clonatge/Cerca de mutacions
P6D12	CTCCTTGCAGTCTCCTGGAA	62	151-170	Clonatge/Cerca de mutacions
P6D13	CTGTGCTCAGCAACACGGAA	62	346-365	Clonatge/Cerca de mutacions
P6D14	GACAGTGAACACTGAGCG	62	674-693	Clonatge/Cerca de mutacions
P6D16	TGTGCGCCCTCCTTGCA	60		Clonatge/Cerca de mutacions
P6D17	GACAGTGAACACTGAGCG	66		Cerca de mutacions
P6A7	CAGGAGGAAACATGGGGGATAC	68		Cerca de mutacions
P6A8	GGAGAGAGGATGAGAAGTCGAT	66		Cerca de mutacions
P6A10	ACTCATTACGTGGCGGGC	60		Cerca de mutacions
P6A11	GTTTCATCTCGACAGTGAAC	58		Cerca de mutacions
Sentit Revers				
P6R1	CACGTTTCATGAGGATGTAGCA	62	981-1001	Clonatge/Cerca de mutacions
P6R2	CAGTCATCACGGTGAAGTAGGA	66	1002-1023	Clonatge/Cerca de mutacions
P6R3	GGGACTGCAGGAGTTCGGTGGCA	76	1022-1044	RACE-PCR
P6R4	CAGCTGACTTGGCTACAAGAGA	66	1659-1680	Clonatge/Cerca de mutacions
P6R5	CCATTAGCATCTGAAGGTGCA	62	1597-1617	Clonatge/Cerca de mutacions
P6R6	CCTAGAATCGTCAGGCCA	56	1343-1360	Clonatge/Cerca de mutacions
P6R7	CTGAGTATATTTTATTCGTAGGA	58	1726-1748	Clonatge/Cerca de mutacions
P6R8	CTGTGAAGCAGGTCCCGTTAGCA	60	1133-1155	Clonatge/Cerca de mutacions
P6R9	CAGCCGCACGCTCAGTGAGTTCA	74		RACE-PCR
P6R10	CTTTGTGTTTCCTTGGGCCAGGA	72	778-800	RACE-PCR
P6R11	CTGGTTCCAGGAGACTGCAA	62	155-174	Clonatge/Cerca de mutacions
P6R12	CACAGCTTCCGTGTTGCTGA	62	352-371	Clonatge/Cerca de mutacions
P6R13	ATGGCCACGATCACCAGCTTG	66	734-754	Multiplex
P6R14	GGAAGAAATAACCACAAATATTGC	64	1696-1719	Clonatge/Cerca de mutacions
P6R15	CGAAGATCCCAGAGCCAATGA	64		Clonatge/Cerca de mutacions
P6R16	CAAGCCGCCCATATGATGAGGCA	72		RACE-PCR
P6B10	TAAAAGATGATGGCGGGGGCT	64		Clonatge/Cerca de mutacions
P6B11	CATCCATCATAGGCCAGAGT	64		Clonatge/Cerca de mutacions

Taula 33. Condicions de PCR per l'ànalisi del promotor de <i>SLC7A9</i>					
Nom	Seqüència (5' > 3')	Mida	X	Y	Z
PP6IF1	CGTGCCACTGCACTCCAGCC	500	60	30 s	16
PP6IR1	CACATGGGCTCAGGCAGCACT				
PP6IF2	GTTGCTCGCCCTGCGTCGCA	630	60	30 s	16
PP6IR2	GAAGCATCGTAGCTGTTACCT				
PP6IF3	CATCCCTGACCTTTGCTTCCA	495	60	30 s	16
PP6IR3	GTCCCACTCCTCTTTACCAGT				
PP6IF4	CGCAGCTGCAGGGAGGACA	652	60	30 s	16
PP6IR4	CTGCAGAGCCGGAGGAGCT				

Taula 34. Encebadors de promotor de <i>SLC7A9</i>				
Nom	Seqüència (5' > 3')	T (°C)	Sentit	Aplicació
PP6IF1	CGTGCCACTGCACTCCAGCC	68	Dir	Cerca de mutacions
PP6IF2	GTTGCTCGCCCTGCGTCGCA	68	Dir	Cerca de mutacions
PP6IF3	CATCCCTGACCTTTGCTTCCA	64	Dir	Cerca de mutacions
PP6IF4	CGCAGCTGCAGGGAGGACA	64	Dir	Cerca de mutacions
PP6IR1	CACATGGGCTCAGGCAGCACT	68	Rev	Cerca de mutacions
PP6IR2	GAAGCATCGTAGCTGTTACCT	62	Rev	Cerca de mutacions
PP6IR3	GTCCCACTCCTCTTTACCAGT	64	Rev	Cerca de mutacions
PP6IR4	CTGCAGAGCCGGAGGAGCT	64	Rev	Cerca de mutacions

Taula 35. Encebadors de mutagènesi de <i>SLC7A9</i>				
Nom	Seqüència (5' > 3')	T (°C)	Sentit	Aplicació
cC771T-for	GCCATCATCATCATCAGCGCG	66	Dir	Testar c.584C > T
P6V142AR	CGATTTGAGGAGGCTTGCAGCGC	64	Rev	Testar p.V142A
W230R-rev	CTCACCATCCATCATAGGCGC	66	Rev	Testar p.W230R
PP6-2Mut-for	GCCCTCCCAAGATGGGAGTT	64	Dir	Testar polim. prom.

Taula 36. Condicions de les PCR per detectar la duplicació E5-E9 de <i>SLC3A1</i>						
Nom	Seqüència (5' > 3')	Mida	X	Y	Z	Cond.
rBAT-I9-for1	CCTCTGGTGATCTGTCTGCC	410 pb	59,58	30 s	26	Taq Expand, DMSO
rBAT-I4-rev1	GTCTCCTTCCCACCTACTTG					

ANNEX 2: DUPLICACIÓ/DELECCIÓ EXÓ 12

E11(4140pb)tgttatattaagcggcctttatttacttcctgtttgtccactacaagtttggatgggctcagaaaatctcaagtaagtaccaacagaagggcc
gcttggcttctgtgaggcagggcaggcacggcgctcacctgtcctgactccaagacctgtcacaggtctcacctgtggcagatccctc**(4980**
pb)GTGCCCCGTAGTCATTCCCGTCTTGATGACACTCATCTCTGTGTTTTGGTTCTGGCTCCAATCATCAG
CAAGCCCACCTGGGAGTACCTCTACTGTGTGCTGTTTATATTAAGCGGCCTTTTATTTTACTTCCTGTTT
GTCCACTACAAGTTTGGATGGGCTCAGAAAATCTCAAgtaagtaccaacagaagggcggcttggcctctgtgaggcagggcagga
ggcacggcgctcacctgtcctgactccaagacctgtcacaggtctcacctgtggcagatccctc**(2280 pb)****E13**

Seqüència de la regió de l'intró 11 que conté les dues seqüències repetides (Rep). Les dues Rep estan subratllades. Es mostren els bases que separen cada seqüència respecte els exons 11 i 13. Cada Rep té 194 nucleòtids i difereixen en un nucleòtid. Bases intròniques en minúscules i bases exòniques en majúscules. Delecció E12: **c.1224 + 4166_c.1399 + 119del(4972)**. Duplicació E12: **c.1224 + 4166_c.1399 + 119dup(4972)**.

ANNEX 3: RESULTATS OBTINGUTS PEL PROGRAMA ESEFINDER PER LES MUTACIONS I POLIMORFISMES DE SLC7A9

Mutació p6	Canvi nucleotídic [canvi RNA]	Exó	SF2/ASF (Thr=1,96)	SC35 (Thr=2,38)	SRp40 (Thr=2,67)	(Thr=2,68)	Efecte <i>splicing</i> predit o comprovat	RNA	
p.R10del	c.28_30delAGA	E2	2,24 > 1,51	< Thr	2,73 > -4,80	3,07 > 1,67	errori		
p.I44T	c.131T > C	E3	< Thr	1,29 > 3,02*	3,69 > 6,08	< Thr	normal		
p.S51fsX38	c.151delT	E3	< Thr	< Thr	< Thr	< Thr	normal		
p.P52L	c.155C > T	E3	1,99 > 0,32	2,66 > 3,30	3,00 > 0,62	2,55 > 3,38	errori		
p.N58_G79del22	c.171C > T	E3	2,29 > 2,74	< Thr	3,40 > 3,75	< Thr	Donador 5'spl		
p.V62M	c.184G > A	E3	< Thr	< Thr	< Thr	< Thr	normal		
p.G63R	c.187G > A	E3	< Thr	4,14 > 2,39	0,18 > 2,73*	2,26 > 3,18*	normal		
p.W69L	c.206G > T	E3	< Thr	< Thr	< Thr	< Thr	normal		
p.W69X	c.206G > A	E3	< Thr	< Thr	< Thr	< Thr	Nonsense!!! Especial		
p.A70V	c.209C > T	E3	< Thr	< Thr	< Thr	< Thr	normal		
p.L30fsX10°	c.235+3_235+293del [r.87_235del]rt	E3	No pot afectar ESE					mut consensus (<i>skipping</i> E3)	
p.G105R	c.311G > A [r.311g > a]rt	E4	< Thr	3,77 > 3,32	3,10 > 5,66	2,95 > 2,34	normal	Sí	
p.T123M	c.368C > T [r.368c > u]rt	E4	4,51 > 1,99	2,77 > 3,42	< Thr	4,70 > 3,15	normal	Sí	
p.A126T	c.376G > A	E4	< Thr	2,67 > 2,22	0,91 > 3,46*	< Thr	normal		
p.A158dup	c.475_477dupGCC	E4	< Thr	< Thr	< Thr	< Thr	normal		
p.S113fsX8	c.335dupT	E4	< Thr	< Thr	3,21 > 3,57	< Thr	normal		
p.T123fsX84	c.368_369delCG	E4	4,51 > -2,45	2,78 > 1,16	< Thr	4,70 > -4,33	errori		
p.139fsX68	c.411_412delTG	E4	< Thr	< Thr	< Thr	< Thr**	normal		
p.V170M	c.508G > A [r.508g > a]rt	E5	1,31 > 2,04*	< Thr	< Thr	< Thr	normal	Sí	
p.A182T	c.544G > A	E5	< Thr	< Thr	< Thr	< Thr	normal		
p.I193dup	c.579_581dupCAT	E5	< Thr	< Thr	< Thr	< Thr	normal		
p.L168fsX19	c.501_504delACTG	E5	2,62 > 1,56	1,04 > 3,30*	3,69 > 3,39	< Thr	Normal?		
p.I187T	c.559A > T	E5	< Thr	2,25 > 2,69*	< Thr	< Thr	normal		
p.G195R	c.583G > A	E5	4,02 > 2,10	< Thr	2,86 > 2,29	< Thr	normal		
p.L160X	c.604+1G > A [r.478_604del126]p	E5	No pot afectar ESE					mut consensus	
p.V188M	c.562G > A	E5	< Thr	< Thr	< Thr	2,94 > 2,33	normal		
p.L196_G202delfsX5	c.586C > T RNA: [r.=/r.585_604del]rt	E5	< Thr	4,41 > 3,84	< Thr	< Thr	Creació DS altern.	Sí	
p.I203fsX27	c.605-3C > A [r.605_704del100]p	I5	No pot afectar ESE					mut consensus	
p.L160X	c.604+2T > C [r.478_604del126]p	I5	No pot afectar ESE					mut consensus	
p.L160fsX1	c.614dupA RNA: [r.479_704del226]rt	E6	< Thr	< Thr	1,32 > 3,14*	< Thr	<i>Skipping</i> E5i 6	No	
p.F211fsX51	c.630_633delTTTC	E6	< Thr	< Thr	< Thr	< Thr	normal		
p.A224V	c.671C > T	E6	1,96 > -0,57	< Thr	< Thr	< Thr	normal?		
p.W230R	c.688T > C	E6	1,69 > 3,14*	< Thr	3,98 > 2,49	< Thr	normal?		
p.Y232C	c.695A > G [r.695A > G]rt	E6	< Thr	4,42 > 4,78	< Thr	< Thr	normal	Sí	
p.I241T	c.722T > C	E7	< Thr	2,00 > 2,57*	3,15 > 4,86	4,92 > 2,31	normal?		
p.E244del	c.730_732delGAA	E7	3,82 > 0,89	< Thr	2,98 > 2,14	< Thr	errori?		
p.N239fsX6	c.712_716delCTCAA	E7	< Thr	< Thr	< Thr	< Thr	normal		
p.G259R	c.775G > A	E8	-0,55 > 2,36*	< Thr	< Thr	< Thr	normal		
p.P261L	c.782C > T	E8	< Thr	2,62 > 2,95	3,33 > 3,01	< Thr	normal		
p.?	c.784_786del	E8	< Thr	2,62 > 4,88	3,33 > -0,78	< Thr	normal??		
p.N271fsX6	c.813delC	E8	< Thr	< Thr	< Thr	< Thr	normal		
p.L283F	c.847C > T	E8	< Thr	4,11 > 3,54	< Thr	< Thr	normal		
p.A316V	c.947C > T	E9	< Thr	2,82 > 2,26	< Thr	3,02 > 1,47	normal?		
p.A290fsX45	c.977+3A > T [r.874_977del104]p	E9	No pot afectar ESE					mut consensus	
IVS9-17G > A		E9	No pot afectar ESE					mut consensus	
p.R333W	c.997C > T [r.874_1074del201, r.874_1074del201]rt	E10	2,60 > 0,07	< Thr	< Thr	< Thr	<i>Skipping</i> E9 / E9,10	Sí	
p.A331V	c.992C > T	E10	2,24 > 0,78	< Thr	< Thr	< Thr	errori??		
p.A354T	c.1060G > A	E10	< Thr	< Thr	< Thr	2,94 > 0,38	normal		
p.S379R	c.1137C > G	E11	-0,62 > 2,29*	< Thr	< Thr	< Thr	normal		
p.A382T	c.1144G > A	E11	< Thr	< Thr	1,02 > 3,63*	3,02 > 1,23	normal??		
p.L424fsX62	c.1270_1271delTT	E12	< Thr	< Thr	< Thr	< Thr	normal		
p.K447fsX22	c.1399+3_+6delAAGT	E12	No pot afectar ESE					mut consensus	
p.E436X	c.1306G > T	E12	< Thr	< Thr	< Thr	< Thr	normal		
p.L424fsX62	c.1265_1266delITG	E12	< Thr	< Thr	< Thr	< Thr	normal		
p.K447fsX22	c.1399+1G > T [r.13371629?del]p	I12	No pot afectar ESE					mut consensus	
p.K447fsX22	c.1400-3C > G [r.13371629?del]p	I12	No pot afectar ESE					mut consensus	
p.K432fsX78	c.1224+4166_c.1399+119dup(4972)	E12 dup	< Thr	< Thr	< Thr	< Thr	normal		
p.V409fsX9	c.1224+4166_c.1399+119del(4972)	E12 del	?	?	?	?			

En la columna "canvi nucleotídic" es mostra el canvi en genòmic i el de RNA entre claudadors, seguit d'una p si es predit o de rt si s'ha comprovat. Les caselles en verd mostren un augment de la probabilitat i amb un asterix es

mostren els que augmenten sobre el llindar. En blau es postren les disminucions de probabilitat que queden per sota el llindar (aquests serien els que produeixen un *splicing* erroni). En lila, es senyalen disminucions de la probabilitat que es mantenen per sobre del llindar. **; desapareix un que està repetit. <Thr; es manté per sota el llindar. La columna "RNA" mostra si hi ha concordança dels resultats predits respecte l'anàlisi de RNA.

Polimorfisme p6	Exó	SF2/ASF (Thr = 1,96)	SC35 (Thr = 2,38)	SRp40 (Thr = 2,67)	SRp55 (Thr = 2,68)	Efecte <i>splicing</i> predit
IVS1 + 17G > C	I1	No pot afectar ESE				-
c.1-39C > T	E2	<Thr	<Thr	<Thr	3,53 > 2,82	normal
c.216C > T (Cys 71)	E3	<Thr	3,90 > 4,55	<Thr	3,56 > 2,01	normal
IVS3 + 22T > G	E3	No pot afectar ESE				-
c.399C > T (Ser 132)	E4	1,89 > 2,50*	*	3,21 > 1,68	2,80 > 3,63	normal
c.411T > C (Cys 136)	E4	<Thr	<Thr	<Thr	Desap. un repe	normal
c.420C > T (F139)	E4	<Thr	<Thr	<Thr	<Thr	normal
c.425T > C (V142A)	E4	<Thr	<Thr	<Thr	2,01 > 3,56*	normal
IVS4 + 10T > C	E4	No pot afectar ESE				-
c.497C > T (Ser 169)	E5	<Thr	<Thr	<Thr	<Thr	normal
IVS5 + 10G > A	I5	No pot afectar ESE				-
IVS5 + 24T > C	I5	No pot afectar ESE				-
L223M (c.667C > A)	E6	2,50 > -0,02 1,96 > -0,55	<Thr	<Thr	<Thr	erroni erroni
L229 (c.687C > T)	E6	<Thr	4,68 > 3,41	3,98 > 2,41	<Thr	normal
c.972G > A (Ala 324)	E9	2,68 > 3,41 4,01 > 2,09	<Thr	<Thr	<Thr	normal -
IVS9 + 51A-G	E9	No pot afectar ESE				-
c.1143C > T (Ala 381)	E11	- 0,06 > 2,89*	<Thr	3,76 > 2,93	<Thr	normal
c.1365C > T (Val 455)	E12	<Thr	4,88 > 4,31	4,31 > 4,67	<Thr	normal

ANNEX 4: PROMOTOR *SLC7A9*

cacctgatgtctcacgtggtctcctgtcagcctgccaggagcacttttgacccagggggtattctggtgttttgca
USF (Matl=0.992, TFS=93.2), PADS (TESS*, Matl=0.991/NH) AML-1a (TFS=100, Mot=1.00)
aacatggatgtccaggactatgatgagtgctcaacattaggaggagtgacccagcaagccggggcaggttctgtctagggggcaggacctgcca
ctagcctctctgctcagggtctgggcatggcaggcaggtaaacaggtgggcccctccaagatgggaggtGacgaacttctaatacaggacctgcctct
gggacaacaagggtccctgtgctctgcagacggcttcagaaaaactgtcctctctcaggtctgctgccccaaactgctccaaactgacccccagaga
ctggcccagctcctccatccctgacctttgcttccatctgatactgggatgcagtttaagttggcccaaggcaaaagctaccagagtttggctgaagtaaca
gctacgatgctcagatgcagtgcttctgtgctccaggctgtctcataaggtctcataaggtgcttccctctctgaaagggctctgctgacctgagg
ctgccgctgagcctaggtcc

GATA-1 (Matl=0.971/NH, TFS=93.0)
aatgcagtgccgggagaacctctgctccctccagagagatccagacctggcagccctggatgcggaccgga
LyF-1 (TESS, TFS=93.5)
gcttctggcctgtgtgctgtccccctccgttccccaaggggaaggtttgtgctcctgtgatgagccaggaca
STATx (TESS, Matl=0.971, TFS=94.2)
tggctacgtgaacagcaccacagccaaacctgatgggcattggccgagctgcaggaggacacaggccc
AML-1a (TFS=100, Mot=1.00)
tgcattgcctcaggcctgctgtgattccaagtgggaagccccatcactggtaagaggagtgaggacgggctcagccgctctcactgctcagccagaggc
aggcccTggcctggggaaattcctgggaggaggaaactgacca
NF-kB (TESS, Matl=0.962, TFS=93.8+), c-Rel (TESS, Matl=0.964, TFS=92.6+) MZF1 (Matl=0.982, TFS=93.0)
acagctgagttacgcacacacagcgggtctgttgagctgcctgactgggttttaaatatagcctattaaggcaatta
AP-4 (Mot=0.97, Matl=0.965, tssg, TESS) TATAbox S8
GCgaAttggtccaagttatctcctctgattcccaaaagataaaagaaggcataattttatcttttagtataaaa
S8 (Matl=0.989, TFS=93.9) Ik-2 (TFS=93.4)
Gtgtagacgattgggacctctggttttaaaaaataatctgacctagacacaaatgaacaaaacaaaacggtt
HFH-2 (TFS, TESS)
ttgagagaaaattggtgTcctgacctccccctttttgtggtgctatctaagctcattgcaaaaaaaaaaaaaagggtttaataattaccttattgacctct
gtacctctggactccttctcctctgggcacaagacatggccatttctaggggtggaccgAgCAGGCACGGGCGGTCAGCTGGGCCG
CAGCTC

Exó 1

Predicció de llocs d'unió de factors de transcripció i del lloc d'inici de la transcripció en 1500 pb de zona promotora de *SLC7A9*. Els llocs d'unió a factors de transcripció predits pels diferents programes apareixen subratllats. Les seqüències en negreta, indiquen que el factor s'uneix a la cadena "forward". +, més probable la unió "forward" (a la cadena +). -, més probable la unió "reverse" (a la cadena -). =, igual de probables les 2 unions.

USF, upstream regulatory factor; LyF-1, lymphoid transcription factor; MZF1, myeloid zinc finger protein; AP-4, activating protein 4; NF-kB, nuclear factor kappaB; GATA-1, GATA-binding protein 1; HFH-2, HNF3 forkhead homologue 2.

Les variants trobades en els pacients no afecten cap de les caixes predites per aquests programes (requadres grisos: per ordre: c.1-1314G>A, c.1-617G>T, c.1-323G>T i c.1-172A>T). Els requadres blancs assenyalen els inicis de transcripció predits pels programes *Core-Promoter* (CG a c.1-468_469, amb una probabilitat de 0.689 i 0.686 respectivament) i *NNPP/Eukaryotic* (A a c.1-482). La TATA box ha estat predita pel programa tssg a c.1-514. La seqüència de l'exó 1 es mostra en majúscules i negreta. El principi de traducció (ATG) es troba a l'exó 2.

Bibliografia

- Ade M (2002) Mouse model of the week: "Pebbles"- a rock-solid model for urology research. *Deductive Genomics News* 1
- Ahmed A, Peter GJ, Taylor PM, Harper AA, Rennie MJ (1995) Sodium-independent currents of opposite polarity evoked by neutral and cationic amino acids in neutral and basic amino acid transporter cRNA-injected oocytes. *J Biol Chem* 270:8482-6.
- Ahmed A, Yao PC, Brant AM, Peter GJ, Harper AA (1997) Electrogenic L-histidine transport in neutral and basic amino acid transporter (NBAT)-expressing *Xenopus laevis* oocytes. Evidence for two functionally distinct transport mechanisms induced by NBAT expression. *J Biol Chem* 272:125-30.
- Albi JL, Canals P, Gallardo MA, Sanchez J (1994) Na(+)-independent L-alanine uptake by trout cells. Evidence for the existence of at least two functionally different acs systems. *J Membr Biol* 140:189-96.
- Antonarakis SE (1998) Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. Nomenclature Working Group. *Hum Mutat* 11:1-3
- Arş E, Serra E, Garcia J, Krüyer H, Gaona A, Lazaro C, Estivill X (2000) Mutations affecting mRNA splicing are the most common molecular defects in patients with neurofibromatosis type 1. *Hum Mol Genet* 9:237-47
- Asatoor AM, Cheng B, Edwards KD, Lant AF, Matthews DM, Milne MD, Navab F, Richards AJ (1970a) Intestinal absorption of dipeptides and corresponding free amino acids in Hartnup disease. *Clin Sci* 39:1P.
- Asatoor AM, Cheng B, Edwards KD, Lant AF, Matthews DM, Milne MD, Navab F, Richards AJ (1970b) Intestinal absorption of two dipeptides in Hartnup disease. *Gut* 11:380-7.
- Ashworth LK, Batzer MA, Brandriff B, Branscomb E, de Jong P, Garcia E, Garnes JA, Gordon LA, Lamerdin JE, Lennon G, *et al.* (1995) An integrated metric physical map of human chromosome 19. *Nat Genet* 11:422-7.
- Avissar NE, Ryan CK, Ganapathy V, Sax HC (2001) Na(+)-dependent neutral amino acid transporter ATB(0) is a rabbit epithelial cell brush-border protein. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:C963-71.
- Babu E, Kanai Y, Chairoungdua A, Kim do K, Iribe Y, Tangtrongsup S, Jutabha P, Li Y, Ahmed N, Sakamoto S, Anzai N, Nagamori S, Endou H (2003) Identification of a novel system L amino acid transporter structurally distinct from heterodimeric amino acid transporters. *J Biol Chem* 278:43838-45
- Bannai S, Tateishi N (1986) Role of membrane transport in metabolism and function of glutathione in mammals. *J Membr Biol* 89:1-8.
- Barfuss DW, Schafer JA (1981) Differences in active and passive glucose transport along the proximal nephron. *Am J Physiol* 241:F322-32.
- Baron DN, Dent CE, Harris H, Hart EW (1956) Hereditary pellagra-like skin rash with temporary cerebellar ataxia. Constant renal amino-aciduria. And other bizarre biochemical features. *Lancet* 2:421
- Bassi MT, Gasol E, Manzoni M, Pineda M, Riboni M, Martin R, Zorzano A, Borsani G, Palacín M (2001) Identification and characterisation of human xCT that co-expresses, with 4F2 heavy chain, the amino acid transport activity system xc. *Pflugers Arch* 442:286-96.
- Bassi MT, Sperandeo MP, Incerti B, Bulfone A, Pepe A, Surace EM, Gattuso C, De Grandi A, Buoninconti A, Riboni M, Manzoni M, Andria G, Ballabio A, Borsani G, Sebastio G (1999) SLC7A8, a gene mapping within the lysinuric protein intolerance critical region, encodes a new member of the glycoprotein-associated amino acid transporter family. *Genomics* 62:297-303.
- Bauch C, Forster N, Löffing-Cueni D, Summa V, Verrey F (2003) Functional cooperation of epithelial heteromeric amino acid transporters expressed in madin-darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 278:1316-22
- Bauch C, Verrey F (2002) Apical heterodimeric cystine and cationic amino acid transporter expressed in MDCK cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:F181-9.
- Beck FX, Burger-Kentischer A, Müller E (1998) Cellular response to osmotic stress in the renal medulla. *Pflugers Arch* 436:814-27
- Bendavid C, Kleta R, Long R, Ouspenskaia M, Muenke M, Haddad BR, Gahl WA (2004) FISH diagnosis of the common 57-kb deletion in CTNS causing cystinosis. *Hum Genet*

BIBLIOGRAFIA

- Bergeron M, Morel F (1969) Amino acid transport in rat renal tubules. *Am J Physiol* 216:1139-49
- Bertran J, Magagnin S, Werner A, Markovich D, Biber J, Testar X, Zorzano A, Kuhn LC, Palacín M, Murer H (1992a) Stimulation of system $\gamma(+)$ -like amino acid transport by the heavy chain of human 4F2 surface antigen in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5606-10.
- Bertran J, Werner A, Chillarón J, Nunes V, Biber J, Testar X, Zorzano A, Estivill X, Murer H, Palacín M (1993) Expression cloning of a human renal cDNA that induces high affinity transport of L-cystine shared with dibasic amino acids in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 268:14842-9.
- Bertran J, Werner A, Moore ML, Stange G, Markovich D, Biber J, Testar X, Zorzano A, Palacín M, Murer H (1992b) Expression cloning of a cDNA from rabbit kidney cortex that induces a single transport system for cystine and dibasic and neutral amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5601-5.
- Berzelius D (1833) *Calculs urinaires*. *Trait Chem* 7:424
- Bisceglia L, Calonge MJ, Dello Strologo L, Rizzoni G, de Sanctis L, Gallucci M, Beccia E, Testar X, Zorzano A, Estivill X, Zelante L, Palacín M, Gasparini P, Nunes V (1996) Molecular analysis of the cystinuria disease gene: identification of four new mutations, one large deletion, and one polymorphism. *Hum Genet* 98:447-51.
- Bisceglia L, Calonge MJ, Totaro A, Feliubadaló L, Melchionda S, Garcia J, Testar X, Gallucci M, Ponzone A, Zelante L, Zorzano A, Estivill X, Gasparini P, Nunes V, Palacín M (1997) Localization, by linkage analysis, of the cystinuria type III gene to chromosome 19q13.1. *Am J Hum Genet* 60:611-6.
- Bisceglia L, Purroy J, Jiménez-Vidal M, d'Adamo AP, Rousaud F, Beccia E, Penza R, Rizzoni G, Gallucci M, Palacín M, Gasparini P, Nunes V, Zelante L (2001) Cystinuria type I: identification of eight new mutations in SLC3A1. *Kidney Int* 59:1250-6.
- Blondeau JP (2002) Homologues of amino acid permeases: cloning and tissue expression of XAT1 and XAT2. *Gene* 286:241-8.
- Boado RJ, Li JY, Nagaya M, Zhang C, Pardridge WM (1999) Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12079-84.
- Boguski MS, Lowe TM, Tolstoshev CM (1993) dbEST—database for "expressed sequence tags". *Nat Genet* 4:332-3
- Boll M, Foltz M, Rubio-Aliaga I, Kottra G, Daniel H (2002) Functional characterization of two novel mammalian electrogenic proton- dependent amino acid cotransporters. *J Biol Chem* 277:22966-73.
- Borghi L, Guerra A, Meschi T, Briganti A, Schianchi T, Allegri F, Novarini A (1999) Relationship between supersaturation and calcium oxalate crystallization in normals and idiopathic calcium oxalate *Stones* formers. *Kidney Int* 55:1041-50
- Borsani G, Bassi MT, Sperandeo MP, De Grandi A, Buoninconti A, Riboni M, Manzoni M, Incerti B, Pepe A, Andria G, Ballabio A, Sebastio G (1999) SLC7A7, encoding a putative permease-related protein, is mutated in patients with lysinuric protein intolerance. *Nat Genet* 21:297-301.
- Boström H, Hambræus L (1964) Cystinuria in Sweden. VII. Clinical, histopathological and medicosocial aspects of the disease. *Acta Med Scand Suppl* 411
- Botzenhart E, Vester U, Schmidt C, Hesse A, Halber M, Wagner C, Lang F, Hoyer P, Zerres K, Eggermann T (2002) Cystinuria in children: distribution and frequencies of mutations in the SLC3A1 and SLC7A9 genes. *Kidney Int* 62:1136-42
- Boutros M, Ong P, Saadi I, Hiou-Tim F, Vicanek C, Rozen R, Goodyer P (1999) The human rBAT promoter mutations in cystinuria. Paper presented at American Journal of Human Genetics. San Francisco (California)
- Bové KC, Bush M, Dietz J, Jezyk P, Segal S (1981) Cystinuria in the maned wolf of South America. *Science* 212:919-20.
- Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E (1984) Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309:255-6.
- Brand, Cahill GF (1934) Further studies on metabolism of sulfur compounds in cystinuria. *Proc Soc Exp Biol Med* 31:1247
- Bridges CC, Kekuda R, Wang H, Prasad PD, Mehta P, Huang W, Smith SB, Ganapathy V (2001) Structure,

- function, and regulation of human cystine/glutamate transporter in retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:47-54.
- Brodehl J, Gellissen K (1968) Endogenous renal transport of free amino acids in infancy and childhood. *Pediatrics* 42:395-404
- Brodehl J, Gellissen K, Kowalewski S (1967) [Cistinúria aïllada (sense lisen-, ornitin- i argininúria) en una família amb tètanus hipocalcèmic](original en alemany). *Monatsschr Kinderheilkd* 115:317-20
- Broer A, Brookes N, Ganapathy V, Dimmer KS, Wagner CA, Lang F, Broer S (1999) The astroglial ASCT2 amino acid transporter as a mediator of glutamine efflux. *J Neurochem* 73:2184-94
- Bröer A, Friedrich B, Wagner CA, Fillon S, Ganapathy V, Lang F, Bröer S (2001) Association of 4F2hc with light chains LAT1, LAT2 or γ +LAT2 requires different domains. *Biochem J* 355:725-31.
- Bröer A, Hamprecht B, Bröer S (1998) Discrimination of two amino acid transport activities in 4F2 heavy chain- expressing *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem J* 333:549-54.
- Broer A, Klingel K, Kowalczyk S, Rasko JE, Cavanaugh J, Broer S (2004) Molecular cloning of mouse amino acid transport system B0, a neutral amino acid transporter related to Hartnup disorder. *J Biol Chem* 279:24467-76
- Bröer A, Wagner CA, Lang F, Bröer S (2000) The heterodimeric amino acid transporter 4F2hc/ γ +LAT2 mediates arginine efflux in exchange with glutamine. *Biochem J* 349:787-95.
- Bröer S, Bröer A, Hamprecht B (1995) The 4F2hc surface antigen is necessary for expression of system L-like neutral amino acid-transport activity in C6-BU-1 rat glioma cells: evidence from expression studies in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem J* 312:863-70.
- Bröer S, Bröer A, Hamprecht B (1997) Expression of the surface antigen 4F2hc affects system-L-like neutral- amino-acid-transport activity in mammalian cells. *Biochem J* 324:535-41.
- Broer S, Wagner CA (2002) Structure-function relationships of heterodimeric amino acid transporters. *Cell Biochem Biophys* 36:155-68
- Busch AE, Herzer T, Waldegger S, Schmidt F, Palacín M, Biber J, Markovich D, Murer H, Lang F (1994) Opposite directed currents induced by the transport of dibasic and neutral amino acids in *Xenopus* oocytes expressing the protein rBAT. *J Biol Chem* 269:25581-6.
- Caceres JF, Kornblihtt AR (2002) Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet* 18:186-93
- Calonge MJ, Gasparini P, Chillarón J, Chillón M, Gallucci M, Rousaud F, Zelante L, Testar X, Dallapiccola B, Di Silverio F, Barceló P, Estivill X, Zorzano A, Nunes V, Palacín M (1994) Cystinuria caused by mutations in rBAT, a gene involved in the transport of cystine. *Nat Genet* 6:420-5.
- Calonge MJ, Nadal M, Calvano S, Testar X, Zelante L, Zorzano A, Estivill X, Gasparini P, Palacín M, Nunes V (1995a) Assignment of the gene responsible for cystinuria (rBAT) and of markers D2S119 and D2S177 to 2p16 by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 95:633-6.
- Calonge MJ, Volpini V, Bisceglia L, Rousaud F, de Sanctis L, Beccia E, Zelante L, Testar X, Zorzano A, Estivill X, *et al.* (1995b) Genetic heterogeneity in cystinuria: the SLC3A1 gene is linked to type I but not to type III cystinuria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9667-71.
- Campbell WA, Sah DE, Medina MM, Albina JE, Coleman WB, Thompson NL (2000) TA1/LAT-1/CD98 light chain and system L activity, but not 4F2/CD98 heavy chain, respond to arginine availability in rat hepatic cells. Loss Of response in tumor cells. *J Biol Chem* 275:5347-54.
- Campbell WA, Thompson NL (2001) Overexpression of LAT1/CD98 light chain is sufficient to increase system L-amino acid transport activity in mouse hepatocytes but not fibroblasts. *J Biol Chem* 276:16877-84
- Carpenter TO, Levy HL, Holtrop ME, Shih VE, Anast CS (1985) Lysinuric protein intolerance presenting as childhood osteoporosis. Clinical and skeletal response to citrulline therapy. *N Engl J Med* 312:290-4
- Cartegni L, Chew SL, Krainer AR (2002) Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 3:285-98
- Cartegni L, Krainer AR (2002) Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nat Genet* 30:377-84

BIBLIOGRAFIA

- Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR (2003) ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res* 31:3568-71
- Casal ML, Giger U, Bovée KC, Patterson DF (1995) Inheritance of cystinuria and renal defect in Newfoundland. *J Am Vet Med Assoc* 207:1585-9.
- Chairoungdua A, Kanai Y, Matsuo H, Inatomi J, Kim DK, Endou H (2001) Identification and characterization of a novel member of the heterodimeric amino acid transporter family presumed to be associated with an unknown heavy chain. *J Biol Chem* 276:8181-8188
- Chairoungdua A, Segawa H, Kim JY, Miyamoto K, Haga H, Fukui Y, Mizoguchi K, Ito H, Takeda E, Endou H, Kanai Y (1999) Identification of an amino acid transporter associated with the cystinuria-related type II membrane glycoprotein. *J Biol Chem* 274:28845-8.
- Chang G, Roth CB (2001) Structure of MsbA from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science* 293:1793-800
- Charlet BN, Logan P, Singh G, Cooper TA (2002) Dynamic antagonism between ETR-3 and PTB regulates cell type-specific alternative splicing. *Mol Cell* 9:649-58
- Chen JG, Klus LR, Steenbergen DK, Kempson SA (1994) Hypertonic upregulation of amino acid transport system A in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 267:C529-36
- Chen JG, Rudnick G (2000) Permeation and gating residues in serotonin transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1044-9
- Cherqui S, Kalatzis V, Trugnan G, Antignac C (2001) The targeting of cystinosin to the lysosomal membrane requires a tyrosine-based signal and a novel sorting motif. *J Biol Chem* 276:13314-21
- Chesney RW (2001) Iminoglycinuria. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. Vol III. McGraw-Hill, New York, pp 4971-81
- Chillarón J, Estévez R, Mora C, Wagner CA, Suessbrich H, Lang F, Gelpí JL, Testar X, Busch AE, Zorzano A, Palacín M (1996) Obligatory amino acid exchange via systems bo, +-like and γ +L-like. A tertiary active transport mechanism for renal reabsorption of cystine and dibasic amino acids. *J Biol Chem* 271:17761-70.
- Chillarón J, Estévez R, Samarzija I, Waldegger S, Testar X, Lang F, Zorzano A, Busch A, Palacín M (1997) An intracellular trafficking defect in type I cystinuria rBAT mutants M467T and M467K. *J Biol Chem* 272:9543-9.
- Chillarón J, Roca R, Valencia A, Zorzano A, Palacín M (2001) Heteromeric amino acid transporters: biochemistry, genetics, and physiology. *Am J Physiol Renal Physiol* 281:F995-1018.
- Choi DW (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1:623-34
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-9
- Chou Q, Russell M, Birch DE, Raymond J, Bloch W (1992) Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Res* 20:1717-23
- Christensen HN (1990) Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol Rev* 70:43-77.
- Coady MJ, Jalal F, Chen X, Lemay G, Berteloot A, Lapointe JY (1994) Electrogenic amino acid exchange via the rBAT transporter. *FEBS Lett* 356:174-8.
- Combe C, Deforges-Lasseur C, Chehab Z, de Precigout V, Aparicio M (1993) [Cystine lithiasis and its treatment with d-penicillamine. The experience in a nephrology service in a 23-year period. Apropos of 26 patients]. *Ann Urol* 27:79-83
- Cooper TA, Mattox W (1997) The regulation of splice-site selection, and its role in human disease. *Am J Hum Genet* 61:259-66
- Cornelius CE, Bishop JA, Schaffer MH (1967) A quantitative study of amino aciduria in dachshunds with a history of cystine urolithiasis. *Cornell Vet* 57:177-83.
- Costa GL, Grafsky A, Weiner MP (1994) Cloning and analysis of PCR-generated DNA fragments. *PCR Methods Appl* 3:338-45

- Coulter LR, Landree MA, Cooper TA (1997) Identification of a new class of exonic splicing enhancers by in vivo selection. *Mol Cell Biol* 17:2143-50
- Crawhall JC, Scowen EF, Thompson CJ, Watts RW (1967) The renal clearance of amino acids in cystinuria. *J Clin Invest* 46:1162-71.
- Crawhall JC, Scowen EF, Watts RWE (1963) Effect of penicillamine on cystinuria. *B M J* 1:588-590
- Crawhall JC, Segal S (1965) Sulphocysteine in the urine of the blotched Kenya genet. *Nature* 208:1320-2
- Crawhall JC, Segal S (1966) The intracellular cysteine-cystine ratio in kidney cortex. *Biochem J* 99:19c
- Crawhall JC, Watts RW (1968) Cystinuria. *Am J Med* 45:736-55.
- Cusworth DC, Dent CE (1960) Renal clearances of amino acids in normal adults and in patients with aminoaciduria. *Biochem J* 74:550-61
- Dahlberg PJ, van den B, Kurtz SB, Wilson DM, Smith LH (1977) Clinical features and management of cystinuria. *Mayo Clin Proc* 52:533-42.
- Dall'Asta V, Bussolati O, Sala R, Rotoli BM, Sebastio G, Sperandio MP, Andria G, Gazzola GC (2000) Arginine transport through system y(+)L in cultured human fibroblasts: normal phenotype of cells from LPI subjects. *Am J Physiol Cell Physiol* 279:C1829-37.
- Daniel H, Kottra G (2004) The proton oligopeptide cotransporter family SLC15 in physiology and pharmacology. *Pflugers Arch* 447:610-8
- Dantzer WH, Silbernagl S (1988) Amino acid transport by juxtamedullary nephrons: distal reabsorption and recycling. *Am J Physiol* 255:F397-407.
- Dantzer WH, Silbernagl S (1990) Amino acid transport: microinfusion and micropuncture of Henle's loops and vasa recta. *Am J Physiol* 258:F504-13.
- Dantzer WH, Silbernagl S (1991) Specificity of amino acid transport in renal papilla: microinfusion of Henle's loops and vasa recta. *Am J Physiol* 261:F495-504
- Datta SP, Harris H (1951) A convenient apparatus for paper chromatography; results of a survey of the urinary amino-acid patterns of some animals. *J Physiol* 114:39-41 P
- Dave MH, Schulz N, Zecevic M, Wagner CA, Verrey F (2004) Expression of heteromeric amino acid transporters along the murine intestine. *J Physiol* 558:597-610
- de Sanctis L, Bonetti G, Bruno M, De Luca F, Bisceglia L, Palacín M, Dianzani I, Ponzone A (2001) Cystinuria phenotyping by oral lysine and arginine loading. *Clin Nephrol* 56:467-74.
- Dello Strologo L, Pras E, Pontesilli C, Beccia E, Ricci-Barbini V, de Sanctis L, Ponzone A, Gallucci M, Bisceglia L, Zelante L, Jiménez-Vidal M, Font M, Zorzano A, Rousaud F, Nunes V, Gasparini P, Palacín M, Rizzoni G (2002) Comparison between SLC3A1 and SLC7A9 cystinuria patients and carriers: a need for a new classification. *J Am Soc Nephrol* 13:2547-53.
- Dello Strologo L, Principato F, Sinibaldi D, Appiani AC, Terzi F, Dartois AM, Rizzoni G (1997) Feeding dysfunction in infants with severe chronic renal failure after long-term nasogastric tube feeding. *Pediatr Nephrol* 11:84-6
- den Dunnen JT, Antonarakis SE (2000) Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat* 15:7-12
- den Dunnen JT, Antonarakis SE (2001) Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet* 109:121-4
- Deng C, Capecchi MR (1992) Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and the target locus. *Mol Cell Biol* 12:3365-71
- Dent CE, Rose GA (1951) Amino acid metabolism in cystinuria. *Quart. J. Med.* 79:205-19
- Dent CE, Senior B (1955) Studies on the treatment of cystinuria. *B J Urol* 27:317-332
- Dent CE, Senior B, Walshe JM (1954) Pathogenesis of cystinuria. II. Polarographic studies of metabolism of sulfur containing amino acids. *J Clin Invest* 33:1216-26
- Desjeux JF, Simell RO, Dumontier AM, Perheentupa J (1980) Lysine fluxes across the jejunal epithelium in lysinuric protein intolerance. *J Clin Invest* 65:1382-7.

BIBLIOGRAFIA

- Devés R, Boyd CA (2000) Surface antigen CD98(4F2): not a single membrane protein, but a family of proteins with multiple functions. *J Membr Biol* 173:165-77.
- Dib C, Faure S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, Millasseau P, Marc S, Hazan J, Seboun E, Lathrop M, Gyapay G, Morissette J, Weissenbach J (1996) A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 380:152-4
- DiBartola SP, Chew DJ, Horton ML (1991) Cystinuria in a cat. *J Am Vet Med Assoc* 198:102-4.
- Doetschman T, Gregg RG, Maeda N, Hooper ML, Melton DW, Thompson S, Smithies O (1987) Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* 330:576-8.
- Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16:6127-45
- D'Souza I, Poorkaj P, Hong M, Nochlin D, Lee VM, Bird TD, Schellenberg GD (1999) Missense and silent tau gene mutations cause frontotemporal dementia with parkinsonism-chromosome 17 type, by affecting multiple alternative RNA splicing regulatory elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5598-603
- Dutzler R, Campbell EB, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R (2002) X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* 415:287-94
- Egoshi KI, Akakura K, Kodama T, Ito H (2000) Identification of five novel SLC3A1 (rBAT) gene mutations in Japanese cystinuria. *Kidney Int* 57:25-32.
- Endsley JK, Phillips JA, Hruska KA, Denneberg T, Carlson J, George AL (1997) Genomic organization of a human cystine transporter gene (SLC3A1) and identification of novel mutations causing cystinuria. *Kidney Int* 51:1893-9.
- Estévez R, Camps M, Rojas AM, Testar X, Devés R, Hediger MA, Zorzano A, Palacín M (1998) The amino acid transport system $\gamma^+L/4F2hc$ is a heteromultimeric complex. *Faseb J* 12:1319-29.
- Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-6.
- Evans WP, Resnick MI, Boyce WH (1982) Homozygous cystinuria—evaluation of 35 patients. *J Urol* 127:707-9.
- Evered DF (1956) The excretion of amino acids by the human: a quantitative study with ion-exchange chromatography. *Biochem J* 62:416
- Fairbrother WG, Yeh RF, Sharp PA, Burge CB (2002) Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes. *Science* 297:1007-13
- Fan MZ, Matthews JC, Etienne NM, Stoll B, Lackeyram D, Burrin DG (2004) Expression of apical membrane L-glutamate transporters in neonatal porcine epithelial cells along the small intestinal crypt-villus axis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287:G385-98
- Faustino NA, Cooper TA (2003) Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev* 17:419-37
- Feksa LR, Cornelio A, Dutra-Filho CS, De Souza Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM (2004) Inhibition of pyruvate kinase activity by cystine in brain cortex of rats. *Brain Res* 1012:93-100
- Felig P (1975) Amino acid metabolism in man. *Annu Rev Biochem* 44:933-55
- Feliubadaló L, Arbones ML, Manas S, Chillarón J, Visa J, Rodes M, Rousaud F, Zorzano A, Palacín M, Nunes V (2003) Slc7a9-deficient mice develop cystinuria non-I and cystine urolithiasis. *Hum Mol Genet* 12:2097-108
- Feliubadaló L, Bisceglia L, Font M, Dello Strologo L, Beccia E, Arslan-Kirchner M, Steinmann B, Zelante L, Estivill X, Zorzano A, Palacín M, Gasparini P, Nunes V (1999a) Recombinant families locate the gene for non-type I cystinuria between markers C13 and D19S587 on chromosome 19q13.1. *Genomics* 60:362-5.
- Feliubadaló L, Font M, Purroy J, Rousaud F, Estivill X, Nunes V, Golomb E, et al. (1999b) Non-type I cystinuria caused by mutations in SLC7A9, encoding a subunit (bo,+AT) of rBAT. International Cystinuria Consortium. *Nat Genet* 23:52-7.
- Fenczik CA, Sethi T, Ramos JW, Hughes PE, Ginsberg MH (1997) Complementation of dominant suppression implicates CD98 in integrin activation. *Nature* 390:81-5
- Fenczik CA, Zent R, Dellos M, Calderwood DA, Satriano J, Kelly C, Ginsberg MH (2001) Distinct domains

- of CD98hc regulate integrins and amino acid transport. *J Biol Chem* 276:8746-52
- Fernández E, Carrascal M, Rousaud F, Abián J, Zorzano A, Palacín M, Chillarón J (2002) rBAT-b(0,+)-AT heterodimer is the main apical reabsorption system for cystine in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:F540-8.
- Fernández E, Torrents D, Chillarón J, Martín Del Río R, Zorzano A, Palacín M (2003) Basolateral LAT-2 has a major role in the transepithelial flux of L-cystine in the renal proximal tubule cell line OK. *J Am Soc Nephrol* 14:837-47
- Fincham DA, Mason DK, Young JD (1985) Characterization of a novel Na⁺-independent amino acid transporter in horse erythrocytes. *Biochem J* 227:13-20.
- Font M, Feliubadaló L, Estivill X, Nunes V, Golomb E, Kreiss Y, Pras E, Bisceglia L, d'Adamo AP, Zelante L, Gasparini P, Bassi MT, George Jr AL, Manzoni M, Riboni M, Ballabio A, Borsani G, Reig N, Fernández E, Zorzano A, Bertran J, Palacín M (2001) Functional analysis of mutations in SLC7A9, and genotype-phenotype correlation in non-Type I cystinuria. *Hum Mol Genet* 10:305-316
- Foreman JW, Hwang SM, Segal S (1980) Transport interactions of cystine and dibasic amino acids in isolated rat renal tubules. *Metabolism* 29:53-61.
- Foreman JW, McNamara PD, Pepe LM, Ginkinger K, Segal S (1985) Uptake of proline by brushborder vesicles isolated from human kidney cortex. *Biochem Med* 34:304-9
- Fox M, Thier S, Rosenberg L, Kiser W, Segal S (1964) Evidence against a single renal transport defect in cystinuria. *N Engl J Med* 270:556-61
- Frimpter GW (1963) Cystinuria: Metabolism of the disulfide of cysteine and homocysteine. *J Clin Invest* 42:1956-64
- Frimpter GW, Horwith M, Furth E, Fellows RE, Thompson DD (1962) Inulin and endogenous amino acid renal clearances in cystinuria: evidence for tubular secretion. *J Clin Invest* 41:281
- Fukasawa Y, Segawa H, Kim JY, Chairoungdua A, Kim DK, Matsuo H, Cha SH, Endou H, Kanai Y (2000) Identification and characterization of a Na⁽⁺⁾-independent neutral amino acid transporter that associates with the 4F2 heavy chain and exhibits substrate selectivity for small neutral D- and L-amino acids. *J Biol Chem* 275:9690-8.
- Furlong TJ, Posen S (1990) D-penicillamine and the transport of L-cystine by rat and human renal cortical brush-border membrane vesicles. *Am J Physiol* 258:F321-7.
- Furriols M, Chillarón J, Mora C, Castelló A, Bertran J, Camps M, Testar X, Vilaró S, Zorzano A, Palacín M (1993) rBAT, related to L-cysteine transport, is localized to the microvilli of proximal straight tubules, and its expression is regulated in kidney by development. *J Biol Chem* 268:27060-8.
- Gahl WA, Reed GF, Thoene JG, Schulman JD, Rizzo WB, Jonas AJ, Denman DW, Schlesselman JJ, Corden BJ, Schneider JA (1987) Cysteamine therapy for children with nephropathic cystinosis. *N Engl J Med* 316:971-7
- Gahl WA, Thoene JG, Schneider JA (2001) Cystinosis: A disorder of lysosomal membrane transport. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. Vol III. McGraw-Hill, New York, pp 5085-5108
- Gahl WA, Thoene JG, Schneider JA (2002) Cystinosis. *N Engl J Med* 347:111-21
- García E, Elliott J, Gorvad A, Brandriff B, Gordon L, Soliman KM, Ashworth LK, Lennon G, Burgin M, Lamerdin J, et al. (1995) A continuous high-resolution physical map spanning 17 megabases of the q12, q13.1, and q13.2 cytogenetic bands of human chromosome 19. *Genomics* 27:52-66.
- Garrod AE (1908) Inborn errors of metabolism. *Lancet* 2
- Gasol E, Jiménez-Vidal M, Chillarón J, Zorzano A, Palacín M (2004) Membrane topology of system xc⁻ light subunit reveals a re-entrant loop with substrate-restricted accessibility. *J Biol Chem* 279:31228-36
- Gasparini P, Calonge MJ, Bisceglia L, Purroy J, Dianzani I, Notarangelo A, Rousaud F, Gallucci M, Testar X, Ponzzone A, et al. (1995) Molecular genetics of cystinuria: identification of four new mutations and seven polymorphisms, and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 57:781-8.

BIBLIOGRAFIA

- Gaugitsch HW, Prieschl EE, Kalthoff F, Huber NE, Baumruker T (1992) A novel transiently expressed, integral membrane protein linked to cell activation. Molecular cloning via the rapid degradation signal AUUUA. *J Biol Chem* 267:11267-73.
- Gingrich JA, Hen R (2000) The broken mouse: the role of development, plasticity and environment in the interpretation of phenotypic changes in knockout mice. *Curr Opin Neurobiol* 10:146-52.
- Gingrich JR, Roder J (1998) Inducible gene expression in the nervous system of transgenic mice. *Annu Rev Neurosci* 21:377-405
- Gitomer WL, Reed BY, Ruml LA, Pak CY (1998a) 335-base deletion in the mRNA coding for a dibasic amino acid transporter-like protein (SLC3A1) isolated from a patient with cystinuria. *Hum Mutat Suppl*:S69-71.
- Gitomer WL, Reed BY, Ruml LA, Sakhaee K, Pak CY (1998b) Mutations in the genomic deoxyribonucleic acid for SLC3A1 in patients with cystinuria. *J Clin Endocrinol Metab* 83:3688-94.
- Goodyer P, Saadi I, Ong P, Elkas G, Rozen R (1998) Cystinuria subtype and the risk of nephrolithiasis. *Kidney Int* 54:56-61.
- Goodyer PR, Clow C, Reade T, Girardin C (1993) Prospective analysis and classification of patients with cystinuria identified in a newborn screening program. *J Pediatr* 122:568-72.
- Grabowski PJ (1998) Splicing regulation in neurons: tinkering with cell-specific control. *Cell* 92:709-12
- Grunewald M, Bendahan A, Kanner BI (1998) Biotinylation of single cysteine mutants of the glutamate transporter GLT-1 from rat brain reveals its unusual topology. *Neuron* 21:623-32
- Grunewald M, Menaker D, Kanner BI (2002) Cysteine-scanning mutagenesis reveals a conformationally sensitive reentrant pore-loop in the glutamate transporter GLT-1. *J Biol Chem* 277:26074-80
- Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, Rajewsky K (1994) Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265:103-6.
- Guillén M, Corella D, Cabello ML, Gonzalez JI, Sabater A, Chavez JF, Hernandez Yago J (2004) Identification of novel SLC3A1 gene mutations in Spanish cystinuria families and association with clinical phenotypes. *Clinical Genetics on-line*
- Guyton AC, Hall JE (2001) *Tratado de fisiología médica*. McGraw-Hill/interamericana de España, Madrid
- H.G.S.C. (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431:931-45
- Haberle D, Christophel W, Deetjen P (1969) [Influence of intraluminal pH changes on the transport of weak electrolytes in rat proximal tubules]. *Pflugers Arch* 307:R67
- Hakuba N, Koga K, Gyo K, Usami SI, Tanaka K (2000) Exacerbation of noise-induced hearing loss in mice lacking the glutamate transporter GLAST. *J Neurosci* 20:8750-3
- Halestrap AP, Meredith D (2004) The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch* 447:619-28
- Haliassos A, Chomel JC, Grandjouan S, Kruh J, Kaplan JC, Kitzis A (1989) Detection of minority point mutations by modified PCR technique: a new approach for a sensitive diagnosis of tumor-progression markers. *Nucleic Acids Res* 17:8093-9
- Handler JS, Kwon HM (2001) Transcriptional regulation by changes in tonicity. *Kidney Int* 60:408-11
- Hardouin SN, Nagy A (2000) Mouse models for human disease. *Clin Genet* 57:237-44.
- Harnevik L, Fjellstedt E, Molbaek A, Denneberg T, Soderkvist P (2003) Mutation analysis of SLC7A9 in cystinuria patients in Sweden. *Genet Test* 7:13-20
- Harnevik L, Fjellstedt E, Molbaek A, Tiselius HG, Denneberg T, Soderkvist P (2001) Identification of 12 novel mutations in the SLC3A1 gene in Swedish cystinuria patients. *Hum Mutat* 18:516-25
- Harris H, Mittwoch U, Robson EB, Warren FL (1955) Phenotypes and genotypes in cystinuria. *Ann Hum Genet* 20:57
- Hashimoto A, Oka T (1997) Free D-aspartate and D-serine in the mammalian brain and periphery. *Prog Neurobiol* 52:325-53
- Hasty P, Ramirez-Solis R, Krumlauf R, Bradley A (1991a) Introduction of a subtle mutation into the Hox-

- 2.6 locus in embryonic stem cells. *Nature* 350:243-6.
- Hasty P, Rivera-Perez J, Bradley A (1991b) The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 11:5586-91.
- Hebert SC (1992) Nephron heterogeneity. In: Windhager EE (ed) *Handbook of Physiology*. Vol I. Section 8: Renal Physiology. Oxford University Press, New York, pp 875-926
- Hediger MA, Welbourne TC (1999) Introduction: glutamate transport, metabolism, and physiological responses. *Am J Physiol* 277:F477-80
- Henthorn PS, Liu J, Gidalevich T, Fang J, Casal ML, Patterson DF, Giger U (2000) Canine cystinuria: polymorphism in the canine SLC3A1 gene and identification of a nonsense mutation in cystinuric Newfoundland dogs. *Hum Genet* 107:295-303.
- Hillman RE, Stewart A, Miles JH (1986) Amino acid transport defect in intestine not affecting kidney. *Pediatr Res* 20:265A
- Hirai T, Heymann JA, Shi D, Sarker R, Maloney PC, Subramaniam S (2002) Three-dimensional structure of a bacterial oxalate transporter. *Nat Struct Biol* 9:597-600
- Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E (1994) *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Hoppe A, Denneberg T, Jeppsson JO, Kagedal B (1993) Urinary excretion of amino acids in normal and cystinuric dogs. *Br Vet J* 149:253-68.
- Horsford J, Saadi I, Raelson J, Goodyer PR, Rozen R (1996) Molecular genetics of cystinuria in French Canadians: identification of four novel mutations in type I patients. *Kidney Int* 49:1401-6.
- Ishii T, Sato H, Miura K, Sagara J, Bannai S (1992) Induction of cystine transport activity by stress. *Ann N Y Acad Sci* 663:497-8.
- Isnard AD, Thomas D, Surdin-Kerjan Y (1996) The study of methionine uptake in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a new family of amino acid permeases. *J Mol Biol* 262:473-84.
- Ito H, Murakami M, Miyauchi T, Mori I, Yamaguchi K, Usui T, Shimazaki J (1983) The incidence of cystinuria in Japan. *J Urol* 129:1012-4.
- Iwama H, Takahashi K, Kure S, Hayashi F, Narisawa K, Tada K, Mizoguchi M, Takashima S, Tomita U, Nishikawa T (1997) Depletion of cerebral D-serine in non-ketotic hyperglycinemia: possible involvement of glycine cleavage system in control of endogenous D-serine. *Biochem Biophys Res Commun* 231:793-6
- Jack DL, Paulsen IT, Saier MH (2000) The amino acid/polyamine/organocation (APC) superfamily of transporters specific for amino acids, polyamines and organocations. *Microbiology* 146:1797-814.
- Jaeger P, Portmann L, Saunders A, Rosenberg LE, Thier SO (1986) Anticystinuric effects of glutamine and of dietary sodium restriction. *N Engl J Med* 315:1120-3.
- Janecek S (1997) alpha-Amylase family: molecular biology and evolution. *Prog Biophys Mol Biol* 67:67-97
- Jans AW, Grunewald RW, Kinne RK (1988) Pathways for organic osmolyte synthesis in rabbit renal papillary tissue, a metabolic study using ¹³C-labeled substrates. *Biochim Biophys Acta* 971:157-62
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R (2002) Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* 417:515-22
- Jiménez-Vidal M, Gasol E, Zorzano A, Nunes V, Palacín M, Chillarón J (2004) Thiol modification of cysteine 327 in the eighth transmembrane domain of the light subunit xCT of the heteromeric cystine/glutamate antiporter suggests close proximity to the substrate binding site/permeation pathway. *J Biol Chem* 279:11214-21
- Joly D, Rieu P, Mejean A, Gagnadoux MF, Daudon M, Jungers P (1999) Treatment of cystinuria. *Pediatr Nephrol* 13:945-50.
- Joyner AL (1993) *Gene targeting: A practical approach*. Oxford University Press, Oxford
- Kalatzis V, Cherqui S, Antignac C, Gasnier B (2001) Cystinosin, the protein defective in cystinosis, is a H(+)-driven lysosomal cystine transporter. *Embo J* 20:5940-9

BIBLIOGRAFIA

- Kalatzis V, Nevo N, Cherqui S, Gasnier B, Antignac C (2004) Molecular pathogenesis of cystinosis: effect of CTNS mutations on the transport activity and subcellular localization of cystinosin. *Hum Mol Genet* 13:1361-71
- Kan JL, Green MR (1999) Pre-mRNA splicing of IgM exons M1 and M2 is directed by a juxtaposed splicing enhancer and inhibitor. *Genes Dev* 13:462-71
- Kanai Y, Fukasawa Y, Cha SH, Segawa H, Chairoungdua A, Kim DK, Matsuo H, Kim JY, Miyamoto K, Takeda E, Endou H (2000) Transport properties of a system y⁺L neutral and basic amino acid transporter. Insights into the mechanisms of substrate recognition. *J Biol Chem* 275:20787-93.
- Kanai Y, Hediger MA (2003) The glutamate and neutral amino acid transporter family: physiological and pharmacological implications. *Eur J Pharmacol* 479:237-47
- Kanai Y, Hediger MA (2004) The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflugers Arch* 447:469-79
- Kanai Y, Segawa H, Miyamoto K, Uchino H, Takeda E, Endou H (1998) Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J Biol Chem* 273:23629-32.
- Kanai Y, Stelzner MG, Lee WS, Wells RG, Brown D, Hediger MA (1992) Expression of mRNA (D2) encoding a protein involved in amino acid transport in S3 proximal tubule. *Am J Physiol* 263:F1087-92.
- Kavanaugh MP, Bendahan A, Zerangue N, Zhang Y, Kanner BI (1997) Mutation of an amino acid residue influencing potassium coupling in the glutamate transporter GLT-1 induces obligate exchange. *J Biol Chem* 272:1703-8
- Kekuda R, Prasad PD, Fei YJ, Torres-Zamorano V, Sinha S, Yang-Feng TL, Leibach FH, Ganapathy V (1996) Cloning of the sodium-dependent, broad-scope, neutral amino acid transporter Bo from a human placental choriocarcinoma cell line. *J Biol Chem* 271:18657-61
- Kekuda R, Torres-Zamorano V, Fei YJ, Prasad PD, Li HW, Mader LD, Leibach FH, Ganapathy V (1997) Molecular and functional characterization of intestinal Na⁽⁺⁾-dependent neutral amino acid transporter B0. *Am J Physiol* 272:G1463-72
- Kelly S (1978) Cystinuria genotypes predicted from excretion patterns. *Am J Med Genet* 2:175-90
- Kilby NJ, Snaith MR, Murray JA (1993) Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet* 9:413-21.
- Kim DK, Kanai Y, Chairoungdua A, Matsuo H, Cha SH, Endou H (2001a) Expression cloning of a Na⁺-independent aromatic amino acid transporter with structural similarity to H⁺/monocarboxylate transporters. *J Biol Chem* 276:17221-8.
- Kim do K, Kanai Y, Matsuo H, Kim JY, Chairoungdua A, Kobayashi Y, Enomoto A, Cha SH, Goya T, Endou H (2002) The human T-type amino acid transporter-1: characterization, gene organization, and chromosomal location. *Genomics* 79:95-103.
- Kim JY, Kanai Y, Chairoungdua A, Cha SH, Matsuo H, Kim DK, Inatomi J, Sawa H, Ida Y, Endou H (2001b) Human cystine/glutamate transporter: cDNA cloning and upregulation by oxidative stress in glioma cells. *Biochim Biophys Acta* 1512:335-44.
- Kleta R, Romeo E, Ristic Z, Ohura T, Stuart C, Arcos-Burgos M, Dave MH, et al. (2004) Mutations in SLC6A19, encoding B0AT1, cause Hartnup disorder. *Nat Genet* 36:999-1002
- Krawczak M, Reiss J, Cooper DN (1992) The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet* 90:41-54
- Kuhn R, Schwenk F (1997) Advances in gene targeting methods. *Curr Opin Immunol* 9:183-8.
- Kukita Y, Tahira T, Sommer SS, Hayashi K (1997) SSCP analysis of long DNA fragments in low pH gel. *Hum Mutat* 10:400-7
- Kumashiro S, Hashimoto A, Nishikawa T (1995) Free D-serine in post-mortem brains and spinal cords of individuals with and without neuropsychiatric diseases. *Brain Res* 681:117-25
- Ladd AN, Cooper TA (2002) Finding signals that regulate alternative splicing in the post-genomic era. *Genome Biol* 3:reviews0008
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, et al. (2001) Initial

- sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921
- Langen H, von Kietzell D, Byrd D, Arslan-Kirchner M, Vester U, Stuhmann M, Dork T, Saar K, Reis A, Schmidtke J, Brodehl J (2000) Renal polyamine excretion, tubular amino acid reabsorption and molecular genetics in cystinuria. *Pediatr Nephrol* 14:376-84.
- Lauteala T, Mykkanen J, Sperandeo MP, Gasparini P, Savontaus ML, Simell O, Andria G, Sebastio G, Aula P (1998) Genetic homogeneity of lysinuric protein intolerance. *Eur J Hum Genet* 6:612-5.
- Lauteala T, SiStonesn P, Savontaus ML, Mykkanen J, Simell J, Lukkarinen M, Simell O, Aula P (1997) Lysinuric protein intolerance (LPI) gene maps to the long arm of chromosome 14. *Am J Hum Genet* 60:1479-86.
- Leclerc D, Boutros M, Suh D, Wu Q, Palacín M, Ellis JR, Goodyer P, Rozen R (2002) SLC7A9 mutations in all three cystinuria subtypes. *Kidney Int* 62:1550-9.
- Leclerc D, Wu Q, Ellis JR, Goodyer P, Rozen R (2001) Is the SLC7A10 gene on chromosome 19 a candidate locus for cystinuria? *Mol Genet Metab* 73:333-9.
- Lee WS, Wells RG, Sabbag RV, Mohandas TK, Hediger MA (1993) Cloning and chromosomal localization of a human kidney cDNA involved in cystine, dibasic, and neutral amino acid transport. *J Clin Invest* 91:1959-63.
- Leonard JV, Marrs TC, Addison JM, Burston D, Clegg KM, Lloyd JK, Matthews DM, Seakins JW (1976) Intestinal absorption of amino acids and peptides in Hartnup disorder. *Pediatr Res* 10:246-9
- Lester FT, Cusworth DC (1973) Lysine infusion in cystinuria: theoretical renal thresholds for lysine. *Clin Sci* 44:99-111.
- Levinsky NG, Lieberthal W (1992) Clearance techniques. In: Windhager EE (ed) *Handbook of Physiology*. Vol I. Section 8: Renal Physiology. Oxford University Press, New York, pp 227-248
- Levtchenko E, de Graaf-Hess A, Wilmer M, van den Heuvel L, Monnens L, Blom H (2004) Comparison of cystine determination in mixed leukocytes vs polymorphonuclear leukocytes for diagnosis of cystinosis and monitoring of cysteamine therapy. *Clin Chem* 50:1686-8
- Levy HL (1973) Genetic screening. In: Harris H, Hirschorn K (eds) *Advances in human genetics*. Vol 4. Plenum, New York, pp 1-104
- Levy HL (2001) Hartnup disorder. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. Vol III. McGraw-Hill, New York, pp 4957-69
- Levy HL, Shih VE, McCready RA (1972) Massachusetts metabolic disorders screening program. In: Harris M (ed) *Early diagnosis in human genetic defects*. U.S. Govt. Printing Office, Washington, pp 47-66
- Li ZW, Stark G, Gotz J, Rulicke T, Gschwind M, Huber G, Muller U, Weissmann C (1996) Generation of mice with a 200-kb amyloid precursor protein gene deletion by Cre recombinase-mediated site-specific recombination in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6158-62.
- Lim LP, Burge CB (2001) A computational analysis of sequence features involved in recognition of short introns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11193-8
- Liu HX, Cartegni L, Zhang MQ, Krainer AR (2001) A mechanism for exon skipping caused by nonsense or missense mutations in BRCA1 and other genes. *Nat Genet* 27:55-8
- Liu HX, Chew SL, Cartegni L, Zhang MQ, Krainer AR (2000) Exonic splicing enhancer motif recognized by human SC35 under splicing conditions. *Mol Cell Biol* 20:1063-71
- Liu HX, Zhang M, Krainer AR (1998) Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins. *Genes Dev* 12:1998-2012
- Longo L, Bygrave A, Grosveld FG, Pandolfi PP (1997) The chromosome make-up of mouse embryonic stem cells is predictive of somatic and germ cell chimaerism. *Transgenic Res* 6:321-8
- Maiorino RM, Bruce DC, Aposhian HV (1989) Determination and metabolism of dithiol chelating agents. VI. Isolation and identification of the mixed disulfides of meso-2,3- dimercaptosuccinic acid with L-cysteine in human urine. *Toxicol Appl Pharmacol* 97:338-49.
- Malstrom K, Stange G, Murer H (1987) Identification of proximal tubular transport functions in the established kidney cell line, OK. *Biochim Biophys Acta* 902:269-77

BIBLIOGRAFIA

- Mandel N (1996) Mechanism of *Stones* formation. *Seminars in Nephrology* 16:364-374
- Mannion BA, Kolesnikova TV, Lin SH, Wang S, Thompson NL, Hemler ME (1998) The light chain of CD98 is identified as E16/TA1 protein. *J Biol Chem* 273:33127-9.
- Marcet A (1817) An essay on the chemical history and medical treatment of calculous disorders. In: Longman, Hurst, Rees, Orme, Brown (eds), London, pp 79-88
- Marck C (1988) 'DNA Strider': a 'C' program for the fast analysis of DNA and protein sequences on the Apple Macintosh family of computers. *Nucleic Acids Res* 16:1829-36
- Mariotti F, Huneau JF, Mahe S, Tome D (2000) Protein metabolism and the gut. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 3:45-50
- Markovich D, Stange G, Bertran J, Palacín M, Werner A, Biber J, Murer H (1993) Two mRNA transcripts (rBAT-1 and rBAT-2) are involved in system b₀(+)-related amino acid transport. *J Biol Chem* 268:1362-7.
- Martin GR (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:7634-8.
- Martin X, Salas M, Labeeuw M, Pozet N, Gelet A, Dubernard JM (1991) *Cystine Stones*: the impact of new treatment. *Br J Urol* 68:234-9.
- Martinez Llamas MS, Cabrera Morales CM, Bravo Soto JA, Canton J, Pedrinaci S (2004) [Cystinosis: diagnosis through the measurement of the leukocyte cystine content by HPLC]. *Med Clin (Barc)* 123:97-9
- Mastroberardino L, Spindler B, Pfeiffer R, Skelly PJ, Loffing J, Shoemaker CB, Verrey F (1998) Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family. *Nature* 395:288-91.
- Matsuo H, Kanai Y, Kim JY, Chairoungdua A, Kim do K, Inatomi J, Shigeta Y, Ishimine H, Chaekuntode S, Tachampa K, Choi HW, Babu E, Fukuda J, Endou H (2002) Identification of a novel Na⁺-independent acidic amino acid transporter with structural similarity to the member of a heterodimeric amino acid transporter family associated with unknown heavy chains. *J Biol Chem* 277:21017-26.
- Maunsbach AB, Christensen EI (1992) Functional ultrastructure of the proximal tubule. In: Windhager EE (ed) *Handbook of Physiology*. Vol I. Section 8: Renal Physiology. Oxford University Press, New York, pp 41-108
- McCarthy CF, Borland JL, Lynch HJ, Owen EE, Tyor MP (1964) Defective Uptake of basic aminoacids and L-Cystine by intestinal mucosa of patients with cystinuria. *J Clin Invest* 43:1518-24
- McCarthy EM, Phillips JA, 3rd (1998) Characterization of an intron splice enhancer that regulates alternative splicing of human GH pre-mRNA. *Hum Mol Genet* 7:1491-6
- McDonald JE, Henneman PH (1965) *Stones* dissolution in vivo and control of cystinuria with penicillamine. *N Engl J Med* 273:578
- McNamara PD, Pepe LM, Segal S (1981) Cystine uptake by rat renal brush-border vesicles. *Biochem J* 194:443-9.
- McNamara PD, Rea CT, Segal S (1992) Ion dependence of cystine and lysine uptake by rat renal brush-border membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1103:101-8.
- Meier C, Ristic Z, Klauser S, Verrey F (2002) Activation of system L heterodimeric amino acid exchangers by intracellular substrates. *Embo J* 21:580-9
- Melançon SB, Dallaire L, Lemieux B, Robitaille P, Potier M (1977) Dicarboxylic aminoaciduria: an inborn error of amino acid conservation. *J Pediatr* 91:422-7.
- Merlin D, Sitaraman S, Liu X, Eastburn K, Sun J, Kucharzik T, Lewis B, Madara JL (2001) CD98-mediated links between amino acid transport and beta 1 integrin distribution in polarized columnar epithelia. *J Biol Chem* 276:39282-9
- Milne MD (1969) Hartnup disease. *Biochem J* 111:3P
- Miyakawa H, Woo SK, Chen CP, Dahl SC, Handler JS, Kwon HM (1998) Cis- and trans-acting factors regulating transcription of the BGT1 gene in response to hypertonicity. *Am J Physiol* 274:F753-61
- Miyamoto K, Katai K, Tatsumi S, Sone K, Segawa H, Yamamoto H, Taketani Y, Takada K, Morita K, Kanayama H, et al. (1995) Mutations of the basic amino acid transporter gene associated with cystinuria. *Biochem J* 310:951-5.

- Mizoguchi K, Cha SH, Chairoungdua A, Kim DK, Shigeta Y, Matsuo H, Fukushima J, Awa Y, Akakura K, Goya T, Ito H, Endou H, Kanai Y (2001) Human cystinuria-related transporter: localization and functional characterization. *Kidney Int* 59:1821-33.
- Modrek B, Lee C (2002) A genomic view of alternative splicing. *Nat Genet* 30:13-9
- Mohrenweiser HW, Tsujimoto S, Gordon L, Olsen AS (1998) Regions of sex-specific hypo- and hyper-recombination identified through integration of 180 genetic markers into the metric physical map of human chromosome 19. *Genomics* 47:153-62.
- Moore RC, Redhead NJ, Selfridge J, Hope J, Manson JC, Melton DW (1995) Double replacement gene targeting for the production of a series of mouse strains with different prion protein gene alterations. *Biotechnology (N Y)* 13:999-1004.
- Mora C, Chillarón J, Calonge MJ, Forgo J, Testar X, Nunes V, Murer H, Zorzano A, Palacín M (1996) The rBAT gene is responsible for L-cystine uptake via the b₀(+)-like amino acid transport system in a "renal proximal tubular" cell line (OK cells). *J Biol Chem* 271:10569-76.
- Morin CL, Thompson MW, Jackson SH, Sass-Kortsak A (1971) Biochemical and genetic studies in cystinuria: observations on double heterozygotes of genotype I-II. *J Clin Invest* 50:1961-76.
- Morton NE (1955) Sequential tests for the detection of linkage. *Am J Hum Genet* 7:277-318
- Mosckovitz R, Udenfriend S, Felix A, Heimer E, Tate SS (1994) Membrane topology of the rat kidney neutral and basic amino acid transporter. *Faseb J* 8:1069-74.
- Mothet JP, Parent AT, Wolosker H, Brady RO, Jr., Linden DJ, Ferris CD, Rogawski MA, Snyder SH (2000) D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4926-31
- Mural RJ, Adams MD, Myers EW, Smith HO, Miklos GL, Wides R, Halpern A, et al. (2002) A comparison of whole-genome shotgun-derived mouse chromosome 16 and the human genome. *Science* 296:1661-71
- Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, Walz T, Agre P, Heymann JB, Engel A, Fujiyoshi Y (2000) Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* 407:599-605.
- Mykkanen J, Toivonen M, Kleemola M, Savontaus ML, Simell O, Aula P, Huoponen K (2003) Promoter analysis of the human SLC7A7 gene encoding y⁺L amino acid transporter-1 (y⁺LAT-1). *Biochem Biophys Res Commun* 301:855-61
- Mykkanen J, Torrents D, Pineda M, Camps M, Yoldi ME, Horelli-Kuitunen N, Huoponen K, Heinonen M, Oksanen J, Simell O, Savontaus ML, Zorzano A, Palacín M, Aula P (2000) Functional analysis of novel mutations in y⁽⁺⁾LAT-1 amino acid transporter gene causing lysinuric protein intolerance (LPI). *Hum Mol Genet* 9:431-8.
- Nagase T, Seki N, Ishikawa K, Ohira M, Kawarabayasi Y, Ohara O, Tanaka A, Kotani H, Miyajima N, Nomura N (1996) Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. VI. The coding sequences of 80 new genes (K1AA0201-K1AA0280) deduced by analysis of cDNA clones from cell line KG-1 and brain. *DNA Res* 3:321-9, 341-54
- Nagy A, Gertsentein M, Vintersten K, Behringer R (2003) *Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Nakamura E, Sato M, Yang H, Miyagawa F, Harasaki M, Tomita K, Matsuoka S, Noma A, Iwai K, Minato N (1999) 4F2 (CD98) heavy chain is associated covalently with an amino acid transporter and controls intracellular trafficking and membrane topology of 4F2 heterodimer. *J Biol Chem* 274:3009-16.
- Nakauchi J, Matsuo H, Kim DK, Goto A, Chairoungdua A, Cha SH, Inatomi J, Shiokawa Y, Yamaguchi K, Saito I, Endou H, Kanai Y (2000) Cloning and characterization of a human brain Na⁽⁺⁾-independent transporter for small neutral amino acids that transports D-serine with high affinity. *Neurosci Lett* 287:231-5.
- Neitzel H (1986) A routine method for the establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines. *Hum Genet* 73:320-6
- Nicholson B, Sawamura T, Masaki T, MacLeod CL (1998) Increased Cat3-mediated cationic amino acid transport functionally compensates in Cat1 knockout cell lines. *J Biol Chem* 273:14663-6.
- Nissim-Rafinia M, Kerem B (2002) Splicing regulation as a potential genetic modifier. *Trends Genet* 18:123-7

BIBLIOGRAFIA

- Noguchi A, Shoji Y, Koizumi A, Takahashi T, Matsumori M, Kayo T, Ohata T, Wada Y, Yoshimura I, Maisawa S, Konishi M, Takasago Y, Takada G (2000) SLC7A7 genomic structure and novel variants in three Japanese lysinuric protein intolerance families. *Hum Mutat* 15:367-72
- Norio R, Perheentupa J, Kekomaki M, Visakorpi JK (1971) Lysinuric protein intolerance, an autosomal recessive disease. A genetic study of 10 Finnish families. *Clin Genet* 2:214-22.
- Norman RW, Manette WA (1990) Dietary restriction of sodium as a means of reducing urinary cystine. *J Urol* 143:1193-5.
- Nozaki J, Dakeishi M, Ohura T, Inoue K, Manabe M, Wada Y, Koizumi A (2001) Homozygosity mapping to chromosome 5p15 of a gene responsible for Hartnup disorder. *Biochem Biophys Res Commun* 284:255-60
- Nyengaard JR, Bendtsen TF (1992) Glomerular number and size in relation to age, kidney weight, and body surface in normal man. *Anat Rec* 232:194-201.
- Osborne CA, Polzin DJ, Kruger JM, Lulich JP, Johnston GR, O'Brien TD (1989) Relationship of nutritional factors to the cause, dissolution, and prevention of feline uroliths and urethral plugs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 19:561-81.
- Osborne CA, Sanderson SL, Lulich JP, Bartges JW, Ulrich LK, Koehler LA, Bird KA, Swanson LL (1999) Canine cystine urolithiasis. Cause, detection, treatment, and prevention. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 29:193-211, xiii.
- Oxender DL, Christensen HN (1963) Evidence for two types of mediation of neutral and amino-acid transport in Ehrlich cells. *Nature* 197:765-7
- Pagani F, Buratti E, Stuani C, Romano M, Zuccato E, Niksic M, Giglio L, Faraguna D, Baralle FE (2000) Splicing factors induce cystic fibrosis transmembrane regulator exon 9 skipping through a nonevolutionary conserved intronic element. *J Biol Chem* 275:21041-7
- Pak CY (1999) Medical prevention of renal Stones disease. *Nephron* 81 Suppl 1:60-5
- Pak CY, Fuller C, Sakhaee K, Zerwekh JE, Adams BV (1986) Management of cystine nephrolithiasis with alpha- mercaptopropionylglycine. *J Urol* 136:1003-8.
- Pak CY, Fuller CJ (1983) Assessment of cystine solubility in urine and of heterogeneous nucleation. *J Urol* 129:1066-70.
- Palacín M (1994) A new family of proteins (rBAT and 4F2hc) involved in cationic and zwitterionic amino acid transport: a tale of two proteins in search of a transport function. *J Exp Biol* 196:123-37.
- Palacín M (2000) The family of heteromultimeric amino acid transporters reveals aminoaciduria genes. *Nephrol Dial Transplant* 15:5-8.
- Palacín M, Bertran J, Chillarón J, Estevez R, Zorzano A (2004) Lysinuric protein intolerance: mechanisms of pathophysiology. *Mol Genet Metab* 81 Suppl 1:S27-37
- Palacín M, Bertran J, Zorzano A (2000) Heteromeric amino acid transporters explain inherited aminoacidurias. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 9:547-53.
- Palacín M, Borsani G, Sebastio G (2001a) The molecular bases of cystinuria and lysinuric protein intolerance. *Curr Opin Genet Dev* 11:328-35.
- Palacín M, Chillarón J, Mora C (1996a) Role of the b(o,+)-like amino acid-transport system in the renal reabsorption of cystine and dibasic amino acids. *Biochem Soc Trans* 24:856-63.
- Palacín M, Estévez R, Bertran J, Zorzano A (1998a) Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol Rev* 78:969-1054.
- Palacín M, Estévez R, Zorzano A (1998b) Cystinuria calls for heteromultimeric amino acid transporters. *Curr Opin Cell Biol* 10:455-61.
- Palacín M, Fernández E, Chillarón J, Zorzano A (2001b) The amino acid transport system b(o,+) and cystinuria. *Mol Membr Biol* 18:21-6.
- Palacín M, Goodyer P, Nunes V, Gasparini P (2001c) Cystinuria. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. Vol III. McGraw-Hill, New York, pp 4909-4932

- Palacín M, Kanai Y (2004) The ancillary proteins of HATs: SLC3 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch* 447:490-4
- Palacín M, Mora C, Chillarón J, Calonge MJ, Estévez R, Torrents D, Testar X, Zorzano A, Nunes V, Purroy J, Estivill X, Gasparini P, Bisceglia L, Zelante L (1996b) The molecular basis of cystinuria: The role of rBAT gene. *Amino Acids* 11:225-247
- Parmacek MS, Karpinski BA, Gottesdiener KM, Thompson CB, Leiden JM (1989) Structure, expression and regulation of the murine 4F2 heavy chain. *Nucleic Acids Res* 17:1915-31.
- Pease S, Williams RL (1990) Formation of germ-line chimeras from embryonic stem cells maintained with recombinant leukemia inhibitory factor. *Exp Cell Res* 190:209-11.
- Peces R, Sanchez L, Gorostidi M, Alvarez J (1991) Effects of variation in sodium intake on cystinuria. *Nephron* 57:421-3
- Peghini P, Janzen J, Stoffel W (1997) Glutamate transporter EAAC-1-deficient mice develop dicarboxylic aminoaciduria and behavioral abnormalities but no neurodegeneration. *Embo J* 16:3822-32.
- Perheentupa J, Visakorpi JK (1965) Protein intolerance with deficient transport of basic aminoacids. Another inborn error of metabolism. *Lancet* 2:813-6.
- Perkins CP, Mar V, Shutter JR, del Castillo J, Danilenko DM, Medlock ES, Ponting IL, Graham M, Stark KL, Zuo Y, Cunningham JM, Bosselman RA (1997) Anemia and perinatal death result from loss of the murine ecotropic retrovirus receptor mCAT-1. *Genes Dev* 11:914-25.
- Peter GJ, Davidson IG, Ahmed A, McIlroy L, Forrester AR, Taylor PM (1996) Multiple components of arginine and phenylalanine transport induced in neutral and basic amino acid transporter-cRNA-injected *Xenopus* oocytes. *Biochem J* 318:915-22.
- Peter GJ, Panova TB, Christie GR, Taylor PM (2000) Cysteine residues in the C-terminus of the neutral- and basic-amino- acid transporter heavy-chain subunit contribute to functional properties of the system b₀, + -type amino acid transporter. *Biochem J* 351 Pt 3:677-82.
- Peters T, Thaete C, Wolf S, Popp A, Sedlmeier R, Grosse J, Nehls MC, Russ A, Schlueter V (2003) A mouse model for cystinuria type I. *Hum Mol Genet* 12:2109-20
- Pfeiffer R, Loffing J, Rossier G, Bauch C, Meier C, Eggermann T, Loffing-Cueni D, Kuhn LC, Verrey F (1999a) Luminal heterodimeric amino acid transporter defective in cystinuria. *Mol Biol Cell* 10:4135-47.
- Pfeiffer R, Rossier G, Spindler B, Meier C, Kuhn L, Verrey F (1999b) Amino acid transport of γ +L-type by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of the glycoprotein-associated amino acid transporter family. *Embo J* 18:49-57.
- Pfeiffer R, Spindler B, Loffing J, Skelly PJ, Shoemaker CB, Verrey F (1998) Functional heterodimeric amino acid transporters lacking cysteine residues involved in disulfide bond. *FEBS Lett* 439:157-62.
- Pham CT, MacIvor DM, Hug BA, Heusel JW, Ley TJ (1996) Long-range disruption of gene expression by a selectable marker cassette. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13090-5.
- Pickel VM, Nirenberg MJ, Chan J, Mosckovitz R, Udenfriend S, Tate SS (1993) Ultrastructural localization of a neutral and basic amino acid transporter in rat kidney and intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:7779-83.
- Pineda M, Fernández E, Torrents D, Estévez R, López C, Camps M, Lloberas J, Zorzano A, Palacín M (1999) Identification of a membrane protein, LAT-2, that Co-expresses with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transport activity with broad specificity for small and large zwitterionic amino acids. *J Biol Chem* 274:19738-44.
- Pineda M, Font M, Bassi MT, Manzoni M, Borsani G, Marigo V, Fernández E, Rio RM, Purroy J, Zorzano A, Nunes V, Palacín M (2004a) The amino acid transporter asc-1 is not involved in cystinuria. *Kidney Int* 66:1453-64
- Pineda M, Wagner CA, Broer A, Stehberger PA, Kaltenbach S, Gelpi JL, Martin Del Rio R, Zorzano A, Palacín M, Lang F, Broer S (2004b) Cystinuria-specific rBAT(R365W) mutation reveals two translocation pathways in the amino acid transporter rBAT-b₀, +AT. *Biochem J* 377:665-74
- Pines G, Danbolt NC, Bjoras M, Zhang Y, Bendahan A, Eide L, Koepsell H, Storm-Mathisen J, Seeberg E, Kanner BI (1992) Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature* 360:464-7

BIBLIOGRAFIA

- Polinsky MS, Kaiser BA, Baluarte HJ (1987) Urolithiasis in childhood. *Pediatr Clin North Am* 34:683-710.
- Potter SJ, Lu A, Wilcken B, Green K, Rasko JE (2002) Hartnup disorder: polymorphisms identified in the neutral amino acid transporter SLC1A5. *J Inher Metab Dis* 25:437-48
- Pras E, Arber N, Aksentijevich I, Katz G, Schapiro JM, Prosen L, Gruberg L, Harel D, Liberman U, Weissenbach J, et al. (1994) Localization of a gene causing cystinuria to chromosome 2p. *Nat Genet* 6:415-9.
- Pras E, Golomb E, Drake C, Aksentijevich I, Katz G, Kastner DL (1998a) A splicing mutation (891+4A->G) in SLC3A1 leads to exon 4 skipping and causes cystinuria in a Moslem Arab family. *Hum Mutat Suppl*:S28-30.
- Pras E, Kochba I, Lubetzky A, Pras M, Sidi Y, Kastner DL (1998b) Biochemical and clinical studies in Libyan Jewish cystinuria patients and their relatives. *Am J Med Genet* 80:173-6.
- Pras E, Kreiss Y, Frishberg Y, Prosen L, Aksentijevich I, Kastner DL (1999) Refined mapping of the CSNU3 gene to a 1.8-Mb region on chromosome 19q13.1 using historical recombinants in Libyan Jewish cystinuria patients. *Genomics* 60:248-50.
- Pras E, Raben N, Golomb E, Arber N, Aksentijevich I, Schapiro JM, Harel D, Katz G, Liberman U, Pras M, et al. (1995) Mutations in the SLC3A1 transporter gene in cystinuria. *Am J Hum Genet* 56:1297-303.
- Prasad PD, Wang H, Huang W, Kekuda R, Rajan DP, Leibach FH, Ganapathy V (1999) Human LAT1, a subunit of system L amino acid transporter: molecular cloning and transport function. *Biochem Biophys Res Commun* 255:283-8.
- Prout W (1823) *Traité de la gravelle*.278
- Purroy J, Bisceglia L, Calonge MJ, Zelante L, Testar X, Zorzano A, Estivill X, Palacín M, Nunes V, Gasparini P (1996) Genomic structure and organization of the human rBAT gene (SLC3A1). *Genomics* 37:249-52.
- Purroy J, Bisceglia L, Jaeken J, Gasparini P, Palacín M, Nunes V (2000) Detection of two novel large deletions in SLC3A1 by semi-quantitative fluorescent multiplex PCR. *Hum Mutat* 15:373-9
- Quackenbush E, Clabby M, Gottesdiener KM, Barbosa J, Jones NH, Strominger JL, Speck S, Leiden JM (1987) Molecular cloning of complementary DNAs encoding the heavy chain of the human 4F2 cell-surface antigen: a type II membrane glycoprotein involved in normal and neoplastic cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:6526-30.
- Quackenbush EJ, Gougos A, Baumal R, Letarte M (1986) Differential localization within human kidney of five membrane proteins expressed on acute lymphoblastic leukemia cells. *J Immunol* 136:118-24.
- Rajan DP, Huang W, Kekuda R, George RL, Wang J, Conway SJ, Devoe LD, Leibach FH, Prasad PD, Ganapathy V (2000a) Differential influence of the 4F2 heavy chain and the protein related to b(0,+)-amino acid transport on substrate affinity of the heteromeric b(0,+)-amino acid transporter. *J Biol Chem* 275:14331-5.
- Rajan DP, Kekuda R, Huang W, Devoe LD, Leibach FH, Prasad PD, Ganapathy V (2000b) Cloning and functional characterization of a Na(+)-independent, broad-specific neutral amino acid transporter from mammalian intestine. *Biochim Biophys Acta* 1463:6-14.
- Rajan DP, Kekuda R, Huang W, Wang H, Devoe LD, Leibach FH, Prasad PD, Ganapathy V (1999) Cloning and expression of a b(0,+)-like amino acid transporter functioning as a heterodimer with 4F2hc instead of rBAT. A new candidate gene for cystinuria. *J Biol Chem* 274:29005-10.
- Rajantie J, Simell O, Perheentupa J (1980a) Intestinal absorption in lysinuric protein intolerance: impaired for diamino acids, normal for citrulline. *Gut* 21:519-24.
- Rajantie J, Simell O, Perheentupa J (1981) Lysinuric protein intolerance. Basolateral transport defect in renal tubuli. *J Clin Invest* 67:1078-82.
- Rajantie J, Simell O, Perheentupa J (1983) Oral administration of epsilon N-acetyllysine and homocitrulline in lysinuric protein intolerance. *J Pediatr* 102:388-90.
- Rajantie J, Simell O, Rapola J, Perheentupa J (1980b) Lysinuric protein intolerance: a two-year trial of dietary supplementation therapy with citrulline and lysine. *J Pediatr* 97:927-32.
- Rasmuson RL, Davis DG, Lieberman M (1993) Amino acid loss during volume regulatory decrease in

- cultured chick heart cells. *Am J Physiol* 264:C136-45
- Reed PW, Davies JL, Copeman JB, Bennett ST, Palmer SM, Pritchard LE, Gough SC, Kawaguchi Y, Cordell HJ, Balfour KM (1994) Chromosome-specific microsatellite sets for fluorescence-based, semi-automated genome mapping. *Nat Genet* 7:390-5
- Reig N, Chillarón J, Bartoccioni P, Fernández E, Bendahan A, Zorzano A, Kanner B, Palacín M, Bertran J (2002) The light subunit of system b(o,+) is fully functional in the absence of the heavy subunit. *Embo J* 21:4906-4914.
- Reizer J, Finley K, Kakuda D, MacLeod CL, Reizer A, Saier MH, Jr. (1993) Mammalian integral membrane receptors are homologous to facilitators and antiporters of yeast, fungi, and eubacteria. *Protein Sci* 2:20-30.
- Riahi-Esfahani S, Jessen H, Roigaard H (1995) Comparative study of the uptake of L-cysteine and L-cystine in the renal proximal tubule. *Amino Acids* 8:247-264
- Robson EB, Rose GA (1957) Effect of intravenous lysine on renal clearances of cystine, arginine and ornithine in normal subjects, in patients with cystinuria and Fanconi syndrome and their relatives. *Clin Sci* 16:75-93
- Rodman JS, Blackburn P, Williams JJ, Brown A, Pospischil MA, Peterson CM (1984) The effect of dietary protein on cystine excretion in patients with cystinuria. *Clin Nephrol* 22:273-8.
- Rodriguez LM, Santos F, Malaga S, Martinez V (1995) Effect of a low sodium diet on urinary elimination of cystine in cystinuric children. *Nephron* 71:416-8
- Rosa TG, de Souza Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM (2004) Cysteamine prevents and reverses the inhibition of pyruvate kinase activity caused by cystine in rat heart. *Biochim Biophys Acta* 1689:114-9
- Rosenberg LE (1966) Cystinuria: genetic heterogeneity and allelism. *Science* 154:1341-3.
- Rosenberg LE, Downing S, Durant JL, Segal S (1966a) Cystinuria: biochemical evidence for three genetically distinct diseases. *J Clin Invest* 45:365-71
- Rosenberg LE, Durant JL, Albrecht I (1966b) Genetic heterogeneity in cystinuria: evidence for allelism. *Trans Assoc Am Physicians* 79:284-96
- Rossier G, Meier C, Bauch C, Summa V, Sordat B, Verrey F, Kuhn LC (1999) LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine. *J Biol Chem* 274:34948-54.
- Rousaud F, Barceló P (1996) Litiasis renal. Estudio metabólico. *Act Fund Puigvert* 15:17-22
- Rubio-Aliaga I, Frey I, Boll M, Groneberg DA, Eichinger HM, Balling R, Daniel H (2003) Targeted disruption of the peptide transporter Pept2 gene in mice defines its physiological role in the kidney. *Mol Cell Biol* 23:3247-52
- Russ WP, Engelman DM (2000) The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association. *J Mol Biol* 296:911-9
- Saadi I, Chen XZ, Hediger M, Ong P, Pereira P, Goodyer P, Rozen R (1998) Molecular genetics of cystinuria: mutation analysis of SLC3A1 and evidence for another gene in type I (silent) phenotype. *Kidney Int* 54:48-55.
- Sacktor B, Lepor N, Schneider EG (1981) Stimulation of the efflux of L-glutamate from renal brush-border membrane vesicles by extravascular potassium. *Biosci Rep* 1:709-13
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-4
- Samarzija I, Fromter E (1982) Electrophysiological analysis of rat renal sugar and amino acid transport. IV. Basic amino acids. *Pflugers Arch* 393:210-4.
- Sanchez Olea R, Pasantes-Morales H, Lazaro A, Cereijido M (1991) Osmolarity-sensitive release of free amino acids from cultured kidney cells (MDCK). *J Membr Biol* 121:1-9
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-7

BIBLIOGRAFIA

- Sato H, Kuriyama-Matsumura K, Hashimoto T, Sasaki H, Wang H, Ishii T, Mann GE, Bannai S (2001) Effect of oxygen on induction of the cystine transporter by bacterial lipopolysaccharide in mouse peritoneal macrophages. *J Biol Chem* 276:10407-12
- Sato H, Kuriyama-Matsumura K, Siow RC, Ishii T, Bannai S, Mann GE (1998) Induction of cystine transport via system x^c and maintenance of intracellular glutathione levels in pancreatic acinar and islet cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1414:85-94.
- Sato H, Tamba M, Ishii T, Bannai S (1999) Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. *J Biol Chem* 274:11455-8.
- Sato H, Tamba M, Kuriyama-Matsumura K, Okuno S, Bannai S (2000) Molecular cloning and expression of human xCT, the light chain of amino acid transport system xc. *Antioxid Redox Signal* 2:665-71.
- Sato H, Tamba M, Okuno S, Sato K, Keino-Masu K, Masu M, Bannai S (2002) Distribution of cystine/glutamate exchange transporter, system x^c-, in the mouse brain. *J Neurosci* 22:8028-33
- Schafer JA, Watkins ML (1984) Transport of L-cystine in isolated perfused proximal straight tubules. *Pflugers Arch* 401:143-51.
- Schmidt C, Tomiuk J, Botzenhart E, Vester U, Halber M, Hesse A, Wagner C, Lahme S, Lang F, Zerres K, Eggermann T, Bachmann H, Bokenkamp A, Fischbach M, Frund S, Pistor KG, Zappel HF (2003a) Genetic variations of the SLC7A9 gene: allele distribution of 13 polymorphic sites in German cystinuria patients and controls. *Clin Nephrol* 59:353-9
- Schmidt C, Vester U, Wagner CA, Lahme S, Hesse A, Hoyer P, Lang F, Zerres K, Eggermann T (2003b) Significant contribution of genomic rearrangements in SLC3A1 and SLC7A9 to the etiology of cystinuria. *Kidney Int* 64:1564-72
- Schmidt C, Vester U, Zerres K, Eggermann T (2004) No evidence for a role of SLC7A10 in 19q13 in the etiology of cystinuria. *Clin Nephrol* 62:71-3
- Scriver CR, Clow CL, Reade TM, Goodyer P, Auray-Blais C, Giguere R, Lemieux B (1985) Ontogeny modifies manifestations of cystinuria genes: implications for counseling. *J Pediatr* 106:411-6.
- Scriver CR, Hechtman P (1970) Human genetics of membrane transport with emphasis on amino acids. *Adv Hum Genet* 1:211-74.
- Scriver CR, Mahon B, Levy HL, Clow CL, Reade TM, Kronick J, Lemieux B, Laberge C (1987) The Hartnup phenotype: Mendelian transport disorder, multifactorial disease. *Am J Hum Genet* 40:401-12.
- Scriver CR, Tenenhouse HS (1985) Genetics and mammalian transport systems. *Ann N Y Acad Sci* 456:384-97
- Scriver CR, Tenenhouse HS (1992) Mendelian phenotypes as "probes" of renal transport systems for amino acids and phosphate. In: Windhager EE (ed) *Handbook of Physiology*. Vol II. Section 8: Renal Physiology. Oxford University Press, New York, pp 1977-2016
- Seal RP, Amara SG (1998) A reentrant loop domain in the glutamate carrier EAAT1 participates in substrate binding and translocation. *Neuron* 21:1487-98
- Segal S, McNamara PD, Pepe LM (1977) Transport interaction of cystine and dibasic amino acids in renal brush border vesicles. *Science* 197:169-71.
- Segal S, Smith I (1969) Delineation of cystine and cysteine transport systems in rat kidney cortex by developmental patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 63:926-33.
- Segawa H, Fukasawa Y, Miyamoto K, Takeda E, Endou H, Kanai Y (1999) Identification and functional characterization of a Na⁺-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J Biol Chem* 274:19745-51.
- Sekine T, Watanabe N, Hosoyamada M, Kanai Y, Endou H (1997) Expression cloning and characterization of a novel multispecific organic anion transporter. *J Biol Chem* 272:18526-9
- Senapathy P, Shapiro MB, Harris NL (1990) Splice junctions, branch point sites, and exons: sequence statistics, identification, and applications to genome project. *Methods Enzymol* 183:252-78
- Senes A, Gerstein M, Engelman DM (2000) Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with beta-branched residues at neighboring positions. *J Mol Biol* 296:921-36

- Seow HF, Broer S, Broer A, Bailey CG, Potter SJ, Cavanaugh JA, Rasko JE (2004) Hartnup disorder is caused by mutations in the gene encoding the neutral amino acid transporter SLC6A19. *Nat Genet* 36:1003-7
- Shayakul C, Kanai Y, Lee WS, Brown D, Rothstein JD, Hediger MA (1997) Localization of the high-affinity glutamate transporter EAAC1 in rat kidney. *Am J Physiol* 273:F1023-9.
- Shih VE, Bixby EM, Alpers DH, Bartoscas CS, Thier SO (1971) Studies of intestinal transport defect in Hartnup disease. *Gastroenterology* 61:445-53
- Shockett PE, Schatz DG (1996) Diverse strategies for tetracycline-regulated inducible gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5173-6.
- Shultz VD, Campbell W, Karr S, Hixson DC, Thompson NL (1999) TA1 oncofetal rat liver cDNA and putative amino acid permease: temporal correlation with c-myc during acute CCl₄ liver injury and variation of RNA levels in response to amino acids in hepatocyte cultures. *Toxicol Appl Pharmacol* 154:84-96.
- Silbernagl S (1979) Renal transport of amino acids. *Klin Wochenschr* 57:1009-19.
- Silbernagl S (1983) Kinetics and localization of tubular resorption of "acidic" amino acids. A microperfusion and free flow micropuncture study in rat kidney. *Pflugers Arch* 396:218-24.
- Silbernagl S (1988) The renal handling of amino acids and oligopeptides. *Physiol Rev* 68:911-1007.
- Silver LM (1995) *Mouse Genetics: Concepts and applications*. Oxford University Press, Oxford
- Simell O (1975) Diamino acid transport into granulocytes and liver slices of patients with lysinuric protein intolerance. *Pediatr Res* 9:504-8.
- Simell O (2001) Lysinuric protein intolerance and other cationic aminoacidurias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. Vol III. McGraw-Hill, New York, pp 4933-56
- Simell O, Perheentupa J (1974) Defective metabolic clearance of plasma arginine and ornithine in lysinuric protein intolerance. *Metabolism* 23:691-701.
- Singer A, Das S (1989) Cystinuria: a review of the pathophysiology and management. *J Urol* 142:669-73.
- Slaugenhaupt SA, Blumenfeld A, Gill SP, Leyne M, Mull J, Cuajungco MP, Liebert CB, Chadwick B, Idelson M, Reznik L, Robbins C, Makalowska I, Brownstein M, Krappmann D, Scheidereit C, Maayan C, Axelrod FB, Gusella JF (2001) Tissue-specific expression of a splicing mutation in the IKBKAP gene causes familial dysautonomia. *Am J Hum Genet* 68:598-605
- Sloand JA, Izzo JL (1987) Captopril reduces urinary cystine excretion in cystinuria. *Arch Intern Med* 147:1409-12.
- Smith CP, Weremowicz S, Kanai Y, Stelzner M, Morton CC, Hediger MA (1994a) Assignment of the gene coding for the human high-affinity glutamate transporter EAAC1 to 9p24: potential role in dicarboxylic aminoaciduria and neurodegenerative disorders. *Genomics* 20:335-6.
- Smith CP, Weremowicz S, Kanai Y, Stelzner M, Morton CC, Hediger MA (1994b) Assignment of the gene coding for the human high-affinity glutamate transporter EAAC1 to 9p24: potential role in dicarboxylic aminoaciduria and neurodegenerative disorders. *Genomics* 20:335-6
- Smith CW, Valcarcel J (2000) Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem Sci* 25:381-8
- Smith DW, Scriver CR, Simell O (1988) Lysinuric protein intolerance mutation is not expressed in the plasma membrane of erythrocytes. *Hum Genet* 80:395-6.
- Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, Koralewski MA, Kucherlapati RS (1985) Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature* 317:230-4.
- Sorgen PL, Hu Y, Guan L, Kaback HR, Girvin ME (2002) An approach to membrane protein structure without crystals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:14037-40
- Sperandeo MP, Bassi MT, Riboni M, Parenti G, Buoninconti A, Manzoni M, Incerti B, Larocca MR, Di Rocco M, Strisciuglio P, Dianzani I, Parini R, Candito M, Endo F, Ballabio A, Andria G, Sebastio G, Borsani G (2000) Structure of the SLC7A7 gene and mutational analysis of patients affected by lysinuric protein intolerance. *Am J Hum Genet* 66:92-9.

BIBLIOGRAFIA

- Spindler B, Mastroberardino L, Custer M, Verrey F (1997) Characterization of early aldosterone-induced RNAs identified in A6 kidney epithelia. *Pflugers Arch* 434:323-31.
- States B, Segal S (1969) Distribution of glutathione-cystine transhydrogenase activity in subcellular fractions of rat intestinal mucosa. *Biochem J* 113:443-4.
- Stein WH (1951) Excretion of amino acids in cystinuria. *Proc Soc Exper Biol and Med* 78:705-8
- Stephens AD (1989) Cystinuria and its treatment: 25 years experience at St. Bartholomew's Hospital. *J Inher Metab Dis* 12:197-209
- Strem SB, Hall P (1989) Effect of captopril on urinary cystine excretion in homozygous cystinuria. *J Urol* 142:1522-4.
- Sun H, Chasin LA (2000) Multiple splicing defects in an intronic false exon. *Mol Cell Biol* 20:6414-25
- Symula DJ, Shedlovsky A, Dove WF (1997a) Genetic mapping of hph2, a mutation affecting amino acid transport in the mouse. *Mamm Genome* 8:98-101.
- Symula DJ, Shedlovsky A, Guillery EN, Dove WF (1997b) A candidate mouse model for Hartnup disorder deficient in neutral amino acid transport. *Mamm Genome* 8:102-7.
- Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kikuchi T, Okuyama S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K (1997) Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276:1699-702
- Tarlow MJ, Seakins JW, Lloyd JK, Matthews DM, Cheng B, Thomas AJ (1970) Intestinal absorption and biopsy transport of peptides and amino acids in Hartnup disease. *Clin Sci* 39:18P-19P
- Tarlow MJ, Seakins JW, Lloyd JK, Matthews DM, Cheng B, Thomas AJ (1972) Absorption of amino acids and peptides in a child with a variant of Hartnup disease and coexistent coeliac disease. *Arch Dis Child* 47:798-803
- Tate SS, Yan N, Udenfriend S (1992) Expression cloning of a Na(+)-independent neutral amino acid transporter from rat kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:1-5.
- Taylor RG, Walker DC, McInnes RR (1993) E. coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Res* 21:1677-8
- te Riele H, Maandag ER, Berns A (1992) Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5128-32.
- Teijema HL, van Gelderen HH, Giesberts MA, Laurent de Angulo MS (1974) Dicarboxylic aminoaciduria: an inborn error of glutamate and aspartate transport with metabolic implications, in combination with a hyperprolinemia. *Metabolism* 23:115-23.
- Teixeira S, Di Grandi S, Kuhn LC (1987) Primary structure of the human 4F2 antigen heavy chain predicts a transmembrane protein with a cytoplasmic NH2 terminus. *J Biol Chem* 262:9574-80.
- Teraoka SN, Telatar M, Becker-Catania S, Liang T, Onengut S, Tolun A, Chessa L, Sanal O, Bernatowska E, Gatti RA, Concannon P (1999) Splicing defects in the ataxia-telangiectasia gene, ATM: underlying mutations and consequences. *Am J Hum Genet* 64:1617-31
- Thalhammer O (1975) Frequency of inborn errors of metabolism, specially PKU, in some representative newborn screening centres around the world. A collaborative study. *Humangenetik* 30:273-86
- Thier S, Fox M, Segal S, Rosenberg LE (1964) Cystinuria: In vitro demonstration of an intestinal transport defect. *Science* 143:482-4
- Thomas KR, Capecchi MR (1987) Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51:503-12.
- Thomas KR, Deng C, Capecchi MR (1992) High-fidelity gene targeting in embryonic stem cells by using sequence replacement vectors. *Mol Cell Biol* 12:2919-23
- Thomson JA, Marshall VS (1998) Primate embryonic stem cells. *Curr Top Dev Biol* 38:133-65
- Toivonen M, Mykkanen J, Aula P, Simell O, Savontaus ML, Huoponen K (2002) Expression of normal and mutant GFP-tagged y(+)-L amino acid transporter-1 in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 291:1173-9
- Torras-Llort M, Torrents D, Soriano-García JF, Gelpí JL, Estévez R, Ferrer R, Palacín M, Moretó M (2001)

- Sequential amino acid exchange across b(0,+)-like system in chicken brush border jejunum. *J Membr Biol* 180:213-20.
- Torrents D, Estévez R, Pineda M, Fernández E, Lloberas J, Shi YB, Zorzano A, Palacín M (1998) Identification and characterization of a membrane protein (γ +L amino acid transporter-1) that associates with 4F2hc to encode the amino acid transport activity γ +L. A candidate gene for lysinuric protein intolerance. *J Biol Chem* 273:32437-45.
- Torrents D, Mykkanen J, Pineda M, Feliubadaló L, Estévez R, de Cid R, Sanjurjo P, Zorzano A, Nunes V, Huoponen K, Reinikainen A, Simell O, Savontaus ML, Aula P, Palacín M (1999) Identification of SLC7A7, encoding γ +LAT-1, as the lysinuric protein intolerance gene. *Nat Genet* 21:293-6.
- Torres RM, Kühn R (1997) Laboratory protocols for conditional gene targeting. Oxford University Press, Oxford
- Town M, Jean G, Cherqui S, Attard M, Forestier L, Whitmore SA, Callen DF, Gribouval O, Broyer M, Bates GP, van't Hoff W, Antignac C (1998) A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. *Nat Genet* 18:319-24.
- Tsan MF, Jones TC, Thornton GW, Levy HL, Gilmore C, Wilson TH (1972a) Canine cystinuria: its urinary amino acid pattern and genetic analysis. *Am J Vet Res* 33:2455-61.
- Tsan MF, Jones TC, Wilson TH (1972b) Canine cystinuria: intestinal and renal amino acid transport. *Am J Vet Res* 33:2463-8.
- Tsurudome M, Ito Y (2000) Function of fusion regulatory proteins (FRPs) in immune cells and virus-infected cells. *Crit Rev Immunol* 20:167-96
- Turnell DC, Cooper JD (1982) Rapid assay for amino acids in serum or urine by pre-column derivatization and reversed-phase liquid chromatography. *Clin Chem* 28:527-31
- Tzortzaki EG, Yang M, Glass D, Deng L, Evan AP, Bledsoe SB, Stambrook PJ, Sahota A, Tischfield JA (2003) Impaired expression of an organic cation transporter, IMPT1, in a knockout mouse model for kidney Stones disease. *Urol Res* 31:257-61
- Ullrich KJ (1979) Sugar, amino acid, and Na⁺ cotransport in the proximal tubule. *Annu Rev Physiol* 41:181-95.
- Utsunomiya-Tate N, Endou H, Kanai Y (1996) Cloning and functional characterization of a system ASC-like Na⁺-dependent neutral amino acid transporter. *J Biol Chem* 271:14883-90.
- Valancius V, Smithies O (1991) Testing an "in-out" targeting procedure for making subtle genomic modifications in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 11:1402-8.
- van Deursen J, Wieringa B (1992) Targeting of the creatine kinase M gene in embryonic stem cells using isogenic and nonisogenic vectors. *Nucleic Acids Res* 20:3815-20.
- Van Winkle LJ (1988) Amino acid transport in developing animal oocytes and early conceptuses. *Biochim Biophys Acta* 947:173-208.
- Van Winkle LJ, Campione AL, Gorman JM (1988) Na⁺-independent transport of basic and zwitterionic amino acids in mouse blastocysts by a shared system and by processes which distinguish between these substrates. *J Biol Chem* 263:3150-63.
- Veljkovic E, Stasiuk S, Skelly PJ, Shoemaker CB, Verrey F (2004) Functional characterization of *Caenorhabditis elegans* heteromeric amino acid transporters. *J Biol Chem* 279:7655-62
- Verrey F, Jack DL, Paulsen IT, Saier MH, Pfeiffer R (1999) New glycoprotein-associated amino acid transporters. *J Membr Biol* 172:181-92.
- Verrey F, Meier C, Rossier G, Kuhn LC (2000) Glycoprotein-associated amino acid exchangers: broadening the range of transport specificity. *Pflügers Arch* 440:503-12.
- Völkl H, Silbernagl S (1982) Mutual inhibition of L-cystine/L-cysteine and other neutral amino acids during tubular reabsorption. A microperfusion study in rat kidney. *Pflügers Arch* 395:190-5.
- Wagner CA, Lang F, Bröer S (2001) Function and structure of heterodimeric amino acid transporters. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:C1077-93.
- Walsh PC, Retik AB, Staney TA, Vaughan ED (1992) *Campbell's Urology*. W. B. Saunders Company, Philadelphia

BIBLIOGRAFIA

- Wang Y, Tate SS (1995) Oligomeric structure of a renal cystine transporter: implications in cystinuria. *FEBS Lett* 368:389-92.
- Wartenfeld R, Golomb E, Katz G, Bale SJ, Goldman B, Pras M, Kastner DL, Pras E (1997) Molecular analysis of cystinuria in Libyan Jews: exclusion of the SLC3A1 gene and mapping of a new locus on 19q. *Am J Hum Genet* 60:617-24.
- Watanabe K, Hata Y, Kizaki H, Katsube Y, Suzuki Y (1997) The refined crystal structure of *Bacillus cereus* oligo-1,6-glucosidase at 2.0 Å resolution: structural characterization of proline-substitution sites for protein thermostabilization. *J Mol Biol* 269:142-53
- Watake K, Hashimoto K, Kano M, Yamada K, Watanabe M, Inoue Y, Okuyama S, Sakagawa T, Ogawa S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K, Tanaka K (1998) Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice. *Eur J Neurosci* 10:976-88
- Weinberger A, Sperling O, Rabinovitz M, Brosh S, Adam A, De Vries A (1974) High frequency of cystinuria among Jews of Libyan origin. *Hum Hered* 24:568-72
- Weiss SD, McNamara PD, Pepe LM, Segal S (1978) Glutamine and glutamic acid uptake by rat renal brushborder membrane vesicles. *J Membr Biol* 43:91-105
- Weissbach L, Handlogten ME, Christensen HN, Kilberg MS (1982) Evidence for two Na⁺-independent neutral amino acid transport systems in primary cultures of rat hepatocytes. Time-dependent changes in activity. *J Biol Chem* 257:12006-11.
- Welbourne TC, Matthews JC (1999) Glutamate transport and renal function. *Am J Physiol* 277:F501-5
- Wells RG, Hediger MA (1992) Cloning of a rat kidney cDNA that stimulates dibasic and neutral amino acid transport and has sequence similarity to glucosidases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5596-600.
- Wells RG, Lee WS, Kanai Y, Leiden JM, Hediger MA (1992) The 4F2 antigen heavy chain induces uptake of neutral and dibasic amino acids in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 267:15285-8.
- Wesson JA, Johnson RJ, Mazzali M, Beshensky AM, Stietz S, Giachelli C, Liaw L, Alpers CE, Couser WG, Kleinman JG, Hughes J (2003) Osteopontin is a critical inhibitor of calcium oxalate crystal formation and retention in renal tubules. *J Am Soc Nephrol* 14:139-47
- Wilcken B, Smith A, Brown DA (1980) Urine screening for aminoacidopathies: is it beneficial? Results of a long-term follow-up of cases detected by screening one million babies. *J Pediatr* 97:492-7.
- Wolf DA, Wang S, Panzica MA, Bassily NH, Thompson NL (1996) Expression of a highly conserved oncofetal gene, TA1/E16, in human colon carcinoma and other primary cancers: homology to *Schistosoma mansoni* amino acid permease and *Caenorhabditis elegans* gene products. *Cancer Res* 56:5012-22.
- Wollaston WH (1810) On cystic oxide, a new species of urinary calculus. *Phil Tr Roy Soc London* 100:223-30.
- Wolosker H, Panizzutti R, De Miranda J (2002) Neurobiology through the looking-glass: D-serine as a new glial-derived transmitter. *Neurochem Int* 41:327-32
- Wong EA, Capecchi MR (1987) Homologous recombination between coinjected DNA sequences peaks in early to mid-S phase. *Mol Cell Biol* 7:2294-5
- Woolf LI (1967) Large-scale screening for metabolic disease in newborn in Great Britain. In: Anderson JA, Swaiman KF (eds) *Phenylketonuria and allied metabolic disorders*. U. S. Department of Health, Education and Welfare (Children's Bureau), Washington, pp 50-59
- Worcester EM (1996) Inhibitors of Stones formation. *Semin Nephrol* 16:474-86
- Yan N, Mosckovitz R, Udenfriend S, Tate SS (1992) Distribution of mRNA of a Na⁽⁺⁾-independent neutral amino acid transporter cloned from rat kidney and its expression in mammalian tissues and *Xenopus laevis* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:9982-5.
- Yanagida O, Kanai Y, Chairoungdua A, Kim DK, Segawa H, Nii T, Cha SH, Matsuo H, Fukushima J, Fukasawa Y, Tani Y, Taketani Y, Uchino H, Kim JY, Inatomi J, Okayasu I, Miyamoto K, Takeda E, Goya T, Endou H (2001) Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1514:291-302
- Yeh HL, Frankl W, Dunn MS, Parker P, Hughes B, Gyorgy P (1947) Urinary excretion of amino acids by

cystinuric subject. *Am J Med Sci* 214:507-12

Zammarchi E, Bardini MR, Donati MA, Savelli A (1981) [Results of screening the urine of 26,014 newborn infants for amino acid disorders]. *Riv Neurobiol* 27:681-6.

Zerangue N, Kavanaugh MP (1996) Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature* 383:634-7

Zhang XX, Rozen R, Hediger MA, Goodyer P, Eydoux P (1994) Assignment of the gene for cystinuria (SLC3A1) to human chromosome 2p21 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 24:413-4.

Zhou L, Rowley DL, Mi QS, Sefcovic N, Matthes HW, Kieffer BL, Donovan DM (2001) Murine inter-strain polymorphisms alter gene targeting frequencies at the mu opioid receptor locus in embryonic stem cells. *Mamm Genome* 12:772-8.

Zhu J, Mayeda A, Krainer AR (2001) Exon identity established through differential antagonism between exonic splicing silencer-bound hnRNP A1 and enhancer-bound SR proteins. *Mol Cell* 8:1351-61

