

Γενετική ανάλυση της κυστινουρίας

Δ. Μπαλτογιάννης*, Κ. Χαραλαμπόπουλος**,
Α. Χατζηκυριακίδου*, Σ. Καρκαμπούνας**,
Β. Καλφακάκου**, Α. Ευαγγέλου**,
Ξ. Γιαννακόπουλος*, και Ν. Σοφικίτης*.

Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

* Ουρολογική Κλινική - Εργαστήριο
Παθοφυσιολογίας του Ουροποιογεννητικού
Συστήματος

** Εργαστήριο Φυσιολογίας
Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων

Περίληψη

Μία από τις γενετικά καθορισμένες μεταβολικές ασθένειες στον άνθρωπο είναι και αυτή της κυστινουρίας. Χαρακτηρίζεται από την ελλιπή νεφρική και εντερική μεταφορά της κυστίνης και των τριών διβασικών αμινοξέων ορνιθίνη, λυσίνη και αργινίνη. Τρεις τύποι κυστινουρίας έχουν αναγνωρισθεί μέχρι σήμερα ανάλογα με τον τρόπο κληρονομιάς τους ('τύπος I', 'τύπος II' και 'τύπος III'). Ένας αρκετά μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων στο γονίδιο SLC3A1, που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2, είναι υπεύθυνες για την κυστινουρία 'τύπου I'. Έχει βρεθεί ότι περίπου 35 μεταλλάξεις είναι υπεύθυνες για την 'τύπου I' κυστινουρία. Αντίθετα, οι κυστινουρίες 'τύπου II' και 'τύπου II-I', γνωστές και ως κυστινουρίες 'μη-τύπου I', προκαλούνται από διάφορες μεταλλάξεις ενός άλλου γονιδίου του SLC7A9, το οποίο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 19. Οι έρευνες, που έχουν γίνει μέχρι σήμερα, έχουν οδηγήσει στην ανακάλυψη 7 μεταλλάξεων υπεύθυνων για τη 'μη-τύπου I' κυστινουρία. Επιβάλλεται, για τους προαναφερθέντες λόγους, να γίνουν περαιτέρω έρευνες και μελέτες γύρω από τη γενετική βάση και τις φαινοτυπικές εκφράσεις των διαφόρων τύπων της ασθένειας αφού πρόκειται για μία νόσο, που μπορεί να προκληθεί από σημαντικά μεγάλο αριθμό μεταλλάξεων σε περισσότερα του ενός γονίδια.

Λέξεις κλειδί: Κυστινουρία τύπου I, Κυστινουρία τύπου II, Κυστινουρία τύπου III, Μεταλλάξεις στο γονίδιο SLC3A1, Μεταλλάξεις στο γονίδιο SLC7A9.

Summary

Cystinuria is one of the well-known metabolism disorders, which is characterized by a defect in the transport of cystine and the 3 dibasic amino acids ornithine, lysine and arginine. Three cystinuria types can be distinguished by the mode of inheritance (cystinuria 'type I', 'type II' and 'type III'). Cystinuria 'type I' is caused by mutations in the SLC3A1 gene located on chromosome 2. To date, 35 mutations in the SLC3A1 have been described. On the other hand, cystinuria 'type II' and cystinuria 'type III', which are known as 'non-type I' cystinuria, are caused by mutations in the SLC7A9 gene located on chromosome 19. To our knowledge, not more than 7 mutations in this gene have been reported in the worldwide literature. More researches studies which will focus on phenotype definitions and molecular analysis of the genetic basis are necessary to there be since cystinuria points out genetic heterogeneity and variability in phenotype expression.

Key words: Cystinuria Type I, Cystinuria Type II, Cystinuria Type III, SLC3A1 mutation analysis, SLC7A9 mutation analysis

Εισαγωγή

Η κυστινουρία είναι μια από τις γνωστές γενετικά καθορισμένες μεταβολικές ασθένειες του ανθρώπου. Συγκεκριμένα προκαλείται από την ελλιπή μετα-

Υπεύθυνος Αλληλογραφίας
Γιαννακόπουλος Ξενοφών
Επίκουρος Καθηγητής Ουρολογίας
Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
45100, ΙΩΑΝΝΙΝΑ
Τηλ: 06510 99111, 99263
Fax: 06510 77302
E-mail: xgiannak@cc.uoi.gr

φορά της κυστίνης και των 3 διβασικών αμινοξέων ορνιθίνη, λυσίνη και αργινίνη, διαμέσου των επιθηλιακών κυττάρων του εγγύς νεφρικού σωληναρίου και του εντερικού βλεννογόνου. Η κυστίνη η οποία παρουσιάζει μια πολύ μικρή διαλυτότητα στο νερό (0,011g/100ml) καθιζάνει και δημιουργεί λίθους στα νεφρά¹. Η προαναφερθείσα διαδικασία λιθογένεσης λίθων κυστίνης δημιουργεί απόφραξη της αποχευτικής μοίρας του ουροποιητικού, λοιμώξεις, νεφροπάθειες και σε πιο προχωρημένες καταστάσεις νεφρική ανεπάρκεια^{2,3}.

Η νόσος εμφανίζεται με συχνότητα 1/7.000, με διακυμάνσεις από 1/2.500 στους Ι Λίβυους Εβραϊκής καταγωγής ως 1/15.000 σε πληθυσμό των Η.Π.Α.⁴. Τρεις μορφές κυστινουρίας έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα, η 'τύπου I', 'τύπου II' και 'τύπου III' (οι μορφές: 'τύπος II' και 'τύπος III' είναι γνωστές και ως κυστινουρία 'μη-τύπου I')⁵. Οι ετεροζυγώτες 'τύπου I' εμφανίζουν κανονικά επίπεδα νεφρικής απέκκρισης της κυστίνης, ενώ οι ετεροζυγώτες 'τύπου II' και 'τύπου III' δείχνουν αντίστοιχα υψηλή ή ενδιάμεση υπερπέκκριση της κυστίνης και των άλλων διβασικών αμινοξέων. Τα ομόζυγα άτομα 'τύπου I' και 'τύπου II' στερούνται της ικανότητας εντερικής απορρόφησης της κυστίνης σε αντίθεση με τους ομοζυγώτες 'τύπου III', οι οποίοι εμφανίζουν σημαντική αύξηση των επιπέδων της κυστίνης στο πλάσμα τους, όπως διαπιστώθηκε μετά από την per-os χορήγησή της⁶. Σήμερα είναι γνωστό από την βασική έρευνα ότι σε μοριακό επίπεδο η κυστινουρία 'τύπου I' προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο SLC3A1, που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2. Αντίθετα, η 'μη-τύπου I' κυστινουρία οφείλεται σε μεταλλάξεις ενός άλλου γονιδίου, του SLC7A9, που τοποθετείται στο χρωμόσωμα 19⁷. Σ' αυτό το άρθρο γίνεται μία συνοπτική παρουσίαση των μέχρι σήμερα γνωστών στοιχείων γύρω από τη γενετική και μοριακή βάση της ασθένειας.

Οι Μεταλλάξεις στο γονίδιο SLC3A1

Έχει τεκμηριωθεί ότι το μη μεταλλαγμένο γονίδιο SLC3A1 είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση μίας πρωτεΐ-

Τύπος μετάλλαξης	Συνολικός αριθμός μεταλλάξεων
Αλλαγή νοκλαοτίου => Μετάλλαξη με λάθος νόημα (missense) ή μετάλλαξη χωρίς νόημα (nonsense)	22
Αλλαγή νοκλαοτίου => Μετάλλαξη που επηρεάζει τη θέση συναρμωγής (splicing)	1
Μικρά ελλείμματα (small deletions)	3
Μικρές προσθήκες (small insertions)	2
Μεγάλα ελλείμματα (gross deletions)	6
Πολύπλοκες αναδιοργανώσεις (συμπεριλαμβανομένων των αναπροσανατολισμών) (complex rearrangements)	1
ΣΥΝΟΛΟ	35

Πίνακας 1: Οι τύποι των μεταλλάξεων που έχουν προσδιοριστεί στο γονίδιο SLC3A1 και ο συνολικός αριθμός των.

νης, που εντοπίζεται στη ψυκτροειδή παρυφή της πλασματικής μεμβράνης του εγγύς νεφρικού σωληναρίου και των επιθηλιακών κυττάρων του εντερικού βλεννογόνου^{7,8}. Η πρωτεΐνη αυτή θεωρείται υπεύθυνη για την επαναρρόφηση της κυστίνης και των διβασικών αμινοξέων, πολύ πιθανά διαμέσου ενός μηχανισμού ο οποίος βρίσκεται ακόμη υπό συνεχή διερεύνηση και που χαρακτηρίζεται από την ταυτόχρονη μεταφορά ουδέτερων αμινοξέων προς την αντίθετη

κατεύθυνση⁹. Το γονίδιο αυτό έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 2 (2p16.3) και μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί περί τις 35 μεταλλάξεις οι οποίες θεωρούνται υπεύθυνες μόνο για την 'τύπου I' κυστινουρία. Στον πίνακα 1 αναφέρονται οι διάφοροι τύποι των μεταλλάξεων που έχουν περιγραφεί, ενώ στον πίνακα 2 παρατίθενται πιο αναλυτικά οι μεταλλάξεις της κάθε επί μέρους κατηγορίας⁸⁻¹⁶.

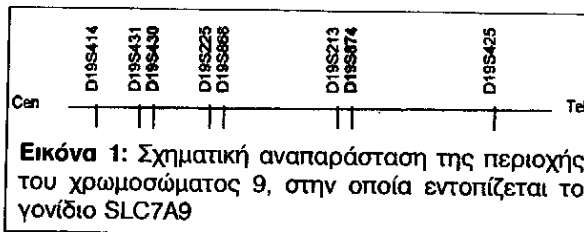
Μετάλλαξη με λάθος νόημα/Μετάλλαξη χωρίς νόημα	Κωδικόνιο	Νουκλεοτίδιο	Αμινοξύ
128	CCA->CAA		Pro->Gln
151	GTAC->AAC		Tyr->Asn
181	CGG->CAG		Arg->Gln
216	ACG->ATG		Thr->Met
268	cGAA->AAA		Glu->Lys
270	μC3A->TGA		Arg->Terp
341	GACA->GCA		Thr->Ala
362	cCGC->TTC		Asp->Cys
365	CEGG->CTG		Arg->Leu
365	cCGG->TTC		Arg->Lys
420	TCT->TGT		Ser->Cys
458	GGG->GAG		Cys->Glu
467	ATG->AAG		Met->Arg
467	ATG->ACC		Met->Thr
483	cGAA->TAA		Glu->Terp
536	CTTG->CTG		Val->Gly
582	GTAC->CAC		Tyr->His
615	TCCC->ACC		Pro->Thr
645	GGA->GCA		Gly->Ala
648	TTT->TCT		Phe->Ser
657	ACAG->AGG		Thr->Arg
678	CTG->CCG		Leu->Pro
Μετάλλαξη που επηρεάζει τη θέση συναρμωγής (splicing)	153	Διαγραφή	Ίσο
		Ασχηματισμός	Ανακατατάξη
	R	ds	+1
			(i) ΔT
Μικρά ελλείμματα	Κωδικόνιο	Τύπος	
53		TCCTT*GGCCTCGCAGGAGCCCG	
325		AAAGCAC*CTGAGAGATGAGATCC	
582		TTCGTG*ATCACAGAGAGACTGG	
Μικρές προσθήκες	Νουκλεοτίδιο	Κωδικόνιο	Πρωτεΐνη
1306		456	C
2022		675	T
Μεγάλα ελλείμματα		Παραγωγή μεταλλάξης	
101		23bp nt 782-801 (μετάλλαξη που 3' gene incl. ex. 5-10 (μετάλλαξη που περιγράφηκε σε γενομικό DNA)	
76		335 bp nt. 431 (μετάλλαξη που περιγράφηκε σε cDNA)	
78		> 1192 bp 5' gene (μετάλλαξη που περιγράφηκε σε γενομικό DNA)	
119		incl. ex. 8 (μετάλλαξη που περιγράφηκε σε γενομικό DNA)	
120		- 58b (μετάλλαξη που περιγράφηκε σε γενομικό DNA)	
Πολύπλοκες αναδιοργανώσεις (συμπεριλαμβανομένων των αναπροσανατολισμών)		Παραγωγή μεταλλάξης	
		Del 11 E2-3 to 11E2-33. Dupl 1 TATAAAA nt 474 cd. 158	

* βιβλιογραφική αναφορά στην εργασία όπου για πρώτη φορά περιγράφηκε η μετάλλαξη

Πίνακας 2: Αναλυτική περιγραφή των διαφόρων μεταλλάξεων στο γονίδιο SLC3A1.

Οι Μεταλλάξεις στο γονίδιο SLC7A9

Η γενετική βάση της κυστινουρίας αποτελείται από έναν αρκετά πολύπλοκο μοριακό μηχανισμό, αφού έχει διαπιστωθεί ότι οι διάφοροι τύποι της δεν οφείλονται σε μεταλλάξεις ενός και μόνο γονιδίου. Έτσι, όπως προαναφέρθηκε μεταλλάξεις στο γονίδιο SLC7A9 προκαλούν τη 'μη-τύπου I' κυστινουρία. Πρόσφατες μελέτες τοποθετούν το γονίδιο αυτό σε μια περιοχή 1.8Mb, μεταξύ των δεικτών D19S430 και D19S874 (εικόνα 1). Η περιοχή αυτή περιέχει 10



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση της περιοχής του χρωμοσώματος 9, στην οποία εντοπίζεται το γονίδιο SLC7A9

γνωστά γονίδια και 56 ESTs (expressed sequence tags). Όμως, κανενός από αυτά τα γονίδια μοριακό προϊόν δεν σχετίζεται με τη μεταφορά των συγκεκριμένων με την ασθένεια αμινοξέων^{17, 18, 19}. Η περαιτέρω

έρευνα και άλλων μοριακών δεικτών θα επιτρέψει να μειωθεί το εύρος της περιοχής, όπου έχει μέχρι σήμερα χαρτογραφηθεί το γονίδιο SLC7A9. Επιπλέον, η ανάλυση των ESTs καθώς και ο ενδεχόμενος προσδιορισμός και άλλων γονιδίων της συγκεκριμένης πε-

Τύπος μετάλλαξης	Συνολικός αριθμός μεταλλάξεων
Αλλαγή νουκλεοτίδιου ⇒ Μετάλλαξη με λάθος νόημα (missense) ή μετάλλαξη χωρίς νόημα (nonsense)	5
Αλλαγή νουκλεοτίδιου ⇒ Μετάλλαξη που επηρεάζει τη θέση συνταξιομίας (splicing)	1
Μικρά ελλείμματα (small deletions)	1
ΣΥΝΟΛΟ	7

Πίνακας 3: Οι τύποι των μεταλλάξεων που έχουν προσδιοριστεί στο γονίδιο SLC7A9 και ο συνολικός αριθμός των.

ριοχής θα δώσει μελλοντικά και τη δυνατότητα πιθανής κλωνοποίησής του. Το σύνολο των μέχρι σήμερα γνωστών μεταλλάξεων του γονιδίου SLC7A9 αναφέρεται στον **πίνακα 3**, ενώ στον **πίνακα 4** παρουσιάζονται πιο αναλυτικά οι μεταλλάξεις κάθε κατηγορίας¹⁰⁻¹⁹.

Μετάλλαξη με λάθος νόημα/Μετάλλαξη χωρίς νόημα	Κωδικαίνιο	Νουκλεοτίδιο	Αμινοξύ
(19)	105	cGGG→AGG	Gly→Arg
(19)	170	cGTG→ATG	Val→Met
(19)	182	cGCG→ACG	Ala→Thr
(19)	195	cGGG→AGG	Gly→Arg
(19)	259	cGGG→AGG	Gly→Arg
Μικρά ελλείμματα	Κωδικαίνιο	Έλλειμμα	
(19)	136	CGAGTAT*GTGcTGCGCCCTTC	
Μικρές προσθήκες	Νουκλεοτίδιο	Κωδικαίνιο	Προσθήκη
(19)	520	112	I

* βιβλιογραφική αναφορά στην εργασία όπου για πρώτη φορά περιγράφηκε η μετάλλαξη

Πίνακας 4: Αναλυτική περιγραφή των διαφόρων μεταλλάξεων στο γονίδιο SLC7A9.

Προοπτικές

Ο τρόπος κληρονομιάς της κυστινουρίας έχει χαρακτηριστεί ως πραγματικά υπολειπόμενος για την κυστινουρία 'τύπου I' και ως ενδιάμεση μορφή κληρονομικότητας για τις 'τύπου II' και 'τύπου III' κυστινουρίες. Πρόσφατες έρευνες σε επίπεδο μοριακής βιολογίας έχουν αποδείξει ότι ο 'τύπος I' κυστινουρίας (που εμφανίζει υπολειπόμενη μορφή κληρονομικότητας) μπορεί να διακριθεί από τη 'μη-τύπου I' κυστινουρία (που χαρακτηρίζεται από ενδιάμεσης μορφής κληρονομικότητα) με βάση τα επίπεδα της νεφρικής απέκκρισης των τεσσάρων αμινοξέων: κυστίνη, λυσίνη, ορνιθίνη και αργινίνη. Ωστόσο, διαφορές στις φαινοτυπικές εκφράσεις των γονιδίων ακόμα και μεταξύ συγγενών ατόμων, που έχουν τον ίδιο γενότυπο, δείχνουν ότι επιβάλλεται να γίνει περαιτέρω βασική έρευνα και να επικεντρωθούν οι προσπάθειες γύρω από τη γενετική βάση της ασθένειας καθώς και της επίδρασης που πιθανά μπορεί να ασκεί το περιβάλλον όπως και για την επίδραση κάποιων άλλων πιθανών παραγόντων που ασκείται επάνω στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των κυστινουρικών ατόμων.

Βιβλιογραφία

1. Colombo R. Dating the origin of the V170M

mutation causing non-type I cystinuria in Libyan Jews by linkage disequilibrium and physical mapping of the SLC7A9 gene. *Gen* 2000; 69: 131-134.

2. Giannakopoulos X, Kalfakakou V, Tsoumanis Ph, Karkabounas S, Chambilomatis P, Evaggelou A, Kallistratos G. Resultats du traitement de la cystinurie et de la lithiase cystinique par l' alpha - mercaptopropionylglycine. *J Urol* 1994; 100: 129-134.

3. Giannakopoulos X, Tsoumanis Ph, Pappas G, Kalfakakou V, Charalampopoulos C, Evaggelou A. Prevention and treatment of cystinuric patients with 2-mercaptopyropionylglycine (2-MPG). *Eur Urol* 1996; 30(suppl 2) 61.

4. Segal S & Their S. Cystinuria In: Scriver CH, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). *The metabolic basis of inherited disease*. McGraw Hill, New York, 1989; 2479-2496.

5. Rosenberg LE, Downing S, Durant JL & Segal S. Cystinuria: biochemical evidence for three genetically distinct diseases. *J Clin Invest* 1966; 45: 365-371.

6. Callonge MJ, Volpini V, Bisceglia L, Rousaud F, de Santis L, Beccia E, Zelante L, Testar X, Zorzano A, Estivill X, Gasparini P, Nunes V & Palacin M. Genetic heterogeneity in cystinuria: The SLC3A1 gene is linked to type I but not to type III cystinuria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 9667-9671.

7. Furriolis M, Chillaron J, Mora C, Castello A, Bertran J, Camps M, Testar X, Vilaro S, Zorzano A & Palacin M. 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* 1993; 268: 27060-27068.

8. Pickel VM, Nirenberg MJ, Chan J, Mosckovitz R, Udenfriend S & Tate SS. Ultrastructural localization of a neutral and basic amino acid in rat kidney and intestine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7779-7783.

9. Busch A, Herzer T, Waldegger S, Schmidt F, Palacin M, Biber J, Markovich D, Muter H & Lang F. Opposite directed currents induced by the transport of dibasic and neutral amino acids in *Xenopus* oocytes expressing the protein rBAT. *J Biol Chem* 1994; 269: 25581-25586.

10. Pras E, Raden N, Golomb E, Arber N, Aksentijevich I, Schapiro JM, Harel D, Katz G, Liberman U, Pras M & Kastner DL. Mutations in the SLC3A1 transporter gene in cystinuria. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 1297-1303.

11. 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 (4): 447-451.

12. 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: 420-426.

13. Miyamoto K, Katai K, Tatsumi S, Sone K, Segawa H, Yamamoto H, Taketani Y, Takada K, Morita K, Kanayama H, Kagawa S & Takeda E.

Mutations in the basic amino acid transporter gene associated with cystinuria. *Biochem J* 1995; 310: 951-955.

14. Albers A, Lahme S, Wagner C, Kaiser P, Zerres K, Capasso G, Pica A, Palacin M, Lang F, Bichler KH & Eggermann T. Mutations in the SLC3A1 gene in cystinuric patients: frequencies and identification of a novel mutation. *Genet Test* 1999; 3 (2): 227-231.

15. Gasparini P, Calogne MJ, Bisceglia L, Purroy J, Dianzani I, Notarangelo A, Rousaud F, Gallucci M, Testar X, Ponzzone A, Estivill X, Zorzano A, Palacin M, Nunes V & Zelante L. Molecular genetics of cystinuria: identification of four new mutations and seven polymorphisms and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 781-788.

16. Gitomer WL, Reed BY, Ruml LA, Sakhaee K &

Pak CY. Mutations in the genomic deoxyribonucleic acid for SLC3A1 in the patients with cystinuria. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83 (10): 3688-3694.

17. 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 (5): 1401-1406.

18. Pras E, 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. *Gen* 1999; 60: 248-250.

19. Feliubadalo L, Font M, Purroy J, et. al. Non-type I cystinuria caused by mutations in the SLC7A9, encoding a subunit (bo, +AT) of rBAT. International Cystinuria Consortium. *Nat Genet* 1999; 23 (1): 52-57