

# Variaciones en el gen *SLC7A9*: impacto de trece mutaciones frecuentes en la etiología de la cistinuria en población mediterránea española



Francesc Francés<sup>a</sup>, Olga Portolés<sup>a</sup>, Dolores Corella<sup>a</sup>, José V. Sorlí<sup>a,b</sup>, Antonio Sabater<sup>a</sup>, Paula Carrasco<sup>a</sup> y Marisa Guillén<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Unidad de Epidemiología Genética y Molecular. Departamento de Medicina Preventiva. Facultad de Medicina. Universitat de València. Valencia.

<sup>b</sup>Centro de Atención Primaria de Xirivella. Valencia. España.

**FUNDAMENTO Y OBJETIVO:** Investigar la presencia de mutaciones en el gen *SLC7A9*, descritas como más prevalentes en otras poblaciones, en familias con cistinuria en población mediterránea española y su asociación con manifestaciones clínicas de la enfermedad.

**PACIENTES Y MÉTODO:** Se estudió a 20 familias con cistinuria (6 tipo I, 12 tipo no I y 2 de tipo desconocido), incluidos 48 pacientes con cistinuria y 44 familiares. Se aisló el ADN y se realizó el análisis molecular de 13 mutaciones en el gen *SLC7A9* (P52L, N58\_G79del22, G63R, G105R, T123M, V170M, A182T, V188M, c.614dupA, G259R, L283F, A316V y R333W). Se estudió la asociación de estas mutaciones con las concentraciones de aminoácidos en orina, formación de cálculos, infecciones urinarias, cólicos y otras manifestaciones clínicas.

**RESULTADOS:** De las 13 mutaciones investigadas, la más prevalente fue la c.614dupA, que se encontró en heterocigosis en 13 pacientes con cistinuria (17,1%) y en 2 familiares, todos ellos pertenecientes a 4 familias clasificadas como tipo no I. Las mutaciones G105R (9,2%), T123M (3,9%) y N58\_G79del22 (2,6%) se detectaron sólo en pacientes con cistinuria tipo no I, mientras que se encontró un alelo portador de la variante R333W en un paciente de una familia en que el tipo desconocido y un alelo portador de G105R en un familiar tipo no I.

**CONCLUSIONES:** Aunque no se ha realizado el cribado completo del gen *SLC7A9*, los resultados obtenidos apuntan a que las variaciones en el gen *SLC7A9* tienen un mayor impacto en la etiología de la cistinuria en esta población que las variaciones en el gen *SLC3A1*, previamente investigado. Además, la amplia variación de las manifestaciones fenotípicas dentro de familias que comparten las mismas mutaciones resalta la importancia de la investigación de otros factores genéticos y/o ambientales.

**Palabras clave:** Cistinuria. Gen *SLC7A9*. Gen *SLC3A1*. Mutaciones. Aminoácidos dibásicos en orina. Cálculos renales.

*SLC7A9* gene variation: impact of 13 frequent mutations in the etiology of cystinuria in a Spanish Mediterranean population

**BACKGROUND AND OBJECTIVE:** The aim of this study was to investigate the presence of the most prevalent mutation in the *SLC7A9* gene in families of the Mediterranean Spanish population and their association with clinical phenotypes.

**PATIENTS AND METHOD:** Twenty cystinuria families were studied (6 type I, 12 non type I, and 2 unknown type), including 48 cystinuria patients and 44 relatives. DNA was isolated and molecular analysis of 13 variations (P52L, N58\_G79del22, G63R, G105R, T123M, V170M, A182T, V188M, c.614dupA, G259R, L283F, A316V and R333W) in the *SLC7A9* gene was undertaken. Association studies between these mutations and urinary aminoacid concentrations, stones, urinary infections, colics and other clinical traits were carried out.

**RESULTS:** Of the 13 investigated mutations, the most prevalent mutation in cystinuria patients was c.614dupA (17.1%), which was found in 13 patients in heterozygous state (17.1%) and in 2 relatives, all of them belonging to 4 non type I families. Mutations G105R (9.2%), T123M (3.9%) and N58\_G79del22 (2.6%) were detected only in non type I cystinuria patients. Meanwhile, a R333W carrier allele was found in a patient of a unknown family, and a G105R allele in a relative of a non type I family. No mutation was found in type I families and no patients with mutations in both *SLC3A1* and *SLC7A9* genes were found in any family.

**CONCLUSIONS:** Although we have not carried out the whole screening of *SLC7A9* gene, the detection rate of variations in *SLC7A9* gene suggests a greater impact of this gene in the etiology of cystinuria in our population than variations in the previously screened *SLC3A1* gene. The wide variation of phenotypical traits in subjects of families with the same mutations suggests that further investigation of other genetic and/or environmental factors should be carried out.

**Key words:** Cystinuria. *SLC7A9* gene. *SLC3A1* gene. Variations. Dibasic aminoacids in urine. Renal calculi.

Trabajo financiado con una ayuda a proyectos de investigación científica y desarrollo tecnológico de la Generalitat Valenciana (GV05/289). F. Francés es becario V. Segles de la Universitat de València.

Correspondencia: Dra. M. Guillén.  
Unidad de Epidemiología Genética y Molecular.  
Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Medicina.  
Avda. Blasco Ibáñez, 15. 46010 Valencia. España.  
Correo electrónico: marisa.guillen@uv.es

Manuscrito recibido el 22-8-2005; aceptado para su publicación el 15-11-2005.

La cistinuria es la aminoaciduria más frecuente en distintas poblaciones<sup>1</sup>. Se caracteriza por la hiperexcreción urinaria de cistina, lisina, arginina y ornitina, debido a una alteración en el transporte de estos aminoácidos en las células epiteliales del túbulo renal<sup>2</sup>. Su presentación clínica es consecuencia de la baja solubilidad de la cistina, cuya precipitación está favorecida a pH ácido, lo que origina la formación de cálculos en el aparato urinario, así como infecciones urinarias recurrentes, cólicos e incluso pérdida total o parcial de la función renal<sup>3</sup>. Se ha estimado que la cistinuria estaría implicada en un 10% de los cálculos renales en niños y en un 1-2% de los encontrados en adultos<sup>1</sup>. En los últimos 10 años se ha realizado notables avances en el estudio de las bases moleculares de la cistinuria y se ha caracterizado un sistema de transporte de aminoácidos denominado b<sup>0</sup>+, que está formado por una subunidad pesada, rBAT, y una subunidad ligera, identificada como b<sup>0</sup>+AT, codificadas por los genes denominados *SLC3A1* y *SLC7A9*, respectivamente<sup>4</sup>. El descubrimiento del gen *SLC3A1*<sup>5</sup> en 1994 (localizado en el cromosoma 2p16.3-p21) y del *SLC7A9* en 1999<sup>6</sup> (localizado en el cromosoma 19q12-13.1) ha contribuido a un mejor conocimiento de esta enfermedad y está facilitando la clasificación fenotípica, muy variable y controvertida. Así, desde el punto de vista bioquímico, y según la clasificación más actual<sup>7</sup>, los pacientes con cistinuria se clasifican en 3 tipos: tipo I (MIM220100), tipo no I (MIM600918) y tipo mixto. En el tipo I la transmisión de la cistinuria sigue un modelo autosómico recesivo y, por lo tanto, los heterocigotos tienen una excreción normal de aminoácidos en orina (fenotipo I). En el tipo no I la enfermedad se transmite de un modo dominante con una penetrancia incompleta. Los heterocigotos tipo no I excretan aminoácidos en orina en cantidades superiores a las normales, pero sin llegar a los valores de los pacientes homocigotos (fenotipo no I). Por último, se han descrito pacientes portadores de un alelo tipo no I pero con fenotipo I, que se han clasificado como tipo mixto.

El impacto de las variaciones en los genes *SLC3A1* y *SLC7A9* en la etiología de la cistinuria varía según la zona geográfica y los fenotipos más prevalentes<sup>8</sup>. En general, las mutaciones en el gen *SLC3A1* se han asociado a cistinuria tipo I<sup>9-11</sup>, mientras que las mutaciones en el gen *SLC7A9* se asociarían a la cistinuria tipo no I<sup>6,12</sup>. Aunque en ambos casos se han descrito modelos animales bien caracterizados<sup>13,14</sup>, también se han encontrado algunos individuos con mutaciones en heterocigosis en alguno de estos genes y que no presentaban el tipo de cistinuria al que se asociaba (p. ej., DupE5-dupE9 en *SLC3A1* en heterocigotos con fenotipo tipo no I; G105R en *SLC7A9* en heterocigotos tipo I)<sup>7,15</sup>. Por este motivo, Dello Strologo et al<sup>16</sup> proponen una clasificación genética de los pacientes con cistinuria atendiendo a los criterios siguientes: el tipo A estaría causado por mutaciones en el gen *SLC3A1* en ambos alelos; los pacientes tipo B tendrían mutaciones en el gen *SLC7A9* en ambos alelos, y los pacientes tipo AB tendrían una mutación en el gen *SLC3A1* y otra en el gen *SLC7A9*. Recientemente nuestro grupo, al realizar un cribado completo de mutaciones en toda la región codificante del gen *SLC3A1*<sup>17</sup> en familias con cistinuria de la Comunidad Valenciana<sup>18</sup>, ha obtenido una prevalencia muy baja de éstas e hipotetizado un mayor impacto de las variaciones en el gen *SLC7A9* en esta población. En los últimos 5 años se ha descrito más de 60 mutaciones en dicho gen<sup>6,7,15,19-22</sup>, de las cuales la mutación G105R es la más preva-

lente en la población analizada por el Consorcio Internacional de Cistinuria<sup>6,7</sup>. Por ello, antes de proceder a un cribado completo del gen *SLC7A9*, nuestro objetivo ha sido investigar la presencia, en familias con cistinuria de la Comunidad Valenciana, de mutaciones en el gen *SLC7A9* que se hayan descrito como más frecuentes en otras poblaciones (P52L, N58\_G79del22, G63R, G105R, T123M, V170M, A182T, V188M, c.614dupA, G259R, L283F, A316V y R333W)<sup>7,15,19-22</sup> y estudiar su asociación con las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

### Pacientes y método

La selección de pacientes con cistinuria se realizó atendiendo a los criterios clínicos y bioquímicos ampliamente descritos con anterioridad<sup>23</sup>. Brevemente, se incluía a los individuos en el estudio si: a) habían presentado positividad del test de Brand<sup>24</sup> durante el primer año de vida en niños identificados a través de un programa de cribado neonatal de aminoácidos en orina realizado en la Unidad de Metabolopatías del Hospital Infantil La Fe durante los años 1983-1986, y/o b) habían formado y/o expulsado cálculos de cistina, cuya composición se hubiera determinado tras un análisis químico. La confirmación final del diagnóstico se realizó mediante la cuantificación en orina de cistina, lisina, arginina y ornitina a través de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y su comparación con los valores de referencia en nuestra población. Se consideró paciente con cistinuria a la persona cuyas concentraciones de al menos uno de los 4 aminoácidos cuantificados y la suma total de ellos fuesen superiores a los valores de referencia<sup>25</sup>. A partir del caso índice se incluyó en el estudio a las personas pertenecientes a su árbol genealógico. Los individuos clasificados como familiares eran parientes de primer o segundo grado del caso índice y no cumplían el criterio para su inclusión como paciente con cistinuria. Para el análisis molecular se incluyó también en el estudio a un grupo de controles sanos no relacionados con

las familias con cistinuria; este grupo control se seleccionó a partir de un registro de población de la misma área geográfica y estaba formado por sujetos sanos apareados por sexo y edad (desviación estándar, 3 años) con los casos. Se seleccionaron 2 controles (n = 96) por cada caso (n = 48). De todos los participantes en el estudio se obtuvo el consentimiento informado. De cada participante se obtuvo muestras de sangre y orina para aislar el ADN y para las determinaciones bioquímicas, así como información acerca de variables del estilo de vida mediante cuestionarios. Con objeto de confirmar el diagnóstico de cistinuria se cuantificó la cistina mediante HPLC con prederivatización de la muestra con amonio-7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-sulfonato<sup>25</sup>. La cuantificación de lisina, arginina y ornitina en orina se efectuó por HPLC con prederivatización de la muestra con orto-ptalaldehído (OPA)<sup>26</sup>. Los resultados obtenidos se expresaron como micromol de aminoácido por gramo de creatinina. Inicialmente las familias de los pacientes con cistinuria se clasificaron en tipo I y tipo no I de acuerdo con el patrón de transmisión de la enfermedad. Las familias tipo I mostraban un patrón de transmisión recesivo, por lo que los portadores de mutaciones carecían de manifestaciones fenotípicas de la enfermedad. Los portadores de las familias tipo no I presentaban una discreta hiperexcreción de aminoácidos en orina. Si no se disponía de información suficiente acerca de alguno de ellos, la familia se clasificaba como de tipo desconocido. Tras la extracción del ADN genómico por métodos estándar, éste se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa utilizando varios pares de cebadores diseñados de acuerdo con la secuencia del gen *SLC7A9* y con las mutaciones de éste que se quería detectar: P52L, N58\_G79del22, G63R, G105R, T123M, V170M, A182T, V188M, c.614dupA, G259R, L283F, A316V y R333W (tabla 1). Todas las ampliificaciones se efectuaron en un volumen de 50 µl (para 300 y 600 ng de ADN de la muestra). Después de una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min se realizaron 35 ciclos con el siguiente protocolo: 30 s a 94 °C y 30 s a la correspondiente temperatura de anillamiento (tabla 1). Para la extensión del amplificado se utilizó una temperatura de 72 °C durante 5 min. A continuación se efectuó el análisis de restricción, para lo cual se digirieron los productos de amplificación con las enzimas indicadas en la tabla 1. Las muestras que presentaban un patrón anormal para

TABLA 1

### Cebadores, temperatura de anillamiento (TA) y enzimas de restricción utilizados para el estudio de variantes genéticas en el gen *SLC7A9*

Variante genómica	Cambio de aminoácido	Exón	Cebadores	TA (°C)	Enzima de restricción
c.155C>T	P52L	3	5'-CTAACGCCTCTTCTCCTCT-3' 5'-CGTGTGGCTGAGCACAGACTC-3'	64,2	Taq1B
c.171C>T	N58_G79del22	3	5'-CTAACGCCTCTTCTCCTCT-3' 5'-CAACAGGCTCCCAAGTCTCT-3'	58,5	BlnI
c.187G>A	G63R	3	5'-CTAACGCCTCTTCTCCTCT-3' 5'-CAACAGGCTCCCAAGTCTCT-3'	58,5	Apal
c.311G>A	G105R <sup>a</sup>	4	5'-AGCCTCCGGTGGGAGGAAG-3' 5'-GAGTCCCAGACACCTCTG-3'	68,7	Apal
c.368C>T	T123M	4	5'-CCCTTCTCTGTGTGTTCCA-3' 5'-CAGAGACTCACTGGGGAGGA-3'	61,4	NlaIII
c.508G>A	V170M	5	5'-AGGCAGGAGAATTGCTTGA-3' 5'-GACGTAGCTTCCCAGCCGTA-3'	64,2	RsaI
c.544G>A	A182T <sup>b</sup>	5	5'-AAAGGAGACTCTCCAGGG-3' 5'-ATGCTTCTTGGAGATGGGCT-3'	55	KspI
c.562G>A	V188M	5	5'-ACATCATGCCACTGCTCTCC-3' 5'-ACACGCCCTGAAACTAAGGA-3'	64,2	BclI
c.614dupA	L160fsX1	6	5'-GGTGGGAGGGATCCTTAGTT-3' 5'-CAGGGAATAAGGGGAGAGG-3' InsA: 5'GGCTTCATTACAGGAAACACAAAA-3 DelA: 5'GGCTTCATTACAGGAAACACAAAG-3	61,4	
c.775G>A	G259R	8	5'-CTGCCTTTGGCCATTATCC-3' 5'-ATAATGACCTCCCGACTC-3'	55,8	DdeI
c.847C>T	L283F	8	5'-CCTCTGCTACCTGCGAATCT-3' 5'-GTGAATATCGCCCTCTTCC-3'	58,5	Tsp509I
c.947C>T	A316V	9	5'-GGCGTTCTCCTCTCCTCT-3' 5'-CATCCTTCTCTGGATTGG-3'	58,5	ApeKI
c.997C>T	R333W <sup>a</sup>	10	5'-GGCGTTCTCCTCTCCTCT-3' 5'-CATCCTTCTCTGGATTGG-3'	55,8	NciI

Para el análisis de las variantes P52L, V170M y G259R se utilizaron cebadores mutagenizados a fin de crear un sitio de restricción. Se indica en negrita el cambio de nucleótido. Para el análisis de la variante L160fsX1 se utilizaron cebadores específicos de alelo. <sup>a</sup>Cebadores descritos por Font et al<sup>17</sup>. <sup>b</sup>Cebadores descritos por Feljubadal et al<sup>19</sup>.

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/3800320>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/3800320>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)