

## BASES MOLECULARS DE LA CISTINÚRIA

M. PALACÍN, C. MORA, J. CHILLARÓN, M. J. CALONGE, R. ESTÉVEZ, D. TORRENTS, X. TESTAR I A. ZORZANO.

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

V. NUNES, J. PURROY, M. NADAL, V. VOLPINI I X. ESTIVILL.

*Departament de Genètica Molecular. Institut de Recerca Oncològica. Barcelona.*

F. ROUSAUD I P. BARCELÓ.

*Fundació Puigvert-IUNA. Barcelona.*

Adreça per a la correspondència: Manuel Palacín. Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona. Avinguda Diagonal 645, 6è pis. Tel.: 4021543. Fax.: 4021559.

### RESUM

Els cDNA identificats actualment de transportadors d'aminoàcids en mamífers poden ser agrupats en quatre famílies. Una d'aquestes famílies la componen les proteïnes rBAT i la cadena pesada (hc) de l'antigen de superfície de membrana anomenat 4F2. Els RNA que codifiquen aquestes dues proteïnes indueixen activitat d'un sistema de transport d'aminoàcids tipus  $b^{o,+}$  (rBAT) i un altre de tipus  $y^+L$  (4F2hc) en oòcits de *Xenopus laevis*. Ambdós transportadors tenen un mecanisme de bescanvi obligatori d'aminoàcids que, en el cas de rBAT, pot acumular, per aquest mecanisme de transport actiu terciari, substrats a través de la membrana plasmàtica fins a 30-50 vegades en l'oòcit de *Xenopus*. Sorprenentment, tant rBAT com 4F2hc no són suficientment hidrofòbics i no semblen proteïnes formadores de porus en membranes. Això ha suggerit la hipòtesi que rBAT i 4F2hc són subunitats o moduladors dels corresponents transportadors. És significatiu que tant per a rBAT com per a 4F2hc s'ha suggerit o demostrat, respectivament, la seva associació amb subunitats lleugeres d'aproximadament 40 kD en una estructura de tipus heterodimèric.

L'expressió de rBAT en oòcits indueix transport d'alta afinitat de cistina, compartit amb aminoàcids bàsics i alguns de neutres. El gen rBAT s'expressa al ronyó i a l'intestí prim. La proteïna es localitza en el microvil·li dels túbuls proximals rectes de la nefrona i en la mucosa de l'intestí prim. Tot això té a veure amb la participació de rBAT en un sistema de reabsorció d'alta afinitat de cistina i aminoàcids bàsics, per un mecanisme de transport actiu terciari. Totes aquestes característiques van suggerir que el gen rBAT (anomenat SLC3A1 en el *Gene Data Bank*) era un bon candidat per a la cistinúria clàssica. Aquesta és una malaltia hereditària que provoca la reabsorció renal i intestinal de cistina i aminoàcids bàsics. La baixa solubilitat de la cistina condueix a la precipitació d'aquesta i a la formació de càlculs renals. L'anàlisi mutacional del gen rBAT procedent de malalts amb cistinúria ha revelat l'existència d'un nombre creixent (17 actualment) de mutacions específiques de la malaltia, tant de canvi d'un aminoàcid, com de codons d'aturada, insercions o delecions. Les mutacions M467T (substitució de metionina per treonina en el residu 467) i R270X (codó de parada en el residu 270, que elimina aproximadament 2/3 parts de la proteïna) representen aproximadament la meitat dels cromosomes cistinúrics on ja s'han trobat mutacions. La mutació M467T redueix l'activitat de transport expressada en oòcits com a conseqüència d'un defecte en el seu processament a la membrana plasmàtica. Tots aquests resultats demostren de manera molt convincent que mutacions en el gen rBAT causen cistinúria.

Tres tipus de cistinúria (tipus I, II i III) han estat descrits basant-se en les característiques genètiques, bioquímiques i clíniques d'aquesta. El tipus I presenta una herència totalment recessiva; els portadors de tipus I són totalment silenciosos. Per contra, els portadors de tipus II i III presenten hiperaminoacidúria de cistina i aminoàcids bàsics. Els homòzigs de tipus III sembla que no presenten defecte intestinal, mentre que els de tipus I i II mostren un clar defecte d'absorció intestinal de cistina. Fins ara no hem trobat mutacions en el gen rBAT associades als tipus II i III, mentre que totes les mutacions descrites es troben associades al tipus I, i representen al voltant del 70 % dels cromosomes de tipus I estudiats. Això suggereix una forta associació entre el gen rBAT i el tipus I de la cistinúria i l'existència d'heterogeneïtat genètica. Per tal de demostrar aquesta heterogeneïtat, hem desenvolupat estudis de lligament genètic. Primer vam localitzar el gen rBAT al braç curt del cromosoma 2 (associat a la banda G 2p16.3). Utilitzant tant marcadors d'aquesta zona cromosòmica (microsatèl·lits) com marcadors intragènics, hem demostrat que la cistinúria és heterogènia, i que només rBAT seria responsable de la cistinúria de tipus I, i no de les de tipus II i III. Estudis de tipus bioquímic, genètic i clínic són necessaris per tal d'identificar els altres gens responsables de la cistinúria: altres transportadors de cistina, responsables de la reabsorció renal d'aquest aminoàcid en el túbul renal proximal contornejat, i una putativa subunitat lleugera de rBAT són ara per ara els màxims candidats per a la cistinúria de tipus III i II, respectivament.

## INTRODUCCIÓ

El transport d'aminoàcids a través de la membrana plasmàtica de les cèl·lules de mamífer és catalitzat per proteïnes que reconeixen, uneixen i transloquen aquests metabòlits entre els compartiments intracel·lular i extracel·lular. L'adveniment de la biologia molecular a l'estudi del transport d'aminoàcids en les cèl·lules de mamífer ha revolucionat en els darrers cinc anys aquesta matèria des d'una visió gairebé únicament fisiològica fins a un estudi més modern de biologia unificada, on s'apliquen la forma de pensament i la tecnologia de la bioquímica, la biologia cel·lular, la genètica, la medicina, etc. Un nombre ràpidament creixent de seqüències de cDNA codificadores de proteïnes relacionades amb el transport d'aminoàcids a través de la membrana plasmàtica han aparegut (aproximadament 20 cDNA diferents, sense comptar els homòlegs procedents d'espècies diferents; vegeu-ne les revisions recents: Bertran *et al.*, 1994; Kanai *et al.*, 1994; Kanner i Kleinberger-Doron, 1994; Macleod *et al.*, 1994; MacGivan i Pastor-Anglada, 1994). Al contrari, cDNA codificants d'altres activitats de transport d'aminoàcids molt significatives encara no han estat clonades (sistemes sodi dependents com els A, NBB, B<sup>o+</sup>, N i sodi independents com l'ubic sistema L o els d'aminoàcids aniònics). Els sistemes de transport d'aminoàcids fins ara clonats es poden agrupar en quatre famílies de gens: 1) transportadors sodi independents d'aminoàcids catiònics, coneguts amb l'abreviació CAT 2) transportadors d'aminoàcids (transportadors del neurotransmissor GABA, de  $\beta$ -aminoàcids, de taurina, de glicina i de prolina) dintre de la superfamília de transportadors de neurotransmissors dependents de sodi i de clorur 3) transportadors sodi i potassi dependents d'aminoàcids aniònics i zwitteriònics (neutres) (isoformes de transportadors tipus X<sub>AG</sub>

de glutamat i de l'activitat de transport coneguda com a sistema ASC per a aminoàcids neutres). Les proteïnes deduïdes de les seqüències de cDNA, o en alguns pocs casos dels transportadors purificats presenten com a característica estructural comuna una naturalesa molt hidrofòbica amb la presència potencial de 8 a 12 dominis transmembrana. Contràriament a tots aquests transportadors, dues proteïnes homòlogues, rBAT (també anomenada D2, NAA-Tr, NBAA-Tr o NABT, segons l'autor i l'any de publicació) i la cadena pesada de l'antigen de superfície cel·lular 4F2 (4F2hc), que són menys hidrofòbiques que els transportadors abans comentats (posseeixen 1 o 4 dominis transmembrana segons els models proposats), indueixen activitat de transport d'aminoàcids en oòcits de *Xenopus* amb característiques pròpies de les activitats de transport similars a les dels sistema b<sup>o+</sup> i y<sup>+L</sup>, respectivament. L'aparent incapacitat d'aquestes dues proteïnes per formar un porus en la membrana plasmàtica, a causa de la seva baixa hidrofobicitat, ha servit per postular que tenen un paper com a subunitats moduladores de transportadors amb estructura heteromèrica. Aquestes dues proteïnes són subjecte d'aquesta revisió. Recentment, s'ha demostrat que mutacions en el gen rBAT causen cistinúria clàssica, un defecte hereditari en la reabsorció renal i intestinal de cistina i d'aminoàcids bàsics. El paper de rBAT en la cistinúria està permetent esbrinar les bases moleculars d'aquesta malaltia, coneguda des dels temps de Beethoven i que va ser descrita com un dels primers «errors congènits del metabolisme» per Sir Archibald E. Garrod (1908).



## CLONACIÓ I IDENTIFICACIÓ DE RBAT I 4F2HC, UNA NOVA FAMÍLIA DE PROTEÏNES INVOLUCRADES EN EL TRANSPORT D'AMINOÀCIDS

La clonació per expressió d'activitat de transport d'aminoàcids en oòcits de *Xenopus* fou utilitzada per tres laboratoris per a aïllar cDNA codificadors de potencials transportadors a partir de genoteques de cDNA de ronyó de conill, rata i ésser humà (Bertran *et al.*, 1992c, 1993; Lee *et al.*, 1993; Tate *et al.*, 1992; Wells i Hediger, 1992). Aquests cDNA codifiquen proteïnes amb una homologia molt alta de seqüència (80-85 % d'identitat).

Per claredat el nom rBAT referirà tots aquests cDNA en aquesta revisió. La proteïna rBAT comparteix aproximadament un 30 % de seqüència d'aminoàcids (aproximadament un 50 % de similitud) amb la cadena pesada del'antigen de superfície cel·lular 4F2 (4F2hc) (Parmacek *et al.*, 1989; Quackenbush *et al.*, 1987; Teixeira *et al.*, 1987). La figura 1 mostra esquemàticament les analogies estructurals i l'homologia de seqüència entre les proteïnes rBAT i 4F2hc. Així, destaquen algunes d'aquestes similituds: ambdues proteïnes manquen d'una seqüència líder, presenten gràfics d'hidrofobicitat (per exemple, algoritme de Kyte-Doolittle) molt semblants (ve-

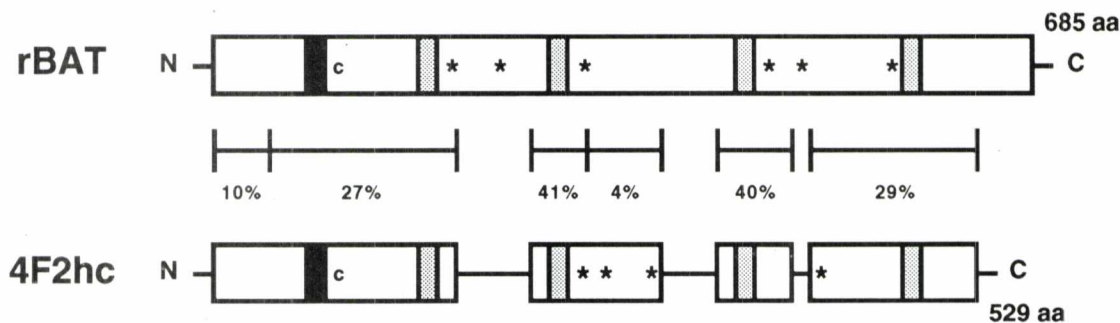


FIGURA 1. Representació esquemàtica de les analogies estructurals i de l'homologia de seqüència entre les proteïnes rBAT i 4F2hc humanes, deduïdes dels seus respectius clons de cDNA. Adues proteïnes presenten un únic clar segment amb hidrofobicitat i helicoïcitat suficient per ser un domini transmembrana (indicat amb barres negres en les posicions 89-110 i 82-104 per rBAT i 4F2hc, respectivament). S. Tate i col·laboradors (Mosckovitz *et al.*, 1994) proposen l'existència d'uns altres tres segments transmembrana de naturalesa amfipàtica, dels quals dos també serien conservats en 4F2hc. Les proteïnes en aquest alineament mostren al voltant del 30 % d'identitat (45 % de similitud) en les seves seqüències d'aminoàcids. Les homologies parcials entre les dues proteïnes al llarg de les seves seqüències es mostren entre el dos dibuixos esquemàtics. Quatre fragments de seqüència (10-18 residus d'aminoàcids de llargada) són altament conservats (67-80 % d'identitat) en les dues proteïnes (assenyalats amb barres puntejades). Les proteïnes rBAT humana, de conill i de rata clonades presenten vuit residus de cisteïna, mentre que la proteïna 4F2hc humana presenta dos d'aquests residus. Un d'ells, el primer tant en les seqüències de rBAT com de 4F2hc (posicions 114 i 102 de les dues proteïnes d'origen humà, respectivament) està conservat (assenyalat a l'esquema per dues lletres *c* minúscules). Els asteriscs indiquen les posicions dels llocs de N-glicosilació. Els buits en l'alineament més petits de deu residus d'aminoàcids no hi són representats o han estat combinats entre ells. *aa* indica residus d'aminoàcids.



geu la revisió de Palacín, 1994), i mostren quatre regions (10-18 residus de longitud) altament conservades (67-80 % identitat) (Figura 1). És potencialment interessant el fet que les dues proteïnes presenten un domini proteic d'homologia significativa amb una família de  $\alpha$ -amilases i  $\alpha$ -glucosidases de procariotes i insectes (Bertran *et al.*, 1992b, c; Wells i Hediger, 1992). Dintre d'aquest domini, el lloc catalític consensu d'aquestes glucosidases no és conservat en les proteïnes rBAT de conill i 4F2hc humanes; això té a veure amb el fet que l'expressió de rBAT en oòcits de *Xenopus* no confereix activitat  $\alpha$ -amilasa o maltasa (Wells i Hediger, 1992).

El cDNA de 4F2hc fou clonat amb l'ajut d'un anticòs monoclonal desenvolupat contra un antigen de membrana de cèl·lules limfoblàstiques (Quackenbush *et al.*, 1987; Teixeira *et al.*, 1987). El paper biològic

d'aquest antigen no va començar a esbrinar-se fins cinc anys més tard. A causa de l'homologia entre rBAT i 4F2hc, l'RNA sintètic de 4F2hc fou expressat en oòcits de *Xenopus* i es va demostrar l'expressió de transport d'aminoàcids amb característiques diferents de les associades amb l'expressió de rBAT (Bertran *et al.*, 1992b; Wells *et al.*, 1992). Així, rBAT indueix en oòcits el transport d'aminoàcids bàsics i neutres, entre ells la cistina, amb valors de  $K_m$  en el rang  $\mu$ M (aquest és el cas per als substrats com L-arginina, L-lisina, L-ornitina, L-leucina, L-histidina, L-cistina, etc.). La cinètica del transport expressat en oòcits per al RNA sintètic de rBAT es mostra a la figura 2. Anàlisis de tipus cinètic i d'inhibició creuada entre els aminoàcids transportats han fet evident que rBAT indueix un únic sistema de transport en oòcits (Bertran *et al.*, 1992b), que no és present en

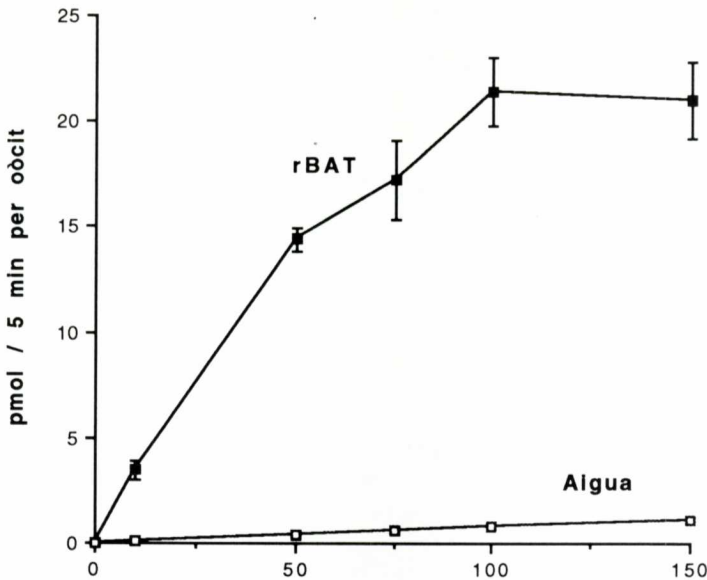


FIGURA 2. Transport de L-cistina induït per rBAT humà en oòcits de *Xenopus*. Els oòcits es van injectar amb 50 nl d'aigua (quadrats buits) o que contenien a més a més 5 ng de RNA sintètic de l'rBAT humà (quadrats negres). Tres dies després, la captació de L-[ $^{35}$ S] cistina, a les concentracions de l'aminoàcid indicades, fou determinada durant incubacions de 5 minuts. La captació de cistina induïda per l'RNA de rBAT se satura a concentracions de cistina properes a 100  $\mu$ M; en canvi la captació de cistina en els oòcits control (injectats amb aigua) no presenta saturació en el rang de concentració de l'aminoàcid utilitzat. Els valors són la mitjana  $\pm$  SEM dels valors de captació de set oòcits per grup en un experiment representatiu.

els oòcits de *Xenopus* (estadi VI) (Figura 2; Bertran *et al.*; 1992b, c; McNamara *et al.*, 1991). L'activitat de transport induïda per l' RNA de rBAT és independent de sodi i molt semblant a la del sistema  $b^{0,+}$  (Bertran *et al.*, 1992b). El nom rBAT és l'acrònim de «related to  $b^{0,+}$  amino acid transporter». El sistema de transport  $b^{0,+}$  fou descrit inicialment en blastòcits de ratolí (van Winkle *et al.*, 1988), i és un sistema de transport sodi independent i d'alta afinitat compartit pels aminoàcids bàsics i zwitteriònics; a diferència de rBAT aquest sistema no transporta cistina (L. J. van Winkle, comunicació personal). En canvi, l'RNA sintètic de 4F2hc sembla que incrementa una activitat de transport, preexistent en els oòcits de *Xenopus* (estadi VI), que es caracteritza pel transport sodi

independent amb alta afinitat ( $K_m$  en el rang  $\mu M$ ) per aminoàcids bàsics i sodi dependent amb alta afinitat per certs aminoàcids zwitteriònics (p. ex. L-leucina) (Bertran *et al.*, 1992c; Wells *et al.*, 1992). Aquesta activitat, que no transporta cistina, és molt semblant a la del sistema  $y^+L$ , descrit inicialment en eritròcits humans per Devés *et al.* (1992). En aquest sentit, molt recentment, el grup de Ganapathy (Augusta, EUA) ha demostrat que el poli(A)<sup>+</sup> RNA d'una línia cel·lular de coriocarcinoma humà expressa activitat de transport  $y^+L$  en oòcits; aquesta expressió és bloquejada per hibridació amb oligonucleòtids *anti-sense* del cDNA de 4F2hc (Fei *et al.*, 1995).

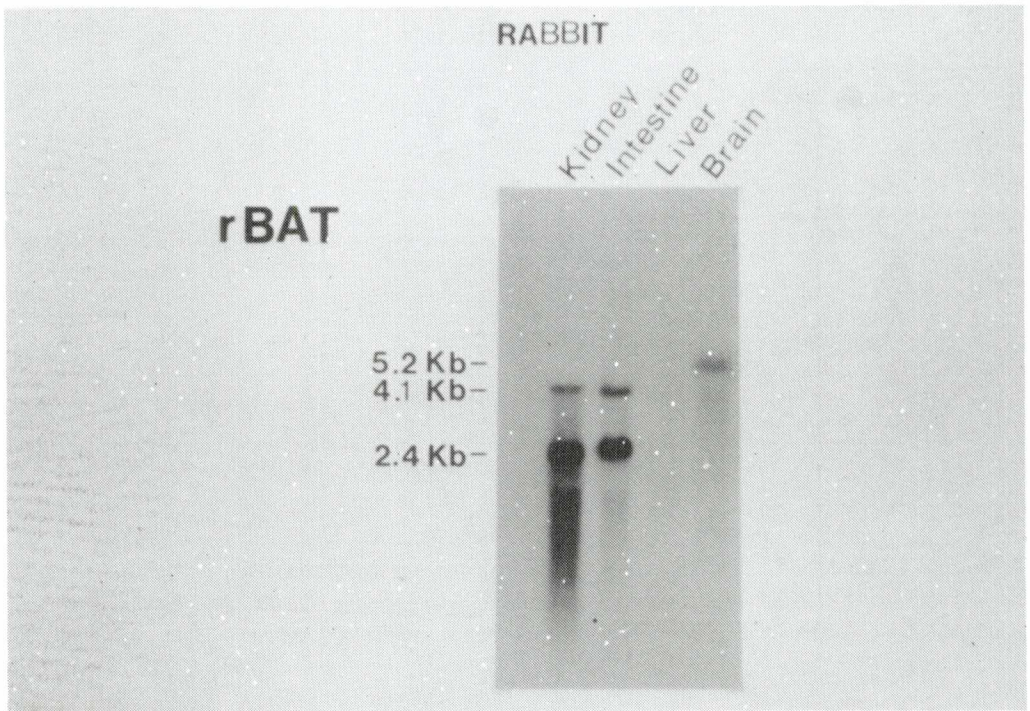


FIGURA 3. Distribució tisular de l'mRNA de rBAT. Utilitzant condicions d'elevada astringència, el cDNA d'rBAT de conill hibrida amb transcrits d'aproximadament 2,4 kb i 4,1 kb presents al ronyó de conill (còrtex i medul·la) i l'intestí prim (principalment al jejú). El cDNA de rBAT també hibrida amb un transcrit de cervell de conill d'aproximadament 5,2 kb. No es troben senyals específiques de rBAT amb RNA de fetge de conill. Aquest *Northern* va ser realitzat per Marc Furriols en el nostre laboratori, seguint els mètodes descrits prèviament (Furriols *et al.*, 1993).



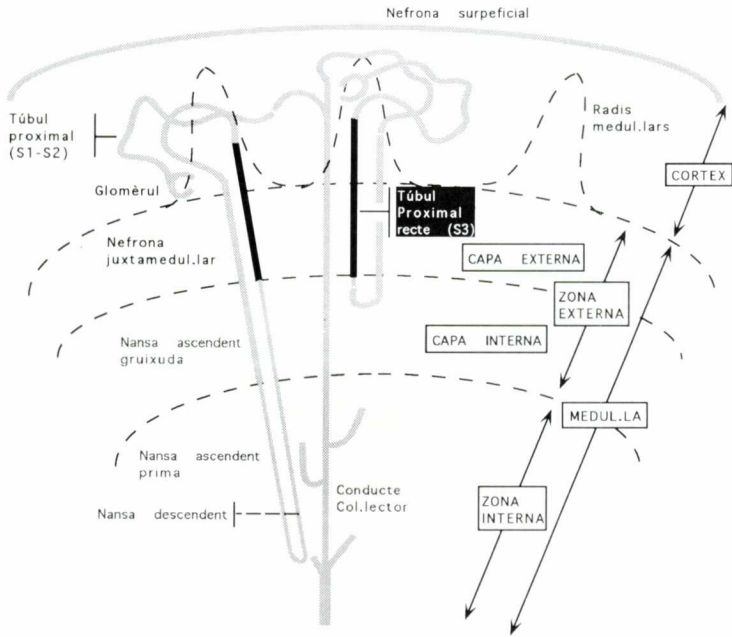


FIGURA 4. Diagrama esquemàtic del ronyó que mostra la localització de la proteïna rBAT en el túbul proximal recte (segment S3) de la nefrona. Estudis d'immunolocalització amb anticossos anti-rBAT (immunofluorescència indirecta i microscòpia electrònica) han demostrat que la proteïna rBAT es localitza en els microvil·li de les cèl·lules epitelials del segment S3 de la nefrona de la ratxa (túbul proximal recte o *pars recta*) (Furriols *et al.*, 1993). Aquests estudis han estat confirmats amb altres anticossos anti-rBAT, i també s'ha mostrat la localització de rBAT als microvil·li de la mucosa de l'intestí prim (Pickel *et al.*, 1993). En total concordança amb aquestes dades, estudis d'hibridació *in situ* han demostrat que el missatger d'rBAT s'expressa a les cèl·lules epitelials dels segments S2 i sobretot S3 de la nefrona (Kanai *et al.*, 1992). En aquest esquema es mostren dues nefrones amb els túbuls proximals rectes corresponents en negreta. En els estudis d'immunofluorescència indirecta la senyal específica de rBAT s'observa sols a la capa externa de la zona externa de la medulla, incloent la zona delimitada en els radis medul·lars. Això és consistent amb l'expressió de rBAT sols al segment S3 de la nefrona. A més a més, les característiques ultraestructurals de les cèl·lules epitelials que expressen rBAT són les corresponents a les del segment S3 de la nefrona (Furriols *et al.*, 1993).

## PAPER DE rBAT EN LA REABSORCIÓ ACTIVA DE CISTINA I AMINOÀCIDS BÀSICS A RONYÓ I INTESTÍ

El missatger de rBAT s'expressa al ronyó i a la mucosa de l'intestí prim (Bertan *et al.*, 1992a,c, 1993; Lee *et al.*, 1993; Wells i Hediger 1992; Yan *et al.*, 1992). D'acord amb aquesta distribució, experiments de depleció per hibridació de RNA renal i intestinal amb

oligonucleòtids *anti-sense* de la seqüència de rBAT bloquegen l'expressió del sistema de transport de tipus  $b^{0,+}$  en oòcits de *Xenopus* (Bertran *et al.*, 1993; Magagnin *et al.*, 1992; Wells i Hediger, 1992). A la figura 3 es mostren dos transcrits de rBAT al ronyó i a l'intestí que representen poliadeninació alternativa del mateix gen (Bertran *et al.*, 1992b; Markovich *et al.*, 1993). Estudis d'hibridació *in situ* i d'immunolocalització han demos-



trat que rBAT es localitza als microvil·li de la mucosa de l'intestí prim i de les cèl·lules epitelials del túbul proximal recte de la nefrona (Kanai *et al.*, 1992; Furriols *et al.*, 1993; Pickel *et al.*, 1993). La figura 4 mostra esquemàticament el túbul proximal recte on s'expressa el gen rBAT i es localitza la proteïna. Teixits cerebrals mostren un transcrit de rBAT més llarg (aproximadament de 5 kb) (Figura 3), que també és present en altres

teixits humans (Bertran *et al.*, 1993; Yan *et al.*, 1992). Estudis de protecció de l'acció de RNAses i estudis immunològics suggereixen que aquest transcrit llarg correspon a l'expressió d'un altre gen homòleg a rBAT (Pickel *et al.*, 1993; Yan *et al.*, 1992).

La presència de la proteïna rBAT en els microvil·li dels epitelis intestinal i renal suggereix que rBAT té un paper en la reabsorció renal i intestinal d'aminoàcids. Però, de qui-

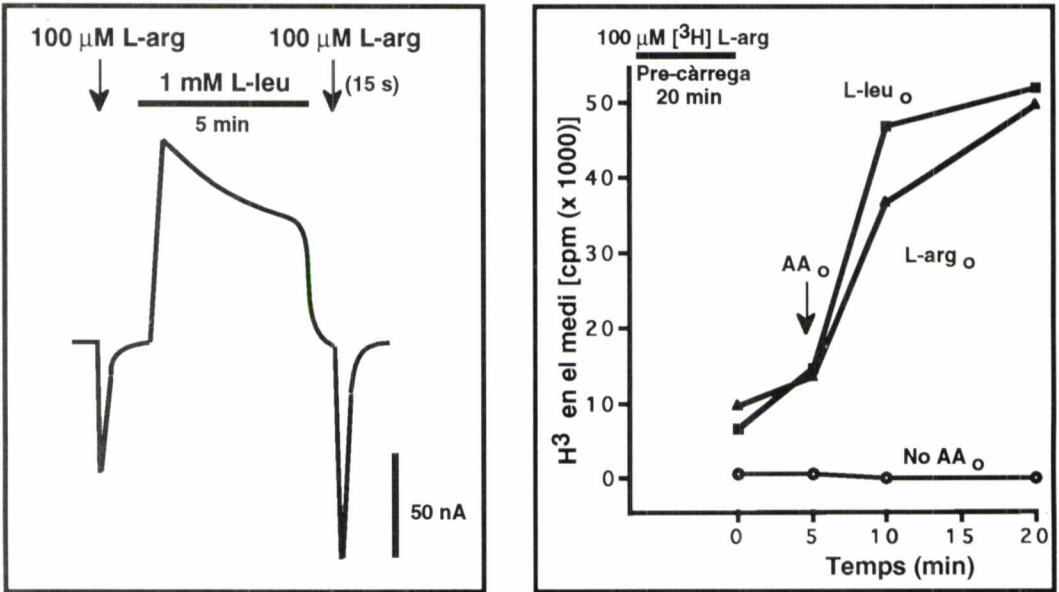


FIGURA 5. El sistema de transport induït per l'RNA de rBAT, en oòcits de *Xenopus*, es comporta com un bescanviador obligatori d'aminoàcids amb especificitat de substrats semblant a la del sistema  $b^{0,+}$ . L'expressió de l'RNA de rBAT (1 ng per oòcit) provoca un corrent d'entrada de càrregues positives en presència d'arginina en el medi (quadre a l'esquerra). Sorprenentment, en presència de leucina (aminoàcid zwitterioníc; neutre a pH 7) el corrent induït és de sentit invers (sortida de càrregues positives de l'oòcit). Resultats representatius obtinguts en un oòcit amb el seu potencial de membrana fixat a  $-40$  mV, tres dies després de la injecció de l'RNA de rBAT de conill. Per tal de confirmar que el moviment d'aminoàcids bàsics, en un mecanisme de bescanvi, a través del transportador rBAT/ $b^{0,+}$  era responsable del corrent induït es van realitzar experiments d'eflux d'aminoàcids en presència de substrats de rBAT en el medi d'incubació dels oòcits (quadre a la dreta). Els oòcits es van injectar amb RNA de rBAT de conill (1 ng per oòcit). Tres dies després, els oòcits s'incubaren en presència de L-[ $^3$ H] arginina (100 μM) durant 20 min. Després d'eliminar el medi radiactiu i de rentar els oòcits, es va mesurar la sortida de triti en el medi (eflux d'arginina; en aquestes condicions més del 95 % del triti correspon a L-[ $^3$ H] arginina). L'eflux d'arginina és dependent de la presència de substrats del transportador associat a rBAT en el medi (en el cas de la figura, bé leucina, bé arginina). En absència de substrats en el medi (No AA) l'eflux d'arginina és mínim (idèntic al que presenten oòcits injectats amb aigua, tant en presència com en absència de substrats en el medi).

na manera un transportador sodi independent com el sistema de tipus  $b^{0+}$  associat a rBAT participa en la reabsorció renal i intestinal d'aminoàcids al pol apical d'aquests epitelis? Quin és, si és que existeix, el seu mecanisme concentratiu d'aminoàcids a través de la membrana plasmàtica? Les respostes a aquestes preguntes han començat a produir-se en dues línies de recerca diferents, per un costat, a través de l'estudi de l'activitat elèctrica del transportador i, per l'altre amb l'estudi de la implicació del gen rBAT en una malaltia hereditària de la reabsorció renal i intestinal de cistina i aminoàcids bàsics: la cistinúria (vegeu més endavant). Andreas Busch, electrofisiòleg de la Universitat de Tübingen, ens va demanar col·laboració per a estudiar una potencial activitat elèctrica del transportador  $b^{0+}$ /rBAT, ja que transporta aminoàcids bàsics per tant, amb càrrega neta positiva a pH neutre. Els resultats inicials van ser altament sorprenents i es mostren a la figura 5. En els oòcits que expressen rBAT (no en els oòcits control) la presència d'arginina en el medi provoca un corrent elèctric de càrregues positives vers l'interior de la cèl·lula; fins aquí res no és sorprenent: la translocació de la mateixa arginina a l'interior cel·lular a través del transportador ocasiona aquest corrent positiu. Però, en exposar els oòcits que expressen rBAT en un medi on es troba l'aminoàcid leucina (zwitteriònic, i per tant amb càrrega neta zero a pH neutre) es produïa un corrent elèctric de càrregues positives de sortida. Ràpidament es va descartar la possibilitat que diferents ions inorgànics ( $K^+$  o  $Cl^-$ ) fossin transportats per rBAT a través de la membrana. Una hipòtesi prenia forma, el transportador  $b^{0+}$ /rBAT bescanviava aminoàcids a través de la membrana plasmàtica de l'oòcit: el corrent positiu de sortida concomitant a la captació de leucina seria degut a la sortida d'aminoàcids bàsics (amb càrrega neta positiva) des de l'interior

de l'oòcit! (Busch *et al.*, 1994). Per comprovar aquesta hipòtesi es va testar si l'eflux d'aminoàcids (sortida d'aminoàcids marcats amb radioisòtops) a oòcits que expressaven rBAT depenia de la presència d'aminoàcids en el medi: la figura 5 mostra clarament que l'eflux d'arginina depèn quasi totalment de la presència d'aminoàcids en el medi. Aquests resultats han estat confirmats posteriorment per altres autors (Coady *et al.*, 1994; Ahmed *et al.*, 1995). Fins hi tot, Mike Coady (Canadà) va tornar a clonar rBAT de ronyó de conill per expressió funcional en oòcits de *Xenopus* seguint l'expressió de corrent elèctric associat a la presència d'arginina (Coady *et al.*, 1994). El transportador  $b^{0+}$ /rBAT és un bescanviador obligatori. Diverses dades addicionals avalen aquesta afirmació (dades de Josep Chillarón i Raúl Estévez; manuscrit en preparació): 1) Només els aminoàcids que actuen com a substrats del sistema  $b^{0+}$ /rBAT provoquen l'eflux (és a dir, participen en el bescanvi). 2) El cicle de transport està limitat per l'aminoàcid més «lent», és a dir, el que posseeix una  $V_{max}$  més baixa. 3) Els valors de  $K_m$  dels substrats, determinats en estudis de captació dels aminoàcids pels oòcits (influx), coincideix amb la concentració de l'aminoàcid necessària per a estimular de manera semi màxima l'eflux d'altres aminoàcids. Totes aquestes característiques són les corresponents a un bescanviador obligatori. Avui, encara falta per esbrinar l'estequiometria del bescanvi i el mecanisme d'acoblament d'aquest (és a dir, tipus ping-pong o concertat).

Un bescanviador obligatori canvia la composició dels substrats a cada banda de la membrana sense canviar-hi les concentracions inicials del conjunt de substrats. És a dir, es pot considerar com un transportador actiu que acumula un substrat en particular i dissipa el gradient preestablert d'un altre substrat; d'això, se'n diu *transport actiu terciari*. Si és així, el transportador  $b^{0+}$ /rBAT,

és capaç d'acumular aminoàcids a l'interior de l'oòcit? La resposta és clarament afirmativa, en oòcits que expressen rBAT, L-cistina, L-arginina i L-leucina (en una concentració de 50  $\mu\text{M}$  en el medi) s'acumulen entre 30 i 50 vegades a l'interior de l'oòcit (això és tenint en compte que l'espai de distribució d'aigua a l'interior de l'oòcit és de 200 nl aproximadament). Aquests nivells d'acumulació són un ordre de magnitud superior al que presenten els oòcits controls, els que no expressen rBAT (dades de Josep Chillarón i Raül Estévez; manuscrit en preparació). La principal força a què s'acobla aquesta acumulació d'aminoàcids és l'alta concentració d'aquests aminoàcids en l'interior de l'oòcit: aproximadament 2.500  $\mu\text{M}$  d'aminoàcids neutres i 750  $\mu\text{M}$  d'aminoàcids bàsics (Taylor

i Smith, 1987). El potencial de membrana (-50 mV) no és capaç de produir aquestes acumulacions: aquest gradient dóna per acumular 6-8 vegades aminoàcids amb càrrega neta positiva (arginina) però no explica l'acumulació de leucina.

Molt recentment, Conxi Mora (manuscrit en preparació) ha demostrat que aquest mateix mecanisme de transport actiu terciari té lloc en una línia cel·lular epitelial procedent del túbul proximal de la sariga, les cèl·lules OK. Aquestes cèl·lules expressen el gen rBAT: estudis de *Northern blot* mostren un transcrit de 2,4 kb, el seu poli(A)<sup>+</sup> RNA induïx el sistema de tipus b<sup>0,+</sup> en oòcits; senyal que es produeix deplecció per hibridació amb oligonucleòtids *anti-sense* de les seqüències de l'rBAT humà, i hem pogut

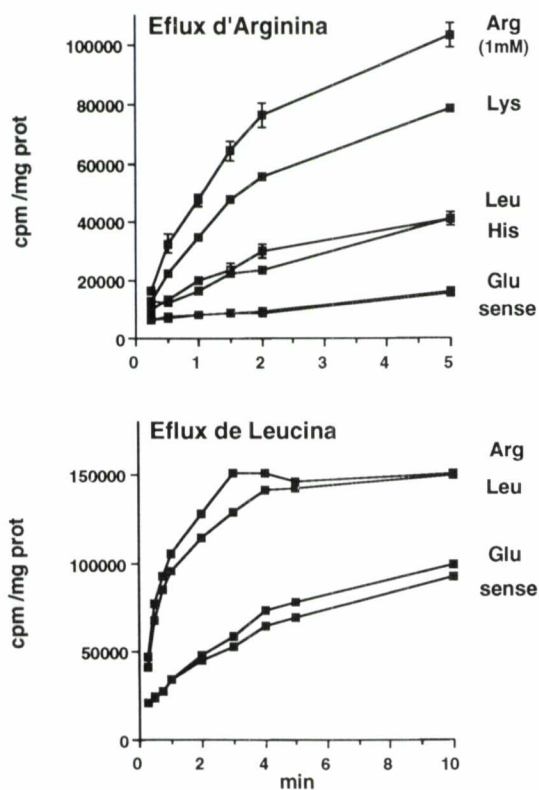


FIGURA 6. Les cèl·lules OK (clon 3B/2), procedents del túbul proximal del ronyó de sariga (*opossum*), presenten transestimulació amb l'especificitat de substrats del sistema de transport d'aminoàcids rBAT/b<sup>0,+</sup>. Les cèl·lules es van preincubar en presència de 50  $\mu\text{M}$  L-[<sup>3</sup>H] arginina o L-[<sup>3</sup>H] leucina durant 2 o 4 minuts, respectivament. El medi es va eliminar i les cèl·lules foren rentades, per mesurar posteriorment l'eflux de l'aminoàcid en presència (1 mM) o absència d'aminoàcids en el medi. Tant l'eflux d'arginina com el de leucina és clarament transestimulat per la presència al medi dels substrats del sistema de transport rBAT/b<sup>0,+</sup> (arginina, lisina, leucina, histidina). En contra la presència d'aminoàcids que no són substrats d'aquest sistema de transport (glutamat) no transestimula l'eflux d'arginina i leucina; la sortida de triti és idèntica a la de les cèl·lules incubades en absència d'aminoàcids. Les dades corresponents a la sortida de triti (corregit per mg de proteïnes totals de les cèl·lules) i són la mitjana  $\pm$  SEM de triplicats d'un experiment representatiu realitzat per Conxi Mora al nostre laboratori (manuscrit en preparació).



amplificar per PCR un fragment de 700 bp amb una homologia d'aproximadament el 70 % amb el cDNA de rBAT de rata, conill o ésser humà). En el pol apical, les cèl·lules OK mostren transport d'arginina, leucina i cistina amb les mateixes característiques que les del sistema  $b^{0,+}/rBAT$ ; de fet, gairebé el 100 % del transport de cistina i el 80 % del transport d'arginina és degut a aquest component de transport. A la figura 6 es mostra la transestimulació de l'eflux d'arginina i de leucina en aquestes cèl·lules en presència dels aminoàcids que són substrat del siste-

ma  $b^{0,+}/rBAT$ ; noteu com l'eflux d'arginina és quasi totalment dependent de la presència en el medi dels substrats del sistema de transport (l'aminoàcid glutamat no és transportat pel sistema  $b^{0,+}/rBAT$ ).

Tenint en compte la localització del transportador  $b^{0,+}/rBAT$  en els microvil·li de les cèl·lules epitelials del túbul proximal recte de la nefrona i el seu mecanisme de transport actiu terciari abans descrit, proposem un model del paper fisiològic del transportador en la reabsorció renal de cistina i aminoàcids bàsics (Figura 7). En aquest model el

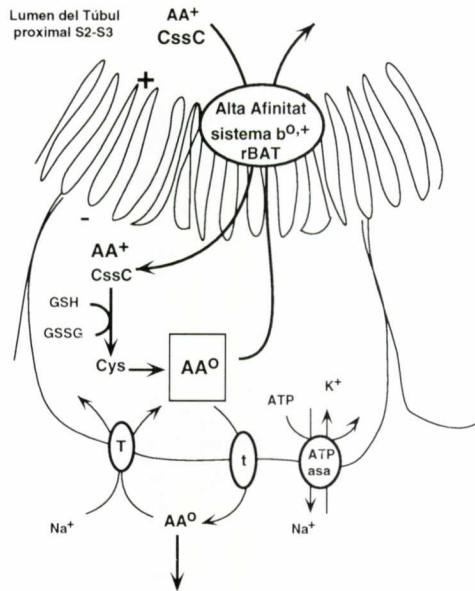


FIGURA 7. Model que proposa el paper del sistema de transport  $rBAT/b^{0,+}$  en la reabsorció d'aminoàcids bàsics i de cistina al ronyó. La proteïna  $rBAT$  formaria part del sistema de reabsorció renal de cistina i aminoàcids bàsics amb alta afinitat que té lloc al segment S3 de la nefrona. Per tant  $rBAT$  seria responsable del 15-20 % de la reabsorció tubular de cistina al ronyó, és d'alta afinitat i té lloc a l'extrem més distal del túbul proximal (Silbernagl, 1988). La concentració d'aminoàcids bàsics i cistina a través de la membrana apical de les cèl·lules tindria lloc per un mecanisme de transport actiu terciari, acoblat a l'elevada concentració d'aminoàcids neutres dintre de la cèl·lula. A més a més, l'entrada d'aminoàcids bàsics i cistina del lumen des del túbul de la nefrona estaria afavorida pel potencial de membrana i per la reducció de cistina dependent de glutatió (GSH), respectivament. Activitats de transport concentratiu d'aminoàcids neutres en el pol apical (sistema de cotransport amb sodi NBB; *Neutral Brush-Border*; no mostrat en l'esquema) i al pol basolateral (sistema ASC; transportadors T en l'esquema), acoblats al gradient electroquímic de sodi establert per l'activitat basolateral  $Na^+/K^+$  ATPasa, serien els responsables de l'alta concentració d'aminoàcids neutres en l'interior de la cèl·lula epitelial. Altres transportadors basolaterals d'aminoàcids, bé bàsics (no mostrats en l'esquema), bé neutres (tipus sistema L; transportadors t en l'esquema), garantirien el flux d'aminoàcids a l'organisme. Aquest model està basat en el mecanisme de transport actiu terciari (bescanviador d'aminoàcids) evidenciat en oòcits de *Xenopus* i cèl·lules OK i en la localització de  $rBAT$  en els microvil·li de les cèl·lules epitelials del segment S3 de la nefrona.

funcionament del transportador  $b^{0,+}$ /rBAT està dirigit vers l'acumulació d'aminoàcids bàsics i cistina i dissipa el gradient de concentració d'aminoàcids neutres a l'interior de la cèl·lula. El potencial de membrana (negatiu a l'interior) i la reducció de la cistina a cisteïna, dependent de glutatió, deuen afavorir aquest tipus de funcionament. La sortida al lumen del túbul renal d'aminoàcids neutres no ha de ser un problema ja que activitats de transport molt actives al pol apical de les cèl·lules epitelials del túbul renal (per exemple, sistema sodi dependent NBB) poden tornar a reabsorbir aquesta aminoàcids. És real aquest model? El fet que mutacions en el gen rBAT provoquin cistinúria, malaltia en que es produeix hiperexcreció de cistina i aminoàcids bàsics, però no neutres, el ratifiquen (vegeu més endavant).

### LES PROTEÏNES rBAT I 4F2HC PODRIEN CONSTITUIR TRANSPORTADORS HETEROMÈRICS

Anteriorment hem mostrat com l'expressió tant de rBAT com de 4F2hc en oòcits resulta en activitats de transport d'aminoàcids concretes. Són, per tant, rBAT i 4F2hc transportadors d'aminoàcids? Si és així, la seva estructura deu sostenir l'activitat catalítica de translocació del substrat a través de la membrana. El paradigma actual sosté que una proteïna transportadora de substrats polars com ara la glucosa, els aminoàcids, d'altres ions, etc., ha de ser: *a*) una proteïna integral de membrana, i per tant glicosilada, amb *b*) hidrofobicitat suficient (generalment amb dotze dominis transmembrana) per formar un porus a la membrana que permeti el pas dels substrats a través d'aquesta.

a) Estudis bioquímics i immunocitoquímics han demostrat que tant rBAT com 4F2hc

són N-glicoproteïnes integrals de membrana. Les proves experimentals per a rBAT són les següents: 1) Traducció *in vitro*. L'addició de microsomes en el sistema de traducció de reticulòcits incrementa la massa del producte proteic sintetitzat a partir de RNA sintètic de rBAT (procedent tant de conill com de rata); aquest increment és sensible al tractament amb endoglicosidasa H (Markovich *et al.*, 1993; Wells i Hediger, 1992). 2) Expressió en oòcits. El principal producte proteic, marcat metabòlicament amb [ $^{35}$ S] metionina, un dia després de la injecció de l'RNA sintètic de rBAT humà en oòcits és una N-glicoproteïna integral de membrana (no se solubilitza amb tractament amb carbonat sòdic com fan les proteïnes associades però no integrals de membrana) de 90 kD aproximadament, el tractament dels oòcits amb tunicamicina (inhibidor de la N-glicosilació) redueix la mida de la proteïna a l'equivalent de 72 kD en gels de poliacrilamida, compatible amb la massa de la proteïna deduïda del seu cDNA (aproximadament Mr 79 x 10<sup>3</sup>) (Bertran *et al.*, 1993). Quan l'expressió de transport en oòcits és màxima (per exemple dia 6 després de la injecció de l'RNA de rBAT humà) es detecten amb anticossos anti-rBAT dues bandes proteiques, una de 90 kD i l'altra de 95 kD; la primera és sensible al tractament amb endoglicosidasa H (no processada a través del complex de Golgi) i la segona no és sensible, demostrant processament a través del complex de Golgi. Aquest producte proteic es troba fonamentalment (> 90 %) a la membrana plasmàtica de l'oòcit (evidenciat per marcatge amb biotina lligada a un reactiu de lisina no permeable a la membrana) (experiment realitzats per Josep Chillarón; manuscrit en preparació). 3) Estudis amb la proteïna nativa. En estudis de *Western blot* la proteïna rBAT glicosilada té una mobilitat en gels d'acrilamida de 90-95 kD aproximadament en preparacions de membrana de *brush border* de ronyó (Furriols

*et al.*, 1993; Mosckovitz *et al.*, 1993). Estudis d'immunodetecció al microscopi electrònic han mostrat que rBAT es localitza en els microvil·li del túbul proximal recte de la nefrona (Furriols *et al.*, 1993; Pickel *et al.*, 1993).

b) El principal argument contra la hipòtesi que rBAT i 4F2hc siguin les proteïnes transportadores dels sistemes  $b^{0,+}$  i  $y^+L$ , respectivament, radica en la prognosi de la seva estructura tridimensional. Els gràfics d'hidrofobicitat d'aquestes proteïnes proposen un únic domini amb hidrofobicitat i helicoïtat (prognosi d'estructura secun-

dària en hèlix  $\alpha$ ) suficient per a ser un segment transmembrana (vegeu el peu de la figura 1). Per raó de la manca de pèptid líder i que els llocs *consensus* d'N-glicosilació es troben vers l'extrem C-terminal de la posició del potencial domini transmembrana, es va proposar que rBAT i 4F2hc eren glicoproteïnes de membrana de tipus II (extrem N-terminal citoplasmàtic i C-terminal extracel·lular). El grup d'Udenfriend, ara sota la direcció de Tate, ha proposat l'existència de quatre dominis transmembrana, el mencionat anteriorment més tres de naturalesa amfipàtica (Figura 8). Això es basa en estu-

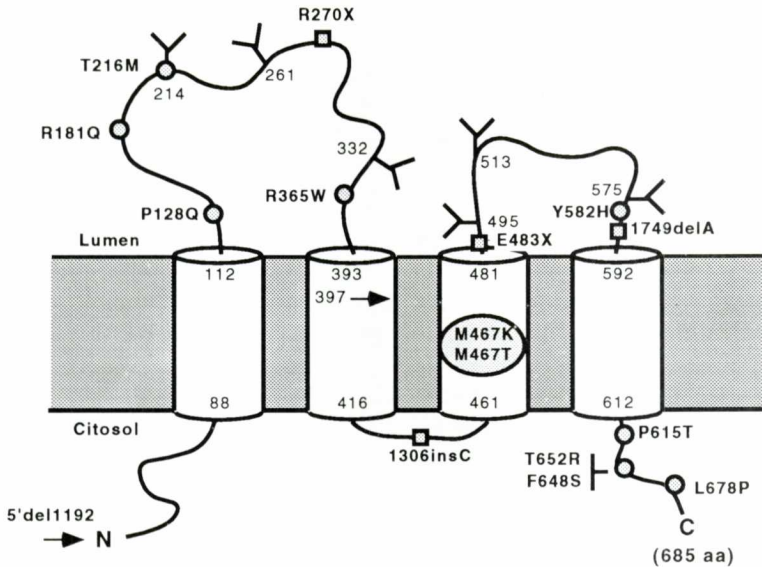


FIGURA 8. Model de la proteïna rBAT amb quatre dominis transmembrana. S. Tate *et al.*, proposen l'existència de quatre dominis transmembrana, amb tres d'aquests de naturalesa amfipàtica; això es basa en estudis de proteclisi limitada i d'utilització de diferents anticossos anti-rBAT en cèl·lules permeabilitzades (Mosckovitz *et al.*, 1994). Damunt d'aquest model de la proteïna rBAT estan representades les mutacions específiques de cistinúria trobades fins ara. Les mutacions de substitució d'un residu d'aminoàcid estan senyalades amb punts, les de codó de parada per quadrats, i les delecions i una inserció per les abreviatures *del* i *ins*. Les fletxes mostren la part de la pauta de lectura de la proteïna afectada per la deleción 5'del1192. La deleción 3'del, que afecta de l'exó 5 o 6 fins a l'últim exó, no hi és representada, ja que encara no se'n coneixen de forma precisa els seus límits. Les mutacions M467T i M467K es troben en el tercer domini transmembrana proposat pel grup de Tate. La resta de mutacions estan distribuïdes al llarg de tota la proteïna. La mutació T216M elimina el primer lloc potencial de N-glicosilació. Els nombres indiquen el primer i l'últim residu d'aminoàcid en els potencials dominis transmembrana, i les posicions potencials de glicosilació (Y). Catorze de les mutacions assenyalades aquí han estat publicades (Calonge *et al.*, 1994; Pras *et al.*, 1995; Gasparini *et al.*, 1995). Les mutacions T216M i E483X han estat descrites recentment per G. Bisceglia i Paolo Gasparini, dintre del nostre consorci d'estudi de la cistinúria; encara es troben en estudi i estan pendents de publicació.



dis de proteòlisi limitada i amb l'ús d'anticossos anti-rBAT dirigits contra diferents pèptids al llarg de la seqüència de rBAT (Mosckovitz *et al.*, 1994). Aquests resultats, molt interessants, esperen confirmació per a rBAT i la realització d'estudis similars per a la proteïna 4F2hc. En qualsevol cas ni un ni quatre segments transmembrana semblen suficients per formar un porus a la membrana per catalitzar el pas dels aminoàcids.

Una possibilitat seria que tant rBAT com 4F2hc fossin components de sistemes de transport d'aminoàcids heteromèrics (Bertran *et al.*, 1992b, c; Wells *et al.*, 1992): rBAT podria «activar» transportadors de tipus  $b^{0,+}$  silenciosos en l'òcít de *Xenopus*, mentre que 4F2hc podria «activar» transportadors de tipus  $y^+L$  parcialment inactius en l'òcít. Un possible mecanisme per a aquesta «activació» fóra la constitució d'holotransportadors amb subunitats presents en l'òcits de *Xenopus*. Aquest hipotètic mecanisme seria similar al demostrat per l'activació de subunitats  $\alpha$  catalítiques de la  $Na^+/K^+$  ATPasa de l'òcít després de l'expressió de l'RNA sintètic de subunitats  $\beta$  de la  $Na^+/K^+$  ATPasa, una N-glicoproteïna de membrana de tipus II (Geering *et al.*, 1989). En aquest sentit és molt interessant el fet que l'antigen de superfície cel·lular 4F2 és un heterodímer (aproximadament 125 kD) compost per una cadena pesada de 85 kD (4F2hc, és a dir, la proteïna homòloga a rBAT) i un altra de lleugera de 40 kD covalentment unides per ponts disulfur (Haynes *et al.*, 1981; Hemler i Strominger, 1982). Desafortunadament aquesta cadena lleugera, evidenciada per marcatge amb  $^{125}I$ ode i posterior immunoprecipitació amb anticossos anti-4F2hc, no ha estat clonada o microseqüenciada. De manera molt similar, en condicions no reductores, rBAT es revela, en estudis de *Western blot*, en preparacions de *brush border* de ronyó en complexos de mobilitats d'aproximadament 240 kD i de

125 kD; en gels de dues dimensions (primer en condicions no reductores, seguit de condicions reductores) els complexos donen lloc a una única banda corresponent a la proteïna glicosilada aïllada de 90-95 kD (estudis realitzats per Josep Chillarón; manuscrit en preparació; Palacín, 1994). Això suggereix que rBAT, igual que 4F2hc, forma una estructura herodimèrica (125 kD) unida per ponts disulfur amb una potencial subunitat lleugera de 40 kD, aproximadament. El complex de 240 kD podria ser una estructura heterotetramèrica a partir del complex de 125 kD. El grup de Tate també postula l'existència d'una subunitat de 50 kD aproximadament (Tate, 1995). Si la hipòtesi dels holotransportadors pel que fa a rBAT i 4F2 es confirmen, l'estructura dels transportadors de tipus  $b^{0,+}$  i  $y^+L$  seria heteromèrica, un fet encara no descrit pels transportadors de substrats orgànics en mamífers. El coneixement de la relació estructura-funció per als transportadors rBAT i 4F2hc requereix l'aïllament i la clonació de la subunitat lleugera de 4F2hc i de la potencial subunitat lleugera de rBAT.

## IDENTIFICACIÓ DE rBAT COM A GEN DE LA CISTINÚRIA

La cistinúria és una malaltia autosòmica recessiva, amb una incidència mitjana d'una entre 7.000 persones. Es caracteritza per una hiperexcreció urinària de cistina i aminoàcids bàsics (Levy, 1973; McKusick, 1990; Segal i Thier, 1989). Com que la cistina té una baixa solubilitat, precipita, formant càlculs en el tracte urinari que en provoquen l'obstrucció, i la infecció d'aquest, i finalment la insuficiència renal (Segal i Thier, 1989). S'han descrit tres tipus de cistinúria clàssica (Rosenberg *et al.*, 1966a): el tipus I en què els heterozigots tenen aminoacidúria normal, i els tipus II i III en què els heterozigots pre-

senten hiperexcreció de cistina i aminoàcids bàsics, principalment de lisina. A diferència dels tipus I i II els homozigots de tipus III mostren un increment dels nivells plasmàtics de cistina després de l'administració oral d'aquesta que és gairebé normal; això suggereix una manca de defecte intestinal en aquests pacients. La hiperexcreció urinària de cistina i l'increment de cistina plasmàtica després de la seva càrrega oral en pacients amb cistinúria dels tres tipus es mostren esquemàticament a la figura. 9. Estudis de tipus genètic van servir per postular que

aquests diferents tipus de cistinúria clàssica eren deguts a al·lelisme d'un mateix gen (Rosenberg *et al.*, 1966b).

En algunes hipòtesis s'afirma que la cistinúria és el resultat d'un defecte en el transport d'alta afinitat de cistina, compartit amb aminoàcids bàsics, a través de les cèl·lules epitelials del túbul renal i el tracte intestinal (Rosenberg *et al.*, 1965). Malauradament, encara no s'entén completament la reabsorció renal de la cistina. Així, el transport d'aquesta determinat amb vesícules de vora del raspall del jejú sembla que és

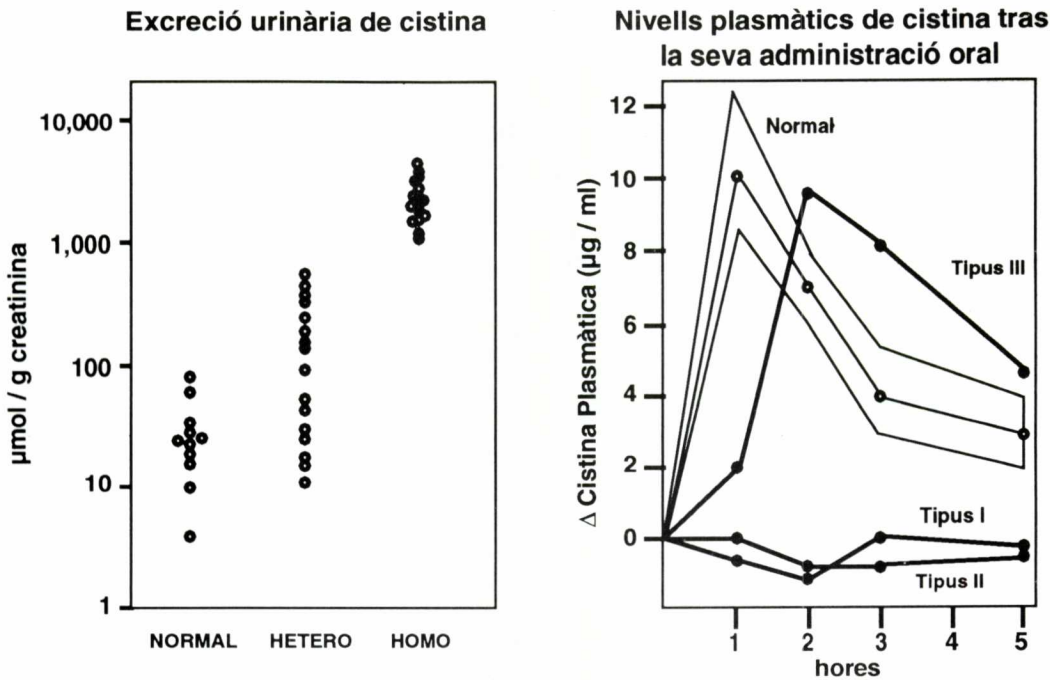


FIGURA 9. Defectes renal i intestinal de la reabsorció de cistina en pacients amb cistinúria clàssica. Excreció urinària de cistina (quadre a la esquerra) expressada en  $\mu\text{mol/g}$  de creatinina excretada en homozigots (HOMO) i heterozigots obligats (HETERO) de cistinúria clàssica, així com en persones sense relació amb la cistinúria (NORMAL). Els homozigots mostren un rang d'excreció de cistina superior a la població no afectada de cistinúria. Els heterozigots obligats (portadors) mostren un rang d'excreció des de valors normals fins a valors propers als dels homozigots. Els portadors amb excreció normal de cistina (també d'aminoàcids bàsics; no es mostra en la figura) corresponen al tipus I de cistinúria, mentre que els de rang més superior corresponen al tipus II; el portadors de tipus III presenten un rang intermedi, entre els de tipus I i els de tipus II. Increment en el plasma de la concentració de cistina després de la seva administració oral (quadre a la dreta). Es presenten dades obtingudes en persones no relacionades amb la cistinúria (NORMAL; mitjana i rang amb el 95 % de confiança), i en un experiment representatiu amb homozigots de cistinúria clàssica de tipus I, II i III. Noteu que només s'aprecia increment de la cistina plasmàtica en la població normal i en l'homozigot de tipus III representat; no en canvi en els homozigots de tipus I i II. Les dades presentades han estat adaptades de les publicades per Crawhall *et al.*, 1969 (quadre a la esquerra) i de Rosenberg *et al.*, 1966 (quadre a la dreta).



majoritàriament independent de sodi (Foreman *et al.*, 1980; McNamara *et al.*, 1981, 1992). A manca d'altre mecanisme concentratiu de cistina i aminoàcids bàsics, la cistina s'acumularia pel fet de la seva reducció intracel·lular cap a cisteïna, i els aminoàcids bàsics pel potencial de membrana amb l'interior cel·lular negatiu; sistemes de transport basolaterals deurien aleshores catalitzar la sortida d'aquests aminoàcids (Silbernagl, 1988). El grup de Segal, a Filadèlfia, postula l'existència de dos transportadors de cistina en el túbul renal: un sistema d'alta afinitat ( $K_m$  en el rang  $\mu$ ) compartit amb aminoàcids bàsics, i un altre de baixa afinitat (no se'n pot estudiar la saturació a causa de la baixa solubilitat de la cistina; al voltant de 450  $\mu$ M) que sembla que no és compartit amb aminoàcids bàsics (McNamara *et al.*, 1981; Segal *et al.*, 1977). És interessant assenyalar que diversos autors han trobat inhibició del transport d'alta afinitat de cistina per aminoàcids neutres (Foreman *et al.*, 1980; Schafer i Watkins; Furlong i Posen, 1990). Contràriament a les preparacions de membranes renals, el transport de cistina a vesícules de vora del raspall del jejú està mitjançat pel sistema d'alta afinitat, compartit amb aminoàcids bàsics, i no hi és present el de baixa afinitat (Ozegovic *et al.*, 1982). Aquest sistema d'alta afinitat, present al ronyó i a l'intestí, es va demostrar ser defectiu en pacients amb cistinúria clàssica (Coicadan *et al.*, 1980; Thier *et al.*, 1964). Estudis de microperfusió indiquen que aquest sistema d'alta afinitat està localitzat en el túbul proximal recte, mentre que el transport de cistina de baixa afinitat seria present en el túbul proximal contornejat (Schafer i Watkins, 1984).

L'expressió específica de rBAT als microvilli del segment S3 (túbul proximal recte) de la nefrona i a la mucosa de l'intestí prim, i les característiques del transport induït per a rBAT als oòcits, suggerien que el sistema

rBAT/b<sup>o+</sup> seria un sistema de reabsorció activa (transport actiu terciari) d'alta afinitat de cistina i aminoàcids bàsics. Tot això va fer pensar que rBAT era un bon candidat com a gen de la cistinúria.

Per estudiar aquesta hipòtesi vam buscar mutacions en el gen rBAT en pacients amb cistinúria. Inicialment no coneixíem l'estructura genòmica del gen i només podíem estudiar el seu RNA missatger. En aquest context la principal dificultat era obtenir mostres (biòpsies) renals o intestinals dels pacients. Per resoldre aquest problema vam aprofitar el fenomen de la transcripció il·legítima: qualsevol gen s'expressa a qualsevol teixit, però amb un nombre de còpies molt baix (Chelly *et al.*, 1989). Així, en col·laboració amb el grup de Paolo Gasparini de l'hospital Solievo de la Soferenza (San Giovanni Rotondo, Itàlia) es van desenvolupar línies cel·lulars limfoblàstiques a partir de la sang de pacients. Llavors, amb l'ajut de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) i del coneixement del missatger humà de rBAT (Bertran *et al.*, 1993) es va amplificar el missatger de rBAT. Aquest cDNA va ser analitzat per a trobar-hi mutacions fent servir la tècnica de l'anàlisi de polimorfismes de conformació de cadenes senzilles (SSCP); aquesta tècnica detecta canvis de mobilitat (migració electroforètica) del DNA que són deguts a alteracions de la seva seqüència; posteriorment les bandes anòmales se seqüencien. Així es van trobar sis mutacions que provocaven un canvi de residu aminoacídic, i que segregaven amb el fenotip de cistinúria (Calonge *et al.*, 1994). L'anàlisi funcional d'una d'aquestes mutacions (M467T) va mostrar la pèrdua d'activitat de l'RNA mutat de rBAT per induir activitat de transport d'aminoàcids tipus b<sup>o+</sup> a oòcits (vegeu més endavant). Això va demostrar que mutacions en el gen rBAT causen cistinúria (Calonge *et al.*, 1994). Posteriorment hem arribat a conèixer l'estructura genòmica del



gen (les unions exó-intró, treball realitzat per Jesús Purroy i M. Julia Calonge al nostre laboratori en col·laboració amb el grup de Paolo Gasparini; manuscrit en preparació). Això ens permet d'esbrinar els canvis de seqüència en els fragments de DNA amplificats per PCR directament de la sang dels pacients. Amb una tècnica molt semblant RNA-SSCP (s'analitza la mobilitat de cadenes sintètiques d'RNA del gen) hem trobat set mutacions més, que inclouen delecions, insercions, codons de parada de traducció i substitucions de residu (quatre d'aquestes mutacions són descrites en Gasparini *et al.*, 1995). Aquestes dades han estat plenament confirmades per un grup nord-americà que en analitzar una població de pacients del Pròxim Orient i d'Europa de l'Est, principalment d'origen jueu, ha trobat quatre mutacions en gen rBAT (un codó de parada, dues delecions i una substitució de residu) que segreguen amb el fenotip de cistinúria (Pras *et al.*, 1995). Fins ara, les mutacions més freqüents en les poblacions italiana i espanyola i en les d'origen jueu són les mutacions M467T (el residu metionina en la posició 467 és substituït per treonina) i R270X (el codó del residu arginina en posició 270 és substituït per un codó de parada de traducció i elimina quasi dues terceres parts de la proteïna cap a la part C-terminal). Aquestes mutacions s'han trobat en homozigosi en diversos pacients, així com en heterozigosi amb altres mutacions. Les mutacions fins ara descrites es mostren a la figura 10; mentre que la seva localització a la proteïna és esquemàticament representada a la figura 8.

L'anàlisi funcional de la mutació M467T, una de les més freqüents trobades fins ara, ha revelat que es tracta d'un mutant defectiu per la seva manca de processament cel·lular cap a la membrana plasmàtica. A diferència de la proteïna normal, el mutant M467T forma un únic producte proteic en l'òcit que és sensible a la digestió amb

endoglucosidasa H i demostra que les N-glicosilacions de la proteïna no han estat processades al complex de Golgi. Això fa que l'arribada d'aquest a la membrana plasmàtica sigui molt lenta en l'òcit: la proteïna normal es localitza aproximadament en un 90 % a la membrana plasmàtica, mentre que per al mutant M467T és a l'inrevés; menys del 10 % és present a la membrana plasmàtica. Això s'ha pogut esbrinar fent estudis de marcatge amb biotina de la proteïna rBAT a la superfície cel·lular dels òcits. És important assenyalar que la proteïna M467T que arriba fins a la membrana és totalment funcional (Josep Chillarón i Raúl Estévez; manuscrit en preparació). Actualment s'està estudiant el mutant M467K (el mateix residu canvia a lisina; es tracta també d'una mutació específica de cistinúria, vegeu la figura 8). Els estudis preliminars suggereixen un comportament similar al de la M467T, però amb una proteïna que podria a més a més no ser totalment funcional una vegada és present a la membrana plasmàtica. En el futur, estudis realitzats amb cèl·lules dels pacients amb la mutació M467T en homozigosi hauran de ratificar el defecte de processament en la membrana plasmàtica abans esmentat.

Per tant, i resumint el que hem dit fins ara, les mutacions en el gen rBAT causen cistinúria. Això demostra que el sistema de transport rBAT/b<sup>0+</sup> participa en la reabsorció de cistina i aminoàcids bàsics, probablement amb un mecanisme de transport actiu terciari com es proposa a la figura 7. Per raó de la localització de rBAT en les cèl·lules epitelials del segment S3 de la nefrona, també es demostra que el sistema de reabsorció de cistina d'alta afinitat i baixa capacitat (en aquest segment del túbul proximal es dona només un 15-20 % de tota la reabsorció tubular de cistina) és manifestament important per a l'eficient reabsorció de cistina i aminoàcids bàsics en el ronyó.

FIGURA 10. Mutacions específiques de cistinúria descrites al gen rBAT. Es mostren les mutacions en el gen rBAT, l'exó implicat en el gen dels deu que conté, així com els cromosomes on s'han descrit (nombre de cromosomes independents i origen poblacional d'aquests). Fins ara s'han descobert disset mutacions en el gen rBAT que segreguen amb el fenotip de la cistinúria clàssica: onze mutacions de substitució de residu d'aminoàcid, sempre en residus ben conservats entre les seqüències conegudes de rBAT humana, de conill i de rata; dos mutacions de codó de parada; i quatre delecions o insercions. Amb la nomenclatura utilitzada, les mutacions per substitució estan representades per l'aminoàcid substituït, la posició del residu substituït, i el nou aminoàcid. Les mutacions de codó de parada es designen mitjançant l'aminoàcid substituït, la posició del residu substituït i la lletra X. Les delecions descrites afecten les primeres 1192 bases de la pauta de lectura oberta del gen rBAT (5'*del* 1192), de l'exó 5 o 6 fins al 10 i últim (3'*del*), o l'A en posició 1749 (1749*del* A) que provoca un canvi de pauta de lectura. El signe d'interrogació assenyalava que els límits d'aquestes delecions no són encara coneguts. S'ha descrit una única inserció d'una C després de la posició 1306 (1306*ins* C) que provoca un canvi de pauta de lectura amb l'aparició d'un nou codó de parada. Cinc mutacions han estat observades en més d'un cromosoma independent: M467T, R270X, P128Q, E483X i T216M. La major part d'aquestes mutacions han estat descrites en Calonge *et al.*, 1994 i Gasparini *et al.*, 1995 per les mutacions d'origen italià i espanyol, i en Pras *et al.*, 1995 per les d'origen jueu, drus i de l'est d'Europa. Les mutacions T216M i E483X han estat descobertes molt recentment en el laboratori del Dr. Gasparini, dintre del nostre consorci per a l'estudi de la cistinúria, i la seva publicació està actualment en preparació.

## Mutacions específiques de cistinúria del gen rBAT

mutació	exó	cromosomes independents	
		nombre	origen
<u>substitució</u>			
P128Q	1	4	2 jueus perses 2 jueus yemenites
R181Q	2	1	italià
T216M	2	2	italià
R365W	6	1	italià
M467K	8	1	italià
M467T	8	12	6 italians, 6 espanyols
Y582H	9	1	italià
P615T	10	1	italià
F648S	10	1	italià
T652R	10	1	italià
L678O	10	1	italià
<u>codó d'aturada</u>			
R270X	4	11	2 drusos, 1 italià, 8 jueus ashkenazis
E483X	8	2	italians
<u>delecions i insercions</u>			
1749 <i>del</i> A	10	1	italià
5' <i>del</i> 1192?	1 al 6	1	europèu de l'est
1306 <i>ins</i> C	7	1	europèu de l'est
3' <i>del</i> ?	5/6 al 10	1	italià

## HETEROGENEÏTAT GENÈTICA DE LA CISTINÚRIA

Com acabem de veure el gen rBAT és responsable de la cistinúria clàssica. La següent pregunta és si rBAT és l'únic gen responsable de la malaltia. Dit d'una altra manera, és la cistinúria una malaltia homogenia des del punt de vista genètic? Si es vol, és rBAT responsable dels tres tipus de cistinúria? Dues dades, una clínica i l'altra fisiològica suggereixen heterogeneïtat en la cistinúria clàssica: 1) Els estudis de càrrega oral de cistina poden ser indicatius que els cistinúrics de tipus III no manifesten defecte intestinal (Figura 9). 2) El 80-85 % de la reabsorció renal de cistina i aminoàcids bàsics es dona als segments S1-S2, i no al S3 on es localitza la proteïna rBAT. És a dir, altres transportadors de cistina, expressats als segments S1-S2 i no presents a l'intestí també podrien ser gens de cistinúria.

Ràpidament vam tenir una indicació d'heterogeneïtat. Les mutacions en el gen rBAT es trobaven només en els malalts de cistinúria de tipus I. Les dades a la figura 11 mostren, que quan teníem accés al 70 % de la regió codificant del gen rBAT a partir de DNA genòmic extret de sang dels malalts, totes les mutacions descrites pel nostre consorci hispano-italià, estaven associades a la cistinúria de tipus I en els casos en què s'havia pogut establir el fenotip dels pares (Gasparini *et al.*, 1995). Aleshores podíem explicar amb les mutacions descobertes en rBAT fins al 50 % dels cromosomes de tipus I en malalts de tipus I/I (és a dir, quan tant el pare com la mare del pacient són portadors del tipus I) i el 33 % dels cromosomes de tipus I en els pacients de tipus I/III (és a dir, pacients que són heterozigots compostos entre els dos tipus). De la mateixa manera no trobem mutacions en els cistinúrics de tipus II. Aquestes dades estan sent confirmades

FIGURA 11. Distribució de les mutacions del gen rBAT segons el tipus de cistinúria. En un estudi recent (Gasparini *et al.*, 1995), famílies amb cistinúria d'origen espanyol i italià, es van classificar d'acord amb la classificació de Rosenberg (tipus I, II i III) segons l'excreció de cistina i d'aminoàcids bàsics en l'orina dels portadors obligatoris. D'un total de 51 pacients amb cistinúria, 8 van ser classificats com de tipus I/I i 8 de tipus III/III, mentre que 9 foren classificats com heterozigots compostos de tipus I/III. A més a més, 6 pacients presenten cistinúria de tipus II, bé en homozigosi o bé com heterozigots compostos amb el tipus III. La cistinúria de vint pacients perquè no se'n van poder estudiar els pares. Després d'anализar el 70 % de la pauta de lectura del gen rBAT només es van trobar mutacions en els malalts de tipus I/I i de tipus I/III, sempre en la línia de transmissió hereditària del tipus I. En canvi no s'han trobat mutacions en els pacients de tipus III/III, II/II o II/III. Aquestes dades suggereixen fortament l'existència d'heterogeneïtat genètica en la cistinúria clàssica: rBAT seria responsable només del tipus I, i no del tipus II i III.

Distribució de les mutacions del gen rBAT entre els tipus de cistinúria

tipus	I/I	I/III	III/III	altres (II/II o II/III)	no definitos	total
PACIENTS	8	9	8	6	20	51
		I III				
<u>CROMOSOMES</u>						
POSITIUS	8	3 0	0	0	6	17
NEGATIUS	8	6 9	16	12	34	85
% DE POSITIUS	50	33 0	0	0	15	17



amb noves mutacions i amb l'estudi de tota la regió codificant del gen rBAT: actualment amb les mutacions descrites, podem explicar gairebé el 75 % de la cistinúria de tipus I en la nostra població.

La forma més ràpida de demostrar heterogeneïtat en la cistinúria i de confirmar que rBAT és responsable només del tipus I era amb estudis de lligament genètic. Per a dur a terme aquests estudis era quasi necessari localitzar el gen rBAT en el seu cromosoma.

Inicialment amb l'ús d'híbrids somàtics el gen es va localitzar en el braç curt del cromosoma 2 humà (2pter-2p12) (Lee *et al.*, 1993; Calonge *et al.*, 1994). De manera independent es va trobar lligament entre un marcador del braç curt del cromosoma 2 (microsatèl·lit D2S119) i la cistinúria (Pras *et al.*, 1994). Per saber si aquest *locus* era al mateix que el de rBAT, vam garbellar una genoteca de mega YAC (*Yeast Artificial Chromosomes*) de DNA genòmic humà cedi-

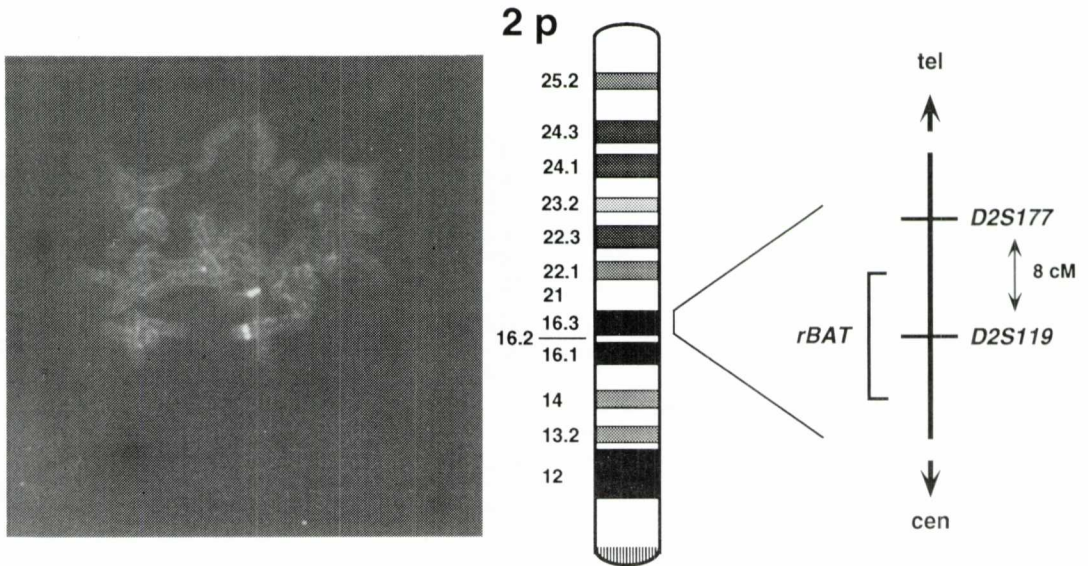


FIGURA 12. Localització cromosòmica del gen rBAT humà. Senyal fluorescent obtingut per hibridació *in situ* (FISH) amb seqüències de DNA humà amplificades per PCR (utilitzant seqüències Alu humanes) a partir d'un cromosoma artificial de llevat (YAC) que conté el gen rBAT. El senyal és específic i es localitza al braç curt del cromosoma 2 (quadre superior). Amb aquest tipus de tecnologia s'ha localitzat el gen rBAT a la banda G 2p16.3 (vegeu quadre inferior) (Calonge *et al.*, 1995a). Mapa genètic regional del *locus* de cistinúria rBAT amb representació esquemàtica del braç curt del cromosoma 2 humà (quadre inferior). Estudis de lligament genètic (Calonge *et al.*, 1995b) entre el fenotip de cistinúria, marcadors del braç curt del cromosoma 2 (microsatèl·lits) i marcadors intragènics del gen rBAT (mutacions i polimorfismes) han demostrat el lligament homogeni de la cistinúria de tipus I al *locus* rBAT, situat en posició telomèrica respecte al microsatèl·lit D2S177 i molt a prop del microsatèl·lit D2S119 (el gen rBAT se situa a 4,8 cM a cada costat del microsatèl·lit amb un interval de confiança del 95 %); la manca de recombinants entre cistinúria de tipus I i el gen rBAT amb el marcador D2S119 no fa possible decidir si el *locus* de cistinúria rBAT se situa centromèric o telomèric respecte d'aquest microsatèl·lit. En aquest estudi la distància gènica entre els microsatèl·lits D2S177 i D2S119 és d'aproximadament 8 cM. La localització física del gen rBAT i els dos microsatèl·lits per estudis de FISH situa els tres marcadors de forma indistingible sobre la banda 2p16.3 (Calonge *et al.*, 1995a).

da per D. Le Paslier del CEPH (França). Es va obtenir un YAC que contenia tots els exons de rBAT. Del seu DNA se'n van amplificar seqüències humanes (Alu-PCR) que es van utilitzar per a localitzar per hibridació *in situ* (FISH) en cromosomes humans en metafase (Figura 12). Tant el gen rBAT com el marcador D2S119 i un altre de molt proper (D2S177) es van localitzar a la banda G 2p16.3 en el braç curt del cromosoma 2 (Calonge *et al.*, 1995a). Altres autors han localitzat el gen rBAT també en aquesta regió però a la banda G contigua 2p21 (Yan *et al.*, 1994). Això va demostrar que el *locus* de rBAT i el descrit pel grup de Pras (Bethesda, EUA) era el mateix. A la vegada aquests estudis ens proveïen d'eines per a fer estudis de lligament genètic. En un estudi amb vint-i-dues famílies amb cistinúria tant de tipus I com

de tipus III, utilitzant la segregació al·lèlica dels microsatèl·lits D2S119 i D2S177, així com marcadors intragènics de rBAT (mutacions i polimorfismes) hem pogut demostrar que el gen rBAT només és responsable del tipus I, de manera homogènia, però en canvi no ho és del tipus III (Calonge *et al.*, 1995b). A la figura 12 es mostra el mapa genètic de la regió cromosòmica del *locus* de cistinúria tipus I (gen rBAT). A la figura 13 es mostra un exemple de manca de segregació entre el *locus* rBAT i la cistinúria de tipus III en una família amb malalts de tipus III/III. Amb anàlisis com aquests utilitzant famílies de tipus II (el tipus menys freqüent) ara també sabem que la cistinúria de tipus II no és deguda al gen rBAT. En conclusió totes aquestes dades, en contra de la visió més estesa (McKusick, 1990), han demostrat con-

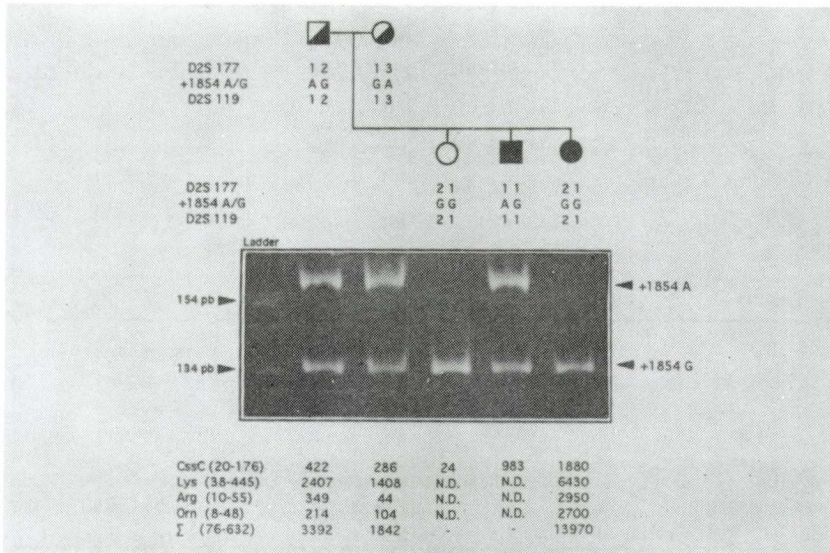


FIGURA 13. Família amb cistinúria de tipus III/III sense lligament genètic amb el *locus* rBAT de cistinúria. Es mostra el caràcter d'una família inclosa en un estudi més ampli on s'ha demostrat que la cistinúria de tipus III no està lligada genèticament amb el *locus* rBAT de cistinúria (Calonge *et al.*, 1995b). Els símbols omplerts i a mig omplir respresenten els pacients amb cistinúria i els portadors, respectivament. Els dos portadors són formadors de càlculs. Els haplotips pel microsatèl·lit D2S177, un polimorfisme al gen rBAT i pel microsatèl·lit D2S119 es mostren sota els símbols. El gel mostra la manca de segregació entre els dos al·lèls del gen rBAT pel polimorfisme (A/G) en el nucleòtid 1854 i la cistinúria. A la part inferior de la figura es mostren els valors d'excreció urinària ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  creatinina), dels membres d'aquesta família, per cistina (CssC), arginina (Arg), lisina (Lys), ornitina (Orn), així com per la suma de l'excreció de cistina i aminoàcids bàsics. El rang de valors normals en la població (o de portadors silenciosos) d'excreció urinària d'aquests aminoàcids es mostren entre claudàtors.



vincentment que la cistinúria és una malaltia hereditària amb heterogeneïtat genètica; només el tipus I de cistinúria és degut a rBAT, mentre que no és aquest el cas per als tipus II i III.

## GENS CANDIDATS DE CISTINÚRIA. FUTURES PERSPECTIVES

L'esquema a la figura 14 resumeix el nostre coneixement actual de la biologia molecular de la cistinúria. La cistinúria de tipus I, la més freqüent en les nostres poblacions; possiblement el 65-70 % del casos, és deguda a mutacions al gen rBAT. Aquest gen codifica una proteïna que participa com a modulador o transportador del sistema de reabsorció renal i intestinal d'alta afinitat de cistina i d'aminoàcids bàsics de tipus  $b^{0,+}$ . Aquest sistema de transport reabsorbeix aquests aminoàcids vers l'interior de les cèl·lules epitelials dels túbuls renal, en el seu

segment S3 (*Pars recta* o túbul proximal recte), per un mecanisme de transport actiu terciari, dissipant el gradient d'aminoàcids neutres establert en aquestes cèl·lules. Per contra, es descobreixen els gens causants de la cistinúria de tipus II i III. Molt probablement, a causa de la aparentment normal absorció intestinal de cistina als pacients de tipus III, el gen causant d'aquest tipus de cistinúria serà un gen que s'expressa al ronyó però que no s'expressa a l'intestí. El sistema o els sistemes de reabsorció renal de cistina de baixa afinitat i alta capacitat expressats en els segments S1 i S2 del túbul renal, i que no es troben a l'intestí, són els principals candidats. El fet, com ja s'ha comentat abans, que el transportador rBAT/ $b^{0,+}$  sigui probablement una proteïna heteromèrica permet postular que la subunitat de baixa massa molecular («lleugera») de rBAT, encara no clonada, pugui ser un altre gen de cistinúria, responsable bé del tipus II o fins i tot del tipus I.

Bases moleculars de la cistinúria

Fenotip	Gen	Sistema de transport	Teixit afectat
I	rBAT	bescanviador d'aminoàcids ( $b^{0,+}$ -like)	ronyó (segment S3) intestí prim
II	?	?	ronyó i intestí
III	?	sistema de reabsorció de baixa afinitat?	ronyó (segment S1-S2)?

FIGURA 14. Esquema resum del coneixement actual de les bases moleculars de la cistinúria. Dels tres tipus de cistinúria, només el tipus I s'ha demostrat que sigui produït per alteracions en el gen rBAT, també anomenat SLC3A1 en el *Gene Data Bank*. La proteïna rBAT constitueix total o parcialment el sistema de transport d'aminoàcids de tipus  $b^{0,+}$ , responsable de la reabsorció d'aminoàcids bàsics i cistina al segment S3 de la nefrona i de la mucosa de l'intestí prim. Els gens, i l'activitat de transport, responsable de la cistinúria de tipus II i III són desconeguts. Com a hipòtesi de treball es proposa que un sistema de reabsorció de cistina i d'aminoàcids bàsics amb alta capacitat i baixa afinitat ubicat en les cèl·lules epitelials del túbul proximal en els segments S2-S3, i no present en l'intestí prim, seria el responsable del tipus III. El fet que rBAT pot tenir una estructura heterodimèrica amb una subunitat lleugera encara no clonada fa pensar en la possibilitat que mutacions en el gen d'aquesta subunitat siguin responsables de la cistinúria de tipus II.



Tres línies principals d'esforç de recerca es plantegen en el futur en l'estudi de la cistinúria: 1) Podem desenvolupar animals model de cistinúria basant-nos en l'eliminació de l'expressió del gen rBAT, per exemple en el ratolí. Actualment perseguim el cDNA de rBAT de ratolí per assolir el *Knock-out* del gen rBAT en aquests animals. Si el fenotip d'aquests animals és cistinúric podrem utilitzar-los per a desenvolupar noves teràpies per a la cistinúria (nous fàrmacs o en el futur teràpia gènica); actualment la teràpia existent és simptomatològica (reducció de l'excreció de cistina i solubilització dels càlculs) i presenta molt efectes secundaris. 2) Hem de trobar els altres gens causants de la cistinúria. Per a assolir això es poden utilitzar bé estratègies genètiques (genètica posicional), bé estratègies bioquímiques (clonació de nous transportadors renals de cistina). 3) Tant rBAT com 4F2hc semblen que necessiten de subunitats encara desconegudes. La purificació i/o seqüenciació d'aquestes subunitats és un requisit indispensable per a establir la relació estructura-funció d'aquests transportadors d'aminoàcids: quins són els dominis proteics que permeten d'establir l'acumulació dels substrats d'aquests transportadors i amb quins mecanismes d'acció? L'estudi de rBAT i 4F2hc està plantejant problemes únics i molt interessants en el món del transport d'aminoàcids en mamífers.

## AGRAÏMENTS

La tasca de col·laboradors anteriors en els nostres grups com Joan Bertran, «clonador» del gen rBAT, Marc Furriols, Marta Camps, Anna Castelló i Miguel Chillón ha estat capital en els nostres estudis. Els nostre agraïment als components dels grups de fora de Catalunya amb què hem col·laborat per a la clonació de rBAT (grup de Heini

Murer a la Universitat de Zuric), per a l'estudi de la genètica molecular de rBAT i la cistinúria (grup de Paolo Gasparini a l'hospital Solievo de la Soferenza de San Giovanni Rotondo a Itàlia), per a l'estudi de l'activitat elèctrica de rBAT i 4F2hc (grup d'Andreas Busch de la Universitat de Tübingen) i per a la caracterització clínica dels fenotips de cistinúria (grups d'Alberto Ponzzone i de Gianfranco Rizzoni a Torí i Roma). El nostre més profund agraïment als grups clínics que ens faciliten mostres de pacients procedents tant d'Itàlia com de Catalunya i de la resta de l'Estat espanyol, i als malalts que han accedit a «donar la seva sang» pels nostres estudis. Diversos autors d'aquesta revisió són actualment becaris de la Generalitat de Catalunya, del Ministeri d'Educació i Ciència de l'Estat espanyol o de la Fundació Pi i Sunyer. El nostre treball revisat aquí ha estat finançat gràcies a ajuts de la Direcció General de la Investigació Científica y Técnica (PB90/0435 i PB93/0738), de l'Institut Català de Salut, de la Fundació Pi i Sunyer, de la Sociedad Española de Diàlisis y Transplante i de la Direcció General de Recerca (GRQ94-1040).

## BIBLIOGRAFIA

- AHMED, A.; G. J. PETER; P. M. TAYLOR; A. A. HARPER; M. J. RENNIE (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.*, núm. 270, pàg. 8482-8486.
- BERTRAN, J.; S. MAGAGNIN; A. WERNER; D. MARKOVICH; J. BIBER; X. TESTAR; A. ZORZANO; L. C. KÜHN; M. PALACÍN; H. MURER (1992c). «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. USA*, núm. 89, pàg. 5606-5610.
- BERTRAN, J.; X. TESTAR; A. ZORZANO; M. PALACÍN (1994). «A new age for mammalian plasma membrane amino acid transporters». *Cell. Physiol. Biochem.*, núm. 4, pàg. 217-241.

- BERTRAN, J.; A. WERNER; J. CHILLARÓN; V. NUNES; J. BIBER; X. TESTAR; A. ZORZANO; X. ESTIVILL; H. MURER; M. PALACÍN (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.*, núm. 268, pàg. 14842-14849.
- BERTRAN, J.; A. WERNER; M. L. MOORE; G. STANGE; D. MARKOVICH; J. BIBER; X. TESTAR; A. ZORZANO; M. PALACÍN; H. MURER (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. USA*, núm. 89, pàg. 5601-5605.
- BERTRAN, J.; A. WERNER; G. STANGE; D. MARKOVICH; J. BIBER; X. TESTAR; A. ZORZANO; M. PALACÍN; H. MURER (1992a). «Expression of Na<sup>+</sup>-independent amino acid transport in *Xenopus laevis* oocytes by injection of rabbit kidney cortex mRNA». *Biochem. J.*, núm. 281, pàg. 717-723.
- BUSCH, A.; T. HERZER; S. WALDEGGER; F. SCHMIDT; M. PALACÍN; J. BIBER; D. MARKOVICH; H. MURER; F. LANG (1994). «Opposite directed currents induced by the transport of dibasic and neutral amino acids in *Xenopus* oocytes expressing the protein rBAT». *J. Biol. Chem.*, núm. 269, pàg. 25581-25586.
- CALONGE, M. J.; P. GASPARINI; J. CHILLARÓN; M. CHILLÓN; M. GALLUCCI; F. ROUSAUD; L. ZELANTE; X. TESTAR; B. DALLAPICCOLA; F. DI SILVERIO; P. BARCELÓ; X. ESTIVILL; A. ZORZANO; V. NUNES; M. PALACÍN (1994). «Cystinuria caused by mutations in rBAT, a gene involved in the transport of cystine». *Nature Genetics*, núm. 6, pàg. 420-425.
- CALONGE, M. J.; M. NADAL; S. CALVANO; X. TESTAR; L. ZELANTE; A. ZORZANO; X. ESTIVILL; P. GASPARINI; M. PALACÍN, M.; V. NUNES (1995a). «Assignment of the gene responsible for cystinuria (rBAT) and of markers D2S119 and D2S177 to 2p16 by fluorescence in situ hybridization». *Human Genet.*, núm. 95, pàg. 633-636.
- CALONGE, M. J.; V. VOLPINI; L. BISCEGLIA; F. ROUSAUD; L. DE SANTIS; E. BRESCIA; L. ZELANTE; X. TESTAR; A. ZORZANO; X. ESTIVILL; P. GASPARINI; V. NUNES; M. PALACÍN (1995b). «Genetic heterogeneity in cystinuria: the rBAT gene is linked to type I but not to type III cystinuria». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 92. [En premsa].
- CHELLY, J.; J. P. CONCORDET; J. C. KAPLAN; A. KHAN (1989). «Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 86, pàg. 2617-2621.
- COADY, M. J.; F. JALAL; X. CHEN; G. LEMAY; A. BERTELOOT; J.-Y. LAPOINT (1994). «Electrogenic amino acid exchange via the rBAT transporter». *FEBS Lett.*, núm. 356, pàg. 174-178.
- COICADAN, L.; M. HEYMAN; E. GRASSET; J. F. DESJEUX (1980). «Cystinuria: reduced lysine permeability at the brush border of intestinal membrane cells». *Pediatr. Res.*, núm. 14, pàg. 109-112.
- CRAWHALL, J. C.; P. PURKISS; R. W. E. WATTS; E. P. YOUNG (1969). «The excretion of amino acids by cystinuric patients and their relatives». *Ann. Hum. Genet.*, núm. 33, pàg. 149.
- DEVÉS, R.; P. CHAVEZ; C. A. R. BOYD (1992). «Identification of a new transport system ( $\gamma^L$ ) in human erythrocytes that recognizes lysine and leucine with high affinity». *J. Physiol.*, núm. 454, pàg. 491-501.
- FEI, Y.-J.; P. D. PRASAD; F. H. LEIBACH; V. GANAPATHY (1995). «The amino acid transport system  $\gamma^L$  induced in *Xenopus laevis* oocytes by human choriocarcinoma cell (JAR) mRNA is functionally related to the heavy chain of the 4F2 cell surface antigen». *Biochem.*, núm. 34, pàg. 8744-8751.
- FOREMAN, J. W.; S. M. HWANG; S. SEGAL (1980). «Transport interactions of cystine and dibasic amino acids in isolated rat renal tubules». *Metabolism*, núm. 29, pàg. 53-61.
- FURLONG, T. J.; S. POSEN (1990). «D-penicillamine and the transport of L-cystine by rat and human renal cortical brush-border membrane vesicles». *Am. J. Physiol.*, núm. 258, pàg. F321-F327.
- FURRIOLS, M.; J. CHILLARÓN; C. MORA; A. CASTELLÓ; J. BERTRAN; M. CAMPS; X. TESTAR; S. VILARÓ; A. ZORZANO; M. PALACÍN (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.*, núm. 268, pàg. 27060-27068.
- GARROD, A. E. (1908). «Inborn errors of metabolism». *Lancet*, núm. 2, pàg. 1-7.
- GASPARINI, P.; M. J. CALONGE; L. BISCEGLIA; J. PURROY; I. DIANZANI; A. NOTARANGELO; F. ROUSAUD; M. GALLUCCI; X. TESTAR; A. PONZONE; X. ESTIVILL; A. ZORZANO; M. PALACÍN; V. NUNES; L. ZELANTE (1995). «Molecular genetics of cystinuria: identification of 4 new mutations and 7 polymorphisms and evidence for genetic heterogeneity». *Am. J. Hum. Genet.*, núm. 56. [En premsa].
- GEERING, K.; I. THEULAZ; F. VERREY; M. T. HÄUPTLE; B. C. ROSSIER (1989). «A role for the b-subunit in the expression of functional Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in *Xenopus* oocytes». *Am. J. Physiol.*, núm. 257, pàg. C851-C858.
- HAYNES, B. F.; M. E. HEMLER; D. L. MANN; G. S. EISENBARTH; J. H. SHELHAMER; H. S. MOSTOWSKI; C. A. THOMAS; J. L. STROMINGER; A. S. FAUCI (1981). «Characterization of a monoclonal antibody (4F2) that binds to human monocytes and to a subset of activated lymphocytes». *J. Immunol.*, núm. 126, pàg. 1409-1414.



- HEMLER, M. E.; J. L. STROMINGER (1982). «Characterization of the antigen recognized by the monoclonal antibody (4F2): different molecular forms on human T and B lymphoblastoid cell lines». *J. Immunol.*, núm. 129, pàg. 623-628.
- KANAI, Y.; C. P. SMITH; M. A. HEDIGER (1994). «A new family of neurotransmitter transporters: the high-affinity glutamate transporters». *FASEB J.*, núm. 8, pàg. 1450-1459.
- KANAI, Y.; M. G. STELZNER; W.-S. LEE; R. G. WELLS; D. BROWN; M. A. HEDIGER (1992). «Expression of mRNA (D2) encoding a protein involved in amino acid transport in S3 proximal tubule». *Am. J. Physiol.*, núm. 263, pàg. F1087-F1093.
- KANNER, B. I.; N. KLEINBERGER-DORON (1994). «Structure and function of sodium-coupled neurotransmitter transporters». *Cell. Physiol. Biochem.*, núm. 4, pàg. 174-184.
- LEE, W.-S.; R. G. WELLS; R. V. SABBAG; T. K. MOHANDAS; M. A. HEDIGER (1993). «Cloning and chromosomal localization of a human kidney cDNA involved in cystine, dibasic, and neutral amino acid transport». *J. Clin. Invest.*, núm. 91, pàg. 1959-1963.
- LEVY, H. L. (1973). «Genetic screening» A: Harris, H. and Hirschhorn, K. [ed.]. *Advances in Human Genetics*. Vol. 4. New York: Plenum, pàg. 1.
- MACLEOD, C. L.; K. D. FINLEY; D. K. KAKUDA (1994). « $\gamma$ -type cationic amino acid transport: expression and regulation of the mCAT genes». *J. Expt. Biol.*, núm. 196, pàg. 109-122.
- MAGAGNIN, S.; J. BERTRAN; A. WERNER; D. MARKOVICH; J. BIBER; M. PALACIN; H. MURER (1992). «Poly(A)<sup>+</sup> RNA from rabbit intestinal mucosa induces  $b^{0+}$  and  $\gamma$  amino acid transport activities in *Xenopus laevis* oocytes». *J. Biol. Chem.*, núm. 267, pàg. 15384-15390.
- MARKOVICH, D.; G. STANGE; J. BERTRAN; M. PALACIN; A. WERNER; J. BIBER; H. MURER (1993). «Two mRNA transcripts (rBAT-1 and rBAT-2) are involved in system  $b^{0+}$ -related amino acid transport». *J. Biol. Chem.*, núm. 268, pàg. 1362-1367.
- MCGIVAN, J. D.; M. PASTOR-ANGLADA (1994) «Regulatory and molecular aspects of mammalian amino acid transport». *Biochem. J.*, núm. 299, pàg. 321-334.
- McKUSICK, V. A. (1990). «Cystinuria». A: *Mendelian Inheritance in Man. Catalogs of autosomal dominant, autosomal recessive, and X-linked phenotypes*. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press, pàg. 1128-1129.
- McNAMARA, P. D.; L. M. PEPE; S. SEGAL (1981). «Cystine uptake by renal brush border vesicles». *Biochem. J.*, núm. 194, pàg. 443-449.
- McNAMARA, P. D.; C. T. REA; S. SEGAL (1991). «Expression of rat jejunal cystine carrier in *Xenopus* oocytes». *J. Biol. Chem.*, núm. 266, pàg. 986-989.
- (1992). «Ion dependence of cystine and lysine uptake by rat renal brush-border membrane vesicles». *Biochim. Biophys. Acta*, núm. 1103, pàg. 101-108.
- MOSCKOVITZ, R.; N. YAN; E. HEIMER; A. FELIX; S. S. TATE; S. UDENFRIEND (1993). «Characterization of the rat neutral and basic amino acid transporter utilizing antipeptide antibodies». *Proc. Natl. Acad. Sci.*, núm. 90, pàg. 4022-4026.
- MOSCKOVITZ, R.; S. UDENFRIEND; A. FELIX; E. HEIMER; S. S. TATE (1994) *FASEB J.*, núm. 8, pàg. 1069-1074.
- OZEGOVIC, B.; P. D. McNAMARA; S. SEGAL (1982). «Cystine uptake by rat jejunal brush border membrane vesicles». *Biosci. Rep.*, núm. 2, pàg. 913-920.
- PALACIN, 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.*, núm. 196, pàg. 123-137.
- PARMACEK, M. S.; B. A. KARPINSKI; K. M. GOTTESDIENER; C. B. THOMPSON; J. M. LEIDEN (1989). «Structure, expression and regulation of the murine 4F2 heavy chain». *Nucleic Acids Res.*, núm. 17, pàg. 1915-1931.
- PICKEL, V. M.; M. J. NIRENBERG; J. CHAN; R. MOSCKOVITZ; S. UDENFRIEND; S. S. TATE (1993). «Ultrastructural localization of a neutral and basic amino acid transporter in rat kidney and intestine». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 90, pàg. 7779-7783.
- PRAS, E.; N. ARBER; I. AKSENTJEVICH; G. KATZ; J. M. SCHAPIRO; L. PROSEN; L. GRUBERG; D. HAREL; U. LIBERMAN; J. WEISSENBACH; M. PRAS; D. L. KASTNER (1994). «Localization of a gene causing cystinuria to chromosome 2p». *Nature Genetics*, núm. 6, pàg. 415-419.
- PRAS, E.; N. RABEN; E. GOLOMB; N. ARBER; I. AKSENTJEVICH; J. M. SCHAPIRO; D. HAREL; G. KATZ; U. LIBERMAN; M. PRAS; D. L. KASTNER (1995). «Mutations in the SLC3A1 Transporter Gene in Cystinuria». *Am. J. Hum. Genet.*, núm. 56, pàg. 1297-1303.
- QUACKENBUSH, E.; M. CLABBY; K. M. GOTTESDIENER; J. BARBOSA; N. H. JONES; J. L. STROMINGER; S. SPECK; J. M. LEIDEN (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. USA*, núm. 84, pàg. 6526-6530.
- ROSENBERG, L. E.; S. DOWNING; J. L. DURANT; S. SEGAL (1966a). «Cystinuria: biochemical evidence of three genetically distinct diseases». *J. Clin. Invest.*, núm. 45, pàg. 365-371.
- ROSENBERG, L. E.; J. L. DURANT; I. ALBRECHT (1966b). «Genetic heterogeneity in cystinuria: Evidence for allelism». *Trans. Assoc. Am. Physicians*, núm. 79, pàg. 284-296.



- ROSENBERG, L. E.; J. L. DURANT; I. M. HOLLAND (1965). «Intestinal absorption and renal extraction of cystine and cysteine in cystinuria». *New Engl. J. of Med.*, núm. 273, pàg. 1239-1345.
- SCHAFFER, J. A.; M. L. WATKINS (1984). «Transport of L-cystine in isolated perfused proximal straight tubules». *Pfluegers Arch.*, núm. 401, pàg. 143-151.
- SEGAL, S.; P. D. MCNAMARA; L. M. PEPE (1977). «Transport interaction of cystine and dibasic amino acids in renal brush border vesicles». *Science*, núm. 197, pàg. 169-171.
- SEGAL, S.; S. O. THIER (1989). «Cystinuria», A: C. H. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly & D. Valle. *The Metabolic Basis of Inherited Diseases*. Nova York: McGraw-Hill, pàg. 2479-2496.
- SILBERNAGL, S. (1988). «The renal handling of amino acids and oligopeptides». *Physiol. Rev.*, núm. 68, pàg. 911-1007.
- TATE, S. S. (1995). «Functional organization of a renal cystine transporter». *Amino acids*, núm. 9, pàg. 25.
- TATE, S. S.; N. YAN; S. UDENFRIEND (1992). «Expression cloning of a Na<sup>+</sup>-independent neutral amino acid transporter from rat kidney». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 89, pàg. 1-5.
- TAYLOR, M. A.; D. L. SMITH (1987). «Accumulation of free amino acids in growing *Xenopus laevis* oocytes». *Dev. Biol.*, núm. 124, pàg. 287-290.
- TEIXEIRA, S.; S. DI GRANDI; L. C. KÜHN (1987). «Primary structure of the human 4F2 antigen heavy chain predicts a transmembrane protein with a cytoplasmic NH<sub>2</sub> terminus». *J. Biol. Chem.*, núm. 262, pàg. 9574-9580.
- THIER, S.; M. FOX; S. SEGAL; L. E. ROSENBERG (1964). «Cystinuria: In vitro demonstration of a intestinal transport defect». *Science*, núm. 143, pàg. 482-484.
- WELLS, R. G.; M. A. HEDIGER (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*, núm. 89, pàg. 5596-5600.
- WELLS, R. G.; W. LEE; Y. KANAI; J. M. LEIDEN; M. A. HEDIGER (1992). «The 4F2 antigen heavy chain induces uptake of neutral and dibasic amino acids in *Xenopus* oocytes». *J. Biol. Chem.*, núm. 267, pàg. 15285-15288.
- WINKLE, L. J. VAN; A. L. CAMPIONE; M. J. GORMAN (1988). «Na<sup>+</sup>-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.*, núm. 263, pàg. 3150-3163.
- YAN, N.; R. MOSCOVITZ; I. D. GERBER; S. MATHEW; V. V. V. S. MURTHY; S. S. TATE; S. UDENFRIEND (1994). «Characterization of the promoter region of the gene for the rat neutral and basic amino acid transporter and chromosomal localization of the human gene». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 91, pàg. 7548-7552.
- YAN, N.; R. MOSCOVITZ; S. UDENFRIEND; S. TATE (1992). «Distribution of mRNA of a Na<sup>+</sup>-independent neutral amino acid transporter cloned from rat kidney and its expression in mammalian tissues and *Xenopus laevis* oocytes». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 89, pàg. 9982-9985.