

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000200223





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ

ΟΥΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΜΟΝΑΔΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΛΙΘΩΝ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ : ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΣΟΦΙΚΙΤΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΥΣΤΙΝΟΥΡΙΑΣ

ΑΝΘΟΥΛΑ Α. ΧΑΤΖΗΚΥΡΙΑΚΙΔΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2004



Αρ. εφε.: 621..... 2005

«Β. έκρηξη της διόξινης... από τον Ιερό ναό
Σχολή του Πανεπιστημίου... του οικοπέδου
αξιοσημείων γειωμένων του...

143/02, άρθρο 202, κ...



«Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα».

Ν.5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2



Ημερομηνία αιτήσεως: 4-12-2000

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 438α/ 5-4-2001

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων:

Γιαννακόπουλος Ξενοφών, Επίκουρος Καθηγητής Ουρολογίας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

*Ευαγγέλου Άγγελος, Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Αγγελίδης Χαράλαμπος, Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων*

Ημερομηνία ανασύστασης Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 450α/ 2-10-2001

ΑΝΑΣΥΣΤΑΣΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Επιβλέπων:

Σοφικίτης Νικόλαος, Καθηγητής Ουρολογίας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

*Γεωργίου Ιωάννης, Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γιαννακόπουλος Ξενοφών, Επίκουρος Καθηγητής Ουρολογίας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων*

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 21-5-2001

Ημερομηνία καταθέσεως διδακτορικής διατριβής: 25-10-2004

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Τσιάνος Επαμεινώνδας, Καθηγητής Παθολογίας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γεωργάτος Σπυρίδων, Καθηγητής Βιολογίας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μπουρανιάς Κωνσταντίνος, Καθηγητής Παθολογίας-Αιματολογίας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Σεφεριάδης Κωνσταντίνος, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Σιαμόπουλος Κωνσταντίνος, Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Σοφικίτης Νικόλαος, Καθηγητής Ουρολογίας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Γεωργίου Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Γιαννακόπουλος Ξενοφών, Επίκουρος Καθηγητής Ουρολογίας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Η διδακτορική διατριβή έγινε αποδεκτή με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ»

Η Γραμματέας της Σχολής

ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΤΣΑΓΓΑΛΑ



*Στην οικογένειά μου,
...Αλέξανδρο, Κατερίνα, Στέλιο*



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου και τις ευχαριστίες μου στους ανθρώπους που μου συμπαραστάθηκαν και με βοήθησαν να ολοκληρώσω την παρούσα Διδακτορική Διατριβή.

Ευχαριστώ θερμά...

Τον κ. *Σοφικίτη Νικόλαο*, Καθηγητή Ουρολογίας, για την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε με την ανάθεση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής. Τον ευχαριστώ, επίσης, για την αδιάκοπη προθυμία και βοήθειά του ώστε να φέρω εις πέρας την ερευνητική μου προσπάθεια, και για τις γνώσεις που απλόχερα μου προσέφερε καθ' όλο αυτό το διάστημα της προσπάθειάς μου.

Τον κ. *Γεωργίου Ιωάννη*, Αναπληρωτή Καθηγητή Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας, για τη δυνατότητα που μου έδωσε να αναπτύξω ελεύθερα τη σκέψη μου. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε στην πειραματική μελέτη του νοσήματος καθώς και για τις σημαντικές του υποδείξεις.

Τον κ. *Γιαννακόπουλο Ξενοφώντα*, Επίκουρο Καθηγητή Ουρολογίας, για το ενδιαφέρον του να μελετηθεί γενετικά η κυστινουρία. Τον ευχαριστώ για την πολύτιμη βοήθειά του στη συλλογή μέρους της βιβλιογραφίας και διάθεσης προσωπικού του βιβλιογραφικού υλικού που αφορά το νόσημα.



Επίσης
Ευχαριστώ ...

Τον κ. Γεωργάτο Σπυρίδωνα, Καθηγητή Βιολογίας, για τις πολύτιμες υποδείξεις του στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων και για την μελλοντική προσέγγιση του υπό μελέτη θέματος.

Τον κ. Μπουραντά Κωνσταντίνο, Καθηγητή Παθολογίας-Αιματολογίας, για το ενδιαφέρον του και τις υποδείξεις στην καλύτερη παρουσίαση των δεδομένων και αποτελεσμάτων της μελέτης μου.

Τον κ. Σεφεριάδη Κωνσταντίνο, Καθηγητή Βιολογικής Χημείας, για την παραχώρηση του ψυχρού θαλάμου στο Βιοχημικό Εργαστήριο του Πανεπιστημικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων όπου πραγματοποιήθηκε μέρος της ερευνητικής μου δουλειάς, και για τις σημαντικές του υποδείξεις στην κλινική προσέγγιση του θέματος.

Τον κ. Σιαμόπουλο Κωνσταντίνο, Καθηγητή Παθολογίας-Νεφρολογίας, για το ενδιαφέρον του και τις πολύτιμες υποδείξεις του στην κλινική προσέγγιση του θέματος και παρουσίαση των αποτελεσμάτων.



Τέλος

Ευχαριστώ...

Τον κ. Ευαγγέλου Άγγελο, Καθηγητή Φυσιολογίας και την κα. Καλφακάκου Βασιλική, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας, για την παραχώρηση, του αρχείου του Εργαστηρίου της Φυσιολογίας με τις κυστινουρικές οικογένειες και του "Urocystin kit" για τον προσδιορισμό της κυστίνης στα ούρα των ασθενών.

Όλους του κλινικούς ιατρούς από τα διάφορα νοσοκομεία της Ελλάδος που προθυμοποιήθηκαν να συμμετάσχουν στην παρούσα μελέτη.

Τα μέλη των κυστινουρικών οικογενειών που πρόθυμα συνεργάστηκαν μαζί μου και με βοήθησαν στην προσπάθειά μου να διαφωτίσω κάποιες πτυχές του συγκεκριμένου γενετικού νοσήματος.

Το προσωπικό και τους φίλους μου στο εργαστήριο της Μονάδας Γενετικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τις όμορφες στιγμές που μοιραστήκαμε στην πορεία ολοκλήρωσης της Διδακτορικής μου Διατριβής.

Την οικογένειά μου για την διαρκή και αμέριστη συμπαράσταση και κατανόηση. Τους ευχαριστώ που συνεχίζουν να στηρίζουν τα όνειρα και τις προσπάθειές μου.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ι) ΕΙΣΑΓΩΓΗ-----	3
A. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ-----	3
B. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΚΥΣΤΙΝΟΥΡΙΑΣ-----	4
Γ. ΤΡΟΠΟΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ ΤΩΝ ΚΥΣΤΙΝΟΥΡΙΚΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ-----	6
Δ. Η ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΟΔΟΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΕΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΚΥΣΤΙΝΟΥΡΙΑ-----	9
α) Ετεροδιμερείς μεταφορείς αμινοξέων-----	9
β) Δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των ετεροδιμερών μεταφορέων----	13
γ) Η μεταβολική οδός της κυστινουρίας-----	15
δ) Πρότυπα κατανομής του rBAT/b ^{0,+} AT συμπλόκου-----	17
E. ΤΑ ΕΜΠΛΕΚΟΜΕΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΣΤΗΝ ΚΥΣΤΙΝΟΥΡΙΑ-----	19
α) Το γονίδιο SLC3A1-----	19
β) Το γονίδιο SLC7A9-----	24
γ) Το γονίδιο SLC7A10-----	28
ΣΤ. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ-ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ ΣΤΟ SLC7A9-----	31
Ζ. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ-ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ ΣΤΟ SLC3A1-----	36
Η. ΟΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ-----	37
ΙΙ) ΣΚΟΠΟΣ-----	41



B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ι) ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ-----45

Α. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΒΑΣΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ--45

α) Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR: Polymerase Chain Reaction)-----45

β) Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (μη-αποδιατακτικού) για ανίχνευση πολυμορφισμών στη διαμόρφωση μονόκλωνου DNA (SSCP-Single Strand Conformation Polymorphisms) -----46

γ) Πρωτοδιάταξη του DNA: Μέθοδος Sanger ή ενζυμική μέθοδος-----48

δ) Πολυμορφισμός μήκους περιοριστικών θραυσμάτων (RLFPs: Restriction Fragments Length Polymorphisms)-----50

B. ΚΑΤΑΓΩΓΗ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΩΝ-----53

Γ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΚΥΣΤΙΝΗΣ ΣΤΑ ΟΥΡΑ-----54

Δ. ΕΞΑΓΩΓΗ DNA ΑΠΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ-----56

Ε. ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ PCR-----57

ΣΤ. ΗΛΕΚΤΟΦΟΡΗΣΗ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΜΟΝΟΚΛΩΝΟΥ DNA (SSCP)-----61

Η. ΧΡΩΣΗ ΜΕ ΝΙΤΡΙΚΟ ΑΡΓΥΡΟ-----62

Θ. ΕΥΡΕΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΟΔΙΑΤΑΞΗΣ ΤΟΥ DNA-----63

Ι. ΠΕΨΕΙΣ ΤΩΝ ΕΝΙΣΧΥΜΕΝΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΤΡΙΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕ ΕΝΖΥΜΑ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΚΑΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΑΝΙΧΝΕΥΘΕΙ ΜΕ ΤΗΝ ΕΥΡΕΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΟΔΙΑΤΑΞΗΣ ΤΟΥ DNA-----65



Κ. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ-----	68
Λ. ΕΥΡΕΣΗ ΣΗΜΑΤΩΝ ΣΥΝΑΡΜΟΓΗΣ (SPLICING) ΤΩΝ ΕΞΩΝΙΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ-----	70
Μ. ΕΥΡΕΣΗ CIS-PΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ SLC7A9 ΓΟΝΙΔΙΟΥ-----	70
Ν. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΔΕΝΔΡΩΝ-----	72
II) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-----	75
Α. Η ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΗΣ ΚΥΣΤΙΝΗΣ ΣΤΑ ΟΥΡΑ ΤΩΝ ΚΥΣΤΙΝΟΥΡΙΚΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ-----	75
Β. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΚΥΣΤΙΝΟΥΡΙΑΣ ΣΤΟΥΣ ΕΛΛΗΝΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ---	84
Γ. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ SLC3A1, SLC7A9 ΚΑΙ SLC7A10-----	97
α) Πολυμορφισμοί του SLC7A9-----	97
β) Πολυμορφισμοί του SLC3A1-----	104
γ) Πολυμορφισμοί του SLC7A10-----	105
III) ΣΥΖΗΤΗΣΗ-----	125
Α. ΟΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΤΩΝ ΕΛΛΗΝΩΝ ΚΥΣΤΙΝΟΥΡΙΚΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ-----	125
Β. ΚΥΣΤΙΝΟΥΡΙΑ: ΜΙΑ ΣΥΝΘΕΤΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ-----	128
α) Ο πιθανός ρόλος των μεταλλάξεων των γονιδίων SLC3A1 και SLC7A9 στη συναρμογή των εξωνίων τους και στις λειτουργικές ιδιότητες των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν-----	128



β) Οι πιθανές επιπτώσεις των μεταλλάξεων των γονιδίων SLC3A1 και SLC7A9 στη συγκρότηση και μεταφορά στην κυτταρική μεμβράνη του ετεροδιμερούς συμπλόκου rBAT /b^{0,+}AT -----133

γ) Ο πιθανός ρόλος των πολυμορφισμών-----135

δ) Οι SLC7A9 πολυμορφισμοί μέσα στους γονοτυπικούς συνδυασμούς-----138

ε) Η εξελικτική σημασία των SLC7A9 SNPs clusters-----140

στ) Οι SLC7A9 πολυμορφισμοί μέσα στους απλοτυπικούς συνδυασμούς-----142

Γ. Η ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΩΝ ΚΥΣΤΙΝΟΥΡΙΚΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΚΥΣΤΙΝΗΣ ΣΤΑ ΟΥΡΑ-----146

Δ. Η ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΩΝ ΚΥΣΤΙΝΟΥΡΙΚΩΝ ΑΤΟΜΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ-----148

Ε. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ-----150

IV) ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-----155

V) ΠΕΡΙΛΗΨΗ-----157

VI) SUMMARY-----161

VII) ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ-----165

A. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΚΥΣΤΙΝΟΥΡΙΑ-----165

B. Η ΙΣΧΥΟΥΣΑ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΗΣ ΚΥΣΤΙΝΟΥΡΙΑΣ-----169

Γ. ΠΡΩΤΕΣ ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ-----174

VIII) ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ-----175



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

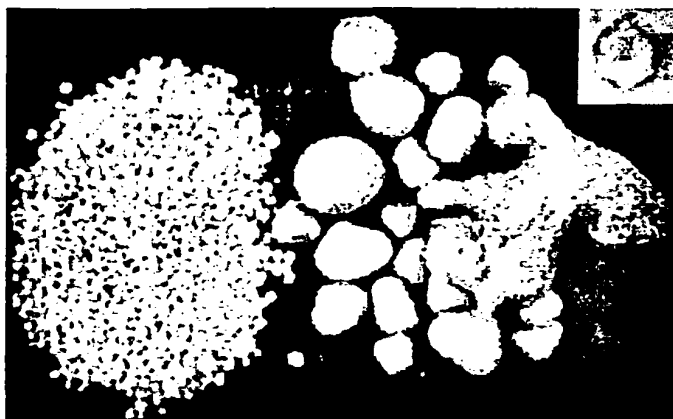
Η κυστινουρία είναι μία από τις 200 περίπου γενετικά καθορισμένες μεταβολικές ασθένειες του ανθρώπινου οργανισμού και από τις συχνότερες νόσους με αυτοσωμική κληρονομικότητα στην Ευρώπη [1]. Χαρακτηρίζεται από την ελλιπή νεφρική επαναρρόφηση και εντερική απορρόφηση της κυστίνης (Cys) και των τριών διβασικών αμινοξέων, της ορνιθίνης (Orn), της λυσίνης (Lys) και της αργινίνης (Arg) [2]. Η κυστινουρία δεν θα αντιπροσώπευε τίποτε περισσότερο από μία μεταβολική ιδιαιτερότητα, αν η αυξημένη απέκκριση της κυστίνης σε συνδυασμό με τη μικρή διαλυτότητά της στο σύνηθες pH των ούρων (250-300 mg/l σε pH=7) δεν οδηγούσε στην κρυστάλλωσή της, με άμεσο επακόλουθο το σχηματισμό λίθων κυστίνης (εικόνα 1) [3]. Οι λίθοι αυτοί εντοπίζονται σε διάφορα τμήματα του ουροποιητικού συστήματος (νεφρικοί κάλυκες, νεφρική πύελος, ουρητήρας, ουροδόχος κύστη). Η αύξηση του μεγέθους και του αριθμού αυτών συνοδεύεται από συμπτώματα και επιπλοκές, στους κυστινουρικούς ασθενείς, που χαρακτηρίζουν και άλλες μορφές ουρολιθίασης [4]. Μεταξύ αυτών των συμπτωμάτων και σημείων καθώς και των επιπλοκών που χαρακτηρίζουν την νόσο είναι ο κωλικός του νεφρού, η απόφραξη της απεκκριτικής μοίρας του ουροποιητικού συστήματος, οι λοιμώξεις και οι φλεγμονές του νεφρικού παρεγχύματος, ενώ σε πιο βεβαρημένες καταστάσεις παρατηρείται έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας, που μπορεί να οδηγήσει μέχρι και σε νεφρική ανεπάρκεια του ασθενούς [5-7].

Οι λίθοι κυστίνης αντιστοιχούν στο 1-2% των περιπτώσεων νεφρολιθίασης των ενήλικων ατόμων και στο 8% εκείνων που παρατηρούνται στα παιδιά [8-11]. Οι λίθοι κυστίνης εμφανίζονται στους κυστινουρικούς ασθενείς συνήθως κατά τη 2^η ή 3^η



δεκαετία της ζωής τους. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις όπου λίθοι κυστίνης παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά σε βρέφη μόλις 6 μηνών καθώς και σε ασθενείς ηλικίας 70 ετών ή και γηραιότερους [12]. Οι άρρενες ασθενείς έχουν βαρύτερη κλινική έκφραση της νόσου σε σχέση με τις γυναίκες [13]. Επιπλέον, ο ρυθμός υποτροπής των λίθων κυστίνης διαφέρει μεταξύ των ασθενών και κυμαίνεται από μερικούς μήνες μέχρι και μερικά χρόνια [5].

Τέλος, υπάρχουν διαφοροποιήσεις στη συχνότητα εμφάνισης της νόσου μεταξύ των διαφόρων πληθυσμιακών εθνοτήτων. Η γενική συχνότητα της κυστινουρίας στα νεογνά είναι 1 στα 7.000 στην Ευρώπη, και κυμαίνεται από 1/1.900 στον πληθυσμό της Ισπανίας έως 1/100.000 στον πληθυσμό της Σουηδίας [14-17].



Εικόνα 1: Λίθοι κυστίνης και στο ένθετο ο χαρακτηριστικός εξαγωνικός κρύσταλλος της κυστίνης.

B. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΚΥΣΤΙΝΟΥΡΙΑΣ

Πρόσφατες μελέτες σχετικά με τη γενετική και μοριακή βάση της ασθένειας βοήθησαν στην καλύτερη μελέτη της αιτιοπαθογένειας της νόσου και στην αποτελεσματικότερη αντιμετώπισή της. Η γενετική βάση της κυστινουρίας είναι ετερογενής αφού μέχρι σήμερα έχει διαπιστωθεί ότι οφείλεται στις μεταλλάξεις τουλάχιστον δύο γονιδίων, ενώ πιθανολογείται και η εμπλοκή ενός τρίτου γονιδίου.



Το γονίδιο SLC3A1 (OMIM 104614) έχει χαρτογραφηθεί στο χρωματόσωμα 2 (2p21) μεταξύ των πολυμορφικών μοριακών δεικτών D2S119 και D2S288, ενώ το δεύτερο υπεύθυνο γονίδιο SLC7A9 (OMIM 604144) χαρτογραφήθηκε στο χρωματόσωμα 19 (19q13) μεταξύ των δεικτών D19S414 και D19S220 [18, 19]. Οι μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια βρέθηκε ότι επηρεάζουν τα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά του ετεροδιμερούς μεταφορέα ο οποίος ευθύνεται, για τη μεταφορά της κυστίνης και των τριών διβασικών αμινοξέων διαμέσου των επιθηλιακών κυττάρων των εγγύς νεφρικών σωληναρίων και εκείνων του εντερικού βλεννογόνου. Το γονίδιο SLC7A10 (OMIM 220100) χαρτογραφήθηκε στην χρωματοσωματική θέση 19q13.1 πολύ κοντά στην περιοχή χαρτογράφησης του SLC7A9, με το οποίο εμφανίζει πολύ μεγάλο βαθμό ομολογίας (42% ταύτιση, 66% ομοιότητα) [20]. Τα προϊόντα έκφρασης των παραπάνω γονιδίων είναι πρωτεΐνες οι οποίες εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στο νεφρικό παρέγχυμα και πιθανολογείται ότι έχουν παρόμοια λειτουργικά χαρακτηριστικά.

Η “τύπου I” (CSNU1; MIM_220100) κυστινουρία έχει συσχετισθεί με μεταλλάξεις του γονιδίου SLC3A1 [solute carrier family 3 (cystine, dibasic and neutral amino acid transporter), member 1], ενώ μεταλλάξεις στο γονίδιο SLC7A9 [solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, γ^+ system), member 9], θεωρούνται υπεύθυνες για την “τύπου II” και “τύπου III” (CSNU3; MIM_600918) κυστινουρία γνωστές και ως κυστινουρία “μη-τύπου I” [21]. Η γενετική ανάλυση της κυστινουρίας έθεσε τη βάση που θα βοηθήσει ακόμη περισσότερο στην εξακρίβωση της φυσιοπαθολογίας του μηχανισμού επαναρρόφησης της κυστίνης, μία διαδικασία όχι πλήρως κατανοητή μέχρι σήμερα σε όλες τις πτυχές της. Κορυφαίοι και βασεοπλευρικοί μεμβρανικοί μεταφορείς θεωρούνται υπεύθυνοι για το δίκτυο μεταφοράς της κυστίνης και των διβασικών και ουδέτερων αμινοξέων διαμέσου της

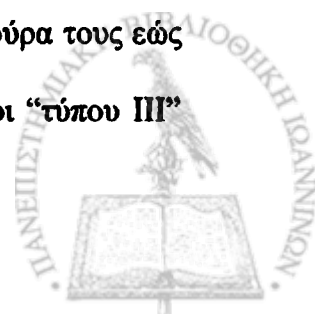


κυτταρικής μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων. Γίνεται προσπάθεια να αποσαφηνιστεί η μοριακή τους δομή αλλά και η ευαισθησία αυτών των μεταφορέων σε διάφορα ιόντα μεταξύ των οποίων και του νατρίου. Η περαιτέρω έρευνα σε μοριακό επίπεδο κρίνεται απαραίτητη για την ακριβέστερη ταξινόμηση των κυστινουρικών ασθενών, η οποία πιστεύεται ότι θα διαδραματίσει στο μέλλον κάποιο ρόλο στη θεραπεία και φαρμακευτική αγωγή που θα ακολουθεί ο κάθε κυστινουρικός ασθενής.

Γ. ΤΡΟΠΟΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ ΤΩΝ ΚΥΣΤΙΝΟΥΡΙΚΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ

Οι κυστινουρικοί ασθενείς ανάλογα με τα επίπεδα κυστίνης στα ούρα τους χωρίζονται σε τρεις υποπληθυσμούς/ τύπους κυστινουρίας. Συγκεκριμένα στην “τύπου I” κυστινουρία τα επίπεδα της κυστίνης στα ούρα κυμαίνονται από 0 ως 100 $\mu\text{mol/gm}$ κρεατινίνης, στην “τύπου II” από 990 ως 1.740 $\mu\text{mol/gm}$ κρεατινίνης και στην “τύπου III” από 100 ως 600 $\mu\text{mol/gm}$ κρεατινίνης [22]. Οι προαναφερθέντες τρεις τύποι κυστινουρίας συγκροτούν τις μορφές της “κλασικής” κυστινουρίας. Σ’ αυτές θα πρέπει να προστεθούν οι σύνθετοι τύποι κυστινουρίας (I/II, I/III, II/III), η κυστινουρία χωρίς την ταυτόχρονη αμινοξυουρία των άλλων διβασικών αμινοξέων καθώς και η αμινοξυουρία των τριών διβασικών αμινοξέων χωρίς την συνύπαρξη της κυστινουρίας.

Τα ετερόζυγα άτομα “τύπου I” έχουν φυσιολογικά επίπεδα κυστίνης και διβασικών αμινοξέων στα ούρα τους, ενώ οι ετερόζυγοι κυστινουρικοί ασθενείς “τύπου II” και “τύπου III” χαρακτηρίζονται αντίστοιχα από υψηλή και μέτρια αύξηση στα επίπεδα των προαναφερθέντων αμινοξέων στα ούρα τους. Συγκεκριμένα οι “τύπου II” ετεροζυγώτες μπορεί να εμφανίσουν επίπεδα κυστίνης στα ούρα τους έως και 10 φορές υψηλότερα από τα φυσιολογικά προσδιοριζόμενα, ενώ οι “τύπου III”



ετεροζυγώτες όχι διπλάσια από τα ανώτερα φυσιολογικά όρια [23]. Τα ομόζυγα άτομα “τύπου III” εμφανίζουν τα αναμενόμενα φυσιολογικά επίπεδα αύξησης της κυστίνης στα ούρα τους μετά την *per/os* πρόσληψή της, ενώ τα ομόζυγα άτομα “τύπου I” και “τύπου II” δεν εμφανίζουν καμμία αύξηση. Τα ετερόζυγα κυστινουρικά άτομα έχουν συχνότητα εμφάνισης στο γενικό πληθυσμό 1/60-1/4.000, ενώ τα ομόζυγα εμφανίζονται με συχνότητα της τάξης του 1/20.000 [15, 16, 24].

Η προαναφερθείσα ταξινόμηση των κυστινουρικών ασθενών φαίνεται να μην είναι η πλέον ακριβής ως προς τη διάγνωση της νόσου, τη φαινοτυπική της έκφραση ή την προσέγγιση της θεραπείας της. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι παρατηρείται συχνά αλληλοεπικάλυψη στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά μεταξύ των κυστινουρικών ατόμων των διαφόρων τύπων της νόσου. Το γεγονός αυτό είναι ιδιαίτερα εμφανές στην περίπτωση των κυστινουρικών ατόμων “μη-τύπου I” όπου πολλές φορές καθίσταται αδύνατη η διάκριση των ομόζυγων από τους ετερόζυγους ασθενείς. Αν και οι περισσότεροι ομοζυγώτες “μη-τύπου I” εμφανίζουν συμπτώματα της νόσου, υπάρχουν και κάποιοι άλλοι που δεν σχηματίζουν ποτέ λίθους κυστίνης. Υπάρχουν και περιπτώσεις ετεροζυγωτών “μη-τύπου I” οι οποίοι εκδηλώνουν φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της ασθένειας, τα οποία δεν διακρίνονται από αυτά των ομοζυγωτών (πίνακας 1) [23, 25].

Πίνακας 1: Ποσοστό εμφάνισης συμπτωμάτων λόγω ύπαρξης λίθων κυστίνης σε ετερόζυγους και ομόζυγους ασθενείς “μη-τύπου I” (Pras E²³, 2000) .

	Χωρίς συμπτώματα	Με συμπτώματα
Ετερόζυγοι	87%	13%
Ομόζυγοι	10%	90%

Αυτές οι διαφοροποιήσεις πιθανώς να μπορούν να αποδοθούν στη διαφορετική συγγένεια του συστήματος νεφρικής επαναρρόφησης της κυστίνης,



ορνιθίνης, λυσίνης και αργινίνης. Φαίνεται πως ο μεταφορέας του συστήματος δείχνει μεγαλύτερη συγγένεια προς την ορνιθίνη και την αργινίνη σε σχέση με την κυστίνη και την λυσίνη. Έτσι όταν υπάρχει μία μικρή βλάβη στη μοριακή δομή του μεταφορέα, η κυστίνη και η λυσίνη απεκκρίνονται σε μεγαλύτερα επίπεδα σε σχέση με την αργινίνη και την ορνιθίνη, ενώ στις πιο σοβαρές παθολογικές καταστάσεις και τα τέσσερα αμινοξέα απεκκρίνονται από τον οργανισμό σε υψηλά επίπεδα [23].

Σύμφωνα με νεότερα στοιχεία που αφορούν τη γενετική βάση της νόσου και τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των κυστινουρικών ατόμων κρίνεται κατάλληλο οι κυστινουρικοί ασθενείς να κατατάσσονται ως εξής [13]:

⇒ *Τύπου Α:* Η κυστινουρία προκαλείται από μεταλλάξεις και στα δύο αλληλόμορφα του γονιδίου SLC3A1 (πλήρως υπολειπόμενη μορφή κληρονομικότητας). Σε αυτήν την περίπτωση οι ετεροζυγώτες έχουν φυσιολογικά επίπεδα αμινοξυουρίας.

⇒ *Τύπου Β:* Η κυστινουρία προκαλείται από μεταλλάξεις και στα δύο αλληλόμορφα του γονιδίου SLC7A9 (ατελώς υπολειπόμενη ή ατελώς επικρατούσα μορφή κληρονομικότητας). Σε αυτήν την περίπτωση οι ετεροζυγώτες έχουν συνήθως αυξημένα τα επίπεδα της κυστίνης και των διβασικών αμινοξέων στα ούρα τους. Ωστόσο, σε ένα ποσοστό των ετερόζυγων ατόμων ευρίσκονται φυσιολογικά επίπεδα αμινοξυουρίας.

⇒ *Τύπου ΑΒ:* Η κυστινουρία προκαλείται από μία μετάλλαξη στο γονίδιο SLC3A1 και μία μετάλλαξη στο γονίδιο SLC7A9. Το ποσοστό εμφάνισης αυτής της κατηγορίας των κυστινουρικών ατόμων υπολείπεται των άλλων δύο κατηγοριών, παρόλο που η συχνότητα εμφάνισης των μεταλλάξεων είναι η ίδια στα γονίδια SLC3A1 και SLC7A9. Επομένως, θεωρητικά αναμένεται το 1/3 των ασθενών να φέρει δύο μεταλλάξεις στο SLC3A1, το άλλο 1/3 να φέρει δύο μεταλλάξεις στο SLC7A9, και το υπόλοιπο 1/3 να φέρει μία μετάλλαξη στο SLC3A1 και μία



μετάλλαξη στο SLC7A9. Προτάθηκε ως πιθανή εξήγηση της παρατηρούμενης παρέκκλισης ότι μπορεί να είναι το γεγονός ότι οι κυστινουργικοί ασθενείς τύπου AB έχουν ήπια εκδήλωση της νόσου και για το λόγο αυτό δεν ανιχνεύονται πάντα.

Δ. Η ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΟΔΟΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΕΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΚΥΣΤΙΝΟΥΡΙΑ

α) Ετεροδιμερείς μεταφορείς αμινοξέων

Οι ετεροδιμερείς μεταφορείς αμινοξέων αποτελούνται από την rBAT ή την 4F2hc πρωτεΐνη (βαρεία υπομονάδα των ετεροδιμερών μεταφορέων, HSHAT-Heavy Subunits of Heteromeric Amino acid Transporters), η οποία συνδεόμενη με μία άλλη πρωτεΐνη (ελαφριά υπομονάδα των ετεροδιμερών μεταφορέων, LSHAT-Light Subunits of Heteromeric Amino acid Transporters) δημιουργούν διαφόρων τύπων πρωτεϊνικά ετεροδιμερή σύμπλοκα (εικόνα 2) [26-30]. Η βαρεία με την ελαφριά πεπτιδική αλυσίδα συνδέονται με μία δισουλφιδική γέφυρα (-S-S-) σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο που έχει μοριακό βάρος περίπου 120-130 kDa [31-33]. Εκτός από τη σύνδεση της βαρείας πεπτιδικής αλυσίδας με την ελαφριά πεπτιδική αλυσίδα διαμέσου της θειϊκής γέφυρας φαίνεται πως συνυπάρχουν μεταξύ τους και άλλες μη-ομοιοπολικού τύπου αλληλεπιδράσεις [34, 35].

Ειδικότερα, η rBAT πεπτιδική αλυσίδα συνδέεται με μία δισουλφιδική γέφυρα με την $b^{0,+}AT$ πρωτεΐνη οπότε και σχηματίζεται ο μεταφορέας του $b^{0,+}$ συστήματος μεταφοράς. Αυτό το σύστημα μεταφοράς χαρακτηρίζεται από την Na^+ -ανεξάρτητη μεταφορά των ουδέτερων και διβασικών αμινοξέων καθώς και της κυστίνης. Η 4F2hc πεπτιδική αλυσίδα έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να συνδεθεί ομοιοπολικά με διαφόρων τύπων πρωτεΐνες, οδηγώντας κάθε φορά σε διαφορετικού τύπου σύστημα μεταφοράς [26, 27]. Συγκεκριμένα η 4F2hc πεπτιδική αλυσίδα συνδεόμενη:



1) με την LAT ελαφριά πεπτιδική αλυσίδα δημιουργεί τον μεταφορέα του L συστήματος μεταφοράς (Na^+ -ανεξάρτητη μεταφορά των ουδέτερων αμινοξέων),

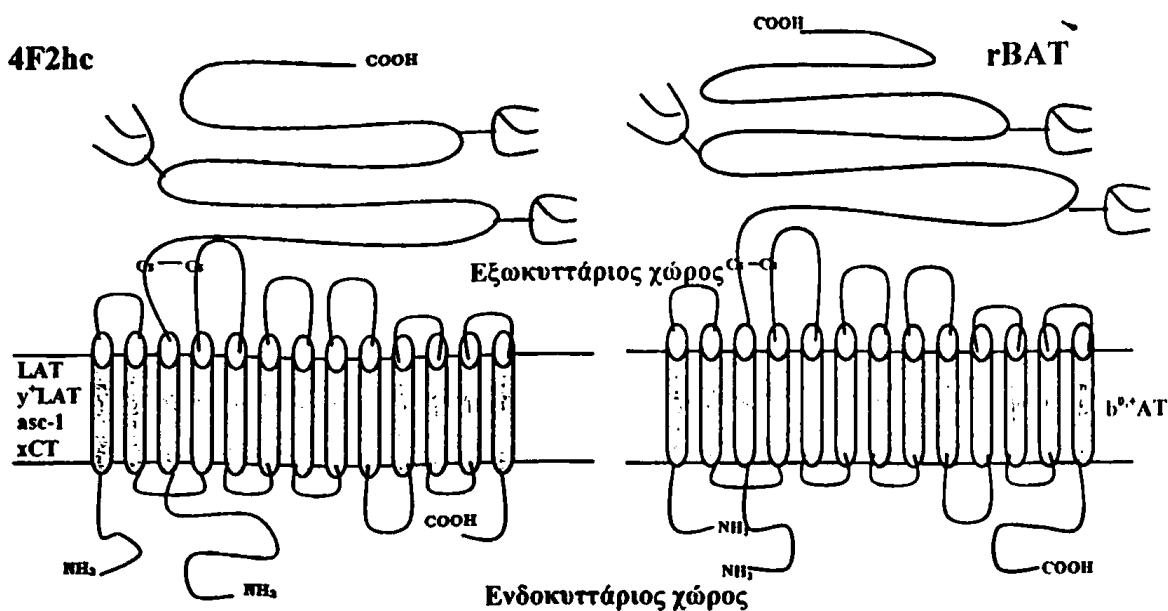
2) με την γ^+ LAT πεπτιδική αλυσίδα συγκροτεί τον ετεροδιμερή μεταφορέα του γ^+ L συστήματος μεταφοράς (Na^+ -ανεξάρτητη μεταφορά των διβασικών αμινοξέων και Na^+ -εξαρτώμενη μεταφορά των ουδέτερων αμινοξέων),

3) με την asc-1 πεπτιδική αλυσίδα δημιουργεί τον ετεροδιμερή μεταφορέα του asc συστήματος μεταφοράς (Na^+ -ανεξάρτητη μεταφορά των ουδέτερων αμινοξέων με μικρή πλευρική αλυσίδα),

4) με την xCT πεπτιδική αλυσίδα συγκροτεί τον μεταφορέα του xCT συστήματος μεταφοράς (Na^+ -ανεξάρτητη μεταφορά της κυστίνης και των ανιονικών αμινοξέων), και

5) με την $b^{0,+}$ AT πεπτιδική αλυσίδα δημιουργεί έναν άλλο μεταφορέα του $b^{0,+}$ συστήματος μεταφοράς που έχει τις ίδιες ιδιότητες με το προαναφερθέν πρωτεϊνικό σύμπλοκο (rBAT/ $b^{0,+}$ AT) αν και απαιτούνται περισσότερες μελέτες για να επιβεβαιωθεί η *in vivo* ύπαρξή του καθώς και τα λειτουργικά του χαρακτηριστικά [36, 37]

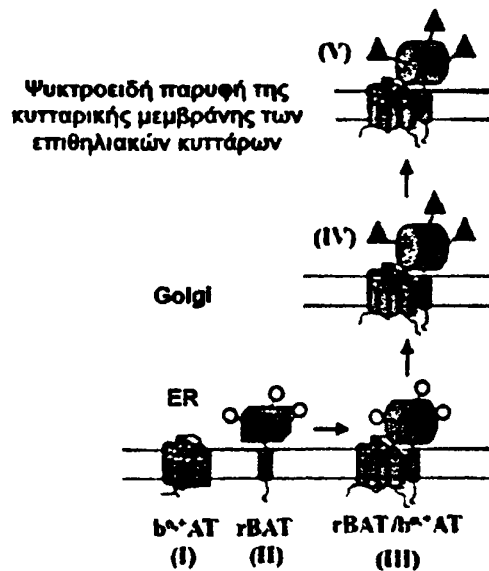




Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση των ετεροδιμερών συμπλόκων, τα οποία σχηματίζονται από τη βαρεία αλυσίδα 4F2hc με την ελαφριά πεπτιδική αλυσίδα LAT, γ^+ LAT, asc-1 ή xCT και από τη βαρεία μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη rBAT με την ελαφριά αλυσίδα $b^{0,+}$ AT. Οι βαρείες αλυσίδες έχουν μόνο μία διαμεμβρανική επικράτεια, η οποία επισημαίνεται με τα γράμματα hc (heavy chain), ενώ οι 12 διαμεμβρανικές επικράτειες των λιπόφιλων ελαφριών αλυσίδων αριθμούνται από το 1 έως το 12. Φαίνονται επίσης οι διατηρημένες εξελικτικά κυστεΐνες που συνδέουν με δισουλφιδικό δεσμό την ελαφριά με τη βαρεία πεπτιδική αλυσίδα στο ετεροδιμερές σύμπλοκο. Με τις “τρίαινες” αναπαριστώνται οι πιθανές τοπογραφικά N-γλυκοσυλιωμένες θέσεις της βαρείας πεπτιδικής αλυσίδας.

Πρόσφατες μελέτες επί του ετεροδιμερούς συμπλόκου rBAT/ $b^{0,+}$ AT οδήγησαν στη δημιουργία ενός μοντέλου βιοσύνθεσης των ετεροδιμερών μεταφορέων (εικόνα 3). Συγκεκριμένα προτάθηκε ότι: α) η $b^{0,+}$ AT υπομονάδα απαιτείται για την ολοκλήρωση της γλυκοσυλίωσης της rBAT υπομονάδας δείχνοντας ότι η δημιουργία του ετεροδιμερούς συμπλόκου πραγματοποιείται μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), β) η σταθερότητα της rBAT πρωτεΐνης αυξάνεται από την $b^{0,+}$ AT πρωτεΐνη, ενώ η σταθερότητα της δεύτερης φαίνεται να είναι

ανεξάρτητη της πρώτης, και γ) η πρόκληση της $b^{0,+}$ μεταφορικής δραστηριότητας στα λιποσώματα απέδειξε ότι η $b^{0,+}$ AT υπομονάδα είναι πλήρως λειτουργική στην απουσία της rBAT [38, 39]. Το τελευταίο δείχνει ότι η rBAT πρωτεΐνη δεν είναι απολύτως απαραίτητη για την είσοδο και τη χωροταξική διαμόρφωση της $b^{0,+}$ AT πρωτεΐνης μέσα στο ER. Επιπλέον, φαίνεται πως η $b^{0,+}$ AT υπομονάδα είναι αυτή που συγκεντρώνει τις καταλυτικές ιδιότητες του ετεροδιμερούς συμπλόκου. Ωστόσο, όπως θα αναφερθεί και στη συνέχεια σύμφωνα με τα αποτελέσματα άλλων πρόσφατων εργασιών, προσδίδονται και στην rBAT υπομονάδα κάποιες καταλυτικές ιδιότητες, πέραν του ρόλου της ως μορίου καθοδηγητή του συμπλόκου rBAT/ $b^{0,+}$ AT στην κυτταρική μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων.



Εικόνα 3: Το μοντέλο βιοσύνθεσης των ετεροδιμερών μεταφορέων των αμινοξέων. Η ελαφριά αλυσίδα $b^{0,+}$ AT (I) και η βαρεία αλυσίδα rBAT (II) εισέρχονται μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER). Η χωροταξική διαμόρφωση της $b^{0,+}$ AT είναι λειτουργική ακόμη και απουσία της rBAT. Οι δύο υπομονάδες (III) δημιουργούν το σύμπλοκο μέσα στο ER. Εκεί το σύμπλοκο rBAT/ $b^{0,+}$ AT υφίσταται διάφορες αγνώστου φύσεως αλλαγές και στη συνέχεια απελευθερώνεται. Η N-γλυκοσυλίωση του συμπλόκου rBAT/ $b^{0,+}$ AT γίνεται στο σύστημα Golgi (IV), και τελικά (V) το σύμπλοκο φθάνει στην ψυκτροειδή παρυφή των επιθηλιακών κυττάρων (Palacin M et al⁴⁰, 2004).



β) Δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των ετεροδιμερών μεταφορέων

Οι πρωτεΐνες rBAT και 4F2hc (HSHAT) είναι γλυκοπρωτεΐνες τύπου II με μία διαμεμβρανική επικράτεια και έχουν το αμινοτελικό τους άκρο στον ενδοκυττάριο χώρο (εικόνα 2). Προκειμένου να σχηματιστεί ο λειτουργικός ετεροδιμερής πρωτεϊνικός μεταφορέας των αμινοξέων πρέπει οι πρωτεΐνες rBAT και 4F2hc να συνδεθούν μέσω μιας γέφυρας θείου (-S-S-) με μία πεπτιδική αλυσίδα η οποία αποτελεί μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών graAT (glycoprotein-associated amino acid transporters). Κάθε πρωτεΐνη graAT έχει 12 διαμεμβρανικές επικράτειες. Το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό της άκρο βρίσκονται στον ενδοκυττάριο χώρο. Οι N-γλυκοσυλιωμένες θέσεις της βαρείας αλυσίδας εντοπίζονται στον εξωκυττάριο χώρο και ο σχηματισμός της δισουλφιδικής γέφυρας γίνεται μεταξύ διατηρημένων εξελικτικά κυστεϊνών των δύο πεπτιδικών αλυσίδων. Συγκεκριμένα η κυστεΐνη αυτή της ελαφριάς αλυσίδας εντοπίζεται στον δεύτερο υποθετικό εξωκυττάριο βρόχο της, ενώ της βαρείας αλυσίδας εντοπίζεται τέσσερα με πέντε αμινοξέα μακριά από τη διαμεμβρανική της επικράτεια. Ούτε η ελαφριά αλυσίδα ούτε η βαρεία αλυσίδα δεν μπορεί από μόνη της να λειτουργήσει πλήρως ως μεταφορέας των αμινοξέων. Η βαρεία πεπτιδική αλυσίδα φαίνεται να συνοδεύει και να κατευθύνει την ελαφριά πεπτιδική αλυσίδα στην κυτταρική μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων όπου το πρωτεϊνικό σύμπλοκο δεσμεύει το κατάλληλο υπόστρωμα και προκαλεί την ενδοκυττάρια ή εξωκυττάρια μεταφορά του υποστρώματός του [41, 42].

Πρόσφατες μελέτες επισημαίνουν τον ιδιαίτερο ρόλο των κυστεϊνών στο καρβοξυτελικό άκρο της rBAT πρωτεϊνικής υπομονάδας του ετεροδιμερούς μεταφορέα [43, 44]. Οι κυστεΐνες αυτές έχουν διατηρηθεί εξελικτικά σε μεγάλο βαθμό στα διάφορα είδη οργανισμών, γεγονός που υποδηλώνει τον πολύ σημαντικό



τους ρόλο στην εξασφάλιση της λειτουργίας του ετεροδιμερούς μεταφορέα. Η μεταφορική δραστηριότητα σε περιπτώσεις μεταλλάξεων των κυστεϊνών του καρβοξυτελικού άκρου της rBAT μεμβρανικής γλυκοπρωτεΐνης διαπιστώθηκε ότι είναι διακριτή τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά συγκριτικά με αυτήν που παράγεται από την άγριου τύπου rBAT υπομονάδα. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι οι μεταλλάξεις αυτές έχουν ιδιαίτερη επίδραση στη λειτουργική ικανότητα του ετεροδιμερούς πρωτεϊνικού συμπλόκου που εξαρτάται από την rBAT υπομονάδα.

Τα στοιχεία αυτά συμφωνούν με την πιθανότητα ότι μία από τις προαναφερθείσες κυστεΐνες (C666) αποτελεί τον κύριο στόχο για την προκαλούμενη από το NEM (N-αιθυλομηλεϊμίδιο) αντιδραστήριο λειτουργική αδρανοποίηση του πρωτεϊνικού συμπλόκου στο $b^{0,+}$ σύστημα μεταφοράς [43]. Πιθανολογείται ότι η κυστεΐνη αυτή έχει άμεσο ρόλο στη δέσμευση του υποστρώματος ή στην παραγωγή μιας αλλαγής στη χωροδιάταξη του πρωτεϊνικού συμπλόκου, η οποία είναι απαραίτητη για τον κύκλο μεταφοράς κατά το $b^{0,+}$ σύστημα. Πιθανώς η μετάλλαξη της κυστεΐνης αυτής να καταργεί επιλεκτικά την ικανότητα της rBAT υπομονάδας να αλληλεπιδρά με την $b^{0,+}$ AT πρωτεΐνη του κυττάρου. Όλα τα παραπάνω συμφωνούν με την παρατήρηση ότι ποικίλες μεταφορικές δραστηριότητες προκαλούνται από την έκφραση των rBAT υπομονάδων στα κύτταρα και πιθανότατα να έχουν και κάποιο ρόλο στα χαρακτηριστικά της μεταφοράς πέρα από τον ρόλο τους ως μόρια “καθοδηγητές” των ελαφριών αλυσίδων των ετεροδιμερών μεταφορέων στην κυτταρική μεμβράνη.

Σε πρόσφατη μελέτη ενισχύθηκε ακόμη περισσότερο η άποψη αυτή αναλύοντας τις επιπτώσεις της μετάλλαξης R365W (SLC3A1) στα λειτουργικά χαρακτηριστικά της rBAT υπομονάδας και του rBAT/ $b^{0,+}$ AT συμπλόκου [45]. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι σε ωκύτταρα η ανθρώπινη rBAT (R365W)

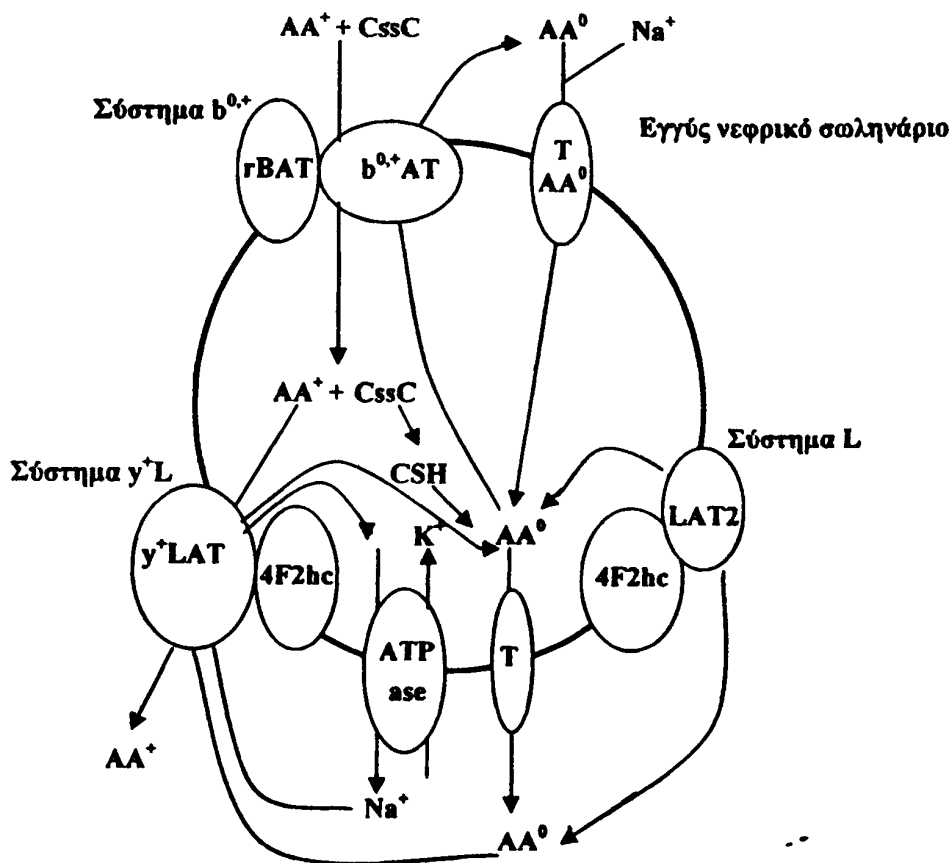


πρωτεΐνη αλληλεπιδρώντας με την ενδογενή $b^{0,+}$ AT πρωτεΐνη προκάλεσε ελλιπή έξοδο της αργινίνης από το κύτταρο χωρίς ωστόσο να επηρεαστούν τα επίπεδα εισόδου του αμινοξέος στο κύτταρο. Στα HeLa κύτταρα (human cervical carcinoma cells) όμως παρατηρήθηκε ότι κάτω από συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες υπάρχει 50% μείωση στα επίπεδα εισόδου της αργινίνης και μία ανάλογη μείωση στην ενδοκυττάρια συσσώρευση και άλλων διβασικών αμινοξέων. Επιπλέον, η έξοδος της αργινίνης από τα κύτταρα ήταν καθόλα απύσχα. Έτσι οι προαναφερθείσες παρατηρήσεις ενισχύουν την άποψη που αποδίδει στην rBAT υπομονάδα καταλυτικές ιδιότητες στο ετεροδιμερές σύμπλοκο πέραν του ρόλου της ως καθοδηγητή του συμπλόκου rBAT/ $b^{0,+}$ AT στην κυτταρική μεμβράνη.

γ) Η μεταβολική οδός της κυστινουρίας

Μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τις πεπτιδικές αλυσίδες του ετεροδιμερούς μεταφορέα στο $b^{0,+}$ σύστημα μεταφοράς αμινοξέων ευθύνονται για την πρόκληση της κυστινουρίας. Όπως προαναφέρθηκε ο μεταφορέας αυτός συγκροτείται από την rBAT (βαρεία πεπτιδική αλυσίδα) και την $b^{0,+}$ AT (ελαφριά πεπτιδική αλυσίδα) υπομονάδα. Πιο συγκεκριμένα εντοπίζεται στην ψυκτροειδή παρυφή των μεμβρανών των επιθηλιακών κυττάρων των εγγύς νεφρικών σωληναρίων και εκείνων του εντερικού βλεννογόνου [27, 46, 47]. Η υψηλή συγκέντρωση των ουδέτερων αμινοξέων στο εσωτερικό του κυττάρου και το δυναμικό της μεμβράνης ευνοούν την είσοδο των διβασικών αμινοξέων και την συνακόλουθη έξοδο των ουδέτερων αμινοξέων από το κύτταρο. Επιπλέον, η ενδοκυττάρια αναγωγή της κυστίνης σε κυστεΐνη ευνοεί αντίστοιχα την ενδοκυττάρια μεταφορά της κυστίνης από την κοιλότητα του νεφρικού σωληναρίου.





Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου το οποίο δείχνει το ρόλο των διαφόρων συστημάτων μεταφοράς στην επαναρρόφηση των αμινοξέων στα εγγύς νεφρικά σωληνάκια. Οι κορυφαίοι και βασεοπλευρικοί μεταφορείς θεωρούνται υπεύθυνοι για το δίκτυο μεταφοράς των αμινοξέων διαμέσου των επιθηλιακών κυττάρων.

Οι υψηλές συγκεντρώσεις των ουδέτερων αμινοξέων στο εσωτερικό των επιθηλιακών κυττάρων προκαλούνται από τις συγκεντρωμένες δραστηριότητες μεταφοράς στην κορυφαία και βασεοπλευρική μεμβράνη. Αυτή η μεταφορά των ουδέτερων αμινοξέων καθοδηγείται από την ηλεκτροχημική διαβάθμιση του νατρίου, η οποία ρυθμίζεται από την $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase . Ο L μεταφορέας αμινοξέων ($\text{y}^+ \text{LAT-1}$) στη βασεοπλευρική μεμβράνη του επιθηλιακού κυττάρου συνεισφέρει στην έξοδο από το κύτταρο των διβασικών αμινοξέων με ένα μηχανισμό ανταλλαγής τους με ουδέτερα αμινοξέα που συνοδεύεται από παθητική μετατόπιση των ιόντων Na^+ στο



εσωτερικό του κυττάρου. Αντίθετα, ο LAT-2 μεταφορέας της ίδιας περιοχής ανταλλάσσει ουδέτερα αμινοξέα ανάμεσα στο εσωτερικό και εξωτερικό του κυττάρου. Τέλος, ένας τρίτος μεταφορέας (T) ουδέτερων αμινοξέων της βασεοπλευρικής μεμβράνης προκαλεί την έξοδο των ουδέτερων αμινοξέων, τα οποία έχουν προηγουμένα συσσωρευτεί στο εσωτερικό του κυττάρου (εικόνα 4) [26, 48-50].

δ) Πρότυπα κατανομής του rBAT/b^{0,+}AT συμπλόκου

Μελέτες με *in situ* υβριδισμό έδειξαν ότι το b^{0,+}AT mRNA κατανέμονταν κυρίως στο φλοιό, ενώ ένα πιο αχνό σήμα υβριδοποίησής του παρατηρήθηκε στο εξωτερικό στρώμα της μυελώδους μοίρας του νεφρικού παρεγχύματος [51]. Στα εγγύς εσπειραμένα σωληνάρια (S1, S2) το σήμα υβριδοποίησης ήταν φανερά ισχυρότερο απ' ό τι στα εγγύς ευθύγραμμο (S3) σωληνάρια. Αντίθετα, το πρότυπο κατανομής του rBAT mRNA ήταν αντίστροφο με το κύριο σήμα υβριδοποίησής του να εντοπίζεται στη μυελώδη μοίρα του νεφρικού παρεγχύματος και ένα πιο ασθενές σήμα στη φλοιώδη του μοίρα. Επιπλέον, το σήμα υβριδοποίησης ήταν ισχυρό στα εγγύς ευθύγραμμο σωληνάρια (S3), ενώ ήταν πιο ασθενές στα εγγύς εσπειραμένα σωληνάρια (S1, S2) [51].

Σύστημα επαναρρόφησης υψηλού-K_m / μικρής-συγγένειας και μικρού-K_m / υψηλής-συγγένειας για την κυστίνη έχει περιγραφεί στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο (S1-S2 τμήματα) και στο εγγύς ευθύγραμμο σωληνάριο (S3 τμήμα), αντίστοιχα [52, 53]. Το πρώτο σύστημα είναι υπεύθυνο για το 10% της επαναρρόφησης της κυστίνης και το δεύτερο για το 90% της επαναπορρόφησής της [54]. Η υπόθεση ότι οι πεπτιδικές αλυσίδες rBAT και b^{0,+}AT αποτελούν τις υπομονάδες του μεταφορέα της κυστίνης των εγγύς νεφρικών σωληναρίων ενισχύεται



από το γεγονός ότι και δύο πρωτεΐνες εκφράζονται στα επιθηλιακά τους κύτταρα [48]. Επιπλέον, σε πειραματικές κυτταροκαλλιέργειες διαπιστώθηκε ότι ήταν αναγκαία η επιμόλυνση των κυττάρων και με τις δύο πρωτεΐνες για να υπάρξει η $b^{0,+}$ μεταφορική δραστηριότητα [55]. Οι διαφορές σε αυτήν την περίπτωση στα χαρακτηριστικά της μεταφοράς της κυστίνης από τα δύο συστήματα (υψηλού- K_m /μικρής-συγγένειας και μικρού- K_m /υψηλής-συγγένειας) θα μπορούσαν να αποδοθούν στην ύπαρξη κάποιας άλλης πρωτεΐνης που ενώνεται μη-ομοιοπολικά με το ετεροδιμερές σύμπλοκο είτε στο S1/S2 σκέλος είτε στο S3 σκέλος και η οποία τελικά τα τροποποιεί [26, 56].

Σύμφωνα όμως με μια άλλη υπόθεση οι πρωτεΐνες αυτές θα μπορούσαν η καθεμιά να είναι υπομονάδες ενός διαφορετικού ετεροδιμερούς πρωτεϊνικού συμπλόκου [23]. Σ' αυτήν την περίπτωση τα δύο συστήματα μεταφοράς της κυστίνης πιθανολογείται ότι λειτουργούν εν σειρά. Η υπόθεση αυτή φαίνεται να ενισχύεται από το αντίστροφο πρότυπο το οποίο παρατηρείται στην κατανομή των δύο πρωτεϊνών κατά μήκος των εγγύς νεφρικών σωληναρίων. Επειδή όμως οι πρωτεΐνες γ BAT και $b^{0,+}$ AT πρέπει να συνδεθούν με άλλες πεπτιδικές υπομονάδες προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μεταφορά της κυστίνης και των άλλων διβασικών αμινοξέων, αυτό προϋποθέτει την ύπαρξη άλλων πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρούν στα σύμπλοκα που σχηματίζει η καθεμιά [26, 56]. Ωστόσο, δεν έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα άλλες LSHAT και HSHAT πεπτιδικές αλυσίδες, οι οποίες να συνδέονται αντίστοιχα με την γ BAT και την $b^{0,+}$ AT πρωτεΐνη, πέραν του μεταξύ τους συμπλόκου. Εάν όμως ανακαλυφθούν τότε είναι βέβαιο ότι θα αποτελούν νέα υπογήφια γονίδια, που μεταλλάξεις τους πιθανότατα θα σχετίζονται με την εμφάνιση των παθολογικών γνωρισμάτων της κυστινουρίας.



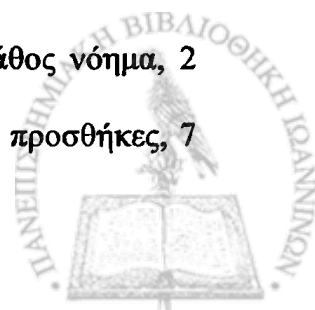
E. ΤΑ ΕΜΠΛΕΚΟΜΕΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΣΤΗΝ ΚΥΣΤΙΝΟΥΡΙΑ

α) Το γονίδιο SLC3A1

Το γονίδιο SLC3A1 είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση της βαρείας υπομονάδας (rBAT) του ετεροδιμερούς συμπλόκου. Ανοσοκυτταροχημικές μελέτες εντοπισμού απέδειξαν ότι το γονίδιο αυτό εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στα επιθηλιακά κύτταρα του νεφρικού παρεγχύματος και του εντερικού βλεννογόνου όπως επίσης και στα κύτταρα του εγκεφάλου, ήπατος και παγκρέατος [46, 53, 57-60].

Συγκεκριμένα το γονίδιο SLC3A1 έχει μέγεθος 2284 bp και η πρωτεΐνη rBAT που προκύπτει από την έκφρασή του αποτελείται από 663 αμινοξέα (εικόνα 5) [61, 62]. Δομείται από 10 εξώνια (117-611 bp) και 9 ιντρόνια (500-13.000 bp). Σ' όλες τις θέσεις συναρμογής υπάρχει το δινουκλεοτίδιο GT στο 5' άκρο και το δινουκλεοτίδιο AG στο 3' άκρο των ιντρονίων. Η μελέτη 700 bp από το κωδικόνιο έναρξης της μεταγραφής απεκάλυψε την ύπαρξη: α) του "κουτιού TATA" μεταξύ των θέσεων -103 και -98, β) δύο GC-κουτιών, γ) πέντε περιοχών δέσμευσης του μεταγραφικού παράγοντα SP-1, δ) τεσσάρων θέσεων όπου δεσμεύεται ο μεταγραφικός παράγοντας AP-2, ε) μιας αλληλουχίας δέσμευσης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB και στ) δέκα στοιχείων όπου δεσμεύεται η ιντερφερόνη-γ. Επίσης, ένα θετικό ρυθμιστικό στοιχείο της έκφρασης του γονιδίου βρέθηκε μεταξύ των θέσεων -229 και -644 και ένα αρνητικό ρυθμιστικό στοιχείο της έκφρασής του μεταξύ των θέσεων -2854 και -3037. Τέλος, ένα Alu στοιχείο εντοπίστηκε στη θέση -162, ενώ η θέση έναρξης της μεταγραφής προσδιορίστηκε 48 νουκλεοτίδια πριν το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασής του (ATG).

Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί 64 μεταλλάξεις στο γονίδιο SLC3A1, οι οποίες διακρίνονται σε 42 μεταλλάξεις αλλαγής νοήματος (40 με λάθος νόημα, 2 χωρίς νόημα), 3 σε θέσεις συναρμογής, 8 μικρά ελλείμματα, 3 μικρές προσθήκες, 7



μεγάλα ελλείμματα και 1 μεγάλος διπλασιασμός (πίνακας 2, εικόνα 6) [63-80]. Επιπλέον, ανιχνεύθηκαν και 10 πολυμορφισμοί (114C>A, 231T>A, 892-3T>G, 1035G>A, 1136+3delT, 1332+7T>C, 1398C>T, 1473C>T, 1854A>G, 2189C>T) [64, 66, 71, 80] (εικόνα 6).

1 gaccaagcat tcagcaagcc acitctccac cteccctact gcaggaagcc acctccgaaga cataagtcgg tgnagcatgg ctgaagataa aagcaagaga gactccalcg
 111 agalgagint gaagggatgc cagacaaca acgggttltg cctaatlga gacatcttgg agcagacccc ggatccagge agctcaacag acaacctgaa
 211 gcacagcacc nggggcatcc ttggctccca ggagcccgac ttcaaggcgg tccagcccta tggggggalg cccaagcagg tgcgttcca gttctctggc
 311 cagcccgctt accgcalacc tggggagale cttctctggc tccagctggc ttctgtctg gtcctcagc cggccaccat agccatcatt gccctctctc caaagtgcct
 421 agactggggc caggagggcc ccatglacca gacttaacca aggtcttca aggaactaa caaggatggg aacggagale tgaagctat tctgaatata tctgaatata
 531 ~~ctagctt aantataaaa acigtgtga ttacttca ttataatg tccctaaag attcagata ttggttga gattccggc aagttacc caatttga~~
 641 ~~agatggag aitttggaa tctgttga gcatcctg ataagctt anaataale atcgattca taaccaacca cagcagtcg aacatatt gtttcaatt~~
 751 ~~gactcggaca cggacaggaa aa taactga ttattatc tggcatgact glaccatga aaatggcaaa accatccac ccacaactc gtaagctg tgggctga~~
 861 ~~ctagttgca cttagcga gtcgcaacc aagttant tctcagtt atgaagagc aacctgatt taatctccg aatctcag ttcaagaga aatagcga~~
 971 ~~aatcccgac aggtccac aatctcga gctgacct gacttaca cccagcagg ggtatgac gactcttcc gcagcttcc gcagcttcc~~
 1081 ~~ttccaataa gcaccagcc cggcagatc agttatgg gactgaagc ctatcgagc atattgaca ggaactgat ttacttga ttccattta tcaangagc~~
 1291 ~~tgatttccc ttcaacaat acctagcat gctagacact gttctggga acagcctgta tgaatttacc acatctgga tggaaaacat gccagaagga aatggccta~~
 1401 ~~actgattat tggggacca gacatttcc gctcactt gcttttggg aatcagttg tcaactgat gacatgctt ctcttccac tccctgac tccatata~~
 1511 ~~ttacttggag aagaatgg aatggcaat attttagccg caaatctca tgaagctat gatttata cctctctc aagttacca atcagctgg acatagttc~~
 1621 ~~aantgtgtt ttctgaag ctatgacac ctgcttact accaattcag attaccacac tggatgtt gcttccaa agactcggc cagatcggc ttgatttt~~
 1731 ~~ttcagattt aagttactt catgcaag agctactct caacagggc tggtttgc atttgggaa tgcagccac taigtgtg acacaagaa gctgattg~~
 1841 ~~ttcagcga tctttctg gttctgaa ttggagaa caacactgt aatcttcat aatagttt cggccttcc cgttaaata agaataggi taattctt~~
 1951 ~~ttctcggc aagggcga aagttgac aagttgcat ttctgaca agggaggg actactt gacactca tgaagact ccttctc ccttctc~~
 2061 ~~ttcagatct atcttttt tcaatcag catcttct ccttctc aatctct atctctgta tggcaact ttatgaagc atgaagac tggcattca~~
 2171 ~~gtggattgt aagcattgt aatagctca tctacagat gctcttgg gaaactat taattctg atattctgt agctgaatg taaccgctt aagaaggtt~~
 2281 ~~ctcaatgtt ttgaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaa//~~

"MAEDKSKRDSIEMSMKGCQTNNGFVHNEDILEQTPDPGSSTDNLKHSTRGILGSQEPDFKGV
 QPYAGMPKEVLFQFSGQARYRIPREILFWLTVASVLVLIATIAIALSPKCLDWWQEGPMYQI
 YPRSFKDSNKDGNGLKGIQDKLDYITALNIKTVWHSFYKSSLRDFRYGVEDFREVDPIFGIV
 EDEENLVAAIHKGLKLIIDFIPNHTSDKHIWFQLSRTRTGKYTDYYIWHDC THEN GK TIPPNN
 WLSVYGNSSWHFDEVNRNQC YFHQFMKEQPD L NFRNPDVQEEIKEILRFWLTKGVDGFS L DAV
 KFLLEAKHLRDEIQV NK TQIPDTVTQYS ELYHDFTTTQVGMHDIVRSFRQ TMDQYSTEPGR
 FMGTEAYAESIDRTVMYYGLPFIQEA DFPFN NYLSMLD TVSGNSVYEVITSWMENMPEGKWP
 NWMIGGPDSSRLTSRLGNQYV NVMNMLLFTLPGTPITYYGEEIGMGNIVAANLNESYDINTLR
 SKSPMQWDNSSNAGFSEASNTWLPTNSDYHTVNVDVQKTQPRSALKLYQDLSLHANEE
 RGWECHLRNDSHYVYVYTR ELDGIDRIIVVLENGESTLLNLHNMISGLPAKMRKNSNSDKC
 SMDISGIFEDKGGC QIPINFRONAHKQFAERDRUETVSNRAQYSSVENI "

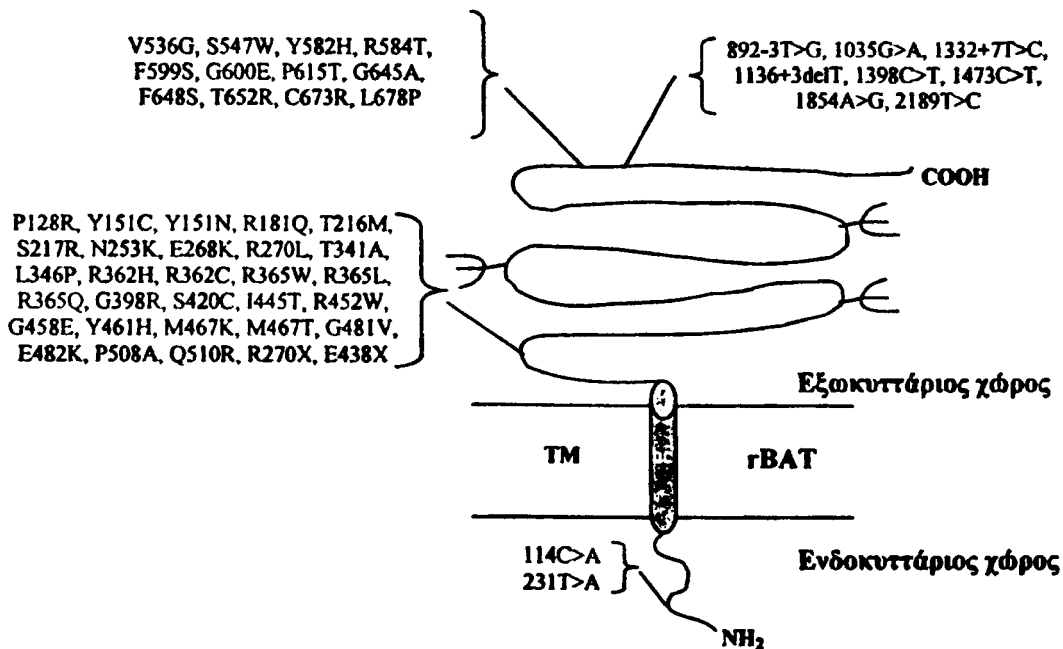
Εικόνα 5: Η κωδικοποιούσα αλληλουχία του γονιδίου SLC3A1 (GenBank: NM_000341.2) και η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί. Επισημαίνεται κάθε εξόνιο και το αντίστοιχο τμήμα που κωδικοποιεί στην πρωτεΐνη.



Πίνακας 2: Αναλυτική περιγραφή των διαφόρων τύπων μεταλλάξεων του γονιδίου SLC3A1.

Τύπος μετάλλαξης	Μετάλλαξη	Τύπος μετάλλαξης	Μετάλλαξη	
Αλλαγής νοήματος	P128R	Αλλαγής νοήματος	G600E	
	Y151C		P615T	
	Y151N		G645A	
	R181Q		F648S	
	T216M		T652R	
	S217R		C673R	
	N253K		L678P	
	E268K		5' θέση συναρμογής	1136+2T>C
	R270L			1500+1G>T
	T341A			IVS6+2delT
	L346P		Χωρίς νόημα	R270X
	R362H		E483X	
	R362C	Ελλείμματα,	163delC	
	R365W	Προσθήκες	974delGA	
	R365L		1749delA	
	R365Q		1749-1751del	
	G398R		1766-1768del	
	S420C		1810delTG	
	I445T		1820delT	
	R452W		1999-2000delTT	
	G458E		1306insC	
	Y461H		1898insTA	
	M467K		2022insT	
	M467T	Μεγάλα Ελλείμματα,	~114-1306del	
	G481V	Προσθήκες	~198-1575del	
	E482K		~782-804del	
	P508A		Exon1-7del	
	Q510R		Exon2-10del	
	V536G		Exon5-9dup	
	S547W		Exon10del	
	Y582H		431-3C to 463Tdel	
	R584T		and dupl ins T468-A474	
	F599S			





Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση των μεταλλάξεων λάθους νοήματος ή χωρίς νόημα και των πολυμορφισμών της πρωτεΐνης rBAT. Όλες οι μεταλλάξεις βρίσκονται στο εξωκυττάριο τμήμα της (12 από τις οποίες πιο κοντά στο καρβοξυτελικό της άκρο), 2 πολυμορφισμοί βρίσκονται στο ενδοκυττάριο αμινοτελικό της άκρο και οι υπόλοιποι 8 κοντά στο εξωκυττάριο καρβοξυτελικό της άκρο (rBAT: προϊόν έκφρασης του SLC3A1, COOH: καρβοξυτελικό άκρο, NH₂: αμινοτελικό άκρο, TM: διαμεμβρανική επικράτεια, hc: βαρεία αλυσίδα).

Η μετάλλαξη με την μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης είναι αυτή της αντικατάστασης της θρεονίνης (T) από την μεθειονίνη (M) στη θέση 216 (T216M). Έχει παγκόσμια εξάπλωση και δεν φαίνεται, σύμφωνα με πρόσφατα αποτελέσματα, να περιορίζεται σε κάποια ιδιαίτερη πληθυσμιακή ομάδα. Ωστόσο, με νεότερες μελέτες κατά τις οποίες ερευνήθηκαν και επτά Έλληνες ασθενείς, διαπιστώθηκε ότι οι έξι ήταν ομόζυγοι για τη συγκεκριμένη μετάλλαξη, γεγονός που ενίσχυσε την υπόθεση για ύπαρξη συγκεκριμένων μεταλλάξεων στους Έλληνες κυστινουρικούς ασθενείς [1, 68, 81].

Η ύπαρξη συσχέτισης της καταγωγής των ασθενών με την μοριακή βάση της νόσου υποστηρίζεται από αποτελέσματα και άλλων ερευνητικών ομάδων [63, 66, 82-84]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η γενετική βάση της κυστινουρίας στους Λίβυους Εβραϊκής καταγωγής, η οποία οφείλεται αποκλειστικά και μόνο στην μετάλλαξη V170M του γονιδίου SLC7A9 [83, 85]. Σε μια τέτοια περίπτωση η γενετική βάση της νόσου ακολουθεί το μοντέλο της “Αρχής του Ιδρυτού”. Επιπλέον, η μετάλλαξη της μεθειονίνης από την θρεονίνη στη θέση 467 (M467T) του γονιδίου SLC3A1, η οποία είναι η συχνότερη μετάλλαξη στην Νότια Ευρώπη (26%), εμφανίζεται κυρίως στους Ισπανούς αλλά αποτελεί επίσης και την συχνότερη μετάλλαξη αυτού του γονιδίου και στους Ιταλούς, στους Γερμανούς και Τούρκους κυστινουρικούς ασθενείς [63, 66, 82, 84]. Στους τελευταίους βρέθηκε να υπάρχει ανισορροπία σύνδεσης της μετάλλαξης M467T με τον πολυμορφισμό 231T/A, ενώ η δεύτερη πιο συχνή μετάλλαξη που εμφανίζεται στους ίδιους ασθενείς είναι αυτή της αντικατάστασης της μεθειονίνης από την λυσίνη στην ίδια θέση (M467K) [72]. Αξίζει, άλλωστε, να αναφερθεί ότι παρόμοια κατάσταση, συσχέτισης της καταγωγής των ασθενών με τις μεταλλάξεις τις οποίες φέρουν, ισχύει και για την περίπτωση της κυστικής ίνωσης, μιας άλλης υπολειπόμενης αυτοσωματικής νόσου [86].

Η συχνότητα με την οποία βρίσκεται κάποια μετάλλαξη στο γονίδιο SLC3A1 και των δύο χρωματωμάτων ενός κυστινουρικού ασθενή με φαινοτυπικά χαρακτηριστικά “τύπου I” βρέθηκε ότι είναι της τάξεως του 50-98% (<100%) [66, 67, 87]. Η αδυναμία να ερμηνευτεί η νόσος στο 100% των ασθενών “τύπου I” με εύρεση μεταλλάξεων στο γονίδιο SLC3A1 πιθανά να οφείλεται σε πολλούς λόγους, μεταξύ των οποίων στην ύπαρξη νουκλεοτιδικών αλλαγών στην περιοχή του προαγωγέα, γενετικών εξαλλαγών στα ιντρόνια ή στις ρυθμιστικές περιοχές του



γονιδίου που συνήθως δεν μελετώνται καθώς και στην μικρότερη από το 100% ευαισθησία της μεθόδου που χρησιμοποιείται στην ανίχνευση των μεταλλάξεων.

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο SLC3A1 όπως προαναφέρθηκε αποτελεί μία εκ των δύο υπομονάδων του ετεροδιμερούς συμπλόκου μεταφοράς της κυστίνης και των διβασικών αμινοξέων. Το γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί για την άλλη υπομονάδα του μεταφορικού συμπλόκου έχει βρεθεί ότι επίσης ευθύνεται για την πρόκληση της κυστινουρίας. Έτσι η μελέτη μελών οικογενειών με φαινοτυπικά χαρακτηριστικά “τύπου II” και “τύπου III” έδειξαν ότι τουλάχιστον ένα ακόμη γονίδιο σχετίζεται με την αιτιοπαθογένεια της νόσου, το SLC7A9 [18, 67, 85, 88, 89].

β) Το γονίδιο SLC7A9

Το γονίδιο SLC7A9 έχει μέγεθος 1754 bp και αποτελείται από 13 εξώνια. Το μικρότερο εξώνιο έχει μέγεθος 45 bp, ενώ το μεγαλύτερο 242 bp. Αντίθετα, το μικρότερο σε μέγεθος ιντρόνιο είναι της τάξεως των 240 bp, ενώ το μεγαλύτερο ιντρόνιο έχει μέγεθος 14.500 bp. Και σ' αυτό το γονίδιο ισχύει ο κανόνας ύπαρξης του δινουκλεοτιδίου GT στο 5' άκρο και του δινουκλεοτιδίου AG στο 3' άκρο των ιντρονίων. Το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης (ATG) έχει αναγνωριστεί στη θέση 186 (εξώνιο 2), ενώ το κωδικόνιο λήξης της (TAA) στη θέση 1647 (εξώνιο 13). Η πρωτεΐνη ($b^{0,+}$ AT) που προκύπτει από την έκφραση του γονιδίου αποτελείται από 468 αμινοξέα και αποτελεί μέλος της οικογένειας των graAT πρωτεϊνών (εικόνα 7) [90]. Στο γονίδιο SLC7A9 έχουν προσδιοριστεί 49 μεταλλάξεις, οι οποίες ταξινομούνται σε 26 μεταλλάξεις αλλαγής νοήματος (24 με λάθος νόημα και 2 χωρίς νόημα), 5 σε θέσεις συναρμογής, 4 μικρές προσθήκες, 12 μικρά ελλείμματα και 2 μεγάλα ελλείμματα (πίνακας 3, εικόνα 8) [72, 73, 75, 76, 81, 90-93].



Επιπλέον, στο γονίδιο SLC7A9 ανιχνεύθηκαν και οι ακόλουθοι 15 πολυμορφισμοί: 1-39C>T (147C>T), 201C>T (386C>T), 399C>T (584C>T), 411T>C (596T>C), 235+22T>G (IVS3+22T>G), 425T>C (610T>C), 478+10T>C (IVS4+10T>C), 507C>T (692C>T), 667C>A (852C>A), 687C>T (872C>T), 972G>A (1157G>A), 977+51A>G (IVS9+51A>G), 997C>T (1182C>T), 1143C>T (1328C>T), 1365C>T (1550C>T) (μέσα στην παρένθεση δίδεται η ονομασία τους όπως έχει δημοσιευθεί σύμφωνα με την αλληλουχία της εικόνας 7, ενώ έξω από αυτήν λαμβάνεται η αδενίνη της τριπλέτας ATG ως η αρχή της αριθμησης) (εικόνα 9) [81, 92, 94].

```

1   ggcacgaggg cacggggggt cagctgggcc gcagctcttc cggctctgca gggcacgga ggaaggtaag taagccagct ccctcagtc aggccgagct
101  tgcacttgcg tctgtctgc tctctctgaa ccaagattt cgtctgcgcc ctctctcag tctctctgaa ccagcaggag gaaacatggg ggalactggc ctgagaanag
211  ggaagagga tgaagaatcg atccagagcc aagagcctaa gaccaccagt ctccanaagg agctggcc ctacagctgc atctctca tctggctca
311  ggaagagga tgaagaatcg atccagagcc aagagcctaa gaccaccagt ctccanaagg agctggcc ctacagctgc atctctca tctggctca
421  ggaagagga tgaagaatcg atccagagcc aagagcctaa gaccaccagt ctccanaagg agctggcc ctacagctgc atctctca tctggctca
531  agcctgatcg tcaatagcc cagctcttc gccatctct cctcagctt cctcagatg tctctctgca ggcctcaggg cccatcccg cctactctt ctctctggcc
641  agcctggcc gcccccctca tctctctcag ctgacagtg aactcactga gctctctgct ggaagctac gtcacagaa tctctctcgc gcccaagctg gtagctgctg
751  gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg
861  tacaatggag tctgggctca tcatggatg aatcactca atcactcag agaaacctt acagaacct gccctggcc atctctcgc gtagctgctg
971  gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg
1081 gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg
1191 cacatctca aagctctc tcatcagc gtagctgctg tcatcagc ccccccctc atctctcag gtagctgctg aagctctc atctctcag gtagctgctg
1301 gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg
1411 tgcctgagc cctctctc tcatcagc tcatcagc gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg
1521 agccgctt tctctctc cactacaagt tggatggc tcaaaaatc tcaaaaatc tcaaaaatc tcaaaaatc tcaaaaatc tcaaaaatc tcaaaaatc
1631 gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg gtagctgctg
1741 atactcagat gtttaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa //

```

```

"MGDTGLRKRREDEKSIQSQEPKTTSLQKELEISGISIVGTHGSGIVSPKSYESNTEAVGPEL
WAACGYLALIGALCFAELGTMITKSGGEYPYLMEAYGPIPAYLFSWASLIVIKPFSFIIICLSF
SEYVCAPFYVGCKPPQIVVKCLAAAAIEFISTVNSLSYRLGSYVQNIPTAAKLVIVAIHISGLVTH
AGGNTKNFDFNSFEQAQLSVGAISLAFYNGLWAYDGNQNLNYITEELRNPYRNLPLAIIHIGPLV
TACYILMNVSYFTVMTATELLQSQAVAVITGDRVLYPASWIVPLFVAFSTIGAANGTCF.TAGR
LIYVAGREGHMLKVLVSYISVRRLLTPAPAIIFYGIATLYHPGDINSLVNYSEFAAWLEYGLTILGL
VQRIRKELERPIKVPVVIPVLMTLISVFLVLAPIISKPTWEYLYCVLFILSGLLFYFLFVHYKFG
WAQKISKPIHMHCOMEMENAVPEEDRE"

```

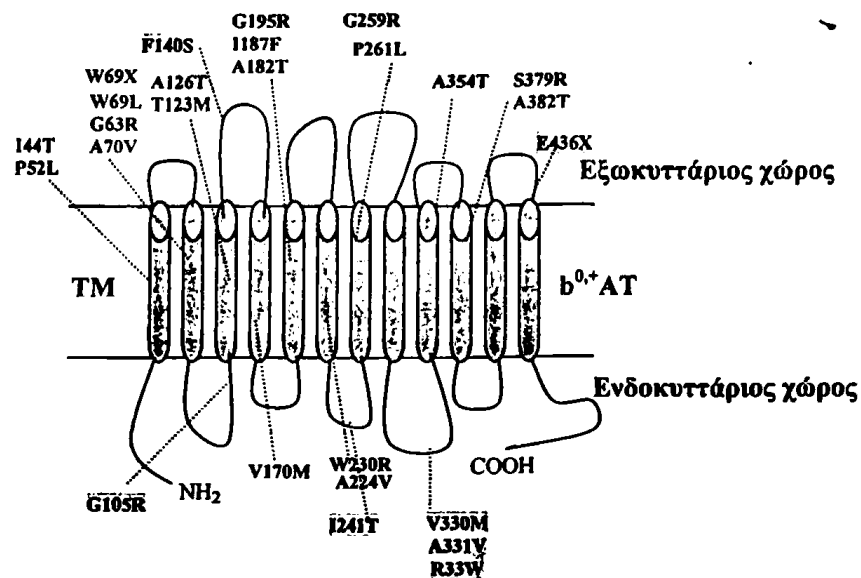
Εικόνα 7: Η κωδικοποιούσα αλληλουχία του γονιδίου SLC7A9 (GenBank: NM_014270.1) και η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί. Επισημαίνεται κάθε εξώνιο (2-13) και το αντίστοιχο τμήμα που κωδικοποιεί στην πρωτεΐνη.



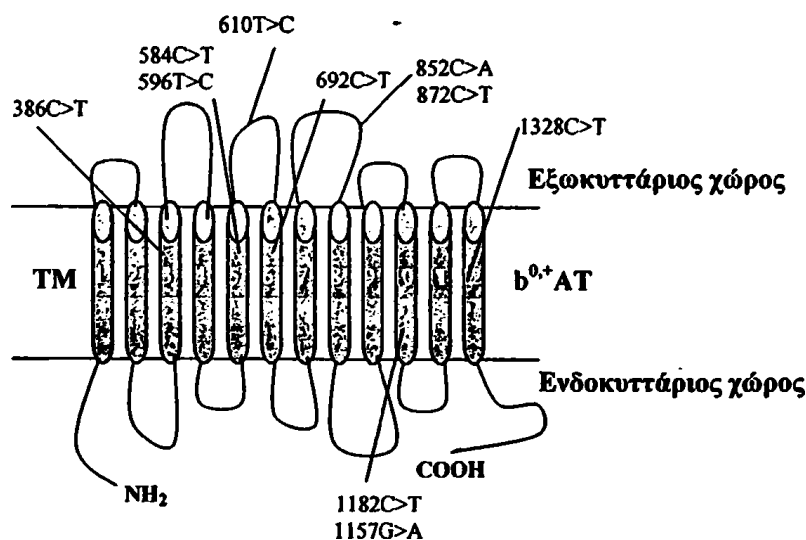
Πίνακας 3: Αναλυτική περιγραφή των διαφόρων τύπων μεταλλάξεων του γονιδίου SLC7A9.

Τύπος μετάλλαξης	Μετάλλαξη	Τύπος μετάλλαξης	Μετάλλαξη
Αλλαγής νοήματος	I44T	Χωρίς νόημα	W69X
	P52L		E436X
	G63R	Σε θέση συναρμογής	IVS5+1G→A
	W69L		IVS9+3A→T
	A70V		IVS9-17G G→A
	G105R		IVS12+4delAGTA
	T123M		IVS12+3IVS12+6delAAGT
	A126T	Ελλείμματα, Προσθήκες	213-215delAGA
	F140S		553-554delCG
	V170M		596-597delTG
	A182T		686-689delACTG
	I187F		747delG
	G195R		815-818delTTTC
	A224V		897-901delCTCAA
	W230R		916-918delGGA
	I241T		969-971delCTG
	G259R		998delC
	P261L		1009delT
	V330M		1455-1456delTT
	A331V		520-521insT
	R333W		660-661insGCC
	A354T		764-765insCAT
	S379R		800-801insA
	A382T	Μεγάλα Ελλείμματα	Exon1-13del
			Exon1-4del





Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση των μεταλλάξεων λάθους νοήματος ή χωρίς νόημα της πρωτεΐνης $b^{0,+}AT$. Προσδιορίζεται η θέση 26 μεταλλάξεων, όπου όλες εκτός από 8 βρίσκονται εντός των υποθετικών διαμεμβρανικών επικρατειών της $b^{0,+}AT$ πρωτεΐνης (μεταλλάξεις επισημασμένες). Οι υπόλοιπες 8 εντοπίζονται στους ενδοκυττάριους ή εξωκυττάριους βρόχους της ($b^{0,+}AT$: προϊόν έκφρασης του SLC7A9, COOH: καρβοξυτελικό άκρο, NH_2 : αμινοτελικό άκρο, TM: διαμεμβρανικές επικράτειες 1-12).



Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση των εξωκτικών πολυμορφισμών της πρωτεΐνης $b^{0,+}AT$. Οι 7 πολυμορφισμοί βρίσκονται σε TM και 3 σε εξωκυττάριους βρόχους ($b^{0,+}AT$: προϊόν έκφρασης του SLC7A9, COOH: καρβοξυτελικό άκρο, NH_2 : αμινοτελικό άκρο, TM: διαμεμβρανικές επικράτειες 1-12).

Η συχνότητα με την οποία βρίσκεται κάποια μετάλλαξη στα αλληλόμορφα του γονιδίου SLC7A9 ενός κυστινουρικού ασθενή με φαινοτυπικά χαρακτηριστικά “μη-τύπου I” βρέθηκε ότι είναι της τάξεως του 80% (93% των ασθενών “μη-τύπου I”) [90]. Η μη ανεύρεση μεταλλάξεων του SLC7A9 σε κάποιο από τα δύο χρωματοσώματα 19 μπορεί να οφείλεται στους ίδιους λόγους που προαναφέρθηκαν και στην περίπτωση του γονιδίου SLC3A1.

Αξίζει όμως να επισημανθούν τα αποτελέσματα ανίχνευσης μεταλλάξεων στο ανοικτό αναγνωστικό πλαίσιο (open reading frame/ ORF) και των δύο γονιδίων (SLC3A1 και SLC7A9) σε κυστινουρικούς ασθενείς οι οποίοι δεν είχαν προηγουμένα ταξινομηθεί βάσει των φαινοτυπικών τους χαρακτηριστικών σε κάποιο τύπο της νόσου [90]. Η συχνότητα με την οποία βρέθηκε κάποια μετάλλαξη στα αλληλόμορφα του γονιδίου SLC3A1 είτε του γονιδίου SLC7A9 ήταν της τάξεώς του 56% (78% των ασθενών). Το γεγονός αυτό αφήνει ανοικτή την πιθανότητα για ύπαρξη και άλλων γονιδίων πέραν των δύο προαναφερθέντων στη μοριακή ερμηνεία της νόσου. Έτσι ίσως εξηγείται μερικά το εναπομείναν 44% των αλληλομόρφων (22% των ασθενών), το οποίο είναι αρκετά υψηλό ποσοστό για να αποδοθεί στο σύνολο του σε κάποια από τις προαναφερθείσες ερμηνείες, που χρησιμοποιήθηκαν στις περιπτώσεις των γονιδίων SLC3A1 και SLC7A9 όταν εκτιμήθηκε το ποσοστό εύρεσης μετάλλαξης σε κάποιο από τα γονίδια σε συνδυασμό με τον τύπο της νόσου (“τύπος I” ή “μη-τύπος I” κυστινουρίας).

γ) Το γονίδιο SLC7A10

Υπάρχουν άλλα γονίδια που να σχετίζονται με την κυστινουρία πέραν των SLC3A1 και SLC7A9; Με τα μέχρι πρότινος δεδομένα των ερευνητικών προσπαθειών δεν είχε δοθεί μία απόλυτη απάντηση στο προαναφερθέν ερώτημα.



Ωστόσο, πιο πρόσφατα δεδομένα φαίνεται να ενοχοποιούν και ένα τρίτο γονίδιο, το SLC7A10 (19q13.1), το οποίο συγκροτείται από 11 εξόνια και κωδικοποιεί πρωτεΐνη 523 αμινοξέων (εικόνα 10) [20]. Μία μετάλλαξη με λάθος νόημα (E112D), η οποία βρέθηκε σε μία εκ των κυστινουρικών οικογενειών, πιθανότατα να σχετίζεται θετικά με την πρόκληση της νόσου. Επίσης, μόνο σε κυστινουρικούς ασθενείς αναγνωρίστηκε μία αλλαγή σ' ένα ιντρόνιο του γονιδίου SLC7A10 (IVS7+20G>T ή 1017+20G>T), και μία σιωπηρή μετάλλαξη (267G>A, S56S). Τέλος, ανιχνεύθηκαν και δύο πολυμορφισμοί, ο IVS6-11C>T (913-11C>T) και ο 1473G>T (T458T).

```

1  cggctcggag ggcctgagc tcacggaccg acggaccgac gggcggccgg ccggaccgac gggcggccg acggaccgac ggcctgagc
101  gggcggccg acgaccgag ccggaccgac gggcggccg ccggaccgac gggcggccg acggaccgac ggcctgagc ggcctgagc
201  ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc
311  ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc
421  ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc
531  ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc
641  ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc
751  ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc
861  ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc
971  ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc
1081  ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc
1191  ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc
1301  ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc
1411  ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc
1521  ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc
1621  ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc
1731  ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc
1841  ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc ggcctgagc

```

```

"MAQHTQPSGRGNPRPAPSPSPVPGTVPGASERVALKKEIGLLSACTIIIUNIGSGHIBKQAVI
RHEIVRVAZAVAVIISGAVIARVAVIARVAVIARVAVIARVAVIARVAVIARVAVIARVAVI
MYPTSLAVISMFTFSNYVLQPVFPNCIPPFTASRVLSMACI.MLLWVNSSSVRWATRIQDMRIG
RVALESLIIGVGEIQIQGHIFEELRPSNAFAFWMTPSVGHILALAFLOGSFAFSGWNFLNYVTB
EMVDARKNLPRAIFISIPLVTFVYFTFNIAFYFTAMSPQELLESNAAVAVTFGEKLLGYFSWMPV
SVALSTFGGINGYLFTYSRLARVQAREGHLESLIAMIHYRHCTPIPALIVGCGATAVIMLVGDT
YTLINYSVFINYLGYVILGLLLRWRRPALHRPIKVAIIPVAVIIVAVIARVAVIARVAVIARVAVI
AVAVIARVAVIARVAVIARVAVIARVAVIARVAVIARVAVIARVAVIARVAVIARVAVIARVAVI
BSMTHWQQLCFVVYPQDAPEEEENGPCPPSLI
PATDKPSKPK"

```

Εικόνα 10: Η κωδικοποιούσα αλληλουχία του γονιδίου SLC7A10 (GenBank: NM_019849.1) και η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί. Επισημαίνεται κάθε εξόνιο και το αντίστοιχο τμήμα που κωδικοποιεί στην πρωτεΐνη.



Βάσει των προαναφερθέντων παρατηρήσεων δικαιολογείται η ανάγκη περαιτέρω έρευνας του SLC7A10 ως ένα άλλο υποψήφιο γονίδιο για την αιτιοπαθογένεια της κυστινουρίας. Αξίζει να σημειωθεί ότι το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί την asc υπομονάδα του βασειπλευρικού 4F2hc/asc συμπλόκου μεταφοράς των μικρών ουδέτερων αμινοξέων όπως της κυστίνης, όχι όμως και των διβασικών αμινοξέων που επίσης απεκκρίνονται σε υψηλά επίπεδα στην κυστινουρία [95, 96]. Για το λόγο αυτό χρήζει επιπρόσθετης μελέτης η πιθανότητα εμπλοκής της κωδικοποιούσας πρωτεΐνης του SLC7A10 στο βιοχημικό μονοπάτι μεταφοράς της κυστίνης και των τριών διβασικών αμινοξέων πριν το τελικό συμπέρασμα για την πιθανή συμμετοχή του στην γενετική ερμηνεία της νόσου.

Αν και το γονίδιο SLC7A9 θεωρείται το κυρίως υπεύθυνο στην πρόκληση της “μη-τύπου I” κυστινουρίας ίσως και άλλα γονίδια όπως το SLC7A10 να εμπλέκονται σε αυτήν. Η ανακάλυψη επιπλέον μεταλλάξεων στο γονίδιο SLC7A10 κρίνεται καθοριστικής σημασίας προκειμένου να επιβεβαιωθεί η υπόθεση της συμμετοχής του στην πρόκληση της κυστινουρίας “μη-τύπου I” ή “μικτού τύπου”. Άλλωστε, κάτι τέτοιο θα ήταν σύμφωνο και με την υπόθεση ότι η διαφοροποίηση που παρατηρείται στο πρότυπο κατανομής των πρωτεϊνών rBAT και b^{0,+}AT πιθανά σχετίζεται και με την παρουσία άλλων πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την rBAT πρωτεΐνη [90, 97, 98]. Η επιβεβαίωση της συμμετοχής του γονιδίου SLC7A10 στην πρόκληση της κυστινουρίας και πιθανότατα μελλοντικά και κάποιων άλλων γονιδίων, αναμένεται ότι θα αυξήσουν το πλήθος των προαναφερθέντων κατηγοριών κατάταξης των κυστινουρικών ασθενών. Αναμφισβήτητα, όμως, η λεπτομερής και εμπεριστατωμένη έρευνα της γενετικής βάσης της νόσου θα βοηθήσει στο να κατανοηθεί πλήρως η αιτιοπαθογένειά της και να προβλέπεται κάθε φορά ο κλινικός φαινότυπος ενός κυστινουρικού ατόμου.



Η μελέτη της γενετικής/ μοριακής βάσης της κυστινουρίας και η συσχέτισή της με τον κλινικό φαινότυπο είναι φανερό ότι θα βοηθήσει στην αντιμετώπιση της νόσου ανάλογα με το γενετικό προφίλ κάθε κυστινουρικού ασθενή. Στις περιπτώσεις εκείνες που παρατηρείται βαρεία κλινική έκφραση της νόσου θεωρείται απαραίτητη η συνταγογράφηση στον ασθενή και μιας κατάλληλης φαρμακευτικής αγωγής εκτός από την βασική διαιτολογική προσέγγιση. Για τον ίδιο λόγο προτείνεται πλέον η κατάταξη των κυστινουρικών ασθενών να γίνεται με κριτήριο τη μετάλλαξη/ μεταλλάξεις τις οποίες φέρουν και όχι με βάση τα επίπεδα κυστίνης στα ούρα τους, τα οποία ενδέχεται να υπόκεινται σε διακυμάνσεις ανάλογα με την προσληφθείσα τροφή, καθώς και σε ενδογενείς ανατομικούς και παθοφυσιολογικούς παράγοντες, αλλά και στην ευαισθησία της μεθόδου με την οποία προσδιορίστηκαν [99, 100].

ΣΤ. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ-ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ ΣΤΟ SLC7A9

Στην εικόνα 8 δίδεται σχηματικά η θέση των σημειακών μεταλλάξεων αλλαγής νοήματος του γονιδίου SLC7A9 κατά μήκος των δώδεκα διαμεμβρανικών επικρατειών της b^{0,+}AT πρωτεΐνης. Οι περισσότερες από τις μεταλλάξεις με λάθος νόημα εντοπίζονται στις υποθετικές διαμεμβρανικές επικράτειες και λιγιστές στους υποθετικούς ενδοκυττάριους ή εξωκυττάριους βρόχους. Από τις πιο συχνές μεταλλάξεις του γονιδίου SLC7A9 είναι οι: G105R (25%), V170M, R333W, c.800-801insA και A182T [72, 73, 81, 90, 92, 93]. Αυτό που παρατηρήθηκε σε γενικές γραμμές είναι η ύπαρξη διαφορών στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά μέσα σε ένα πληθυσμό ετερόζυγων κυστινουρικών ασθενών “μη-τύπου I” [90]. Έτσι κάποια από τα ετερόζυγα “μη-τύπου I” κυστινουρικά άτομα απεκκρίνουν την κυστίνη και τα άλλα διβασικά αμινοξέα σε μικρότερα επίπεδα (χαρακτηριστικό της “τύπου III” κυστινουρίας), ενώ κάποια άλλα σε πολύ υψηλότερα επίπεδα (χαρακτηριστικό της



“τύπου II” κυστινουρίας). Παρόμοιες διαφοροποιήσεις έχει βρεθεί να ισχύουν ακόμη και μεταξύ των ετερόζυγων ατόμων που φέρουν την ίδια μετάλλαξη όπως για παράδειγμα στην περίπτωση των μεταλλάξεων G105R και R333W [90]. Αυτό πιθανώς να δηλώνει έμμεσα ότι η “τύπου II” και η “τύπου III” κυστινουρία προκαλούνται από μεταλλάξεις του ίδιου γονιδίου, επομένως άλλοι περιβαλλοντικοί και/ή γενετικοί παράγοντες πρέπει να ευθύνονται για τις παρατηρούμενες διαφορές στη νεφρική απέκκριση της κυστίνης και των τριών διβασικών αμινοξέων.

Αναφερόμενοι αναλυτικότερα, έχει διαπιστωθεί ότι οι ετεροζυγώτες της μετάλλαξης G105R ή V170M μπορεί να εμφανίζουν επίπεδα νεφρικής απέκκρισης της κυστίνης και του συνόλου των τεσσάρων αμινοξέων (Cys, Orn, Lys, Arg) κοντά στα φυσιολογικά όρια, ενώ κάποιοι άλλοι κοντά στα επίπεδα που χαρακτηρίζουν τους ομόζυγους κυστινουρικούς ασθενείς “μη-τύπου I”. Επιπλέον, πέραν από τις διαφορές στις φαινοτυπικές εκφράσεις των ιδίων μεταλλάξεων από άτομο σε άτομο, παρατηρήθηκε διαφόρου βαθμού βαρύτητα στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των ετερόζυγων ατόμων με διαφορετικές μεταλλάξεις. Έτσι τα ετερόζυγα άτομα της μετάλλαξης A182T εμφανίζουν τα μικρότερα επίπεδα (3,5 φορές μεγαλύτερα των ορίων όπως αυτά ορίζονται στα υγιή άτομα), ενώ αυτά της μετάλλαξης R333W τα υψηλότερα επίπεδα (18 φορές μεγαλύτερα από τα υγιή άτομα) νεφρικής απέκκρισης της κυστίνης και των τριών διβασικών αμινοξέων [90]. Ενδιάμεσης βαρύτητας είναι τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά στους ετερόζυγους ασθενείς για την μετάλλαξη V170M (8 φορές μεγαλύτερα από τα υγιή άτομα), την G105R (10 φορές μεγαλύτερα από τα υγιή άτομα) και την c.800-801insA (13 φορές μεγαλύτερα από τα υγιή άτομα) [90].

Η ίδια διασπορά στις μετρήσεις ισχύει και στην περίπτωση των ετερόζυγων ατόμων με σπάνιες μεταλλάξεις του γονιδίου SLC7A9. Έτσι οι ετεροζυγώτες για την



μετάλλαξη T123M, I241T, G63R ή A126T εμφανίζουν ήπια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά (νεφρική απέκκριση Cys \leq 200 $\mu\text{mol/g}$ κρεατινίνης, νεφρική απέκκριση Cys+Orn+Lys+Arg \leq 1000 $\mu\text{mol/g}$ κρεατινίνης). Αντίθετα, στις περιπτώσεις των μεταλλάξεων P52L, G195R, G259R όπως και σε αυτές της μετατόπισης του αναγνωστικού πλαισίου, οι φαινοτυπικές εκφράσεις της νόσου είναι βαρύτερης μορφής [90].

Η ταυτόχρονη επιμόλυνση των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας (human cervical carcinoma cells/ HeLa) με τις άγριου τύπου πρωτεΐνες $b^{0,+}$ AT και rBAT οδήγησε σε αύξηση κατά 7 φορές των επιπέδων μεταφοράς της κυστίνης σε σχέση με αυτήν που παρατηρήθηκε όταν: α) τα κύτταρα είχαν επιμολυνθεί μόνο με την rBAT πρωτεΐνη ή β) σε μη επιμολυσμένα κύτταρα. Το γεγονός αυτό κατ' αρχήν δείχνει ότι είναι απαραίτητη η συνέκφραση και των δύο πρωτεϊνών προκειμένου να υπάρξει η μεταφορά της κυστίνης και των τριών διβασικών αμινοξέων [90]. Μελετώντας στη συνέχεια οι ερευνητές διάφορες μεταλλάξεις στο προϊόν έκφρασης του γονιδίου SLC7A9 με το οποίο επιμόλυναν τα κύτταρα HeLa διαπίστωσαν ότι στην περίπτωση της μετάλλαξης A182T διατηρείται περίπου το 60% της μεταφορικής δραστηριότητας σε σύγκριση με αυτό που εκφράζεται από το άγριου τύπου σύμπλοκο $b^{0,+}$ AT/rBAT. Έτσι τα ετερόζυγα άτομα που φέρουν τη συγκεκριμένη μετάλλαξη δείχνουν ήπιου βαθμού φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της νόσου. Αντίθετα, τα χαρακτηριστικά του κυστινουρικού φαινοτύπου είναι βαρύτερα στα άτομα που στο γενετικό τους υλικό φέρουν μία εκ των εξής μεταλλάξεων: G105R, V170M, R333W και A354T. Πιο συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ότι όταν στη δομή του μεταφορέα επιδρά μια εξ αυτών των μεταλλάξεων τότε διατηρείται το 10% ή και λιγότερο της μεταφορικής δραστηριότητας του άγριου τύπου συμπλόκου [90].



Η εξήγηση των προαναφερθέντων παρατηρήσεων έγκειται στο γεγονός ότι οι μεταλλάξεις μετατόπισης του αναγνωστικού πλαισίου και μεταλλάξεις με λάθος νόημα επηρεάζουν υψηλού βαθμού εξελικτικής διατήρησης αμινοξέα των ελαφριών αλυσίδων του ετεροδιμερούς μεταφορέα. Αντίθετα, η πιο ήπιας μορφής μεταλλάξεις με λάθος νόημα επηρεάζουν αμινοξέα της ελαφριάς υπομονάδας του ετεροδιμερούς μεταφορέα, τα οποία διαφοροποιούνται σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των μελών της LSHAT οικογένειας [90]. Η μόνη μετάλλαξη η οποία δεν φαίνεται να ακολουθεί αυτόν τον κανόνα είναι η G63R. Η γλυκίνη (Gly) της θέσης 63 βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο της υποθετικής διαμεμβρανικής επικράτειας II της $b^{0,+}AT$ πρωτεΐνης και είναι σε μεγάλο βαθμό διατηρημένη σε όλα τα μέλη της οικογένειας των ελαφριών αλυσίδων των ετεροδιμερών μεταφορέων των αμινοξέων. Ωστόσο, οι μεταλλάξεις της γλυκίνης αυτής βρέθηκε να σχετίζονται με ήπια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά [90].

Φαίνεται, λοιπόν, ότι η γονοτυπική-φαινοτυπική σχέση που παρατηρείται στις μεταλλάξεις του γονιδίου SLC7A9 δίνει τη δυνατότητα εύρεσης πολλών πληροφοριών που αφορούν τα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των υπομονάδων στα ετεροδιμερή συστήματα μεταφοράς των αμινοξέων. Οι περισσότερες από τις πιο συχνές μεταλλάξεις λάθους νοήματος του γονιδίου SLC7A9 εντοπίζονται εντός των υποθετικών διαμεμβρανικών επικρατειών της $b^{0,+}AT$ πρωτεΐνης και η συντριπτική πλειοψηφία τους αφορά αμινοξέα τα οποία διαθέτουν μικρή πλευρική αλυσίδα (ομάδα -R) (π.χ. G63R, A70V, A126T, A182T, G195R, G259R και A354T). Η σημασία αυτών των αμινοξέων (Gly, Ala ή Ser) στις περιοχές αλληλεπίδρασης των α -ελίκων των διαμεμβρανικών επικρατειών (trans-membrane/TM) διαφωτίστηκε σε πρόσφατες μελέτες [90, 101-103]. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι η $b^{0,+}AT$ πρωτεΐνη περιέχει σε μεγάλο βαθμό εξελικτικά



διατηρημένα αμινοξέα (την Gly και/ή την Ala) στις υποθετικές διαμεμβρανικές επικράτειες I, II, V, VI, X και XII. Επιπλέον, στην $b^{0,+}AT$ πρωτεΐνη υπάρχουν υψηλά διατηρημένα πρότυπα που αφορούν την αλληλεπίδραση συγκεκριμένων ελίκων τύπου $SmxxxSm$ (όπου το Sm αντιστοιχεί σε κάποιο από τα αμινοξέα με μικρή πλευρική αλυσίδα: Gly, Ala ή Ser) [90].

Τρεις από τις μεταλλάξεις λάθους νοήματος του γονιδίου $SLC7A9$ (G195R, G259R και A354T) βρίσκονται κεντρικά στις υποθετικές διαμεμβρανικές επικράτειες της $b^{0,+}AT$ πρωτεΐνης. Οι μεταλλάξεις αυτές προκαλούν σε όλες τις ευκαρυωτικές LSHAT πρωτεΐνες που μελετήθηκαν αντικατάσταση αμινοξέων που έχουν μικρή πλευρική αλυσίδα δηλαδή της Gly ή της Ala. Η μετάλλαξη G259R εμφανίζεται στο διατηρημένο εξελικτικά $SmxxxSm$ πρότυπο αλληλεπίδρασης των ελίκων της διαμεμβρανικής επικράτειας VII. Αυτές οι τρεις μεταλλάξεις ευθύνονται για σοβαρά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά ή για μεγάλη μείωση της μεταφορικής δραστηριότητας σε HeLa κύτταρα των πειραματικών κυτταροκαλλιεργειών [90].

Αντίθετα προς αυτές τις μεταλλάξεις με σοβαρή κλινική έκφραση, οι γενετικές αλλαγές: A70V, A126T και A182T αφορούν αμινοξέα των διαμεμβρανικών επικρατειών στα οποία οι πλευρικές τους ομάδες είναι διαφορετικού μεγέθους σε σύγκριση με τα αντίστοιχά τους άλλων μελών της LSHAT οικογένειας. Στις μεταλλάξεις A70V και A182T διατηρείται ένα μεγάλο ποσοστό της άγριου τύπου μεταφορικής δραστηριότητας, και οι μεταλλάξεις A126T και A182T σχετίζονται συνήθως με ήπιας μορφής κλινική έκφραση της νόσου [90]. Έτσι όλα τα προαναφερθέντα στοιχεία στηρίζουν ισχυρά την άποψη ότι τα αμινοξέα με τις μικρές πλευρικές ομάδες, τα οποία έχουν διατηρηθεί στις διαμεμβρανικές επικράτειες των LSHAT πρωτεϊνών, μετέχουν πιθανά στην αλληλεπίδραση των ελίκων των



επικρατειών αυτών και οι μεταλλάξεις τους οδηγούν σε βαρεία κλινική έκφραση της νόσου.

Z. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ-ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ ΣΤΟ SLC3A1

Στις περιπτώσεις ετεροζυγωτίας των μεταλλάξεων του SLC3A1 γονιδίου δεν εκδηλώνεται η νόσος της κυστινουρίας, σε αντίθεση με την ετεροζυγωτία κάποιων μεταλλάξεων του SLC7A9 (13% των ασθενών) που όπως προαναφέρθηκε σχηματίζουν λίθους κυστίνης [81]. Η ομοζυγωτία των μεταλλάξεων του SLC3A1 συνοδεύεται με κλινική εκδήλωση της νόσου αν και πάλι τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά ποικίλουν από μετάλλαξη σε μετάλλαξη και από άτομο σε άτομο [13, 72].

Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στο ότι ανάλογα με το πού εντοπίζονται οι μεταλλάξεις επηρεάζουν διαφορετικά τη δομή και λειτουργία της rBAT πρωτεΐνης και κατ' επέκταση και του συμπλόκου rBAT/ b^{0,+}AT. Στο εξωκυττάριο τμήμα της rBAT πρωτεΐνης έχουν χαρακτηριστεί δύο διακριτές λειτουργικά επικράτειες [104]. Το καρβοξυτελικό άκρο της φαίνεται ότι μετέχει στη μεταφορική δραστηριότητα του συμπλόκου [65, 105]. Το υπόλοιπο και μεγαλύτερο τμήμα που εκτείνεται μεταξύ των αμινοξέων 125-512 δείχνει σημαντική ομοιότητα στην αλληλουχία (46%) με την αντίστοιχη επικράτεια της α-αμυλάσης (κεντρική επικράτεια των γλυκοσιδασών). Το κέντρο αυτής της επικράτειας συγκροτείται από εναλλασσόμενες α-έλικες και β-ελάσματα που σχηματίζουν μία εσωτερική διαμόρφωση 8 β-ελασμάτων και μία εξωτερική διαμόρφωση 8 α-ελίκων. Η λειτουργική σημασία αυτής της δομής είναι δύσκολο να ερμηνευθεί, καθώς έχει παρατηρηθεί σε πλήθος πρωτεϊνών με διαφορετικές μεταξύ τους ιδιότητες και λειτουργίες. Η εσωτερική διαμόρφωση είναι πλούσια σε υδρόφοβα αμινοξέα αποκλείοντας την περίπτωση να αποτελεί τμήμα του



καναλιού μεταφοράς του υποστρώματος. Αντίθετα, η υποθετική καταλυτική θέση της rBAT πρωτεΐνης φαίνεται ότι βρίσκεται αρκετά μακριά από την κυτταρική της μεμβράνη [43-45].

Η μελέτη των λειτουργικών επιπτώσεων των μεταλλάξεων που εντοπίζονται στην επικράτεια μεταξύ των αμινοξέων 125 και 512 έδειξε ότι προκαλεί μειωμένη μετατόπιση του συμπλόκου rBAT/b^{0,+}AT στην κυτταρική μεμβράνη. Ανάλογη ήταν και η δράση των μεταλλάξεων στο καρβοξυτελικό άκρο της rBAT πρωτεΐνης, αλλά με τη διαφορά ότι σε αυτήν την περίπτωση επηρεάζονται επίσης και τα λειτουργικά χαρακτηριστικά του ετεροδιμερούς συμπλόκου [104]. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι μεταλλάξεις του SLC3A1 γονιδίου που έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα αφορούν και τις δύο αυτές λειτουργικές επικράτειες του εξωκυττάριου τμήματος της κωδικοποιούσας πρωτεΐνης του.

Η. ΟΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ

Αν πάρουμε δύο τυχαία ανθρώπινα γονιδιώματα θα έχουν ταύτιση πρωτοδιάταξης κατά 99,9%. Για την ποικιλομορφία στο υπόλοιπο 0,1% ευθύνονται κάποιες γενετικές αλλαγές γνωστές ως πολυμορφισμοί. Η πιο απλή κατηγορία αυτών των πολυμορφισμών και ταυτόχρονα και πιο συχνή είναι οι σημειακές υποκαταστάσεις των νουκλεοτιδίων, γνωστές και με τον όρο SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), που το ελάχιστο συχνότερό τους αλληλόμορφο έχει συχνότητα $\geq 1\%$ στο γενικό πληθυσμό [106, 107]. Τα SNPs απαντώνται στο ανθρώπινο γονιδίωμα με συχνότητα της τάξεως του 1/200-300 ζεύγη βάσεων και χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: α) τα cSNPs (coding-region SNPs) είναι οι πολυμορφισμοί που αλλάζουν την αλληλουχία των αμινοξέων της πρωτεΐνης. Εάν λάβουμε υπόψη μας ότι στον άνθρωπο υπάρχουν περίπου 75.000 γονίδια και σε κάθε



γονίδιο υπάρχουν περίπου 4 cSNPs, προκύπτει ότι στο ανθρώπινο γονιδίωμα υπάρχουν 240.000-400.000 cSNPs και ότι κάθε άτομο είναι ετερόζυγο για 24.000-40.000 cSNPs [108], β) τα pSNPs (perigenic SNPs) είναι οι πολυμορφισμοί εντός ή στις άμεσα γειτονικές περιοχές των κωδικοποιούντων αλληλουχιών των γονιδίων. Τα pSNPs σχετίζονται με σιωπηρές αλλαγές και αλλαγές στις μη κωδικοποιούσες περιοχές των γονιδίων (ιντρόνια, αλληλουχία 5'-άκρου, αλληλουχία 3'-άκρου). Οι άμεσα γειτνιάζουσες αλληλουχίες των εξωνίων είναι σε μεγάλο βαθμό συντηρημένες, σε αντίστοιχο βαθμό με αυτόν των εξωνίων, οπότε και φέρουν στο σύνολό τους 250.000-500.000 pSNPs [108], και γ) τα rSNPs (random noncoding SNPs) απαντώνται στις ενδιάμεσες αλληλουχίες DNA ("junk"), δημιουργούνται 4 φορές πιο συχνά και αντιστοιχούν σε $5-29 \times 10^6$ SNPs.

Οι πολυμορφισμοί του γονιδιώματος έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τους εξής λόγους: α) όταν ένα SNP βρίσκεται σε κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδίου και προκαλεί αλλαγή στη δομή της πρωτεΐνης ή στα επίπεδα έκφρασής της, τότε μπορεί να προκαλέσει νόσημα ή λεπτές διαφορές στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά κάποιου νοσήματος, β) τα SNPs ίσως να σχετίζονται άμεσα και να προσδιορίζουν την παρουσία κάποιων άλλων γενετικών αλλαγών που για κάποιο λόγο δεν είναι εύκολο να ανιχνευθούν, αλλά που προκαλούν νόσημα, γ) στη μελέτη του ρυθμού δημιουργίας των μεταλλάξεων και των φυλογενετικών σχέσεων, και δ) στην διαφορετική απόκριση των ατόμων στην χορηγούμενη φαρμακευτική αγωγή. Όταν ένα φάρμακο εισέρχεται στον οργανισμό, η τύχη του εξαρτάται από την πρόσληψή του, τη σύνδεσή του στις θέσεις-στόχους και την κατανομή, τον μεταβολισμό και την απέκκρισή του. Στα πλαίσια της φαρμακογενετικής εξετάζεται η διαφορετική αυτή απόκριση των ατόμων στα φάρμακα που εξαρτάται όμως από γενετικούς παράγοντες.

Με τη σειρά της η φαρμακογενωμική στοχεύει στην εύρεση νέων φαρμακευτικών



σκευασμάτων τα οποία αυξάνουν την αποτελεσματικότητά τους έχοντας ως βάση τη γνώση που έχει προκύψει από τη φαρμακογενετική.

Αυτό που προσδοκείται είναι σε πρώτη φάση ο προσδιορισμός των SNPs [109, 110]. Σύγχρονες μεθοδολογίες όπως τα DNA chips δίνουν τη δυνατότητα γρήγορης σάρωσης του γονιδιώματος και την πεποίθηση ότι η ανίχνευση των πολυμορφισμών του ανθρώπινου γονιδιώματος σύντομα θα ολοκληρωθεί. Παράλληλα μπορεί να προκύψουν και δεδομένα ταυτόχρονης παρουσίας κάποιων πολυμορφισμών (ανισορροπία σύνδεσης-linkage disequilibrium) που οδηγούν σε συγκεκριμένους γονοτύπους/ απλοτύπους στον άνθρωπο [111, 112]. Η συνεργασία κλινικών γενετιστών, μοριακών βιολόγων, φαρμακογενετιστών, φαρμακογενωμιστών, βιοπληροφοριακών, πιστεύεται ότι θα βοηθήσει τη συσχέτιση ενός ή περισσότερων SNPs με: α) την παρουσία κάποιου νοσήματος, β) τις διαφορές στις φαινοτυπικές εκφράσεις του νοσήματος, γ) την αποτελεσματικότητα στη δράση των φαρμάκων και δ) την εύρεση πιθανών νέων στόχων δράσης των φαρμάκων τα οποία θα αυξήσουν την αποτελεσματικότητά τους αφού θα βασίζονται στο γενετικό προφίλ κάθε ασθενή μεμονωμένα.



ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν:

- Η μελέτη της γενετικής βάσης της κυστινουρίας σε 20 οικογένειες που συγκεντρώθηκαν από όλη την Ελλάδα.
- Η ερμηνεία σε μοριακό επίπεδο της επίπτωσης των μεταλλάξεων που ανιχνεύθηκαν και των αμινοξέων που κωδικοποιούν, επάνω στη δομή και λειτουργία του ετεροδιμερούς μεταφορέα που ευθύνεται για τη μεταφορά της κυστίνης και των τριών διβασικών αμινοξέων.
- Η μελέτη της πιθανολογούμενης συμμετοχής του γονιδίου SLC7A10 στη γενετική βάση της νόσου.
- Η μελέτη του ρόλου των πολυμορφισμών των γονιδίων στην φαινοτυπική έκφραση της κυστινουρίας.



ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

A. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΒΑΣΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ

α) Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR: Polymerase Chain Reaction)

Η ανάπτυξη της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) έχει προσφέρει πολλές δυνατότητες στη μελέτη του ανθρώπινου γονιδιώματος [113]. Η αξία της μεθόδου έγκειται στο γεγονός ότι επιτρέπει σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα την παραγωγή χιλιάδων αντιγράφων της επιθυμητής αλληλουχίας DNA χρησιμοποιώντας ελάχιστες ποσότητες ιστού, η οποία μπορεί να εφαρμοσθεί ακόμη και σε δείγμα με κατεστραμμένα πολλά από τα μακρομόριά του αφού μπορεί να επιλέξει και να ενισχύσει τα λίγα και άθικτα μόρια που υπάρχουν σε αυτό.

Η μέθοδος βασίζεται στη δράση μιας θερμοσταθερής πολυμεράσης που απομονώνεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* [114]. Απαραίτητη προϋπόθεση στο μίγμα της αντίδρασης είναι η παρουσία: α) της δίκλωνης αλληλουχίας DNA που πρόκειται να ενισχυθεί (μήτρα), β) των ολιγονουκλεοτιδίων μεγέθους 15-25bp που είναι συμπληρωματικά στα άκρα του υπό ενίσχυση τμήματος (primers), γ) διαλύματος ελεύθερων 5'-τριφωσφορικών-δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs), δ) ιόντων μαγνησίου και ε) του απαραίτητου ρυθμιστικού διαλύματος που διευκολύνει τη δράση της πολυμεράσης.

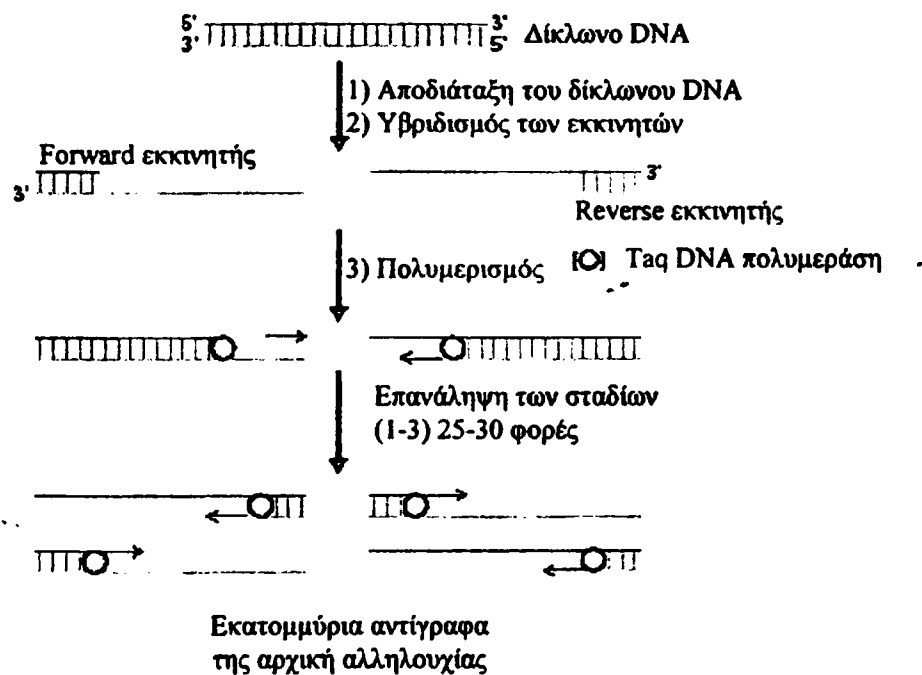
Κατά την πραγματοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης εκτελούνται τα εξής στάδια:

- Το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 95°C.



- Γίνεται σύνδεση (υβριδοποίηση) των εκκινητών στις συμπληρωματικές τους θέσεις στα άκρα του υπό ενίσχυση τμήματος (η θερμοκρασία εξαρτάται από το ζευγάρι των εκκινητών).
- Πολυμερισμός και δημιουργία των θυγατρικών μορίων στους 72 °C.

Ο θερμοκρασιακός κύκλος των τριών σταδίων επαναλαμβάνεται για 25-30 φορές οπότε και παράγονται εκατομμύρια αντίγραφα της αλληλουχίας-στόχου (εικόνα 11).



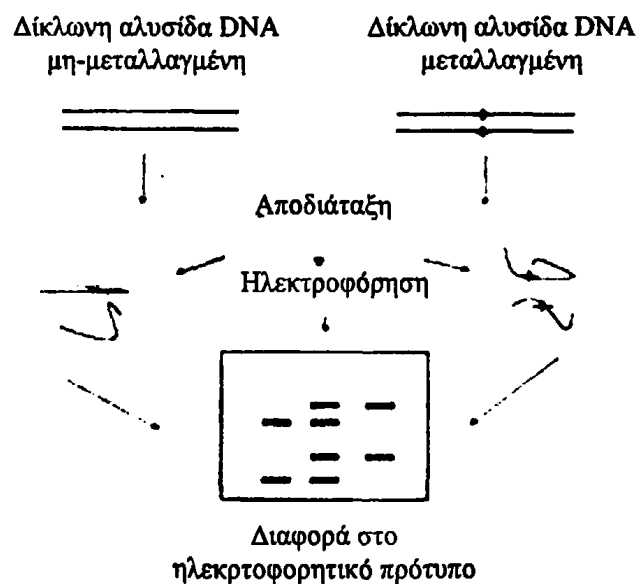
Εικόνα 11: Η μεθοδολογία της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR).

β) Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (μη-αποδιατακτικού) για ανίχνευση πολυμορφισμών στη διαμόρφωση μονόκλωνου DNA (SSCP-Single Strand Conformation Polymorphisms)

Η τριτοταγής διαμόρφωση του μονόκλωνου DNA αλλάζει σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και ιονικού περιβάλλοντος [115, 116]. Πάνω σε αυτή τη βασική αρχή βασίζεται η μεθοδολογία SSCP (εικόνα 12) [117]. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι 90% για τμήματα DNA μικρότερα των 200bp, 80% για τμήματα της



τάξεως των 300bp και μικραίνει όσο αυξάνεται το μέγεθος των PCR προϊόντων [118]. Καθώς η ευαισθησία της μεθόδου δεν είναι απόλυτη, η απουσία διαφορετικού ηλεκτροφορητικού προτύπου από αυτό του άγριου τύπου δε σημαίνει απαραίτητα και την μη ύπαρξη κάποιας άγνωστης γενετικής αλλαγής στο υπό μελέτη δείγμα. Αν και υπάρχουν εμπειρικοί κανόνες για την επιλογή των συνθηκών διαχωρισμού δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε απόλυτο βαθμό για την ανίχνευση άγνωστων μεταλλάξεων [119]. Προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία της μεθόδου εκτελείται σε διάφορες συνθήκες [118]. Η μέθοδος βρίσκει εφαρμογή στην ανίχνευση μεταλλάξεων και πολυμορφισμών όπως και υποψηφίων γονιδίων πρόκλησης μιας νόσου.



Εικόνα 12: Η μεθοδολογία SSCP.

Τα βασικά στάδια της μεθόδου είναι: α) η αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων DNA παρουσία των κατάλληλων αποδιατακτικών παραγόντων στην κατάλληλη θερμοκρασία (95°C), και β) η ηλεκτροφόρηση τους σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία της μεθόδου και να



φθάσει ίσως και το 99% αποκάλυψης των γενετικών αλλαγών χρησιμοποιείται: α) διαφορετική αναλογία ακρυλαμιδίου/bis-ακρυλαμιδίου, β) προσθήκη 5-10% γλυκερόλης στο μίγμα του πηκτώματος και γ) πραγματοποίηση της ηλεκτροφόρησης τόσο σε θερμοκρασία δωματίου όσο και σε θερμοκρασία 4 °C [118].

γ) Πρωτοδιάταξη του DNA: Μέθοδος Sanger ή ενζυμική μέθοδος

Η ενζυμική μέθοδος εύρεσης της αλληλουχίας του DNA βασίζεται στη διαφορά που υπάρχει μεταξύ των 2'-δεοξυριβονουκλεοτιδίων από τα 2',3'-δι-δεοξυριβονουκλεοτίδια [120]. Η σύνθεση της θυγατρικής αλυσίδας τερματίζεται όταν ένα 2',3'-δι-δεοξυ-ριβονουκλεοτίδιο ενσωματωθεί στο 3' άκρο της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι τα 2',3'-δι-δεοξυ-ριβονουκλεοτίδια δε διαθέτουν στο 3' άκρο τους υδροξυλική ομάδα με αποτέλεσμα την αδυναμία σχηματισμού φωσφοδιεστερικού δεσμού, οπότε και ο πολυμερισμός της θυγατρικής αλυσίδας τερματίζεται εκεί.

Τα βασικά στάδια της μεθόδου είναι τα ακόλουθα:

α) αποδιάταξη του προς ανάλυση δίκλωνου τμήματος DNA

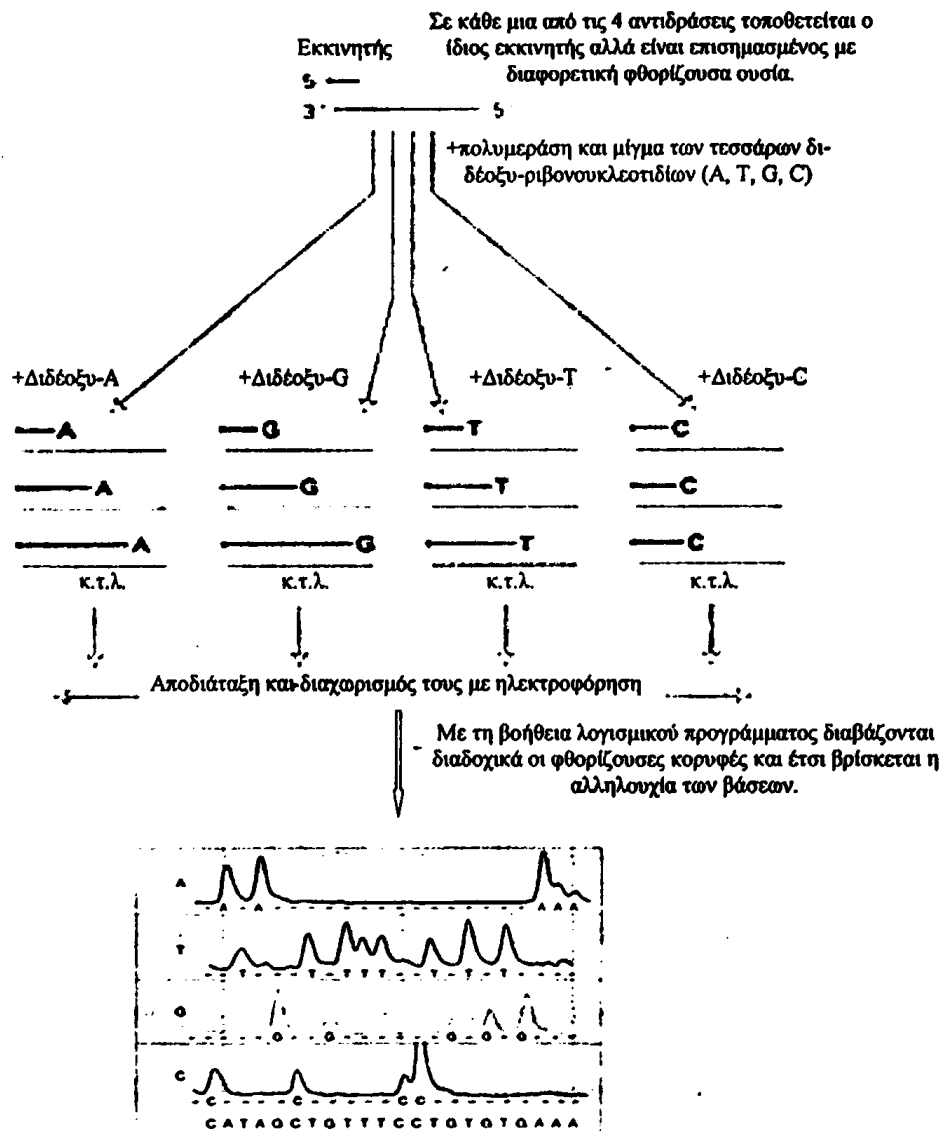
β) υβριδισμός του εκκινητή στο 3' άκρο της περιοχής που θα αναλυθεί

γ) σύνθεση της νέας αλυσίδας DNA με τη δράση της πολυμεράσης μετά από προσθήκη των κατάλληλων δεοξυριβονουκλεοτιδίων, ένα εκ των οποίων είναι ραδιενεργά επισημασμένο

δ) επιμήκυνση και τερματισμός της σύνθεσης της νέας αλυσίδας εφόσον η προηγούμενη αντίδραση χωριστεί σε τέσσερα ίσα μέρη. Σε καθένα από αυτά προστίθεται ένα εκ των τεσσάρων 2',3'-δι-δεοξυ-ριβονουκλεοτιδίων. Το αποτέλεσμα της διαδικασίας αυτής είναι η παραγωγή νέων ραδιενεργά επισημασμένων αλυσίδων DNA διαφορετικού μεγέθους, με κοινό τους γνώρισμα την ενσωμάτωση του ίδιου

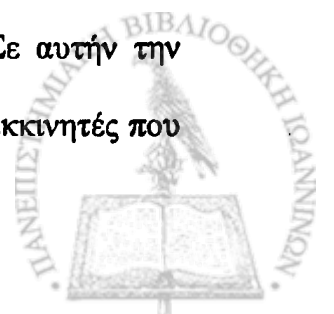


2',3'-δι-δεοξυ-ριβονουκλεοτιδίου στο τέλος των αλυσίδων της κάθε αντίδρασης. Τα προϊόντα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου-ουρίας και αυτοραδιογραφούνται, οπότε μετά από την εμφάνιση του φωτογραφικού φιλμ η αλληλουχία των βάσεων διαβάζεται με φορά από κάτω προς τα επάνω.



Εικόνα 13: Η μεθοδολογία εύρεσης της πρωτοδιάταξης του DNA (sequencing) κατά Sanger, όπως αυτή πραγματοποιείται στις μέρες από τους αυτόματους αναλυτές.

Στις μέρες μας τα πράγματα έχουν απλουστευθεί ακόμη περισσότερο με τους αυτόματους αναλυτές εύρεσης της πρωτοδιάταξης του DNA [121]. Σε αυτήν την περίπτωση χρησιμοποιούνται σε καθεμιά από τις τέσσερις αντιδράσεις εκκινητές που

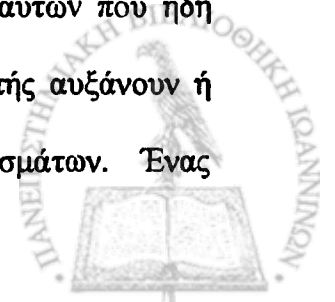


είναι επισημασμένοι με διαφορετική φθορίζουσα ουσία, οπότε και διαβάζεται αυτόματα το χρωματικό πρότυπο των διαδοχικών κορυφών (προϊόντα αυξανόμενου μοριακού βάρους λόγω τερματισμού της αντίδρασης σε διαδοχικές νουκλεοτιδικές βάσεις) που αντιστοιχεί στην αλληλουχία της υπό ανάλυση ακολουθίας (εικόνα 13).

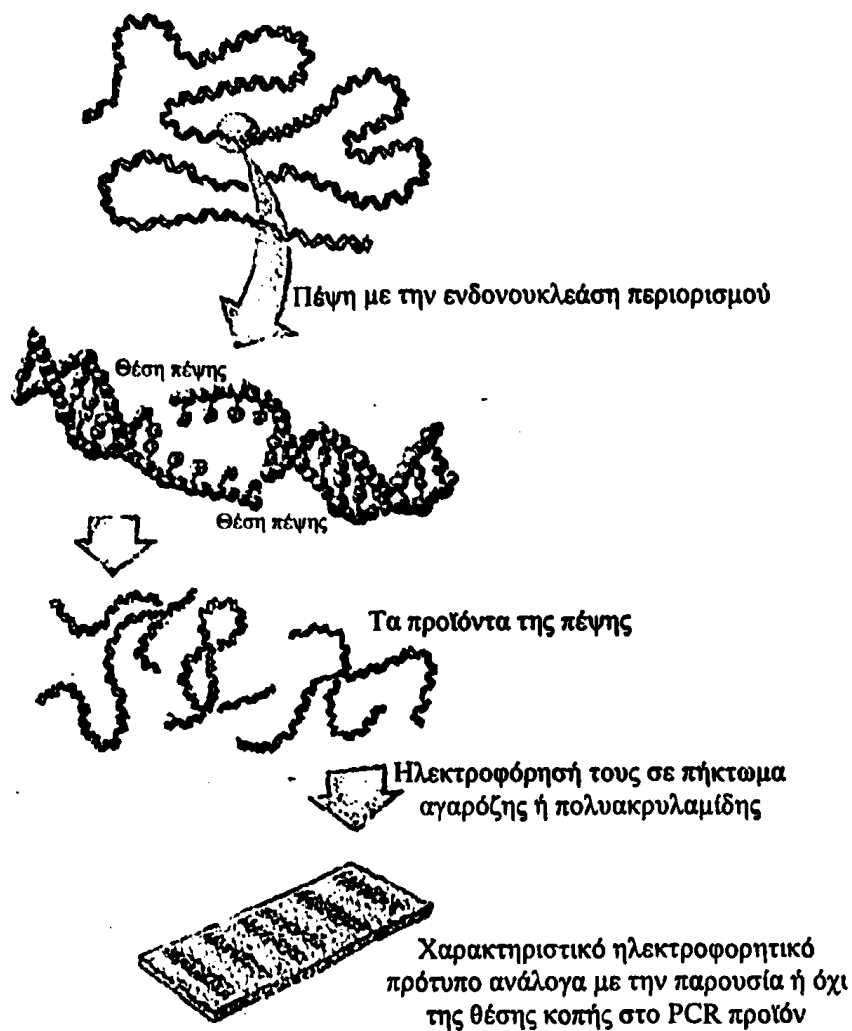
δ) Πολυμορφισμός μήκους περιοριστικών θραυσμάτων (RLFPs: Restriction Fragments Length Polymorphisms)

Η μέθοδος του πολυμορφισμού του μήκους των περιοριστικών θραυσμάτων (RLFPs) βασίζεται στη χρήση ειδικών ενζύμων πέψης που αποκαλούνται ενδονουκλεάσες περιορισμού [122]. Έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί περισσότερες από 1.000 ενδονουκλεάσες περιορισμού από βακτήρια. Οι ενδονουκλεάσες που έχουν απομονωθεί από διαφορετικά βακτήρια αλλά αναγνωρίζουν την ίδια αλληλουχία χαρακτηρίζονται ως “ισοσχιζομερή”. Οι ενδονουκλεάσες δρουν στα βακτήρια προκειμένου να τα προφυλάξουν από την προσβολή τους από άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς πέπτοντας το ξένο DNA. Τα ίδια τα βακτήρια προφυλάσσουν το δικό τους γονιδίωμα έχοντας μεθυλιωμένες τις αντίστοιχες θέσεις που αναγνωρίζονται από τα ένζυμα.

Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού κόβουν το DNA σε μία συγκεκριμένη ακολουθία αναγνώρισης 4-6 ζευγών βάσεων δίνοντας τμήματα DNA συγκεκριμένου αριθμού και μοριακού βάρους (μεγέθους) (εικόνα 14). Αλλαγές στον αριθμό και το μέγεθος των θραυσμάτων μπορούν να προέλθουν από σημειακές αλλαγές των βάσεων στις αλληλουχίες που αναγνωρίζει το ένζυμο, από αναδιατάξεις των ακολουθιών και από προσθήκες ή ελλείμματα. Οι σημειακές αλλαγές μπορεί να οδηγήσουν στην δημιουργία νέων θέσεων κοπής ή στην απώλεια αυτών που ήδη υπάρχουν. Οι προσθήκες ή τα ελλείμματα μεταξύ δύο θέσεων κοπής αυξάνουν ή μειώνουν το μέγεθος των φυσιολογικά αναμενόμενων θραυσμάτων. Ένας



διπλασιασμός του τμήματος που περιέχει την αλληλουχία που αναγνωρίζεται από το ένζυμο οδηγεί σε ένα επιπλέον κομμάτι που έχει το ίδιο μέγεθος με αυτό του διπλασιασμού.



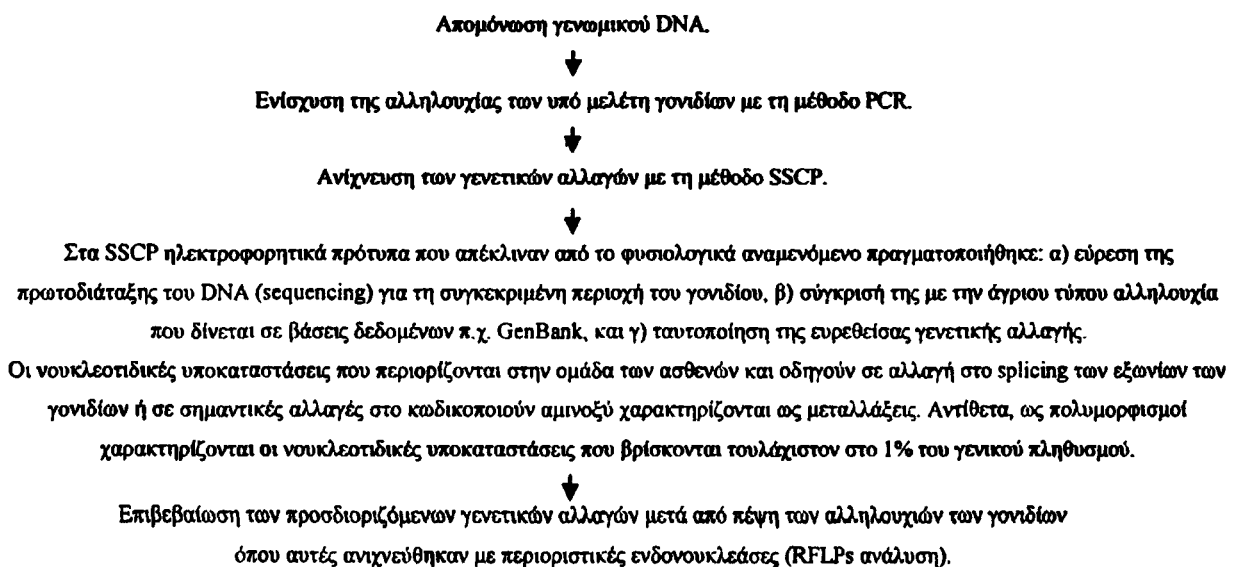
Εικόνα 14: Η μεθοδολογία RLFPs.

Οι βασικές παραδοχές πάνω στις οποίες βασίζεται η μεθοδολογία RFLPs και πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη σημασία είναι ότι:

α) Οι αλλαγές στα πρότυπα οφείλονται στις αλλαγές που υφίσταται το γονιδίωμα. Η μεθυλίωση μπορεί να προκαλέσει απώλεια κάποιας θέσης κοπής και έτσι να δημιουργηθεί σύγχυση με τον υποτιθέμενο πολυμορφισμό. Η πέψη των ίδιων PCR προϊόντων με διαφορετικά ισοσχίζομερή που δείχνουν διαφορετική ευαισθησία μπορεί να διευκολύνει την ερμηνεία σε μια τέτοια περίπτωση.

β) Το πρότυπο μετακίνησης των μορίων DNA σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου εξαρτάται όχι μόνο από το μοριακό βάρος αλλά και από την διαμόρφωση των μορίων. Το τελευταίο πρέπει επίσης να ληφθεί υπόψη στην ερμηνεία των ηλεκτροφορητικών προτύπων.

Η πορεία των μεθοδολογιών που χρησιμοποιήθηκε στην ανίχνευση, προσδιορισμό και επιβεβαίωση των γενετικών αλλαγών δίνεται συνοπτικά στην εικόνα 15.



Εικόνα 15: Ο αλγόριθμος της πορείας των μεθοδολογιών που χρησιμοποιήθηκε στην γενετική ανάλυση του νοσήματος.



B. ΚΑΤΑΓΩΓΗ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΩΝ.

Συλλέχθηκαν δείγματα από 20 οικογένειες που δεν είχαν μεταξύ τους καμία συγγένεια. Οι 10 οικογένειες προέρχονταν από περιοχές της Ηπείρου, 1 από την Θεσσαλία, 5 από την Μακεδονία, 1 από την Κρήτη, 2 από νησιά του Αιγαίου (Μυτιλήνη, Ρόδο) και 1 από νησί του Ιονίου (Κέρκυρα). Η καταγωγή τους φαίνεται παραστατικότερα στην εικόνα 16.

Η γενετική ανάλυση επεκτάθηκε και σε όσα άλλα μέλη των οικογενειών των ασθενών αυτό ήταν εφικτό (γιαγιά, παππού, μητέρα, πατέρα, αδέρφια, εξαδέλφια, τέκνα, και ο/η σύζυγο ασθενούς στην τελευταία περίπτωση για τη διευκόλυνση των γενετικών αναλύσεων στα τέκνα του ασθενούς). Αυτή η επέκταση της μελέτης βοήθησε στο να προσδιοριστούν οι απλότυποι των πολυμορφισμών που βρέθηκαν καθώς και να γίνει ανίχνευση της πιθανής συσχέτισης αυτών των γενετικών στοιχείων με τη βαρύτητα των κλινικών συμπτωμάτων της νόσου μεταξύ συγγενών ατόμων που έχουν το ίδιο γενετικό προφίλ.

Η γενετική ανάλυση πέραν των 20 οικογενειών (ασθενών και συγγενών τους) έγινε και σε 57 άτομα του γενικού πληθυσμού, τα οποία δεν έπασχαν από κυστινουρία και προέρχονταν από όλη την Ελλάδα (Ν. Ιωαννίνων, Ν. Θεσπρωτίας, Ν. Άρτας, ν. Κέρκυρας, Ν. Θεσσαλονίκης, Ν. Δράμας, Ν. Φλώρινας, Ν. Κοζάνης, Ν. Ημαθίας, Ν. Μαγνησίας, Ν. Λάρισας, Ν. Τρικάλων, Ν. Αιτωλοακαρνανίας, Ν. Φθιώτιδας, Ν. Αττικής, ν. Ρόδος). Τα άτομα αυτά αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου προκειμένου να επιβεβαιωθεί αν κάποια γενετική αλλαγή που θα ευρίσκετο είναι μετάλλαξη ή κάποιος πολυμορφισμός του γενικότερου ελληνικού πληθυσμού.

Όλες οι αναλύσεις που θα περιγραφούν στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν στη Μονάδα Γενετικής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων κατά τη διάρκεια των ετών 2001-2004.





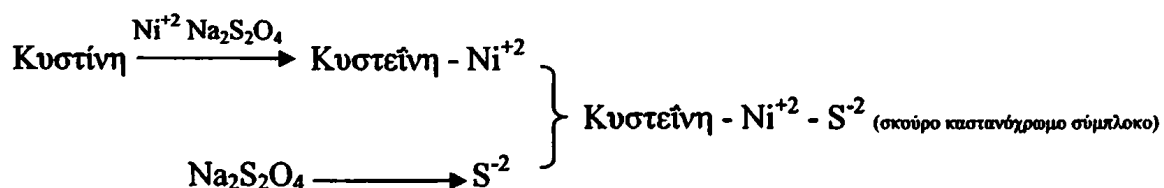
Εικόνα 16: Καταγωγή των 20 ελληνικών κυστινουρικών οικογενειών.

Γ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΚΥΣΤΙΝΗΣ ΣΤΑ ΟΥΡΑ

Για τον προσδιορισμό της κυστίνης στα ούρα χρησιμοποιήθηκε μία χρωματομετρική μέθοδος ρουτίνας γνωστή με την εμπορική ονομασία Urocystin kit. Η χρωματομετρική ανίχνευση της κυστίνης πραγματοποιείται ως εξής: η κυστίνη ανάγεται από το $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ σε κυστεΐνη και στη συνέχεια παρουσία των ιόντων Ni^{+2} σχηματίζει ένα σύμπλοκο το οποίο υπό την παρουσία και των ιόντων S^{2-} αποκτά χρώμα σκούρο καστανό, ορατό μακροσκοπικά (εικόνα 17) [123].

Η μέθοδος είναι απλή στην διαδικασία της και πολύ ασφαλής σε σχέση με την προγενέστερη του κυανιούχου νιτροπρωσικού οξέος στην οποία γίνεται χρήση του τοξικού κυανιούχου νατρίου και της οποίας το αποτέλεσμα επηρεάζεται από την αλκαλικότητα του δείγματος. Αντίθετα, η χρωματομετρική μέθοδος με το Urocystin kit δεν επηρεάζεται από το pH του δείγματος των ούρων λόγω της παρουσίας των

ρυθμιστικών NaH_2PO_4 και NaHCO_3 στο μίγμα αντίδρασης. Το NaHCO_3 βοηθάει επίσης στην καλή ανάμειξη των ούρων με τα χημικά αντιδραστήρια του μίγματος αντίδρασης και η ακρίβεια στην ποσότητα των ούρων που χρησιμοποιείται εξασφαλίζει την ευαισθησία και ακρίβεια στο αποτέλεσμα της μέτρησης. Η πρόσληψη 240 mg l-κυστεΐνης, κοινών φαρμακευτικών σκευασμάτων, και η πρωτεϊνουρία δεν επηρεάζουν το αποτέλεσμα της αντίδρασης. Ψευδή θετικά αποτελέσματα μπορούν να υπάρξουν μόνο σε περιπτώσεις θεραπείας με σκευάσματα που περιέχουν θειούχες ομάδες (α -mercaptopropionylglycine, D-penicillamine) ή αιματουρίας οπότε και συνιστάται η λήψη κατάλληλων μέτρων ή κατάλληλη επεξεργασία του δείγματος των ούρων [123]. Συγκεκριμένα, ο έλεγχος είναι θετικός 6 ώρες μετά τη χορήγηση 400 mg α -mercaptopropionylglycine ή D-penicillamine. Σε περίπτωση αιματουρίας η φυγοκέντρηση του δείγματος των ούρων για την απομάκρυνση των ερυθροκυττάρων και ο βρασμός του για την αποδιάταξη των αιμοσφαιρινών εξασφαλίζουν την αξιοπιστία του αποτελέσματος της μέτρησης.

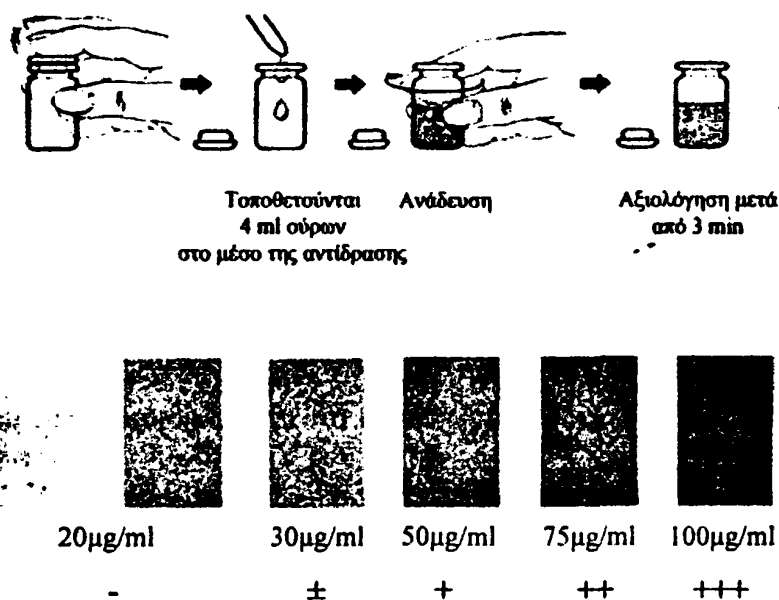


Εικόνα 17: Η χρωματομετρική αντίδραση ανίχνευσης της κυστίνης.

Συγκεκριμένα: α) τοποθετούνται 4 ml ούρων εντός του μέσου της αντίδρασης που περιέχει: 28 mg ($\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 4 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, 25mg EDTA-2Na, 4 mg NaH_2PO_4 , 50 mg NaHCO_3 , και κατάλληλη ποσότητα σουκρόζης με τελικό βάρος μίγματος 400 mg, β) το δείγμα ανακινείται, γ) αφήνεται για 3 min εν ηρεμία και δ) γίνεται η εκτίμηση και αξιολόγησή του (εικόνα 18). Ένα δείγμα κρίνεται ως θετικό



για κυστινουρία όταν η συγκέντρωση της κυστίνης είναι μεγαλύτερη των 50 $\mu\text{g/ml}$. Κατά προσέγγιση, κατόπιν του χρωματομετρικού ελέγχου, ένα δείγμα καφέ χρώματος ($\geq 50 \mu\text{g/ml}$) εκτιμάται ως θετικό, ανοιχτού πράσινου χρώματος (20 $\mu\text{g/ml}$) ως αρνητικό και πολύ ανοιχτού-καφέ/ μελί χρώματος (30 $\mu\text{g/ml}$) ως ύποπτον για κυστινουρία που χρήζει επανάληψης. Πιο συγκεκριμένα η κλίμακα αξιολόγησης έχει ως εξής: 20 $\mu\text{g/ml}$ (-), 30 $\mu\text{g/ml}$ (\pm), 50 $\mu\text{g/ml}$ (+), 75 $\mu\text{g/ml}$ (++) και 100 $\mu\text{g/ml}$ (+++).



Εικόνα 18: Πειραματική διαδικασία ανίχνευσης της κυστίνης στα ούρα.

Δ. ΕΞΑΓΩΓΗ DNA ΑΠΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ

Σε 700 μl περιφερικού ολικού αίματος προστέθηκαν 700 μl διαλύματος TKM (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM KCl, 4 mM MgCl_2 και 2 mM EDTA pH 8) και 25 μl NP-40 (Nonyphenoxy Polyethoxy Ethanol-40). Το μίγμα αυτών των διαλυμάτων προκαλεί λύση των ερυθροκυττάρων. Αναδεύτηκε και φυγοκεντρήθηκε στις 10.000 στροφές για 3 min. Το ίζημα των λευκοκυττάρων πλύθηκε με 0,5 ml διαλύματος TKM 4-5 φορές μέχρι να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα των



ερυθροκυττάρων, το οποίο φαίνεται μακροσκοπικά από την λευκή/ υποκίτρινη χροιά του ιζήματος. Σε αυτές τις πλύσεις του ιζήματος η φυγοκέντρωση πραγματοποιήθηκε στις 10.000 στροφές για 1 sec. Στο καθαρό ίζημα των λευκοκυττάρων προστέθηκαν 200 μl TKM και 15 μl διαλύματος SDS 10% (Sodium dodecyl sulfate) και έγινε θέρμανση για 5 min στους 55°C. Σκοπός αυτού του σταδίου είναι η λύση των λευκοκυττάρων, των πυρήνων τους και ο κατακερματισμός των πρωτεϊνών που είναι προσκολλημένες στο DNA. Στη συνέχεια προστέθηκαν 75μl διαλύματος NaCl και ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 12.000 στροφές για 3 min. Το αποτέλεσμα αυτού του σταδίου είναι ο κατακερματισμός των πρωτεϊνών. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε προσεκτικά σε νέο erpendorf και έγινε προσθήκη 750 μl απόλυτης αιθανόλης -20 °C. Η αιθανόλη αφυδατώνει το DNA, το οποίο μπορεί στη συνέχεια να συλλεχθεί εύκολα και κατόπιν να διαλυθεί σε 50 μl διαλύματος TE (10 mM Tris-HCl pH 7,8, 1 mM EDTA pH 8). Το DNA που απομονώθηκε διατηρήθηκε στους 4°C.

E. ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ PCR

Με τη μέθοδο PCR ενισχύθηκαν τα 10, 13 και 11 εξόνια των γονιδίων SLC3A1, SLC7A9 και SLC7A10, αντίστοιχα. Στον πίνακα 4 φαίνεται η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση κάθε εξωνίου [20, 67, 69, 90]. Η αλληλουχία του ζεύγους των εκκινητών για την ενίσχυση του εξωνίου 6 του SLC7A9 γονιδίου σχεδιάστηκε εκ νέου. Το μίγμα κάθε αντίδρασης σε τελικό όγκο 25 μl περιελάμβανε:

- 100 ng DNA
- 50 pmols έκαστου εκκινητή
- 200 μM έκαστου dNTP (A, T, G, C)



- 2,5 μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x PCR buffer, απουσία Mg^{++} (200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl)
- 1 mM $MgCl_2$
- 1,25-2,5 U Taq DNA πολυμεράσης (Invitrogen)

Η PCR πραγματοποιήθηκε σε όλα τα εξώνια για 31 συνολικά κύκλους. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα για κάθε εξώνιο δίνεται στον πίνακα 5. Σε κάθε περίπτωση υπήρχε πριν από τον πρώτο κύκλο ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του DNA στους 95°C για 5 min και ένα τελικό στάδιο πολυμερισμού του DNA μετά τον 31^ο κύκλο στους 72°C για 10 min.

Ο έλεγχος της ενίσχυσης της επιθυμητής αλληλουχίας των δειγμάτων γινόταν μετά το πέρας της PCR σε πηκτή αγαρόζης 2%. Συγκεκριμένα, διαλύονταν 2 gr αγαρόζης σε 100 ml διαλύματος 1xTBE (89mM Tris-base, 89 mM βορικό οξύ, 0,01M EDTA pH=8) κατόπιν θέρμανσης και ακολούθως προστίθετο βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 5×10^{-5} w/v. Το βρωμιούχο αιθίδιο έχει την ικανότητα να δεσμεύεται μεταξύ των βάσεων του DNA κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης και κάνει ορατά τα μόρια DNA από τα οποία έχει δεσμευθεί όταν η πηκτή αγαρόζης εκτεθεί στο υπεριώδες φως. Το διάλυμα φόρτωσης (κυανούν της βρωμοφαινόλης 2%w/v, κυανούν του ξυλενίου 2%w/v, γλυκερόλη 50%v/v) αντιπροσώπευε το 1/10 του τελικού όγκου του δείγματος που ελέγχονταν. Το μέσο της ηλεκτροφόρησης ήταν επίσης το διάλυμα 1xTBE. Ως μάρτυρας χρησιμοποιείτο ο "100bp ladder" και η ηλεκτροφόρηση γινόταν με εφαρμογή τάσης 100-150V για 30 min.



Πίνακας 4: Τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των εξωνίων των γονιδίων SLC3A1, SLC7A9 και SLC7A10.

Γονίδιο	Ζεύγος εκκινητών	Μοριακό βάρος PCR προϊόντος (bp)
SLC3A1		
Εξώνιο 1 ⁶⁹	F: 5'-GAAGGCACTCCGAAGACATAA-3' R: 5'-TCATCCCCATCTTGCCCACT-3'	471
Εξώνιο 2 ⁶⁹	F: 5'-GGGTTTATTCATGACTTTGACT-3' R: 5'-ACCTCATCCCCATCTTGCCCACT-3'	251
Εξώνιο 3 ⁶⁹	F: 5'-CCCTAGCATTTGAAAATGCTTT-3' R: 5'-TCACTACATATCTGCCTTTTACCC-3'	241
Εξώνιο 4 ⁶⁷	F: 5'-GGGCAATGATCTTTTATTCTGGG-3' R: 5'-GTGTTTTAAATAAATACCTAAACCTC-3'	257
Εξώνιο 5 ⁶⁷	F: 5'-GTTGTGATAATAACGTAGTTAATG-3' R: 5'-CTGATGACATTTTCAGAAAAGGC-3'	227
Εξώνιο 6 ⁶⁹	F: 5'-GTGGGCATGCAATGTATGAAAT-3' R: 5'-TACACTGCAGATCACACACTAAGC-3'	236
Εξώνιο 7 ⁶⁹	F: 5'-CCTACATCTTGATACATGCAAG-3' R: 5'-AGGCAACAGCAGGACATTATG-3'	239
Εξώνιο 8 ⁶⁹	F: 5'-TAGGGTAAATCTTTCAGAAAAC-3' R: 5'-ATAGTAAGTTCTCTGATTTGGCA-3'	317
Εξώνιο 9 ⁶⁹	F: 5'-CAGGACCAAAGCACATTCTTC-3' R: 5'-CAGGGTGAGTGTGACTTTCAGTA-3'	260
Εξώνιο 10 ⁶⁹	F: 5'-GGATCGAGTGTTTTGGGTAAAT-3' R: 5'-GCCAGTGTCTTCATCTCTTC-3'	480
SLC7A9		
Εξώνιο 1 ⁹⁰	F: 5'-ATTCTAGGGTTGGACCGTG-3' R: 5'-GGCCAGGAGAGCCATGAG-3'	127
Εξώνιο 2 ⁹⁰	F: 5'-ATGACTGACTTTGACTCTGGG-3' R: 5'-TCTTCTGCCGTGTCACTAGGG-3'	400
Εξώνιο 3 ⁹⁰	F: 5'-CGCCCTCTTCCTCC-3' R: 5'-TAGCAGCTGCCTGGCGTG-3'	240
Εξώνιο 4 ⁹⁰	F: 5'-AGCCTCCGGTGGGAGGAAG-3' R: 5'-GAGTCCCCAGACACCCTCTG-3'	405
Εξώνιο 5 ⁹⁰	F: 5'-AAAGGAGACTCTCTCAGGG-3' R: 5'-TGCTTCTTGGAGCTGGGT-3'	290
Εξώνιο 6	F: 5'-TCCCCTGGAGATACACTCAAGA-3' R: 5'-CAGACTCGGACATCTCA-3'	196
Εξώνιο 7 ⁹⁰	F: 5'-AGTCAAGGTGTGTGACCGTTG-3' R: 5'-AGGAGAAGAGAAAATCAGGCTG-3'	141
Εξώνιο 8 ⁹⁰	F: 5'-CTGAACGTGGGTCTCCGTG-3' R: 5'-ACCTCCAGTGCTGACACCTG-3'	235
Εξώνιο 9 ⁹⁰	F: 5'-GACCCTCAGGACTCATCTCG-3' R: 5'-TAGCTGTGTGCTTCCCTCGGG-3'	216
Εξώνιο 10 ⁹⁰	F: 5'-GGAGCACAAGTCTCAGTGG-3' R: 5'-GCCTTGAAGATAGGCTGGTAG-3'	209
Εξώνιο 11 ⁹⁰	F: 5'-TTCGGTCTTCTGTGACATGAG-3' R: 5'-AGCCACTCGTACTCTGGG-3'	252
Εξώνιο 12 ⁹⁰	F: 5'-ATGATTGAAATTTGGAGGAGGG-3' R: 5'-TGGAGTCAGGACAGGTGAGG-3'	370
Εξώνιο 13 ⁹⁰	F: 5'-CCTCACCCACAACAACCTCC-3' R: 5'-AAATTCAGCTGACTTGGCTAC-3'	178
SLC7A10		
Εξώνιο 1 ²⁰	R: F: 5'-GGACAGACGGGGCAGCGCA-3' R: 5'-GAGCGGCTGCGCCCTCATT-3'	258
Εξώνιο 2 ²⁰	F: 5'-ACAGAAGGCCGGCTGCGAA-3' R: 5'-CCATCCCAAGAGGGTGTCC-3'	314
Εξώνιο 3 ²⁰	F: 5'-TCTGGGCACTTTGAGCCACT-3' R: 5'-CCCAGGCAAGTGGCTGATCT-3'	241
Εξώνιο 4 ²⁰	F: 5'-ACTTGGCCATGGTCCACTGTG-3' R: 5'-CTGGAGGCCAGAAAGT-3'	258
Εξώνιο 5 ²⁰	F: 5'-GTAGGGCCGAGTCGGGGTAA-3' R: 5'-ACCAGAGGGCCTGGCTGCTT-3'	271
Εξώνιο 6 ²⁰	F: 5'-TGCACCCTCAGGAGCTGACG-3' R: 5'-CACAGTAGAGAGGCCATGTGTA-3'	247
Εξώνιο 7 ²⁰	F: 5'-TGCCCCGGCCTTACACATGG-3' R: 5'-CCCACGGCATGACTGGTGCA-3'	219
Εξώνιο 8 ²⁰	F: 5'-AGACCCAGGATGTGGCCAGT-3' R: 5'-AAGGTCTGCATTGCCGGGTA-3'	205
Εξώνιο 9 ²⁰	F: 5'-GGCCAGGGCTCATCCTGCA-3' R: 5'-GCAGGGGTGGCTCTGGCAG-3'	277
Εξώνιο 10 ²⁰	F: 5'-TACAGACAGCTGGAGGCCCT-3' R: 5'-AGGGAGGTCTGGTCTCCAGG-3'	294
Εξώνιο 11 ²⁰	F: 5'-GGGAGGTGTCGGAGCTGG-3' R: 5'-CAGAAACAACCTGCTCAGTCTC-3'	246



Πίνακας 5: Ο θερμοκρασιακός κύκλος για την ενίσχυση των εξωνίων των γονιδίων SLC3A1, SLC7A9 και SLC7A10.

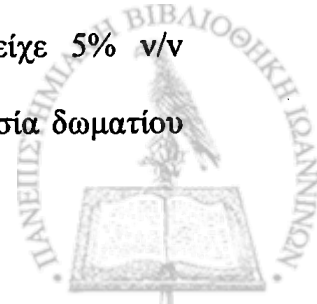
Γονίδιο	Θερμοκρασιακός κύκλος
SLC3A1	
Εξόνιο 1	Αποδιάταξη: 95°C/ 30 sec Υβριδισμός εκκνητών: 55°C/ 30 sec Επιμήκυνση: 72°C/ 1 min 30 sec
Εξόνιο 2	Αποδιάταξη: 95°C/ 30 sec Υβριδισμός εκκνητών: 58°C/ 30 sec Επιμήκυνση: 72°C/ 1 min 30 sec
Εξόνιο 3	Αποδιάταξη: 95°C/ 30 sec Υβριδισμός εκκνητών: 54°C/ 30 sec Επιμήκυνση: 72°C/ 1 min 30 sec
Εξόνιο 4	Αποδιάταξη: 95°C/ 30 sec Υβριδισμός εκκνητών: 55°C/ 30 sec Επιμήκυνση: 72°C/ 1 min 30 sec
Εξόνιο 5	Αποδιάταξη: 95°C/ 30 sec Υβριδισμός εκκνητών: 55°C/ 30 sec Επιμήκυνση: 72°C/ 1 min 30 sec
Εξόνιο 6	Αποδιάταξη: 95°C/ 30 sec Υβριδισμός εκκνητών: 57°C/ 30 sec Επιμήκυνση: 72°C/ 1 min 30 sec
Εξόνιο 7	Αποδιάταξη: 95°C/ 30 sec Υβριδισμός εκκνητών: 55°C/ 30 sec Επιμήκυνση: 72°C/ 1 min 30 sec
Εξόνιο 8	Αποδιάταξη: 95°C/ 30 sec Υβριδισμός εκκνητών: 54°C/ 30 sec Επιμήκυνση: 72°C/ 1 min 30 sec
Εξόνιο 9	Αποδιάταξη: 95°C/ 30 sec Υβριδισμός εκκνητών: 58°C/ 30 sec Επιμήκυνση: 72°C/ 1 min 30 sec
Εξόνιο 10	Αποδιάταξη: 95°C/ 30 sec Υβριδισμός εκκνητών: 57°C/ 30 sec Επιμήκυνση: 72°C/ 1 min 30 sec
SLC7A9	
Εξόνιο 1	Αποδιάταξη: 95°C/ 30 sec Υβριδισμός εκκνητών: 57°C/ 30 sec Επιμήκυνση: 72°C/ 1 min 30 sec
Εξόνιο 2	Αποδιάταξη: 95°C/ 30 sec Υβριδισμός εκκνητών: 57°C/ 30 sec Επιμήκυνση: 72°C/ 1 min 30 sec
Εξόνιο 3	Αποδιάταξη: 95°C/ 30 sec Υβριδισμός εκκνητών: 61°C/ 30 sec Επιμήκυνση: 72°C/ 1 min 30 sec
Εξόνιο 4	Αποδιάταξη: 95°C/ 30 sec Υβριδισμός εκκνητών: 63°C/ 30 sec Επιμήκυνση: 72°C/ 1 min 30 sec
Εξόνιο 5	Αποδιάταξη: 95°C/ 30 sec Υβριδισμός εκκνητών: 59°C/ 30 sec Επιμήκυνση: 72°C/ 1 min 30 sec
Εξόνιο 6	Αποδιάταξη: 95°C/ 30 sec Υβριδισμός εκκνητών: 52°C/ 30 sec Επιμήκυνση: 72°C/ 1 min 30 sec
Εξόνιο 7	Αποδιάταξη: 95°C/ 30 sec Υβριδισμός εκκνητών: 58°C/ 30 sec Επιμήκυνση: 72°C/ 1 min 30 sec
Εξόνιο 8	Αποδιάταξη: 95°C/ 30 sec Υβριδισμός εκκνητών: 61°C/ 30 sec Επιμήκυνση: 72°C/ 1 min 30 sec
Εξόνιο 9	Αποδιάταξη: 95°C/ 30 sec Υβριδισμός εκκνητών: 61°C/ 30 sec Επιμήκυνση: 72°C/ 1 min 30 sec
Εξόνιο 10	Αποδιάταξη: 95°C/ 30 sec Υβριδισμός εκκνητών: 55°C/ 30 sec Επιμήκυνση: 72°C/ 1 min 30 sec
Εξόνιο 11	Αποδιάταξη: 95°C/ 30 sec Υβριδισμός εκκνητών: 58°C/ 30 sec Επιμήκυνση: 72°C/ 1 min 30 sec
Εξόνιο 12	Αποδιάταξη: 95°C/ 30 sec Υβριδισμός εκκνητών: 56°C/ 30 sec Επιμήκυνση: 72°C/ 1 min 30 sec
Εξόνιο 13	Αποδιάταξη: 95°C/ 30 sec Υβριδισμός εκκνητών: 56°C/ 30 sec Επιμήκυνση: 72°C/ 1 min 30 sec



SLC7A10	
Εξώνιο 1	Αποδιάταξη: 95°C/ 30 sec Υβριδισμός εκκνητών: 50 °C/ 30 sec Επιμήκυνση: 72°C/ 1 min 30 sec
Εξώνιο 2	Αποδιάταξη: 95°C/ 30 sec Υβριδισμός εκκνητών: 60 °C/ 30 sec Επιμήκυνση: 72°C/ 1 min 30 sec
Εξώνιο 3	Αποδιάταξη: 95°C/ 30 sec Υβριδισμός εκκνητών: 60 °C/ 30 sec Επιμήκυνση: 72°C/ 1 min 30 sec
Εξώνιο 4	Αποδιάταξη: 95°C/ 30 sec Υβριδισμός εκκνητών: 55 °C/ 30 sec Επιμήκυνση: 72°C/ 1 min 30 sec
Εξώνιο 5	Αποδιάταξη: 95°C/ 30 sec Υβριδισμός εκκνητών: 60 °C/ 30 sec Επιμήκυνση: 72°C/ 1 min 30 sec
Εξώνιο 6	Αποδιάταξη: 95°C/ 30 sec Υβριδισμός εκκνητών: 60 °C/ 30 sec Επιμήκυνση: 72°C/ 1 min 30 sec
Εξώνιο 7	Αποδιάταξη: 95°C/ 30 sec Υβριδισμός εκκνητών: 60 °C/ 30 sec Επιμήκυνση: 72°C/ 1 min 30 sec
Εξώνιο 8	Αποδιάταξη: 95°C/ 30 sec Υβριδισμός εκκνητών: 60 °C/ 30 sec Επιμήκυνση: 72°C/ 1 min 30 sec
Εξώνιο 9	Αποδιάταξη: 95°C/ 30 sec Υβριδισμός εκκνητών: 60 °C/ 30 sec Επιμήκυνση: 72°C/ 1 min 30 sec
Εξώνιο 10	Αποδιάταξη: 95°C/ 30 sec Υβριδισμός εκκνητών: 60 °C/ 30 sec Επιμήκυνση: 72°C/ 1 min 30 sec
Εξώνιο 11	Αποδιάταξη: 95°C/ 30 sec Υβριδισμός εκκνητών: 60 °C/ 30 sec Επιμήκυνση: 72°C/ 1 min 30 sec

ΣΤ. ΗΛΕΚΤΟΦΟΡΗΣΗ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΜΟΝΟΚΛΩΝΟΥ DNA (SSCP)

Σε 5 μl προϊόντος PCR γινόταν προσθήκη ίσου όγκου αποδιατακτικού διαλύματος που περιείχε 95% φορμαμίδιο, 0,1% κυανούν της βρωμοφαινόλης, 0,1% ξυλενοκυανόλη και 20 mM EDTA pH=8. Στη συνέχεια το μίγμα αποδιατάσσονταν στους 95°C για 5 min και μετά το τέλος της αποδιάταξης τοποθετούνταν σε πάγο. Τα δείγματα ηλεκτροφορούνταν σε πήκτωμα ακρυλαμίδης/ bis-ακρυλαμίδης (29:1) 10% για μεγέθη προϊόντων PCR <250bp και 8% για μεγέθη προϊόντων PCR >250bp. Το πήκτωμα είχε διαστάσεις 20x20x0,1 cm³ και το μέσο της ηλεκτροφόρησης περιείχε 1x-TBE (89mM Tris-base, 89 mM βορικό οξύ, 0,01M EDTA pH=8). Για να αυξηθεί η ευαισθησία της μεθόδου τα ίδια PCR προϊόντα ηλεκτροφορούνταν σε τέσσερις διαφορετικές συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα σε πήκτωμα που περιείχε 5% v/v γλυκερόλη και σε πήκτωμα που δεν περιείχε γλυκερόλη, σε θερμοκρασία δωματίου



και σε θερμοκρασία 4°C (η συνθήκη των 4°C πραγματοποιήθηκε στον ψυχρό θάλαμο του Βιοχημικού του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων). Εφαρμοζόταν σταθερή τάση 80 Volts στη θερμοκρασία δωματίου και αυτή των 120 Volts στη θερμοκρασία των 4°C, για 16-18 h.

Η. ΧΡΩΣΗ ΜΕ ΝΙΤΡΙΚΟ ΑΡΓΥΡΟ

Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου τοποθετούνταν σε 200 ml υδατικού διαλύματος, που περιείχε 10% v/v αιθανόλη (100%) και 0,5% v/v οξικό οξύ. Η εμφάνιση της πηκτής στο διάλυμα γινόταν 2 φορές συνολικής διάρκειας 6min (3min+3min). Το στάδιο αυτό στοχεύει στο να εμποδίσουμε τη διάχυση των ζωνών του DNA. Ακολούθως, το πήκτωμα τοποθετούνταν σε 200 ml διαλύματος AgNO_3 1 gr/lit υπό συνεχή ανάδευση για 10 min, οπότε τα θετικά ιόντα του αργύρου δεσμεύονταν επάνω στις ζώνες του αρνητικά φορτισμένου DNA. Γίνονταν δύο πλύσεις με αποσταγμένο νερό για να απομακρυνθεί ο άργυρος που δε δεσμεύτηκε και στη συνέχεια η πηκτή τοποθετούνταν στο τελευταίο διάλυμα της χρώσης για 15-20 min. Αυτό περιείχε σε τελικό όγκο 200 ml: 1,5% w/v NaOH, 0,02 gr NaBH_4 και 0,4% v/v φορμαλδεΰδης που έχει ρόλο μονιμοποιητικού. Τα ιόντα αργύρου, που έχουν δεσμευτεί επάνω στα τμήματα DNA στα διάφορα σημεία της πηκτής, υπό την επίδραση του NaBH_4 στο πολύ υψηλό pH του περιβάλλοντος μαυρίζουν και δίνουν σκούρες καφέ ζώνες. Έτσι γίνονται ορατά τα σημεία, στα οποία έχει μετακινηθεί το DNA των δειγμάτων μετά την ηλεκτροφόρησή τους. Ακολουθούσε ξέβγαλμα της πηκτής με αποσταγμένο νερό και μελέτη της.



Θ. ΕΥΡΕΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΟΔΙΑΤΑΞΗΣ ΤΟΥ DNA

Σε εκείνα τα δείγματα που είχαν ανέδειξαν διαφορετικό ηλεκτροφορητικό πρότυπο μετά από την SSCP επεξεργασία τους ακολουθούσε η εύρεση της πρωτοδιάταξής τους. Συγκεκριμένα βρίσκονταν η αλληλουχία για ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα κάθε ηλεκτροφορητικού προτύπου και έτσι γινόταν ταυτοποίηση του ηλεκτροφορητικού προτύπου με τις αλλαγές του γονιδιώματος που το προκάλεσαν.

Πιο αναλυτικά, γινόταν και πάλι η ενίσχυση του δείγματος με την μέθοδο PCR. Ακολουθούσε ο καθαρισμός του προϊόντος της PCR από τα διάφορα αντιδραστήρια που δρουν ανασταλτικά στην αντίδραση εύρεσης της πρωτοδιάταξης της αλληλουχίας με τη χρήση του "Rapid PCR Purification System" κατά το πρωτόκολλο της Marligen Bioscience, Inc. Συγκεκριμένα, αρχικά γινόταν προσθήκη του διαλύματος H₁ στο προϊόν της PCR και μετά από φυγοκέντρηση σε στήλη που διέθετε κατάλληλες μεμβράνες σιλικόνης, τα δίκλινα μόρια DNA δεσμεύονταν επιλεκτικά επάνω τους. Στη συνέχεια, η DNA πολυμεράση, το ρυθμιστικό διάλυμα, οι εκκινητές και τα δεοξυριβινουκλεοτίδια που δε χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της PCR αντίδρασης απομακρύνονταν με νέα φυγοκέντρηση αφού προηγουμένως είχε προστεθεί ένα αλκοολούχο ρυθμιστικό διάλυμα H₂. Τέλος, γινόταν προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος TE και μετά από νέα φυγοκέντρηση συλλέγονταν το καθαρό προϊόν της PCR. Ακολούθως, η εύρεση της αλληλουχίας της υπό ενίσχυσης περιοχής γινόταν σύμφωνα με την ενζυμική μέθοδο Sanger με τη χρήση του αυτόματου αναλυτή ABI 3700 σύμφωνα με τα πρωτόκολλα της MWG Biotech.

Σε τρεις μόνο περιπτώσεις ασθενών η μη εύρεση διαφορετικού ηλεκτροφορητικού προτύπου (SSCP ανάλυση) σε κάποιο από τα εξώνια, που να



συνδέεται με κάποια μετάλλαξη και να ερμηνεύει πλήρως τη νόσο με γενετικά κριτήρια, οδήγησε σε αυτούς τους ασθενείς στην εύρεση της πρωτοδιάταξης όλων των εξωνίων των γονιδίων SLC3A1 και SLC7A9. Λόγω του ότι η ευαισθησία της μεθόδου SSCP δε φτάνει το 100% κρίθηκε απαραίτητη η εύρεση της αλληλουχίας όλων των εξωνίων σε αυτές τις τρεις περιπτώσεις προκειμένου να επιβεβαιωθεί ή να αποκλειστεί η παρουσία ή μη, κάποιας μετάλλαξης τουλάχιστον στην κωδικοποιούσα περιοχή και στα όρια των εξωνίων-ιντρονίων των γονιδίων SLC3A1 και SLC7A9. Άλλωστε, στην διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχουν αναφορές για μεταλλακτικά “hotspots” στην αλληλουχία αυτών των γονιδίων στα οποία θα μπορούσε να περιοριστεί σε κάποιο βαθμό αυτή η σάρρωση των γονιδίων. Επίσης, με αυτόν τον τρόπο έμμεσα ελέγχθηκε η πιθανότητα εμπλοκής και κάποιου άλλου γονιδίου ή ρυθμιστικού παράγοντα π.χ. στην περιοχή του προαγωγέα των γονιδίων SLC3A1 και SLC7A9 στην πρόκληση της κυστινουρίας. Κάτι τέτοιο θα ίσχυε ανεπιφύλακτα στην περίπτωση εκείνη που δε θα ανιχνεύονταν κάποια μετάλλαξη μετά και από αυτήν την εμπειριστατωμένη και λεπτομερή σάρωσή των εξωνίων τους. Σε αυτές, λοιπόν, τις περιπτώσεις εφαρμόστηκαν όλα τα στάδια εύρεσης της πρωτοδιάταξης όλων των εξωνίων και των δύο γονιδίων και για τους τρεις ασθενείς με τον τρόπο που προαναφέρθηκε για τα εξώνια που έδειξαν αλλαγή σε κάποιο από τα φυσιολογικά αναμενόμενα SSCP patterns των SLC3A1 και SLC7A9 εξωνίων.

Η ονοματολογία των γενετικών αλλαγών έγινε σύμφωνα με τους κανόνες που ισχύουν για το ανθρώπινο γονιδίωμα κατά τη Human Genome Variation Society (HGVS, <http://www.hgvs.org/mutnomen>). Συγκεκριμένα τα νουκλεοτίδια αριθμούνται θεωρώντας την αδενίνη της πρώτης τριπλέτας, ATG, των cDNA αλληλουχιών των γονιδίων SLC3A1, SLC7A9 και SLC7A10 ως την υπό αριθμό 1 βάση.



I. ΠΕΨΕΙΣ ΤΩΝ ΕΝΙΣΧΥΜΕΝΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΤΡΙΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕ
ENZYMA ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΚΑΙ
ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΑΝΙΧΝΕΥΘΕΙ ΜΕ ΤΗΝ ΕΥΡΕΣΗ ΤΗΣ
ΠΡΩΤΟΔΙΑΤΑΞΗΣ ΤΟΥ DNA

Οι μεταλλάξεις που βρέθηκε ότι σχετίζονται με κάποιο συγκεκριμένο ηλεκτροφορητικό πρότυπο ταυτοποιούνταν σε όλα τα άτομα που είχαν ανάλογο ηλεκτροφορητικό πρότυπο μετά από πέψεις με ενδονουκλεάσες περιορισμού που αναγνώριζαν το άγριου τύπου αλληλόμορφο ή το μεταλλαγμένο. Παρομοίως και για τους πολυμορφισμούς εφαρμόστηκε ανάλογη επεξεργασία, η οποία όμως επεκτάθηκε σε όλα τα άτομα της ομάδας ελέγχου. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν δίνονται στον πίνακα 6.

Οι πέψεις γίνονταν σύμφωνα με τα πρωτόκολλα της κατασκευάστριας εταιρείας New England Biolabs. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης της πέψης ήταν 6 μl. Σε αυτό προσθέτονταν 2,5 U ενζύμου (το κατάλληλο για κάθε γενετική αλλαγή σύμφωνα με τον πίνακα 6), κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος κάθε ενζύμου και το υπόλοιπο συμπληρωνόταν μέχρι τελικού όγκου 6 μl με το προϊόν της εκάστοτε PCR. Ακολουθούσε επώαση στους 37°C για 12-15h. Οι θερμοκρασίες επώασης για τα ένζυμα BstUI, BssHII και ApaI ήταν, 60°C, 50°C, και 25°C, αντίστοιχα.

Τα προϊόντα των πέψεων, αφού σε αυτά προσθέτονταν διάλυμα φόρτωσης όπως στον έλεγχο των προϊόντων της PCR, ηλεκτροφορούνταν με πηκτή αραρόζης 2%, σε διάλυμα 1xTBE, χρωματίζονταν με βρωμιούχο αιθίδιο και φωτογραφίζονταν υπό το υπεριώδες φως. Ως μάρτυρας χρησιμοποιούνταν ο "100bp ladder". Η ηλεκτροφόρηση διαρκούσε 1h υπό την επίδραση 100V.



Τα προϊόντα 7 πέψων ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 8-10% καθώς η ευαισθησία του πηκτώματος αгарόζης ήταν πολύ μικρή για να διακρίνει διαφορές μεταξύ των θραυσμάτων πέψης μικρότερες των 50bp. Οι πολυμορφισμοί που ελέγχθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου ήταν οι: 1-39C>T (SLC7A9E2 με το ένζυμο πέψης HincPI), 235+22T>G (SLC7A9E3 με το ένζυμο πέψης BsgI), V142A (SLC7A9E4 με το ένζυμο πέψης Cac8I), 507C>T (SLC7A9E5 με το ένζυμο πέψης DraIII), 972G>A (SLC7A9E9 με το ένζυμο πέψης AciI), και 634+8C>G (SLC7A10 με το ένζυμο πέψης BsaHI). Αναλυτικότερα εντός των προϊόντων της πέψης προσθέτονταν διάλυμα φόρτωσης (όπως στον έλεγχο των προϊόντων της PCR αντίδρασης), τα οποία ακολούθως ηλεκτροφορούνταν με πήκτωμα ακρυλαμίδης/ bis-ακρυλαμίδης (29:1) 8-10%, σε διάλυμα 1xTBE, χρωματίζονταν με νιτρικό άργυρο και φωτογραφούνταν. Η ηλεκτροφόρηση διαρκούσε 4-5h από την επίδραση 100-120V.

Για εκείνες τις μεταλλάξεις (R270X, 479-1G>C, Y232C, και D233E) που δεν υπήρχε διαθέσιμη περιοριστική ενδονουκλεάση για την ταυτοποίησή τους, γινόταν εύρεση της πρωτοδιάταξης σε όλα τα δείγματα. Για εκείνους τους πολυμορφισμούς (I618M, 235+18C>A, 704+10G>A, και 977+51A>G) που δεν υπήρχε διαθέσιμο ένζυμο πέψης για την ταυτοποίησή τους γινόταν εύρεση της πρωτοδιάταξης δύο ακόμη δειγμάτων με το ίδιο ηλεκτροφορητικό πρότυπο, προκειμένου να ταυτοποιηθούν οι γενετικές αλλαγές σε μεγαλύτερο ποσοστό δειγμάτων και να διαπιστωθεί αν υπάρχουν αποκλίσεις. Όταν και εφόσον δεν βρισκόταν κάποια απόκλιση τότε θεωρούνταν ότι το μη-άγριου τύπου ηλεκτροφορητικό πρότυπο μετά από την επεξεργασία με την SSCP μέθοδο, οφείλονταν στο συγκεκριμένο πολυμορφισμό ή συνδυασμό πολυμορφισμών. Ιδιαίτερα σε εκείνες τις περιπτώσεις που σε κάποιο εξώνιο υπήρχαν περισσότερες από μία αλλαγές η παρουσία του ίδιου



ηλεκτροφορητικού προτύπου τουλάχιστον σε δύο διαφορετικές συνθήκες ηλεκτροφόρησης, αποτελούσε επιπλέον ενισχυτικό στοιχείο επιβεβαίωσης της παρουσίας ή μη του πολυμορφισμού στο δείγμα (478+10T>C: 4°C παρουσία 5% γλυκερόλης ή θερμοκρασία δωματίου απουσία γλυκερόλης, 977+51A>G: θερμοκρασία δωματίου παρουσία 5% γλυκερόλης ή θερμοκρασία δωματίου απουσία γλυκερόλης). Στις λιγοστές παρεκκλίσεις κάποιων δειγμάτων γινόταν εύρεση της πρωτοδιάταξής τους.

Τέλος, στο εξώνιο 4 του SLC7A9 γονιδίου υπήρχαν περισσότεροι του ενός πολυμορφισμοί. Το ένζυμο πέψης DdeI που χρησιμοποιήθηκε στην ανίχνευση του πολυμορφισμού 399C>T, αναγνώριζε τρεις θέσεις κοπής, όπου και η τρίτη θέση κοπής ήταν πολυμορφική (478+10T>C). Η τελευταία είχε προηγουμένα μελετηθεί με ένα άλλο ένζυμο (AvaI) που αναγνώριζε μόνο την υπό μελέτη πολυμορφική θέση 478+10T>C. Για να προσδιοριστεί από τα patterns της πέψης DdeI αυτό που αφορούσε την παρουσία ή όχι του πολυμορφισμού 399C>T, έγινε διασταύρωση των αποτελεσμάτων της με αυτά των patterns της πέψης Cac8I, για τον πολυμορφισμό V142A. Σ' όλες τις άλλες περιπτώσεις ενζύμων που αναγνώριζαν περισσότερες της μίας θέσης κοπής, οι επιπλέον θέσεις αναγνώρισης από την ενδονουκλεάση περιορισμού στην υπό ανάλυση αλληλουχία δεν ήταν πολυμορφικές και δεν επηρέαζαν τα αποτελέσματα της εκάστοτε πέψης για μία συγκεκριμένη γονιδιακή θέση.

Στο τέλος της διδακτορικής διατριβής παρατίθεται πίνακας όπου δίνεται η εταιρεία προέλευσης όλων των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και ο αριθμός καταλόγου τους.



Πίνακας 6: Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν στην ταυτοποίηση των μεταλλάξεων ή πολυμορφισμών. Προσδιορίζεται η αλληλουχία που αναγνωρίζουν.

Ένζυμο πέψης	Αλληλουχία που αναγνωρίζει
AclI	5'-C ¹ CGC-3'
AluI	5'-AG ¹ CT-3'
AlwNI	5'-CAGNNN ¹ CTG-3'
ApaI	5'-GGGCC ¹ C-3'
AvaI	5'-C ¹ PyCGPuG-3'
BccI	5'-CCATC(N) ₄ ¹ -3'
BsaHI	5'-GPu ¹ CGPyC-3'
BsgI	5'-GTGCAG(N) ₁₆ ¹ -3'
BssHPI	5'-G ¹ CGCGC-3'
BssSI	5'-C ¹ TCGTG-3'
BstUI	5'-CG ¹ CG-3'
Cac8I	5'-GCN ¹ NGC-3'
DdeI	5'-C ¹ TNAG-3'
DraIII	5'-CACNNN ¹ GTG-3'
Hinfi	5'-G ¹ ANTC-3'
HinPII	5'-G ¹ CGC-3'
Hpy188I	5'-TCN ¹ GA-3'
HpyCH ₄ V	5'-TG ¹ CA-3'
MseI	5'-T ¹ TAA-3'
MspI	5'-C ¹ CGG-3'
NlaIII	5'-CATG ¹ -3'
PstI	5'-CTGCA ¹ G-3'
XcmI	5'-CCANNNNN ¹ NNNNTGG-3'

Κ. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Για κάθε πολυμορφισμό υπολογίστηκε η συχνότητα των ομόζυγων (H_o) και ετερόζυγων (H_e) ατόμων κάθε αλληλομόρφου (aa, bb, ab), τόσο στην ομάδα των ασθενών (n₁) όσο και στην ομάδα ελέγχου (n₂):

$$H_o = aa / n, \quad H_o = bb / n, \quad H_e = ab / n$$

Η γενετική σύσταση ενός πληθυσμού εξαρτάται από φυσικές διαδικασίες όπως τυχαίες διασταυρώσεις, μικρές ή μεγάλες μεταναστεύσεις, δημιουργία μεταλλάξεων, γενετική παρέκκλιση, αιμομιξίες. Τα γεγονότα αυτά και κάτω από την πίεση της φυσικής επιλογής καθορίζουν τη γενετική σύσταση ενός πληθυσμού οδηγώντας τελικά σε ισοζύγιο Hardy-Weinberg. Συμβαίνει όμως κάποιες φορές να



μην έχει επέλθει ακόμη το ισοζύγιο αυτό σε κάποιους πολυμορφισμούς. Η πιθανή αυτή απόκλιση από την κατάσταση ισορροπίας ελέγχθηκε για κάθε πολυμορφικό δείκτη σύμφωνα με τη μέθοδο των Guo & Thompson, 1992 [124]. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο Arlequin Ver 2.000, το οποίο είναι ειδικό για τη στατιστική ανάλυση δεδομένων πληθυσμιακής γενετικής. Δίνει τη δυνατότητα προσδιορισμού της φύσης των δεδομένων (απλοτυπικά ή γονοτυπικά με γνωστή ή όχι τη γαμετική τους φάση) και την ανάλυσή τους προς διάφορες συνιστώσες. Ως επίπεδο σημαντικότητας (τιμή p) ορίστηκε η τιμή 0,05 και θεωρείτο ότι η απόκλιση από το ισοζύγιο Hardy-Weinberg ήταν στατιστικά σημαντική όταν $p < 0,05$. Η ανάλυση έγινε τόσο στους ασθενείς όσο και στα υγιή άτομα.

Με τη χρήση του ίδιου στατιστικού πακέτου ελέγχθηκε η τυχαία κατανομή των αλληλομόρφων κάθε πολυμορφικού δείκτη στην ομάδα των ασθενών και σε αυτήν της ομάδας ελέγχου. Ο έλεγχος αυτός ("exact test of population differentiation") έγινε σύμφωνα με τους Raymond & Rousset, 1995 και Goudet et al, 1996 [125, 126]. Ως επίπεδο σημαντικότητας (τιμή p) ορίστηκε η τιμή 0,05 και θεωρείτο ότι η κατανομή δεν ήταν τυχαία όταν $p < 0,05$.

Η ίδια ανάλυση με αυτήν των πολυμορφισμών διεξήχθη και για τους γονοτυπικούς συνδυασμούς του συνόλου των πολυμορφισμών των δύο αλληλομόρφων του γονιδίου SLC7A9, χωρίς στοιχεία της μεταξύ τους σύνδεσης, οι οποίοι βρέθηκαν στους ασθενείς και στα υγιή άτομα. Συγκεκριμένα, οι SLC7A9 SNPs γονότυποι των ασθενών χωρίστηκαν σε δύο ομάδες: α) σε αυτούς που βρέθηκαν στους ασθενείς με τις SLC7A9 μεταλλάξεις και β) σε αυτούς που βρέθηκαν στους ασθενείς με τις SLC3A1 μεταλλάξεις. Στην ανάλυση που θα ακολουθήσει οι όροι γονότυποι και γονότυπικά "cluster", αναφέρονται σε αυτούς τους SLC7A9 SNPs γονοτυπικούς συνδυασμούς. Με τη βοήθεια των γενετικών αποτελεσμάτων για τις



ίδιες πολυμορφικές θέσεις μεταξύ των μελών κάθε οικογένειας μπόρεσαν επίσης να βρεθούν οι SLC7A9 SNPs απλότυποι αυτών των γονοτύπων. Ομοίως και σε αυτήν την περίπτωση πραγματοποιήθηκε η ίδια με την προηγούμενη στατιστική ανάλυση αλλά αυτή τη φορά επί απλοτυπικών δεδομένων.

Ως ανισορροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium) ορίζεται ο μη τυχαίος συνδυασμός μεταξύ των αλληλομόρφων δύο διαφορετικών γενετικών δεικτών. Ο έλεγχος αυτός έγινε για γονοτυπικά δεδομένα γνωστής γαμετικής φάσης (δηλαδή απλοτυπικά δεδομένα) σύμφωνα με τους Slatkin & Excoffier, 1996 και Excoffier & Slatkin, 1998 [127, 128] τόσο στους ασθενείς όσο και στην ομάδα ελέγχου. Και σε αυτήν την περίπτωση έγινε χρήση του στατιστικού πακέτου Arlequin software Ver. 2.000.

Λ. ΕΥΡΕΣΗ ΣΗΜΑΤΩΝ ΣΥΝΑΡΜΟΓΗΣ (SPLICING) ΤΩΝ ΕΞΩΝΙΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

Η εύρεση αλληλουχιών κατά μήκος των γονιδίων SLC3A1, SLC7A9, SLC7A10 που δρουν ως σήματα συναρμογής των εξωνίων των γονιδίων έγινε με τη μέθοδο Neural Network [129]. Η ανάλυση αυτή παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς δείχνει τον πιθανό τρόπο δράσης κάποιων πολυμορφισμών και μεταλλάξεων στο μάτισμα των εξωνίων επιτρέποντας συσχετίσεις γονοτυπικών και φαινοτυπικών στοιχείων.

Μ. ΕΥΡΕΣΗ CIS-ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ SLC7A9 ΓΟΝΙΔΙΟΥ

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς η ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων ελέγχεται από τον προαγωγέα (promoter), από τα ρυθμιστικά στοιχεία πλησίον του



προαγωγέα (promoter-proximal elements) και από τους ενισχυτές (enhancers/cis-acting transcription factors) [130, 131]. Σε αυτά τα ρυθμιστικά στοιχεία δεσμεύονται οι trans-ρυθμιστικοί παράγοντες και βοηθούν στη συνέχεια τη δέσμευση της RNA πολυμεράσης II, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την έναρξη της μεταγραφής και ακολούθως την ενίσχυση του ρυθμού της. Ο προαγωγέας και τα εγγύς στον προαγωγέα ρυθμιστικά στοιχεία βρίσκονται κοντά στο σημείο έναρξης της μεταγραφής (CAP), ενώ οι ενισχυτές μπορεί να βρίσκονται μπροστά από τον προαγωγέα ή μετά από αυτόν και πριν από το σημείο έναρξης της μεταγραφής, μέσα σε ιντρόνια και στο 3'-άκρο του γονιδίου μετά το τελευταίο του εξώνιο.

Το κύριο ρυθμιστικό στοιχείο του προαγωγέα είναι το "κουτί TATA", ενώ το "κουτί CCAAT", το "GC-κουτί" και οι αλληλουχίες "GCCACACCC" και "ATGCAAAT" ανήκουν στα υπόλοιπα ρυθμιστικά στοιχεία της περιοχής του, τα οποία μπορεί να βρίσκονται εντός 200bp από το σημείο έναρξης της μεταγραφής. Οι ενισχυτές, αντίθετα, έχουν μήκος περίπου 100-200bp, περιέχουν πολλαπλά ρυθμιστικά στοιχεία μήκους 8-20bp και μπορούν να ελέγξουν την μεταγραφή αν και πολύ μακριά, μέχρι και 50kb, από το σημείο έναρξής της.

Αλλαγές, λοιπόν, στην αλληλουχία των cis-ρυθμιστικών μεταγραφικών παραγόντων ενδέχεται να επηρεάσουν την αλληλεπίδραση τους με τους trans-ρυθμιστικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Οι διαταραχές σε αυτήν την αλληλεπίδραση μπορεί να είναι άμεσες λόγω αλλαγής των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του DNA που αναγνωρίζονται από τους trans-ρυθμιστικούς παράγοντες είτε έμμεσες λόγω των διαφοροποιήσεων που μπορούν να προκαλέσουν οι αλλαγές της πρωτοταγούς δομής του DNA στις υπόλοιπες διαμορφώσεις του, καθιστώντας τις cis-θέσεις στόχους μη προσβάσιμες, είτε αναγνωρίσιμες στους trans-ρυθμιστικούς μεταγραφικούς παράγοντες.



Προκειμένου, λοιπόν, να μελετήσουμε την επίδραση των γενετικών αλλαγών που βρέθηκαν κατά μήκος του γονιδίου SLC7A9 ελέγξαμε την παρουσία ενισχυτών σε τμήμα της 5'-ρυθμιστικής περιοχής έκφρασής του, των ιντρονίων του, και στο 3'-άκρο μετά το τελευταίο του εξώνιο. Η ανάλυση στο SLC7A9 γονίδιο έχει ιδιαίτερη αξία καθώς είναι πολύ πιο πολυμορφικό σε σχέση με τα άλλα δύο γονίδια (SLC3A1 και SLC7A10) και φέρει πλήθος γενετικών αλλαγών κατά μήκος των αλληλομόρφων του. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα αύξηση της πιθανότητας να αλλάξει η χωροταξική του διαμόρφωση και κατ' επέκταση πιθανή μείωση στη δέσμευση των trans-ρυθμιστικών παραγόντων στους cis-ρυθμιστικούς παράγοντες της μεταγραφής.

Για την εύρεση των ενισχυτών κατά μήκος του γονιδίου SLC7A9 χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο TFSEARCH (Searching Transcription Factor Binding Sites, Ver 1.3) [132, 133].

N. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΔΕΝΔΡΩΝ

Στην κατασκευή των φυλογενετικών δένδρων χρησιμοποιήθηκε μια μέθοδος απόστασης. Στις μεθόδους αυτές χρησιμοποιείται ως μήτρα δεδομένων το σύνολο των γονιδιακών συχνοτήτων σε κάθε πληθυσμό και βρίσκονται οι μεταξύ τους γενετικές αποστάσεις. Θεωρείται ότι οι φυλογενετικές σειρές εξελίσσονται ανεξάρτητα και ότι οι γονιδιακοί τόποι μεταβάλλονται ανεξάρτητα λόγω γενετικής παρέκκλισης.

Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος απόστασης UPGMA (Unweighted Pair Group Method using arithmetic Averages), στην οποία γίνεται χρήση μήτρας τιμών (γονιδιακών συχνοτήτων) των νουκλεοτιδικών αποκλίσεων μεταξύ των πληθυσμών από γονοτυπικά δεδομένα [134]. Πρόκειται για μέθοδο ολομετρικής απόστασης, η οποία προϋποθέτει ίσους ρυθμούς εξέλιξης για όλες τις



φυλογενετικές σειρές. Η μέθοδος αυτή χαρακτηρίζεται επίσης και ως προσθετική αφού η απόσταση μεταξύ δύο taxa είναι ίση με το άθροισμα των μηκών των κλάδων που συνδέουν τα αντίστοιχα taxa.

Η γενετική απόσταση μεταξύ των επιμέρους πληθυσμών έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο Nei 1978 [135]. Χαρακτηριστικό της συγκεκριμένης εκτίμησης είναι ότι δεν επηρεάζεται από το μέγεθος του δείγματος. Η γενετική απόσταση του Nei υιοθετεί ένα μοντέλο εξέλιξης μέσω μεταλλάξεων και γενετικής παρέκκλισης [136]. Σύμφωνα με αυτό: α) κάθε γονιδιακός τόπος συσσωρεύει με τον ίδιο ρυθμό ουδέτερες μεταλλάξεις, β) κάθε αλληλόμορφο ενός γονιδίου έχει το ίδιο δυναμικό μετάλλαξης του σε νέο και γ) το μέγεθος του πληθυσμού παραμένει σταθερό. Το αποτέλεσμα αυτών των παραδοχών είναι ότι η γενετική απόσταση αυξάνεται γραμμικά στο χρόνο.

Τα βασικά στάδια στην κατασκευή των φυλογενετικών δένδρων με τη μέθοδο UPGMA, αφού έχει κατασκευαστεί όπως προαναφέρθηκε η μήτρα των γενετικών αποστάσεων μεταξύ των πληθυσμών, είναι τα εξής:

- Από τα δεδομένα της αρχικής μήτρας των γενετικών αποστάσεων επιλέγονται εκείνα τα taxa (i και j) με τη μικρότερη μεταξύ τους απόσταση (d_{ij})
- Τα δύο αυτά taxa ενώνονται μεταξύ τους σε μια κοινή ομάδα u. Το μήκος του κλάδου που τα συνδέει ορίζεται ως $d_{ij} / 2$.
- Στη συνέχεια ορίζεται η απόσταση της ομάδας u από ένα άλλο taxon k, το αμέσως πλησιέστερο, $d_{ku} = (d_{ki} + d_{kj}) / 2$ (d_{ki} και d_{kj} οι αποστάσεις του taxon k από τα taxa i και j, αντίστοιχα).
- Οι δύο νέες ομάδες ενώνονται.
- Η διαδικασία αυτή θα ολοκληρωθεί όταν όλα τα taxa αποτελούν μέλη της ίδιας ομάδας.



Συνολικά κατασκευάστηκαν δύο φυλογενετικά δένδρα με τη μέθοδο απόστασης UPGMA. Στη μία περίπτωση οι SLC7A9 SNPs γονότυποι των ασθενών και υγιών ατόμων θεωρήθηκαν ως μία ομάδα, ενώ στο δεύτερο δένδρο οι SLC7A9 SNPs γονότυποι των ασθενών αποτέλεσαν ξεχωριστή ομάδα από αυτή των SLC7A9 SNPs γονοτύπων που βρέθηκαν στην ομάδα ελέγχου.



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

A. Η ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΗΣ ΚΥΣΤΙΝΗΣ ΣΤΑ ΟΥΡΑ ΤΩΝ ΚΥΣΤΙΝΟΥΡΙΚΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ

Η συγκέντρωση της κυστίνης ($\mu\text{g/ml}$) στα ούρα των ασθενών δίνεται στον πίνακα 7. Όλοι τους είχαν αυξημένα επίπεδα απέκκρισης της κυστίνης που κυμαίνονταν από 50-100 $\mu\text{g/ml}$. Επίσης, όλοι είχαν δημιουργήσει λίθους κυστίνης κατά το παρελθόν, με ποικίλο βαθμό υποτροπής, δύο τουλάχιστον ασθενείς είχαν ετερόπλευρη μειωμένη νεφρική λειτουργία, και τέσσερις από αυτούς υπεβλήθησαν τελικά σε ετερόπλευρη νεφρεκτομή. Διακύμανση των επιπέδων απέκκρισης της κυστίνης και των κλινικών χαρακτηριστικών, παρατηρείται όχι μόνο μεταξύ των ασθενών που φέρουν διαφορετικές μεταλλάξεις αλλά και μεταξύ ασθενών που φέρουν τις ίδιες μεταλλάξεις (πίνακας 7).

Ανάλογη διακύμανση των επιπέδων απέκκρισης της κυστίνης παρατηρείται και μεταξύ των μελών των οικογενειών των κυστινουρικών ασθενών (πίνακας 8, 9). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρουσία ή μη αυξημένων επιπέδων κυστίνης στα ούρα ετερόζυγων ατόμων για κάποια μετάλλαξη του SLC7A9 γονιδίου (πίνακας 8). Οι ετεροζυγώτες που απεκκρίνουν υψηλότερα από τα φυσιολογικά επίπεδα κυστίνης, παρουσιάζουν απόκλιση μεταξύ των κλινικών χαρακτηριστικών με τα οποία εκδηλώνουν την κυστινουρία είτε είναι συγγενείς είτε όχι, είτε πρόκειται για την ετεροζυγωτία της ίδιας μετάλλαξης είτε όχι (πίνακας 8). Στην περίπτωση όμως των ετερόζυγων ατόμων για μετάλλαξη του SLC3A1 γονιδίου δεν παρατηρείται σε καμία περίπτωση αύξηση των επιπέδων απέκκρισης της κυστίνης (πίνακας 9). Όταν όμως και τα δύο αλληλόμορφα του SLC3A1 έχουν μεταλλαχθεί, τότε μόνον η απέκκριση της κυστίνης είναι αυξημένη πέραν του ανωτέρου φυσιολογικού ορίου



(πίνακας 9). Στις περιπτώσεις όμως ομοζυγωτίας ή σύνθετης ετεροζυγωτίας για τις ίδιες μεταλλάξεις του SLC3A1 παρατηρούνται αποκλίσεις των επιπέδων κυστίνης στα ούρα καθώς και των κλινικών χαρακτηριστικών της νόσου μεταξύ συγγενικών ή μη ατόμων (πίνακας 9).

... ...



Πίνακας 7: Προσδιορίζονται οι μεταλλάξεις των κυστινουρικών ασθενών, η καταγωγή τους, τα επίπεδα απέκκρισης της κυστίνης στα ούρα τους και τα κύρια κλινικά χαρακτηριστικά έκφρασης της κυστινουρίας (wt: άγριου τύπου αλληλόμορφο, * επισημαίνει τις νέες μεταλλάξεις).

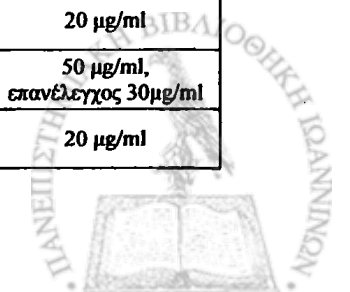
No. Ασθενούς	Φύλο	Ηλικία	Ηλικία πρωτοεκδήλωσης νόσου	Καταγωγή	SLC3A1	SLC7A9	Αγωγή με -SH	Αλκαλοποίηση	Συγκέντρωση κυστίνης στα ούρα (μg/ml)	Κλινικά χαρακτηριστικά
Cys8	♂	42	18	Ήπειρος	T216M/ N516D*	Y232C*/wt	+ (6μηνο)	-	100	Υποτροπιάζουσα αμφοτερόπλευρη λιθίαση
Cys76	♀	18	10,5	Ήπειρος	T216M/ T216M		+	+	60	Υποτροπιάζουσα ετερόπλευρη (ΔΕ) λιθίαση
Cys99	♀	30	2,5	Ήπειρος	T216M/ T216M		-	-	75	Υποτροπιάζουσα ετερόπλευρη (ΑΡ) λιθίαση
Cys180	♀	10	8	Θεσσαλία	T216M/ T216M		+ (πρόσφατα ≈ 1έτος)	+ (πρόσφατα ≈ 1έτος)	90-100	Υποτροπιάζουσα ετερόπλευρη (ΑΡ) λιθίαση
Cys198	♂	23,5	18	Μακεδονία	T216M/ T216M		+ (πρόσφατα ≈ 1,5 μήνα)	+ (με σόδες πρόσφατα ≈ 1,5 μήνα)	50	Υποτροπιάζουσα αμφοτερόπλευρη λιθίαση
Cys3	♂	47	19	Ήπειρος	F266S*/wt	G105R/ G105R	+ (3 χρόνια)	+ με σόδες	65	Υποτροπιάζουσα αμφοτερόπλευρη λιθίαση
Cys11	♀	14	3,5	Μακεδονία		G105R/ G105R	+	+	65-70	Υποτροπιάζουσα αμφοτερόπλευρη λιθίαση
Cys80	♂	72	45,5	Θεσπρωτία		G105R/ G105R	+ (3-5 χρόνια)	-	50	Νεφρεκτομή ΑΡ, έκτοτε υποτροπιάζουσα λιθίαση ΔΕ
Cys159	♂	73	41,5	Μακεδονία		G105R/ G105R	+ (Caroten)	+	60-65	Υποτροπιάζουσα αμφοτερόπλευρη λιθίαση κυρίως λιθίαση ΔΕ
Cys191	♂	41	18	Ήπειρος		G105R/ G105R	+ (5 χρόνια)	+ (5 χρόνια)	100	Νεφρεκτομή ΑΡ, έκτοτε υποτροπιάζουσα λιθίαση ΔΕ
Cys77	♀	68	37,5	Θεσπρωτία		G105R/ S379R	+	+ (3 τελευταία χρόνια)	75	Υποτροπιάζουσα αμφοτερόπλευρη λιθίαση, κυρίως λιθίαση ΔΕ

... συνέχεια πίνακα 7

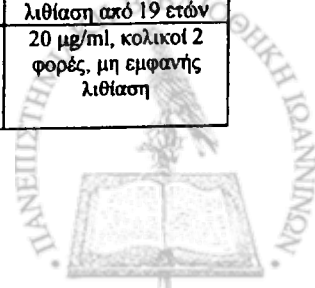
Cys173	♂	50	43	Ιόνιο κέλυφος (Κέλυφος)	M467T/ M467T		+ (2μηνω)	+ (με σόδες)	-	Υποπροϊόντα αμιφοτερόδελουρη λάθλαση
Cys153	♀	25	≈7	Αργείο κέλυφος (Μυρτιάληνη)	M467T/ T3511*		-	-	-	Υποπροϊόντα αμιφοτερόδελουρη λάθλαση
Cys12	♀	27	18	Μακεδονία	M467T/ R365L		-	+ (με σόδες)	50	Υποπροϊόντα αμιφοτερόδελουρη λάθλαση
Cys6	♂	25,5	10-12	Μακεδονία		479-IG>C/ D233E*	+ (προ 2ετίας)	+	65	Υποπροϊόντα αμιφοτερόδελουρη λάθλαση
Cys183	♂	56	18	Αργείο κέλυφος (Κρητήν)	R270X/ R270X		+	+	-	Υποπροϊόντα αμιφοτερόδελουρη λάθλαση, νεφροτροπή AP
Cys187	♂	20	10	Αργείο κέλυφος (Ρόδος)	R456C/ R456C*		+	+	-	Υποπροϊόντα αμιφοτερόδελουρη λάθλαση
Cys154	♀	67	35	Θηρακός		R333W/ R333W	+	+	55	Υποπροϊόντα αμιφοτερόδελουρη λάθλαση, κυρίως λάθλαση AP, μερική στήν AP νεφροβό
Cys169	♂	16	3,5	Θηρακός		R333W/ R333W	-	+	50	Υποπροϊόντα λάθλαση AP, οβίτητες σε στήν AP νεφροβό
Cys161	♀	71	25	Θηρακός		S379R/ I399+IG>T*	+ (τα 5 τελευταία χρόνια)	-	75	Νεφροτροπή ΔΕ, υποπροϊόντα λάθλαση AP

Πίνακας 8: Γονοτυπικά, απλοτυπικά και φαινοτυπικά δεδομένα των συγγενών των κυστινουρικών ασθενών με μεταλλάξεις του SLC7A9 γονιδίου (Οι ασκερίσκοι επισημαίνουν το κυστινουρικό άτομο αναφοράς της κάθε οικογένειας, οι έντονα επισημασμένοι SLC7A9 SNPs απλότυποι βρίσκονται σε σύνδεση (linkage) με την μετάλλαξη, # δείχνει τους ασθενείς με τον άγριο τύπο SLC7A9 SNPs απλότυπο: wt).

Οικογένεια	Συγγένεια με το κυστινουρικό άτομο αναφοράς της οικογένειας	Μεταλλάξεις στο SLC7A9	Μεταλλάξεις στο SLC3A1	*SLC7A9 SNPs απλότυποι	Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά
Cys11#	*	G105R/G105R		cctcttttcgacc -----	
F9	Πατέρας	G105R/wt		cctcttttcgacc -----	30 µg/ml
F10	Μητέρα	G105R/wt		cctcttttcgacc --gt-c-t-cat----	30 µg/ml
F20	Αδελφός	G105R/wt		cctcttttcgacc -----	20 µg/ml
F21	Αδελφός	G105R/wt		cctcttttcgacc -----	20 µg/ml
Cys80#	*	G105R/G105R		cctcttttcgacc -----	
F81	Υιός	G105R/wt		cctcttttcgacc -----	20 µg/ml
F82	Κόρη	G105R/wt		cctcttttcgacc -----	20 µg/ml
Cys159#	*	G105R/G105R		cctcttttcgacc -----	
F92	Κόρη	G105R/wt		cctcttttcgacc -----	20 µg/ml
Cys191#	*	G105R/G105R		cctcttttcgacc -----	
F189	Πατέρας	G105R/wt		cctcttttcgacc --gt-c-t-cat--t-	20 µg/ml, από 17 ετών κολικοί και αυτόματες αποβολές άμμου και λίθων
F190	Μητέρα	G105R/wt		cctcttttcgacc -----	30 µg/ml, από 17-20 ετών κολικοί, 1 αυτόματη αποβολή λίθου, ίχνη άμμου ΔΕ και ΑΡ
F192	Αδελφός	G105R/wt		cctcttttcgacc --gt-c-t-cat--t-	30 µg/ml, 24-25 ετών κολικός, περιστασιακά κολικοί, αποβολή άμμου και 1 φορά λίθου
F193	Αδελφή	G105R/G105R		cctcttttcgacc -----	80-100 µg/ml, υποτροπιάζουσα αμφοτερόπλευρη λιθίαση από 5 ετών, κυρίως λιθίαση ΑΡ
Cys3#	*	G105R/G105R	F266S/wt	cctcttttcgacc -----	
F1	Αδελφός	G105R/G105R	wt/wt	cctcttttcgacc -----	35-40 µg/ml, 8 ετών αφαίρεση λίθου, υποτροπή λιθίασης
F14	Πατέρας	G105R/wt		cctcttttcgacc -----	20 µg/ml
F15	Μητέρα	G105R/wt	F266S/wt	cctcttttcgacc -----	20 µg/ml
F2	Υιός του F1	G105R/wt	wt/wt	cctcttttcgacc --g-cctacat-g--	50 µg/ml, επανέλεγχος 30µg/ml
F17	Κόρη του F1	G105R/wt	wt/wt	cctcttttcgacc -----	20 µg/ml



Cys77#	*	G105R/wt S379R/wt		<u>ccctcttctgctcgacc</u>	
F78	Υιός	G105R/wt		<u>ccctcttctgctcgacc</u>	20 µg/ml
F79	Κόρη	S379R/wt		<u>ccctcttctgctcgacc</u>	-
Cys161#	*	S379R/wt 1399+1G>T/wt		<u>ccctcttctgctcgacc</u>	
F163	Κόρη	S379R/wt		<u>ccctcttctgctcgacc</u>	20 µg/ml
F165	Κόρη της F163	wt/wt		<u>ccctcttctgctcgacc</u> --g-ccctacat-g--	20 µg/ml
F166	Κόρη της F163	S379R/wt		<u>ccctcttctgctcgacc</u> --g-ccctacat-g--	Παλαιότερα έδειξε αυξημένα επίπεδα απέκκρισης κυστίνης, πρόσφατα 20 µg/ml, ωστόσο έχει υποτροπιάζουσες δυσουρικές ενοχλήσεις αγνώστου αιτίας
Cys6	*	479-1G>C/wt D233E/wt		<u>ccctcttctgctcgacc</u> -----f	
F4	Μητέρα	479-1G>C/wt		<u>ccctcttctgctcgacc</u> --g-ccctacat-g--	30 µg/ml, αυτόματη αποβολή λίθου 40 ετών, δεν προσδιορίστηκε η σύστασή του
F5	Πατέρας	D233E/wt		<u>ccctcttctgctcgact</u> --g-ccctacat-g-c	>50 µg/ml
F83	Γιαγιά από τον πατέρα	D233E/wt		<u>ccctcttctgctcgact</u> l---cc-----g-c	75 µg/ml
F85	Γιαγιά από την μητέρα	479-1G>C/wt		<u>ccctcttctgctcgacc</u>	20 µg/ml
F7	Αδελφή της F4	479-1G>C/wt		<u>ccctcttctgctcgacc</u> --g-ccctacat-g--	75 µg/ml, υποτροπιάζουσες δυσουρικές ενοχλήσεις (συρολοιμώξη ακουσία λιθίασης τη στιγμή που έγινε ο έλεγχος προσδιορισμού της κυστίνης)
F90	Υιός της F7	479-1G>C/wt		<u>ccctcttctgctcgacc</u>	20 µg/ml
F91	Υιός της F7	479-1G>C/wt		<u>ccctcttctgctcgacc</u>	20 µg/ml
F86	Αδελφός της F4 και F7	479-1G>C/wt		<u>ccctcttctgctcgacc</u> --g-ccctacat-g--	30 µg/ml
F88	Υιός του F 86	479-1G>C/wt		<u>ccctcttctgctcgacc</u>	20 µg/ml
F89	Υιός του F86	wt/wt		Έλλειψη DNA	-
Cys154#	*	R333W/R333W		<u>ccctcttctgctcgacc</u>	
F156	Κόρη	R333W/wt		<u>ccctcttctgctcgacc</u>	20 µg/ml
F157	Κόρη	R333W/wt		<u>ccctcttctgctcgacc</u>	20 µg/ml
F158	Κόρη	R333W/wt		<u>ccctcttctgctcgacc</u>	20 µg/ml
F167	Ξαδέλφη	R333W/R333W		<u>ccctcttctgctcgacc</u>	30 µg/ml, υποτροπιάζουσα αμφοτερόπλευρη λιθίαση από 19 ετών
F168	Κόρη της F167	R333W/wt		<u>ccctcttctgctcgacc</u> --g-ccctacat-g--	20 µg/ml, κολικοί 2 φορές, μη εμφανής λιθίαση



...συνέχεια πίνακα 8

Cys169#		R333W/R333W		ccctcttctgctcgacc -----	
F170	Πατέρας	R333W/wt		ccctcttctgctcgacc -----g--	±30 µg/ml
F171	Μητέρα	R333W/wt		ccctcttctgctcgacc -----	20 µg/ml
F172	Αδελφός	R333W/R333W		ccctcttctgctcgacc -----	50 µg/ml

*Οι ακλότυποι αντιστοιχούν στην ακόλουθη σειρά των πολυμορφικών θέσεων του SLC7A9 γονιδίου: 1-39C>T, 235+18C>A, 235+22T>G, 399C>T, 411T>C, 425T>C, 478+10T>C, 507C>T, 604+10G>A, 604+24T>C, 667C>A, 687C>T, 972G>A, 977+51A>G, 1143C>T, 1365C>T.



Πίνακας 9: Γονοτυπικά, απλοτυπικά και φαινοτυπικά δεδομένα των συγγενών των κυστινourικών ασθενών με μεταλλάξεις του SLC3A1 γονιδίου (Οι ασκερίσκοι επισημαίνουν το κυστινourικό άτομο αναφοράς της κάθε οικογένειας, οι έντονα επισημασμένοι SLC7A9 SNPs απλότυποι είναι αυτοί που αποκλίνουν από τον άγριου τύπο απλότυπο, # δείχνει τους ασθενείς με τον άγριο τύπο SLC7A9 SNPs απλότυπο: wt).

Οικογένεια	Συγγένεια με το κυστινourικό άτομο αναφοράς της οικογένειας	Μεταλλάξεις στο SLC7A9	Μεταλλάξεις στο SLC3A1	* SLC7A9 SNPs απλότυποι	Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά
Cys99	*		T216M/T216M	ccgtttctgcatgac -a-----cc-c-	
F95	Γιαγιά από τον πατέρα		T216M/wt	ccctttctgctcgacc -----	20 µg/ml
F96	Πατέρας		T216M/wt	ccctttctgctcgacc -agt-c-t-c-----	20 µg/ml
F97	Μητέρα		T216M/wt	ccctttctgctcgacc -gt-c-t-cat-t-	-
F98	Αδελφός		T216M/wt	ccctttctgctcgacc -----	20 µg/ml
Cys76	*		T216M/T216M	ccctttctgctcgacc -agt-c-t-c-----	
F72	Πατέρας		T216M/wt	ccctttctgctcgacc -----	20 µg/ml
F73	Μητέρα		T216M/wt	ccctttctgctcgacc -agt-c-t-c-----	20 µg/ml
F74	Αδελφός		wt/wt	ccctttctgctcgacc -----	20 µg/ml
F75	Αδελφός		T216M/T216M	ccctttctgctcgacc -agt-c-t-c-----	60 µg/ml, 10,5 ετών κολικός που οδήγησε σε απόφραξη και αυτόματη αποβολή λίθου
Cys180	*		T216M/T216M	ccgcccctacatggcc -----	
F177	Μητέρα		T216M/wt	ccgcccctacatggcc --t-ttctgcc-a--	20 µg/ml
F178	Πατέρας		T216M/wt	ccgcccctacatggcc --t-ttctgcc-a--	20 µg/ml
F179	Αδελφή		T216M/T216M	ccgcccctacatggcc --t-ttctgcc-a--	90-100 µg/ml, 10 ετών κολικός ΔΕ και αυτόματη αποβολή λίθου, στή ΔΕ νεφρού
F181	Αδελφός		wt/wt	ccgcccctacatggcc -----	20 µg/ml
F182	Αδελφός		wt/wt	ccgcccctacatggcc --t-ttctgcc-a--	20 µg/ml
Cys198	*		T216M/T216M	ccgtttctgcatgate --cc-c-a--gc-	
F196	Πατέρας		T216M/wt	ccgtttctgcatgate --cc-c-a--gc-	20 µg/ml
F197	Μητέρα		T216M/wt	ccgtttctgcatgate --cc-c-a--gc-	20 µg/ml
F199	Αδελφός		wt/wt	ccgtttctgcatgate -----	20 µg/ml
F200	Αδελφή		T216M/wt	ccgtttctgcatgate -----	20 µg/ml
Cys8	*	Y232C/wt (σύνδεση της με τον μη-wt)	T216M/N516D	ccctttctgctcgacc -g-ccctacat-g-	

		απλότυπο)			
F18	Μητέρα	Υ232C/wt (σύνδεσή της με τον μη-wt απλότυπο)	N516D/wt	cctctttcgtccgacc -g-ccctacat-g-	20 µg/ml
F19	Πατέρας		T216M/wt	cctctttcgtccgacc -----	20 µg/ml
Cys173#	*		M467T/M467T	cctctttcgtccgacc -----	
F175	Υιός		M467T/wt	cctctttcgtccgacc -----	20 µg/ml
F176	Υιός		M467T/wt	cctctttcgtccgacc -----	20 µg/ml
Cys153#	*		M467T/T351I	cctctttcgtccgacc -----	
F152	Πατέρας		M467T/wt	cctctttcgtccgacc -----	- (δεν αναφέρθη κανένα σύμπτωμα)
Cys12#	*		M467T/R365L	cctctttcgtccgacc -----	
F13	Αδελφός		M467T/R365L	cctctttcgtccgacc -gt-c-t-cat--t-	80-85 µg/ml
F22	Πατέρας		M467T/wt	cctctttcgtccgacc -gt-c-t-cat--t-	20 µg/ml
F23	Μητέρα		R365L/wt	cctctttcgtccgacc -gt-c-t-cat--t-	20 µg/ml
F93	Παππούς από μητέρα		R365L/wt	cctctttcgtccgacc -g-ccctacat-g-	20 µg/ml
F94	Γιαγιά από μητέρα		wt/wt	cctctttcgtccgacc -gt-c-t-cat--t-	20 µg/ml
Cys183	*		R270X/R270X	ccctcttttgcgacc -gt-c-c-cat--tc	
F207	Σύζυγος		wt/wt	ccctcttttgcgacc -g-ccccacat-g-	-
F184	Κόρη		R270X/wt	ccctcttttgcgacc -g-ccccacat-g-c	-
F185	Υιός		-R270X/wt	ccctcttttgcgacc -gt-c-c-cat--t-	-
Cys187#	*		R456C/R456C	cctctttcgtccgacc -----	
F186	Μητέρα		R456C/wt	cctctttcgtccgacc -----	-
F188	Πατέρας		R456C/wt	cctctttcgtccgacc -gt-c-t-cat--	-

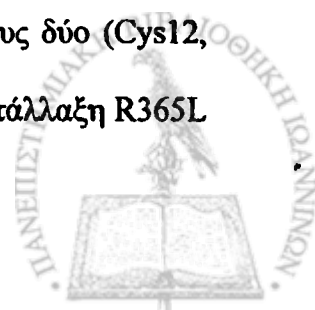
* Οι απλότυποι αντιστοιχούν στην ακόλουθη σειρά των πολυμορφικών θέσεων του SLC7A9 γονιδίου: 1-39C>T, 235+18C>A, 235+22T>G, 399C>T, 411T>C, 425T>C, 478+10T>C, 507C>T, 604+10G>A, 604+24T>C, 667C>A, 687C>T, 972G>A, 977+51A>G, 1143C>T, 1365C>T.



B. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΚΥΣΤΙΝΟΥΡΙΑΣ ΣΤΟΥΣ ΕΛΛΗΝΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Συνολικά 15 μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν στους 20 Έλληνες κυστινουρικούς ασθενείς οι οποίοι μελετήθηκαν (πίνακας 10, εικόνα 19). Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη γενετική ανάλυση της νόσου στην Ελλάδα. Οκτώ από τις 15 συνολικά μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν για πρώτη φορά διεθνώς. Από τις 15 μεταλλάξεις, οι 8 αφορούν στο γονίδιο SLC3A1, ενώ οι υπόλοιπες 7 σχετίζονται με το γονίδιο SLC7A9. Αποκλίσεις από το φυσιολογικά αναμενόμενο πρότυπο ηλεκτροφόρησης, μετά την εφαρμογή της μεθόδου SSCP, αποκάλυψαν 12 από τις 15 μεταλλάξεις (εικόνες 20-22, πίνακας 10). Οι υπόλοιπες 3 μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν μετά από εύρεση της πρωτοδιάταξης όλων των εξωνίων των γονιδίων SLC3A1 και SLC7A9. Η ευαισθησία της μεθόδου SSCP προσέγγισε το 80%. Το ποσοστό όμως αυτό ανίχνευσης των μεταλλάξεων ανήλθε σε 100% μετά από την εύρεση της πρωτοδιάταξης όλων των εξωνίων των γονιδίων SLC3A1 και SLC7A9 τριών ασθενών για τους οποίους μέχρι τότε δεν είχε δοθεί πλήρης ερμηνεία της γενετικής βάσης της νόσου τους. Τα αντίστοιχα αποτελέσματα της RFLPs ανάλυσης των μεταλλάξεων δίνονται στην εικόνα 23.

Η μετάλλαξη T216M στο εξώνιο 3 του SLC3A1 γονιδίου, η οποία είναι γνωστή στη διεθνή βιβλιογραφία ως η “ελληνική” μετάλλαξη, βρέθηκε σε τέσσερις ασθενείς σε ομοζυγωτία (Cys76, Cys99, Cys180, Cys198) και σε έναν ασθενή σε ετεροζυγωτία (Cys8). Ο ασθενής αυτός έφερε επίσης σε ετεροζυγωτία και την για πρώτη φορά περιγραφόμενη μετάλλαξη N516D του εξωνίου 9 στο SLC3A1 γονίδιο όπως και την καινούργια μετάλλαξη Y232C του εξωνίου 6 στο SLC7A9 γονίδιο. Η “μεσογειακή” μετάλλαξη M467T στο εξώνιο 8 του γονιδίου SLC3A1 βρέθηκε σε ομοζυγωτία σε έναν ασθενή (Cys173) και σε ετεροζυγωτία σε άλλους δύο (Cys12, Cys153). Ο ένας εκ των οποίων έφερε επίσης σε ετεροζυγωτία την μετάλλαξη R365L



του εξωνίου 6 του SLC3A1, ενώ ο δεύτερος έφερε σε ετεροζυγωτία την νεοπεριγραφόμενη μετάλλαξη T351I του ίδιου εξωνίου. Η ομοζυγωτία της καινούργιας μετάλλαξης R456C στο εξώνιο 8 του SLC3A1, προκάλεσε την κυστινουρία στον ασθενή Cys187, ενώ η ομοζυγωτία της μετάλλαξης R270X στο εξώνιο 4 του ίδιου γονιδίου, οφείλεται για τη νόσο στον ασθενή Cys183. Στο ίδιο εξώνιο ανιχνεύθηκε επίσης η καινούργια μετάλλαξη F266S. Η μετάλλαξη αυτή σε ετεροζυγωτία μαζί με την ομοζυγωτία της μετάλλαξης G105R στο εξώνιο 4 του γονιδίου SLC7A9 σχετίστηκαν με την νόσο στον ασθενή Cys3.

Η μετάλλαξη G105R βρέθηκε επίσης σε ομοζυγωτία σε τέσσερις ακόμη ασθενείς (Cys11, Cys80, Cys159, Cys191) και σε ετεροζυγωτία σε έναν (Cys77). Ο ασθενής αυτός έφερε επίσης σε ετεροζυγωτία την καινούργια μετάλλαξη S379R στο εξώνιο 11 του SLC7A9. Η ετεροζυγωτία αυτής της μετάλλαξης και της νεοπεριγραφόμενης μετάλλαξης 1399+1G>T σε θέση συναρμογής, σχετίστηκαν με την εκδήλωση της κυστινουρίας στον ασθενή Cys161. Η επίσης νέα για τη διεθνή βιβλιογραφία μετάλλαξη σε θέση ματίσματος εξωνίου-ιντρονίου, 479-1G>C, μαζί με την D233E στο εξώνιο 6 του SLC7A9 προκάλεσαν κυστινουρία στον ασθενή Cys6. Τέλος, η ομοζυγωτία της μετάλλαξης R333W στο εξώνιο 10 του SLC7A9 προκάλεσε τη νόσο σε άλλους δύο ασθενείς (Cys154, Cys169). Δεν ανιχνεύθηκαν καθόλου μεταλλάξεις στα εξώνια 1, 2, 5, 7, και 10 του SLC3A1 γονιδίου και στα εξώνια 1, 2, 3, 7, 8, 9 και 13 του SLC7A9. Επίσης, καμμία από τις προαναφερθείσες γενετικές αλλαγές δεν βρέθηκε στην ομάδα ελέγχου.

Η μετάλλαξη G105R στο εξώνιο 4 του SLC7A9 είναι η συχνότερη στον πληθυσμό της Ελλάδος. Αυτή η μετάλλαξη αντιπροσωπεύεται σε ομοζυγωτία από το 25% των ασθενών και σε ετεροζυγωτία από το 5% αυτών. Η δεύτερη σε συχνότητα μετάλλαξη παρούσα σε ομοζυγωτία στο 20% και σε ετεροζυγωτία στο 5% των



ασθενών είναι η T216M στο εξώνιο 3 του SLC3A1. Η αποκαλούμενη ως “μεσογειακή” μετάλλαξη M467T στο εξώνιο 8 του SLC3A1 βρέθηκε σε ομοζυγωτία στο 5% των ασθενών και σε ετεροζυγωτία στο 10% αυτών. Αυτές οι τρεις μεταλλάξεις συνεισφέρουν με την ομοζυγωτία τους στην γενετική ερμηνεία της νόσου στο 50% των Ελλήνων ασθενών. Για το υπόλοιπο 50% των Ελλήνων κυστινουρικών ατόμων, είτε η σύνθετη ετεροζυγωτία αυτών των τριών μεταλλάξεων, είτε η ομοζυγωτία ή σύνθετη ετεροζυγωτία 12 επιπλέον μεταλλάξεων ισοτίμως κατανεμημένων στα γονίδια SLC3A1 και SLC7A9, συμβάλλουν στη γενετική βάση της νόσου. Καμμία από τις μεταλλάξεις δεν μπορούμε να πούμε ότι περιορίζεται

Δώδεκα από τις 15 μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν χαρακτηρίζονται ως λάθους νόηματος, 1 χωρίς νόημα και 2 μεταλλάξεις επηρεάζουν τη διαδικασία της συναρμογής των εξωνίων (splicing). Σε 7 από τις μεταλλάξεις ο υδροφοβικός χαρακτήρας των αμινοξέων αλλάζει σε υδρόφιλο ή το αντίστροφο (T216M, F266S, T351I, R365L, M467T, G105R, και R333W). Σε 3 άλλες περιπτώσεις ο υδρόφιλος χαρακτήρας του άγριου τύπου αμινοξέων παραμένει σταθερός, ενώ το φορτίο μεταβάλλεται από ουδέτερο σε θετικό, από θετικό σε ουδέτερο και από ουδέτερο σε αρνητικό (S379R, R456C, N516D, αντίστοιχα). Τέλος, καμμία αλλαγή ούτε στον υδρόφιλο χαρακτήρα ούτε στην πολικότητα των αμινοξέων ισχύει για τις περιπτώσεις των μεταλλάξεων Y233C και D233E (πίνακας 11).

Σύμφωνα με την κλίμακα Grantham όσον αφορά τη βαθμίδωση στη φυσικοχημική ανομοιογένεια (πίνακας 11) των υποκαταστάσεων μεταξύ των αμινοξέων ισχύει η ακόλουθη φθίνουσα κλιμάκωση της ετερογένειάς τους: Y232C, R456C, D233E, F266S, G105R, S379R, R365L, R333W, T351I, T216M και M467T



(ισοδύναμα), D233E, και N516D. Οι πρώτες 8 υποκαταστάσεις των αμινοξέων χαρακτηρίζονται ως ακραίες, ενώ οι ακόλουθες 4 ως συντηρητικές [137].

Στην εικόνα 24 φαίνεται η θέση των μεταλλάξεων στη δομή των rBAT και b^{0,+}AT πρωτεϊνών που συγκροτούν τον μεταφορέα της κυστίνης. Οι μεταλλάξεις του SLC3A1 γονιδίου βρίσκονται όλες στον εξωκυττάριο βρόχο, με μία εξ αυτών (N516D) να εντοπίζεται στην πιο ακραία καρβοξυτελική περιοχή της rBAT πρωτεΐνης. Οι μεταλλάξεις του SLC7A9 εντοπίζονται 2 σε ενδοκυττάριους βρόχους (G105R και R333W, στον 1 και 4 βρόχο, αντίστοιχα) και 3 σε διαμεμβρανικές επικράτειες (Y232C, και D233E στην 6^η TM και S379R στην 10^η TM).

Στην εικόνα 25 φαίνεται ο αρνητικός ρόλος 7 από τις 8 προσδιοριζόμενες μεταλλάξεις στη συναρμογή (splicing) των εξωνίων των γονιδίων. Οι υπόλοιπες 8 είναι ουδέτερες. Συγκεκριμένα:

α) Η D233E (εξώνιο 6, SLC7A9) οδηγεί σε απώλεια της πραγματικής 5'-ιντρονικής θέσης συναρμογής.

β) Η R333W (εξώνιο 10, SLC7A9) μειώνει ελάχιστα το score της κύριας 3'-ιντρονικής θέσης συναρμογής.

γ) Η S379R (εξώνιο 11, SLC7A9) δημιουργεί νέο ισχυρό σήμα για εναλλακτική θέση ματίσματος στο 5'-άκρο του ιντρονίου και αυξάνει το score της ψευδούς (εναλλακτικής) θέσης συναρμογής στο 3' του άκρο.

δ) Η T351I (εξώνιο 6, SLC3A1) αυξάνει το score της ψευδούς 3'-ιντρονικής θέσης συναρμογής.

ε) Η R365L (εξώνιο 6, SLC3A1) δημιουργεί δεύτερη ψευδή 3'-ιντρονική θέση συναρμογής.



στ) Η 479-1G>C είναι μετάλλαξη που αφορά τη θέση συναρμογής στο 3'-άκρο του ιντρονίου 4 του SLC7A9 γονιδίου, οδηγεί σε κατάργηση της πραγματικής 3'-ιντρονικής θέσης συναρμογής και δημιουργία ψευδούς.

ζ) Η 1399+1G>T είναι μετάλλαξη που αφορά τη θέση συναρμογής στο 5'-άκρο του ιντρονίου 12 του SLC7A9 γονιδίου και οδηγεί σε κατάργηση της πραγματικής 5'-ιντρονικής θέσης ματίσματος.

Τέλος, δεν ανιχνεύθηκαν καθόλου μεταλλάξεις στο επίσης πιθανολογούμενο κυστινουρικό γονίδιο SLC7A10.



Πίνακας 10: Οι 15 μεταλλάξεις που βρέθηκαν στους Έλληνες κυστινourικούς ασθενείς (η ονοματολογία μέσα στην παρένθεση δίδεται σύμφωνα με τον αύξοντα αριθμό της αλληλουχίας κάθε γονιδίου όπως αυτή έχει καταχωρηθεί στο NCBI), οι συνθήκες των SSCP patterns όπου αποκαλύφθηκαν, το ένζυμο πέψης με το οποίο ανιχνεύονται, το αλληλόμορφο που αναγνωρίζεται και πέπτει η ενδονουκλεάση περιορισμού, και το ποσοστό της ομοζυγωτίας (Ho) ή ετεροζυγωτίας (He) των μεταλλάξεων στον ελληνικό πληθυσμό (* νεοπεριγραφόμενες μεταλλάξεις, † περισσότερες της μίας θέσης κοπής και δίπλα ο αντίστοιχος αριθμός των θέσεων πέψης, ‡ οι μεταλλάξεις που δεν αποκαλύφθηκαν με την SSCP ανάλυση).

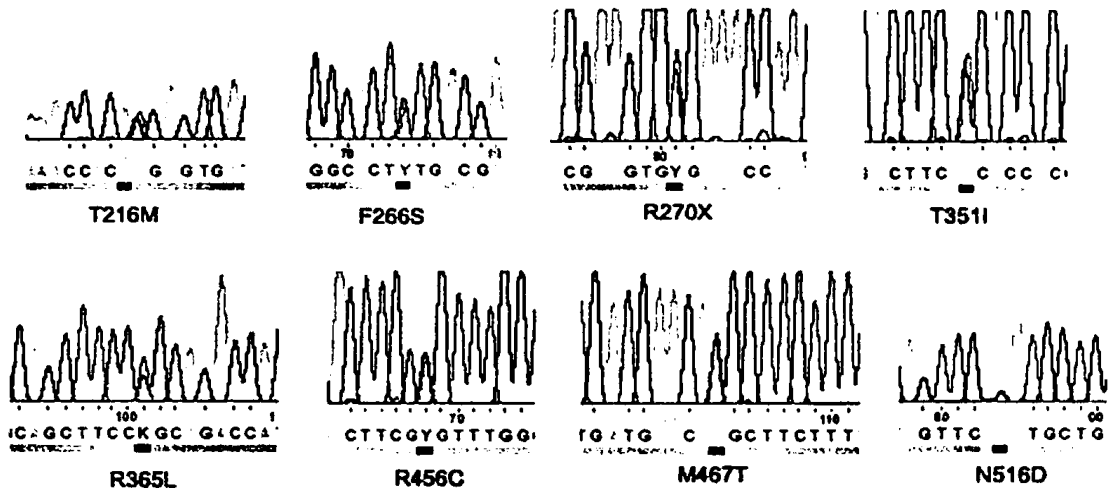
Εξώνιο/Intrόνιο	Νουκλεοτιδική αλλαγή	Αλλαγή στην πρωτεΐνη	SSCP συνθήκη αποκάλυψης μη-άγριου τύπου pattern	Ένζυμο πέψης	Πέπτει άγριου τύπου αλληλόμορφο	Συνολική συσχόληση
SLC3A1 (NM_000341.2)						
Εξώνιο 3	c.647C>T (c.723C>T)	T216M	4°C χωρίς γλυκερόλη ή 25°C με γλυκερόλη	BssSI	+	20% Ho, 5% He
Εξώνιο 4*	c.797T>C (c.873T>C)	F266S	4°C με γλυκερόλη	Hyp188I	-	5% He
Εξώνιο 4	c.808C>T (c.884C>T)	R270X	4°C με γλυκερόλη ή 25°C χωρίς γλυκερόλη	-		5% Ho
Εξώνιο 6*	c.1052C>T (c.1128C>T)	T351I	25°C χωρίς γλυκερόλη	XcmI	+	5% He
Εξώνιο 6	c.1094G>T (c.1170G>T)	R365L	4°C με γλυκερόλη ή 25°C χωρίς γλυκερόλη	PstI	-	5% He
Εξώνιο 8*	c.1366C>T (c.1442C>T)	R456C	25°C χωρίς γλυκερόλη	BstUI	+	5% Ho
Εξώνιο 8	c.1400T>C (c.1476T>C)	M467T	4°C με ή χωρίς γλυκερόλη	NlaIII	+	5% Ho, 10% He
Εξώνιο 9*	c.1546A>G (c.1622A>G)	N516D	4°C ή 25°C με ή χωρίς γλυκερόλη	AlwNI	-	5% He
SLC7A9 (NM_014270.1)						
Εξώνιο 4	c.313G>A (c.498G>A)	G105R	Απροσδιόριστο pattern	ApaI	+	25% Ho, 5% He
Intrόνιο 4-Εξώνιο 5*	c.479-1G>C (IVS4-1G>C)	-	4°C με γλυκερόλη	-		5% He
Εξώνιο 6*	c.695A>G (c.880A>G)	Y232C	†	-		5% He

Εξόνο 6*	c.699T>G (c.884T>G)	D233E	↑	-	-	5% He
Εξόνο 10	c.997C>T (c.1182C>T)	R333W	25°C με η χροιά γλυκερόλη	MspI	+	10% Ho
Εξόνο 11	c.1137C>G (c.1322C>G)	S379R	↑	AfuI	+	10% Ho
Εξόνο 12-Invρόνο 12*	c.1399+1G>T (VSI12+1G>T)	-	↑	MaeI ^{5:2}	-	5% He

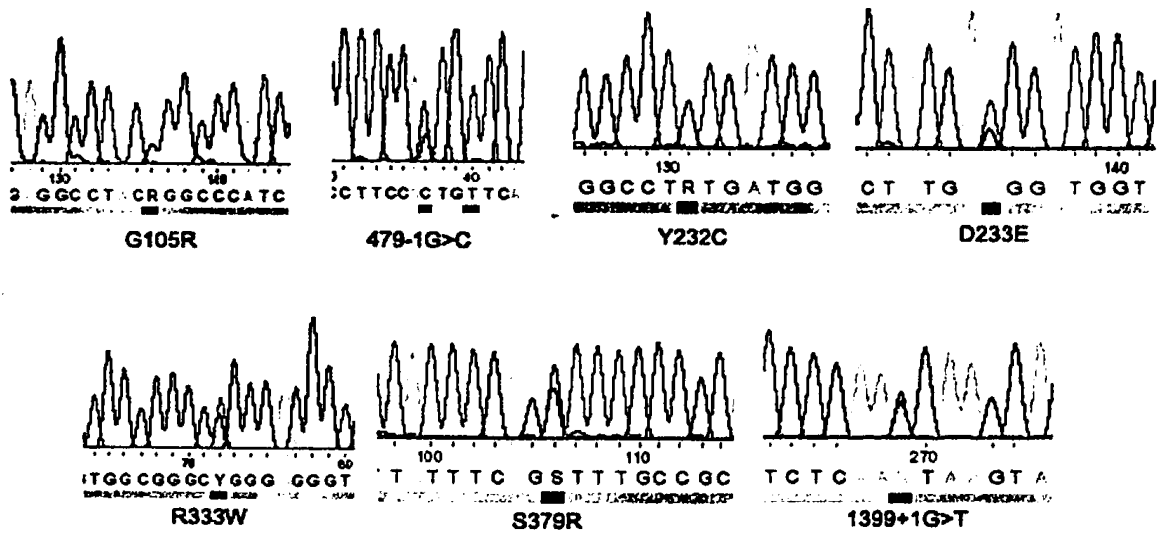
Πίνακας 11: Οι αλλαγές στις φυσικοχημικές ιδιότητες των αμινοξέων των μεταλλάξεων και η ανομοιογένειά τους σύμφωνα με την κλίμακα Grantham¹³² (>100 ακραίες αλλαγές, <100 συντηρητικές αλλαγές).

Εξόνο/Invρόνο	Μετάλλαξη	Αλλαγές στις φυσικοχημικές ιδιότητες των αμινοξέων	Grantham score
SIC3A1			
Εξόνο 3	T216M	Από υδρόφιλο ουδέτερο σε υδρόφοβο	81
Εξόνο 4	F266S	Από υδρόφοβο σε υδρόφιλο ουδέτερο	155
Εξόνο 4	R270X	Από υδρόφιλο θετικό σε καθίκονο τερματισμού	-
Εξόνο 6	T351I	Από υδρόφιλο ουδέτερο σε υδρόφοβο	89
Εξόνο 6	R365L	Από υδρόφιλο θετικό σε υδρόφοβο	102
Εξόνο 8	R456C	Από υδρόφιλο θετικό σε υδρόφιλο ουδέτερο	180
Εξόνο 8	M467T	Από υδρόφοβο σε υδρόφιλο ουδέτερο	81
Εξόνο 9	N516D	Από υδρόφιλο ουδέτερο σε υδρόφιλο αρνητικό	23
SIC7A9			
Εξόνο 4	G105R	Από υδρόφοβο σε υδρόφιλο θετικό	125
Invρόνο 4-Εξόνο 5	479-1G>C	-	-
Εξόνο 6	Y232C	Από υδρόφιλο ουδέτερο σε υδρόφιλο ουδέτερο	194
Εξόνο 6	D233E	Από υδρόφιλο αρνητικό σε υδρόφιλο αρνητικό	160
Εξόνο 10	R333W	Από υδρόφιλο αρνητικό σε υδρόφοβο	101
Εξόνο 11	S379R	Από υδρόφιλο ουδέτερο σε υδρόφιλο θετικό	110
Εξόνο 12-Invρόνο 12	1399+1G>T	-	-

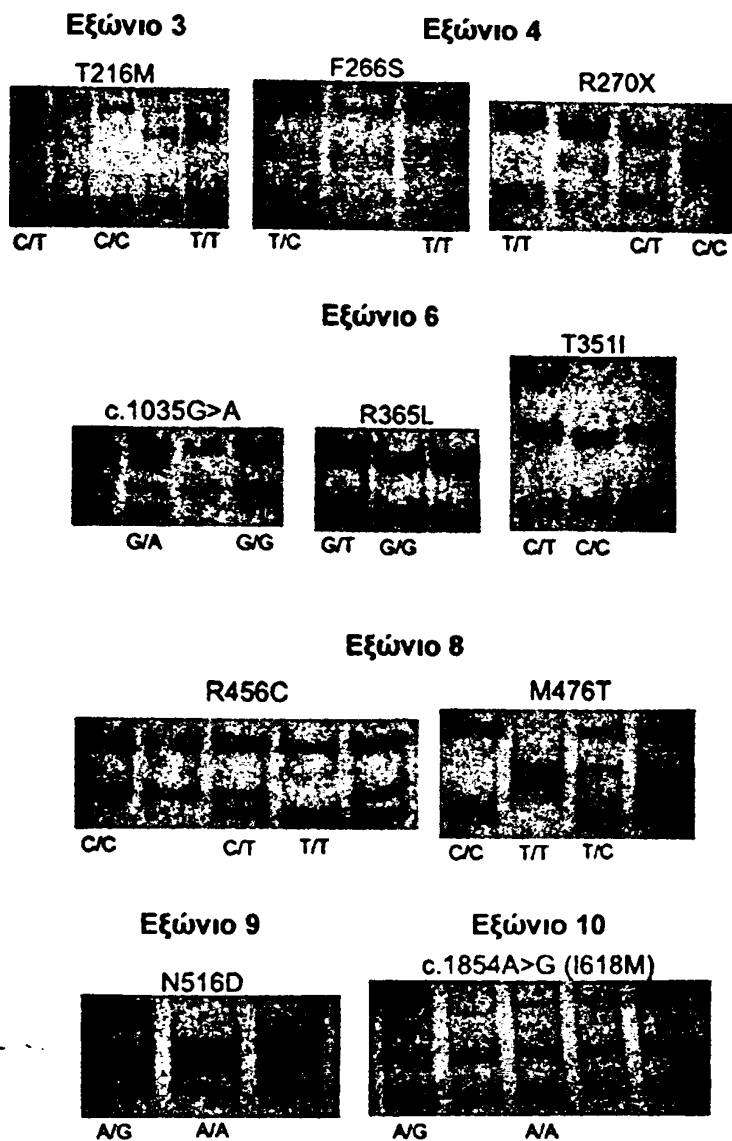
SLC3A1



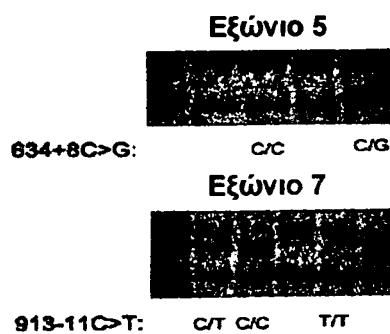
SLC7A9



Εικόνα 19: Τμήματα της αλληλουχίας των γονιδίων SLC3A1 και SLC7A9 όπου εντοπίζονται οι μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν στους 20 ασθενείς.



Εικόνα 20: Τα SSCP patterns που ανιχνεύθηκαν στο SLC3A1 γονίδιο.



Εικόνα 21: Τα SSCP patterns που ανιχνεύθηκαν στο SLC7A10 γονίδιο.



Εξώνιο 3



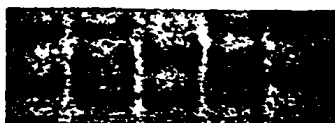
235+24T>G: T/T T/G T/T G/G
 235+18C>A: C/A C/C C/C C/C

Εξώνιο 5



507C>T: C/C C/T C/T C/C
 604+10G>A: G/G G/A G/A G/G
 604+24T>C: T/T T/C T/C T/T
 479-1G>C: G/C G/C
 C/C T/T C/C C/C C/T T/T T/T
 G/G A/A G/G G/G G/A G/A G/G
 T/T C/C T/T T/T T/C C/C C/C

Εξώνιο 6



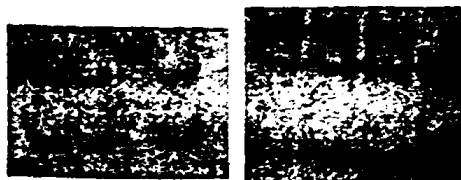
667C>A: C/C C/A A/A
 687C>T: C/C C/T T/T

Εξώνιο 9



977+51A>G: G/G A/G A/A

Εξώνιο 10



R333W: C/C T/T C/T C/C

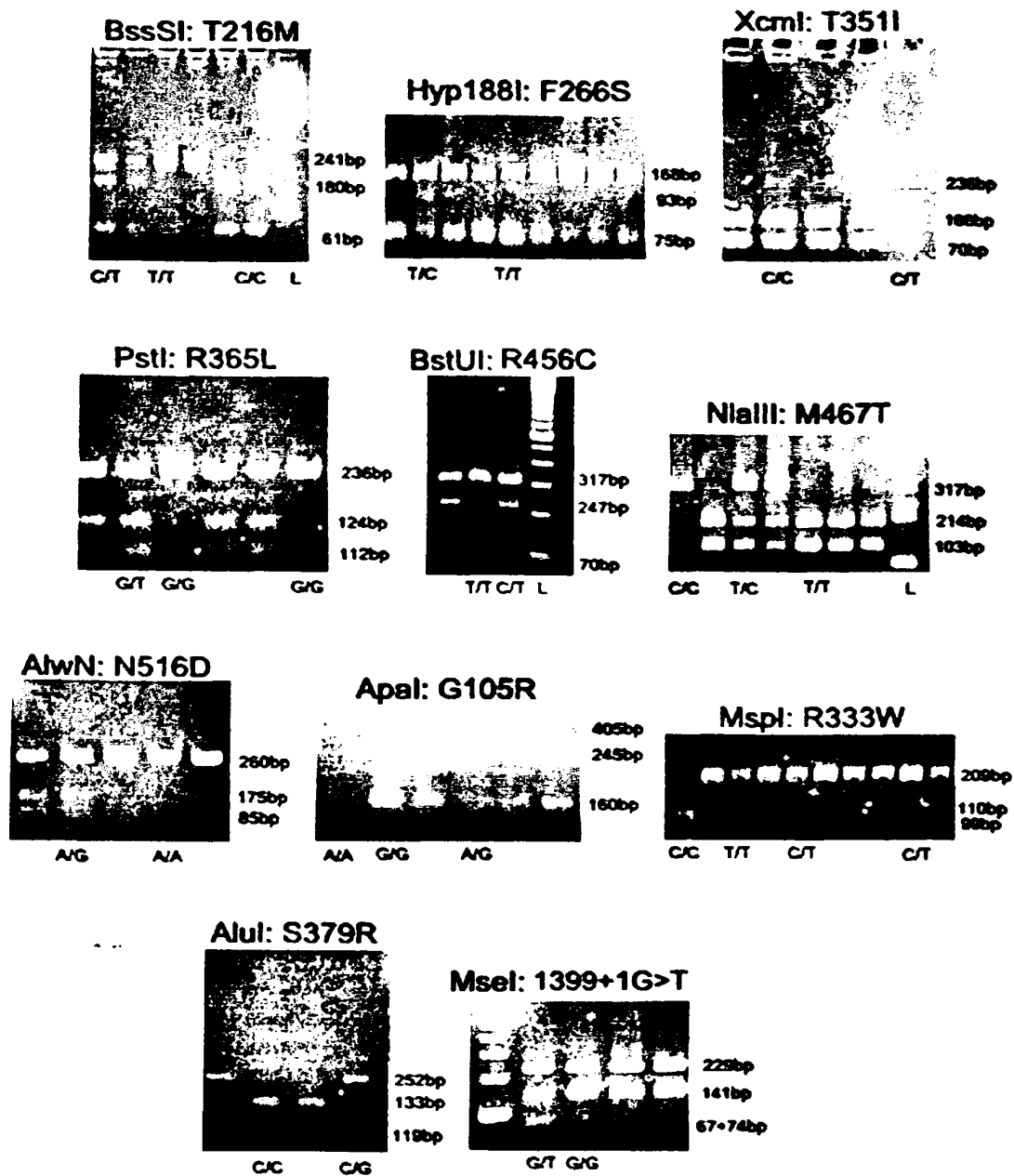
Εξώνιο 11



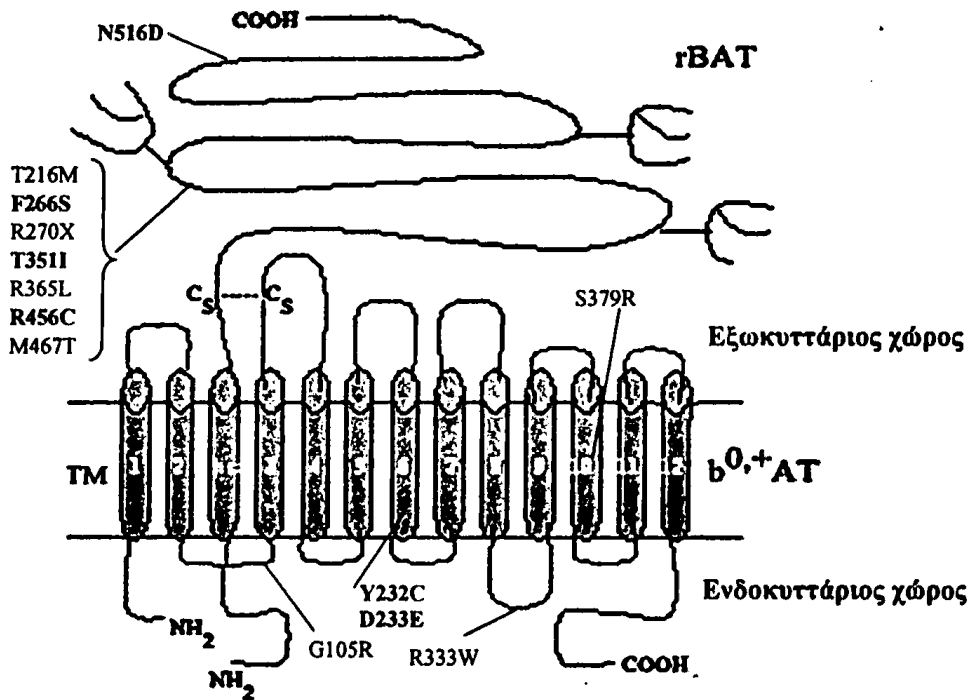
1143C>T: C/C C/T C/T

Εικόνα 22: Τα SSCP patterns που ανιχνεύθηκαν στο SLC7A9 γονίδιο (τα pattern του εξωνίου 4 δεν ήταν πληροφοριακά λόγω των πολλών γενετικών αλλαγών: 1 μετάλλαξη και 4 πολυμορφισμοί).





Εικόνα 23: Τα αποτελέσματα της RLFPs ανάλυσης των μεταλλάξεων που προσδιορίστηκαν (οι μαύρες απεικονίσεις των ζωνών αντιστοιχούν στις RFLPs αναλύσεις που ελέγχθηκαν με πηκτή πολυακρυλαμίδης και χρώση με νιτρικό, ενώ λευκές απεικονίσεις των ζωνών αντιστοιχούν στις RFLPs αναλύσεις που ελέγχθηκαν με πηκτή αγαρόζης και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο).



Εικόνα 24: Σχηματική αναπαράσταση των SLC3A1 και SLC7A9 μεταλλάξεων (rBAT: η πρωτεΐνη που εκφράζεται από το SLC3A1, $b^{0,+}AT$: η πρωτεΐνη που εκφράζεται από το SLC7A9, TM: διαμεμβρανική επικράτεια, C_S-C_S : δισουλφιδικός δεσμός, οι νεοπεριγραφόμενες μεταλλάξεις είναι γραμμένες με τους έντονους γραφικούς τύπους).

SLC7A9

Εξώνιο 5	Start	End	Score	Intron	Exon	<p>Η πραγματική θέση συναρμογής.</p> <p>* 479-1G>C: Καταργεί την πραγματική θέση συναρμογής και δημιουργεί νέα ψευδή. Η <u>μετάλλαξη</u> δρα αρνητικά.</p>
	45	85	<u>0.46</u>	aaactgtccccacccttc	agtggttcattctcgacagtgaac	
	60	100	0.59	ttccactgttcatctcgaca	gtgaactcactgagcgtgcgg	
Εξώνιο 6	Start	End	Score	Exon	Intron	<p>* D233E (799T>G): Απώλεια της πραγματικής θέσης συναρμογής. Η <u>μετάλλαξη</u> δρα αρνητικά.</p>
	161	175	<u>0.59</u>	atggatggtgaggtg		
	211	225	0.44	tcccaggtgacttt		
Εξώνιο 10	Start	End	Score	Intron	Exon	<p>R333W (1097C>T): Μειώνει το score της πραγματικής θέσης συναρμογής σε 0,8. Η <u>μετάλλαξη</u> δρα αρνητικά.</p>
	56	96	<u>0.89</u>	tccegtgtcgttattttcc	agactcatttactgtggcgggc	
Εξώνιο 11	Start	End	Score	Exon	Intron	<p>* S379R (1237C>G): Δημιουργεί δεύτερη ψευδή θέση συναρμογής. Η <u>μετάλλαξη</u> δρα αρνητικά.</p>
	126	140	0.69	atttcag(c/g)ttgccc		
	214	228	<u>1.00</u>	tatcaaggttaagett		
Εξώνιο 11	Start	End	Score	Intron	Exon	<p>* S379R (1237C>G): Αυξάνει το score της ψευδούς θέσης συναρμογής σε 0,8'. Η <u>μετάλλαξη</u> δρα αρνητικά.</p>
	50	90	<u>0.95</u>	atccattcttcttctatt	aggglatcatagcaacgattta	
	112	152	0.55	ctcgttagtcaattatttc	agctttgccgcacatggtgtttt	
Εξώνιο 12	Start	End	Score	Exon	Intron	<p>* 1399+1G>T: Απώλεια της πραγματικής θέσης συναρμογής. Η <u>μετάλλαξη</u> δρα αρνητικά.</p>
	288	302	<u>0.99</u>	atctcaa(g/t)taagtac		
Εξώνιο 6	Start	End	Score	Intron	Exon	<p>* T351I (1052C>T): Αυξάνει το score της ψευδούς θέσης συναρμογής σε 0, Η <u>μετάλλαξη</u> δρα αρνητικά.</p> <p>* R365L (1094G>T): Δημιουργεί δεύτερη ψευδή θέση συναρμογής. Η <u>μετάλλαξη</u> δρα αρνητικά.</p>
	60	100	0.46	catgacttcaccaccacgc	aggtgggaatgcacgacattgt	
	96	136	0.66	attgtccgcagcttcggc	agaccatggaccaatacagcac	

SLC3A1

Εικόνα 25: Ο αρνητικός ρόλος επτά μεταλλάξεων των SLC3A1 και SLC7A9 γονιδίων στη συναρμογή των εξωνίων τους. (Τα υπογραμμισμένα "score" αντιστοιχούν στην προβλεπόμενη θέση συναρμογής που ταυτίζεται με την πραγματική, ενώ τα υπογραμμισμένα νουκλεοτίδια είναι αυτά τα οποία υπόκεινται στην υποκατάσταση).



Γ. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ SLC3A1, SLC7A9 ΚΑΙ SLC7A10

α) Πολυμορφισμοί του SLC7A9

Τρεις νεοπεριγραφόμενοι πολυμορφισμοί βρέθηκαν στο γονίδιο SLC7A9. Οι σημειακές αυτές αλλαγές είναι οι ακόλουθες: 235+18C>A (ιντρόνιο 3), 604+10G>A (ιντρόνιο 5), και 604+24T>C (ιντρόνιο 5). Επιπλέον, ανιχνεύθηκαν και 13 ακόμη πολυμορφισμοί που είχαν προηγουμένα δημοσιευθεί και ήταν οι εξής: 1-39C>T (5'-ρυθμιστικό άκρο), 235+22T>G (ιντρόνιο 3), 399C>T (εξώνιο 4), 411T>C (εξώνιο 4), 425T>C (V142A, εξώνιο 4), 478+10T>C (ιντρόνιο 4), 507C>T (εξώνιο 5), 667C>A (L223M, εξώνιο 6), 687C>T (εξώνιο 6), 972G>A (εξώνιο 9), 977+51A>G (ιντρόνιο 9), 1143C>T (εξώνιο 11), και 1365C>T (εξώνιο 12). Στον πίνακα 12 δίνονται συνοπτικά όλοι οι πολυμορφισμοί του SLC7A9, οι συνθήκες των SSCP patterns όπου αποκαλύφθησαν καθώς και τα ένζυμα πέψης με τα οποία ανιχνεύονται. Επίσης, στον ίδιο πίνακα προσδιορίζονται οι πολυμορφισμοί που αποκλίνουν από το τυχαίο πρότυπο κατανομής ανάμεσα στην ομάδα των ασθενών και αυτή της ομάδας ελέγχου. Οι αλλαγές στις φυσικοχημικές ιδιότητες των μη-συνώνυμων υποκαταστάσεων των αμινοξέων όπως και ο βαθμός της ετερογένειάς τους κατά Grantham δίνονται στον πίνακα 13. Στην εικόνα 26 δίνεται η θέση τους επάνω στην αλληλουχία του SLC7A9 γονιδίου και στην εικόνα 27 τα αποτελέσματα της RLFPs ανάλυσης. Τέλος, η θέση των πολυμορφισμών στο ετεροδιμερές σύμπλοκο rBAT/b^{0,+}AT παρουσιάζεται παραστατικά στην εικόνα 28.

Στην εικόνα 29 φαίνεται ο θετικός ρόλος των πολυμορφισμών του SLC7A9 γονιδίου στο μάτισμα των εξωνίων του. Όλοι οι πολυμορφισμοί του, με εξαίρεση έναν [411T>C (εξώνιο 4, SLC7A9)], ευνοούν τη σωστή συναρμογή των εξωνίων του καθώς: α) ένας αυξάνει το "score" της πραγματικής θέσης συναρμογής [972G>A

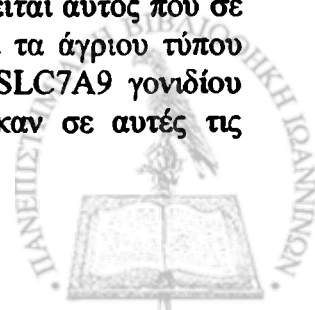


(εξώνιο 4, SLC7A9)], β) κάποιος άλλος εξαλείφει την ψευδή θέση συναρμογής [399C>T (εξώνιο 4, SLC7A9)], γ) δύο άλλοι μειώνουν το “score” της ψευδούς θέσης ματίσματος [399C>T (εξώνιο 4, SLC7A9), 1143C>T (εξώνιο 11, SLC7A9)], και δ) οι υπόλοιποι είναι ουδέτεροι αφού δεν επιδρούν καθόλου στο “score” της προβλεπόμενης 5'- και 3'-θέσης ματίσματος. Τη μόνη εξαίρεση αποτελεί ο πολυμορφισμός 411T>C (εξώνιο 4, SLC7A9) που δρα αρνητικά καθώς αυξάνει σε κάποιο βαθμό το “score” της ψευδούς θέσης ματίσματος.

Η συχνότητα με την οποία βρίσκονται σε ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία οι πολυμορφισμοί δίνεται στον πίνακα 12. Σημαντικές αποκλίσεις από το Hardy-Weinberg ισοζύγιο βρέθηκαν για τους πολυμορφισμούς 235+22T>G, 425T>C, 507C>T, και 604+24T>C ($p<0,05$) στην ομάδα των ασθενών. Από τους 8 συνολικά γονοτυπικούς συνδυασμούς των 16 πολυμορφισμών του γονιδίου SLC7A9 που βρέθηκαν στους ασθενείς οι 2 περιορίζονται αποκλειστικά σε αυτούς (P6 και P7) (πίνακας 14). Οι υπόλοιποι 6 καθώς και 16 ακόμα βρέθηκαν σε Hardy-Weinberg ισοζύγιο στην ομάδα ελέγχου ($p=0,89$) (πίνακας 15).

Ο άγριου τύπου SLC7A9 SNPs γονότυπος/απλότυπος* βρέθηκε σε όλους τους ασθενείς με τις SLC7A9 μεταλλάξεις (εκτός από τον ασθενή Cys 6 ο οποίος όμως απέκλινε μόνο στον ακραίο πολυμορφισμό 1365C>T και μάλιστα σε ετεροζυγωτία) και σε 4 από τους 10 ασθενείς με τις SLC3A1 μεταλλάξεις (πίνακας 8, 9).

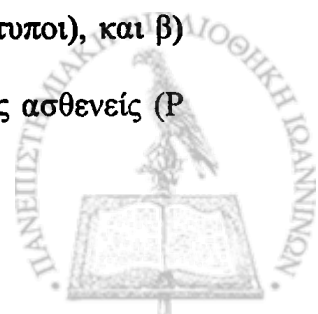
* Ως άγριου τύπου SLC7A9 SNPs γονότυπος ή απλότυπος θεωρείται αυτός που σε όλες τις πολυμορφικές θέσεις του SLC7A9 γονιδίου βρίσκονται τα άγριου τύπου νουκλεοτίδια που έχουν δημοσιευθεί για την αλληλουχία του SLC7A9 γονιδίου (GenBank: NM_014270.1). Τα άλλα νουκλεοτίδια που βρέθηκαν σε αυτές τις πολυμορφικές θέσεις χαρακτηρίζονται ως μη-άγριου τύπου SNPs.



Ο έλεγχος για την τυχαία κατανομή των SLC7A9 SNPs γονοτύπων πραγματοποιήθηκε ανάμεσα: α) στην ομάδα ελέγχου και στην ομάδα των ασθενών με τις SLC7A9 μεταλλάξεις, β) στην ομάδα ελέγχου και στην ομάδα των ασθενών με τις SLC3A1 μεταλλάξεις, και γ) στην ομάδα των ασθενών με τις SLC7A9 μεταλλάξεις και στην ομάδα των ασθενών με τις SLC3A1 μεταλλάξεις. Η απόκλιση από την τυχαία κατανομή των SLC7A9 SNPs γονοτύπων ήταν οριακά στατιστικά σημαντική μεταξύ των δύο ομάδων των ασθενών ($p=0,048<0,05$).

Προκειμένου να αυξήσουμε τη στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων μας εξαιρέσαμε από τους SLC7A9 SNPs γονοτύπους τον ακραίο στην αλληλουχία του SLC7A9 γονιδίου πολυμορφισμό 1365C>T. Ακολούθως, 19 SLC7A9 SNPs γονοτύποι παρατηρήθηκαν στην ομάδα ελέγχου, μόνο ο άγριου τύπου SLC7A9 SNPs γονότυπος/απλότυπος στους ασθενείς με τις SLC7A9 μεταλλάξεις, και 7 SLC7A9 SNPs γονοτυπικά “clusters” παρατηρήθηκαν στους ασθενείς με τις SLC3A1 μεταλλάξεις (συμπεριλαμβανομένου του άγριου τύπου SLC7A9 SNPs γονοτύπου/ απλοτύπου). Στην περίπτωση αυτή, η απόκλιση από την τυχαία κατανομή των SLC7A9 SNPs γονοτύπων ήταν στατιστικά σημαντική τόσο μεταξύ των δύο ομάδων των ασθενών ($p<0,001$) όσο και μεταξύ της ομάδας των ασθενών με τις SLC7A9 μεταλλάξεις και της ομάδας ελέγχου ($p<0,001$). Το γεγονός αυτό τονίζει την ανισορροπία σύνδεσης του άγριου τύπου SLC7A9 SNPs γονοτύπου/απλοτύπου (εξαιρώντας τον ακραίο πολυμορφισμό του 3'-άκρου 1365C>T) με τις SLC7A9 μεταλλάξεις.

Επιπλέον, κατασκευάστηκαν δύο δενδρογράμματα προκειμένου να καθοριστούν οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ: α) όλων των SLC7A9 SNPs γονοτύπων που ανιχνεύθηκαν στην παρούσα γενετική μελέτη (G γονοτύποι), και β) όλων των SLC7A9 SNPs γονοτύπων οι οποίοι προσδιορίστηκαν στους ασθενείς (P

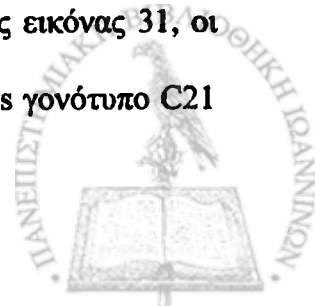


γονότυποι) σε σχέση με τους SLC7A9 SNPs γονοτύπους που ανιχνεύθηκαν στην ομάδα ελέγχου (C γονότυποι), χωρίζοντάς τους σε δύο ξεχωριστές ομάδες (εικόνα 30, 31). Η μήτρα των γενετικών αποστάσεων μεταξύ των SLC7A9 SNPs γονοτύπων για την κατασκευή των φυλογενετικών δένδρων δίνεται στους πίνακες 18 και 19.

Γενετική απόσταση βρέθηκε να υπάρχει μόνο μεταξύ του P7 γονοτύπου της ομάδας των ασθενών, με τον C30 γονότυπο της ομάδας ελέγχου (P7 vs C30: 2,11853), και β) την G7 γονοτυπική ομάδα (φέρει μόνο ασθενείς) με την G24 γονοτυπική ομάδα (φέρει μόνο γονοτύπους της ομάδας ελέγχου) (G7 vs G24: 2,11853) (εικόνα 30, 31). Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις μηδενικές γενετικές αποστάσεις βρέθηκαν για κάθε ομάδα SLC7A9 SNPs γονοτύπων των ασθενών, με κάθε ομάδα SLC7A9 SNPs γονοτύπων της ομάδας ελέγχου, στις τελικές απολήξεις του γενεαλογικού δένδρου. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο P1 SLC7A9 SNPs γονότυπος αντιστοιχεί στο C9 SLC7A9 SNPs γονότυπο της ομάδας ελέγχου (G1: P1/C9), ο P2 στον C10 (G2: P2/C10), ο P3 στον C13 (G3: P3/C13), ο P4 στον C16 (G4: P4/C16), ο P5 στον C28 (G5: P5/C28), και ο P8 στον C29 (G8: P8/C28) (πίνακας 14).

Η απόκλιση που εμφάνισε ο γονότυπος P7 από τον C30 μάλλον αντανακλά ένα στάδιο στη φυλογένεση των SLC7A9 SNPs γονοτύπων παρά έναν SLC7A9 SNPs γονότυπο που συνδέεται με την κλινική βαρύτητα στην έκφραση της κυστινουρίας (δηλαδή του P7). Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι το υγιές άτομο με τον C30 γονότυπο προέρχεται από την ίδια περιοχή με την ασθενή Cys99 που φέρει τον P7 γονότυπο και πιθανώς να πρόκειται για έναν μηχανισμό “Αρχής του Ίδρυτού” στη δημιουργία του συγκεκριμένου SLC7A9 SNPs γονοτυπικού cluster.

Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι οι SLC7A9 SNPs γονότυποι P6 και P7 των ασθενών δεν βρέθηκαν στην ομάδα ελέγχου. Στο δενδρόγραμμα της εικόνας 31, οι SLC7A9 SNPs γονότυποι P5 και P6 απέχουν από τον SLC7A9 SNPs γονότυπο C21



της ομάδας ελέγχου. Αν λάβουμε όμως υπόψην ότι ο P5 γονότυπος ταυτίζεται με τον C28 γονότυπο της ομάδας ελέγχου, συμπεραίνουμε ότι η συγκεκριμένη γενετική απόσταση αντανάκλα περισσότερο σε ένα εξελικτικό βήμα στη φυλογένεση των SLC7A9 SNPs γονοτύπων παρά σε έναν SLC7A9 SNPs γονότυπο που σχετίζεται με πιο βαρεία φαινοτυπικά χαρακτηριστικά στον συγκεκριμένο ασθενή (P6 γονότυπος, Cys76 ασθενής). Τα αποτελέσματα και των δύο γενεαλογικών προσεγγίσεων συμπίπτουν μεταξύ τους δίνοντας ακρίβεια στην πιθανή πρόβλεψη των SLC7A9 SNPs γονοτυπικών clusters που πιθανώς να δρουν επί της βαρύτητας της φαινοτυπικής έκφρασης της νόσου.

Ο καθορισμός των SLC7A9 SNPs απλοτύπων από τους γονοτυπικούς συνδυασμούς των πολυμορφικών θέσεων του SLC7A9 γονιδίου έγινε κατόπιν συνδυαστικής ανάλυσης των SLC7A9 SNPs γονοτύπων των ασθενών και των συγγενών τους (πίνακας 8, 9, 14). Επτά διαφορετικοί SLC7A9 SNPs απλοτυπικοί συνδυασμοί των πολυμορφικών θέσεων του SLC7A9 γονιδίου βρέθηκαν στους ασθενείς. Ο στατιστικός έλεγχος για ανισοροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium) έδειξε ποικίλα ζεύγη μη τυχαίου πρότυπου κατανομής για τους ακόλουθους πολυμορφισμούς στην ομάδα ασθενών και στην ομάδα ελέγχου: 235+18C>A, 399C>T, 411T>C, 425T>C, 507C>T, 604+10G>A, 604+24T>C, 667C>A, και 972G>A. ($p < 0,05$) (πίνακας 16, 17). Στους ασθενείς, στατιστικά σημαντική ανισοροπία σύνδεσης βρέθηκε επίσης για τα ακόλουθα SLC7A9 SNPs: i) 1-39C>T με 235+18C>A, 235+22T>G, 411T>C, 478+10T>C, και 604+10G>A; ii) 235+22T>G με 478+10T>C, και 977+51A>G; iii) 478+10T>C με 235+22T>G, 977+51A>G, και 1143C>T, iv) 977+51A>G με 235+22T>G, και 478+10T>C, v) 1143C>T με 478+10T>C. Επιπλέον, ο πολυμορφισμός 1-39C>T στην ομάδα ελέγχου και οι πολυμορφισμοί 687C>T και 1365C>T στην ομάδα ασθενών και στην ομάδα



ελέγχου εξαιρέθηκαν από τη στατιστική ανάλυση του Arlequin software εξαιτίας έλλειψης πολυμορφικών τους ζευγών με τα άλλα SNPs.

Τέλος, από τον προσεκτικό συνδυασμό των SLC7A9 SNPs απλοτυπικών δεδομένων με τα φαινοτυπικά στοιχεία των συγγενών των κυστινουρικών ατόμων της παρούσας μελέτης (πίνακας 8, 9) προέκυψαν τα ακόλουθα σημεία (πίνακας 20):

α) Όταν ένα άτομο φέρει σε ετεροζυγωτία μία μετάλλαξη του SLC7A9 γονιδίου σε σύνδεση με τον άγριου τύπου SLC7A9 SNPs απλότυπο και επίσης τον άγριου τύπου SLC7A9 SNPs απλότυπο στο άλλο SLC7A9 αλληλόμορφο τότε δεν εκδηλώνει τη νόσο (F81, F82, F92, F14, F15, F17, F78, F163, F85, F90, F91, F86, F156, F157, F158, F171). Πιθανώς να εκφράζεται το δεύτερο SLC7A9 αλληλόμορφο.

β) Όταν ένα άτομο έχει σε ετεροζυγωτία μία μετάλλαξη του SLC7A9 γονιδίου σε σύνδεση με μη-άγριου τύπου πολυμορφισμούς, και τον άγριου τύπου SLC7A9 SNPs απλότυπο στο άλλο αλληλόμορφο του SLC7A9 γονιδίου, τότε δεν εκδηλώνει τη νόσο (F18). Πιθανώς εκφράζεται το δεύτερο SLC7A9 αλληλόμορφο. Οι περιπτώσεις αυτές είναι σπάνιες, καθώς οι μεταλλάξεις του SLC7A9 είναι φυσικό να εμφανίζονται συχνότερα στον άγριου τύπου SLC7A9 SNPs απλότυπο του γονιδίου, όντας πιο κοινός. Η φυσική επιλογή στη συνέχεια τείνει να εξαλείψει τις μεταλλάξεις, με αποτέλεσμα να μην προλάβουν να συσσωρευτούν γύρω τους πολυμορφισμοί που δεν αντιστοιχούν στον άγριου τύπου γονότυπό τους. Σε σπάνιες περιπτώσεις είναι δυνατόν να εμφανιστεί μία μετάλλαξη σε μη-άγριου τύπου SLC7A9 SNPs απλότυπο. Πιθανώς αυτές οι περιπτώσεις να μην είναι συμβατές με τη ζωή παρά μόνον στην περίπτωση παρουσίας στον οργανισμό ενός μη μεταλλαγμένου και πιο ουδέτερου πολυμορφικά SLC7A9 αλληλομόρφου, το οποίο τελικά θα εκφραστεί δίνοντας λειτουργική κωδικοποιούσα πρωτεΐνη ($b^{0,+}AT$).



γ) Όταν ένα άτομο έχει σε ετεροζυγωτία μία μετάλλαξη του SLC7A9 γονιδίου σε σύνδεση με τον άγριου τύπου SLC7A9 SNPs απλότυπο και έναν μόνο μη-άγριου τύπου πολυμορφισμό στον SLC7A9 SNPs απλότυπο του άλλου SLC7A9 αλληλομόρφου, τότε μπορεί να εκδηλώσει τη νόσο (F9, F20, F21, F190, F170: το 60% αυτών των ατόμων απέκκρινε 30μg/ml κυστίνης και εθεωρείτο ύποπτο για εμφάνιση κυστινουρίας). Πιθανότατα εκφράζονται και τα δύο SLC7A9 αλληλόμορφα.

δ) Όταν ένα άτομο έχει σε ετεροζυγωτία μία μετάλλαξη του SLC7A9 γονιδίου σε σύνδεση με τον άγριου τύπου SLC7A9 SNPs απλότυπο και περισσότερους από δύο μη-άγριου τύπου πολυμορφισμούς στην αντίστοιχη αλληλουχία του άλλου SLC7A9 αλληλομόρφου τότε η μετάλλαξη εκφράζεται (F10, F192, F2, F166, F4, F5, F83, F7, F86, F168: το 100% αυτών των ατόμων απέκκρινε >100μg/ml κυστίνης ή παρουσίασε κλινικά συμπτώματα ουρολιθίασης και θεωρήθηκε θετικό για την κυστινουρία).

ε) Όταν ένα άτομο φέρει σε ομοζυγωτία ή σύνθετη ετεροζυγωτία δύο μεταλλάξεις του SLC7A9 γονιδίου είναι θετικό για την κυστινουρία (Cys11, Cys80, Cys159, Cys191, F193, Cys3, F1, Cys77, Cys161, Cys6, Cys154, F167, Cys169, F172).

Επιπλέον, όλοι οι ετεροζυγώτες για μία μετάλλαξη του SLC3A1 γονιδίου απέκκριναν 20μg/ml κυστίνης και θεωρήθηκαν αρνητικοί για την κυστινουρία (F95, F96, F98, F72, F73, F177, F178, F196, F197, F200, F15, F18, F19, F175, F176, F152, F22, F23, F93). Μόνο οι ομοζυγώτες ή σύνθετα ετεροζυγώτες για δύο μεταλλάξεις του SLC3A1 ήταν θετικοί για την κυστινουρία (Cys99, Cys76, F75, Cys180, F179, Cys198, Cys8, Cys173, Cys153, Cys12, F13, Cys183, Cys187) επιβεβαιώνοντας τον πλήρη ατελώς υπολειπόμενο τρόπο κληρονομικότητας του γονιδίου.



Το παραπάνω μοντέλο εκφραστικής υπεροχής του SLC7A9 αλληλομόρφου με τις λιγότερες γενετικές αλλαγές φαίνεται να ενισχύεται και από την ανάλυση για την παρουσία *cis*-μεταγραφικών παραγόντων στο 5'-ρυθμιστικό άκρο του γονιδίου, στα ιντρονιά του και στο 3'-ρυθμιστικό του άκρο μετά το τελευταίο του εξώνιο (εικόνα 32). Καθώς το γονίδιο SLC7A9 φέρει συνήθως πολλούς πολυμορφισμούς κατά μήκος της αλληλουχίας του ενδέχεται η αλλαγή στην ίδια την νουκλεοτιδική του αλληλουχία ή στη διαμόρφωση του DNA να είναι τέτοια που καθιστά την πρόσβαση και αλληλεπίδραση των *trans*-ρυθμιστικών παραγόντων με τους *cis*-ρυθμιστικούς μεταγραφικούς παράγοντες μειονεκτική. Αντίθετα, η αλληλεπίδραση μεταξύ των *cis*- και *trans*-ρυθμιστικών μεταγραφικών παραγόντων πιθανώς να ευνοείται στα πιο άγριου τύπου SLC7A9 αλληλόμορφα, γεγονός που οδηγεί στην έναρξη και ενίσχυση της μεταγραφής τους και τελικά στη μη ισοζυγισμένη έκφραση των δύο SLC7A9 αλληλομόρφων του.

β) Πολυμορφισμοί του SLC3A1

Δύο πολυμορφισμοί ανιχνεύθηκαν στο γονίδιο SLC3A1, ο 1035G>A στο εξώνιο 6 και ο 1854A>G (I618M) στο εξώνιο 10 (πίνακας 12, εικόνες 20, 26-28). Στην περίπτωση του πολυμορφισμού I618M δεν υπάρχει περιοριστικό ένζυμο για την ανίχνευση του και το ηλεκτροφορητικό πρότυπο της SSCP ανάλυσης δεν μπορούσε να βοηθήσει στην διάκριση του A/A γονοτύπου από τον A/G γονότυπο. Για το λόγο αυτό για τον συγκεκριμένο γονιδιακό τόπο εκτιμήθηκε μόνο η συχνότητα της ομοζυγωτίας του γονοτύπου G/ και των γονοτύπων A/A και A/G ως σύνολο (πίνακας 12). Ωστόσο, οι γονοτυπικοί συνδυασμοί του (G/G, A/G και A/A) βρέθηκαν σε Hardy-Weinberg ισοζύγιο τόσο στους ασθενείς όσο και στην ομάδα ελέγχου



($p=1$), χωρίς να υπάρχει απόκλιση από την τυχαία κατανομή μεταξύ των δύο ομάδων ($p=0,17$).

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό 1035G>A βρέθηκε σε ετεροζυγωτία μόνο σε μία οικογένεια, σε 1 κυστινourικό (F1) και σε 3 μη-κυστινourικά (F2, F14, F17) άτομα. Δεν τίθεται θέμα σύνδεσής του με κάποια μετάλλαξη, γιατί τα άτομα αυτά φέρουν την κοινή γενετική αλλαγή G105R του γονιδίου SLC7A9. Η συχνότητά του στην ομάδα των ασθενών είναι τόσο μικρή που δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική απόκλιση από την τυχαία κατανομή του ανάμεσα στους ασθενείς και στην ομάδα ελέγχου ($p=0,26$).

Τέλος, και οι δύο περιγραφόμενοι πολυμορφισμοί στο SLC3A1 γονίδιο είναι ουδέτεροι ως προς τη συναρμογή των εξωνίων του.

γ) Πολυμορφισμοί του SLC7A10

Δύο πολυμορφισμοί βρέθηκαν στο γονίδιο SLC7A10, ο νέος 634+8C>G (ιντρόνιο 4) και ο προηγούμενα δημοσιευμένος 913-11C>T (ιντρόνιο 6) (πίνακας 12, εικόνες 21, 26, 27). Και οι δύο πολυμορφισμοί βρίσκονται σε Hardy-Weinberg ισοζύγιο τόσο στους ασθενείς όσο και στην ομάδα ελέγχου ($p>0,05$). Επίσης, δεν παρατηρήθηκε απόκλιση από την τυχαία κατανομή τους στην ομάδα ασθενών και στην ομάδα ελέγχου ($p>0,05$). Τέλος, η επίδραση των πολυμορφισμών 634+8C>G και 913-11C>T στη συναρμογή των εξωνίων του SLC7A10 γονιδίου φαίνεται στην εικόνα 29. Ο πολυμορφισμός 634+8C>G αυξάνει το "score" της πραγματικής θέσης συναρμογής, ενώ ο 913-11C>T είναι ουδέτερος.



Πίνακας 12: Οι πολυμορφισμοί που βρέθηκαν στα SLC3A1, SLC7A9, και SLC7A10 γονίδια (η ονοματολογία μέσα στην παρένθεση δίνεται σύμφωνα με τον αύξοντα αριθμό της αλληλουχίας κάθε γονιδίου όπως αυτή έχει καταχωρηθεί στο NCBI). Δίνονται επίσης: οι συνθήκες των SSCP patterns όπου αποκαλύφθηκαν, το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε στην ανίχνευσή τους και η συχνότητα της ομοζυγωτίας ή της ετεροζυγωτίας των αλληλομόρφων κάθε γονιδιακής θέσης (με * επισημαίνονται οι νέοι πολυμορφισμοί, με # οι πολυμορφισμοί που έχουν σημαντική απόκλιση από την τυχαία κατανομή στους ασθενείς και στην ομάδα ελέγχου, με + τα ένζυμα που αναγνωρίζουν και πέπτουν το άγριου τύπου αλληλόμορφο, με \$ τα ένζυμα που αναγνωρίζουν περισσότερες της μίας θέσης κοπής και δίπλα ο αντίστοιχος αριθμός των θέσεων πέψης, και με † οι πολυμορφισμοί που δεν ανιχνεύθηκαν από κάποιο SSCP pattern).

Εξόνιο/Ιντρόνιο	Νουκλεοτιδική αλλαγή	Αλλαγή πρωτεΐνης	SSCP συνθήκη αποκάλυψης pattern	Ένζυμο πέψης	Γονότυποι	Συχνότητα στους ασθενείς (%) (n=20)	Συχνότητα στην ομάδα ελέγχου (%) (n=57)
SLC3A1 (NM_000341.2)							
Εξόνιο 6	c.1035G>A (c.1111G>A)	E345E	25°C με γλυκερόλη	AluI ⁺	G/G	95	100
					G/A	5	0
					A/A	0	0
Εξόνιο 10	c.1854A>G (c.1930A>G)	1618M	4°C με γλυκερόλη	-	A/A	85	94,7
					A/G		
					G/G	15	5,3
SLC7A9 (NM_014270.1)							
5'-ρυθμιστικό άκρο	c.1-39C>T (c.147C>T)	-	†	Hinp1I ^{+, \$:2}	C/C	100	84,2
Ιντρόνιο 3 *	c.235+18C>A (IVS3+18C>A)	-	25°C με γλυκερόλη ή 4°C χωρίς γλυκερόλη	-	C/T	0	15,8
					T/T	0	0
					C/C	90	100
Ιντρόνιο 3 #	c.235+22T>G (IVS3+22T>G)	-	25°C με γλυκερόλη ή 4°C χωρίς γλυκερόλη	BspI	C/A	10	0
					A/A	0	0
					T/T	70	43,86
Εξόνιο 4	c.399C>T (c.584C>T)	S133S	Απροσδιόριστο	DdeI ^{\$:3}	T/G	15	49,12
					G/G	15	7,02
					C/C	80	66,67
Εξόνιο 4	c.411T>C (c.596T>C)	C137C	Απροσδιόριστο	BssSIII	C/T	15	31,58
					T/T	5	1,75
					T/T	85	75,44
Εξόνιο 4 #	c.425T>C (c.610T>C)	V142A	Απροσδιόριστο	Cac8I ^{\$:4}	T/C	10	22,81
					C/C	5	1,75
					T/T	70	42,1
Ιντρόνιο 4	c.478+10T>C (IVS4+10T>C)	-	Απροσδιόριστο	AvaI	T/C	15	50,88
					C/C	15	7,02
					T/T	85	70,18
Εξόνιο 5 #	c.507C>T (c.692C>T)	S169S	25°C χωρίς γλυκερόλη ή 4°C με γλυκερόλη	-	T/C	10	28,07
					C/C	5	1,75
					C/C	70	43,86
Ιντρόνιο 5 *	c.604+10G>A (IVS5+10G>A)	-	25°C χωρίς γλυκερόλη ή 4°C με γλυκερόλη	-	C/T	15	49,12
					T/T	15	7,02
					G/G	85	73,68
Ιντρόνιο 5 * #	c.604+24T>C (IVS5+24T>C)	-	25°C χωρίς γλυκερόλη ή 4°C με γλυκερόλη	HpyCH4V ^{+, \$:2}	G/A	10	24,56
					A/A	5	1,75
					T/T	70	43,86
Ιντρόνιο 5 * #	c.604+24T>C (IVS5+24T>C)	-	25°C χωρίς γλυκερόλη ή 4°C με γλυκερόλη	HpyCH4V ^{+, \$:2}	T/C	15	49,12
					C/C	15	7,02

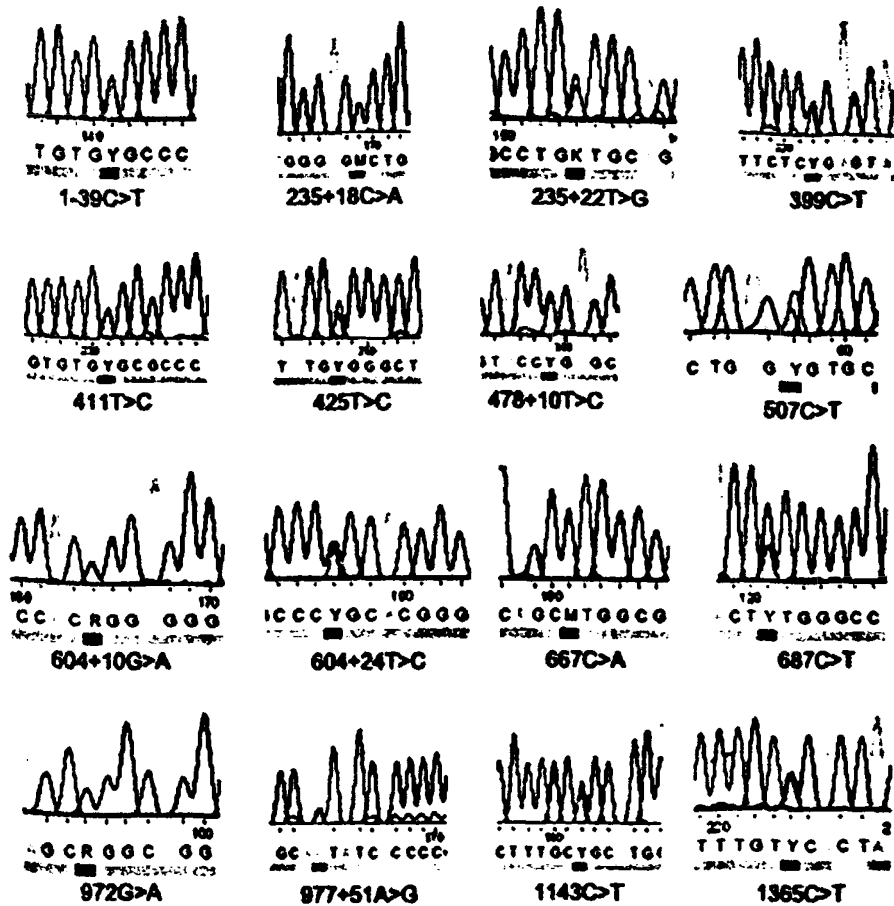
Εξόνιο 6 #	c.667C>A (c.852C>A)	L223M	25°C ή 4°C χωρίς γλυκερόλη ή 25°C με γλυκερόλη	NlaIII	C/C	75	45,61
Εξόνιο 6 #	c.687C>T (c.872C>T)	L229L			HinPI ⁺ .S:2	C/A	15
Εξόνιο 9	c.972G>A (c.1157G>A)	A324A	†	Acil ⁺		A/A	10
Εξόνιο 9	c.977+51A>G (1VS9+51A>G)	-	25°C χωρίς γλυκερόλη ή 4°C με γλυκερόλη		-	C/C	75
Εξόνιο 11	c.1143C>T (c.1328C>T)	A381A	4°C χωρίς γλυκερόλη	HypCH4V		C/T	15
Εξόνιο 12	c.1365C>T (c.1550C>T)	V455V	†		XcmI ⁺	T/T	10
Εξόνιο 12	c.1365C>T (c.1550C>T)	V455V	†	-		G/G	100
Εξόνιο 11	c.1143C>T (c.1328C>T)	A381A	4°C χωρίς γλυκερόλη		-	G/A	0
Εξόνιο 12	c.1365C>T (c.1550C>T)	V455V	†	-		A/A	0
Εξόνιο 12	c.1365C>T (c.1550C>T)	V455V	†		-	A/A	85
Εξόνιο 12	c.1365C>T (c.1550C>T)	V455V	†	-		A/G	10
Εξόνιο 12	c.1365C>T (c.1550C>T)	V455V	†		-	G/G	5
Εξόνιο 12	c.1365C>T (c.1550C>T)	V455V	†	-		C/C	85
Εξόνιο 12	c.1365C>T (c.1550C>T)	V455V	†		-	C/T	15
Εξόνιο 12	c.1365C>T (c.1550C>T)	V455V	†	-		T/T	0
Εξόνιο 12	c.1365C>T (c.1550C>T)	V455V	†		-	C/C	90
Εξόνιο 12	c.1365C>T (c.1550C>T)	V455V	†	-		C/T	10
Εξόνιο 12	c.1365C>T (c.1550C>T)	V455V	†		-	T/T	0
SLC7A10 (NM 019849.1)							
Ιντρόνιο 4*	c.634+8C>G (1VS4+8C>G)	-	Εξόνιο 4: 25°C ή 4°C με γλυκερόλη Εξόνιο 5: 25°C χωρίς γλυκερόλη ή 4°C με γλυκερόλη	BsaHI	C/C	95	87,72
					C/G	5	12,28
					G/G	0	0
Ιντρόνιο-6	c.913-11C>T (1VS6-11C>T)	-	25°C με ή χωρίς γλυκερόλη	HinPI ⁺	C/C	40	35,09
					C/T	30	47,37
					T/T	30	17,54

Πίνακας 13: Οι αλλαγές στις φυσικοχημικές ιδιότητες των αμινοξέων των μη-συνώνυμων πολυμορφισμών και η διαφορά τους σύμφωνα με την κλίμακα Grantham¹³² (>100 ακραίες αλλαγές, <100 συντηρητικές αλλαγές).

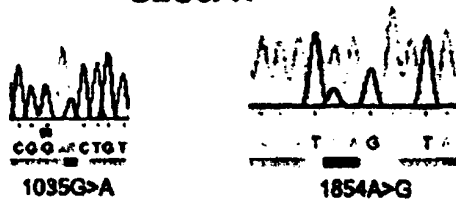
Εξόνιο/ιντρόνιο	Πολυμορφισμός	Αλλαγές στις φυσικοχημικές ιδιότητες των αμινοξέων	Grantham score
SLC3A1			
Εξόνιο 10	I618M	Από υδρόφοβο σε υδρόφοβο	10
SLC7A9			
Εξόνιο 4	V142A	Από υδρόφοβο σε υδρόφοβο	64
Εξόνιο 6	L223M	Από υδρόφοβο σε υδρόφοβο	15



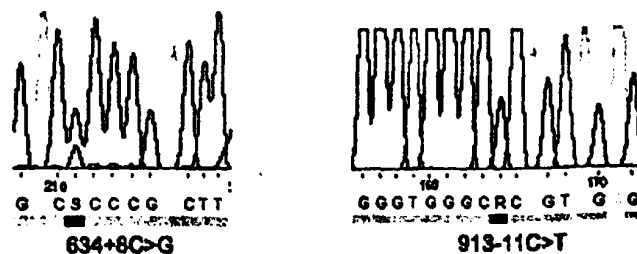
SLC7A9



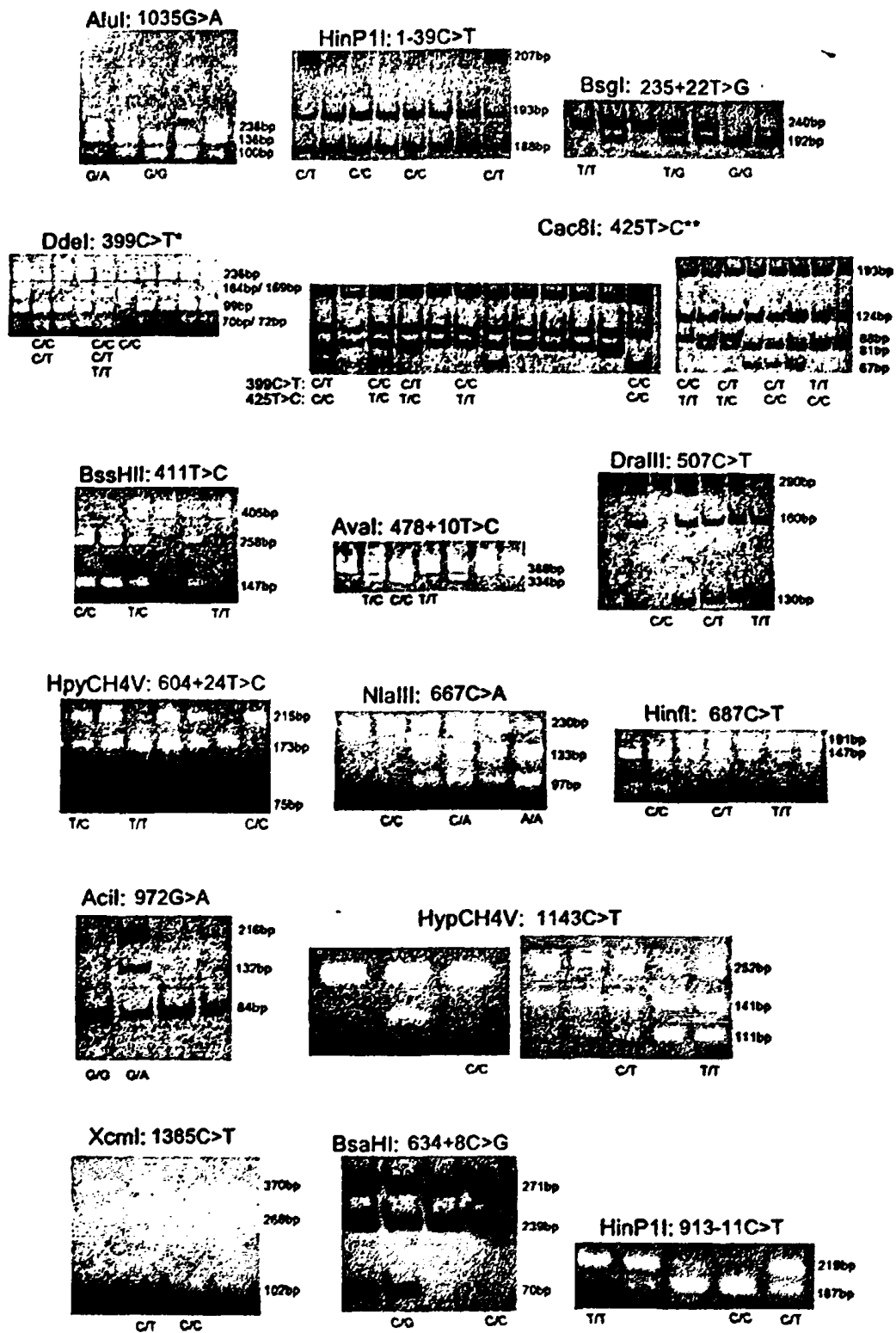
SLC3A1



SLC7A10

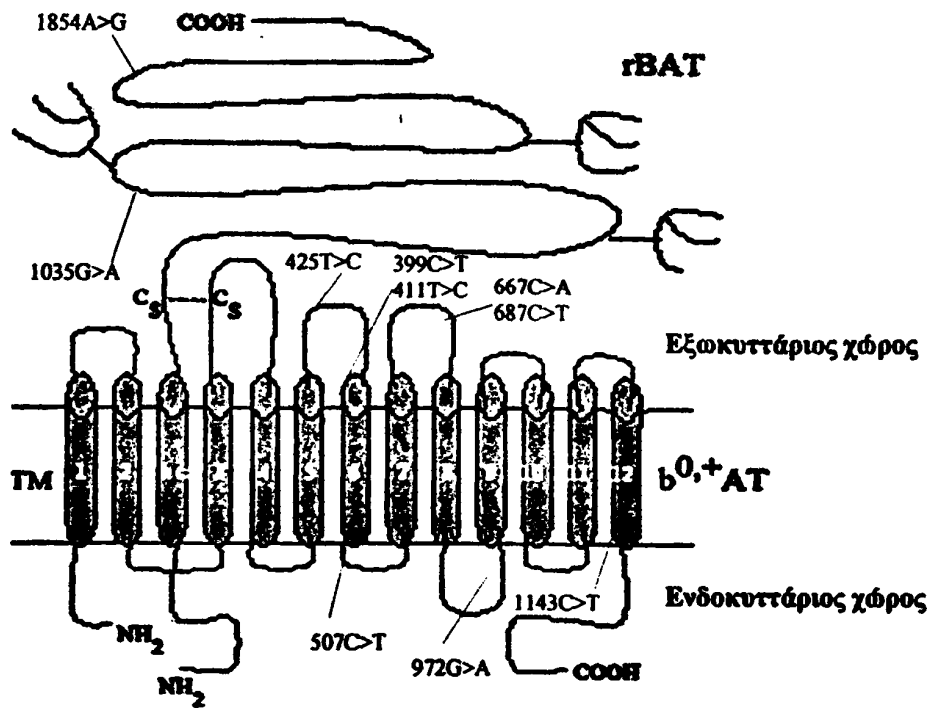


Εικόνα 26: Τμήματα της αλληλουχίας των γονιδίων SLC3A1 και SLC7A9 όπου εντοπίζονται οι πολυμορφισμοί που ανιχνεύθηκαν στους 20 ασθενείς και την ομάδα ελέγχου.



Εικόνα 27: Τα αποτελέσματα της RFLPs ανάλυσης των πολυμορφισμών που προσδιορίστηκαν (τα αποτελέσματα της πέψης DdeI* ερμηνεύονται με τη βοήθεια της πέψης Cac8I**, οι μαύρες απεικονίσεις των ζωνών αντιστοιχούν στις RFLPs αναλύσεις που ελέγχθηκαν με πηκτή πολυακρυλαμίδης και χρώση με νιτρικό, ενώ λευκές απεικονίσεις των ζωνών αντιστοιχούν στις RFLPs αναλύσεις που ελέγχθηκαν με πηκτή αγαρόζης και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο).





Εικόνα 28: Σχηματική αναπαράσταση των SLC3A1 και SLC7A9 εξωκινών πολυμορφισμών (rBAT: η πρωτεΐνη που εκφράζεται από το SLC3A1, b^{0,+}AT: η πρωτεΐνη που εκφράζεται από το SLC7A9, TM: διαμεμβρανική επικράτεια, C_S-C_S: δισουλφιδικός δεσμός).

Εξώνιο 4

Start	End	Score	Intron	Exon
242	256	0.55	tcctcgag	tatgtgt
319	333	<u>0.63</u>	gccatctg	tgagtac

* 399C>T: Απώλεια της ψευδούς θέσης συναρμογής.
Το SNP δρα θετικά.

Εξώνιο 4

Start	End	Score	Intron	Exon
62	102	<u>0.99</u>	cccttctctctgtgttcc	agggtgccctgtctttgaggag
219	259	0.51	cttcgccatcatctgctc	aggctctcggagtatgtgtgtg

* 399C>T: Μειώνει το score της ψευδούς θέσης συναρμογής σε 0,41. Το SNP δρα θετικά.

* 411T>C: Αυξάνει το score της ψευδούς θέσης συναρμογής σε 0,60. Το SNP δρα αρνητικά.

Εξώνιο 9

Start	End	Score	Intron	Exon
131	145	<u>0.79</u>	cgggcag	gtagggga

* 972G>A: Αυξάνει το score της πραγματικής θέσης συναρμογής σε 0,86.
Το SNP δρα θετικά.

Εξώνιο 11

Start	End	Score	Intron	Exon
50	90	<u>0.95</u>	atccattcttcttctatt	agggtatcatagcaacgattta
112	152	0.55	ctcgtagcaattatttc	agcttgcgcgatggctgtttt

1143C>T: Μειώνει το score της ψευδούς θέσης συναρμογής σε 0,52. Το SNP δρα θετικά.

Εξώνιο 5

Start	End	Score	Intron	Exon
71	111	0.77	ccccgactctggtctcc	aggacacttcgaggagctgagg
157	197	<u>0.97</u>	ctggccctggccttctcc	agggtccttcgcttcagtgg

* 634+8C>G: Μειώνει το score της ψευδούς θέσης συναρμογής σε 0,57. Το SNP δρα θετικά.

Εικόνα 29: Ο θετικός ρόλος τεσσάρων πολυμορφισμών των SLC7A9 και SLC7A10 γονιδίων στη συναρμογή των εξωνίων τους. Τη μόνη εξαίρεση αποτελεί ο πολυμορφισμός 411T>C, που αυξάνει αδρά το “score” της ψευδούς θέσης ματίσματος. (Τα υπογραμμισμένα “score” αντιστοιχούν στην προβλεπόμενη θέση συναρμογής που ταυτίζεται με την πραγματική, ενώ τα υπογραμμισμένα νουκλεοτίδια είναι αυτά τα οποία υπόκεινται την υποκατάσταση).



Πίνακας 14: Οι SLC7A9 SNPs γονότυποι και απλότυποι που βρέθηκαν στους ασθενείς και η κατανομή τους στην ομάδα ελέγχου (Οι SLC7A9 SNPs γονότυποι αντιστοιχούν στην ακόλουθη σειρά των πολυμορφικών θέσεων του γονιδίου SLC7A9: 1-39C>T, 235+18C>A, 235+22T>G, 399C>T, 411T>C, 425T>C, 478+10T>C, 507C>T, 604+10G>A, 604+24T>C, 667C>A, 687C>T, 972G>A, 977+51A>G, 1143C>T, 1365C>T. Ως άγριου τύπου SLC7A9 SNPs γονότυπος ή απλότυπος θεωρείται αυτός που σε όλες τις πολυμορφικές θέσεις του SLC7A9 γονιδίου βρίσκονται τα άγριου τύπου νουκλεοτίδια που έχουν δημοσιευθεί για την αλληλουχία του SLC7A9 γονιδίου. Τα άλλα νουκλεοτίδια που βρέθηκαν σε αυτές τις πολυμορφικές θέσεις χαρακτηρίζονται ως μη-άγριου τύπου SNPs.).

No.	SLC7A9 SNPs γονότυποι	Ασθενείς	Ομάδα ελέγχου	SLC7A9 SNPs απλότυποι
G1: P1/C9	cctcttctgiccagacc (άγριου τύπου SLC7A9 SNPs γονότυπος, σε 9 ασθενείς με SLC7A9 μεταλλάξεις και σε 4 με SLC3A1 μεταλλάξεις)	13	14	cctcttctgiccagacc
				cctcttctgiccagacc
G2: P2/C10	cctcttctgiccagac(c/t)	1	3	cctcttctgiccagacc
				cctcttctgiccagact
G3: P3/C13	ccgcccctacatggcc	1	1	ccgcccctacatggcc
				ccgcccctacatggcc
G4: P4/C16	cc(t/g)c(t/c)(t/c)(t/c)(c/t)(g/a)(t/c)(c/a)(c/t)g(a/g)cc	1	9	cctcttctgiccagacc
				ccgcccctacatggcc
G5: P5/C28	cc(t/g)(c/t)t(t/c)t(c/t)g(t/c)(c/a)(c/t)ga(c/t)(c/t)	1	1	cctcttctgiccagact
				ccgttctgcatgac
G6: P6	c(c/a)(t/g)(c/t)t(t/c)t(c/t)g(t/c)ccgacc	1	0	cctcttctgiccagacc
				cagttctgcccagacc
G7: P7	c(c/a)gttctg(c/a)(c/t)ga(c/t)c	1	0	ccgttctgcatgac
				cagttctgcccagacc
G8: P8/C29	ccg(c/t)(t/c)c(t/c)(a/g)catg(a/g)(c/t)c	1	1	ccgttctgcatgac
				ccgcccctacatggcc



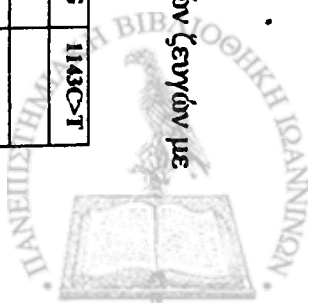
Πίνακας 15: Οι 16 επιπλέον SLC7A9 SNPs γονότυποι που βρέθηκαν στην ομάδα ελέγχου.

SLC7A9 SNPs γονότυπος	
C11	c(t)ctctttcgtccgac(t)c
C12	cct(g)c(t)tt(c)tc(t)gt(c)c(a)c(t)gac(t)c
C14	c(t)ct(g)c(t)tt(c)tc(t)gt(c)c(a)c(t)gac(t)c
C15	cct(g)ctttcgtccgacc(t)
C17	cct(g)ct(c)tt(c)tt(c)c(t)g(a)tt(c)c(a)c(t)ga(g)cc(t)
C18	cct(g)c(t)tt(c)tc(t)gt(c)c(a)c(t)gacc
C19	c(t)ctctt(c)tt(c)cgccga(g)cc
C20	c(t)ctctttcgtccgacc
C21	cct(g)c(t)tt(c)tc(t)gt(c)ccgacc
C22	ccgc(t)tt(c)ct(c)tg(a)cc(a)c(t)ga(g)cc
C23	cct(g)ct(c)tt(c)tt(c)tt(c)g(a)tt(c)c(a)c(t)a(g)a(g)cc
C24	cct(g)ct(c)tt(c)tt(c)c(t)g(a)tt(c)c(a)c(t)gacc
C25	c(t)ctc(t)tt(c)tt(c)c(t)gt(c)c(a)c(t)ga(g)tt(c)c
C26	cctctttcgtccg(a)acc
C27	c(t)ct(g)c(t)tt(c)tc(t)gt(c)c(a)c(t)gacc
30	ccgttcttgcacgacc



Πίνακας 16: Ανισορροπία σύνδεσης των πολυμορφικών θέσεων του SLC7A9 γονιδίου στην ομάδα ελέγχου (απουσία πολυμορφικών ζευγών με τις υπόλοιπες θέσεις για τους γονδιακούς τόπους 1-39 >T, 687 >T, και 1365 >T).

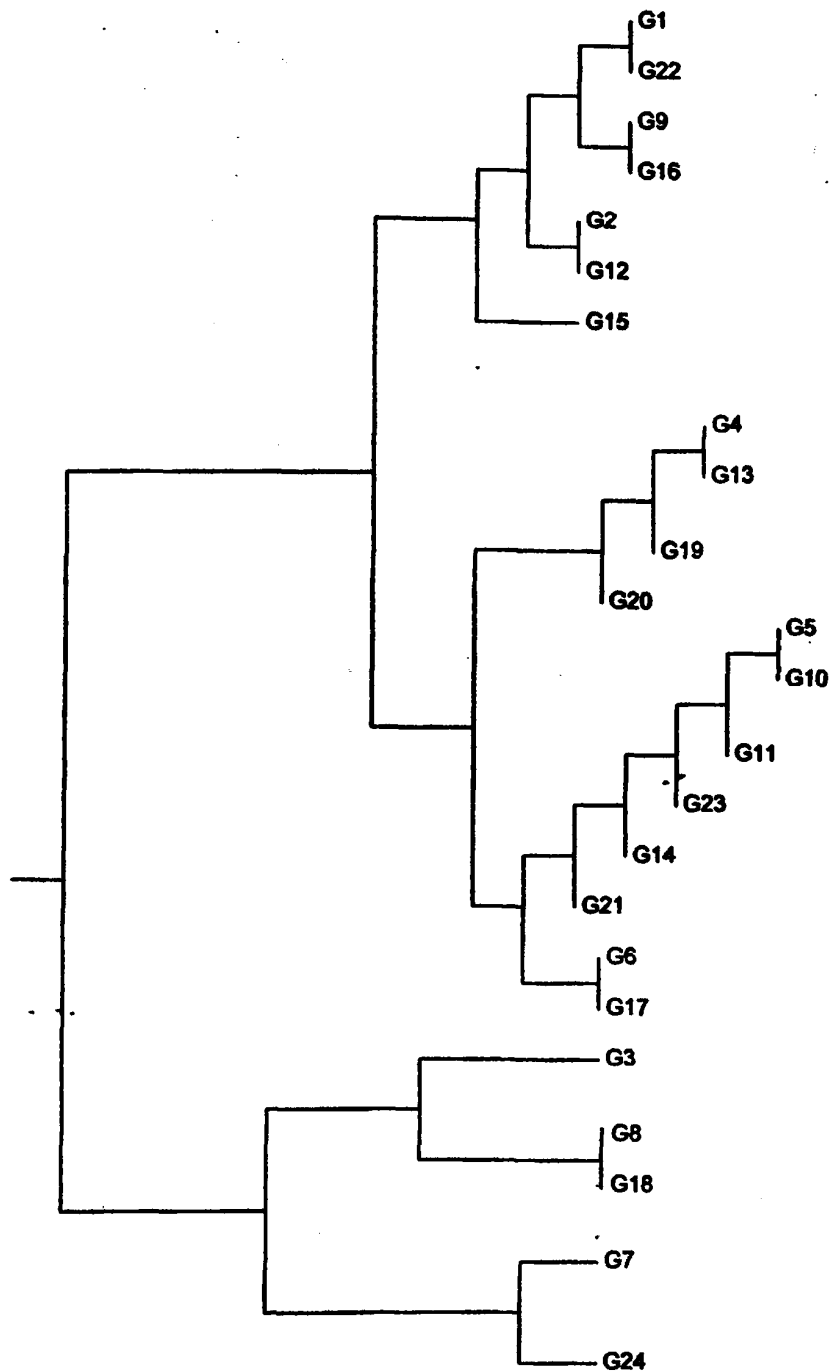
	235+18 >A	235+18 >A	235+221 >G	399 >T	411T >C	425T >C	478+10T >C	507 >T	604+10G >A	604+24T >C	667 >A	972G >A	977+51A >G	1143 >T
235+18 >A	*													
235+221 >G	+	*												
399 >T	+		*											
411T >C	+	+		*										
425T >C	+		*	+	*									
478+10T >C	+		*	+	+	*								
507 >T	+		*	+	+	+	*							
604+10G >A	+		*	+	+	+	+	*						
604+24T >C	+		*	+	+	+	+	+	*					
667 >A	+		*	+	+	+	+	+	+	*				
972G >A	+		*	+	+	+	+	+	+	+	*			
977+51A >G	+		*	+	+	+	+	+	+	+	+	*		
1143 >T	-		*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*	



Πίνακας 17: Ανισορροπία σύνδεσης των πολυμορφικών θέσεων του SLC7A9 γονιδίου στους ασθενείς (απουσία πολυμορφικών ζευγών με τις υπόλοιπες θέσεις για τους γονιδιακούς τόπους 687C>T και 1365C>T).

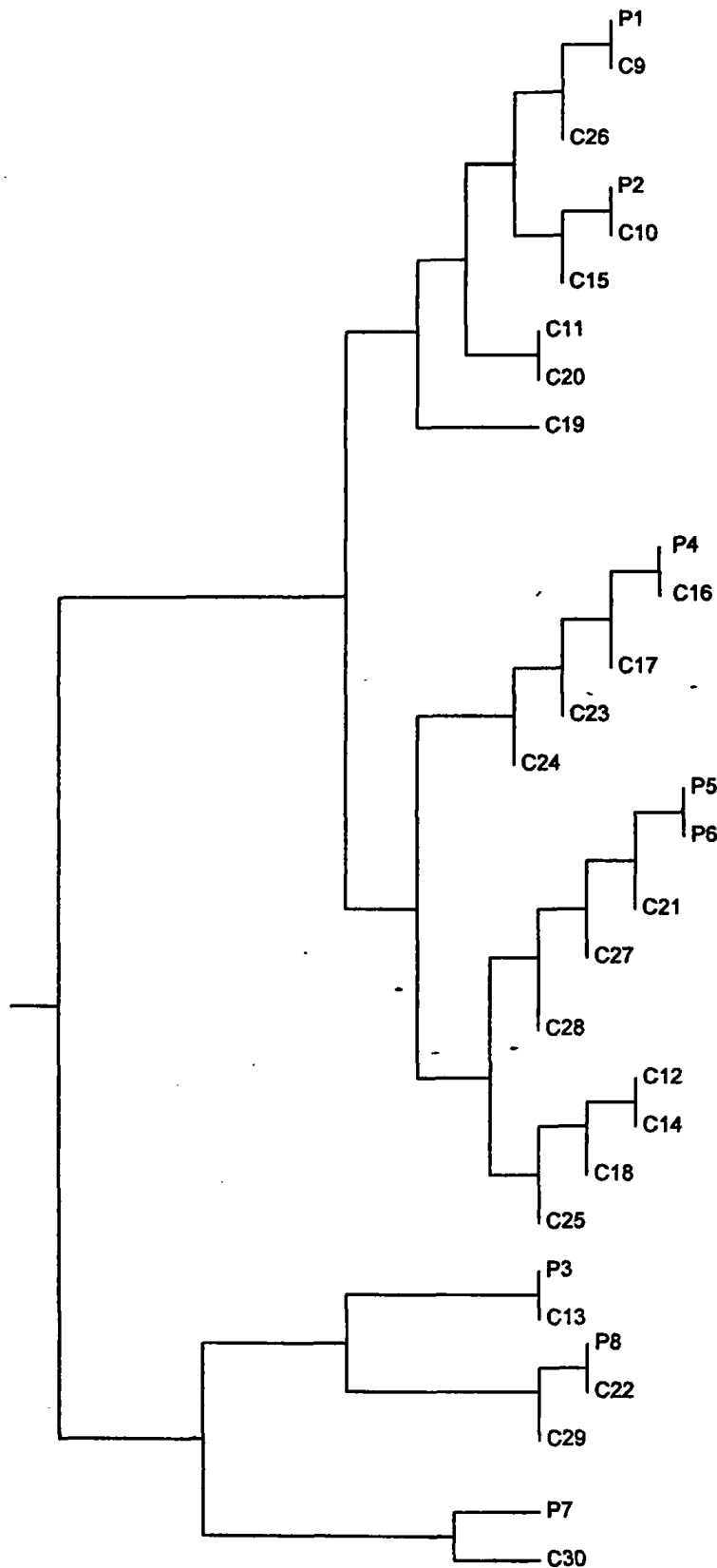
	1-39C>T	235+18C>A	235+22T>G	399C>T	411T>C	425T>C	478+10T>C	507C>T	604+10G>A	604+24T>C	667C>A	972G>A	977+51A>G	1143C>T
1-39C>T	*													
235+18C>A	+	*												
235+22T>G	+	+	*											
399C>T	-	+	-	*										
411T>C	+	+	+	+	*									
425T>C	-	+	-	+	+	*								
478+10T>C	+	+	+	+	+	+	*							
507C>T	-	+	-	+	+	+	+	*						
604+10G>A	+	+	+	+	+	+	+	+	*					
604+24T>C	-	+	+	+	+	+	+	+	+	*				
667C>A	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*			
972G>A	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	*		
977+51A>G	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	*	
1143C>T	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	*





Εικόνα 30: Φυλογενετικό δένδρο UPGMA που κατασκευάστηκε με βάση τις τιμές της τυπικής γενετικής απόστασης του Nei (1978) στην περίπτωση που οι SLC7A9 SNPs γονότυποι των ασθενών και της ομάδας ελέγχου ομαδοποιήθηκαν.





Εικόνα 31: Φυλογενετικό δένδρο UPGMA που κατασκευάστηκε με βάση τις τιμές της τυπικής γενετικής απόστασης του Nei (1978) στην περίπτωση που οι SLC7A9 SNPs γονότυποι των ασθενών και της ομάδας ελέγχου αποτέλεσαν δύο ξεχωριστές ομάδες.



Πίνακας 20: Η ταξινόμηση των ατόμων σύμφωνα με τις μεταλλάξεις τους στο γονίδιο SLC3A1 ή SLC7A9, τον αριθμό των SNPs στα δύο SLC7A9 αλληλόμορφα, και την κλινική έκφραση της κυστινουρίας (* σε αυτήν την στήλη πρέπει να ληφθεί υπόψη στο συνολικό αριθμό των γενετικών αλλαγών, δηλ. πολλαμορφισμών και μεταλλάξεων, αυτή της SLC7A9 μετάλλαξης, μέσα στις παρενθέσεις δίνεται ο συνολικός αριθμός των γενετικών αλλαγών σε κάθε αλληλόμορφο, # το SLC7A9 αλληλόμορφο που προτιμάται να μεταγραφεί, WT: άγριου τύπου).

Γονίδιο	Πλήθος μη-WT SLC7A9 SNPs in cis με το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο*	Πλήθος μη-WT SLC7A9 SNPs in trans με το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο	Έκφραση κυστινουρίας	Ταξινόμηση ατόμων
SLC7A9	0 (1)	0 [#]	Όχι	F81, F82, F92, F14, F15, F17, F78, F163, F85, F90, F91, F86, F156, F157, F158, F171: Το 100% αυτών των ατόμων απεκρίνεται 20μg/ml κυστίνης στα ούρα και επομένως είναι άγριου τύπου για το νόσημα.
Έτεροζυγώτες	≥1 (≥2)	0 [#]	Όχι	Πολλί σπάνιες περιπτώσεις εξαιτίας της ανισορροπίας σύνδεσης των SLC7A9 μεταλλάξεων με τον άγριο τύπο SLC7A9 SNPs αντίστοιχα. F18: F9, F20, F21, F190, F170: Το 60% αυτών των ατόμων απεκρίνεται 30μg/ml κυστίνης στα ούρα και θεωρείται ύστερο για την έκφραση του νοσήματος.
	0 (1) [#]	1 [#]	Ναι/Όχι;	F10, F192, F2, F166, F4, F5, F83, F7, F86, F168: Το 100% αυτών των ατόμων απεκρίνεται ≥30μg/ml κυστίνης στα ούρα ή εμφανίζει κλινικά συμπτώματα ουρολιθίασης και επομένως είναι θετικό για το νόσημα.
	0 (1) [#]	≥2	Ναι	No.11, No.80, No.159, No.191, F193, No.3, F1, No.77, No.161, No.6, No.154, F167, No.169, F172: Το 100% αυτών των ατόμων απεκρίνεται ≥50μg/ml κυστίνης στα ούρα και ρέσκει από το νόσημα.
Ομοζυγώτες ή σύνθετοι ετεροζυγώτες για δύο διαφορετικές μεταλλάξεις SLC3A1	Συνήθως δεν υπάρχουν μη-WT SLC7A9 SNPs σε σύνδεση με τις μεταλλάξεις.		Ναι	
Έτεροζυγώτες			Όχι	F95, F96, F98, F72, F73, F177, F178, F196, F197, F200, F15, F18, F19, F175, F176, F152, F22, F23, F93: Το 100% αυτών των ατόμων απεκρίνεται 20μg/ml κυστίνης στα ούρα και επομένως είναι άγριου τύπου για το νόσημα. No.99, No.76, F75, No.180, F179, No.198, No.8, No.173, No.153, No.12, F13, No.183, No.187: Το 100% αυτών των ατόμων απεκρίνεται ≥50μg/ml κυστίνης στα ούρα και ρέσκει από το νόσημα.
Ομοζυγώτες ή σύνθετοι ετεροζυγώτες για δύο διαφορετικές μεταλλάξεις	Οι αβλαστοπυκτικοί συνδυασμοί των πολλαμορφικών θέσεων του SLC7A9 γονιδίου πιθανώς να επιδρούν στα κλινικά χαρακτηριστικά έκφρασης της νόσου.		Ναι	

Εξώνιο 2

1	GGCACGAGGG CACGGGCGGT CAGCTGGGCC GCAGCTCCTC CGGCTCTGCA	entry	score
	<-----	<u>M00217</u> USF	86.1
51	GGGTCACGGA GGAAGGTAAG TAAGCCAGCT CCCCTAGTCC AGGCCGAGCT		
101	TGCACITGCG TCTTGTCTGC TGCTGCTGAA CCAAGATTTA GCTGTGCGCC	entry	score
	<-----	<u>M00240</u> Nkx-2.	90.7
151	CTCCTTGCG TCTCCTGGAA CCAGCAGGAG GAAACATGGG GGATACTGGC		
201	CTGAGAAAGC GGAGAGAGGA TGAGAAGTCG ATCCAGAGCC AAGAGCCTAA		
251	GACCACCAST CTCCAAAAGG AGGTAAGGCG GTCTCTGGTG GGGCAGGCC		
301	TTTGACAGTT AGGCAAGGGC GTCTGAACGA GGGGCGCAGG CAGTGAATC	entry	score
	----->	<u>M00109</u> C/EBPb	91.2
	<-----	<u>M00116</u> C/EBPa	86.1
351	CGGGCCGATC CCTAGTGACA GGGCAGAAGA		

Εξώνιο 3

1	CGCCCTCTC CTTCCTCCAC ACCCAGCTGG GCCTCATCAG TGGCATCTCC		
51	ATCATCGTGG GCACCATCAT TGGCTCTGGG ATCTTCGTTT CCCCCAAGTC		
101	TGTGCTCAG AACACGGAAG CTGTGGGGCC CTGCCTCATC ATATGGGCGG		
151	CTTGCGGGGT CCTCGCGAGC CTGGGTAAAG AGACTTGGGA GCTGTGCA		
201	GCCCCGGAAG CATGCAGGGG CACGCCAGGC AGCTGCTA	entry	score
	----->	<u>M00032</u> c-Ets-	93.1

Εξώνιο 4

1	AGCCTCCGT GGGAGGAAGG CTCCTGGGG CCGGGCAGT GCCTCACAAG	entry	score
	<-----	<u>M00032</u> c-Ets-	87.3
51	GGGCCGTGG GCCCTTCTC TCTGTGTTCC AGGTGCCCTG TGCTTTGGCG	entry	score
	----->	<u>M00053</u> c-Rel	85.1
101	AGCTTGGCAG AATGATCACC AAGTCAGGGG GAGAGTATCC CTACTGATG		
151	GAGGCCTAC GGGCCATCCC GGCCTACCTC TTCTCTGGG CCAGCCTGAT		
201	CGTCATTAAG CCCACGTCCT TCGCCATCAT CTGCCTCAGC TTCTCGAGT		
251	ATGTGTGGC GCCCTTCTAT GGGGCTGCA AGCCTCTCA AATCGTTGTG		
301	AAATGCCTGG CCGCCGCGCC CATCTGTGAG TACCAGAGCC CAGGGCAGGG		
351	GTCAGAAAAG ACCTGGCACA GAGGGTGTCT GGGGACTC	entry	score
	<-----	<u>M00083</u> MZF1	87.8
		<u>M00101</u> CdxA	86.4

Εξώνιο 5

1	AAAGGAGACT CTCTCCAGGG CTTTGTGAA AACATAAAT GCAGAAACTG	entry	score
	<-----	<u>M00100</u> CdxA	100.0
	<-----	<u>M00101</u> CdxA	99.3
	----->	<u>M00101</u> CdxA	86.4
51	TCCCCACCCT TCCAGTGTTC ATCTCGACAG TGAATCACT GAGGTGCGG	entry	score
	<-----	<u>M00083</u> MZF1	98.3
101	CTGGGAAGCT ACGTCCAGAA CATCTTACC GCGGCCAAGC TGGTATCGT		
151	GCCCATCATC ATCATCAGCG GGCTGGTGCT CCTGGCCCAA GGTGACCCAC		
201	GGGAGGGTGG GCCCGCACG GGCACACACC AAACGCCCTT CCACTGGGAG	entry	score
	----->	<u>M00072</u> CP2	89.6
251	CAGGAGCAGC CTTGCCCCAC GAGCCATCT CCAAGGAAGC A	entry	score
	<-----	<u>M00075</u> GATA-1	93.5
	<-----	<u>M00076</u> GATA-2	88.5

Εξώνιο 6

1	TCCCGTGGAG ATACACTCAA GATCTGCCCG GTTGACACCC GCCGTTCACT	entry	score
	----->	<u>M00076</u> GATA-2	85.8
51	GTCTGGCTTC ATTACAGGAA ACACAAAGAA TTTTGATAAT TCTTTCGAGG		
101	GCGCCACGCT GTCTGTGGGA GCCATCAGC TGGCGTTTA CAATGGACT		
151	TGGGCTATG AAGGATGGTG AGGTGTCCTG AGATGTCCCG AGTCTGGGGG	entry	score
	----->	<u>M00271</u> AML-1a	88.7
		<u>M00008</u> Sp1	86.3
	<-----	<u>M00257</u> RREB-1	85.1
201	TGGGTGGGGT TCTCCAGGTG ACTTAACTC CA	entry	score
	----->	<u>M00073</u> deltaE	90.3
		<u>M00271</u> AML-1a	87.4
		<u>M00041</u> CRE-BP	87.2
		<u>M00008</u> Sp1	86.3
		<u>M00257</u> RREB-1	85.1



Εξώνιο 7

1	AGTCAAGGTG TGTGACGCTT GTTACTTICC TTTTCCAGG AATCAACTCA	entry	score
	<-----	M00073	deltaE 89.4
51	ATTACATCAC AGAAGAACTT AGAARCCCTT ACAGGTAACA GCTGAATCAG	entry	score
	----->	M00199	AP-1 91.1
	<-----	M00199	AP-1 89.6
	----->	M00250	Gfi-1 86.4
	----->	M00173	AP-1 85.6
101	TGCAGAGGAC AGTAGCCGGG CAGCCTGATT TCTCTCTCC T	entry	score
	----->	M00075	GATA-1 86.5
	>	M00250	Gfi-1 86.4
		M00173	AP-1 85.6

Εξώνιο 8

1	CTGAACGTGG GTCTCCGTGT CATTGCCCTT CCCAGAAACC TGCCTTTGGC	entry	score
	<-----	M00084	MZF1 88.7
51	CATTATCATC GGGATCCCC TGGTGACGGC GTGCTACATC CTCATGACG		
101	TGTCCTACTT CACCCTGATG ACTGCCACCG AACTCCTGCA GTCCAGGGC		
151	GTGGCTGTGG TGAGTGCCCG GGCATCGCTG CTGGCGGGGG CTGTGGCTTG	entry	score
	<--	M00223	STATx 88.5
201	TGGGAAGGGG TAAGGCAGGT GTCAGCACTG GAGGT	entry	score
	----->	M00002	E47 92.3
	----->	M00223	STATx 88.5
	----->	M00001	MyoD 86.0
	----->	M00084	MZF1 85.5
	<-----	M00217	USF 85.5

Εξώνιο 9

1	GACCCTCAGG ACTCATCTCG CTCTCTCAC CAGACATTG GTGACCGTGT	entry	score
	<-----	M00075	GATA-1 88.6
51	TCTCTATCCT GCTTCTTGA TCGTTCACCT TTTTGTGGCA TTTTCAACCA		
101	TCGGTGCTGC TAACGGGACC TGCTTCACAG CGGGAGGTA GGGGACCCCC	entry	score
	----->	M00051	NF-kap 88.9
	<-----	M00051	NF-kap 88.3
151	ACCCTCACTC CCAGGGTGGG CAGGGGCGGC GAAAGCAATA TCACCCCGGA	entry	score
	<-----	M00075	GATA-1 91.4
	<-----	M00076	GATA-2 88.9
	<-----	M00033	p300 87.1
	<-----	M00077	GATA-3 85.6
201	GGAAGACACA CAGCTA		

Εξώνιο 10

1	GGAGCACAAG TCTCAGTGG CCTGGACAG ATGGTCTGCA CTCTGGTCAG	entry	score
	----->	M00065	Tal-1b 93.3
	----->	M00070	Tal-1b 91.1
	----->	M00066	Tal-1a 90.7
51	CGGACTCCCG TGTCGTTATT TTCCAGACTC ATTACGTGG CGGGCGGGGA	entry	score
	----->	M00041	CRE-BF 86.2
	<-----	M00101	CdxA 85.7
101	GGGTACATG CTCAAAGTGC TTTCTTACAT CAGCGTCAGG CGCCTCACTC		
151	CAGCCCCCGC CATCATCTTT TATGRGAGTA CAATCCCGC TACCAGCCTA	entry	score
	<----	M00076	GATA-2 92.5
	<----	M00075	GATA-1 89.8
	<----	M00077	GATA-3 89.1
	<-----	M00100	CdxA 87.2
	<-----	M00075	GATA-1 86.5
	<-----	M00126	GATA-1 85.2
201	TCTTCAAGGC	entry	score
	-----	M00076	GATA-2 92.5
	-----	M00075	GATA-1 89.8
	-----	M00077	GATA-3 89.1
	-----	M00126	GATA-1 85.2

Εξώνιο 11

1	TTCGGTCTTC TGTGACATGA GAACAGTGT TGTAGTAAAT GACCTACAAA	entry	score
	<-----	M00101	CdxA 94.3
	----->	M00137	Oct-1 91.6
	<-----	M00156	RORalp 90.7
	----->	M00101	CdxA 87.9
	<-----	M00100	CdxA 87.2
	<-----	M00157	RORalp 85.0
51	TCCATTCTTC TTCTATTAG GGTATCATAG CAACGATTTA TATCATCCCT	entry	score
	-	M00156	RORalp 90.7
	-	M00100	CdxA 87.2
	-	M00157	RORalp 85.0
101	GGTGACATAA ACTCGTTAGT CAATTATTC AGTTTGGCG CATGGCTGTT		
151	TTATGGCCTG ACGATTCTAG GACTCATCGT GATGAGATT ACAAGGAAAG		
201	AGCTGGAAAG GCCTATCAAG GTAAGCTTGC AGCCCCAGAG TCACGAGTGG	entry	score
	<-----	M00075	GATA-1 90.6
	<-----	M00053	c-Rel 86.0
	<-----	M00203	GATA-X 85.8
	<-----	M00076	GATA-2 85.4
251	CT		



Εξώνιο 12

1	ATGATTGAAA TTGGAGGAGG GGGTACATGG AGTTCATACT CTTTTTATAA	entry	score
		M00101 CdxA	92.9
		M00101 CdxA	92.9
		M00084 MZF1	88.7
		M00216 TATA	88.3
		M00216 TATA	88.3
		M00252 TATA	87.9
		M00096 Pbx-1	87.3
		M00100 CdxA	87.2
		M00100 CdxA	87.2
		M00252 TATA	86.7
51	AAATCGGTTT TTTATCATGA AAAATTCAA AAAGAAAATG GGTACCCATG	entry	score
		M00101 CdxA	92.9
		M00148 SRY	90.0
		M00156 RORαp	89.8
		M00216 TATA	88.3
		M00216 TATA	88.3
		M00252 TATA	87.9
		M00100 CdxA	87.2
		M00203 GATA-X	86.7
		M00116 C/EBPα	85.3
101	ACCTGTTTTT CGTCTCCAGG TGCCCGTAGT CATTCCCGTC TTGATGACAC	entry	score
		M00156 RORαp	89.8
151	TCATCTCTGT GTTTTTGGTT CTGGCTCCAA TCATCAGCAA GCCCACCTGG		
201	GAGTACCTCT ACTGTGTGCT GTTTATATTA AGCGGCCTTT TATTTACTT		
251	CCTGTTTGT CACTACAAGT TTGGATGGGC TCAGAAAATC TCAAGTAAGT		
301	ACCAACAGAA GGGCCGCTTG GCCTCTGTGA GGTGCAGGCA GGCACGGCGT	entry	score
		M00271 AML-1a	88.7
		M00073 deltaE	85.0
351	CCTCACCTGT CCTGACTCCA	entry	score
		M00073 deltaE	89.3
		M00001 MyoD	88.4

Εξώνιο 13

1	CCTCACCCAC ACAAACCTCA GTGAACTTT CGAATTCAG TCTAACTAAG		
51	TGTACTCATT TTTGACTCTT ATTTCAAGAG CGATTACCAT GCACCTTCAG	entry	score
		M00100 CdxA	87.2
		M00101 CdxA	85.0
101	ATGCTAATGG AAGTGGTCCC ACCGGAGGAA GACCCTGAGT AACAAAGCTCC		
151	GTCTCTTGTA GCCAAGTCAG CTGAATTTAT TTTCTTAAGC AATATTTGTG	entry	score
		M00271 AML-1a	100.0
		M00116 C/EBPα	94.6
		M00100 CdxA	91.0
		M00101 CdxA	90.0
		M00100 CdxA	89.7
		M00159 C/EBP	88.5
		M00131 HNF-3b	88.4
		M00109 C/EBPβ	87.4
		M00117 C/EBPβ	86.4
201	GTATATTCCT CCTTTTTTC TTACGAATAA AATATACTCA GATGTTAAA	entry	score
		M00271 AML-1a	100.0
		M00159 C/EBP	88.5
		M00148 SRY	87.3
		M00101 CdxA	85.7
251	AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA		
301	AAAAAAA		

Εικόνα 32: Οι cis-ρυθμιστικοί μεταγραφικοί παράγοντες τμήματος του 5'-ρυθμιστικού άκρου του γονιδίου SLC7A9, των ιντρονίων του και του 3'-ρυθμιστικού του άκρου (επισημαίνεται το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης ATG, το κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης TAA, το 5' και 3'-άκρο συναρμογής των εξωνίων, με σκίαση δίνονται οι πολυμορφισμοί, ενώ με σκίαση και υπογράμμιση οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν στην παρούσα μελέτη).



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

“...Καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η συμπεριφορά ενός πολύπλοκου πράγματος θα πρέπει να εξηγηθεί με βάση τις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα συστατικά του μέρη, που τα θεωρούμε ως διαδοχικά επίπεδα σε μια εύτακτη ιεραρχία...”

Richard Dawkins

A. ΟΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΤΩΝ ΕΛΛΗΝΩΝ ΚΥΣΤΙΝΟΥΡΙΚΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ

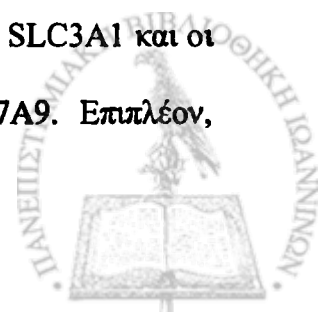
Η κυστινουρία είναι μία εκ των συχνότερων κληρονομικών παθήσεων στην Ευρώπη, μόλις δεύτερη σε συχνότητα μετά από την ινοκυστική νόσο και η πρώτη πιο συχνή νόσος αμινοξυουρίας [86]. Σε πλήθος εργασιών έχει προταθεί ότι η καταγωγή των κυστινουρικών ασθενών μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως κριτήριο για να προβλεφθεί η μετάλλαξη/ μεταλλάξεις που προκαλούν τη νόσο σε έναν συγκεκριμένο ασθενή [23, 66, 69, 71, 72, 82-84, 94]. Στην Ευρώπη, και ειδικότερα στο νότιο τμήμα της, η μετάλλαξη M467T στο εξόνιο 8 του SLC3A1 γονιδίου αποτελεί την συχνότερη (26%) γενετική αλλαγή που συνδέεται με την πρόκληση της νόσου. Έχει βρεθεί κυρίως στους Ισπανούς, Ιταλούς και Γερμανούς. Το αυτό ιδιαίτερο πρότυπο κατανομής φαίνεται να ισχύει και στην περίπτωση άλλων μεταλλάξεων. Έτσι η μετάλλαξη R270X στο εξόνιο 4 του SLC3A1 έχει σποραδικά βρεθεί στους Ευρωπαίους ασθενείς, αλλά στους Ashkenazi (Γερμανοί εβραϊκής καταγωγής) βρέθηκε να σχετίζεται με τη νόσο σε όλους τους κυστινουρικούς ασθενείς. Το αντιπροσωπευτικότερο παράδειγμα χαρακτηριστικής μετάλλαξης σε κάποιον πληθυσμό είναι η V170M στο εξόνιο 5 του SLC7A9 γονιδίου που βρέθηκε στους Λίβυους εβραϊκής καταγωγής και πιστεύεται ότι αποτελεί ένα κλασικό παράδειγμα γενετικής αλλαγής που ακολουθεί το μοντέλο της “Αρχής του Ίδρυτού”. Επίσης, και στους Σουηδούς βρέθηκαν ειδικές μεταλλάξεις, όπως και στους Ιάπωνες και μάλιστα τέτοιες που δεν έχουν περιγραφεί στους Καυκάσιους.



Σύμφωνα με τα δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας πιστεύονταν ότι μια τέτοια γενετική-πληθυσμιακή εξειδίκευση της νόσου ισχύει και στην περίπτωση των Ελλήνων ασθενών [1, 68, 81]. Συγκεκριμένα, σε προηγούμενες μελέτες που διεξήχθησαν στην Γερμανία και Σουηδία, η μετάλλαξη T216M θεωρήθηκε ως η επικρατούσα μετάλλαξη στους Έλληνες κυστινουργικούς ασθενείς, καθότι βρέθηκε σε ομοζυγωτία στους 6 από τους 7 συνολικά ασθενείς που μελετήθηκαν. Το συμπέρασμα όμως αυτό απορρίπτεται από την παρούσα μελέτη, η οποία πραγματοποιείται για πρώτη φορά στον ελληνικό πληθυσμό. Ο αριθμός των κυστινουργικών ασθενών (n=20) υπερέιχε αριθμητικά των προηγούμενων αντίστοιχων μελετών και βρέθηκε μεγάλη διασπορά όσον αφορά τις μεταλλάξεις που προκαλούσαν την νόσο στους Έλληνες ασθενείς. Η μετάλλαξη T216M, αν και αρκετά συχνή (20% σε ομοζυγωτία και 5% σε ετεροζυγωτία), έρχεται δεύτερη μετά την G105R (25% σε ομοζυγωτία και 5% σε ετεροζυγωτία) η οποία έχει βρεθεί και στους άλλους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς που μελετήθηκαν. Γίνεται, λοιπόν, σαφές πως δεν τεκμηριώνεται επιστημονικά η άποψη για μία κυρίαρχη μετάλλαξη στους Έλληνες ασθενείς.

Σε όλους τους πληθυσμούς που βρέθηκε να υπάρχει μία επικρατούσα μετάλλαξη υπεύθυνη για την πρόκληση της νόσου αυτή αφορούσε το γονίδιο SLC3A1. Τη μόνη εξαίρεση όπως προαναφέρθηκε αποτελούν οι Λίβυοι εβραϊκής καταγωγής, στους οποίους η νόσος προκαλείται από την μετάλλαξη V170M του SLC7A9 γονιδίου. Ωστόσο, και στην περίπτωση των Ελλήνων ασθενών, η κύρια μετάλλαξη είναι η G105R και που αφορά επίσης το γονίδιο SLC7A9 [90].

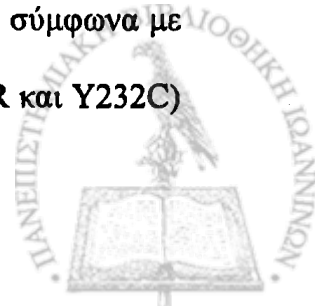
Συνολικά στον κυστινουργικό πληθυσμό μας ανιχνεύθηκαν 15 μεταλλάξεις, 8 από τις οποίες περιγράφονται για πρώτη φορά. Οι νεοπεριγραφόμενες αυτές μεταλλάξεις είναι οι: F266S, T351I, R456C, και N516D του γονιδίου SLC3A1 και οι 479-1G>C, Y232C, D233E, και 1399+1G>T του γονιδίου SLC7A9. Επιπλέον,



ανιχνεύθηκαν και οι μεταλλάξεις T216M, M467T, R365L, και R270X στο SLC3A1, και οι G105R, S379R, και R333W στο SLC7A9. Τα προαναφερθέντα γονίδια ευθύνονται εξίσου για την πρόκληση της κυστινουρίας στους Έλληνες ασθενείς, καθένα από τα οποία φέρει μία από τις δύο πιο κοινές μεταλλάξεις των Ελλήνων, την G105R και την T216M. Το γεγονός αυτό ενισχύει ακόμη περισσότερο την άποψη περί μη ειδικής “ελληνικής” μετάλλαξης, ενώ αξίζει επίσης να σημειωθεί πως καμμία μετάλλαξη δε φαίνεται να περιορίζεται σε κάποια συγκεκριμένη περιοχή της Ελλάδας.

Σε δύο από τους ασθενείς (Cys3, Cys8) βρέθηκε επίσης η συνύπαρξη τριών μεταλλάξεων και των δύο γονιδίων. Αυτές οι δύο περιπτώσεις κυστινουρικών ασθενών έχουν πολύ μεγάλο ενδιαφέρον αφού προσφέρουν τη δυνατότητα παρατήρησης και μελέτης της λειτουργίας των γονιδίων SLC3A1 και SLC7A9. Ο ασθενής Cys3 είναι ομοζυγώτης για τη μετάλλαξη G105R του SLC7A9 και ετεροζυγώτης για την F266S του SLC3A1. Επιπλέον, ο ασθενής Cys8 φέρει σε ετεροζυγωτία την μετάλλαξη T216M και N516D του SLC3A1, καθώς και σε ετεροζυγωτία την μετάλλαξη Y232C του SLC7A9.

Η μητέρα (F15) του ασθενούς Cys3, η οποία φέρει σε ετεροζυγωτία τις μεταλλάξεις G105R και F266S, δεν εμφάνισε αυξημένα επίπεδα κυστίνης στα ούρα της. Επίσης, η μητέρα (F18) του ασθενούς Cys8, η οποία φέρει σε ετεροζυγωτία τις μεταλλάξεις N516D και Y232C παρομοίως δεν είχε αυξημένα τα επίπεδα της κυστίνης στα ούρα της. Λαμβάνοντας υπόψη την ατελώς υπολειπόμενη μορφή κληρονομικότητας που προτείνεται ότι εμφανίζει το γονίδιο SLC7A9, θα μπορούσε η μη παρουσία της νόσου σε αυτές τις δύο γυναίκες να αποδοθεί σε μικρή διεισδυτικότητα και εκφραστικότητα αυτών των μεταλλάξεων. Ωστόσο, σύμφωνα με την κλίμακα Grantham, αυτές οι δύο υποκαταστάσεις αμινοξέων (G105R και Y232C)



παρουσιάζουν σημαντικές μεταξύ τους αποκλίσεις όσον αφορά τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες [137]. Αυτό έμμεσα δηλώνει ότι δεν πρόκειται για λειτουργικά “αθώες” μεταλλάξεις, γεγονός που φαίνεται και από τα αποτελέσματα άλλων ερευνητικών ομάδων [90]. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η μετάλλαξη G105R δείχνει διαφορετικές φαινοτυπικές εκφράσεις στα ετερόζυγα άτομα, με κάποιους ετεροζυγώτες να απεκκρίνουν την κυστίνη κοντά στα φυσιολογικά όρια, και κάποιους άλλους κοντά σε αυτά που χαρακτηρίζουν τους ομοζυγώτες ή σύνθετα ετεροζυγώτες δύο μεταλλάξεων [90]. Ανάλογες μελέτες για την πιθανή έκφραση της ετεροζυγωτίας της μετάλλαξης Y232C δεν υπάρχουν για να απαντήσουν στην ερώτηση σχετικά με την εκφραστική της διεισδυτικότητα. Παραμένει, λοιπόν, το ερώτημα αν για την έκφραση αυτών των μεταλλάξεων ακόμη και σε ετεροζυγωτία ευθύνονται οι ίδιες οι μεταλλάξεις ή είναι αποτέλεσμα κάποιων ατομικών ιδιαιτεροτήτων που δεν έχουν μέχρι τώρα διευκρινιστεί και επηρεάζουν την έκφραση των μεταλλάξεων στο γονίδιο SLC7A9. Μια προσέγγιση για να απαντηθεί αυτό το ερώτημα δίνεται στη συνέχεια της ανάπτυξης των αποτελεσμάτων της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

B. ΚΥΣΤΙΝΟΥΡΙΑ: ΜΙΑ ΣΥΝΘΕΤΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ

α) Ο πιθανός ρόλος των μεταλλάξεων των γονιδίων SLC3A1 και SLC7A9 στη συναρμογή των εξονίων τους και στις λειτουργικές ιδιότητες των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν

Η κυστινουρία είναι ένα σύνθετο, πολύπλοκο γενετικό νόσημα, το οποίο μπορεί να αποδοθεί όχι μόνο στην ετερογένεια του τρόπου της κληρονόμησής της αλλά και στην διαφορετική φαινοτυπική έκφραση των ίδιων μεταλλάξεων τόσο



μεταξύ των ασθενών όσο και μεταξύ των συγγενών ατόμων [73, 90, 138, 139]. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο SLC3A1 ακολουθούν πλήρως υπολειπόμενη μορφή κληρονομικότητας, ενώ αυτές του SLC7A9 φαίνεται να ακολουθούν ατελώς υπολειπόμενη ή ατελώς επικρατούσα μορφή κληρονομικότητας [56, 140]. Ωστόσο, σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν και περιπτώσεις ασθενών στους οποίους δεν ανιχνεύθηκε καμμία μετάλλαξη ούτε στο SLC3A1 ούτε στο SLC7A9 γονίδιο [72]. Έτσι προτάθηκε η πιθανότητα να σχετίζονται και άλλα γονίδια με τη νόσο και τα οποία να αυξάνουν την πολυπλοκότητα της γενετικής βάσης του νοσήματος. Επίσης, πέραν των γενετικών παραγόντων, ενδεχομένως και άλλοι μη γενετικοί παράγοντες να υπεισέρχονται στον τελικό φαινότυπο της [99, 100]. Διάφοροι ενδογενείς, ανατομικοί και παθοφυσιολογικοί παράγοντες, καθώς και διαιτολογικές ιδιαιτερότητες, μπορεί να συνεισφέρουν στην φαινοτυπική έκφραση της κυστινουρικής νόσου. Όλα τα προαναφερθέντα καθιστούν την κυστινουρία ένα σύνθετο γενετικά και πολύπλοκο φαινοτυπικά νόσημα.

Ξεκινώντας την προσέγγιση αυτού του θέματος, η πολυπλοκότητα θα μπορούσε να αποδοθεί στο γεγονός ότι δύο τουλάχιστον γονίδια σχετίζονται με τη νόσο, το SLC3A1 και το SLC7A9. Αυτό βέβαια έχει ιδιαίτερη αξία αν λάβουμε υπόψη μας το διαφορετικό ρόλο των πρωτεϊνών rBAT και b^{0,+}AT στο ετεροδιμερές σύμπλοκο rBAT/b^{0,+}AT, το οποίο ευθύνεται για τη επαναρρόφηση της κυστίνης στα εγγύς νεφρικά σωληνάκια [26]. Η πρωτεΐνη rBAT, που εκφράζεται από το γονίδιο SLC3A1, έχει έναν ενδοκυττάριο ρόλο μεταφοράς του ετεροδιμερούς συμπλόκου rBAT/b^{0,+}AT στην ψυκτροειδή παρυφή των επιθηλιακών κυττάρων των εγγύς νεφρικών σωληναρίων. Αντίθετα, η πρωτεΐνη b^{0,+}AT, που εκφράζεται από το γονίδιο SLC7A9, αποτελεί την καταλυτική υπομονάδα του ετεροδιμερούς συμπλόκου rBAT/b^{0,+}AT καθορίζοντας τις μεταφορικές του ιδιότητες.



Όπως προαναφέρθηκε αμφότερα τα γονίδια ευθύνονται εξίσου για την πρόκληση της κυστινουρίας. Πιο συγκεκριμένα, στους Έλληνες κυστινουρικούς ασθενείς, δύο μεταλλάξεις στο γονίδιο SLC3A1 βρέθηκαν στο 45% των ασθενών (n=9/20). Δύο μεταλλάξεις στο γονίδιο SLC7A9 βρέθηκαν επίσης στο 45% των ασθενών (n=9/20), ενώ στο υπόλοιπο 10% των ασθενών βρέθηκαν δύο μεταλλάξεις στο SLC3A1 γονίδιο και μία στο SLC7A9 (n=1/20) ή δύο μεταλλάξεις στο SLC7A9 γονίδιο και μία στο SLC3A1 (n=1/20). Ο τελευταίος ασθενής (Cys3) είχε λίθους μεγαλύτερων διαστάσεων και συχνότερη υποτροπή τους, επομένως πιο βαρεία κλινική εικόνα της νόσου, εν σχέση με τον αδελφό του (F1) ο οποίος έφερε μόνο τα δύο μεταλλαγμένα αλληλόμορφα του SLC7A9.

Επιπλέον, η θέση όπου εδράζονται οι μεταλλάξεις στον rBAT/ b^{0,+}AT μεταφορέα, πιστεύεται ότι επιδρά στον τελικό φαινότυπο [98, 104, 105, 141, 142]. Στους ασθενείς της παρούσας μελέτης όταν οι μεταλλάξεις αφορούσαν το γονίδιο SLC3A1 εντοπιζόνταν στο εξωκυττάριο τμήμα της rBAT πρωτεΐνης, όπου πιστεύεται ότι εδράζουν οι λειτουργικές της ιδιότητες. Όλες οι μεταλλάξεις του SLC3A1, εκτός από την N516D, βρίσκονται στην εξωκυττάρια υπο-επικράτεια (subdomain), μεταξύ των αμινοξέων 125 και 512 της rBAT πρωτεΐνης. Η επικράτειά της αυτή έχει συσχετισθεί κυρίως με την λειτουργία της rBAT πρωτεΐνης ως μορίου καθοδηγητή του συμπλόκου rBAT/b^{0,+}AT στην κυτταρική μεμβράνη [104]. Αντίθετα, το πλέον εξωκυττάριο καρβοξυτελικό άκρο της rBAT πρωτεΐνης, εκτός από την προαναφερθείσα ιδιότητά της, πιθανώς επιδρά και στις καταλυτικές ιδιότητες του rBAT/b^{0,+}AT συμπλόκου [105]. Η μετάλλαξη N516D τοποθετείται σε αυτήν την δεύτερη υπο-επικράτεια και για το λόγο αυτό πιθανώς αυτό να επιδρά και στα μεταφορικά χαρακτηριστικά του rBAT/b^{0,+}AT συμπλόκου εν σχέση με τις άλλες SLC3A1 μεταλλάξεις που προαναφέρθηκαν.



Επιπλέον, οι μεταλλάξεις του SLC7A9 γονιδίου εντοπίζονται στις υποθετικές διαμεμβρανικές επικράτειες ή στους ενδοκυττάριους βρόχους της $b^{0,+}$ AT πρωτεΐνης, που θεωρούνται υπεύθυνες για την καταλυτική της δράση. Συγκεκριμένα, οι μεταλλάξεις G105R και R333W βρίσκονται στους υποθετικούς ενδοκυττάριους βρόχους 1 και 4, ενώ οι μεταλλάξεις Y232C, D233E, και S379R προκαλούν σημειακές αλλαγές σε αμινοξέα των διαμεμβρανικών επικρατειών 6, 6, και 10, αντίστοιχα. Η μετάλλαξη G105R επιδρά σε αμινοξύ που έχει διατηρηθεί εξελικτικά σε μεγάλο βαθμό στα μέλη της οικογένειας των ελαφριών αλυσίδων (LSHAT, Light Subunits Heteromultimeric Amino Acid Transporters) [90]. Η μετάλλαξη Y232C βρίσκεται πολύ κοντά σε μία υψηλά εξελικτικά διατηρημένη γλυκίνη, η οποία έχοντας μικρή πλευρική ομάδα-R συμμετέχει στη δευτεροταγή διαμόρφωση της πρωτεΐνης (διαμεμβρανική αλληλεπίδραση ελίκων τύπου SmxxxSm, όπου Sm οποιοδήποτε αμινοξύ με μικρή πλευρική αλυσίδα: Gly, Ala, Ser και x οποιοδήποτε αμινοξύ) [90]. Γενικότερα οι μεταλλάξεις του γονιδίου SLC7A9 που επιδρούν: α) σε υψηλά εξελικτικά διατηρημένα αμινοξέα και β) σε εξελικτικά διατηρημένα αμινοξέα με μικρή πλευρική αλυσίδα, τα οποία συμμετέχουν στη διαμεμβρανική αλληλεπίδραση των ελίκων της δευτεροταγούς διαμόρφωσης της πρωτεΐνης, προκαλούν σοβαρότερη φαινοτυπική έκφραση της νόσου.

Στην φαινοτυπική έκφραση των διαφόρων μεταλλάξεων θα μπορούσε επίσης να συμβάλλει το γεγονός, ότι ορισμένες από αυτές πέρα από την αλλαγή που επιφέρουν στην κωδικοποιούσα πρωτεΐνη, δρουν αρνητικά και στη συναρμογή των εξωνίων των γονιδίων. Συγκεκριμένα στην παρούσα μελέτη βρέθηκαν επτά μεταλλάξεις, οι οποίες επηρεάζουν αρνητικά το μάτισμα των εξωνίων: α) μειώνοντας το "score" της πραγματικής θέσης συναρμογής (R333W), β) αυξάνοντας το "score" της ψευδούς (εναλλακτικής) θέσης συναρμογής (S379R, T351I) γ) καταργώντας

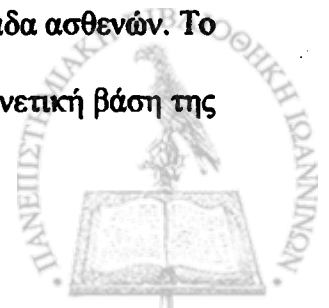


πλήρως την πραγματική θέση συναρμογής (479-1G>C, D233E, 1399+1G>T), και δ) δημιουργώντας σήμα για ψευδή θέση συναρμογής (479-1G>C, S379R, R365L). Αντίθετα, οι υπόλοιπες οκτώ μεταλλάξεις ήταν ουδέτερες μη επδρώντας στο μάτισμα των εξονίων.

Ωστόσο, φαινοτυπικές αποκλίσεις υπάρχουν ακόμη και μεταξύ ατόμων που φέρουν τις ίδιες μεταλλάξεις. Για το λόγο αυτό μελετήσαμε την πιθανότητα, το γονίδιο SLC7A10 να φέρει μεταλλάξεις και να συμβάλλει στον τελικό φαινότυπο. Το γονίδιο SLC7A10 έχει 42% απόλυτη ταύτιση, και 66% ομοιότητα, με το γονίδιο SLC7A9 [20]. Το γεγονός αυτό προϋποθέτει για πιθανή μερικού βαθμού αντικατάσταση της πρωτεΐνης $b^{0,+}AT$, από το προϊόν έκφρασης του γονιδίου SLC7A10 (πρωτεΐνη asc) στο ετεροδιμερές σύμπλοκο $\gamma BAT/ b^{0,+}AT$ της ψυκτροειδούς παρυφής των επιθηλιακών κυττάρων, μεταβάλλοντας κατ' αυτόν τον τρόπο το μέγιστο της λειτουργικής της ικανότητας.

Είναι, όμως, γνωστό ότι το σύμπλοκο 4F2hc/asc προκαλεί τη βασεοπλευρική μεταφορά των μικρών ουδέτερων αμινοξέων μεταξύ των οποίων και της κυστίνης [95, 96]. Πιθανώς, σε μια τέτοια περίπτωση οι μεταλλάξεις του γονιδίου SLC7A10 να ευθύνονται για τη μη φυσιολογική επαναρρόφηση της κυστίνης καθώς επηρεάζονται τα ενδοκυττάρια επίπεδά της. Επομένως, όταν ένα άτομο φέρει SLC3A1, SLC7A9 και/ή SLC7A10 μεταλλάξεις, ο μεταξύ τους συνδυασμός ίσως να επιδρά στην τελική φαινοτυπική έκφραση της κυστινουρίας.

Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη δεν βρέθηκε καμία μεταλλαγή στο SLC7A10 γονίδιο εκτός από δύο πολυμορφισμούς, τον νεοπεριγραφόμενο 634+8C>G και τον ήδη γνωστό 913-11C>T. Και οι δύο αυτοί πολυμορφισμοί δεν εμφάνισαν απόκλιση από την τυχαία κατανομή τόσο στην ομάδα ελέγχου όσο και στην ομάδα ασθενών. Το γεγονός αυτό απέκλεισε τη συμμετοχή του SLC7A10 γονιδίου στη γενετική βάση της



νόσου και στην βαρύτητα με την οποία εκδηλώνουν οι 20 κυστινourικοί ασθενείς της παρούσας μελέτης την κυστινourία.

β) Οι πιθανές επιπτώσεις των μεταλλάξεων των γονιδίων SLC3A1 και SLC7A9 στη συγκρότηση και μεταφορά στην κυτταρική μεμβράνη του ετεροδιμερούς συμπλόκου rBAT /b^{0,+}AT

Οι μεταλλάξεις τόσο στην rBAT πρωτεΐνη όσο και στην b^{0,+}AT πρωτεΐνη ίσως να επιδράσουν όχι μόνο στις λειτουργικές τους ιδιότητες αλλά και στην ίδια τη συγκρότηση του συμπλόκου εντός του ενδοπλασματικού δικτύου (ER) και μετέπειτα μεταφορά του στην κυτταρική μεμβράνη. Είναι γνωστό ότι η σύνθεση των μεμβρανικών και εκκριτικών πρωτεϊνών άρχεται στο κυτταρόπλασμα και από εκεί εισέρχονται στο ER όπου αποκτούν τη στερεοχημική τους διαμόρφωση [143-145]. Ειδικότερα, στις νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες συνδέονται τα χαπερόνια, τα οποία μαζί με τα κατάλληλα ένζυμα συμβάλουν στη σωστή διαμόρφωση των πρωτεϊνών. Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες αφού έχουν υποστεί τις κατάλληλες μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις και αφού αποδεσμευτούν από αυτές τα χαπερόνια ακολουθούν την οδό που θα τις οδηγήσει στο σύστημα Golgi όπου σχεδόν ολοκληρώνεται η χωροταξική τους διαμόρφωση και η συναρμολόγηση των πρωτεϊνικών συμπλόκων.

Ωστόσο, υπάρχουν και περιπτώσεις όπου οι πρωτεΐνες δεν μπορούν να αποκτήσουν την κατάλληλη στερεοχημική τους διαμόρφωση. Αυτό συμβαίνει για παράδειγμα στην περίπτωση που φέρουν μεταλλάξεις, με άμεσο αποτέλεσμα την παραμονή τους εντός του ER καθώς δεν αποδεσμεύονται από επάνω τους τα χαπερόνια. Ακολούθως, οι πρωτεΐνες αυτές αποβάλλονται από το ER οπότε και αποσυντίθενται μέσα στο κυτταρόπλασμα από τα πρωτεοσώματα. Η σωστή, λοιπόν, διαμόρφωση των πρωτεϊνών αποτελεί όπως φαίνεται καθοριστικό βήμα για την



μετέπειτα πορεία τους εντός του κυττάρου. Η όλη διαδικασία που περιγράφηκε ανωτέρω είναι γνωστή ως “ποιοτικός πρωτεϊνικός έλεγχος στο ER” (protein quality control in ER) [143-145].

Στον άνθρωπο είναι γνωστά αρκετά γενετικά νοσήματα που η μη σωστή διαμόρφωση κάποιων πρωτεϊνών έχει σημαντικό ρόλο στην κλινική εκδήλωση ή βαρύτητα της νόσου [143-145]. Συγκεκριμένα η μη σωστή διαμόρφωση συγκεκριμένων πρωτεϊνών και η αδυναμία μεταφοράς τους στην κυτταρική μεμβράνη ή έκκρισής τους, έχει περιγραφεί στην κυστική ίνωση (CFTR), στην Granzmann's θρομβασθένεια, στην κληρονομούμενη τύφλωση, στην οικογενή υπερχοληστερολαιμία τύπου II, στη συγγενή νεφρογενή μορφή του άποιου διαβήτη, στην ατελή οστεογένεση, στο σύνδρομο Marfan, στη νόσο von Willebrand, στην ανεπάρκεια της πρωτεΐνης C, της αι-αντιτρυψίνης, και του κληρονομούμενου παράγοντα VII.

Όλα τα παραπάνω πιθανώς να υποδεικνύουν ότι και οι πρωτεΐνες rBAT και b^{0,+}AT ίσως υπόκεινται σε έναν παρόμοιο ποιοτικό έλεγχο στο ER. Άλλωστε, είναι γνωστό ότι η συναρμολόγηση του συμπλόκου rBAT /b^{0,+}AT πραγματοποιείται μέσα στο ER [40]. Επομένως, η κυστινουρία μπορεί να είναι αποτέλεσμα όχι μόνο των τροποποιημένων λειτουργικών ιδιοτήτων των rBAT και b^{0,+}AT μεταλλαγμένων πρωτεϊνών που διαφεύγουν τον ποιοτικό αυτό έλεγχο, αλλά και των μειωμένων επιπέδων του συμπλόκου rBAT /b^{0,+}AT που τελικά μεταφέρεται στην ψυκτροειδή παρυφή των επιθηλιακών κυττάρων.

Προσφάτως δημοσιεύθηκε ότι οι σημειακές μεταλλάξεις ίσως να επηρεάζουν επιπλέον και την ίδια την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών κατά τη συγκρότηση των ετεροδιμερών μεταφορέων (π.χ. μεταλλάξεις στις πρωτεΐνες ABPCG5 και ABCG8 επιδρούν στο σχηματισμό του ετεροδιμερούς συμπλόκου G5/G8 στο νόσημα της



σιτοστερολαιμίας) [146]. Ανάλογα μπορούν, πιθανώς, να δράσουν και οι μεταλλάξεις που περιγράψαμε στην παρούσα μελέτη επί της δημιουργίας του ετεροδιμερούς συμπλόκου γ BAT / $b^{0,+}$ AT. Από όλα αυτά τα στοιχεία, λοιπόν, προβάλλεται αναγκαία η μελέτη των επιπτώσεων των μεταλλάξεων των πρωτεϊνών γ BAT και $b^{0,+}$ AT στην μεταξύ τους αλληλεπίδραση και στην μεταφορά του σχηματιζόμενου συμπλόκου στην κυτταρική μεμβράνη. Η εύρεση παρόμοιων μηχανισμών ποιοτικού ελέγχου των πρωτεϊνών γ BAT και $b^{0,+}$ AT στο ER ίσως συμβάλλει τελικά και στην ερμηνεία της φαινοτυπικής ποικιλότητας που χαρακτηρίζει το νόσημα μεταξύ των ασθενών που φέρουν διαφορετικές μεταλλάξεις.

γ) Ο πιθανός ρόλος των πολυμορφισμών

Στο γονίδιο SLC3A1 βρέθηκαν μόνο 2 σημειακοί πολυμορφισμοί. Οι πολυμορφισμοί αυτοί, 1035G>A και 1854A>G (I618M), δεν έχουν απόκλιση από την τυχαία κατανομή στους ασθενείς και στην ομάδα ελέγχου. Ωστόσο, το 88,89% των πολυμορφισμών που βρέθηκαν στα δύο κυστινουρικά γονίδια αφορούν το γονίδιο SLC7A9, στο οποίο πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή.

Στην πρόσφατη διεθνή βιβλιογραφία, ειδική μνεία γίνεται σε πολυμορφισμούς που βρέθηκαν να σχετίζονται με την πρόκληση ασθενειών στον άνθρωπο μεταξύ των οποίων νόσος Alzheimer, Graves, Creutzfeld-Jakob, Crohn, HIV, IDDM (ινσουλινοεξαρτώμενος άποιος διαβήτης), NIDDM (μη ινσουλινοεξαρτώμενος άποιος διαβήτης), FMF (οικογενής μεσογειακός πυρετός), POAG (πρωτοπαθές γλαύκωμα ανοικτής γωνίας), σε καρκίνο μαστού, παχέως εντέρου, πνευμόνων, σε νευροδιαταραχές, αυτοάνοσα νοσήματα, άσθμα, αρρυθμία, ημικρανία, διαταραχές του μεταβολισμού, συστηματική σκλήρυνση, ιδιοπαθούς φύσεως αρθρίτιδα, θρόμβωση, αιμοχρωμάτωση, συστηματικό ερυθματώδη λύκο, χολική κίρρωση,



αρτηριακή πίεση, και οστεοποίηση [147, 148]. Το γεγονός αυτό καθιστά τους πολυμορφισμούς σημαντικούς στην γενετική ανάλυση των κληρονομικών παθήσεων μεταξύ των οποίων και της κυστινουρίας.

Στην παρούσα μελέτη, ο πολυμορφισμός 1-39C>T πιθανώς να επηρεάζει τη μετα-μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου SLC7A9 αφού εντοπίζεται 39bp από το κωδικόνιο έναρξης της μεταγραφής στο 5'UTR άκρο. Τρεις από τους πολυμορφισμούς οι 1854A>G (SLC3A1), 425T>C και 667C>A (SLC7A9) προκαλούν αλλαγή στα κωδικοποιημένα αμινοξέα (I618M, V142A, και L223M, αντίστοιχα). Ο πολυμορφισμός I618M τοποθετείται στο ακρότατο τμήμα του καρβοξυτελικού άκρου της rBAT πρωτεΐνης. Η συγκεκριμένη επικράτεια της rBAT πρωτεΐνης όπως προαναφέρθηκε πιθανώς να έχει κάποιον άμεσο ρόλο στα λειτουργικά χαρακτηριστικά του $b^{0,+}$ συστήματος μεταφοράς, εκτός του ρόλου της ως καθοδηγητή του συμπλόκου rBAT/ $b^{0,+}$ AT στην κυτταρική μεμβράνη [43, 44]. Ο πολυμορφισμός V142A τοποθετείται στο δεύτερο εξωκυττάριο βρόχο κοντά στην κυστίνη η οποία σχηματίζει το δισουλφιδικό δεσμό με την rBAT πρωτεΐνη. Τέλος, ο πολυμορφισμός L223M βρίσκεται στην 6^η διαμεμβρανική επικράτεια δίπλα από μία αλανίνη και μία γλυκίνη που είναι υψηλά διατηρημένα αμινοξέα στις LSHAT, και όλα μαζί (Ala, Gly, Leu) παρουσία μίας τυροσίνης (Tyr) και μίας ασπαραγίνης (Asp) συμμετέχουν σε μια διαμεμβρανική αλληλεπίδραση ελίκων για τη δευτεροταγή διαμόρφωση της $b^{0,+}$ AT πρωτεΐνης. Οι προαναφερθείσες παρατηρήσεις θα μπορούσαν ενδεχομένως να καταστήσουν τις αλλαγές αυτές σημαντικές. Όμως, σύμφωνα με την κλίμακα Grantham αυτές οι υποκαταστάσεις των αμινοξέων θεωρούνται συντηρητικές, γεγονός που εξηγεί την παρουσία τους και μάλιστα σε Hardy-Weinberg ισοζύγιο στον υγιή πληθυσμό [137].



Στην πλειοψηφία τους οι πολυμορφισμοί που βρέθηκαν είναι σιωπηρές υποκαταστάσεις αμινοξέων. Ωστόσο, έχουν περιγραφεί νοσήματα τα οποία έχουν συσχετισθεί με τέτοιες σιωπηρές μεταλλάξεις, καθώς επηρεάζουν τη διαδικασία συναρμογής των εξωνίων-ιντρονίων, όπως στην προϊούσα μυϊκή ατροφία, στην φαινυλοκετονουρία, στην εγκεφαλομυελοπάθεια Leigh, και στο σύνδρομο Marfan [149]. Τέτοιες νουκλεοτιδικές αλλαγές συνήθως υποτιμούνται καθώς θεωρούνται μεταφραστικά συνώνυμες και έτσι μερικές φορές λανθασμένα θεωρούνται ως ουδέτεροι πολυμορφισμοί. Το γεγονός αυτό τονίζει τη σημασία εύρεσης κατάλληλων λογισμικών προγραμμάτων για την ακριβή πρόβλεψη αλληλουχιών στο γονιδίωμα, οι οποίες λειτουργούν ως σήματα/ θέσεις συναρμογής και των οποίων η αλλαγή ίσως να προκαλεί τη δημιουργία ή την απώλεια ενός σήματος/ μιας θέσης ματίσματος. Έτσι είναι δυνατόν άτομα τα οποία φέρουν τέτοιες γενετικές αλλαγές στο γονιδίωμά τους, κατά τα άλλα σιωπηρές, να διαφέρουν στη σωστή συναρμολόγηση των εξωνίων των γονιδίων τους, γεγονός που οδηγεί τελικά σε διαφορετική φαινοτυπική έκφραση της νόσου, διαφορετική διεισδυτικότητα των μεταλλάξεων και ηλικία πρώτης εκδήλωσης των συμπτωμάτων της κυστινουρίας.

Η ανάλυση για αλληλουχίες οι οποίες λειτουργούν ως σήματα στη συναρμογή των εξωνίων των γονιδίων αποκάλυψε ότι οι πολυμορφισμοί που προσδιορίστηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν ουδέτεροι ή θετικοί ως προς το “splicing”. Η δράση τους αυτή επιτυγχάνεται με: α) την αύξηση του “score” της πραγματικής θέσης συναρμογής [972G>A (εξώνιο 4, SLC7A9), 634+8C>G (εξώνιο 5, SLC7A10)], β) την εξάλειψη της ψευδούς (εναλλακτικής) θέσης συναρμογής [399C>T (εξώνιο 4, SLC7A9)], γ) την μείωση του “score” της ψευδούς θέσης ματίσματος [399C>T (εξώνιο 4, SLC7A9), 1143C>T (εξώνιο 11, SLC7A9)], και δ) το να είναι ουδέτεροι μη δράντας ουδόλου στο “score” της προβλεπόμενης 5'- και 3'-θέσης ματίσματος

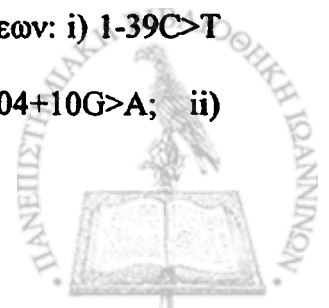


(όλοι οι υπόλοιποι δηλαδή προσδιοριζόμενοι πολυμορφισμοί των SLC3A1, SLC7A9, και SLC7A10 γονιδίων). Τη μόνη εξαίρεση, αποτελεί ο πολυμορφισμός 411T>C (εξώνιο 4, SLC7A9) που δρα αρνητικά καθώς αυξάνει σε κάποιο βαθμό το “score” της ψευδούς θέσης ματίσματος.

δ) Οι SLC7A9 πολυμορφισμοί μέσα στους γονοτυπικούς συνδυασμούς

Οι ασθενείς που είχαν δύο μεταλλαγμένα SLC7A9 αλληλόμορφα (με εξαίρεση μόνο ένα που απέκλεινε μόνο στον ακραίο 1365C>T πολυμορφισμό και μάλιστα σε ετεροζυγωτία) είχαν τις μεταλλάξεις τους σε σύνδεση με τον άγριου τύπου SLC7A9 SNPs γονοτυπικό/ απλοτυπικό συνδυασμό των πολυμορφικών θέσεων του SLC7A9 γονιδίου, σε ποσοστό 100% (πίνακας 8, εξαίρεση του ακραίου πολυμορφισμού 1365C>T). Αντίθετα, οι ασθενείς που έφεραν δύο SLC3A1 μεταλλαγμένα αλληλόμορφα είχαν μεγάλη ποικιλότητα στον αντίστοιχο SLC7A9 SNPs γονότυπο/ απλότυπο (πίνακας 9). Μόνο το 40% αυτών των ασθενών είχε κληρονομήσει μεταλλάξεις του SLC3A1 και τον άγριου τύπου SLC7A9 SNPs απλότυπο. Η αποκλειστική σύνδεση των SLC7A9 μεταλλάξεων με τον άγριου τύπου SLC7A9 SNPs απλότυπο στο 100% των ασθενών, αν εξαιρέσουμε την ακραία SLC7A9 γονιδιακή πολυμορφική θέση 1365C>T, ίσως να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη σε ποίου γονιδίου τις κωδικοποιούσες περιοχές πρέπει να γίνει ο έλεγχος εύρεσης των μεταλλάξεων.

Η πρόβλεψη αυτή μπορεί να γίνει ανάλογα με τον αν οι πολυμορφισμοί του SLC7A9 αποκλίνουν ή όχι από τα άγριου τύπου αλληλόμορφά τους. Για το λόγο αυτό θα μπορούσε να ελέγχεται η στατιστικά σημαντική ανισορροπία σύνδεσης των άγριου τύπου αλληλομόρφων των εξής SLC7A9 πολυμορφικών θέσεων: i) 1-39C>T με 235+18C>A, 235+22T>G, 411T>C, 478+10T>C, και 604+10G>A; ii)



235+22T>G με 478+10T>C, και 977+51A>G; iii) 478+10T>C με 235+22T>G, 977+51A>G, και 1143C>T, iv) 977+51A>G με 235+22T>G, και 478+10T>C, v) 1143C>T με 478+10T>C, καθώς περιορίζεται μόνο στους κυστινουρικούς ασθενείς. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ανισορροπία σύνδεσης του πολυμορφισμού 1-39C>T, καθώς βρίσκονται πιο κοντά στη θέση του προαγωγέα του γονιδίου SLC7A9. Εκεί πρέπει να συγκεντρώνονται οι περισσότερες αλληλουχίες (cis-ρυθμιστικοί μεταγραφικοί παράγοντες) του SLC7A9 γονιδίου, οι οποίες αναγνωρίζονται από τους trans-ρυθμιστικούς παράγοντες της έκφρασής του. Η ανισορροπία σύνδεσης των άγριου τύπου αλληλομόρφων αυτών των πέντε πολυμορφικών θέσεων, θα μπορούσε επίσης να προβλέψει σε ποιου γονιδίου τις μη μεταφραζόμενες περιοχές (ιντρόνια, 5'-άκρο, 3'-άκρο) πρέπει να επεκταθεί ο έλεγχος εύρεσης των μεταλλάξεων, όταν μόνο μία ή καμμία μετάλλαξη δεν έχει βρεθεί στα εξώνια και των δύο γονιδίων.

Επιπλέον, κατασκευάστηκαν τα δένδρογράμματα αυτών των SLC7A9 SNPs γονοτύπων για να διαπιστωθεί η ύπαρξη ή μη SLC7A9 SNPs γονοτύπων που αποκλίνουν μεταξύ τους και πιθανώς να επιδρούν στη φαινοτυπική έκφραση της νόσου (εικόνες 30, 31). Στην παρούσα μελέτη απόκλιση εμφάνισε ένας SLC7A9 SNPs γονότυπος (P7) από τον C30 SLC7A9 SNPs γονότυπο ενός υγιούς ατόμου. Το άτομο όμως με τον C30 SLC7A9 SNPs γονότυπο προέρχεται από την ίδια περιοχή με την ασθενή Cys99 που φέρει τον P7 SLC7A9 SNPs γονότυπο. Οι SLC7A9 SNPs γονότυποι P7 και C30 αποτελούν ένα ξεχωριστό φυλογενετικό στάδιο. Αυτό πιθανώς να αντανakλά την εξέλιξη έως σήμερα ενός γεγονότος “Αρχής του Ιδρυτού” στην εξέλιξη των SLC7A9 SNPs γονοτύπων παρά σε ένα SLC7A9 SNPs γονοτυπικό cluster το οποίο συνδέεται με την κλινική βαρύτητα στην έκφραση της κυστινουρίας (δηλαδή του P7). Τελικά, οι SLC7A9 SNPs γονότυποι ίσως να βοηθήσουν στην



πρόβλεψη του πιθανού γονιδίου που προκαλεί την κυστινουρία σε κάποιον ασθενή όχι όμως και στην πρόβλεψη της βαρύτητας των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών της νόσου με την οποία το άτομο θα την εκφράσει.

ε) Η εξελικτική σημασία των SLC7A9 SNPs clusters

Η ανισορροπία σύνδεσης των SLC7A9 μεταλλάξεων με τον άγριου τύπου SLC7A9 SNPs γονότυπο/ απλότυπο δεν μπορεί να αποδοθεί σε πρόσφατη εμφάνισή τους στον ελληνικό πληθυσμό [94]. Η μετάλλαξη G105R του SLC7A9 είναι η συχνότερη στους Έλληνες ασθενείς, και ίσως αντιπροσωπεύει την παλαιότερη μετάλλαξη αυτού του γονιδίου στον ελληνικό πληθυσμό. Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι ανασυνδυασμοί και οι μεταλλάξεις επηρεάζουν τη σύνδεση των γενετικών θέσεων κατά τη διάρκεια του χρόνου, είναι πολύ λογικό, ότι τουλάχιστον η μετάλλαξη G105R, ως συχνότερη, δεν θα έπρεπε να επιδεικνύει αυτή την στατιστικά σημαντική ανισορροπία σύνδεσης με τον άγριου τύπου SLC7A9 SNPs απλότυπο.

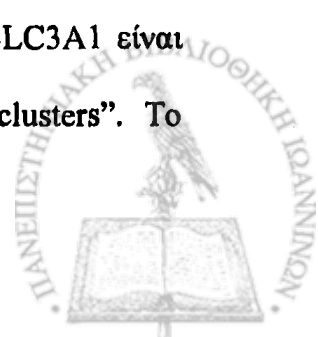
Τα “clusters” του πολυμορφικού SLC7A9 γονιδίου, δύναται να είναι αποτέλεσμα εξελικτικών διαδικασιών, οι οποίες στοχεύουν στην αύξηση της προσαρμοστικότητας (fitness) και ταυτόχρονα της εξελισιμότητας (evolnability) των μεταφορέων των αμινοξέων και κατ’ επέκταση του ανθρώπου. Η εξελισιμότητα δημιουργεί τα γονοτυπικά σύμπλοκα, τα οποία παρέχουν στον άνθρωπο τη δυνατότητα της απαιτούμενης γενετικής ποικιλομορφίας ώστε να μπορεί να αντεπεξέλθει στις νέες πιθανές περιβαλλοντολογικές συνθήκες που θα βρεθεί να αντιμετωπίσει στο μέλλον. Διατηρώντας ταυτόχρονα σε σύνδεση με τις SLC7A9 μεταλλάξεις μόνο τον άγριου τύπου SLC7A9 SNPs απλότυπο αυξάνεται παράλληλα και ο συντονισμός (modularity) των δύο προαναφερθέντων διαδικασιών, προσαρμοστικότητα και εξελισιμότητα. Τα SNPs δεν εμπλέκονται με τις μεταλλάξεις



και για το λόγο αυτό οι μεταλλακτικού ή πολυμορφικού τύπου γενετικές αλλαγές “επιλέγονται” διαφορετικά και ανεξάρτητα από τις διαδικασίες της φυσικής επιλογής [150-152].

Όπως ανωτέρω αναφέρθηκε το γονίδιο SLC7A9 κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη που συγκεντρώνει σχεδόν αποκλειστικά τις καταλυτικές ιδιότητες του ετεροδιμερούς συμπλόκου rBAT/b^{0,+}AT. Μία γενετική αλλαγή στην αλληλουχία του SLC7A9 γονιδίου και ακολούθως στην κωδικοποιούσα πρωτεΐνη ίσως έχει σοβαρές επιπτώσεις στη λειτουργία του rBAT/b^{0,+}AT μεταφορέα. Στην περίπτωση του SLC7A9 γονιδίου κάθε γενετική αλλαγή μπορεί να είναι καθοριστική για τη λειτουργία του μεταφορέα και πρέπει ξέχωρα να επιλεγθεί τη στιγμή που εμφανίζεται. Οι γενετικές αλλαγές που δεν ευνοούν τη λειτουργία του ετεροδιμερούς μεταφορέα θα επιλεγθούν αρνητικά, ενώ αυτές που την ευνοούν ή είναι ουδέτερες προς αυτήν, θα επιλεγθούν θετικά. Οι γενετικές αλλαγές αναμένεται να πρωτοεμφανιστούν στον γονότυπο/απλότυπο με τη μεγαλύτερη συχνότητα, δηλαδή τον άγριο τύπο. Αφού απορριφθούν αυτές που δρουν αρνητικά στη λειτουργία του συμπλόκου rBAT/b^{0,+}AT, πιθανώς οδηγούμαστε σταδιακά στη συσσώρευση των ουδέτερων λειτουργικά πολυμορφισμών στο SLC7A9 γονίδιο με τη μορφή “clusters”. Η δράση, λοιπόν, τέτοιων εξελικτικών μηχανισμών στο SLC7A9 γονίδιο προσδίδουν τελικά προσαρμοστικό πλεονέκτημα στη λειτουργία του rBAT/b^{0,+}AT συμπλόκου και κατ’επέκταση του ανθρώπου.

Επιπλέον, μόνο ο ακραίος πολυμορφισμός I618M του SLC3A1 γονιδίου ήταν παρόν σε δύο ασθενείς (Cys 8, Cys 76) με SLC3A1 μεταλλάξεις. Το αυτό άλλωστε προαναφέρθηκε ότι ισχύει και στην περίπτωση του ασθενούς Cys 6, ο οποίος αν και έφερε SLC7A9 μεταλλάξεις, έφερε μόνο τον ακραίο 1365C>T SLC7A9 πολυμορφισμό. Αν και οι πολυμορφισμοί που έχουν περιγραφεί στο SLC3A1 είναι αριθμητικά συγκρίσιμοι με αυτούς του SLC7A9, δεν συνθέτουν “clusters”. Το



γονίδιο SLC3A1 φαίνεται να είναι πιο συντηρητικό στην συσσώρευση SNPs, γεγονός που πιθανώς δίδει το ίδιο προσαρμοστικό αποτέλεσμα στην λειτουργία του rBAT/b^{0,+}AT συμπλόκου, από πλευράς αυτήν την φορά της rBAT πρωτεΐνης.

στ) Οι SLC7A9 πολυμορφισμοί μέσα στους απλοτυπικούς συνδυασμούς

Ένα από τα σημαντικότερα ευρήματα της παρούσας μελέτης φαίνεται πως η έκφραση ή μη της κυστινουρίας, αλλά και η ετερογένεια με την οποία εκδηλώνεται, πιθανώς να εξαρτώνται από τα απλοτυπικά “clusters” των δύο αλληλομόρφων του γονιδίου SLC7A9 που αφορούν τους πολυμορφισμούς του. Βρέθηκε ότι το πλήθος των γενετικών αλλαγών μεταξύ των δύο SLC7A9 αλληλομόρφων οδηγεί σε μη ισοζυγισμένη έκφρασή τους.

Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι η συσσώρευση γενετικών αλλαγών στο ένα SLC7A9 αλληλόμορφο καταστέλλει την έκφρασή του και δίνει εκφραστικό πλεονέκτημα στο άλλο SLC7A9 αλληλόμορφο, ακόμη κι αν φέρει μετάλλαξη, αρκεί να φέρει λιγότερες συνολικά γενετικές αλλαγές. Ωστόσο, οι περιπτώσεις ετεροζυγωτίας που εκδηλώνονται φαινοτυπικά εμφανίζουν ήπια κλινικά συμπτώματα της νόσου, σε αντίθεση με τις περιπτώσεις ομοζυγωτίας αυτών των μεταλλάξεων (πίνακας 8). Στην παρούσα μελέτη όλοι οι ασθενείς που έφεραν δύο μεταλλάξεις στο SLC7A9 γονίδιο εκδήλωσαν την κυστινουρία με λίθους κυστίνης, ενώ κάποιοι είχαν ακόμη και μειωμένη νεφρική λειτουργία ή οδηγήθηκαν σε ετερόπλευρη νεφρεκτομή.

Το γονίδιο SLC7A9 φαίνεται πως εμφανίζει μη ισοζυγισμένη έκφραση των δύο αλληλομόρφων του, η οποία καθορίζεται από το απλοτυπικό πρότυπο των πολυμορφισμών τους. Έτσι θα λέγαμε ότι στην πραγματικότητα οι αλλαγές στην αλληλουχία των cis-ρυθμιστικών παραγόντων, επηρεάζουν την αλληλεπίδρασή τους με τους trans-ρυθμιστικούς παράγοντες, και κατ' επέκταση την μεταγραφή των



SLC7A9 αλληλομόρφων. Με άλλα λόγια, φαίνεται πως υπάρχει “δια-αλληλομορφική επίσταση” του πιο άγριου τύπου αλληλομόρφου του SLC7A9 γονιδίου, δηλαδή εκείνου με τις λιγότερες γενετικές αλλαγές, στην έκφραση του άλλου αλληλομόρφου του.

Η εκφραστική υπεροχή του SLC7A9 αλληλομόρφου με τις λιγότερες γενετικές αλλαγές φαίνεται να υποστηρίζεται και από τα δεδομένα της ανάλυσης για μεταγραφικούς παράγοντες κατά μήκος του γονιδίου στην 5'-ρυθμιστική του περιοχή, στα ιντρόνια και στο 3'- του άκρο. Καθώς το SLC7A9 γονίδιο έχει μία τάση να συσσωρεύει πολυμορφισμούς κατά μήκος της αλληλουχίας του, αυτές οι νουκλεοτιδικές αλλαγές ίσως να επηρεάζουν όχι μόνο την πρωτοταγή δομή των cis-ρυθμιστικών μεταγραφικών παραγόντων αλλά και την ανώτερη διαμόρφωση του SLC7A9 DNA, επιδρώντας με αυτόν τον τρόπο στην αναγνώριση και δέσμευσή των cis-ρυθμιστικών μεταγραφικών παραγόντων από τους trans-ρυθμιστικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Το τελικό αποτέλεσμα αυτών των αλλαγών φαίνεται πως είναι η μη-ισοζυγισμένη μεταγραφή των SLC7A9 αλληλομόρφων.

Ίσως για το λόγο αυτό κάποιοι ετεροζυγώτες κυστινουρικοί ασθενείς εκδηλώνουν τη νόσο ενώ κάποιοι άλλοι όχι. Επιπλέον, η αυτή αιτία πιθανώς εξηγεί γιατί κάποιοι AB κυστινουρικοί ασθενείς δεν υφίστανται διάγνωση και εμφανίζονται σε μικρό ποσοστό αν και τα γονίδια SLC3A1 και SLC7A9 έχουν παρόμοιο ποσοστό μεταλλάξεων [13]. Καθώς η εγκυρότητα της κατηγορίας των ασθενών AB τίθεται υπό αμφισβήτηση, επισημαίνεται η ανάγκη πιο εμπεριστατωμένης γενετικής κατάταξης των κυστινουρικών ασθενών.

Αντίθετα, η έκφραση μιας μετάλλαξης του SLC3A1 δεν επηρεάζεται όπως αναμένεται από την απόκλιση που μπορεί να έχουν οι άγριου τύπου απλότυποι των



δύο αλληλομόρφων του γονιδίου SLC7A9 (πίνακας 9). Όλοι οι ετεροζυγώτες για μία μετάλλαξη του SLC3A1 της παρούσας μελέτης ήταν αρνητικοί για την κυστινουρία.

Επιπλέον, η μητέρα (F18) ενός κυστινουρικού ασθενή που έφερε σε ετεροζυγωτία την μετάλλαξη N516D του SLC3A1 και σε ετεροζυγωτία την μετάλλαξη Y232C του SLC7A9 δεν έπασχε από κυστινουρία. Σε αυτήν την γυναίκα η μετάλλαξη Y232C βρίσκονταν σε σύνδεση με πολλούς πολυμορφισμούς και καθώς σύμφωνα με προαναφερθέν προτεινόμενο μοντέλο “δια-αλληλομορφικής επιστατικής” δράσης δόθηκε εκφραστική υπεροχή στο άλλο SLC7A9 αλληλόμορφο που έφερε τον άγριου τύπου SLC7A9 SNPs απλότυπο, η κυστινουρία τελικά δεν εκφράστηκε.

Η μετάλλαξη Y232C είναι μόλις 8^η στη φθίνουσα κλίμακα της ανομοιογένειας των 190 δυνατών συνδυασμών των υποκαταστάσεων μεταξύ των αμινοξέων [137]. Παρόλη τη φυσικοχημική της ετερογένεια και του προτεινόμενου ατελώς υπολειπόμενου/ ατελώς επικρατούντος τρόπου κληρονομιάς της (SLC7A9 γονίδιο) δεν εκφράστηκε. Η παρατήρηση αυτή φαίνεται να ενισχύει ακόμη περισσότερο το προτεινόμενο μοντέλο “δια-αλληλομορφικής επίστασης” στο SLC7A9 γονίδιο εν σχέση με αυτό του ατελώς υπολειπόμενου ή κατά άλλους συγγραφείς ατελώς επικρατούντος τρόπου κληρονομικότητας. Όμοια και η μητέρα F15 του κυστινουρικού ασθενούς Cys3, που φέρει σε ετεροζυγωτία τη SLC7A9 μετάλλαξη G105R (56^η στη φθίνουσα κλίμακα της ετερογένειας των μεταξύ των αμινοξέων υποκαταστάσεων) και σε ετεροζυγωτία την SLC3A1 μετάλλαξη F266S, δεν εκδήλωσε τη νόσο, λόγω της εκφραστικής υπεροχής του άλλου καθόλα άγριου τύπου SLC7A9 αλληλομόρφου της. Αυτές οι δύο περιπτώσεις των ατόμων (F18, F15) επισημαίνουν τη μη ορθότητα του τύπου AB της κυστινουρίας, καθώς η εκδήλωση ή μη του νοσήματος ελέγχεται από την έκφραση ή όχι του μεταλλαγμένου SLC7A9



αλληλομόρφου, η οποία καθορίζεται από τη μη ισοζυγισμένη μεταγραφή των δύο SLC7A9 αλληλομόρφων.

Ανάλογη περίπτωση επίδρασης απλοτύπων στην κλινική έκφραση της νόσου ισχύει και στην περίπτωση της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας. Τα διάφορα απλοτυπικά “clusters” των γονιδίων των σφαιρινών φαίνεται πως επηρεάζουν τα επίπεδα της HbF, τις αιματολογικές παραμέτρους και την κλινική εξέλιξη της νόσου [153]. Έτσι οι πολυμορφισμοί μεταξύ των γονιδίων οι οποίοι ευθύνονται για την πλειοτροπική τους δράση μπορεί να είναι ταυτόχρονα και επιστατικοί των γονιδίων, συνεισφέροντας στην φαινοτυπική ποικιλότητα που χαρακτηρίζει τους ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία. Όμοια, έχει βρεθεί ότι ο απλότυπος H και T του mtDNA (μιτοχονδριακό DNA) βρίσκεται σε σύνδεση με καταστάσεις νορμοζωοσπερμίας και ασθενοζωοσπερμίας, αντίστοιχα [154, 155]. Πιθανώς σε αυτές τις περιπτώσεις οι απλότυποι να λειτουργούν ως δείκτες οι οποίοι επηρεάζουν τη δράση διαφόρων trans-ρυθμιστικών παραγόντων της έκφρασης των γονιδίων.

Ένα από τα πλέον χαρακτηριστικά παραδείγματα μη ισοζυγισμένης έκφρασης των δύο αλληλομόρφων ενός γονιδίου είναι η περίπτωση της γονιδιακής αποτύπωσης (genomic imprinting) [156]. Πρόσφατα, έχουν δημοσιευθεί και άλλες περιπτώσεις γονιδίων με μη ισοζυγισμένη έκφραση των αλληλομόρφων τους που δεν αφορά τον κοινό μηχανισμό της μεθυλίωσης στην περίπτωση της γονιδιακής αποτύπωσης [157-160]. Μη ισοζυγισμένη έκφραση παρατηρήθηκε στο 18% των δύο αλληλομόρφων 129 γονιδίων που μελετήθηκαν στον άνθρωπο [160]. Βρέθηκε, επίσης, ότι συγκεκριμένα SNPs και απλοτύποι του γονιδίου BTN3A2 βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης με συγκεκριμένα αλληλόμορφα του, τα οποία είτε υπερεκφράζονται είτε η έκφραση αυτών καταστέλλεται [160]. Όλα τα παραπάνω συνηγορούν στην πεποίθηση ότι οι πολυμορφισμοί του ανθρώπινου γονιδιώματος και τα απλοτυπικά τους



“clusters”, ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση, και φαίνεται πως αποτελούν ίσως τη λύση στην κατανόηση πολλών ανθρώπινων κληρονομικών παθήσεων, μεταξύ των οποίων πιθανώς και της κυστινουρίας.

Τέλος, δεν αποκλείεται η πιθανότητα, οι SLC7A9 SNPs απλότυποι να επηρεάζουν την τελική φαινοτυπική έκφραση, όχι μόνο στην περίπτωση των μεταλλάξεων του SLC7A9 γονιδίου αλλά και στην περίπτωση που για την εμφάνιση της νόσου υπεύθυνες είναι δύο μεταλλάξεις του SLC3A1. Ίσως στους SLC7A9 SNPs απλοτύπους να έγκειται η απάντηση στο ερώτημα γιατί ασθενείς ή αδέρφια με τις ίδιες μεταλλάξεις στο SLC3A1 εμφανίζουν μεταξύ τους φαινοτυπικές αποκλίσεις. Εφόσον το απλοτυπικό πρότυπο των πολυμορφισμών του SLC7A9 επηρεάζει ποιο αλληλόμορφο θα εκφραστεί, ίσως αυτό να επηρεάζει την τελική λειτουργία της πρωτεΐνης $b^{0,+}AT$ όταν και τα δύο αλληλόμορφα αποκλίνουν από τον άγριου τύπου SLC7A9 SNPs απλότυπο (στο 40% των ασθενών της παρούσας μελέτης με SLC3A1 μεταλλάξεις). Όπως προαναφέρθη το γεγονός αυτό στη συνέχεια μπορεί να επηρεάζει την αλληλεπίδραση των $rBAT$ και $b^{0,+}AT$ υπομονάδων, τη λειτουργία του ετεροδιμερούς συμπλόκου $rBAT/b^{0,+}AT$ και τελικά την κλινική εκδήλωση της κυστινουρίας.

Γ. Η ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΩΝ ΚΥΣΤΙΝΟΥΡΙΚΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΚΥΣΤΙΝΗΣ ΣΤΑ ΟΥΡΑ

Ο υπάρχων τρόπος κατάταξης των κυστινουρικών ασθενών σύμφωνα με τα επίπεδα απέκκρισης της κυστίνης και των διβασικών αμινοξέων στα ούρα τους φαίνεται πως έχει μικρή αξία και ακρίβεια. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι η απέκκριση της κυστίνης μπορεί να δείχνει απόκλιση που ενδέχεται να οφείλεται: α) στις διαφορετικές διαιτολογικές προτιμήσεις μεταξύ των ατόμων καθώς είναι γνωστό



ότι τροφές πλούσιες σε μεθειονίνη όπως τα αυγά, τα αλίπαστα, το κρέας, τα πουλερικά και τα τυριά αυξάνουν την ημερήσια αποβολή σε κυστίνη, β) στα διαφορετικά επίπεδα πρόσληψης νατρίου που είναι επίσης γνωστό ότι επηρεάζουν την απέκκριση της κυστίνης, γ) στα διαφορετικά επίπεδα κατανάλωσης υγρών που επηρεάζουν τα επίπεδα διάλυσης της κυστίνης στα ούρα, δ) στην παρουσία σουλφυδρυλικών ομάδων στα ούρα λόγω κάποιας θεραπείας (π.χ. a-mercaptopropionylglycine, D-penicillamine) και στην αιματουρία, τα οποία μπορούν να επηρεάσουν το τελικό χρωματικό πρότυπο σε περίπτωση ελέγχου των επιπέδων της κυστίνης στα ούρα με το Urocystin kit, αν δεν ληφθούν τα κατάλληλα μέτρα προφύλαξης. Επίσης, τα επίπεδα και των άλλων αμινοξέων στα ούρα ή κάποιο άλλο βιολογικό υγρό π.χ. αίμα, ενδεχομένως να επηρεάζονται από τις διατροφολογικές προτιμήσεις και την ημερήσια πρόσληψη σε υγρά, αφού διαμορφώνουν την τελική τους συγκέντρωση στα εξεταζόμενα δείγματα, επηρεάζοντας με αυτόν τον τρόπο την αντικειμενικότητα των μετρήσεων και την ταξινόμηση των κυστινουρικών ατόμων η οποία φαίνεται να βρίσκεται μόνο στην γενετική βάση της νόσου.

Δ. Η ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΩΝ ΚΥΣΤΙΝΟΥΡΙΚΩΝ ΑΤΟΜΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η ταξινόμηση που προτείνεται παίρνοντας υπόψη όλα τα προαναφερθέντα γενετικά και κλινικά δεδομένα είναι η ακόλουθη (το "Α" αντιστοιχεί στο γονίδιο SLC3A1, το "Β" στο γονίδιο SLC7A9, και οι δείκτες δίπλα στο "Α" και "Β" στον αριθμό των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων κάθε γονιδίου, εικόνα 33):



I. Έκφραση της κυστινουρίας

1. Τύποι A_2B_0 και A_2B_1 : Η κυστινουρία προκαλείται από δύο μεταλλάξεις του SLC3A1. Τα αλληλόμορφα του SLC7A9 πιθανώς να φέρουν μη-άγριου τύπου πολυμορφισμούς (SNPs) (B_0), οπότε η απλοτυπική τους σύνθεση αναμένεται να επηρεάσει το ποιο SLC7A9 αλληλόμορφο θα μεταγραφεί επιδρώντας κατά αυτόν τον τρόπο στον τελικό φαινότυπο. Επιπλέον, εάν υπάρχει ένα μεταλλαγμένο SLC7A9 αλληλόμορφο (B_1), η πιθανή μεταγραφή του θα επηρεάσει επιπλέον την κλινική εικόνα της νόσου. Η μεταγραφή του μεταλλαγμένου SLC7A9 αλληλομόρφου επίσης εξαρτάται από τη μη ισοζυγισμένη έκφραση των δύο SLC7A9 αλληλομόρφων, η οποία εξαρτάται από το συνολικό αριθμό των γενετικών αλλαγών τις οποίες φέρουν, και δρα υπέρ εκείνου του αλληλομόρφου που έχει τις λιγότερες γενετικές αλλαγές.

2. Τύποι A_0B_2 και A_1B_2 : Η κυστινουρία προκαλείται από δύο μεταλλάξεις του SLC7A9 ανεξαρτήτως από την παρουσία (A_1) ή μη (A_0) ενός μεταλλαγμένου SLC3A1 αλληλομόρφου. Οι μεταλλάξεις του SLC7A9 γονιδίου βρίσκονται κυρίως σε σύνδεση με τον άγριου τύπου SLC7A9 SNPs απλότυπο. Στις πολύ σπάνιες περιπτώσεις μη σύνδεσής τους με τον άγριου τύπου SLC7A9 SNPs απλότυπο, η βαρύτητα στην κλινική έκφραση της νόσου πιθανώς να καθορίζεται από το ποιο SLC7A9 μεταλλαγμένο αλληλόμορφο θα εκφραστεί (λόγω της μη ισοζυγισμένης έκφρασης των δύο SLC7A9 αλληλομόρφων εξαιτίας της παρουσίας σε κάποιο από αυτά ή και στα δύο μη-άγριου τύπου πολυμορφισμών) σε συνδυασμό με τη μετάλλαξη την οποία φέρει.

3) Τύπος A_2B_2 : Η κυστινουρία προκαλείται από μεταλλάξεις και στα δύο αλληλόμορφα και των δύο γονιδίων, SLC3A1 και SLC7A9. Αναμφίβολα, η κυστινουρία εκδηλώνεται, αλλά απαιτούνται περισσότερες μελέτες προκειμένου να



διαπιστωθεί η συμβατότητα αυτής της κατάστασης με τη ζωή καθώς δεν έχουν περιγραφεί τέτοιες περιπτώσεις ασθενών στη διεθνή βιβλιογραφία.

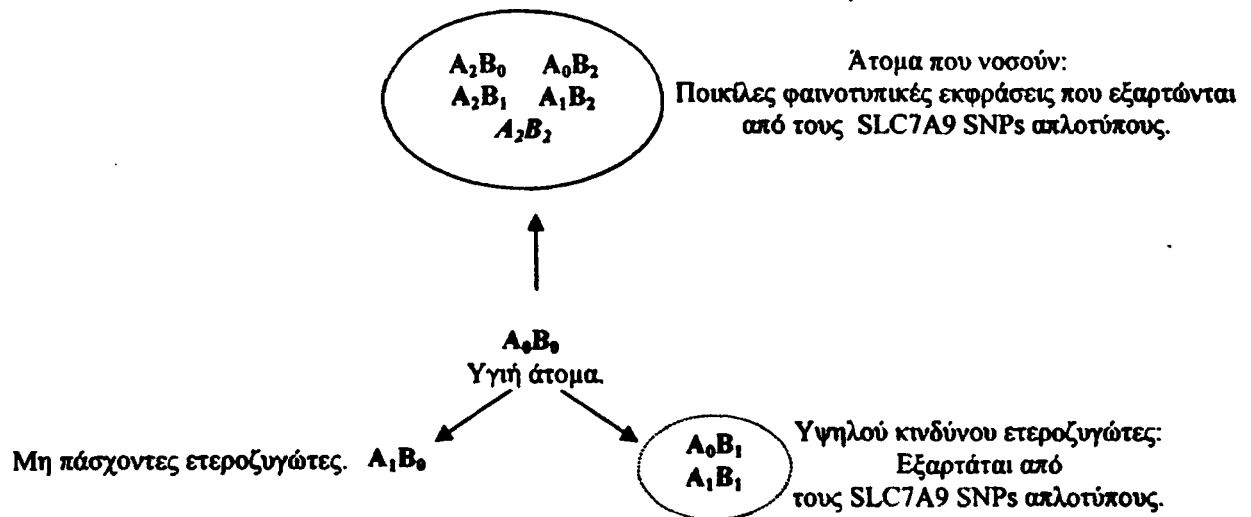
II. Ετεροζυγώτες για μία μετάλλαξη του SLC3A1 και/ ή μία μετάλλαξη του SLC7A9 γονιδίου.

1. Τύπος A_1B_0 : Μία μετάλλαξη του SLC3A1 και μη μεταλλαγμένα SLC7A9 αλληλόμορφα. Μη έκφραση της κυστινουρίας ανεξάρτητα από τους SLC7A9 SNPs απλοτύπους.

2) Τύποι A_0B_1 και A_1B_1 : Τα άτομα έχουν ένα μεταλλαγμένο SLC7A9 αλληλόμορφο και ταυτόχρονα την παρουσία (A_1) ή μη (A_0) ενός μεταλλαγμένου SLC3A1 αλληλομόρφου. Το μεταλλαγμένο SLC7A9 αλληλόμορφο αναμένεται να φέρει τον άγριου τύπου SLC7A9 SNPs απλότυπο, ενώ το άλλο μη μεταλλαγμένο SLC7A9 αλληλόμορφο πιθανώς να έχει μη-άγριου τύπου πολυμορφισμούς. Το SLC7A9 αλληλόμορφο με τις λιγότερες γενετικές αλλαγές πιθανότατα μεταγράφεται. Αν αυτό τυγχάνει να είναι το μεταλλαγμένο SLC7A9 αλληλόμορφο τότε η κυστινουρία εκφράζεται.

Τέλος, στην τελική φαινοτυπική έκφραση της νόσου πρέπει επίσης να ληφθούν υπόψη πέραν των ιδιαιτεροτήτων καθεμιάς εκ των προαναφερθείσων κατηγοριών, ο ρόλος: α) των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών κάθε μετάλλαξης και του γονιδίου στο οποίο ανήκει, β) των ανατομικών και παθοφυσιολογικών ιδιαιτεροτήτων του ατόμου, γ) των διαιτολογικών του προτιμήσεων, και δ) της προτεινόμενης φαρμακευτικής αγωγής και της συμμόρφωσης σύμφωνα με αυτήν από τον εκάστοτε κυστινουρικό ή με προδιάθεση κυστινουρικό ασθενή (περιπτώσεις SLC7A9 ετεροζυγωτών).





Εικόνα 33: Ο αλγόριθμος της κατάταξης των κυστινουρικών ασθενών. Το “A” αντιστοιχεί στο SLC3A1 γονίδιο και το “B” αντιστοιχεί στο SLC7A9 γονίδιο. Οι δείκτες δίπλα στα “A” and “B” δείχνουν τον αριθμό των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων κάθε γονιδίου (0, 1, or 2). Οι τύποι εκτός κύκλων δεν προκαλούν κυστινουρία, οι τύποι εντός του διακεκομμένου κύκλου ίσως προκαλέσουν κυστινουρία το οποίο εξαρτάται από το SLC7A9 SNPs απλοτυπικό “background”, και οι τύποι εντός του κύκλου θα προκαλέσουν κυστινουρία της οποίας η φαινοτυπική ποικιλότητα επίσης εξαρτάται από το SLC7A9 SNPs απλοτυπικό “background”. Ο τύπος με πλάγιο γραφικό χαρακτήρα δεν έχει περιγραφεί μέχρι σήμερα στη διεθνή βιβλιογραφία και για το λόγο αυτό πιθανώς να μην είναι συμβατός με τη ζωή.

E. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Αυτή η ταξινόμηση των κυστινουρικών ασθενών εξηγεί αντικειμενικά την φαινοτυπική ποικιλότητα με γενετικά κριτήρια και αντιπροσωπεύει την πρώτη λεπτομερή και αμερόληπτη προσέγγιση της γενετικής ετερογένειας και πολυπλοκότητας της νόσου. Το rBAT/b⁰⁺AT σύμπλοκο εκφράζεται κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα των εγγύς νεφρικών σωληναρίων, του λεπτού εντέρου, του ήπατος, του παγκρέατος και του εγκεφάλου. Σε αυτούς τους κυτταρικούς τύπους είναι δύσκολη η δημιουργία κυτταρικών σειρών, πέραν του γεγονότος ότι στις κυτταρικές



σειρές οι γονιδιακές αλληλουχίες που εισάγονται μελετούνται εκτός της φυσιολογικής χρωματοσωματικής τους θέσης [160]. Για το λόγο αυτό η παρούσα μελέτη αποτελεί άμεση *in vivo* επιβεβαίωση της μη ισοζυγισμένης μεταγραφής των SLC7A9 αλληλομόρφων που πιθανά σχετίζεται με τις παρατηρούμενες φαινοτυπικές διαφορές στην έκφραση της κυστινουρίας.

Αυτή η σχέση μεταξύ του απλοτυπικού “background” και ποιου αλληλομόρφου εκφράζεται αποκλειστικά ή κυρίως στα ετερόζυγα άτομα, (“gene dosage effect”) ίσως να ισχύει και σε κάποια άλλα από τα 298 γονίδια των 43 SLC-οικογενειών [161]. Προσφάτως δημοσιεύθηκε ότι οι ετεροζυγώτες των SLC26A5 μεταλλάξεων δείχνουν φαινοτυπική ποικιλότητα στο βαθμό απώλειας της ακοής τους, ενώ οι ετεροζυγώτες των SLC22A12 μεταλλάξεων παρουσιάζουν “gene dosage effect” που αντανακλά σε διαφορετικά επίπεδα ουρικού οξέος στον ορό του αίματός τους [162, 163].

Ωστόσο, για την επιβεβαίωση του “gene dosage effect” χρειάζονται περισσότερες *in vivo*, *ex vivo* και genetic association μελέτες. Μελέτες έκφρασης διαφόρων συνδυασμών των πολυμορφισμών σε πειραματικά μοντέλα ζώων ίσως βοηθήσουν στην διάκριση εκείνων των πολυμορφισμών που συμβάλλουν περισσότερο στην πολυπλοκότητα της νόσου [164, 165]. Ο συγκεκριμένος τύπος κάθε μετάλλαξης επηρεάζει επιπλέον την τελική φαινοτυπική έκφραση της κυστινουρίας σε συνδυασμό με διαφόρους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Παρόλα αυτά η ακριβής ταξινόμηση των κυστινουρικών ασθενών παραμένει το πρώτο και καθοριστικό βήμα για την σωστή ιατρική προσέγγιση κάθε κυστινουρικού ασθενή μεμονωμένα. Άλλωστε, το γονιδιακό αποτύπωμα του SLC7A9 γονιδίου κάθε ασθενούς πιθανώς να επηρεάζει την έκφραση ή μη του νοσήματος, αλλά και τη βαρύτητα με την οποία θα το εκδηλώσει.



Επιπλέον, η μελέτη των πολυμορφισμών δίνει τη δυνατότητα προεμφυτευτικής ή προγενετικής διάγνωσης, ιδιαίτερα σε εκείνες τις περιπτώσεις που δεν βρίσκεται κάποια μετάλλαξη/ μεταλλάξεις που να δικαιολογούν την παρουσία της κυστινουρίας.

Τέλος, προκύπτει γενικότερα το συμπέρασμα ότι η μοριακή και γενετική ανάλυση της κυστινουρίας γίνεται ολοένα και πιο σημαντική [166]. Ήδη επισημάνθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή ότι οι μεταλλάξεις και οι πολυμορφισμοί βρίσκονται κάτω από διαφορετική πίεση φυσικής επιλογής. Η διαδικασία αυτή διατηρεί τους πολυμορφισμούς του SLC7A9 γονιδίου σε “clusters”, ξέχωρους των μεταλλάξεων. Το γεγονός αυτό επισημαίνει τη σημασία να προσδιοριστούν όλες οι γενετικές αλλαγές των γονιδίων που εμπλέκονται στην κυστινουρία και να κατανοηθούν οι μηχανισμοί δράσης τους. Η μη ισοζυγισμένη έκφραση των SLC7A9 αλληλομόρφων πιθανώς να οφείλεται στις αλλαγές της αλληλουχίας των cis-ρυθμιστικών παραγόντων που επηρεάζουν την αλληλεπίδρασή τους με τους trans-ρυθμιστικούς παράγοντες και κατ' επέκταση την έκφραση των SLC7A9 αλληλομόρφων. Σε μια τέτοια περίπτωση ενδέχεται και μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν για τους trans-ρυθμιστικούς παράγοντες να ευθύνονται για την πρόκληση της νόσου και να ερμηνεύουν εκείνες τις περιπτώσεις ασθενών στους οποίους δε βρέθηκαν μεταλλάξεις στα κυστινουρικά γονίδια. Οι νέες μοριακές τεχνικές των DNA-μικροσυστοιχιών ή DNA-chips δίνουν τη δυνατότητα γρήγορου και αξιόπιστου προσδιορισμού των γενετικών αλλαγών και των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων. Αν λάβουμε υπόψη μας ότι το γενετικό αποτύπωμα κάθε ασθενούς επηρεάζει την απόκρισή του στα φάρμακα, ο προσδιορισμός του γενετικού του προφίλ ίσως τελικά να οδηγήσει σύντομα στην εξατομικευμένη ιατρική αντιμετώπιση της κυστινουρίας.



Άλλωστε, η μοριακή γνώση της λειτουργίας των μεταφορέων των SLC-οικογενειών ήδη χρησιμοποιείται στην παραγωγή διαφόρων φαρμακευτικών σκευασμάτων [161]. Οι μεταφορείς από μόνοι τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε ως στόχοι δράσης των φαρμάκων είτε οι ίδιοι ως μέσα μεταφοράς του φαρμάκου στη θέση-στόχο. Προσφάτως φαρμακευτικούς στόχους αποτελούν οι μεταφορείς της γλυκόζης (SLC5), οι μεταφορείς των νευροδιαβιβαστών (SLC10), οι μεταφορείς των κατιόντων Cl^- (SLC12), ενώ ως συστήματα διανομής του φαρμάκου στη θέση-στόχο έχουν χρησιμοποιηθεί ο εντερικός ολιγοπεπτιδικός μεταφορέας PepT1 (SLC15A1) και οι μεταφορείς του αιματο-εγκεφαλικού φραγμού (ποικίλες SLC οικογένειες). Ανάλογα μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η γνώση της μοριακής μελέτης των μεταφορέων SLC3A1 και SLC7A9. Ο προσδιορισμός των μεταλλάξεων και πολυμορφισμών τους στην περίπτωση της κυστινουρίας αποτελεί το πρώτο και καθοριστικό βήμα στην κατανόηση του τρόπου δράσης και περαιτέρω φαρμακευτικής αξιοποίησής του.



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η γενετική βάση της κυστινουρίας στους Έλληνες ασθενείς παρουσιάζει ετερογένεια αφού ποικίλες μεταλλάξεις ερμηνεύουν τη νόσο. Τα δύο κυστινουρικά γονίδια συμβάλλουν ισότιμα στη γενετική ερμημεία της νόσου. Συγκεκριμένα βρέθηκαν 8 μεταλλάξεις στο SLC3A1 γονίδιο (T216M, F266S, R270X, T351I, R365L, R456C, M467T και N516D) και 7 μεταλλάξεις στο SLC7A9 γονίδιο (G105R, 479-1G>C, Y232C, D233E, R333W, S379R και 1399+1G>T). Οι μεταλλάξεις G105R, T216M, και M467T ευθύνονται για την πρόκληση της νόσου στο 70% των ασθενών, 50% με την ομοζυγωτία τους και 20% με την ετεροζυγωτία τους.

Στο γονίδιο SLC7A10 δεν ανιχνεύθηκαν καθόλου μεταλλάξεις. Επιπλέον, βρέθηκαν συνολικά 20 πολυμορφισμοί και στα τρία γονίδια: 16 στο SLC7A9, 2 στο SLC3A1, και 2 στο SLC7A10.

Οι μεταλλάξεις του SLC7A9 γονιδίου ήταν στο 100% των ασθενών σε σύνδεση με τον άγριου τύπου SLC7A9 SNPs γονότυπο/ απλότυπο όσον αφορά τις πολυμορφικές του θέσεις. Το ποσοστό αυτό γίνεται 90% αν συμπεριληφθεί στον SLC7A9 SNPs γονότυπο ο ακραίος πολυμορφισμός 1365C>T. Επομένως, η στατιστικά σημαντική ανισορροπία σύνδεσης μεταξύ των άγριων τύπων αλληλομόρφων κάποιων σημειακών πολυμορφισμών του SLC7A9 γονιδίου (i) 1-39C>T με 235+18C>A, 235+22T>G, 411T>C, 478+10T>C, και 604+10G>A; ii) 235+22T>G με 478+10T>C, και 977+51A>G; iii) 478+10T>C με 235+22T>G, 977+51A>G, και 1143C>T, iv) 977+51A>G με 235+22T>G, και 478+10T>C, v) 1143C>T με 478+10T>C,) μπορεί να κατευθύνει τις γενετικές αναλύσεις στις κωδικοποιούσες ή μη-κωδικοποιούσες περιοχές ενός εκ των δύο γονιδίων.



Τέλος, προτείνεται ένας νέος τρόπος κατάταξης των κύστινουρικών ασθενών βάσει των απλοτυπικών τους δεδομένων για τις αλληλουχίες των αλληλομόρφων του SLC7A9 γονιδίου. Φαίνεται πως ισχύει ένα μοντέλο “δια-αλληλομορφικής επίστασης” στην έκφραση των δύο αλληλομόρφων του SLC7A9 γονιδίου. Το αλληλόμορφο με τις λιγότερες γενετικές αλλαγές (μεταλλάξεις και πολυμορφισμούς) φαίνεται να υπερέχει εκφραστικά σε σχέση με το άλλο αλληλόμορφο όταν παρεκκλίνει σε περισσότερες θέσεις. Αυτό κρίνεται μεγίστης σημασίας και σπουδαιότητας, καθώς δίδει την δυνατότητα στον ερευνητή της πρόβλεψης, της προδιάθεσης και τελικά της κλινικής έκφρασης της νόσου, της βαρύτητας με την οποία θα εκδηλωθεί αυτή και κατ’ επέκταση της αποτελεσματικής αντιμετώπισής της σε κάθε ασθενή μεμονωμένα, ανάλογα με το γενετικό του αποτύπωμα.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι λίθοι κυστίνης αντιστοιχούν στο 3% των νεφρολιθιάσεων του ανθρώπου και έχει γενική συχνότητα εμφάνισης 1 στα 7.000 νεογέννητα. Στη διεθνή βιβλιογραφία, δύο γονίδια έχουν περιγραφεί ως τα κύρια υπεύθυνα για την πρόκληση της νόσου, το SLC3A1 (2p21) και το SLC7A9 (19q13). Πρόσφατα πιθανολογείται και ένα τρίτο γονίδιο, το SLC7A10 (19q13.1), αλλά χρειάζονται περισσότερες μελέτες ώστε να επιβεβαιωθεί η εμπλοκή του στη γενετική βάση της νόσου. Μέχρι σήμερα, 64 μεταλλάξεις είχαν ανιχνευθεί στο SLC3A1 γονίδιο, οι οποίες ακολουθούν υπολειπόμενο αυτοσωματικό τρόπο κληρονομής. Επιπλέον, έχουν περιγραφεί και 49 μεταλλάξεις στο SLC7A9 γονίδιο, οι οποίες προτάθηκε ότι ακολουθούν ατελώς υπολειπόμενο/ ατελώς επικρατούντα τρόπο κληρονομής. Τέλος, η πλειοψηφία των σημειακών πολυμορφισμών (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) που έχουν περιγραφεί αφορούν στο γονίδιο SLC7A9, 10 στο SLC3A1 και 15 στο SLC7A9, αντίστοιχα.

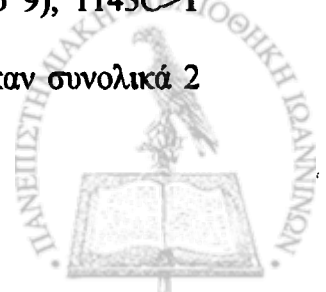
Στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκαν 15 μεταλλάξεις σε 20 Έλληνες κυστινουρικούς ασθενείς που μελετήθηκαν και οι οποίοι προέρχονται από διάφορα γεωγραφικά διαμερίσματα της Ελλάδας. Οκτώ από τις οποίες περιγράφονται για πρώτη φορά, 4 στο SLC3A1 γονίδιο και 4 στο SLC7A9. Οι νεοπεριγραφόμενες μεταλλάξεις στο SLC3A1 είναι οι: F266S (εξώνιο 4), T351I (εξώνιο 6), R456C (εξώνιο 8), και N516D (εξώνιο 9), ενώ στο SLC7A9 γονίδιο είναι οι: 479-1G>C (3'-άκρο ιντρονίου 4), Y232C (εξώνιο 6), D233E (εξώνιο 6), και 1399+1G>T (5'-άκρο ιντρονίου 12). Επίσης, βρέθηκαν και οι ακόλουθες μεταλλάξεις T216M (εξώνιο 3), R270X (εξώνιο 4), R365L (εξώνιο 6), και M467T (εξώνιο 8) στο SLC3A1, καθώς και



οι G105R (εξώνιο 4), R333W (εξώνιο 10), και S379R (εξώνιο 11) στο SLC7A9. Στο γονίδιο SLC7A10 δεν ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις.

Η μετάλλαξη G105R στο εξώνιο 4 του SLC7A9 είναι η συχνότερη στον ελληνικό πληθυσμό. Βρέθηκε σε ποσοστό 25% σε ομοζυγωτία και σε ετεροζυγωτία στο 5% των ασθενών. Η δεύτερη σε συχνότητα μετάλλαξη είναι η T216M στο εξώνιο 3 του SLC3A1. Ανιχνεύθηκε σε ομοζυγωτία στο 20% των ασθενών και σε ετεροζυγωτία στο 5% αυτών. Η αποκαλούμενη “μεσογειακή μετάλλαξη” M467T στο εξώνιο 8 του SLC3A1 βρέθηκε σε ομοζυγωτία στο 5% των ασθενών και σε ετεροζυγωτία στο 10%. Οι τρεις προαναφερθείσες μεταλλάξεις με την ομοζυγωτία τους αποτελούν τη γενετική βάση του νοσήματος στο 50% των Ελλήνων κυστινουρικών ασθενών. Στο υπόλοιπο 50% των ασθενών, η σύνθετη ετεροζυγωτία των προαναφερθέντων τριών μεταλλάξεων καθώς και η ομοζυγωτία ή σύνθετη ετεροζυγωτία 12 άλλων μεταλλάξεων των SLC3A1 και SLC7A9 γονιδίων, συμβάλλουν στη γενετική βάση του νοσήματος. Φαίνεται πως και τα δύο γονίδια, SLC3A1 και SLC7A9, συμβάλλουν ισότιμα στην γενετική ερμηνεία της κυστινουρίας στον ελληνικό πληθυσμό, χωρίς έκαστη των μεταλλάξεων να επικρατεί έναντι των άλλων και να συνδέεται με συγκεκριμένη περιοχή της Ελλάδας.

Επιπλέον, προσδιορίστηκαν και 4 νέοι πολυμορφισμοί: 3 στο SLC7A9 και 1 στο SLC7A10. Οι νεοπεριγραφόμενοι πολυμορφισμοί στο SLC7A9 γονίδιο είναι οι 235+18C>A (ιντρόνιο 3), 604+10G>A (ιντρόνιο 5), και 604+24T>C (ιντρόνιο 5), ενώ ανιχνεύθηκαν επίσης και 13 γνωστά SNPs, τα 1-39C>T (5'-ρυθμιστικό άκρο), 235+22T>G (ιντρόνιο 3), 399C>T (εξώνιο 4), 411T>C (εξώνιο 4), 425T>C (V142A, εξώνιο 4), 478+10T>C (ιντρόνιο 4), 507C>T (εξώνιο 5), 667C>A (L223M, εξώνιο 6), 687C>T (εξώνιο 6), 972G>A (εξώνιο 9), 977+51A>G (ιντρόνιο 9), 1143C>T (εξώνιο 11), και 1365C>T (εξώνιο 12). Στο γονίδιο SLC3A1 βρέθηκαν συνολικά 2



SNPs, ο 1035G>A (εξώνιο 6) και ο 1854A>G (I618M, εξώνιο 10). Τέλος, στο γονίδιο SLC7A10 ανιχνεύθηκαν 2 πολυμορφισμοί, ο νεοπεριγραφόμενος 634+8C>G (ιντρόνιο 4) και ο γνωστός πολυμορφισμός 913-11C>T (ιντρόνιο 6).

Οι μεταλλάξεις του SLC7A9 γονιδίου ήταν στο 100% των ασθενών σε σύνδεση με τον άγριου τύπου SLC7A9 SNPs γονότυπο/ απλότυπο όσον αφορά τις πολυμορφικές του θέσεις (90% αν συμπεριληφθεί στον γονότυπο/ απλότυπο ο ακραίος πολυμορφισμός 1365C>T). Αντίθετα, όπως άλλωστε και αναμένεται, οι ετερόζυγοι ή ομόζυγοι κυστινουρικοί ασθενείς με μεταλλάξεις στο SLC3A1 γονίδιο έφεραν SLC7A9 SNPs γονοτύπους που παρέκκλιναν από τον άγριου τύπου SLC7A9 SNPs γονότυπο σε ποσοστό 60%. Προτείνεται, λοιπόν, ότι το γενετικό background του SLC7A9 γονιδίου μπορεί να κατευθύνει τις γενετικές αναλύσεις στις κωδικοποιούσες ή μη-κωδικοποιούσες περιοχές ενός εκ των δύο γονιδίων. Για το λόγο αυτό θα μπορούσε να ελέγχεται η στατιστικά σημαντική ανισορροπία σύνδεσης των άγριων τύπων αλληλομόρφων των εξής SLC7A9 πολυμορφικών θέσεων: α) 1-39C>T με 235+18C>A, 235+22T>G, 411T>C, 478+10T>C, και 604+10G>A; β) 235+22T>G με 478+10T>C, και 977+51A>G; γ) 478+10T>C με 235+22T>G, 977+51A>G, και 1143C>T, δ) 977+51A>G με 235+22T>G, και 478+10T>C, ε) 1143C>T με 478+10T>C, καθώς παρατηρήθηκε μόνο στην ομάδα των ασθενών.

Τέλος, από τα απλοτυπικά δεδομένα των αλληλουχιών των αλληλομόρφων του SLC7A9 γονιδίου, φαίνεται πως ισχύει ένα μοντέλο “δια-αλληλομορφικής επίστασης” στην έκφρασή τους. Το αλληλόμορφο με τις λιγότερες γενετικές αλλαγές (μεταλλάξεις και πολυμορφισμούς) φαίνεται να υπερέχει εκφραστικά σε σχέση με το άλλο αλληλόμορφο όταν παρεκκλίνει σε περισσότερες θέσεις. Έτσι θα λέγαμε ότι στην πραγματικότητα οι αλλαγές στην αλληλουχία των cis-ρυθμιστικών μεταγραφικών παραγόντων επηρεάζουν την αλληλεπίδρασή τους με τους trans-



ρυθμιστικούς μεταγραφικούς παράγοντες και κατ' επέκταση την έκφραση των SLC7A9 αλληλομόρφων. Βάσει αυτού προτείνεται ένας νέος τρόπος ταξινόμησης των κυστινουρικών ασθενών, που κάνει χρήση των δεδομένων των μεταλλάξεων και του γονιδιακού αποτυπώματος κάθε ασθενή μεμονωμένα. Ο τρόπος αυτός κατάταξης των κυστινουρικών ασθενών ίσως φανεί τελικά χρήσιμος στην πρόβλεψη της βαρύτητας των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών με την οποία θα εκδηλωθεί η κυστινουρία και στην θεραπευτική αγωγή που πρέπει να χορηγηθεί σε κάθε ασθενή μεμονωμένα.

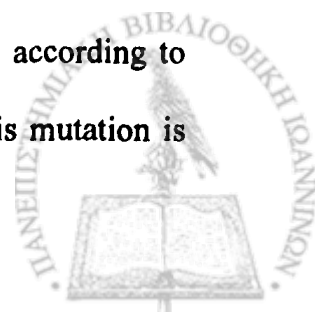


SUMMARY

Cystine stones represents 3% of nephrolithiasis in humans with an overall prevalence of 1/7,000 neonates. Two genes have been reported, so far, to represent the genetic basis of cystinuria, the SLC3A1 (2p21) and the SLC7A9 (19q13). Recently, another gene is suggested to cause cystinuria, the SLC7A10 (19q13.1), but more studies are needed to confirm its involvement. Sixty-four mutations have been identified in the SLC3A1 which are inherited in a fully recessive manner, whereas the 49 mutations described in the SLC7A9 seems to follow an incomplete recessive/incomplete dominant mode of inheritance. The majority of identified single nucleotide polymorphisms (SNPs) described in both genes concern the SLC7A9, 10 in the SLC3A1 and 15 in the SLC7A9; respectively.

In the present study we identified in total 15 mutations in 20 Greek cystinuric patients, originating from distant areas. Eight mutations are novel, 4 in the SLC3A1 and 4 in the SLC7A9. The novel mutations in the SLC3A1 gene are the F266S (exon 4), T351I (exon 6), R456C (exon 8), and N516D (exon 9), while the newly described mutations in the SLC7A9 gene are the 479-1G>C (3'-splice junction of intron 4), Y232C (exon 6), D233E (exon 6), and 1399+1G>T (5'-splice junction of intron 12). The previously identified mutations which also found to contribute to the genetic basis of cystinuria in Greek patients are the T216M (exon 3), R270X (exon 4), R365L (exon 6), and M467T (exon 8) in the SLC3A1 gene, as well as the G105R (exon 4), R333W (exon 10), and S379R (exon 11) in the SLC7A9 gene. No mutations were found in the SLC7A10 gene.

The most common mutation G105R (exon 4) in SLC7A9 gene according to the literature is also the most frequent mutation in our population. This mutation is



present in homozygosity in 25% of our patients and in heterozygosity in 5%. The second more frequent mutation is the T216M in exon 3 of the SLC3A1. This was identified in homozygosity in 20% of the patients and in heterozygosity in 5%. The Mediterranean-specific M467T mutation in exon 8 of the SLC3A1 was found in homozygosity in 5% of our patients and in heterozygosity in 10%. These 3 mutations contribute to disease's aetiology by their homozygosity in 50% of Greek patients. For the remaining 50% of Greek cystinuric patients, the compound heterozygosity of the above three mutations or the homozygosity or heterozygosity of 12 other mutations in both SLC3A1 and SLC7A9 genes contribute to the genetic basis of the disease. Both genes are equally involved in the pathogenesis of cystinuria and no mutation was found to be strictly related to a particular area in Greece.

Furthermore, we identified 4 novel polymorphisms: 3 in SLC7A9 and 1 in SLC7A10. The newly described polymorphisms in SLC7A9 gene are the 235+18C>A (intron 3), 604+10G>A (intron 5), 604+24T>C (intron 5), while there was also found the previously reported 13 SNPs: 1-39C>T (5'-regulatory site), 235+22T>G (intron 3), 399C>T (exon 4), 411T>C (exon 4), 425T>C (V142A, exon 4), 478+10T>C (intron 4), 507C>T (exon 5), 667C>A (L223M, exon 6), 687C>T (exon 6), 972G>A (exon 9), 977+51A>G (intron 9), 1143C>T (exon 11), and 1365C>T (exon 12). In total 2 SNPs were found in SLC3A1 gene, the 1035G>A in exon 6 and the 1854A>G (I618M) in exon 10. Finally, 2 polymorphisms were also found in the SLC7A10 gene, the novel 634+8C>G (intron 4) and the known 913-11C>T (intron 6).

The identified SLC7A9 mutations were in 100% of the patients in linkage with the wild type SLC7A9 SNPs genotype/ haplotype (the respective percent was 90% if the 1365C>T polymorphism was also included into the SLC7A9 SNPs genotype/ haplotype). In contrast, only the 40% of the patients who were compound



heterozygous or homozygous for two SLC3A1 mutations carried the wild type SLC7A9 SNPs haplotype. Therefore, it is proposed that the analysis of the SLC7A9 SNPs genotypic background might be able to be used as an evidence for a selective mutation analysis in the coding or non-coding regions of one of the two cystinuria genes. Specifically, we suggest the study of the linkage disequilibrium between the following wild type SLC7A9 SNPs: a) 1-39C>T with 235+18C>A, 235+22T>G, 411T>C, 478+10T>C, and 604+10G>A; b) 235+22T>G with 478+10T>C, and 977+51A>G; c) 478+10T>C with 235+22T>G, 977+51A>G, and 1143C>T, d) 977+51A>G with 235+22T>G, and 478+10T>C, e) 1143C>T with 478+10T>C. This choice results from the fact that the above cases of statistical significant linkage disequilibrium among the polymorphic loci were observed only in patient group.

As far as the respective haplotypic backgrounds of SLC7A9 alleles are concerned, they suggest an "inter-allelic epistasis" mode of inheritance between the two SLC7A9 alleles. The allele with the fewer genetic changes is preferred to be expressed, when the other SLC7A9 allele has more sites diverging from the wild type SLC7A9 sequence. It is suggested that changes in the sequences of cis-acting transcription factors affect their recognition by the trans-acting factors which eventually leads to imbalance in the transcription of the two SLC7A9 alleles. This fact has led to a new suggestion for cystinuric patient classification based on molecular genetic criteria.

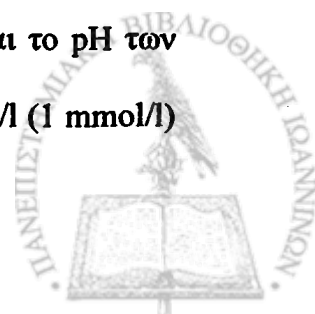


ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

A. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΚΥΣΤΙΝΟΥΡΙΑ

Η ελλιπής νεφρική επαναρρόφηση και η εντερική απορρόφηση της κυστίνης και των άλλων διβασικών αμινοξέων στα κυστινουρικά άτομα φαίνονται στις εικόνες 34, 35 [167]. Στα φυσιολογικά άτομα η κυστίνη και τα διβασικά αμινοξέα ορνιθίνη, λυσίνη και αργινίνη επαναρροφούνται σε ποσοστό 99-100% μέσω της σωληναριακής επαναρρόφησης των νεφρώνων. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι τα βρέφη καταναλώνουν μεγαλύτερες ποσότητες υγρών σε σχέση με τα παιδιά ηλικίας 6-10 ετών και θεωρητικά αυτό τους δίνει μεγαλύτερες δυνατότητες για τη διάλυση της κυστίνης στα ούρα τους [168]. Τα μικρότερα επίσης παιδιά απεκκρίνουν υψηλότερα επίπεδα κυστίνης σε σχέση με τα μεγαλύτερα [168]. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στη σταδιακή “ωρίμανση” της νεφρικής λειτουργίας και αύξηση του ρυθμού της πειραματικής διήθησης (GFR, glomerular filtration rate) όσο αυξάνεται η ηλικία του ατόμου. Τότε όμως γιατί λίθοι κυστίνης συνήθως δε σχηματίζονται στα πρώτα χρόνια της ζωής του ατόμου αλλά μεταγενέστερα; Σύμφωνα με νεότερα αποτελέσματα ερευνητικών προσπαθειών, το γεγονός αυτό δεν έχει να κάνει με τα επίπεδα απέκκρισης της κυστίνης ή διάλυσης της στα ούρα σε συνάρτηση με την ηλικία του ατόμου. Πιθανότατα σχετίζεται με την παρουσία σε υψηλή συγκέντρωση μη-διαλυτών ουσιών (>12kDa) στα ούρα των νηπίων που εμποδίζουν την καθίζηση της κυστίνης. Όταν οι ενδογενείς αυτοί αναστολείς της καθίζησης της κυστίνης αρχίσουν να φθίνουν καθώς αυξάνεται η ηλικία του ατόμου τότε αρχίζουν οι υποτροπιάζουσες ουρολιθιάσεις που εμφανίζονται στα μεγαλύτερα σε ηλικία κυστινουρικά άτομα.

Καθοριστικός παράγοντας στην κρυστάλλωση της κυστίνης είναι το pH των ούρων. Η κυστίνη (MB = 240 daltons) έχει διαλυτότητα περίπου 250 mg/l (1 mmol/l)



σε ούρα που το pH τους είναι μεγαλύτερο του 7 ($\text{pH} > 7$), ενώ η διαλυτότητα της κυστίνης αυξάνεται σημαντικά πάνω από 500 mg/l (2 mmol/l) ή και περισσότερο όταν το pH είναι μεγαλύτερο του 7,5 [169]. Έτσι όταν το pH των ούρων εμφανίζει τιμή μεγαλύτερη του 7 αναμένεται η κρυστάλλωση της κυστίνης να μειωθεί οποιοσδήποτε και αν είναι ο ρυθμός της νεφρικής της απέκκρισης. Ωστόσο, πρέπει να επισημανθεί ότι η διαλυτότητα της κυστίνης σε σχέση με το pH των ούρων δεν είναι τόσο προβλέψιμη όπως στα ρυθμιστικά διαλύματα, εξαρτάται από τη μέθοδο που χρησιμοποιείται στη μέτρησή της, και διαφέρει από δείγμα σε δείγμα. Για τους λόγους αυτούς πρέπει να αποφεύγεται η χρήση πρότυπων καμπυλών προσδιορισμού της συγκέντρωσης της κυστίνης στα ούρα κάποιου ασθενούς, όταν πρόκειται να του χορηγηθεί κάποιο αλκαλοποιητικό μέσο για την αύξηση της διαλυτότητάς της [170-172]. Αξίζει να σημειωθεί ότι ακόμη και παροδικές μειώσεις του pH των ούρων μπορεί να επιτρέψουν την έναρξη της κρυστάλλωσης και τον σχηματισμό λιθιασικού πυρήνα γεγονός που θα οδηγήσει σε αύξηση του αριθμού και του μεγέθους των λίθων κυστίνης.

Επιπλέον, η Sakhaee και οι συνεργάτες της (1989) επισήμαναν τη σχέση ανάμεσα στις μεταβολικές διαταραχές των κυστινουρικών ατόμων, συμπεριλαμβανομένων και της υποκιτροουρίας (44,4%), υπερουρικοζουρίας (22,2%) και υπερασβεστοουρίας (18,5%) [173]. Κάτι τέτοιο καθιστά αναγκαία τη μελέτη όλων των μεταβολικών οδών που λαμβάνουν χώρα στα επιθηλιακά κύτταρα του νεφρικού παρεγχύματος και καθορίζουν ή επηρεάζουν τη μεταφορά των ουδέτερων, διβασικών αμινοξέων, της κυστίνης και των διαφόρων ιόντων [174]. Οι κρύσταλλοι της κυστίνης ίσως δρουν σαν μια εστία για την εναπόθεση και το σχηματισμό λίθων που δομούνται από ασβέστιο όπως και αντίστροφα. Η πολύ μεγάλη αλκαλοποίηση των ούρων και οι φλεγμονές τόσο της απεκκριτικής ουροφόρου οδού όσο και του



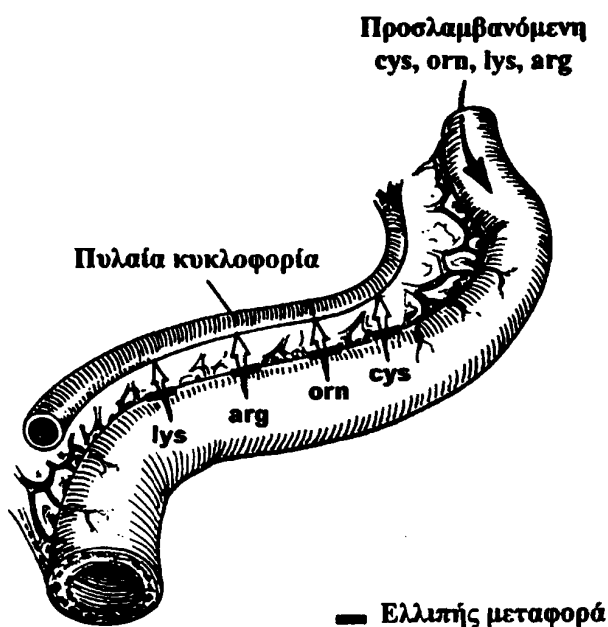
νεφρικού παρεγχύματος ίσως προδιαθέσουν τους ασθενείς να σχηματίσουν λίθους φωσφορικού ασβεστίου. Έτσι κρίνεται απαραίτητη η παρακολούθηση του pH των ούρων τους και η κατάλληλη αντιμετώπιση των φλεγμονών της απεκκριτικής μούρας του ουροποιητικού συστήματος.

Αποφρακτικά επεισόδια, ειδικά όταν το νεφρικό παρέγχυμα προσβάλλεται από υποτροπιάζουσες φλεγμονές ή λοιμώξεις, αλλοιώνουν και επιβαρύνουν τη νεφρική λειτουργία. Η κατάσταση αυτή μπορεί να οδηγήσει μέχρι και σε νεφρεκτομή όταν εμφανιστεί μεγάλη έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας με αποτέλεσμα να είναι αναγκαία πλέον η τεχνητή υποστήριξη του ασθενούς εφ' όσον ο ετερόπλευρος του εναπομείναντος νεφρού υπολειτουργεί. Η πιθανότητα επανεμφάνισης ουρόλιθων κυστίνης και η απώλεια της νεφρικής λειτουργίας δικαιολογεί την ανάγκη συνεχούς παρακολούθησης όλων των κυστινουρικών ατόμων, ενώ με τη μεταμόσχευση νεφρών εξασφαλίζεται η μη επανεμφάνιση της ασθένειας. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι ο δότης του μοσχεύματος φέρει το φυσιολογικό, άγριου τύπου αλληλόμορφο του μεταλλαγμένου γονιδίου του δέκτη και έτσι εξασφαλίζεται η φυσιολογική επαναρρόφηση της κυστίνης και των τριών διβασικών αμινοξέων στα νεφρικά σωληνάκια.





Εικόνα 34: Οι βλάβες στο νεφρικό σύστημα μεταφοράς. Στα κυστινOURικά άτομα η ελλιπής επαναρρόφηση της κυστίνης και των τριών διβασικών αμινοξέων οδηγεί στην αυξημένη νεφρική τους απέκκριση (Micheal W et al¹⁶⁷, 1996).



Εικόνα 35: Οι βλάβες στο εντερικό σύστημα μεταφοράς. Στα κυστινOURικά άτομα, η εντερική απορρόφηση της κυστίνης και των τριών διβασικών αμινοξέων (orn, arg, lys) είναι ελλιπής (Micheal W et al¹⁶⁷, 1996).



B. Η ΙΣΧΥΟΥΣΑ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΗΣ ΚΥΣΤΙΝΟΥΡΙΑΣ

Ο κύριος στόχος για την αντιμετώπιση της κυστινουρίας είναι η αύξηση της διαλυτότητας της κυστίνης και συνεπώς η μείωση του ρυθμού σχηματισμού κρυστάλλων κυστίνης και υποτροπής των λίθων [100, 175, 176]. Στόχο, επίσης, αποτελεί η επιβράδυνση ανάπτυξης νεφρικής δυσλειτουργίας. Προς την κατεύθυνση αυτή αναπτύχθηκε ένας αλγόριθμος που συνίσταται από κατάλληλη διαιτολογική προσέγγιση, σωστή φαρμακευτική αγωγή και τέλος σε περιπτώσεις αποφρακτικής παθολογίας της απεκκριτικής μοίρας του ουροποιητικού συστήματος, υποβολής του ασθενούς σε μεθόδους λιθοαπαλλαγίας ή κατακερματισμού των λίθων με ενδοσκοπικές μεθόδους ή χειρουργική αφαίρεση αυτών ή ακόμη και εξωσωματικής λιθοτριψίας (πίνακας 21).

Η βασική διαιτολογική προσέγγιση συνίσταται σε πρόσληψη και αποφυγή συγκεκριμένων τροφών, σε αύξηση της διούρησης και σε αλκαλοποίηση των ούρων. Πιο συγκεκριμένα, τα άτομα πρέπει να αποφεύγουν τροφές πλούσιες σε μεθιονίνη, η οποία αποτελεί την πρόδρομο ουσία της κυστίνης. Έτσι πρέπει να αποφεύγουν τα αυγά ή τα αλίπαστα, να μετριάζουν την κρεοφαγία καθώς και την βρώση πουλερικών, ειδών κυνηγιού, ψαριών και τυριών. Προτιμότερα είναι τα νωπά λαχανικά και καρποί, καθώς και τα δημητριακά. Καλό είναι επίσης η διαίτα των κυστινουρικών ατόμων να είναι πτωχή σε νάτριο διότι έτσι μειώνεται η απέκκριση της κυστίνης. Αυτό όμως είναι δύσκολο να εφαρμοστεί για μεγάλα χρονικά διαστήματα.

Τα κυστινουρικά άτομα θα πρέπει να προσλαμβάνουν ημερησίως 3l νερό ή και περισσότερο, προκειμένου η συγκέντρωση της κυστίνης στα ούρα τους να διατηρηθεί σε επίπεδα κάτω των 200-250 mg/l. Αξίζει να σημειωθεί ότι η πρόσληψη των υγρών πρέπει να γίνεται σε 24ωρη βάση και να κατανεμηθεί τόσο κατά τη διάρκεια της ημέρας όσο και της νύκτας. Χυμοί φρούτων όπως πορτοκαλιού ή κίτρου

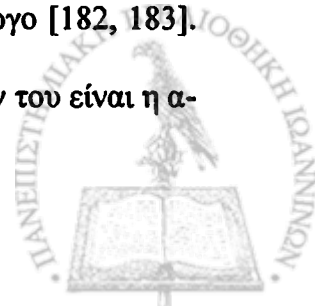


είναι καλό να καταναλώνονται, αφού το κιτρικό οξύ και το κάλιο αυξάνουν τη διούρηση και το αλκαλικό φορτίο του οργανισμού.

Ένα από τα σημαντικότερα μέτρα της βασικής διαιτολογικής αγωγής είναι αυτό της αλκαλοποίησης των ούρων. Η αλκαλοποίηση των ούρων πρέπει να στοχεύει στη ρύθμιση του pH των ούρων μεταξύ των τιμών 7,5-8 [177]. Σε αυτές τις συνθήκες επιτυγχάνεται η παρεμπόδιση της καθίζησης του φωσφορικού ασβεστίου, το οποίο σχηματίζει περίβλημα γύρω από τους λίθους κυστίνης κάνοντάς τους αδιάλυτους. Ανάμεσα στα αλκαλοποιητικά σκευάσματα προτιμάται το κιτρικό κάλιο διότι το διτανθρακικό νάτριο αυξάνει το φορτίο του οργανισμού σε νάτριο και κατά συνέπεια την απέκκριση της κυστίνης [178]. Η κατανάλωση ανθρακούχου μεταλλικού ύδατος θεωρείται εξίσου ευεργετική και επιπλέον δεν αποτελεί κάποιο επιπλέον φαρμακευτικό σκεύασμα που πρέπει να καταναλώσει ο κυστινουρικός ασθενής.

Διχογνωμίες υπάρχουν σχετικά με το ρόλο της βιταμίνης C στη μείωση της συγκέντρωσης της κυστίνης στα ούρα. Το ασκορβικό οξύ θεωρούν ορισμένοι ερευνητές ότι έχει την ικανότητα να διασπά την κυστίνη σε δύο μορφές κυστεϊνών, οι οποίες είναι πιο ευδιάλυτες σε σχέση με τη δυσδιάλυτη κυστίνη [179, 180]. Κάτι τέτοιο θα είχε πρακτική αξία μόνο στην περίπτωση που η αντίδραση γινόταν αυθόρμητα (εξώθερμη). Αυτό όμως που έχει διαπιστωθεί είναι ότι η αντίδραση είναι ενδόθερμη και επομένως χρειάζονται πιο ισχυρά αναγωγικά αντιδρώντα σώματα προκειμένου αυτή η προσέγγιση στην αντιμετώπιση της κυστινουρίας να είναι πραγματικά αποτελεσματική [181].

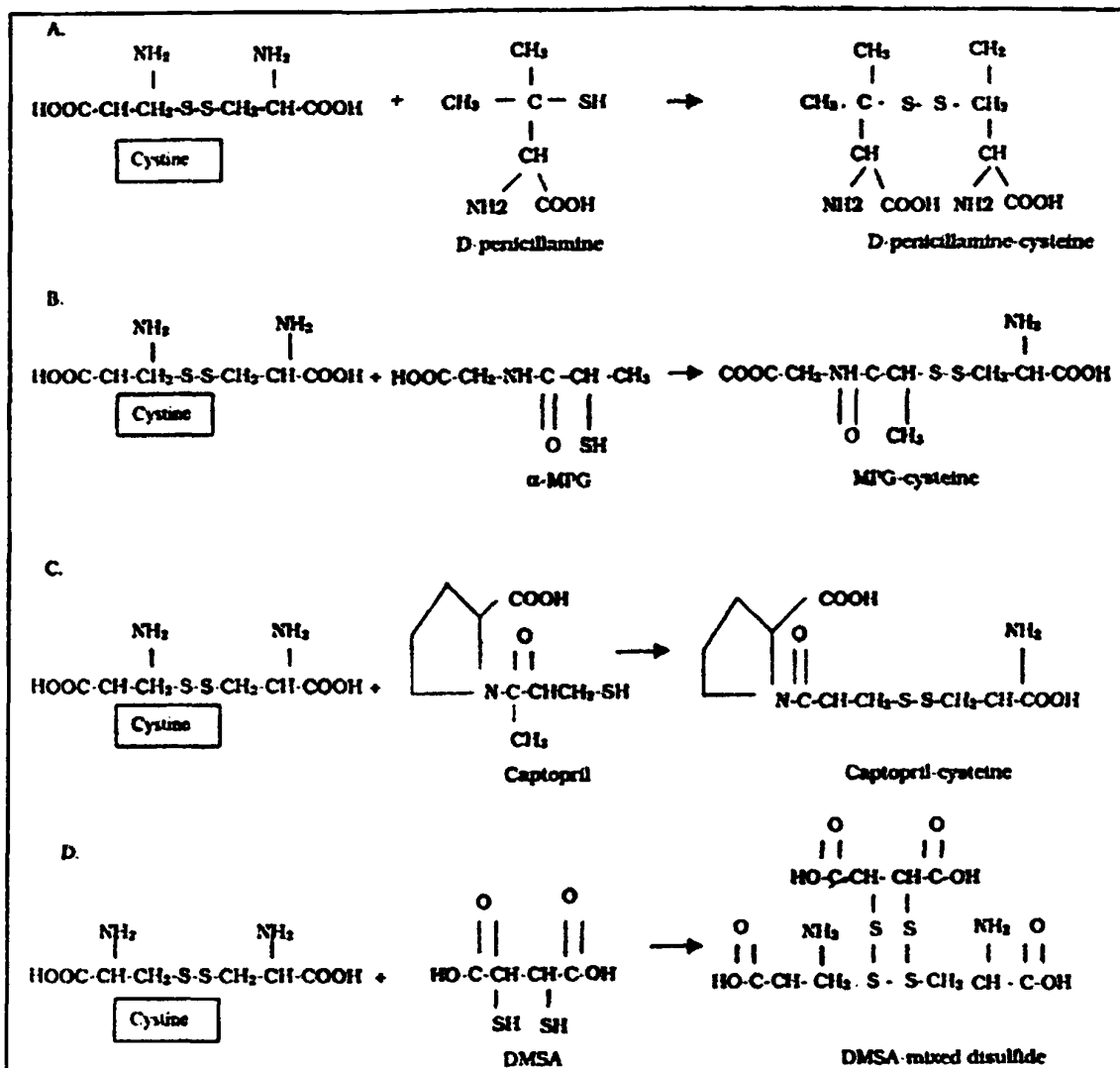
Όταν τα προαναφερθέντα μέτρα δεν φανούν αποτελεσματικά ώστε να αποτρέψουν την υποτροπή των λίθων τότε συνιστάται στον κυστινουρικό ασθενή να ακολουθήσει μία κατάλληλη αγωγή με κάποιο σουλφυδρικό παράγωγο [182, 183]. Αυτό που κυρίως χορηγείται εξαιτίας και των μειωμένων παρενεργειών του είναι η α-



MPG (α -Mercaptopropionylglycine) σε δοσολογία 1.000 mg ημερησίως. Τα χηλικά παράγωγα (D-Penicillamine/D-P, α -Mercaptopropionylglycine/ α -MPG, Bucillamine/BCA, N-Acetyl-L-Cysteine/NAC, Captopril) έχουν την ικανότητα να διασπούν την κυστίνη σε δύο μορφές κυστεϊνών σχηματίζοντας ένα μίγμα δισουλφιδίων μέχρι και 50 φορές πιο διαλυτό σε σχέση μ' αυτό της κυστίνης. Πρόσφατα *in vitro* ανάλυση καθίζησης της ενδογενούς κυστίνης σε ούρα κυστινουρικού ασθενή έδειξαν ότι η meso-2,3-dimercaptosuccinic (DMSA) μπορεί να μειώσει τα επίπεδα ελεύθερης κυστίνης στα ούρα του ως και 50% [168]. Αυτό το γεγονός καθιστά την DMSA ένα πιθανό μελλοντικό φαρμακευτικό σκεύασμα στην αντιμετώπιση της κυστινουρίας. Μέχρι τότε περισσότερα στοιχεία πρέπει να συλλεχθούν για την ασφάλεια της χρήσης της σε κλινικό επίπεδο όπως και να γίνουν συγκριτικές κλινικές μελέτες για όλα τα σκευάσματα που μέχρι σήμερα έχουν χρησιμοποιηθεί. Στην εικόνα 36 φαίνεται ο τρόπος δράσης ορισμένων εξ' αυτών.

Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί η ανάγκη ελέγχου του pH των ούρων των κυστινουρικών ατόμων και κατά τη διάρκεια της νύκτας [184]. Έχει διαπιστωθεί ότι η υποτροπή των λίθων συμβαίνει ακόμη και σε άτομα που το pH των ούρων τους και η κατά βάρος ωσμωγραμμομοριακότητά τους, είναι εντός των προτεινόμενων φυσιολογικών ορίων. Αυτό συμβαίνει διότι το pH των ούρων μειώνεται κατά τη διάρκεια της νύκτας με αποτέλεσμα να δημιουργείται ευνοϊκότερο περιβάλλον για το σχηματισμό των λίθων κυστίνης. Έτσι προβάλλει αναγκαία η πρόσληψη υγρών πριν την κατάκλιση και κατά τη διάρκεια της νύκτας καθώς και η πρόσληψη κάποιου αλκαλοποιητικού παράγοντα των ούρων πριν από τον βραδινό ύπνο.





Εικόνα 36: (Α–C) Μονοθειώλες που συνδέονται με το ήμισυ του μορίου της κυστίνης για να σχηματιστεί το ευδιάλυτο δισουλφιδικό μίγμα με την κυστεΐνη και (D) η διθειώλη, DMSA, που συνδέεται και με τις δύο κυστεΐνες του μορίου της κυστίνης για να σχηματιστεί το δισουλφιδικό μίγμα (Parvex P et al¹⁶⁸, 2003).

Σχετικά με την αντιμετώπιση των υπαρχόντων λίθων αυτό που προτείνεται είναι να χρησιμοποιούνται οι λεγόμενες αναιμακτες ενδοουρολογικές επεμβατικές μέθοδοι. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των λίθων κυστίνης τους κάνουν σχετικά ανθεκτικούς στα κύματα κρούσης της εξωσωματικής λιθοτριψίας (ESWL: Extracorporeal Shock Wave Lithotripsy). Ωστόσο, πρόσφατα αποτελέσματα δείχνουν πως η ESWL είναι αποτελεσματική σε περιπτώσεις λίθων εντοπισμένων εντός των



νεφρικών καλύκων, της νεφρικής πυέλου ή του άνω τριτημορίου του ουρητήρα και εφ' όσον ο μεγαλύτερος λίθος είναι διαμέτρου μικρότερης του 1,5 cm [185, 186]. Για πυελοκαλυκικούς λίθους διαμέτρου μεγαλύτερης του 1,5 cm συνιστάται διαδερμική λιθοτριψία αφού οι λίθοι προσεγγίζονται άμεσα, σπάνε ευκολότερα και ταυτόχρονα απομακρύνονται τα θραύσματά τους [187]. Τέλος, σε πιο βεβαρημένες περιπτώσεις όπως μεγάλων κοραλλιοειδών λίθων χρήζουν ανοικτών χειρουργικών επεμβάσεων [187].

Τέλος, η τάση για υποτροπή των λίθων υπάρχει ακόμη και σε εκείνους τους ασθενείς που ακολουθούν πιστά την προτεινόμενη αγωγή [188]. Οι ασθενείς πρέπει να επισκέπτονται συχνά το θεράποντα ιατρό τους (κάθε 3-4 μήνες). Ο υπερηχογραφικός έλεγχος του ουροποιητικού συστήματος συνιστάται σε τακτά χρονικά διαστήματα. Επιπλέον, πρέπει συχνά να ελέγχεται η νεφρική λειτουργία, ιδιαίτερα σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε νεφρεκτομή ή έχουν μονήρη λειτουργικό νεφρό.

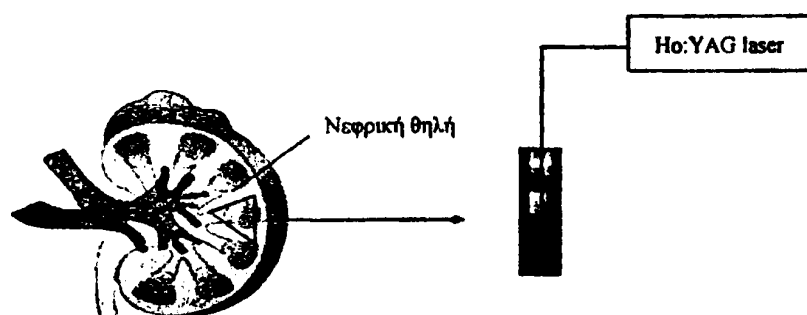
Πίνακας 21: Η θεραπευτική αντιμετώπιση των κυστινουρικών ασθενών (Joly D et al¹⁰⁰, 1999).

Βασική θεραπεία
1) Υψηλή πρόσληψη υγρών κατά τη διάρκεια της ημέρας και της νύκτας (συστήνονται χυμοί κίτρου και πορτοκαλιού) 2) Μέτρια πρόσληψη άλατος 3) Τροφές με μέτρια περιεκτικότητα μεθειονίνης (μονό σε περιπτώσεις ενήλικων ασθενών) 4) Αλκαλοποίηση των ούρων (είναι προτιμότερο να χρησιμοποιείται το κιτρικό κάλιο)
Σε περιπτώσεις υποτροπής των λίθων
1) Ενίσχυση και πιο αυστηρή εφαρμογή των παραπάνω μέτρων 2) Προσθήκη σουλφυδρικών ενώσεων (D-Penicillamine ή α-Mercapto-propionylglycine) σε κατάλληλη εξατομικευμένη δοσολογία ώστε τα επίπεδα απέκκρισης της κυστίνης στα ούρα να είναι <200 mg/l (περίπου 0,8 mmol/l)
Παρακολούθηση των κυστινουρικών ασθενών
1) Συχνές επισκέψεις στον θεράποντα ιατρό σε περιπτώσεις ιδιαίτερα βεβαρημένων καταστάσεων (κυρίως τα παιδιά και οι έφηβοι) 2) Συγκέντρωση ούρων 24ωρου α) προσδιορισμός του όγκου τους (στόχος: >1,5-2 l/m ² επιφάνειας σώματος ημερησίως) β) προσδιορισμός των επίπεδων απέκκρισης της κυστίνης (στόχος: <250 mg/l) 3) Προσδιορισμός του pH των ούρων (επιθυμητό σταθερό εύρος: 7,5-8) 4) Συγκέντρωση πρώτων πρωινών ούρων (στόχος: η απουσία κρυστάλλων κυστίνης) 5) Υπερηχογραφικοί έλεγχοι (επαναλαμβανόμενοι σε τακτά χρονικά διαστήματα)



Γ. ΠΡΩΤΕΣ ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ

Πολύ πρόσφατα, μόλις το 2004, έγιναν τα πρώτα πετυχημένα *in vitro* και *ex vivo* πειράματα μεταφοράς γυμνού πλασμιδιακού DNA με εφαρμογή laser ενέργειας σε νεφρικά κύτταρα χοίρου και σε μοντέλο νεφρικής θηλής χοίρου [189]. Η πετυχημένη επιμόλυνση των καλοηθών νεφρικών κυττάρων με DNA διαμέσου Ho:YAG (holmium: yttrium-aluminium-garnet laser) δίνει πολλές ελπίδες στη γονιδιακή θεραπεία της κυστινουρίας. Στην πραγματικότητα πρόκειται για μια νέα επιτυχή μέθοδο μεταφοράς του φυσιολογικού γονιδίου στα κύτταρα στόχους. Καθώς τα νεφρά είναι εύκολα προσβάσιμα με το ουρητηροσκόπιο, η εφαρμογή laser ενέργειας ίσως να αποτελέσει στο μέλλον τη μη-επιθετική μέθοδο επιλογής μεταφοράς του φυσιολογικού γονιδίου στα κύτταρα του ιστού-στόχου. Επιπλέον, τα *ex vivo* πειράματα έδειξαν ότι τα περιφερικά στρώματα του -νεφρικού ιστού είναι επιδεκτικά στην επιμόλυνσή τους με το ξένο DNA διαμέσου εφαρμογής laser ενέργειας από την επιφάνεια της νεφρικής θηλής έχοντας ως τελικό αποτέλεσμα την επιμόλυνση εκτεταμένων περιοχών του νεφρικού ιστού (εικόνα 37).



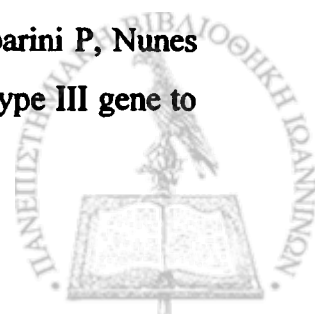
Εικόνα 37: Η *ex vivo* εφαρμογή της Ho:YAG laser ενέργειας στη νεφρική θηλή του χοίρου για μεταφορά γυμνού πλασμιδιακού DNA (Knoll T et al ¹⁸⁹, 2004).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Lahme S, Bichler KH, Eggermann T, Lang F: Genomic and functional investigations of mutations of the SLC3A1 gene in cystinuria. *Urol Int* 2002; 69: 207-211.
2. Langen H, von Kietzell D, Byrd D, Arslan-Kirchner M, Vester U, Stuhmann M, Dörk T, Saar K, Reis A, Schmidtke J, Brodehl J: Renal polyamine excretion, tubular amino acid reabsorption and molecular genetics in cystinuria. *Pediatr Nephrol* 2000; 14: 376-384.
3. Namara Mc, Rea PD, Segal S: Ion dependence of cystine and lysine uptake by rat renal brush-border membrane vesicles. *Biochem Biophys Acta* 1992; 1103: 101-108.
4. Gambaro G, Favaro S, d'Angelo A: Risk for renal failure in nephrolithiasis. *Am J Kidney Dis* 2001; 37: 233-243.
5. Lindell A, Denneberg T, Granerus G: Studies on renal function in patients with cystinuria. *Nephron* 1997; 77: 76-85.
6. Kallistratos G, Dimopoulos C, Kalfakakou-Vadalouka V, Evangelou A, Stockidis D, Vezyraki P, Charalambopoulos C, Miata I: Familial cystinouria in Ioannina District (Greece); diagnosis and treatment. *Urol Res* 1983; 11: 291-296.
7. Dimopoulos K, Kyriakidis A, Stockidis D, Karayiannis A, Kallistratos G: Metabolic disturbance in cystinuria. *Eur Urol* 1982; 8: 367-369.
8. Milliner DS and Murphy ME: Urolithiasis in pediatric patients. *Mayo Clin Proc* 1993; 68: 241-248.
9. Diamond DA: Clinical patterns of pediatric urolithiasis. *Br J Urol* 1991; 68: 195-198.



10. Leusmann DB, Blaschke R, Schmandt W: Results of 5,035 stone analyses: a contribution to epidemiology of urinary stone disease. *Scand J Urol Nephron* 1990; 24: 205-210.
11. Pariha JJ: Management of the patient with cystinuria. *Urol Clin North Am* 1987; 14: 339-346.
12. McDonald MW, Stoller ML: Cystinuria: Advances in medical therapy. *Contemp Urol* 1996; 8: 20-36.
13. Strologo LD, Pras E, Pontesilli C, Beccia E, Ricci-Barbini V, De Sanctis L, Ponzzone A, Gallucci M, Bisceglia L, Zelante L, Jimenez-Vidal M, Font M, Zorzano A, Rousaud F, Nunes V, Gasparini P, Palacin M, Rizzoni G: Comparison between SLC3A1 and SLC7A9 cystinuria patients and carriers: a need for a new classification. *J Am Nephron* 2002; 13: 2547-2553.
14. Guillen M, Corella D, Cabello ML, Garcia AM, Hernandez-Yago J: Reference values of urinary excretion of cystine and dibasic amino acids: Classification of patients with cystinuria in the Valencian community in Spain. *Clin Biochem* 1999; 32: 25-30.
15. Levy HL, Madigan PM, Shih VE: Massachusetts metabolic disorders screening program, I: Technics and results of urine screening. *Pediatrics* 1972; 49: 825-836.
16. Turner B, Brown DA: Amino acid excretion in infancy and early childhood: a survey of 200,000 infants. *Med J Aust* 1972; 1: 62-65.
17. Bostrum H, Hambræus L: Cystinuria in Sweden VII: Clinical histopathological and medico-social aspect of the disease. *Acta Med Scand* 1964; 411: 1-61.
18. Bisceglia L, Calonge MJ, Totaro A, Feliubadalo L, Melchionda S, Garcia J, Testar X, Galluci M, Ponzzone A, Zelante L, Zorzano A, Estivill X, Gasparini P, Nunes V, Palacin M: Localization, by linkage analysis, of the cystinuria type III gene to chromosome 19q13.1. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 611-616.



19. Pras E, Arber N, Aksentijevich I, Katz G, Scharpino JM, Prosen L, Gruberg L, Harel D, Liberman K, Weissenbach J, Pras M, Kastner DL: Localization of a gene causing cystinuria to chromosome 2p. *Nat Genet* 1994; 6: 415-419.
20. Leclerc D, Wu Q, Ellis JR, Goodyer P, Rozen R: Is the SLC7A10 gene on chromosome 19 a candidate locus for cystinuria? *Mol Gen Metabol* 2001; 73: 333-339.
21. Colombo R: Dating the origin of the V170M mutation causing non-type I cystinuria in Libyan Jews by linkage disequilibrium and physical mapping of the SLC7A9 gene. *Gen* 2000; 69: 131-134.
22. Goodyer P, Saadi I, Ong P, Elkas G, Rozen R: Cystinuria subtype and the risk of nephrolithiasis. *Kidney Int* 1998; 54: 56-61.
23. Pras E: Cystinuria at the turn of the millennium: Clinical aspects and new molecular developments. *Mol Urol* 2000; 4: 409-413.
24. Crawhall JC, Watt RW: Cystinuria. *Am J Med* 1968; 45: 736-755.
25. Pras E, Kochva I, Lubetzky A, Pras M, Sidi Y, Kastner DL: Biochemical and clinical studies in Libyan Jewish cystinuria patients and their family members. *Am J Med Genet* 1998; 80: 173-176.
26. Palacin M, Bertran J, Zorzano A: Heteromeric amino acid transporters explain inherited aminocidurias. *Opin Nephrol Hypertens* 2000; 9: 547-553.
27. Pfeiffer R, Loffing J, Rossier G, Bauch C, Meier C, Eggermann T, Loffing-Cueni D, Kuch LC, Verrey FJ: Luminal heterodimeric amino acid transporter defective in cystinuria. *Mol Biol Cell* 1999; 10: 4135-4147.
28. Palacin M, Borsani G, Sebastio G: The molecular bases of cystinuria and lysinuric intolerance. *Curr Opin Genet Dev* 2001; 11: 328-335.



29. Palacin M: The family of heteromultimeric amino acid transporters reveals aminoaciduria genes. *Nephron Dial Transplant* 2000; 15 (Suppl 6): 5-8.
30. Palacín M, Estévez R, Zorzano A: Cystinuria calls for heteromultimeric amino acid transporters. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 455-461.
31. Chillaron J, Roca R, Valencia A, Zorzano A, Palacin M: Heteromeric amino acid transporters: biochemistry, genetics, and physiology. *Am J Physiol* 2001; 281: F995-1018.
32. Deves R, Boyd CA: Surface antigen CD98(4F2): not a single membrane protein, but a family of proteins with multiple functions. *J Membr Biol* 2000; 173: 165-177.
33. Verrey F, Meier C, Rossier G, Kuhn LC: Glycoprotein-associated amino acid exchangers: broadening the range of transport specificity. *Pflugers Arch* 2000; 440: 503-512.
34. Estevez R, Camps M, Rojas AM, Testar X, Deves R, Hediger MA, Zorzano A, Palacin M: The amino acid transport system $y^+L/4F2hc$ is a heteromultimeric complex. *FASEB J* 1998; 12: 1319-1329.
35. Pfeiffer R, Spindler B, Loffing J, Skelly PJ, Shoemaker CB, Verrey F: Functional heterodimeric amino acid transporters lacking cystine residues involved in disulfide bond. *FEBS* 1998; 439: 157-162.
36. Rajan DP, Huang W, Kekuda R, George RL, Wang J, Conway SJ, Devoe LD, Leibach FH, Prasad PD, Ganapathy V: Differential influence of the 4F2 heavy chain and the protein related to $b^{0,+}$ amino acid transport on substrate affinity of the heteromeric $b^{0,+}$ amino acid transporter. *Am J Biol Chem* 2000; 275: 14331-14335.



37. Rejan DP, Kekuda R, Huang W, Wang H, Devoe LD, Leibach FH, Prasad PD, Ganapathy V: Cloning and expression of a b(0,+)-like amino acid transporter functioning as a heterodimer with 4F2hc instead of rBAT. A new candidate gene for cystinuria. *J Biol Chem* 1999; 274: 29005-29010.
38. Bauch C, Verrey F: Apical hetero dimeric cystine and cationic amino acid transporter expressed in MDCK cells. *Am J Physiol* 2002; 1238: F181-189.
39. Reig N, Chillaron J, Bartoccioni P, Fernandez E, Bendahan A, Zorzano A, Kanner B, Palacin M, Bertran J: The light subunit of system b^{0,+} is fully functional in the absence of the heavy subunit. *EMBO J* 2002; 21: 4906-4914.
40. Palacin M, Kanai Y: The ancillary proteins of HATs: SLC3 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch, Eur J Physiol* 2004; 447: 490-494.
41. Fernandez E, Carrascal M, Rousaud F, Abian J, Zorzano A, Palacin M, Chillaron J: rBAT-b^{0,+}AT heterodimer is the main apical reabsorption system for cystine in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 283: F540-548.
42. Chillarón J, Estevéz R, Samarzija I, Waldeggers S, Testar X, Lang F, Zorzano A, Busch A, Palacin M: An intracellular trafficking defect in type I cystinuria rBAT mutants M467T and M467K. *J Biol Chem* 1997; 272: 9543-9549.
43. Peter GJ, Panova TB, Christie GR, Taylor PM: Cysteine residues in the C-terminus of the neutral- and basic-amino-acid transporter heavy-chain subunit contribute to functional properties of the system b_{0,+}-type acid transporter. *Biochem J* 2000; 351: 677-682.
44. Peter GJ, Davies A, Watt PW, Birrell J, Taylor PM: Interactions between the thiol-group reagent N-ethylmaleimide and neutral and basic amino acid transporter-related amino acid transport. *Biochem J* 1999; 343: 169-176.



45. Pineda M, Wagner CA, Broer A, Stehberger PA, Kaltenbach S, Gelpi JLI, Martin del Rio R, Zorzano A, Palacin M, Lang F, Broer S: The cystinuria-specific rBAT (R365W) mutation reveals two translocation pathways in the amino acid transporter rBAT- $b^{0,+}$ AT. *Biochem J* 2004; 377: 665-674.
46. Furriols M, Chillaron J, Mora C, Castello A, Bertran J, Camps M, Testar X, Vilaro S, Zorzano A, Palacin M: rBAT, related to L-cystine transport is localized to the microvilli of proximal straight tubules and its expression is regulated in kidney by development. *J Biol Chem* 1993; 268: 27060-27068.
47. Chairoungdua A, Segawa H, Kim JY, Miyamoto K, Haga H, Fukui Y, Mizoguchi K, Ito H, Takeda E, Endou H, Kanai Y: Identification of an amino acid transporter associated with the cystinuria-related type III membrane glycoprotein. *J Biol Chem* 1999; 274: 28845-28848.
48. Segal S, Thier SO: Cystinuria. In: *The metabolic and molecular bases of inherited diseases*. Scriver CH, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). New York, McGraw-Hill 1995; pp 3581-3601.
49. Mora C, Chillaron J, Calonge MJ, Forgo J, Testar X, Nunes V, Murer H, Zorzano A, Palacin M: The rBAT gene is responsible for L-cystine uptake via the $b^{0,+}$ -like amino acid transport system in a renal proximal tubular cell line (OK cells). *J Biol Chem* 1996; 271: 10569-10576.
50. Chillaron J, Estevez R, Mora C, Wagner CA, Suessbrich H, Lang F, Gelpi JL, Testar X, Busch AE, Zorzano A, Palacin M: Obligatory amino acid exchange via $b^{0,+}$ -like and y^+L -like. A tertiary active transport mechanism for renal reabsorption of cystine and dibasic amino acids. *J Biol Chem* 1996; 271: 17761-17770.
51. Sillbernagl S: The renal handling of amino acids and oligopeptides. *Physiol Rev* 1988; 68: 911-1007.
52. Schafer JA, Watkins ML: Transport of L-cystine in isolated perfused proximal straight tubules. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 1984; 401: 143-151.



53. Lee WS, Wells RG, Sabbag RV, Mohandas TK, Hediger MA: Cloning and chromosomal localization of a human kidney cDNA involved in cystine, dibasic and neutral amino acid transport. *J Clin Invest* 1993; 91: 1959-1963.
54. Segal S, McNamara PD, Pepe LM: Transport interactions of cystine and dibasic amino acids in renal brush border vesicles. *Science* 1977; 197: 169-171.
55. Van Winkle LJ, Campione AL, Gorman JM: Na⁺-independent transport of basic and zwitterionic amino acids in mouse blastocysts by a shared system and by processes which distinguish between these substrates. *J Biol Chem* 1988; 263: 3150-3163.
56. Ito H, Egoshi K, Mizoguchi K, Akakura K: Advances in genetic aspects of cystinuria. *Mol Urol* 2000; 4: 403-407.
57. Bertran J, Werner A, Moore ML, Stange G, Markovich D, Biber J, Testar X, Zorzano A, Palacin M, Murer H: Expression cloning of a cDNA from rabbit kidney cortex that induces a single transport system for cystine and dibasic and neutral amino acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 5601-5605.
58. Bertran A, Werner A, Chillaron J, Nunes V, Biber J, Testar X, Zorzano A, Estivill X, Murer H, Palacin M: 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* 1993; 268: 14842-14849.
59. Tate SS, Yan N, Udenfriend S: Expression cloning of a Na⁺-independent neutral amino acid transporter from rat kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 1-5.
60. Wells RG, Hediger MA: 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* 1992; 89: 5596-5600.



61. Pras E, Sood R, Raben N, Aksentijevich I, Chen X, Kastner D: Genomic organization of SLCEA1, a transporter gene mutated in cystinuria. *Genomics* 1996; 36: 163-167.
62. Purroy J, Bisceglia L, Calonge MJ, Zelante L, Testar X, Zorzano A, Estivill X, Palacin M, Nunes V, Gasparini P: Genomic structure and organization of the human rBAT gene (SLC3A1). *Genomics* 1996; 37: 249-252.
63. Calonge MJ, Gasparini P, Chillaron J, Chillon M, Gallucci M, Rousaud F, Zelante L, Testar X, Dallapiccola B, Di Silverio F, Barcelo P, Estivill X, Zorzano A, Nunes V, Palacin M: Cystinuria caused by mutations in rBAT, a gene involved in the transport of cystine. *Nat Genet* 1994; 6: 420-425.
64. Gasparini P, Calonge M J, Bisceglia L, Purroy J, Dianzani I, Notarangelo A, Rousaud F, Gallucci M, Testar X, Ponzzone A, Estivill X, Zorzano A, Palacin M, Nunes V, Zelante L: Molecular genetics of cystinuria: identification of four new mutations and seven polymorphisms, and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 781-788.
65. Miyamoto K, Segawa H, Tatsumi S, Katai K, Yamamoto H, Taketani Y, Haga H, Morita K, Takeda E: Effects of truncation of the COOH-terminal region of a Na⁺-independent neutral and basic amino acid transport in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 1996; 271: 16758-16763.
66. Bisceglia L, Calonge MJ, Strologo LD, Rizzoni G, Sanctis L, Gallucci M, Beccia E, Testar X, Zorzano A, Estivill X, Zelante L, Palacin M, Gasparini P, Nunes V: Molecular analysis of the cystinuria disease gene: identification of four new mutations, one large deletion, and one polymorphism. *Hum Genet* 1996; 98: 447-451.
67. Saadi I, Chen XZ, Hediger M, Ong P, Pereira P, Goodyer P, Rozen R: Molecular genetics of cystinuria: mutation analysis of SLC3A1 and evidence for another gene in type I (silent) phenotype. *Kidney Int* 1998; 54: 48-55.



68. Albers A, Lahme S, Wagner C, Kaiser P, Zerres K, Capasso G, Pica A, Palacin M, Lang F, Bichler KH, Eggermann T: Mutations in the SLC3A1 gene in cystinuric patients: frequencies and identification of a novel mutation. *Genet Test* 1999; 3: 227-231.
69. Egoshi KI, Akakura K, Kodama T, Ito H: Identification of five novel SLC3A1 (rBAT) gene mutations in Japanese cystinuria. *Kidney Int* 2000; 57: 25-32.
70. Purroy J, Bisceglia L, Jaeken J, Gasparini P, Palacin M, Nunes V: Detection of two novel large deletions in SLC3A1 by semi-quantitative fluorescent multiplex PCR. *Hum Mutat* 2000; 15: 373-379.
71. Harnevik L, Fjellsted E, Molbaek A, Tiselius H, Denneberg T, Söderkvist P: Identification of 12 novel mutations in the SLC3A1 gene in Swedish cystinuria patients. *Hum Mut* 2001, 18: 516-525.
72. Botzenhart E, Vester U, Schmidt C, Hesse A, Halber M, Wagner C, Lang F, Hoyer P, Zerres K, Eggermann T and members of the Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Nephrologie (APN): Cystinuria in children: Distribution and frequencies of mutations in the SLC3A1 and SLC7A9 genes. *Kidney Int* 2002; 62: 1136-1142.
73. Schmidt C, Vester U, Wagner CA, Lahme S, Hesse A, Hoyer P, Lang F, Zerres K, Eggermann T, and members of the Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Nephrologie (APN): Significant contribution of genomic rearrangements in SLC3A1 and SLC7A9 to the etiology of cystinuria. *Kidney Int* 2003; 64: 1564-1572.
74. Dayangac D, Kalkanoglu HS, Durmus-Aydoglu S, Erdem H, Besbas N, Coskun T: Molecular genetic analyses of cystinuria type 1 in 24 Turkish patients. *Turk J Pediatr* 2001; 43: 110-113.



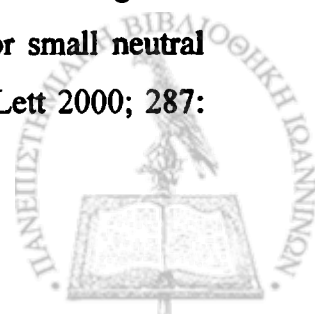
75. Klepárník K, Grochová D, Škopková Z, Adam T: Detection of the major mutation M467T causing cystinuria by single-strand conformation polymorphism analysis using capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2004; 25: 57-64.
76. Strologo DL: Cystinuria. Orphanet encyclopedia (<http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-cystinuria.pdf>) 2003.
77. Goodyer P, Boutros M, Rozen R: The molecular basis of cystinuria: an update. *Exp Nephrol* 2000; 8: 123-127.
78. Gitomer WL, Pak CYC: Recent advances in the biochemical and molecular biological basis of cystinuria. *J Urol* 1996; 156: 1907-19012.
79. Miyamoto K, Katai K, Tatsumi S, Sone K, Segawa H, Yamamoto H, Taketani Y, Takada K, Morita K, Kanayama H, Kagawa S, Takeda E: Mutations of the basic amino acid transporter gene associated with cystinuria. *Biochem J* 1995; 310: 951-955.
80. Schimdt C, Vester U, Hesse A, Lahme S, Lang F, Zerres K, Eggermann T: The population-specific distribution and frequencies of genomic variants in the SLC3A1 and SLC7A9 genes and their application in molecular genetic testing of cystinuria. *Urol Res* 2004; 32: 75-78.
81. Schimdt C, Albers A, Tomiuk J, Eggermann K, Wagner C, Capasso G, Lahme S, Hesse A, Lang F, Zerres K, Eggermann T: Analysis of the genes SLC7A9 and SLC3A1 in unclassified cystinurics: mutation detection rates and association between variants in SLC7A9 and the disease. *Clin Nephrol* 2002; 57, 342-348.
82. Pras E, Raben N, Golomb E, Arber N, Aksentijevich I, Schapiro JM, Harel D, Katz G, Liberman U, Pras M, Kastner DL: Mutations in the SLC3A1 transporter gene in cystinuria. *Am J Hum Genet* 1995; 56:1297-1303.



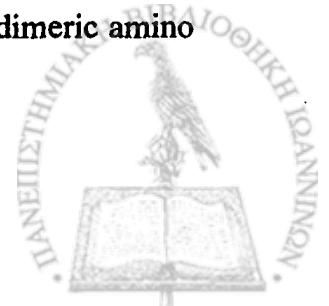
83. Pras E, Pras E, Kreiss Y, Frishberg Y, Prosen L, Aksentijevich I, Kastner DL: Refined mapping of the CSNUIII gene to a 1.8 Mb region on chromosome 19q13.1 using historical recombinants in Libyan Jewish cystinuria patients. *Genomics* 1999; 60: 248-250.
84. Guillen M, Corella D, Cabello ML, Garcia AM, Portoles O, Hernandez-Yago J: Association between M467T and 114C>A variants within the SLC3A1 gene and some phenotypical traits in cystinuria patients from Spain. *Hum Genet* 2000; 106: 314-320.
85. Wartenfeld R, Golomb E, Katz G, Bale SJ, Goldman B, Pras M, Kastner DL, Pras E: Molecular analysis of cystinuria in Lybian Jews: exclusion of the SLC3A1 gene and mapping of a new locus on 19q. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 617-624.
86. Cystic Fibrosis Mutation Data Base 1999; <http://www.genet.sickkids.on.ca/>.
87. Horsford J, Saadi I, Raelson J, Goodyer PR, Rozen R: Molecular genetics of cystinuria in French Canadians. Identification of four novel mutations in type I patients. *Kidney Int* 1996; 23: 52-57.
88. Callonge MJ, Volpini V, Bisceglia L, Rousaud F, De Sanctis L, Beccia E, Zelante L, Testar X, Zorzano A, Estivill X, Gasparini P, Nunes V, Palacin M: Genetic heterogeneity in cystinuria: The SLC3A1 gene is linked to type I but not to type III cystinuria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 9667-9671.
89. Mizoguchi K, Cha SH, Chairoungdua A, Kim DK, Shigeta Y, Matsuo H, Fukushima J, Awa Y, Akakura K, Goya T, Ito H, Endou H, Kanai Y: Human cystinuria-related transporter: Localization and functional characterization. *Kidney Int* 2001; 59: 1821-1833.



90. Font M, Feliubadaló L, Estivill X, Nunes V, Golomb E, Kreiss Y, Pras E, Bisceglia L, d'Adamo A, Zelante L, Gasparini P, Bassi MT, George AL Jr, Manzoni M, Riboni M, Ballabio A, Borsani G, Reig N, Fernandez E, Zorzano A, Bertan J, Palacin M: International Cystinuria Consortium: Functional analysis of mutations in SLC7A9, and genotype-phenotype correlation in non-type I cystinuria. *Hum Mol Gen* 2001, 10: 305-316.
91. Feliubadalo L, Font M, Purroy J, Rousaud F, Estivill X, Nunes V, Golomb E, Centola M, Aksentijevich I, Kreiss Y, Goldman B, Pras M, Kastner DL, Pras E, Gasparini P, Bisceglia L, Beccia E, Gallucci M, de Sanctis L, Ponzzone A, Rizzoni GF, Zelante L, Bassi MT, George Jr AL, Manzoni M, De Grandi A, Riboni M, Endsley JK, Ballabio A, Borsani G, Reig N, Fernandez E, Estevez R, Pineda M, Torrents D, Camps M, Lloberas J, Zorzano A, Palacin M: Non-type I cystinuria caused by mutations in the SLC7A9, encoding a subunit (bo,+AT) of rBAT. International Cystinuria Consortium. *Nat Genet* 1999, 23: 52-57.
92. Leclerc D, Boutros M, Suh D, Wu Q, Palacin M, Ellis JR, Goodyer P, Rozen R: SLC7A9 mutations in all three cystinuria subtypes. *Kidney Int* 2002, 62: 1550-1559.
93. Harnevik L, Fjellstedt E, Molbaek A, Denneberg T, Soderkvist P: Mutation analysis of SLC7A9 in cystinuria patients in Sweden. *Genet Test* 2003; 7: 13-20.
94. Schimdt C, Tomiuk J, Botzenhart E, Vester U, Halber M, Hesse A, Wagner C, Lahme S, Lang F, Zerres K, Eggermann T and members of the Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Nephrologie (APN): Genetic variations of the SLC7A9 gene: allele distribution of 13 polymorphic sites in German cystinuria patients and controls. *Clin Nephrol* 2003; 59: 353-359.
95. Nakauchi J, Matsuo H, Kim DK, Goto A, Chairoungdua A, Cha SH, Inatomi J, Shiokawa Y, Yamaguchi K, Saito I, Endou H, Kanai Y: Cloning and characterization of a human brain Na⁺-independent transporter for small neutral amino acids that transport D-serine with high affinity. *Neurosci Lett* 2000; 287: 4135-4147.



96. Wagner CA, Lang F, Broer S: Function and structure of heterodimeric amino acid transporters. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 2001; 281: 1077-1093.
97. Leclerc D, Boutros M, Suh D, Wu Q, Palacin M, Goodyer P, Rozen R: SLC7A9 mutations in Type II and Type III cystinuria. *Am J Hum Genet* 2000; 67 (abstract): 2169.
98. Rezan DP, Huang W, Kekuda R, George RL, Wang J, Conway SJ, Devoe LD, Leibach FH, Prasad P, Ganapathy V: Differential influence of the 4F2 heavy chain and the protein related to b^{0,+} amino acid transport on substrate affinity of the heteromeric b^{0,+} amino acid transporter. *J Biol Chem* 2000; 275; 331-335.
99. Purohit RS, Stoller ML: Laterality of symptomatic cystine calculi. *Urology* 2003; 62: 421-424.
100. Joly D, Rieu P, Mejean A, Gagnadoux MF, Daudon M, Jungers P: Treatment of cystinuria. *Pediatr Nephrol* 1999; 13: 945-950.
101. Russ WP, Engelman DM: The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association. *J Mol Biol* 2000; 296: 911-919.
102. Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, Walz T, Agre P, Bernard Heymann J, Engel A, Fujiyoshi Y: Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* 2000; 407: 599-605.
103. Mykkanen J, Torrents D, Pineda M, Camps M, Yoldi ME, Horelli-Kuitunen N, Huoponen K, Heinonen M, Oksanen J, Simell O, Savontaus ML, Zorzano A, Palacin M, Aula P: Functional analysis of novel mutations in y⁺LAT amino acid transporter gene causing lysinuric protein intolerance (LPI). *Hum Mol Genet* 2000; 9: 431-438.
104. Broer S, Wagner CA. Structure-function relationships of heterodimeric amino acid transporters. *Cell Biochem Biophys* 2002; 36: 155-168.



105. Deora AB, Ghosh RN, Tate SS: Progressive C-terminal deletions of the renal cystine transporter, NBAT, reveal a novel bimodal pattern of functional expression. *J Biol Chem* 1998; 273: 32980-32987.
106. Stephens JC, Schneider JA, Tanguay DA, Choi J, Acharya T, Stanley SE: Haplotype variation and linkage disequilibrium in 313 human genes. *Science* 2001; 293: 489-493.
107. Kruglyak L, Nickerson DA: Variation is the spice of life. *Nat Genet* 2001; 27: 234-236.
108. Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, Lane CR, Lim EP, Kalayanaraman N, Nemesh J, Ziaugra L, Friedland L, Rofle A, Warrington J, Lipshutz R, Daley GQ, Lander ES: Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet* 1999; 22: 231-238.
109. The International HapMap Project. *Nature* 2003; 789-794.
110. Hudson TJ: Wanted: regulatory SNPs. *Nat Genet* 2003; 33: 439-440.
111. Cardon LR, Abecasis GR: Using haplotype blocks to map human complex trait loci. *Trends Genet* 2003; 19: 135-140.
112. Salisbury BA, Pungliya M, Choi JY, Jiang R, Sun XJ, Stephens JC: SNP and haplotype variation in the human genome. *Mut Res (Fund Mol M)* 2003; 526: 53-61.
113. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Ehrlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-491.
114. White T, Arnheim N, Erlich H: The polymerase chain reaction. *Trends Genet* 1989; 5: 185-189.



115. Orita M, Iwahama H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekita T: Detection of polymorphism of human DANN by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2766-2770.
116. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K: Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989; 5: 874-879.
117. Hayashi K: PCR-SSCP: A method for detection of mutations. *Genet Anal Tech Applic* 1992; 9: 73-79.
118. Hayashi K, Yandel D: How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mut* 1993; 2: 338-346.
119. Glavac D, Dean M: Optimization of the SSCP technique for detection of point mutations. *Hum Mut* 1993; 2: 404-414.
120. Sanger F: Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science* 1981; 214: 1205-1210.
121. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, Heiner C, Kent SB, Hood LE: Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 1986; 321: 674-679.
122. Summers K: DNA polymorphisms in human population studies: a review. *Ann Hum Biol* 1987; 14: 203-217.
123. Kinoshita K, Takemoto M, Itatani H, Yachiku S, Kotake T, Sonoda T: A new screening method for cystinuria: a simple and safe screening kit. *Urol Int* 1979; 34: 369-373.
124. Guo S, Thompson E: Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 1992; 48: 361-372.



125. Raymond M, Rousset F: An exact test for population differentiation. *Evolution* 1995; 49: 1280-1283.
126. Goudet J, Raymond M, de Meeüs T, Rousset F: Testing differentiation in diploid populations. *Genetics* 1996 ; 144 : 1933-1940.
127. Slatkin M, Excoffier L: Testing for linkage disequilibrium in genotyping data using the EM algorithm. *Heredity* 1996; 76: 377-383.
128. Excoffier L, Slatkin M: Incorporating genotypes of relatives into a test of linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 171-180.
129. Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D: Improved splice site detection in Genie. *J Comput Biol* 1997; 4:311-323.
130. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J: *Molecular Cell Biology*, 4th Edition, WH Freeman and Company, pp 358-370.
131. Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM: *An Introduction to Genetic Analysis*, 6th Edition, WH Freeman and Company, pp 564-568.
132. Heinemeyer T, Wingender E, Reuter I , Hermjakob H, Kel AE, Kel OV, Ignatieva EV, Ananko EA, Podkolodnaya OA, Kolpakov FA: Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic Acids Research* 1998; 26: 362-367.
133. Heinemeyer T, Chen X, Karas H, Kel AE, Kel OV, Liebich I, Meinhardt T, Reuter I, Schacherer F, Wingender E: Expanding the TRANSFAC database towards an expert system of regulatory molecular mechanisms. *Nucleic Acids Research* 1999; 27: 318-322
134. Sneath PHA, Socal RR: *Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. Freeman and Co., San Francisco.



135. Nei M: Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 1978; 89: 583-590.
136. Nei M: Genetic distance between populations. *Am Naturalist* 1972; 106: 283-292.
137. Grantham R: Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science* 1974; 185: 862-864.
138. Purohit RS, Stoller ML: Stone clustering of patients with cystine urinary stone formation. *Urology* 2004; 63: 630-635.
139. Strologo LD, Carbonari D, Galluci M, Gasparini P, Bisceglia L, Zelante L, Rosaud F, Nunes V, Palacin M, Rizzoni G: Inter and intrafamilial clinical variability in patients with cystinuria type I and identified mutation. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: A388.
140. Harris H, Mittwoch U, Robson EB, Warren FL: Phenotypes and genotypes in cystinuria. *Ann Hum Genet* 1955; 20: 57.
141. Palacin M, Fernandez E, Chillaron J, Zorzano A: The amino acid transport system b(0,+)₁ and cystinuria. *Mol Membr Biol* 2001; 18: 21-26.
142. Ng CS, Strem SB: Medical and surgical therapy of the cystine stone patient. *Curr Opin Urol* 2001; 11: 353-358.
143. Kuznetsov G, Nigam SK: Folding of secretory and membrane proteins. *N Engl J Med* 1998; 339: 1688-1695.
144. Brooks DA: Protein processing: a role in the pathophysiology of genetic disease. *FEBS Lett* 1997; 409: 115-120.



145. Bross P, Corydon TJ, Andresen BS, Jorgensen MM, Bolund L, Gregersen N: Protein misfolding and degradation in genetic diseases. *Hum Mut* 1999; 14: 186-198.
146. Graf GA, Cohen JC, Hobbs HH: Missense mutations in ABCG5 and ABCG8 disrupt heterodimerization and trafficking. *J Biol Chem* 2004; 279: 24881-24888.
147. Shastry B: SNP alleles in human disease and evolution. *J Hum Genet* 2002; 47: 561-566.
148. Botstein D, Risch N: Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet* 2003; 33 (suppl): 228-237.
149. Cartegni L, Chew S, Krainer A: Listening to silence and understanding nonsense exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 285-298.
150. Wagner GP, Altenberg L: Complex adaptations and the evolution of evolvability. *Evolution* 1996; 50: 967-976.
151. Ancel LW, Fontana W: Plasticity, evolvability and modularity in RNA. *J Exp Zool (Mol Dev Evol)* 2000; 288: 242-283.
152. Pepper JW: The evolution of evolvability in genetic linkage patterns. *BioSystems* 2003; 69: 115-126.
153. Nagel RL, Steinberg MH: Role of epistatic (modifier) genes in the sickle modulation of the phenotypic diversity of sickle cell anemia. *Pediatr Pathol Mol Med* 2001; 20: 123-136.
154. Frederik ML, Renee RA: Male sperm motility by mother's mtDNA. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 543-548.



155. Ruiz-Pesini E, Lapeña A, Díez-Sánchez C, Pérez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, Díaz m, Urriés A, Montoro L, López-Pérez MJ, Enríquez JA: Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 682-696.
156. Reik W, Walter J: Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 21-32.
157. Bray NJ, Buckland PR, Owen MJ, O'Donovan MC: Cis-acting variation in the expression of a high proportion of genes in human brain. *Hum Genet* 2003; 113: 149-153.
158. Lo HS, Wang Z, Hu Y, Yang HH, Gere S, Buetow KH, Lee MP: Allelic variation in gene expression is common in the human genome. *Genome Res* 2003; 13: 1855-1862.
159. Yan H, Yuan W, Velculescu VE, Vogelstein B, Kinzler KW: Allelic variation in human gene expression. *Science* 2002; 297: 1143.
160. Pastinen T, Sladek R, Gurd S, Sammak A, Ge B, Lepage P, Lavergne K, Villeneuve A, Gaudin T, Brändström H, Beck A, Verner A, Kingsley J, Harmsen E, Labuda D, Morgan K, Vohl M, Naumova AK, Sinnett D, Hudson TJ : A survey of genetic and epigenetic variation affecting human gene expression. *Physiol Genomics* 2004; 16: 184-193.
161. Hediger MA, Romero MF, Peng J, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA: The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *Pfugers Arch (Eur J Physiol)* 2004; 447: 465-468.



162. Liu XZ, Ouyang XM, Xia XJ, Zheng J, Pandya A, Li F, Du LL, Welch KO, Petit C, Smith RJ, Webb BT, Yan D, Arnos KS, Corey D, Dallos P, Nance WE, Chen ZY. Prestin, a cochlear motor protein, is defective in non-syndromic hearing loss. *Hum Mol Genet* 2003;12:1155-1162.
163. Ichida K, Hosoyamada M, Hisatome I, Enomoto A, Hikita M, Endou H, Hosoya T. Clinical and molecular analysis of patients with renal hypouricemia in Japan-influence of URAT1 gene on urinary urate excretion. *J Am Soc Nephrol* 2004;15: 164-173.
164. Peters T, Thaete C, Wolf S, Popp A, Sedlmeier R, Grosse J, Nehls MC, Russ A, Schlueter V: A mouse model for cystinuria type I. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 2109-2120.
165. Feliubadaló L, Arbonés ML, Mañas S, Chillarón J, Visa J, Rodés M, Rousaud F, Zorzano A, Palacín M, Nunes V: Slc7a9-deficient mice develop cystinuria non-I and cystine urolithiasis. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 2097-2108.
166. Nebert DW: Pharmacogenetics and pharmacogenomics: why is this relevant to the clinical geneticist? *Clin Genet* 1999; 56: 247-258.
167. Micheal W, McDonald MD, Marshall L, Stoller MD: Cystinuria: advances in medical therapy. *Contemporary Urology* 1996; 20-38.
168. Parvex P, Rozen R, Dziarmaga A, Goodyer P: Studies of urinary precipitation in vitro: ontogeny of cystine nephrolithiasis and identification of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid as a potential therapy for cystinuria. *Mol Genet Metabol* 2003; 80: 419-425.
169. Dent CE, Senior B: Studies on the treatment of cystinuria. *Br J Urol* 1955; 27: 317-332.



170. Pak CY, Fuller CJ: Assessment of cystine solubility in urine and heterogeneous nucleation. *J Urol* 1983; 129: 1066-1070.
171. Nakagawa Y, Coe FL: A modified cyanide-nitroprusside method for quantifying urinary cystine concentration that corrects for creatinine interference. *Clin Chim Acta* 1999; 289: 57-68.
172. Nakagawa Y, Asplin JR, Goldfarb DS, Parks JH, Coe F: Clinical use of cystine supersaturation measurements. *J Urol* 2000; 164: 1481-1485.
173. Sakhaee K, Poindexter JR, Pak CY: The spectrum of metabolic abnormalities in patients with cystine nephrolithiasis. *J Urol* 1989; 141: 819-821.
174. Townsend DM, Tew KD, Tapiero H: Sulfur containing amino acids and human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2004; 58: 47-55.
175. Barrey F, Joly D, Rieu P, Mejean A, Daudon M, Jungers P: Medical treatment of cystinuria: critical reappraisal of long-term results. *J Urol* 2000; 163: 1419-1423.
176. Choong S, Whitfield H, Duffy P, Kellett M, Cuckow P, van't Hoff W, Corry D: The management of pediatric urolithiasis. *BJU Int* 2000; 86: 857-860.
177. Sakhaee K: Cystinuria: pathogenesis and treatment. *Miner Electrolyte Metab* 1994; 20: 414-423.
178. Sakhaee K, Nicar M, Hill K, Pak CY: Contrasting effects of potassium citrate and sodium citrate therapies on urinary chemistries and crystallization of stone-forming salts. *Kidney Int* 1983; 24: 348-352.
179. Lux B, May P: Long-term observation of young cystinuric patients under ascorbic acid therapy. *Urol Int* 1983; 38: 91-94.



180. Birwe H, Schneeberger W, Heese A: Investigations on the efficacy of ascorbic acid therapy in cystinuria. *Urol Res* 1991; 19: 199-201.
181. Ragone R: Medical treatment of cystinuria with vitamin C. *Am J Kidney Dis* 2000; 35: 1020.
182. Sakhae K, Sutton RAL: Cystinuria. In: Coe FL, Favus MJ, Pak CYC, Parks JH, Preminger GM (eds) *Kidney stones: medical and surgical management*. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996.
183. Chow GK, Strem SB: Medical treatment of cystinuria: results of contemporary clinical practice. *J Urol* 1996; 1576-1578.
184. Monnens LAH, Noordam K, Trijbels F: Necessary practical treatment of cystinuria at night. *Pediatr Nephrol* 2000; 14: 1148-1149.
185. Kachel TA, Vijan SR, Dretler SP: Endourological experience with cystine calculi and a treatment algorithm. *J Urol* 1991; 145: 25-31.
186. Harada M, Zhao-Ren K, Kamidono S: Experience with extracorporeal shock wave lithotripsy for cystine calculi in 20 renal units. *J Endourol* 1992; 6: 213-220.
187. Chow GK, Strem SB: Contemporary urological intervention for cystinuric patients: immediate and long term impact and implication. *J Urol* 1998; 160: 341-345.
188. Pietrow PK, Auge BK, Weizer AZ, Delvecchio FC, Silverstein AD, Mathias B, Albala DM, Preminger GM: Durability of the medical management of cystinuria. *J Urol* 2003; 169: 68-70.
189. Knoll T, Sagi S, Trojan L, Schaaf A, Alken P, Michel MS: In vitro and ex vivo gene delivery into proximal tubular cells by means of laser energy-a potential approach for curing cystinuria? *Urol Res* 2004; 32: 129-132.



190. Κατάλογος των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη του νοσήματος: Δίδεται η εταιρεία προέλευσής τους και ο αριθμός καταλόγου τους.

Αντιδραστήριο	Εταιρεία	Αρ. Καταλόγου
Ammonium persulfate	GIBCOBRL	15703-010
EDTA (Ethylenediaminetetracetic Acid, Disodium Salt, Dihydrate-Na ₂ EDTA · 2H ₂ O)	GIBCOBRL	15576-028
Agarose	INVITROGEN	15510-027
dNTPs (100mM dNTP Set PCR Grade)	INVITROGEN	10297-018
Ethidium Bromide solution	INVITROGEN	15585-011
Taq DNA Polymerase Recombinant	INVITROGEN	10342-020
Tris	INVITROGEN	15504-020
10xBlue Juice Gel Loading Buffer	INVITROGEN	10816-015
100bp DNA Ladder	INVITROGEN	15628-050
Formamide	INTERGEN	54117
Rapid PCR Purification System	Marligen Bioscience Inc.	11458-015
Ethanol absolute, extra pure	MERCK	100986
Formaldehyde solution	MERCK	159174
MgCl ₂ (Magnesium chloride)	MERCK	814733
KCl (Potassium chloride)	MERCK	105001
AgNO ₃ (Silver nitrate)	MERCK	101510
NaBH ₄ (Sodium borohydride)	MERCK	818873
NaCl (Sodium chloride)	MERCK	101540
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylendiamin)	MERCK	110732
Tris-HCL (Tris-Hydrochloride)	MERCK	101547
Bromphenol blue	SIGMA	B-8026
NP-40 (Nonyphenoxy Polyethoxy Ethanol-40)	SIGMA	I-3021
SDS (Sodium Dodecyl Sulphate)	SIGMA	L-6026
Xylen cyanol FF	SIGMA	X-4126
Acrylamide	SCHARLAU	AC3345
Acetic acid glacial	SCHARLAU	AC0342
bis-acrylimide (N, N'-Methylene-bis-acrylamide)	SCHARLAU	BI0091
Boric acid	SCHARLAU	AC0577
Glycerol	SCHARLAU	GL0027
NaOH (Sodium hydroxide, pellets)	SCHARLAU	SO0420
Primers, Sequencing	MWG Biotech, Anzinger Str. 7, 85560, Ebersberg, German	-
Urocystin kit	Santen Pharmaceutical Co, Shimoshinjo-cho 2, Higashi Yodogawa-ku, Osaka Japan	-
AccI	New England Biolaps	RO551
AclI	New England Biolaps	RO137
AlwNI	New England Biolaps	RO514
ApaI	New England Biolaps	RO114
AvaI	New England Biolaps	RO152
BccI	New England Biolaps	-
BsaHI	New England Biolaps	RO556
BspI	New England Biolaps	RO559
BssHII	New England Biolaps	RO177
BssSI	New England Biolaps	RO587
BstUI	New England Biolaps	RO518
Cac8I	New England Biolaps	RO579
DdeI	New England Biolaps	RO175
DraIII	New England Biolaps	RO510
Hinfi	New England Biolaps	RO155
HinPII	New England Biolaps	-
Hpy188I	New England Biolaps	RO617
HpyCH4V	New England Biolaps	RO620
MseI	New England Biolaps	RO525
MspI	New England Biolaps	RO106
NlaIII	New England Biolaps	RO125
PstI	New England Biolaps	RO140
XcmI	New England Biolaps	RO533