



## Cistinuria

F. Rousaud\*, M. Palacín\*\* y V. Nunes\*\*\*

\*Servicio de Nefrología. Fundació Puigvert. Barcelona. \*\*Departament de Bioquímica i Fisiologia. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona. Barcelona. \*\*\*Departament de Genètica Molecular. Institut de Recerca Oncològica. L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona.

### ESTADO ACTUAL SOBRE LOS CONOCIMIENTOS DE LA REABSORCIÓN RENAL DE CISTINA Y AMINOÁCIDOS BÁSICOS: EL SISTEMA DE REABSORCIÓN APICAL DE CISTINA

Aproximadamente, el 99% de los aminoácidos filtrados a través del glomérulo renal son reabsorbidos en el túbulo; principalmente a nivel del túbulo contorneado proximal<sup>1</sup>. Este transporte activo requiere el paso del correspondiente aminoácido desde la luz del túbulo al interior de la célula epitelial, a través de la membrana plasmática apical, y de ésta al medio intersticial en equilibrio con la sangre, a través de la membrana plasmática basolateral. El paso de un aminoácido a través de la membrana plasmática requiere la mediación de un transportador, ya que los aminoácidos son moléculas muy polares.

Se han descrito seis familias de transportadores de aminoácidos en la membrana plasmática de mamíferos<sup>2,3</sup>. La mayoría de estos transportadores están codificados por un solo gen que a su vez codifica para una proteína que constituye el transportador correspondiente. Por el contrario, una de estas familias de transportadores está constituida por dos proteínas distintas, codificadas por dos genes distintos: los transportadores HAT (Heteromeric Amino acid Transporters)<sup>3-5</sup>. Los HAT están formados por dos subunidades, una subunidad pesada y otra ligera unidas por un puente disulfuro. Hasta la fecha conocemos dos tipos de subunidades pesadas: rBAT y 4F2hc<sup>6,7</sup>. Estas subunidades pesadas son glicoproteínas de tipo II, es decir con el extremo N-terminal citoplasmático, con un único segmento transmembrana, y un gran dominio extracelular con el extremo C-terminal. Por el contrario, se conocen un número mayor de subunidades ligeras: LAT-1, LAT-2, asc-1, y + LAT-1, y + LAT-2, xCT, b<sup>0,+</sup>AT, asc-2 y AGT-1<sup>8-20</sup>. Estas subunidades ligeras son proteínas de

membrana no glicosiladas, altamente hidrofóbicas y que probablemente presentan 12 segmentos transmembrana con los extremos N- y C-terminales intracelulares. Los heterodímeros formados por 4F2hc y las seis primeras subunidades ligeras antes mencionadas dan lugar a distintos transportadores de aminoácidos: dos isoformas del sistema L, una isoforma del sistema asc, dos isoformas del sistema y + L y el sistema xc-. El heterodímero de rBAT y b<sup>0,+</sup>AT constituye el denominado sistema b<sup>0,+</sup> (fig. 1), desconociendo todavía la subunidad pesada que se asocia a las subunidades asc-2 y AGT-1. Todos los HAT son intercambiadores obligatorios de aminoácidos<sup>3</sup>. La reconstitución en liposomas del sistema b<sup>0,+</sup>AT sin rBAT ha permitido demostrar que la subunidad ligera es plenamente funcional en ausencia de la subunidad pesada, sugiriendo que las subunidades ligeras son las responsables del transporte de aminoácidos<sup>22</sup>. En este sentido, el papel de las subunidades pesadas (rBAT ó 4F2hc) sería el de facilitar el tráfico del transportador correspondiente a la membrana plasmática.

El heterodímero formado por rBAT y b<sup>0,+</sup>AT se expresa en el borde en cepillo de las células epiteliales del túbulo contorneado proximal de la nefrona, y probablemente también de las células epiteliales del intestino delgado<sup>23</sup>. La expresión del dímero rBAT/b<sup>0,+</sup>AT en células en cultivo da lugar a la aparición de la actividad de transporte del sistema b<sup>0,+</sup> en la membrana plasmática<sup>14-16</sup>. El sistema b<sup>0,+</sup> intercambia cistina y aminoácidos básicos (influjo) por aminoácidos neutros (eflujo)<sup>24,25</sup> (fig. 2). Cistina y arginina interactúan con el sistema b<sup>0,+</sup> con una afinidad aparente en el rango micromolar<sup>22</sup>. Estas características del sistema b<sup>0,+</sup> (heterodímero rBAT/b<sup>0,+</sup>AT) son idénticas al sistema de transporte de alta afinidad de cistina compartido por aminoácidos básicos descrito por Segal en vesículas de membrana del borde en cepillo de células epiteliales del riñón<sup>26</sup>. Dadas las características del sistema b<sup>0,+</sup>, un defecto en esta actividad de transporte debe ocasionar la reducción de la reabsorción renal de cistina y aminoácidos básicos y la correspondiente hiperconcentración en orina de éstos (exactamente la disfunción presente en la cistinuria). Efectivamente, como veremos mas adelante, mutaciones en los

**Correspondencia:** Dr. Ferrán Rousaud  
Servicio de Nefrología  
Fundació Puigvert  
Cartagena, 340-350  
08025 Barcelona  
E-mail: frousaud@fundacio-puigvert.es

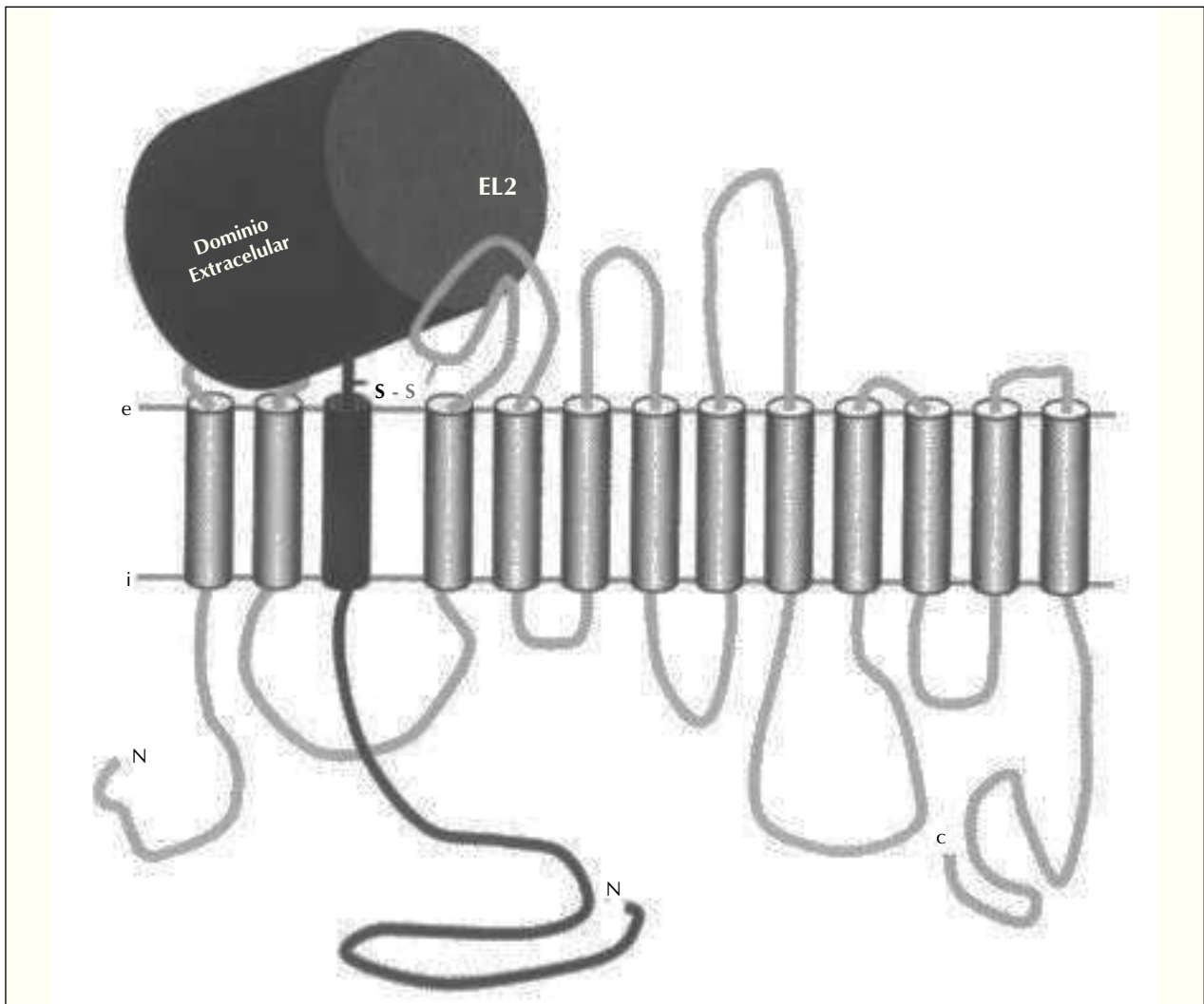


Fig. 1.—Representación esquemática de los transportadores heteroméricos de aminoácidos (HAT). La subunidad pesada de los HAT (gris oscuro) está unida por puente disulfuro a la correspondiente subunidad ligera (gris claro). Los residuos de cisteína envueltos en este enlace (-S-S-) están localizados extracelularmente, justo tras el segmento transmembrana de la subunidad pesada y en el putativo lazo extracelular 2 (EL2) de la subunidad ligera. La subunidad pesada (rBAT o 4F2hc) es una glicoproteína de membrana tipo II con un dominio extracelular que presenta homología con glucosidasas bacterianas<sup>3</sup>. Las subunidades ligeras son proteínas integrales de membrana, no glicosiladas, y con 12 segmentos transmembrana putativos. Los lazos, segmentos transmembrana y el dominio extracelular no están dibujados a escala. e: extracelular. i: intracelular.

genes *SLC3A1* y *SLC7A9*, que codifican las proteínas rBAT y b<sup>0+</sup>AT respectivamente, causan cistinuria<sup>21,27,28</sup>. Como algunos enfermos con cistinuria presentan una reabsorción renal de cistina nula<sup>29</sup>, se estima que el sistema b<sup>0+</sup> es el principal, quizá el único, responsable de la reabsorción apical de cistina<sup>23</sup>. Por el contrario, la reabsorción renal de aminoácidos básicos residual en enfermos con cistinuria es significativa<sup>29</sup>. Esto demuestra que otros transportadores apicales juegan un papel relevante

además del sistema b<sup>0+</sup> en la reabsorción renal de aminoácidos básicos.

Como hemos mencionado, los aminoácidos reabsorbidos a través de la membrana apical deben atravesar la membrana plasmática para completar el proceso de reabsorción a través del epitelio del túbulo renal. Un transportador basolateral juega un papel predominante, el sistema y + L (fig. 2). Este sistema también es un transportador heteromérico (HAT), el heterodímero de 4F2hc/y + LAT-1. Este

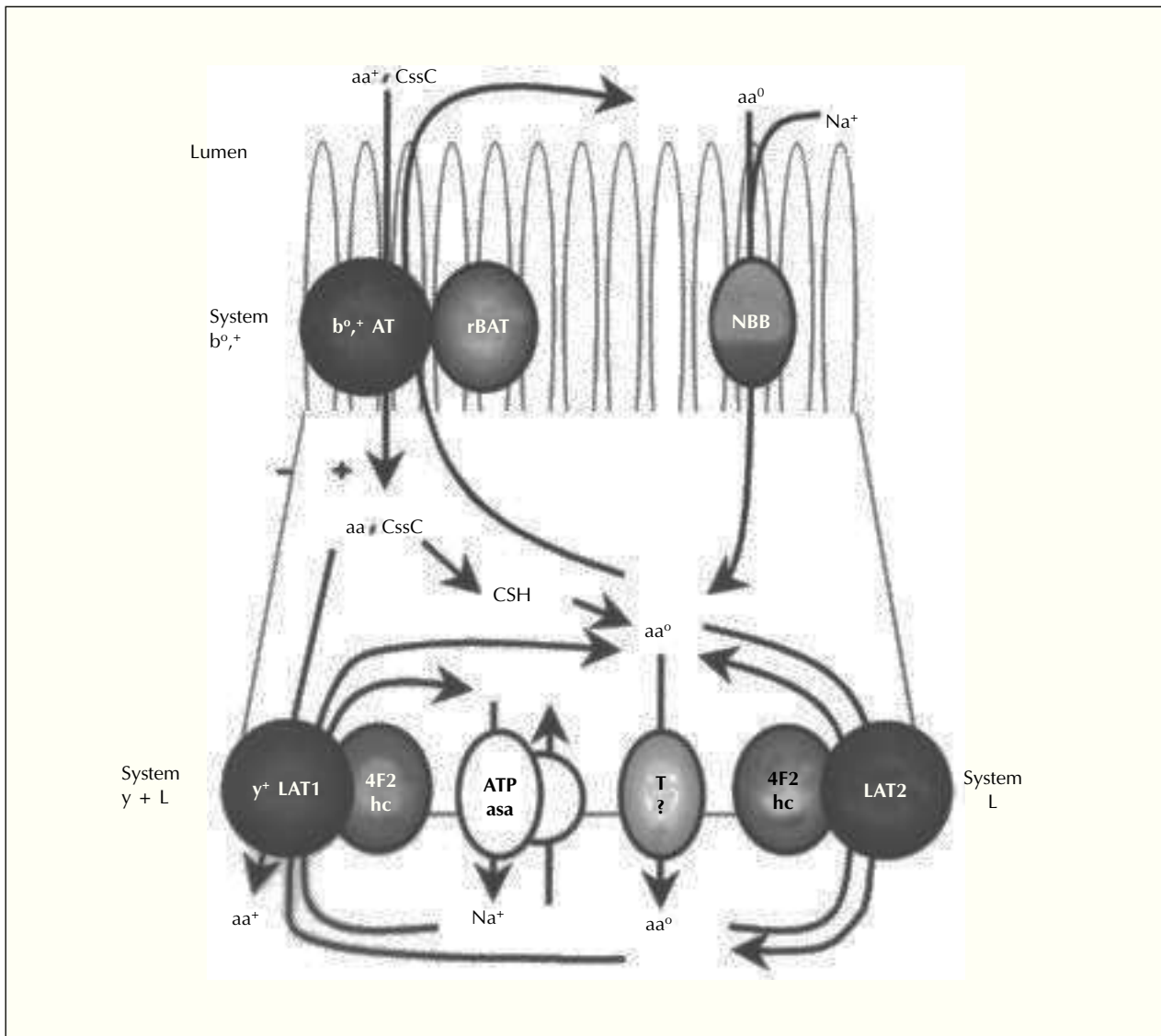


Fig. 2.—Modelo de reabsorción de cistina y aminoácidos básicos en el túbulo proximal de la nefrona. El flujo transepitelial de cistina y aminoácidos básicos se debe a la acción coordinada de distintos transportadores en la membrana apical y basolateral de la célula. La captación apical de cistina (CscC) y aminoácidos básicos ( $aa^+$ ) se realiza por un mecanismo activo terciario: 1) La  $Na^+/K^+$  ATPasa (ATPasa) basolateral genera el gradiente electroquímico de sodio. 2) Un transportador apical sodio-dependiente de aminoácidos neutros (quizá NBB, «Neutral Brush-Border») contribuye a una alta acumulación de aminoácidos neutros ( $aa^0$ ) en la célula. Este gradiente de aminoácidos neutros es la fuerza impulsora de cistina y aminoácidos básicos a través del sistema  $b^{0,+}$  (heterodímero rBAT/ $b^{0,+}$ AT). Además la entrada de aminoácidos básicos y cistina a través de este sistema está favorecida por el potencial de membrana negativo y por la reducción de cistina a cisteína (CSH), respectivamente. El defecto en el sistema  $b^{0,+}$ , debido a mutaciones en rBAT o  $b^{0,+}$ AT causan cistinuria, enfermedad caracterizada por hiperexcreción de cistina y aminoácidos básicos. El eflujo basolateral neto de aminoácidos básicos se realiza por intercambio por aminoácidos neutros y sodio ( $Na^+$ ) a través del sistema  $\gamma^+$ L (heterodímero 4F2hc/ $\gamma^+$ LAT-1). El acervo intracelular de aminoácidos neutros, incluyendo cisteína, puede intercambiarse con los aminoácidos neutros intracelulares por mediación del sistema de transporte basolateral L (heterodímero 4F2hc/LAT-1). El modelo presente requiere un sistema basolateral que medie el eflujo neto de aminoácidos neutros (T), para así satisfacer la reabsorción renal de aminoácidos neutros y mantener la concentración intracelular de estos aminoácidos. Todavía no se conoce la naturaleza de este sistema de transporte.

transportador intercambia aminoácidos básicos (eflujo) con aminoácidos neutros y sodio (influjo)<sup>10</sup>. El papel de este transportador en la reabsorción

renal de aminoácidos es manifiesto, ya que mutaciones en el gen *SLC7A7*, que codifica la subunidad ligera  $\gamma^+$  LAT-1, causan otra aminoaciduria

hereditaria, la denominada lisinuria con intolerancia a proteínas (LPI)<sup>30-32</sup>. Finalmente, se especula que otro transportador HAT, el heterodímero 4F2hc/LAT-2<sup>12</sup>, podría ser responsable de la salida basolateral de la forma reducida de cistina, el aminoácido cisteína (fig. 2). El *knockout* parcial de LAT-2 en un modelo celular de epitelio renal del túbulo proximal de la zarigüeya (*Oposum Kidney cells*) apoya firmemente esta hipótesis<sup>33</sup>.

### GENÉTICA DE LA CISTINURIA. BASES MOLECULARES DE LA ENFERMEDAD

La cistinuria (OMIM 220100) es una hiperaminoaciduria de cistina y aminoácidos básicos debida a un defecto en el transporte tubular renal e intestinal de los mismos. Se transmite con un patrón de herencia autosómico recesivo. Tiene una prevalencia promedio en neonatos de 1/7.000, pero con una gran variabilidad geográfica, así los valores van de 1/2.500 en neonatos judíos-libios a 1/100.000 en Suecia.

Si bien la primera referencia a un nuevo tipo de cálculo (cistina) data de 1810<sup>34</sup> y la descripción de la misma como enfermedad en 1909<sup>35</sup>, las bases moleculares empezaron a esclarecerse hace ahora 8 años con nuestros trabajos.

En una primera etapa previa demostramos que un cDNA de riñón humano, denominado rBAT, responsable del transporte de cistina, aminoácidos básicos y algunos neutros vía el sistema de transporte b<sup>0+</sup>, era un gen candidato a cistinuria<sup>36,37</sup>.

Esta hipótesis fue investigada mediante el análisis de mutaciones de este gen, denominado SLC3A1, en pacientes afectados de cistinuria. A partir de RNA de los pacientes y su posterior análisis, se identificaron seis mutaciones *missense* que cosegregaban con el fenotipo cistinuria<sup>27</sup>. El análisis funcional, realizado en oocitos de *Xenopus*, de la mutación encontrada con más frecuencia (la M467T; sustitución del residuo metionina 467 por treonina) mostró una actividad de transporte de aminoácidos del sistema b<sup>0+</sup>-like reducida. Estos hechos demostraban la implicación directa del gen SLC3A1 en la enfermedad. En otras palabras, mutaciones en el gen SLC3A1 eran responsables de cistinuria.

Posteriormente demostramos que mutaciones en SLC3A1 eran responsables de la cistinuria de tipo I pero no la del tipo no I<sup>38-40</sup>.

En 1996 describimos la estructura genómica de SLC3A1<sup>41</sup>, y determinamos los límites entre los intrones y los exones del gen.

Mediante *southern* se determinó la longitud del gen, que tiene un tamaño de aproximadamente 45

Kb de DNA genómico y consta de 10 exones, el tamaño de los cuales oscila entre 120 y 438 pares de bases. El tamaño de los intrones se encuentra entre los 500 y los 13.000 pares de bases de longitud. Todos los lugares de *splice* cumplen la regla GT/AG.

Una vez conocida la estructura genómica, pudimos realizar el análisis de mutaciones del gen a partir de DNA aislado de sangre de pacientes<sup>42,43</sup>. Inicialmente ya se encontraron mutaciones de todo tipo: inserciones, deleciones, codones de stop prematuros y mutaciones sin sentido.

Hasta la fecha se han descrito 59 mutaciones distintas en SLC3A1 responsables de cistinuria de tipo I. La mutación más común es la M467T, que se ha detectado hasta la fecha en 82 cromosomas. Sólo otras cinco mutaciones se han encontrado distribuidas por todas las poblaciones analizadas, estas mutaciones son: R270X, E483X, T216M, Y461H y 1550 + 1G- > T; las restantes mutaciones se han encontrado en un único cromosoma<sup>44</sup>. En la cohorte de pacientes estudiada por el International Cystinuria Consortium (ICC), se han caracterizado el 80% de los alelos analizados; destacando que las mutaciones *missense* de SLC3A1 hasta ahora estudiadas siempre causan defectos de tráfico de la proteína desde el retículo endoplásmico a la membrana plasmática<sup>45</sup>.

El hecho de encontrar mutaciones específicas de cistinuria en el gen SLC3A1 sólo en pacientes con cistinuria de tipo I era una buena indicación de la existencia de heterogeneidad genética<sup>38</sup>. La manera de comprobarlo fue mediante estudios de ligamiento genético con marcadores del locus genómico de rBAT. El gen rBAT fue localizado inicialmente en el brazo corto del cromosoma 2, y mediante hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) utilizando células híbridas somáticas, se situó en la banda G 2p16.3 del cromosoma 2<sup>37,46</sup>. De forma independiente se describió que microsatélites (D2S119 y D2S177) del brazo corto del cromosoma 2 se encontraban ligados al fenotipo cistinuria en familias de origen judío procedentes de Oriente Medio<sup>47</sup> y que también identificaban a la misma banda G como el gen rBAT<sup>46</sup>. Otros autores localizaron rBAT en una banda G más cercana, 2p21 del cromosoma 2<sup>48</sup>. Esto confirmó la identidad entre el gen rBAT y el locus de cistinuria definido por estudios de ligamiento. Con posterioridad estos marcadores del cromosoma 2 (D2S177 y D2S119), así como los marcadores intragénicos de SLC3A1 (polimorfismos y mutaciones específicas de cistinuria) fueron utilizados en estudios de ligamiento genético en familias que transmitían separadamente o en forma conjunta las cistinuria de tipo I y III. La clasificación de los tipos de cistinuria se realizó dependiendo de los valores de aminoaciduria presentes en la orina de los portadores obliga-

dos. El ligamiento solo resultó positivo en las familias de tipo I/I, mientras que fue negativo para las familias con cistinuria de tipo I/III o tipo III/III<sup>39</sup>.

Nuestros datos mostraron que, contrariamente a la opinión aceptada, la cistinuria era una enfermedad genética heterocigota<sup>49</sup>.

El segundo gen responsable de la cistinuria de tipo no-I se asignó mediante análisis de ligamiento, al brazo largo del cromosoma 19, en la posición 19q12-13.1<sup>40,50</sup>; posteriormente esa región fue acotada a 1.3 Mb gracias al análisis de familias con cistinuria que presentaban recombinantes en esa región<sup>51</sup>. Finalmente ese mismo año se identifica el gen de cistinuria de tipo no I, denominado SLC7A9<sup>52</sup>. Este gen codifica para una proteína denominada b<sup>0,+</sup> AT que forma un heterodímero con rBAT<sup>14</sup>. El gen SLC7A9 abarca unos 32.33 Kb de DNA genómico y está dividido en 13 exones y se transcribe en un cDNA de 1.8 Kb<sup>53</sup>.

El análisis de mutaciones en enfermos de cistinuria de tipo no-I recogidos por el ICC, ha permitido detectar 37 mutaciones distintas en SLC7A1, distribuidas en el 80% de los alelos estudiados<sup>32,44</sup>. Las mutaciones más frecuentemente encontradas en SLC7A1 son: G105R en un 25,4% de los alelos analizados, V170M en el 14,7% (es la más frecuente en judíos Libaneses), R33W (8,6%), c799-800insA (6%) y A182T (4,3%), el resto se han encontrado en un único alelo<sup>53</sup>.

Se procedió a una correlación fenotipo-genotipo en base al grado de excreción de cistina y aminoácidos dibásicos en portadores de mutaciones *missense* de SLC7A9, estableciendo las siguientes consideraciones: 1) aquellas mutaciones que afectan a residuos de aminoácidos con una cadena lateral de pequeño tamaño, en todos los miembros de la familia de subunidades ligeras y situados en los segmentos transmembrana de la proteína, causan una pérdida de función severa; estas mutaciones en heterocigotos producen una hiperexcreción de cistina y aminoácidos básicos mayor, y 2) por el contrario, mutaciones que afectan a residuos poco conservados, pueden producir una pérdida de función menor y en algunos portadores se asocian con una excreción urinaria de cistina y aminoácidos dibásicos normal.

Estos resultados demostraron que SLC7A9 es el gen de la cistinuria de tipo no-I, pero que también es el gen causante de una parte significativa de la cistinuria de tipo I, que mayoritariamente es debida a SLC3A1 (rBAT).

Estos hallazgos nos han conducido a proponer una nueva clasificación de la enfermedad basada en el genotipo de 224 pacientes recogidos por los diferentes miembros del ICC en una base de datos conjunta<sup>61</sup>.

Una vez conocidos los dos genes causantes de la enfermedad así como las mutaciones más frecuentes, es posible plantearse como una de las líneas principales de investigación, el diseño de modelos de animales con cistinuria, para poder profundizar en la patofisiología de la enfermedad y desarrollar nuevas estrategias terapéuticas. De hecho ya hemos generado un ratón *knock-out* para el gen SLC7A9.

Otra línea importante es la identificación de nuevos genes relacionados con la cistinuria, mediante aproximaciones genéticas (mapa de exclusión) o por enfoques bioquímicos (clonando nuevos transportadores renales de cistina).

#### ASPECTOS CLÍNICOS. CORRELACIÓN FENOTIPO-GENOTIPO. NUEVA CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD

La única manifestación clínica conocida de la cistinuria es la litiasis renal de cistina. Desde un punto de vista epidemiológico, la litiasis renal de cistina es uno de los tipos de enfermedad litiásica renal más infrecuentes, con una prevalencia entre el 1 y 3% del total de las litiasis<sup>54</sup>.

El cálculo de cistina se forma por la excesiva concentración de éste aminoácido en orina y a su gran insolubilidad sobre todo a pH ácido.

Desde un punto de vista práctico, es una de las enfermedades litiásicas más complejas de tratar, no en relación al arsenal terapéutico de que disponemos sino por los escasos resultados que obtenemos en algunos pacientes y por el elevado índice de recidiva litiásica<sup>55,56</sup>.

Al ser una enfermedad hereditaria el protocolo de actuación terapéutica ha de aplicarse de por vida en la gran mayoría de pacientes, lo que implica en muchos casos una pérdida de adherencia al tratamiento con las lógicas consecuencias que ello implica<sup>57</sup>. La opción quirúrgica o intervencionista, que debe de aplicarse en algunos casos, juega a la larga como un factor en contra y debe preservarse al máximo. La litotricia extracorpórea por ondas de choque (LEOC) que se aplica comúnmente en la enfermedad litiásica en general, debe prescribirse con cautela dado los escasos resultados obtenidos cuando se aplica al cálculo de cistina; la conformación cristalográfica de los cristales de cistina confieren una extraordinaria dureza al cálculo ya formado, por lo que la LEOC ofrece escasos resultados<sup>58</sup>.

En la práctica clínica diaria hemos observado aspectos fenotípicos en los pacientes cistinúricos que no siguen un patrón de conducta esperado<sup>59</sup>: 1) no todos los homocigotos desarrollan clínica litiásica; 2) el debut de la clínica litiásica no sigue un patrón



fijo, puede presentarse desde la infancia a la edad senil o no presentarse; 3) en los estudios familiares realizados, hemos observado que entre hermanos homocigotos unos desarrollan litiasis renal y otros no, siendo los factores medio-ambientales, hábitos dietéticos y personales, situación metabólica semejante; 4) En los mismos estudios familiares, objetivamos que algunos pacientes cistinúricos con litiasis tienen unos niveles de cistina urinaria menores que algunos de sus hermanos, cistinúricos también, que no han desarrollado litiasis y con unos niveles de cistina en orina cuantitativamente superiores para un mismo pH; 5) portadores de la enfermedad del tipo B (no-I), que por definición tienen niveles de cistina elevados en orina no parecen desarrollar cálculos renales, y 6) en un estudio presentado por nosotros<sup>60</sup>, demostramos que no existían *a priori* diferencias de evolutividad clínica entre los pacientes homocigotos de tipo A y B (tipo I y tipo no-I).

Pero uno de los mayores logros obtenidos en el ámbito clínico de la enfermedad gracias a la aportación de la genética y biología molecular es la nueva clasificación fenotípica que recientemente hemos publicado<sup>61</sup>.

Desde 1966 se ha seguido la clasificación de Rosenberg<sup>62,63</sup>, en base al patrón de excreción de aminoácidos en heterocigotos, en la respuesta plasmática a la sobrecarga oral de cistina y en la actividad de transporte intestinal de cistina, lisina y arginina; así los heterocigotos de tipo I presentan un patrón de excreción de aminoácidos normal, los de tipo II presentan cistín-lisínuria (en muchos casos están elevados los cuatro aminoácidos) y en el tipo III la elevación de aminoácidos está presente pero es cuantitativamente menor que los de tipo II. Con el conocimiento de las bases moleculares de la enfermedad y con la correlación fenotipo-genotipo que hemos realizado en un total de 224 pacientes cistinúricos, proponemos una nueva clasificación clínica:

1. *Cistinuria de tipo A*: causada por mutaciones en ambos alelos del gen SLC3A1 (cromosoma 2). Los heterocigotos muestran una aminoaciduria normal.

2. *Cistinuria de tipo B*: causada por mutaciones en ambos alelos del gen SLC7A9 (cromosoma 19). Los heterocigotos normalmente (pero con alguna excepción) presentan elevación urinaria de cistina y aminoácidos básicos, pero en un 14% de los casos el patrón de aminoaciduria puede ser normal.

3. *Cistinuria de tipo AB*: causada por una mutación en SLC3A1 y otra mutación en SLC7A9. Este tipo es infrecuente.

Nuevas vías de futuro se nos presentan. Los modelos animales (*knock out*) para SLC3A1 y SLC7A9 servirán para la experimentación de nuevos fármacos, más eficaces y sin efectos secundarios. El crecimien-

to de la base de datos Europea de la enfermedad permitirá obtener más conocimiento sobre nuevas mutaciones y sobre todo de aspectos clínicos y metabólicos de gran utilidad de cara a un tratamiento preventivo de la litogénesis del cálculo de cistina.

## Agradecimientos

A todos los pacientes cistinúricos por su entrega, dedicación y sobre todo su fe en nosotros.

A todos los miembros del International Cystinuria Consortium.

Parte de los resultados presentados en esta revisión han sido posible gracias a la aportación de la Marató de TV3 proyecto nº 981-930.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Silbernagl S: The renal handling of amino acids and oligopeptides. *Physiol Rev* 68: 911-1007, 1988.
2. Palacín M, Estévez R, Bertrán J, Zorzano A: Mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol Rev* 78, 969-1054, 1998.
3. Chillarón J, Roca R, Valencia A, Zorzano A, Palacín M: Heteromeric amino acid transporters: biochemistry, genetics, and physiology. *Am J Physiol Renal Physiol* 281: F995-F1018, 2001.
4. Verrey F, Meier C, Rossier G, Kuhn LC: Glycoprotein-associated amino acid exchangers: broadening the range of transport specificity. *Pflügers Arch* 440: 503-512, 2000.
5. Wagner CA, Lang F, Bröer S: Function and structure of heterodimeric amino acid transporters. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C1077-C1093, 2001.
6. Bertrán J, Werner A, Moore ML, Stange G, Markovich D, Biber J, Testar X, Zorzano A, Palacín M, Murer H: Expression-cloning of a cDNA from rabbit kidney cortex that induces a single transport system for cystine, dibasic and neutral amino acids. *Proc Natl Acad Sci* 89: 5601-5605, 1992.
7. Bertrán J, Magagnin S, Werner A, Markovich D, Biber J, Testar X, Zorzano A, Khün LC, Palacín M, Murer H: Stimulation of a system  $\gamma^+$ -like amino acid transport in *Xenopus laevis* oocytes by the heavy chain of the human 4F2 surface antigen. *Proc Natl Acad Sci* 89: 5606-5610, 1992.
8. Mastroberardino L, Spindler B, Pfeiffer R, Skelly PJ, Löffing J, Shoemaker CB, Verrey F: Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family. *Nature* 395: 288-291, 1998.
9. Kanai Y, Segawa H, Miyamoto K, Uchino H, Takeda E, Endou H: Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J Biol Chem* 273: 23629-23632, 1998.
10. Torrents D, Estévez R, Pineda M, Fernández E, Lloberas J, Shi YB, Zorzano A, Palacín M: Identification and characterization of a membrane protein ( $\gamma^+$ L amino acid transporter-1) that associates with 4F2hc to encode the amino acid transport activity  $\gamma^+$ L. A candidate gene for lysinuric protein intolerance. *J Biol Chem* 273:32437-32445, 1998.
11. Sato H, Tamba M, Ishii T, Bannai S: Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. *J Biol Chem* 274: 11455-11448, 1999.

## F. ROUSAUD $\gamma$ cols.

12. Pineda M, Fernández E, Torrents D, Estévez R, López C, Camps M, Lloberas J, Zorzano A, Palacín M: Identification of a membrane protein, LAT-2, that Co-expresses with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transport activity with broad specificity for small and large zwitterionic amino acids. *J Biol Chem* 274: 19738-19744, 1999.
13. Segawa H, Fukasawa Y, Miyamoto K, Takeda E, Endou H, Kanai Y: Identification and functional characterization of a Na<sup>+</sup>-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J Biol Chem* 274: 19745-19751, 1999.
14. Pfeiffer R, Löffing J, Rossier G, Bauch C, Meier C, Eggermann T, Löffing-Cueni D, Kuhn LC, Verrey F: Luminal heterodimeric amino acid transporter defective in cystinuria. *Mol Biol Cell* 10: 4135-4147, 1999.
15. 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 II membrane glycoprotein. *J Biol Chem* 274: 28845-28848, 1999.
16. Rossier G, Meier C, Bauch C, Summa V, Sordat B, Verrey F, Kuhn LC: LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine. *J Biol Chem* 274: 34948-34954, 1999.
17. Pfeiffer R, Rossier G, Spindler B, Meier C, Kuhn L, Verrey F: Amino acid transport of  $\gamma$ (<sup>+</sup>)L-type by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of the glycoprotein-associated amino acid transporter family. *EMBO J* 18: 49-57, 1999.
18. Fukasawa Y, Segawa H, Kim JY, Chairoungdua A, Kim DK, Matsuo H, Cha SH, Endou H, Kanai Y: Identification and characterization of a Na<sup>+</sup>-independent neutral amino acid transporter that associates with the 4F2 heavy chain and exhibits substrate selectivity for small neutral D- and L-amino acids. *J Biol Chem* 275: 9690-9698, 2000.
19. Bassi MT, Gasol E, Manzoni M, Pineda M, Riboni M, Martín R, Zorzano A, Borsani G, Palacín M: Identification and characterization of human xCT, which coexpresses with 4F2hc the amino acid transport system x<sub>c</sub><sup>-</sup>. *PLügers Arch* 442: 286-296, 2001.
20. Matsuo H, Kanai Y, Kim JY, Chairoungdua A, Kim do K, Inatomi J, Shigeta Y, Ishimine H, Chaekuntode S, Tachampa K, Choi HW, Babu E, Fukuda J, Endou H: Identification of a novel Na<sup>+</sup>-independent acidic amino acid transporter with structural similarity to the member of a heterodimeric amino acid transporter family associated with unknown heavy chains. *J Biol Chem* 277: 21017-21026, 2002.
21. Feliubadalo L, Font M, Purroy J, Rousaud F, Estivill X, Nunes V, Golomb E, Centola M, Akseptijevich I, Kreiss Y, Goldman B, Pras M, Kastner DL, Pras E, Gasparini P, Bisceglia L, Beccia E, Gallucci M, De Sanctis L, Ponzzone A, Rizzoni GF, Zelante L, Bassi MT, George AL, Manzoni M, De Grandi A, Riboni M, Endsley JK, Ballabio A, Borsani G, Reig N, Fernández E, Estévez R, Pineda M, Torrents D, Camps M, Lloberas J, Zorzano A, Palacín M: (International Cystinuria Consortium). Non-Type I cystinuria caused by mutations in *SLC7A9*, encoding a subunit (b<sup>0+</sup>AT) of rBAT. *Nature Genet* 23: 52-57, 1999.
22. Reig N, Chillarón J, Bartoccioni P, Fernández E, Bendahan A, Zorzano A, Kanner B, Palacín M, Bertrán J: The light subunit of system b<sup>0+</sup> is fully functional in the absence of the heavy subunit. *EMBO J* 21: 4906-4914, 2002.
23. Fernández E, Carrascal M, Rousaud F, Abián J, Zorzano A, Palacín M, Chillarón J: The rBAT-bo,+AT heterodimer is the main apical reabsorption system for cystine in kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F540-F548, 2002.
24. Busch AE, Herzer T, Waldegger S, Schmidt F, Palacín M, Biber J, Markovich D, Murer H, Lang F: Opposite directed currents induced by the transport of dibasic and neutral amino acids in *Xenopus* oocytes expressing the protein rBAT. *J Biol Chem* 269: 25581-25586, 1994.
25. Chillarón J, Estévez R, Mora C, Wagner CA, Suessbrich H, Lang F, Gelpi JL, Testar X, Busch AE, Zorzano A, Palacín M: Obligatory amino acid exchange via systems b<sup>0+</sup>-like and y<sup>+</sup>L-like. A tertiary active transport mechanism for renal reabsorption of cystine and dibasic amino acids. *J Biol Chem* 271: 17761-17770, 1996.
26. Segal S. Disorders of renal amino acid transport. *N Engl J Med* 294: 1044-1051, 1976.
27. Calonge MJ, Gasparini P, Chillarón J, Chillon M, Gallucci M, Rousaud F, Zelante L, Testar X, Dallapiccola B, di Silverio F, Barceló P, Estivill X, Zorzano A, Nunes V, Palacín M: Cystinuria caused by mutations in rBAT, a gene involved in the transport of cystine. *Nature Genet* 6: 420-425, 1994.
28. Font M, Feliubadalo L, Estivill X, Nunes V, Golomb E, Kreiss Y, Pras E, Bisceglia L, d'Adamo AP, Zelante L, Gasparini P, Bassi MT, George A. Jr, Manzoni M, Riboni M, Ballabio A, Borsani G, Reig N, Fernández E, Zorzano A, Bertrán J, Palacín M: (International Cystinuria Consortium). Functional analysis of mutations in *SLC7A9*, and genotype/phenotype correlation in non-Type I cystinuria. *Hum Mol Genet* 10: 305-316, 2001.
29. Crawhall JC, Scowen EF, Thompson CJ, Watts RW: The renal clearance of amino acids in cystinuria. *J Clin Invest* 46: 1162-1171, 1967.
30. Torrents D, Mykkänen J, Pineda M, Feliubadalo L, Estévez R, De Cid R, Sanjurjo P, Zorzano A, Nunes V, Huoponen K, Reinikainen A, Simell O, Savontaus ML, Aula P, Palacín M: Identification of *SLC7A7*, encoding  $\gamma$ +LAT-1, as the lysinuric protein intolerance gene. *Nature Genet* 21: 293-296, 1999.
31. Mykkanen J, Torrents D, Pineda M, Camps M, Yoldi ME, Horelli-Kuitunen N, Huoponen K, Heinonen M, Oksanen J, Simell O, Savontaus ML, Zorzano A, Palacín M, Aula P: Functional analysis of novel mutations of  $\gamma$  + LAT-1 amino acid transporter gene causing Lysinuric protein intolerance (LPI). *Hum Mol Genet* 9: 431-438, 2000.
32. Palacín M, Borsani G, Sebastio G: The molecular bases of cystinuria and lysinuric protein intolerance. *Curr Opin Genet Develop* 11: 328-335, 2001.
33. Fernández E, Torrents D, Chillarón J, Martín del Río R, Zorzano A, Palacín M: Basolateral LAT-2 has a major role in the transepithelial flux of L-cystine in the renal proximal tubule cell line OK (sometido, octubre 2002).
34. Wollaston WH: New species of stone. *Trans Roy Soc (London)* 100: 223-239, 1810.
35. Garrod AE: Inborn errors of metabolism. *Lancet* 2: 1-7, 1909.
36. Bertrán J, Werner A, Chillarón J, Nunes V, Biber X, Testar X, Zorzano A, Estivill X, Murer H, Palacín M: Expression cloning of a human renal cDNA that induces high affinity transport of L-cystine shared with dibasic amino acid in *xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 268: 14842-14849, 1993.
37. Lee WS, Wells RG, Sabbag RV, Mohandas TK, Heideger MA: Cloning and chromosomal localization of human kidney cDNA involved in cystine, dibasic and neutral amino acid transport. *J Clin Invest* 91: 1959-1963, 1993.
38. Gasparini P, Calonge MJ, Bisceglia L, Purroy J, Dianzani I, Notarangelo A, Rousaud F, Galluci M, Testar X, Ponzzone A, Estivill X, Zorzano A, Palacín M, Nunes V, Zelante L: Molecular genetics of cystinuria: identification of a 4 new mutations and 7 polymorphism and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 57: 781-788, 1995.
39. Calonge MJ, Volpini V, Bisceglia L, Rousaud F, De Sanctis L, Beccia E, Zelante L, Testar X, Zorzano A, Estivill X, Gasparini P, Nunes V, Palacín M: The *SLC3A1* gene is linked to type I but not to type III cystinuria. *Proc Natl Acad Sci USA* 21: 9667-9671, 1995.
40. Wartenfeld R, Golomb E, Katz G, Bale SJ, Goldman B, Pras M, Kastner DL, Pras E: Molecular analysis of cystinuria in

- Libyan jews: exclusion of the SLC3A1 gene and mapping of a new locus on 19q. *Am J Hum Genet* 60: 617-624, 1997.
41. Purroy J, Bisceglia L, Calonge MJ, Zelante L, Testar X, Zorzano A, Estivill X, Palacín M, Nunes V, Gasparini P: Genomic structure and organization of the human rBAT gene (SLC3A1). *Genomics* 2: 249-252, 1996.
  42. Bisceglia L, Calonge MJ, Dello Strologo L, Rizzoni G, De Sanctis L, Gallucci M, Beccia E, Testar X, Zorzano A, Estivill X, Zelante L, Palacín M, Gasparini P, Nunes V: Molecular análisis of the cystinuria disease gene: identification of four new mutations one large deletion and one polymorphism. *Hum Genet* 4: 447-451, 1996.
  43. Bisceglia L, Purroy J, Jiménez-Vidal M, d'Adamo AP, Rousaud F, Beccia E, Penza R, Rizzoni G, Gallucci M, Palacín M, Nunes V, Zelante L: Cystinuria type I: identification of eight new mutation in SLC3A1. *Kidney Int* 59: 1250-1256, 2001.
  44. Palacín M, Goodyer P, Nunes V, Gasparini P: Cystinuria. The molecular and metabolic bases of inherited disease. Chapter 191. Eds. Scriver CR, Beaudet AL, Sly SW, Valle D; Ass. Eds. Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B. New York: McGraw-Hill, 2002.
  45. Chillarón J, Roca R, Valencia A, Zorzano A, Palacín M: Heteromeric amino acid transporters: biochemistry, genetics and physiology. *Am J Physiol Renal Physiol* 6: F995-F1018, 2001.
  46. Calonge MJ, Nadal M, Calvano S, Testar X, Zelante L, Zorzano A, Estivill X, Gasparini P, Palacín M, Nunes V: Assignment of the gene responsible for cystinuria (rBAT) and of markers D2S119 and D2S177 to 2p16 by fluorescent *in situ* hybridization. *Hum Genet* 6: 633-636, 1995.
  47. Pras E, Arber N, Aksentijevich I, Katz G, Schapiro JM, Prosen L, Gruberg L, Harel D, Liberman U, Weissenbach J, y cols.: *Nature Genet* 4: 415-419, 1994.
  48. Yan N, Mosckovitz R, Gerber LD, Mathew S, Murty VV, Tate SS, Udenfriend S: Characterization of the promoter region of the gene for the rat neutral and basic amino acid transporter and chromosomal localization of the human gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 16: 7548-7552, 1994.
  49. McKusick VA: Cystinuria, in Mendelian Inheritance in Man. Catalogs of autosomal dominant, autosomal recessive, and X linked phenotypes. 9<sup>th</sup> Edition. Baltimore and London: the Johns Hopkins University Press. p. 1128-1129, 1990.
  50. Bisceglia L, Calonge MJ, Totaro A, Feliubadaló L, Melchionda S, García J, Testar X, Gallucci M, Ponzone A, Zelante L, Zorzano A, Estivill X, Gasparini P, Nunes V, Palacín M: Localization by linkage análisis of the cystinuria type III gene to chromosome 19q13.1. *Am J Hum Genet* 60: 611-616, 1997.
  51. Feliubadaló L, Bisceglia L, Font M, Dello Strologo L, Beccia E, Arslan-Kirchner M, Steinmann B, Zelante L, Estivill X, Zorzano A, Palacín M, Gasparini P, Nunes V: Recombinant families locate the gene for non-type I cystinuria between markers C13 and D19S587 on chromosome 19q13.1. *Genomics* 3: 362-365, 1999.
  52. International Cystinuria Consortium: Feliubadaló M, Font J, Purroy F, Rousaud F, Estivill X, Nunes V y cols.: Non-type I cystinuria caused by mutations in SLC7A9, coding for a subunit (bo,<sup>rat</sup>) of rBAT. *Nature Genet* 23: 52-57, 1999.
  53. International Cystinuria Consortium: Font M, Feliubadaló X, Nunes V y cols.: *Human Mol Genet* 10: 305-316, 2001.
  54. Rousaud F: Consideraciones acerca de la cistinuria y la litiasis renal de cistina. *Act Fund Puigvert* 21: 18-19, 2002.
  55. Rousaud F, Rousaud A, Barceló P: Mejor médico del paciente cistiúrico. *Rev Port Nefrol Hipert* 8: 289-299, 1994.
  56. Guillén M, Corella D, Cabello ML, González JI, Hernández-Yágo J: Manifestaciones fenotípicas de la cistinuria: estudio de 20 familias en la Comunidad Valenciana. *Med Clin (Barc)* 115: 610-616, 2000.
  57. Rousaud F, Gracia S, Palacín M, Nunes V, Millán F, Oliver A, Rousaud A: Cistinuria y litiasis renal de cistina. Estudio y enfoque terapéutico. *Arch Esp Urol* 54: 989-996, 2001.
  58. Rousaud F: Cistinuria humana. Perspectivas actuales sobre una vieja enfermedad. *Nefrología* 15: 515-516, 1995.
  59. Rousaud F, Gracia S, Millán F, Rousaud A: Litogénesis de los cálculos de cistina. *Act Fund Puigvert* 20: 192-200, 2001.
  60. Pontesilli C, Dello Strologo L, Beccia E, Rousaud F y cols.: Cystinuria: preliminary data from a newly created multinational registry. 34<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Society for Paediatric Nephrology. Helsinki. Finland. June 2000.
  61. Dello Strologo L, Pras E, Pontesilli C, Beccia E, Ricci-Barbini V, De Sanctis L, Ponzone A, Gallucci M, Bisceglia L, Zelante L, Jiménez-Vidal M, Font M, Zorzano A, Rousaud F, Nunes V, Gasparini P, Palacín P, Rizzoni G: Comparison between SLC3A1 and SLC7A9 cystinuria patients and carriers: a need for a new classification. *J Am Soc Nephrol* 13: 2547-2553, 2002.
  62. Rosemberg LE, Downing S, Durant JL, Segal S: Cystinuria: biochemical evidence of three genetically distinct diseases. *J Clin Invest* 46: 365-369, 1966.
  63. Rousaud F, Rousaud A, Nunes V, Barceló P, Palacín M: Progrès dans la génétique de la cistinurie. *Ann Urol* 29: 346-350, 1995.