

بررسی جهش در اگزون‌های ۸ و ۳ ژن SLC3A1 و اگزون‌های ۴ و ۱۰ ژن SLC7A9 در بیماران مبتلا به سیتینوری در ایران

لیلا کولیوند^۱، دکتر مهرداد محمدی^۲، دکتر رسول صالحی^۳، بهروز عزت‌پور^۴، دکتر مجید خیراللهی^۵

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سیتینوری یکی از اولین اختلالات متابولیکی توصیف شده توسط گارود می‌باشد که با افزایش ترشح سیستین، آرژنین، لیزین و اورنیتین به درون ادرار مشخص می‌شود. دو ژن در ارتباط با بیماری شناخته شده است: ژن SLC3A1 (۲p۱۶/۳) کدکننده‌ی زیر واحد سنگین rBAT، متعلق به ترانسپورتر کلیوی b⁰⁺ و ژن SLC7A9 (۱۹q۱۳/۱) که زیر واحد سبک ترانسپورتر را کدگذاری می‌کند. بیماران با دو جهش در ژن SLC3A1 به عنوان نوع A، بیماران با دو جهش در ژن SLC7A9 به عنوان نوع B شناخته می‌شوند. بیماران با سیتینوری نوع AB دارای یک جهش در ژن SLC3A1 و یک جهش در ژن SLC7A9 باشند. با وجود توزیع اختصاصی جهش در جمعیت‌های خاص، مطالعات محدودی در خاور میانه صورت گرفته است. این مطالعه نتایج بررسی ژنتیکی در بیماران مبتلا به سیتینوری در ایران را ارائه می‌دهد.

روش‌ها: ۳۰ بیمار تحت عمل جراحی برداشتن سنگ لیه، توسط پزشک متخصص اورولوژیست با تشخیص سنگ‌های سیستینی انتخاب شدند. بیماران برای تعیین جهش، با استفاده از روش‌های ARMS (Amplification refractory mutation system) و PCR-RFLP (Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism) مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: در مجموع چند واریانت اعم از بد معنی، پلی‌مورفیسیم هم‌معنی و واریانت اینترونی یافت شدند؛ اما جهش‌های شایع مطالعات دیگر، در بیماران این مطالعه یافت نشدند.

نتیجه‌گیری: شاید بتوان این مطالعه را تأییدی بر اثر نژادی روی توزیع جهش‌ها در بیماران سیتینوری دانست. امید آن می‌رود که این مطالعه بتواند در درک ژنتیک مولکولی بیماران سیتینوری در ایران روشنگر باشد.

واژگان کلیدی: جهش، سیتینوری، ایران

ارجاع: کولیوند لیلا، محمدی مهرداد، صالحی رسول، عزت‌پور بهروز، خیراللهی مجید. بررسی جهش در اگزون‌های ۸ و ۳ ژن SLC3A1 و اگزون‌های ۴ و ۱۰ ژن SLC7A9 در بیماران مبتلا به سیتینوری در ایران. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۹۳): ??

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد به شماره‌ی ۳۹۱۴۳۳ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات بیماری‌های ارثی کودکان و گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استادیار، گروه اورولوژی، دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات پیوند کلیه، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دانشیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های ارثی کودکان و گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- دانشجوی دکتری، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران

۵- استادیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های ارثی کودکان و گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: mkheirollahi@med.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مجید خیراللهی

تاکنون بیش از ۱۰۰ جهش در ژن SLC3A1 و نزدیک به ۱۰۰ جهش در ژن SLCVA9 یافت شده است (۱۴، ۱۲). این مطالعه بررسی تعیین جهش‌های شایع در بیماران سیتینوری در کشور ایران می‌باشد.

روش‌ها

نمونه‌گیری: در این مطالعه از ۱۵۰۰ بیمار که در بیمارستان الزهرا (س) دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تحت عمل جراحی سنگ کلیه قرار گرفته بودند، ۳۰ بیمار بر اساس جنس سنگ (سیتینی) انتخاب شدند. همه‌ی بیماران دارای تاریخچه‌ی افزایش ترشح ادراری سیتین و آمینو اسیدهای دی‌بازیک بودند و سنگ‌سازی (مکرر) از نوع سیتین داشتند. پس از اخذ رضایت‌نامه، از تمام بیماران نمونه‌گیری خون انجام شد. استخراج DNA از لئوسیت‌های خون با روش بی‌بی‌بی (Biogenet kit, Korea) انجام شد.

چهار مورد از شایع‌ترین جهش‌های یافت شده در مطالعات قبلی شامل T216M، M467T (SLC3A1) و R3337G، 105R (SLCVA9) در بیماران مورد بررسی قرار گرفتند (۱۹-۱۲). به این منظور، پرایمرهای مشتق از ایترون با استفاده از داده‌های بیوانفورماتیکی تهیه شدند (جدول ۱). محصولات واکنش با استفاده از کیت BigDye terminator kit و آنالایزر ژنتیکی Biosystems® 3730 مورد آنالیز قرار گرفت.

آنالیز PCR-RFLP (Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism)

دو جهش شناخته شده‌ی G105R (اگزون ۴) و R3337W (اگزون ۱۰) واقع در ژن SLCVA9 با

مقدمه

سیتینوری یکی از اولین اختلالات متابولیسم مادرزادی است که توسط گارود توصیف شد (۱). بیماری با افزایش ترشح سیتین و آمینو اسیدهای دی‌بازیک در ادرار شناخته می‌شود. بیماری به علت انتقال مختل شده‌ی این آمینو اسیدها از طریق سلول‌های اپیتلیال مجرای پروکسیمال کلیوی و دستگاه گوارش ایجاد می‌شود (۳-۲). شیوع جهانی سیتینوری ۱ در ۷۰۰۰ نفر برآورد شده است، در حالی که این میزان دامنه‌ای از ۱ در ۲۵۰۰ نفر در یهودیان لیبیایی تا ۱ در ۱۰۰۰۰ نفر در بیماران سوئدی را دارا می‌باشد (۶-۲). در مطالعه‌ی، شیوع سیتینوری در ایران ۶-۲ درصد ذکر شده است (۷). تاکنون دو ژن در ارتباط با این بیماری شناخته شده است: SLC3A1 (MIM # 104614, CSNU1) و SLCVA9 (MIM # 604144, CSNU3).

ژن SLC3A1 که روی بازوی کوتاه کروموزوم ۲ (۲p16/۳) واقع شده است، زیر واحد بزرگ (rBAT) ترانسپورتر $b^{0,+}$ را کد می‌کند. ژن SLCVA9 روی بازوی بلند کروموزوم ۱۹ (۱۹q۱۳/۱) قرار گرفته است و کد کننده‌ی زیر واحد کوچک ترانسپورتر می‌باشد (۹-۸). ابتدا SLC3A1 در سال ۱۹۹۴ شناسایی شد (۱۱-۱۰). سپس SLCVA9 توسط آنالیز پیوستگی نقشه‌یابی شد (۱۳-۱۲). در سال ۲۰۰۲، سیتینوریا بر اساس ژنتیک مولکولی به نوع A (جهش در ژن SLC3A1)، نوع B (جهش در ژن SLCVA9) و نوع AB (یک جهش در SLC3A1 و یک جهش در SLCVA9) طبقه‌بندی شد (۱۵-۱۴).

مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

یافته‌ها

از آن جایی که چند مورد از محصولات PCR به منظور تأیید روش‌های RFLP و ARMS مورد توالی‌یابی قرار گرفتند، در مجموع چهار واریانت در ژن SLC3A1 یافت شد که شامل p.G105R (اگزون ۴) رایج‌ترین جهش پاتوژن گزارش شده در ژن SLCVA9 (۱۷، ۸)، دو پلی‌مورفیسم p.C137C (۱۴) و $c.478 + 10T > C$ (اگزون ۴) (۱۴) و در نهایت، واریانت p.V142A (اگزون ۴) (۲۰) می‌باشند (جدول ۲). از چهار جهش نقطه‌ای مورد مطالعه در بیماران، جهش‌های T216M، M467T و R333W با وجود این که از رایج‌ترین جهش‌های یافت شده در سطح جهانی می‌باشند، در هیچ کدام از بیماران پیدا نشد؛ اما G105R در دو بیمار در حالت هتروزیگوت مشخص شد.

بحث

سیستمیوری در ایران یکی از بیماری‌های ارثی به علت نقص در بازه جذب کلیوی سیستمین و آمینو اسیدهای دی‌بازیک اتفاق می‌افتد. در تحقیق حاضر، از ۱۵۰۰ بیمار که به منظور برداشت سنگ کلیه در

استفاده از آنزیم‌های محدودگر ApaI و NciI به ترتیب، مورد بررسی قرار گرفتند که هر دو جهش محل برش این آنزیم‌ها را تخریب می‌کنند. این روش با توالی‌یابی تعدادی از محصولات PCR تأیید شد.

Polymerase chain reaction-) PCR-ARMS (Amplification refractory mutation system

دو جهش رایج دیگر شامل M467T (اگزون ۸) و T216M (اگزون ۳) که در ژن SLC3A1 وجود دارند، با این روش مورد مطالعه قرار گرفتند. پرایمرهای موتانت برای هر دو جهش در دو نوکلئوتید ناسازگار در هفت باز اول سر ۳' با توالی طبیعی بودند. نتایج با توالی‌یابی مستقیم تعدادی از محصولات مورد تأیید قرار گرفتند. واکنش PCR در حجم $25 \mu\text{l}$ شامل 150 ng DNA ژنومیک، $2/5 \mu\text{l}$ بافر $10 \times$ ، $0/25 \mu\text{l}$ Taq پرایمر، $200 \mu\text{mol/l}$ dNTP (Deoxyribonucleotide) و 400 nmol/l پرایمر انجام شد.

پروفایل دمایی برای ۳۵ سیکل واکنش با دناتوراسیون ابتدایی 94°C به مدت ۴ دقیقه آغاز شد و با ۳۵ سیکل در 94°C به مدت ۲۰ ثانیه، اتصال در $55/5-62/5$ (دمای مناسب برای هر جفت پرایمر تعیین شد) به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن در 72°C به مدت ۳۰ ثانیه و طویل شدن نهایی در 72°C به

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در واکنش ARMS و RFLP

ژن	اگزون	پرایمر رفت	پرایمر برگشت	روش
SLC3A1	۳	ATGAGGTTTGAGAGAAGCAC	RN:GAAACCAAATATGTTTATCACTCG RM:GAAACCAAATATGTTTATCACTCA RS:ATCTGCCTTTTACCCCTTTG	ARMS Sequence
	۸	ACCCTTTTCTTGCTCATCAG	RN:AGGGAGTGTGAAAAGAAGCA RM:GGGAGTGTGAAAAGATGCG RS:ATAAGCTCTCAGACCACAA	ARMS Sequence
SLCVA9	۴	CCCTTCTCTGTGTTCAG	GTCTTTTCTGACCCCTGCC	RFLP
	۱۰	TCTCAGTGCCTTAACCTCCTC	GCATCTGGGTCATTTGGAAGC	RFLP

RN: پرایمر برگشت طبیعی، RM: پرایمر برگشت جهش یافته، RS: پرایمر برگشت برای توالی‌یابی

ARMS: Amplification refractory mutation system; RFLP: Restriction fragment length polymorphism

جدول ۲. جهش‌های یافت شده در ژن‌های SLC3A1 و SLCVA9 و فراوانی آللی

ژن	اگزون/ایترون	تغییر نوکلئوتیدی	تغییر آمینو اسید	نوع تغییر	فراوانی آللی
SLC3A1	۸	c.1400T/C	M467T	بد معنی	۰ از ۶۰
	۳	c.647C/T	T216M	بد معنی	۰ از ۶۰
SLCVA9	۴	c.425T/C	V142A	بد معنی	۳ از ۶۰
	۴	c.498G/A	G105R	بد معنی	۲ از ۶۰
	۴	c.478+10T/C		واریانت ایترونی	۳ از ۶۰
	۴	c.411T/C	C137C	پلی مورفیسم	۳ از ۶۰
	۱۰	c.1182C/T	R333W	بد معنی	۰ از ۶۰

لوپ خارج سلولی EL2 پروتئین AT^{b+} قرار دارد (۲۰). از آن جایی که این جهش در افراد طبیعی بدون بروز سیستینوری دیده شده است (۲۰)، کشمکش‌هایی در خصوص بیماری‌زایی این واریانت وجود دارد (۱۴).

یکی از پلی‌مورفیسم‌های یافت شده در بیماران C137C (C > 411T) می‌باشد که در بیماران سیستینوری کشورهایمانند پرتغال (۱۴)، یونان (۲۵) سوئد (۲۷) گزارش شده است. امروزه مطالعات نشان دهنده‌ی وجود جهش‌های خاموشی می‌باشد که برخلاف نامشان، عواقب بسیار مخربی مانند تخریب حواصی تنظیمی یا اختلال در عمل پیرایش را ایجاد می‌کنند (۲۹، ۳۰، ۱۴).

R333W جهش رایج در اگزون ۱۰ ژن SLCVA9 می‌باشد (۳۱، ۲۲، ۱۷، ۱۲) که در بیماران این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. این جایگاه در خانواده‌ی ترانسپورترهای آمینو اسیدی هترو دایمیک در انسان بسیار حفاظت شده است (۲۰). این جهش در مطالعات انجام شده در آلمان (۳۲، ۲۳، ۱۸، ۱۶)، چک اسلواکی (۹)، یونان (۳۳، ۲۵)، ژاپن (۲۰) و ... گزارش شده است، اما در بیماران مطالعه‌ی کنونی دیده نشد.

بیمارستان الزهرا (س) دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تحت عمل جراحی قرار گرفتند، ۳۰ بیمار با سنگ‌های سیستینی توسط پزشک اورولوژیست انتخاب شدند. بیماران برای چهار مورد جهش شایع ژنتیکی در نواحی کد کننده‌ی ژن SLC3A1 و SLCVA9 بررسی شدند. در مجموع، چهار واریانت ژنومیک در ژن SLCVA9 مشخص شد. این موارد شامل یک واریانت ایترونی، دو جهش بد معنی، یک جهش هم معنی در ژن می‌باشند.

فراوان‌ترین جهش یافت شده در ژن SLCVA9 مربوط به G105R بود (۲۱، ۱۹-۱۶، ۸). این جهش بعد از اولین لوپ داخل سلولی (IL1) قرار دارد (۲۲) و افزایش شدید ترشح سیستین در هتروزیگوت‌های این واریانت را باعث می‌شود (۱۷) و در بیماران سیستینوری کشورهای اروپایی از جمله آلمان (۲۳)، ۲۱، ۱۸)، ایتالیا (۲۴-۲۳، ۲۱)، چک اسلواکی (۹)، یونان (۲۵) و ... دیده شده است؛ اما در چین (۲۶)، ژاپن (۲۰) و آمریکا (۸) یافت نشده است. V142A جهش بد معنی گزارش شده در کشورهای مثل ژاپن (۲۰)، پرتغال (۱۴)، سوئد (۲۷)، یونان (۲۸، ۲۵)، کانادا و آلمان (۱۸) در بیماران مطالعه‌ی حاضر نیز دیده شد. V142A در اگزون چهار ژن SLCVA9 در

SLCVA9 از جمله واریانت‌های یافت شده بود. به طور خلاصه، در این مطالعه چهار واریانت ژنتیکی یافت شد. از چهار جهش رایج در سطح جهانی، در این مطالعه فقط G105R در دو آلل یافت شد. با توجه به این که نتایج ژنتیک مولکولی ممکن است بر پیش‌آگهی و سیر درمان بیماری مؤثر باشد (۱۸)، امید می‌رود این مطالعه در روشن شدن ژنتیک مولکولی بیماران ایرانی کمک کند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از استادان ارجمند دانشکده ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و تمام بیمارانی که در این طرح ما را یاری رساندند، تقدیر و تشکر می‌شود.

جهش M46VT به عنوان رایج‌ترین تغییر در ژن SLC3A1، اولین بار در یک بیمار اسپانیایی شناخته شد (۱۰). این جهش در آلمان (۲۱، ۱۸، ۱۶)، سوئد (۳۴)، چک اسلواکی (۹)، ترکیه (۴)، اسپانیا (۳۶-۳۵) و آمریکا (۳۷) گزارش شده است. با این وجود، این جهش در هیچ یک از بیماران مطالعه‌ی حاضر همانند بیماران ژاپنی مشخص نشد (۳۸).

تغییر T216M به عنوان دیگر جهش شایع که در بیماران مورد بررسی قرار گرفت، اولین بار در یک بیمار مصری-ایتالیایی (۳۹) یافت شد. این جهش رایج‌ترین جهش در یونان (۴۰، ۳۳، ۱۶)، ترکیه (۱۶)، آلمان (۱۸) و دیگر کشورها ذکر شده است. این جهش نیز در مطالعه‌ی حاضر پیدا نشد. علاوه بر این، واریانت ایترونی $C > 10T + c.478$ (اگزون ۷) (۱۴) در ژن

References

- Garrod AE. Inborn errors of metabolism (lectures I-IV). Lancet 1908; 2: 214-20.
- Palacin M, Goodyear P, Nunes V, Gasparini P. Cystinuria. In: Scriver C, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. The metabolic and molecular basis of inherited disease. 8th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2001.
- Palacin M, Borsari S, Sebastio G. The molecular bases of cystinuria and lysinuric protein intolerance. Curr Opin Genet Dev 2001; 11(3): 328-35.
- Tanzer F, Ozgur A, Bardakci F. Type I cystinuria and its genetic basis in a population of Turkish school children. Int J Urol 2007; 14(10): 914-7.
- Saravakos P, Kokkinou V, Giannatos E. Cystinuria: current diagnosis and management. Urology 2014; 83(4): 693-9.
- Knoll T, Zollner A, Wendt-Nordahl G, Michel MS, Alken P. Cystinuria in childhood and adolescence: recommendations for diagnosis, treatment, and follow-up. Pediatr Nephrol 2005; 20(1): 19-24.
- Akhavan sepahi M, Sharifian M, Shajari A, Heidary A. Clinical manifestations and etiology of renal and urethra stone in children less than 14 years old referring to Fatemi-e-Sahamieh pediatric hospital in Qom, 2007-2008. J Arak Univ Med Sci 2009; 12(3): 1-7. [In Persian].
- Feliubadalo L, Font M, Purroy J, Rousaud F, Estivill X, Nunes V, et al. Non-type I cystinuria caused by mutations in SLC7A9, encoding a subunit (bo,+AT) of rBAT. Nat Genet 1999; 23(1): 52-7.
- Skopkova Z, Hrabincova E, Stastna S, Kozak L, Adam T. Molecular genetic analysis of SLC3A1 and SLC7A9 genes in Czech and Slovak cystinuric patients. Ann Hum Genet 2005; 69(Pt 5): 501-7.
- Calonge MJ, Gasparini P, Chillaron J, Chillon M, Gallucci M, Rousaud F, et al. Cystinuria caused by mutations in rBAT, a gene involved in the transport of cystine. Nat Genet 1994; 6(4): 420-5.
- Pras E, Raben N, Golomb E, Arber N, Aksentijevich I, Schapiro JM, et al. Mutations in the SLC3A1 transporter gene in cystinuria. Am J Hum Genet 1995; 56(6): 1297-303.
- Eggermann T, Venghaus A, Zerres K. Cystinuria: an inborn cause of urolithiasis. Orphanet J Rare Dis 2012; 7: 19.
- Wartenfeld R, Golomb E, Katz G, Bale SJ, Goldman B, Pras M, et al. Molecular analysis of

- cystinuria in Libyan Jews: exclusion of the SLC3A1 gene and mapping of a new locus on 19q. *Am J Hum Genet* 1997; 60(3): 617-24.
14. Barbosa M, Lopes A, Mota C, Martins E, Oliveira J, Alves S, et al. Clinical, biochemical and molecular characterization of cystinuria in a cohort of 12 patients. *Clin Genet* 2012; 81(1): 47-55.
 15. Dello SL, Pras E, Pontesilli C, Beccia E, Ricci-Barbini V, de SL, et al. Comparison between SLC3A1 and SLC7A9 cystinuria patients and carriers: a need for a new classification. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(10): 2547-53.
 16. Schmidt C, Vester U, Hesse A, Lahme S, Lang F, Zerres K, et al. 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(2): 75-8.
 17. Font MA, Feliubadalo L, Estivill X, Nunes V, Golomb E, Kreiss Y, et al. Functional analysis of mutations in SLC7A9, and genotype-phenotype correlation in non-Type I cystinuria. *Hum Mol Genet* 2001; 10(4): 305-16.
 18. Eggermann T, Spengler S, Wirth J, Lahme S. Molecular genetic testing in cystinuria. *Int J Human Genet* 2011; 11(1): 41-4.
 19. Di PM, Louizou E, Fischetti L, Dedoussis GV, Stanziale P, Michelakakis H, et al. Twenty-four novel mutations identified in a cohort of 85 patients by direct sequencing of the SLC3A1 and SLC7A9 cystinuria genes. *Genet Test* 2008; 12(3): 351-5.
 20. Shigeta Y, Kanai Y, Chairoungdua A, Ahmad N, Sakamoto S, Matsuo H, et al. A novel missense mutation of SLC7A9 frequent in Japanese cystinuria cases affecting the C-terminus of the transporter. *Kidney Int* 2006; 69(7): 1198-206.
 21. Botzenhart E, Vester U, Schmidt C, Hesse A, Halber M, Wagner C, et al. Cystinuria in children: distribution and frequencies of mutations in the SLC3A1 and SLC7A9 genes. *Kidney Int* 2002; 62(4): 1136-42.
 22. Chillaron J, Font-Llitjos M, Fort J, Zorzano A, Goldfarb DS, Nunes V, et al. Pathophysiology and treatment of cystinuria. *Nat Rev Nephrol* 2010; 6(7): 424-34.
 23. Schmidt C, Albers A, Tomiuk J, Eggermann K, Wagner C, Capasso G, et al. 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(5): 342-8.
 24. Bisceglia L, Fischetti L, Bonis PD, Palumbo O, Augello B, Stanziale P, et al. Large rearrangements detected by MLPA, point mutations, and survey of the frequency of mutations within the SLC3A1 and SLC7A9 genes in a cohort of 172 cystinuric Italian patients. *Mol Genet Metab* 2010; 99(1): 42-52.
 25. Chatzikyriakidou A, Sofikitis N, Georgiou I. Identification of novel cystinuria mutations and polymorphisms in SLC3A1 and SLC7A9 genes: absence of SLC7A10 gene mutations in cystinuric patients. *Genet Test* 2005; 9(3): 175-84.
 26. Yuen YP, Lam CW, Lai CK, Tong SF, Li PS, Tam S, et al. Heterogeneous mutations in the SLC3A1 and SLC7A9 genes in Chinese patients with cystinuria. *Kidney Int* 2006; 69(1): 123-8.
 27. Harnevik L, Fjellstedt E, Molbaek A, Denneberg T, Soderkvist P. Mutation analysis of SLC7A9 in cystinuria patients in Sweden. *Genet Test* 2003; 7(1): 13-20.
 28. Chatzikyriakidou A, Sofikitis N, Giannakis D, Tsambalas S, Georgiou I. 466 Six novel polymorphic variants in SLC3A1 and SLC7A9 genes: New approaches to the study of cystinuria. *European Urology Supplements* 2004; 3(2): 19.
 29. Raponi M, Baralle D. Alternative splicing: good and bad effects of translationally silent substitutions. *FEBS J* 2010; 277(4): 836-40.
 30. Magani F, Raponi M, Baralle FE. Synonymous mutations in CFTR exon 12 affect splicing and are not neutral in evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(18): 6368-72.
 31. Font-Llitjos M, Jimenez-Vidal M, Bisceglia L, Di PM, de SL, Rousaud F, et al. New insights into cystinuria: 40 new mutations, genotype-phenotype correlation, and digenic inheritance causing partial phenotype. *J Med Genet* 2005; 42(1): 58-68.
 32. Schmidt C, Tomiuk J, Botzenhart E, Vester U, Halber M, Hesse A, et al. Genetic variations of the SLC7A9 gene: allele distribution of 13 polymorphic sites in German cystinuria patients and controls. *Clin Nephrol* 2003; 59(5): 353-9.
 33. Chatzikyriakidou A, Louizou E, Dedoussis GV, Bisceglia L, Michelakakis H, Georgiou I. An overview of SLC3A1 and SLC7A9 mutations in Greek cystinuria patients. *Mol Genet Metab* 2008; 95(3): 192-3.
 34. Harnevik L, Fjellstedt E, Molbaek A, Tiselius HG, Denneberg T, Soderkvist P. Identification of 12 novel mutations in the SLC3A1 gene in Swedish cystinuria patients. *Hum Mutat* 2001; 18(6): 516-25.
 35. Guillen M, Corella D, Cabello ML, Gonzalez JJ, Sabater A, Chaves JF, et al. Identification of novel SLC3A1 gene mutations in Spanish cystinuria families and association with clinical phenotypes. *Clin Genet* 2005; 67(3): 240-51.
 36. Gasparini P, Calonge MJ, Bisceglia L, Purroy J, Dianzani I, Notarangelo A, et al. Molecular

- genetics of cystinuria: identification of four new mutations and seven polymorphisms, and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 1995; 57(4): 781-8.
37. Endsley JK, Phillips JA, III, Hruska KA, Denneberg T, Carlson J, George AL, Jr. Genomic organization of a human cystine transporter gene (SLC3A1) and identification of novel mutations causing cystinuria. *Kidney Int* 1997; 51(6): 1893-9.
38. Egoshi KI, Akakura K, Kodama T, Ito H. Identification of five novel SLC3A1 (rBAT) gene mutations in Japanese cystinuria. *Kidney Int* 2000; 57(1): 25-32.
39. Bisceglia L, Calonge MJ, Dello SL, Rizzoni G, de SL, Gallucci M, et al. Molecular analysis of the cystinuria disease gene: identification of four new mutations, one large deletion, and one polymorphism. *Hum Genet* 1996; 98(4): 447-51.
40. Albers A, Lahme S, Wagner C, Kaiser P, Zerres K, Capasso G, et al. Mutations in the SLC3A1 gene in cystinuric patients: frequencies and identification of a novel mutation. *Genet Test* 1999; 3(2): 227-31.

Proof Version

Detection of Mutation in Exons 3 and 8 of SLC3A1 and Exons 4 and 10 of SLC7A9 Genes in Patients Affected by cystinuria in Iran

Leila Koulivand¹, Mehrdad Mohammadi MD², Rasoul Salehi MD³, Behrouz Ezatpour MSc⁴,
Majid Kheirollahi PhD⁵

Original Article

Abstract

Background: Cystinuria, one of the first inborn errors of metabolism, is recognized by hyperexcretion of cystine, lysine, ornithine arginine and into urine. So far, two genes associated with cystinuria have been identified: SLC3A1 (2p16.3) that encodes the heavy subunit rBAT of the renal b⁰⁺ transporter and SLC7A9 (19q13.1), which encodes the light subunit b⁰⁺AT. Patients with type A cystinuria have two SLC3A1 mutations, whereas patients with type B cystinuria have two SLC7A9 mutations and finally patients with type AB have one mutation in each gene. Considering the population-specific distribution of mutations in disease, limited studies on the genetic bases of the cystinuria have been done in Middle East. This research presents the results of mutation analysis on patients with cystinuria in Iran.

Methods: Thirty unrelated cystinuria patients operated to remove kidney stones were screened by urologist. The patients were analyzed for mutation using ARMS-PCR and RFLP-PCR methods.

Findings: We found some variations including missense mutations, polymorphism and intron variant, but the most frequent mutations, M467T and also T216I and R333W, were not detected in our patients.

Conclusion: Our research may confirm the ethnic distribution of mutations in cystinuria and hopefully this study will expand our concept of the genetic basis of cystinuria in Iranian patients.

Keywords: Cystinuria, Mutation, Iran

Citation: Koulivand L, Mohammadi M, Salehi R, Ezatpour B, Kheirollahi M. **Detection of Mutation in Exons 3 and 8 of SLC3A1 and Exons 4 and 10 of SLC7A9 Genes in Patients Affected by cystinuria in Iran.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(293): ??.

* This paper is derived from a MSc thesis No. 391433 in Isfahan University of Medical Sciences.

1- MSc Student, Pediatrics Inherited Diseases Research Center AND Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Urology, School of Medicine AND Urology and Kidney Transplantation Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Associate Professor, Pediatrics Inherited Diseases Research Center AND Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- PhD Student, Razi Herbal Medicines Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

5- Assistant Professor, Pediatrics Inherited Diseases Research Center AND Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Majid Kheirollahi PhD, Email: mkheirollahi@med.mui.ac.ir