

Relació estructura-funció en la família de transportadors d'aminoàcids heteromultimèrics. Identificació d'una nova família de transportadors lisosomals

Raúl Estévez Povedano

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNITAT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
FACULTAT DE BIOLOGIA
UNIVERSITAT DE BARCELONA

**RELACIÓ ESTRUCTURA-FUNCIÓ EN LA FAMÍLIA DE
TRANSPORTADORS D'AMINOÀCIDS HETEROMULTIMÈRICS
IDENTIFICACIÓ D'UNA NOVA FAMÍLIA DE
TRANSPORTADORS LISOSOMALS**

RAÚL ESTÉVEZ POVEDANO

Barcelona, desembre de 1999

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100.



DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
FACULTAT DE BIOLOGIA
UNIVERSITAT DE BARCELONA
PROGRAMA DE DOCTORAT DE BIOQUÍMICA, BIENNI 1995-1997

Memòria presentada per optar al grau de Doctor en Bioquímica per

RAÚL ESTÉVEZ POVEDANO

L'interessat

Raúl Estévez Povedano

Vist i plau
del director

M. PALACÍN

Dr. Manuel Palacín Prieto
Catedràtic de Bioquímica i Biologia Molecular
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Universitat de Barcelona

AGRAÏMENTS

La realització de la tesi doctoral representa una oportunitat única de formació en l'àmbit de la recerca i la docència. En el meu cas, no ha representat únicament això, sinó que m'ha permès millorar en les meves actituds personals. En aquests tres aspectes voldria agrair a diferents persones per les seves aportacions.

Voldria agrair al Dr. Manuel Palacín per la seva direcció durant aquests anys: la seva capacitat de treball, la visió clara i objectiva dels projectes, la seva honestat i confiança amb els seus col·laboradors seran per mi exemples a seguir. Especialment, vull recordar dos moments: el seu recolzament durant la realització del MBA i el confiar en mi en el projecte de la coexpressió funcional. Només manifestar el desig de que puguem treballar junts en el futur, d'una manera o altra.

Gràcies al Dr. Antonio Zorzano per la seva visió crítica i la seva predisposició a compartir amb mi els seus coneixements. Moltes gràcies al Dr. Xavier Testar per la seva amabilitat i per preocupar-se tant per la meua formació.

Gràcies al Josep per la seva formació al inici d'aquesta tesi. Vaig gaudir molt treballant amb tu, desitjo que les coses et vagin molt bé facis el que facis. Gràcies a Conxi per la seva amistat.

A la Perla Kaliman i la Marta Camps gràcies pel seu suport i la seva preocupació. També gràcies a la Marta en els experiments de biologia cel·lular. Gràcies a l'Anna Gumà per la seva amabilitat.

Gràcies als antics del grup: Tomàs, Francesc, Puri, Lúdia, Marc, Sílvia, Gemma per totes les discussions que hem tingut. També al més antic i més nou, Joan, del qual he pogut gaudir aquests últims mesos de les seves ensenyances.

Voldria agrair a en David per ser el millor company que podia haver tingut. Et desitjo molta sort en el teu post-doc i espero que puguem treballar junts en el futur.

Gràcies Marta per la teva paciència i les correccions del català. Desitjo que et vagin molt bé les coses en la teva tesi doctoral. Gràcies Núria i Espe per la vostra simpatia.

També vull agrair a la resta de companys del grup pel seu suport moral i la seva preocupació constant: Horacio, gràcies a tu vaig poder escriure la tesi, quan estiguis acabant tu la tesi repetirem el partit. Gràcies Dani, per l'ajuda al realitzar alguns northern. Moltes gràcies a César, Eva, Judith Canicio, Manu, Emma, Eli, Anna Ros, Marta, Anna, Luc, Bernhart, Sara, Anna, Judith.

Gràcies a tota la gent de l'IRO per la seva disposició a ajudar: Julia, en el principi de la tesi, espero que obtinguis el que tu vols en la teua carrera com a científic; Jordi, sempre disposat a ajudar, gràcies en el cribratge per hibridació, Nònia, Mariona, Jesus, gràcies en el cribratge dels fags, Asun, etc.. Gràcies a Virginia per la seva simpatia i amabilitat.

Gràcies als nostres col·laboradors de la Universitat de Tübingen, Carsten, Andreas, Stefan i Florian per les discussions i la realització dels experiments d'electrofisiologia.

Gràcies al professor Hediger per permetre'm treballar en el seu laboratori. Vull agrair especialment a Hiroyasu per l'ajuda en la construcció i cribratge de la llibreria, Taro per l'ajuda en la obtenció dels RNAs i el seu fraccionament i per mostrar-me el menjar japonès, Urs per les magnífiques hibridacions in situ, Xing-Zhen pels intents de mesurar corrents amb LyCAT i les discussions de biofísica.

Gràcies a Ernest Wright pels consells en els experiments de criofractura i per la seva amabilitat sempre que hem pogut discutir.

Gràcies a Cecilio Giménez i Beatriz López-Corcuera pels consells inicials en la purificació de la subunitat de rBAT. En aquest sentit també voldria agrair al professor Isidre Casals, dels serveis científico-tècnics i tots els membres d'aquest servei, pels seus magnífics consells.

Dels serveis científico-tècnics voldria agrair especialment a Carmen Lopez i David Bellido per l'ajuda en els experiments de criofractura. Vaig gaudir molt amb el microscopi electrònic i espero que en el futur es puguin desenvolupar altres projectes en el grup col·laborant amb vosaltres. Gràcies també a Alejandro per l'ajuda informàtica en la quantificació de les partícules. També gràcies a Susana pels seus consells en la microscopia confocal i a Jaume Comas, per la seva col·laboració en l'anàlisi de les dades de producció de NO per citometria de flux.

Moltes gràcies també a tota la gent del grup del professor Antonio Celada, m'ho he passat molt bé tornant a recordar conceptes d'immunologia. Especialment vull agrair al Jordi Xaus i a la Mònica Green, els millor col·laboradors que podia haver tingut.

Gràcies a tots els membres del departament, companys i professors per la seva amabilitat i predisposició a ajudar.

També voldria agrair al professor Albert Boronat per la seva amabilitat i les seves explicacions quan vaig estar d'alumne intern amb ell.

Gràcies a la CIRIT i a la Universitat pel seu suport econòmic durant la realització d'aquesta tesi. Moltes gràcies al servei de correcció de llengua catalana de la universitat per la seva celeritat.

Si m'he oblidat d'algú, és la meva falta.

Voldria també recordar aquí al professor Ricardo Cucala, que em va transmetre el seu esperit per la recerca en els seus anys com a professor de batxillerat.

Gràcies també a la meva família pel seu suport constant i per no tenir en compte els meus oblits.

Per últim voldria agrair a la meva dona per estar sempre al meu costat. Et mereixes aquesta tesi més que jo, gràcies pel teu suport.

A l'Ana

*No soy un hombre que sabe,
he sido un hombre que busca,
y lo soy aún:
pero no busco ya en las estrellas
ni en los libros,
comienzo a estudiar la enseñanza
que mi sangre murmura en mí.
Mi historia no es agradable,
no es suave y armoniosa
como las historias inventadas;
sabe a insensatez,
y a locura, y a ensueño,
como la vida,
de todos los seres humanos
que no quieren mentirse más
a sí mismos.*

Herman Hesse

Índex general

Índex de taules i figures

Abreviatures

Introducció

| | |
|---|-----------|
| 1. Introducció· Generalitats del transport d'aminoàcids en mamífers····· | 1 |
| 2. Proteïnes implicades en el transport d'aminoàcids en mamífers en la membrana plasmàtica· | |
| 2.1 Transportadors d'aminoàcids catiónics independents de sodi····· | 2 |
| 2.2 Transportadors d'aminoàcids dependents de sodi i clorur····· | 6 |
| 2.3 Transportadors d'aminoàcids aniònics i zwitteriònics dependents de sodi····· | 13 |
| 2.4 Transportadors d'aminoàcids heteromultimèrics····· | 20 |
| 2.5 Transportadors d'aminoàcids dependents de protó/hidroxil ····· | 21 |
| 2.6 Altres proteïnes indirectament implicades en el transport d'aminoàcids····· | 23 |
| 2.7 Sistemes de transport d'aminoàcids no identificats· Futures direccions····· | 24 |
| 3. Sistemes de transport d'aminoàcids lisosomals | |
| 3.1 Introducció····· | 25 |
| 3.2 Metodologia per estudiar el transport d'aminoàcids lisosomal····· | 26 |
| 3.3 Sistemes de transport d'aminoàcids descrits····· | 27 |
| 4. Malalties hereditàries associades a defectes en el transport d'aminoàcids | |
| 4.1 Cistinúria····· | 31 |
| 4.2 Intolerància a proteïnes amb lisinúria (LPI)····· | 34 |
| 4.3 Malaltia de Hartnup····· | 35 |
| 4.4 Iminoglicinúria····· | 36 |
| 4.5 Aminoacidúria dicarboxílica····· | 36 |
| 4.6 Cistinosi····· | 36 |
| Antecedents····· | 38 |
| Objectius inicials d'aquesta tesi····· | 44 |

Materials i mètodes

1· Manipulació i/o detecció de proteïnes·

| | |
|--|----|
| 1·1 Purificació d'IgGs a partir del sèrum· Cromatografia d'afinitat per proteïna A lligada a sefarosa (mètode de baixa salinitat)····· | 45 |
| 1·2 Unió d'IgGs a boletes d'acrilamida····· | 47 |
| 1·3 Obtenció de proteïnes de membrana totals a partir de teixits de rata····· | 47 |
| 1·4 Obtenció de membranes apicals a l'escorça renal de rata····· | 49 |
| 1·5 Obtenció de membranes totals d'oòcits····· | 50 |
| 1·6 Determinació de la concentració de proteïnes····· | 50 |
| 1·7 Electroforesi SDS-PAGE····· | 51 |
| 1·8 Assaig tipus transferència Western····· | 53 |
| 1·9 Immunoprecipitació····· | 57 |
| 1·10 Tractament amb endoglicosidasa F i H····· | 58 |
| 1·11 Solubilització de proteïnes de membrana····· | 58 |
| 1·12 Columna de tipus WGA····· | 59 |
| 1·13 Columna de tipus Mono Q····· | 60 |
| 1·14 Gradients de sacarosa····· | 61 |
| 1·15 Diferents tractament de membranes····· | 61 |
| 1·16 Tinció de gels amb clorur de plata····· | 63 |

2· Manipulació i/o detecció d'àcids nucleics·

| | |
|--|----|
| 2.1 Normes generals de manipulació de bacteris, DNA i RNA····· | 63 |
| 2·2 Extracció d'RNA total····· | 64 |
| 2·3 Purificació d'RNA poli(A) ⁺ ····· | 67 |
| 2·4 Separació per la mida d'RNA poli(A) ⁺ en gradients de sacarosa····· | 68 |
| 2·5 Separació per la mida d'RNA poli(A) ⁺ mitjançant electroforesi preparativa····· | 70 |
| 2·6 Electroforesi d'RNA en gels d'agarosa/formaldehid····· | 70 |
| 2·7 Assaig de transferència Northern····· | 72 |
| 2·8 Purificació de DNA plasmídic····· | 74 |
| 2·9 Obtenció de bacteris competents i transformació····· | 77 |
| 2·10 Digestió de DNA amb enzims de restricció····· | 79 |
| 2·11 Extracció amb dissolvents orgànics i precipitació del DNA····· | 80 |
| 2·12 Electroforesi de DNA en gels d'agarosa····· | 80 |
| 2·13 Purificació de DNA a partir de gels d'agarosa····· | 81 |
| 2·14 Marcatge radioactiu de la sonda de DNA pel mètode <i>random priming</i> ····· | 82 |
| 2·15 Tractament del DNA amb Klenow····· | 84 |
| 2·16 Tractament del DNA amb fosfatasa alcalina····· | 84 |
| 2·17 Lligaments····· | 84 |
| 2·18 Mutagènesi dirigida····· | 85 |
| 2·19 PCR····· | 88 |
| 2·20 Electroforesi de DNA en gels d'acrilamida····· | 91 |
| 2·21 Seqüenciació del DNA····· | 92 |
| 2·22 Construcció de genoteques de cDNA per expressió funcional····· | 93 |
| 2·23 Anàlisi de genoteques de cDNA per expressió funcional····· | 94 |

| | |
|---|------------|
| 2-24 Clonatge virtual (identificació de gens homòlegs) en bases de dades d'EST·
Anàlisi per computadora de seqüències de DNA i proteïna····· | 95 |
| 2-25 Cribellatge de genoteques de cDNA (λ ZAP) per hibridació····· | 96 |
| 2-26 Transcripció in vitro····· | 99 |
| 3. Tècniques relacionades amb els oòcits de <i>Xenopus</i>· | |
| 3-1 Manipulació de les granotes, obtenció d'oòcits i microinjecció····· | 100 |
| 3-2 Assajos de transport····· | 102 |
| 3-3 Estudis de cromatografia en capa fina····· | 103 |
| 3-4 Estudis de deplecció de mRNA per hibridació amb oligos antisense····· | 104 |
| 3-5 Anàlisi de proteïnes····· | 105 |
| 4. Tècniques relacionades amb els cultius cel·lulars· | |
| 4.1 Línies cel·lulars utilitzades· Normes generals de manipulació····· | 111 |
| 4.2 Transfecció transitòria de cèl·lules COS-1····· | 113 |
| 4.3 Transfecció permanent de cèl·lules RAW 264·7 amb constructes d'orientació
<i>sense</i> i <i>antisense</i> de LyCAT de rata····· | 113 |
| 4.4 Assajos de transport en cèl·lules COS-1····· | 115 |
| 4.5 Estudis d'immunolocalització sobre cèl·lules en cultiu al microscopi òptic·· | 116 |
| 4.6 Mesura de l'òxid nítric····· | 117 |
| 5· Apèndix. Solucions d'us general····· | 118 |

Resultats i Discussió

| | |
|---|-----|
| 1. Anàlisi del mutant de rBAT Met467Lys en oòcits de <i>Xenopus</i> ·
Comparació amb el mutant Met467Thr····· | 122 |
| 2. Anàlisi de les activitats $b^{0,+}$ i y^+L induïdes per rBAT i 4F2hc en oòcits
de <i>Xenopus</i> com a base per entendre la reabsorció d'aminoàcids bàsics i
cistina ····· | 106 |
| 3. El transportador y^+L és heteromultimèric····· | 133 |
| 4. Una nova família de transportadors heteromultimèrics: descobriment,
caracterització i implicació en malalties hereditàries | |
| 4-1 En recerca de les subunitats associades a rBAT i 4F2hc····· | 137 |
| 4-2 Caracterització dels primers membres de la família de transportadors
heteromultimèrics····· | 140 |
| 4-3 Aparició de noves subunitats· El gen de cistinúria de tipus no-I····· | 145 |
| 5. Interaccions creuades entre subunitats· Paper de la cadena pesada en la
funció del transportador····· | 151 |

| | |
|--|------------|
| 6. Buscant relacions estructura-funció: mutagènesi de les cisteïnes de
LAT-1..... | 156 |
| 7. Descobriment d'una nova família de transportadors lisosomals..... | 158 |
| Conclusions..... | 168 |
| Bibliografia..... | 169 |
| Articles que formen part de la present tesi | |

Index de taules i figures

Introducció

Taula 1. Relació entre els sistemes de transport d'aminoàcids i els gens que s'hi ha relacionat (Pàgina 2)

Taula 2. Resum de les característiques funcionals dels transportadors d'aminoàcids de la família de transportadors dependents de sodi i clorur. (Pàgina 8)

Taula 3. Resum de les característiques funcionals dels transportadors d'aminoàcids de la família de transportadors dependents de sodi. (Pàgina 15)

Taula 4. Mutacions trobades en el gen y^+LAT-1 que causen intolerància a proteïnes amb lisinúria. (Pàgina 35)

Figura 1: Multialineament dels membres de la família CAT. (Pàgina 4)

Figura 2: Alineament dels membres de transportadors d'aminoàcids dependents de sodi i clorur. (Pàgines 9 i 10)

Figura 3: Multialineament dels membres de la família de transportadors dependents de sodi. (Pàgina 16)

Figura 4. Predicció de l'estructura secundària de g17 (TMPred). (Pàgina 21)

Figura 5. Multialineament de g17 amb els membres de la família AAP. (Pàgina 22)

Figura 6: Arbre filogenètic d'alguns membres d'aquesta possible nova família de transportadors d'aminoàcids. (Pàgina 23)

Figura 7. Sistemes de transport d'aminoàcids neutres petits lisosomals. (Pàgina 29)

Figura 8. Representació esquemàtica de les mutacions, insercions i delecions que s'han trobat en el gen rBAT en pacients de cistinúria de tipus I. (Pàgina 32)

Figura 9. Representació esquemàtica de les mutacions que s'han trobat en pacients cistinúrics de tipus no-I. (Pàgina 33)

Figura 10. Estructura genòmica del gen $b^{0,+}AT$. Localització de les mutacions trobades en pacients cistinúrics de tipus no-I. (Pàgina 34)

Antecedents

Taula 1. Classificació dels diferents tipus de cistinúria en funció del fenotip renal i intestinal. (Pàgina 41)

Figura 1: Anàlisi a diferents dies del transport de cistina induït en oòcits injectats amb la proteïna rBAT salvatge (WT) i la proteïna rBAT mutada amb el canvi Met467Thr (MT). (Pàgina 40)

Figura 2: Corrents induïdes en l'òcit de *Xenopus* injectat amb cRNA de rBAT en presència d'aminoàcids dibàsics (arginina) i neutres (leucina). (Pàgina 41)

Materials i Mètodes

Taula 1. Quantitats de sulfat amònic que s'han d'afegir per tenir un % determinat de saturació. (Pàgina 62)

Figura 1. Experiment típic de purificació d'un anticòs. (Pàgina 46)

Figura 2. Exemple típic de *dot-blot* en analitzar diferents fraccions d'un cromatograma. (Pàgina 57)

Figura 3. Exemple d'immunoprecipitació fent servir boletes d'acrilamida. (Pàgina 58)

Figura 4. Posada a punt de les condicions de pH i força iònica per unió a columnes de bescanvi d'anions. (Pàgina 60)

Figura 5. Gradient de sacarosa (5-40%) de membranes apicals solubilitzades. (Pàgina 61)

Figura 6. Detecció de la proteïna rBAT després de precipitar-se amb sulfat amònic. (Pàgina 62)

Figura 7. Exemple del tractament de membranes apicals amb tripsina. (Pàgina 63)

Figura 8. Exemple d'un gradient de sacarosa d'mRNAs (ronyó) i el seu processament posterior. (Pàgina 69)

Figura 9. Fotografia d'un gradient de mRNA de pulmó de rata obtingut al fraccionar aquest mRNA per electroforesi preparativa mitjançant l'aparell GenePrep. (Pàgina 70)

Figura 10. Esquema gràfic del mètode SOE. (Pàgina 90)

Figura 11. Esquema dels passos realitzats en la construcció de la llibreria de cDNA. (Pàgina 94)

Figura 12. Resultat del cribellatge de LyMAT en una llibreria de cDNAs de cor en fags λ ZAP. (Pàgina 98)

Figura 13. Experiment de biotinitil·lació i detecció de la proteïna β_1 -integrina. (Pàgina 106)

Figura 14. Replica d'un experiment de criofractura d'òcits *squeeze-fixed* 4 dies després de la injecció amb 4F2hc. (Pàgina 109)

Figura 15. Cares de fractura de la membrana plasmàtica d'un òcit expressant 4F2hc 4 dies després de la injecció. (Pàgina 110)

Figura 16. La imatge digitalitzada es converteix en forma binària (ADOBE) que es finalment cuantificada (IMAGE). (Pàgina 110)

Figura 17. Transferència Northern que mostra un dels clons estables antisense seleccionats (AS35). (Pàgina 115)

Resultats i discussió

Taula 1. Gradients d'acumulació de diferents aminoàcids a l'òcit de *Xenopus* en l'equilibri. (Pàgina 128)

Taula 2. Resum sobre la família de transportadors d'aminoàcids heteromultimèrics. (Pàgina 149)

Figura 1: Dependència del transport induït per la proteïna i els mutants M467T i M467K en oòcits per la quantitat de cRNA injectat i els dies d'expressió. (Pàgina 122)

Figura 2: Sensibilitat de les proteïnes rBAT salvatge (WT), mutant Met467Thr (MT), mutant Met 467Lys (MK) expressades en oòcits i la proteïna de membranes de ronyó (Kidney) a l'endoglicosidasa H. (Pàgina 123)

Figura 3: Detecció de la proteïna rBAT salvatge (wt), Met467Thr (MT) present en la membrana plasmàtica. (Pàgina 124)

Figura 4: L'acumulació d'arginina depèn de la concentració d'una manera no lineal. (Pàgina 129)

Figura 5. Efecte de la superfusió amb L-arginina i L-leucina en els corrents induïts per aminoàcids en oòcits injectats amb rBAT. (Pàgina 129)

Figura 6. Fluxes d'entrada i sortida comparats d'arginina i leucina a través del sistema $b^{0,+}$. (Pàgina 130)

Figura 7. Mecanisme seqüencial ordenat (Nomenclatura de Cleland) essent l'aminoàcid intracel·lular el substrat conductor. (Pàgina 131)

Figura 8. Model hipotètic per explicar la reabsorció d'aminoàcids bàsics i cistina en el túbul proximal del ronyó. (Pàgina 132)

Figura 9. Comparació entre el transport induït per 4F2hc i la proteïna a superfície estimada pel mètode de criofractura. (Pàgina 134)

Figura 10. Efecte de condicions reductores en la sensibilitat a la inactivació per reactius sulfhidril. (Pàgina 135)

Figura 11. Model especulatiu per explicar l'efecte dels reactius sulfhidril sobre l'activitat γ^+L induïda en oòcits per la proteïna 4F2hc. (Pàgina 136)

Figura 12. A) Obtenció de membranes apicals de ronyó en presència de $CaCl_2$ i NEM. B) Primeres proves de solubilització amb diferents detergents. (Pàgina 138)

Figura 13. Prova pilot de purificació del complex en columnes d'intercanvi iònic Resource MonoQ. (Pàgina 138)

Figura 14. Experiment representatiu de coexpressió en la funció entre 4F2hc i un cRNA d'un conjunt d'uns 300 clons d'una llibreria de cDNA de pulmó de rata. (Pàgina 139)

Figura 15. Diferents activitats de transport induïdes al coexpressar amb 4F2hc diferents membres d'aquesta nova família de subunitats lleugeres. (Pàgina 141)

Figura 16. La proteïna 4F2hc porta a la membrana plasmàtica a $N\text{-myc-}\gamma^+LAT\text{-1}$. (Pàgina 142)

Figura 17. 4F2hc forma una estructura heterodimèrica amb $\gamma^+LAT\text{-1}$ a través d'un pont disulfur on intervé la cisteïna 109. (Pàgina 143)

Figura 18. Anàlisi del mutant L334R- $\gamma^+LAT\text{-1}$ trobat en un pacient amb LPI en oòcits de *Xenopus*. (Pàgina 145)

Figura 19. Patró d'inhibicions de l'activitat de transport d'aminoàcids induïda per la coexpressió de 4F2hc i LAT-2 en oòcits de *Xenopus*. (Pàgina 146)

Figura 20. Localització de la proteïna rBAT en cèl·lules COS transfectades en presència o no de $b^{0,+}$ AT. (Pàgina 147)

Figura 21. Alineament dels membres humans coneguts de la família HAT. (Pàgina 150)

Figura 22. Arbre filogenètic dels membres coneguts de la família HAT. (Pàgina 151)

Figura 23: Expressió del sistema y^+L en coexpressar rBAT i y^+LAT-1 en oòcits de *Xenopus*. (Pàgina 152)

Figura 24. El mutant C114S-hrBAT funciona com un transportador “pur” $b^{0,+}$ en oòcits de *Xenopus*. (Pàgina 153)

Figura 25. El mutant C114S-hrBAT no porta y^+LAT-1 a la membrana plasmàtica a diferència del mutant CS1 de 4F2hc. (Pàgina 153)

Figura 26. El domini C terminal de rBAT és important per la interacció amb la subunitat lleugera $b^{0,+}$. (Pàgina 154)

Figura 27. Esquema de la localització de les cisteïnes en la proteïna LAT-1 i dels residus conservats en tota la família. (Pàgina 157)

Figura 28. Anàlisi de la funció i de la sensibilitat a pCMBS dels diferents mutants individuals de la proteïna LAT-1. (Pàgina 158)

Figura 29. Possible esquema en 2-D de la proteïna LyCAT. (Pàgina 159)

Figura 30. Multialiniament d'MTP humà i de ratolí, LyCAT humà i de ratolí i LyMAT humà. (Pàgina 161)

Figura 31. Immunocitoquímica de la proteïna N-myc-LyCAT i N-myc-LyCAT Δ C en oòcits de *Xenopus*. Efecte de l'expressió de 4F2hc sobre la localització subcel·lular de N-myc-LyCAT. (Pàgina 161)

Figura 32. Immunocitoquímica de la proteïna N-myc-LyCAT i N-myc-LyCAT Δ C en cèl·lules COS transfectades. Col·localització amb LAMP-1. Efecte de la delecció C-terminal. (Pàgina 162)

Figura 33. LyCAT Δ C i LyMAT Δ C indueixen diferents activitats de transport d'aminoàcids. (Pàgina 163)

Figura 34. Anàlisi per transferència Northern de l'expressió tisular de LyCAT i LyMAT. (Pàgina 164)

Figura 35. Anàlisi per hibridació *in situ* de la localització del mRNA de LyCAT. (Pàgina 165)

Figura 36. Menor producció de nitrats i nitrits en els macròfags *antisense* per LyCAT. (Pàgina 166)

Figura 37. Model especulatiu que intenta explicar perquè la coexpressió de LyCAT i 4F2hc incrementa l'activitat y^+L en oòcits de *Xenopus*. (Pàgina 167)

Abreviatures

| | |
|--------------------------------|---|
| 4F2hc: | Cadena pesada de l'antigen de superfície 4F2 |
| ACHC | Àcid cis-3-aminociclohexacarboxílic |
| AIB | Àcid amino isobutic |
| ALS | Amyotrophic lateral sclerosis |
| AMPA | α -amino-3-hidroxy-5-methyl-4-isoxalone propionic acid |
| APC | Antigen-presenting cells |
| BCH | àcid 2-aminobiciclo-(2,2,1)-heptà-2-carboxílic |
| BSA | Bovine serum albumine |
| cAMP | Adenosin-monofosfat cíclic |
| cDNA | DNA complementari |
| cpm | Counts per minute |
| cRNA | RNA complementari |
| CssC | L-Cistina |
| CsTFA | Trifluoroacetat de cesi |
| CTNS | Cistinosina |
| CHAPS | 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate |
| DAF-2DA | Diacetat de 4,5-diaminofluoresceïna |
| ddNTP | Didesoxirribonucleòtid trifosfat |
| DEPC | Diethyl Pirocarbonate |
| DMG | Àcid trans-(dicarboxil)-2,4-metanoglutamat |
| DMSO | Dimetilsulfòxid |
| DNA | Àcid desoxirribonucleic |
| DNAasa | Desoxirribonucleasa |
| dNTP | Desoxirribonucleòtid trifosfat |
| DO | Densitat òptica |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Àcid etilen-diamina-tetraacètic |
| EST | Expressed sequence tag |
| FBS | Fetal Bovine Serum |
| FITC | Fluoreceïna-isotiocianat |
| GABA | γ -aminobutirat |
| HAT | Heteromultimeric amino acid transporters |
| IFN-γ | Interferó-gamma |
| IgGs | Immunoglobulines |
| IMAGE | Integrated and Molecular Analysis of Genomes and their expression |
| IMPs | Intramembranous particles |
| KA | Kainic acid |
| kb | Kilobase |
| kDa | Kilodalton |
| Km | Constant de Michaelis ($K_{0,5}$) |
| LB | Luria Broth medium |
| L-DABA | Àcid 2,4-diaminobutíric |
| LPI | Lysinuric Protein Intolerance |
| LPS | Lipopolisacàrid |
| LSB | Load sample buffer |
| LyCAT | Lysosomal cationic amino acid transporter |

| | |
|-------------------------------|--|
| LyMAT | Lysosomal multiple amino acid transporter |
| LαAA | L- α -aminoadipate |
| M6P | Manosa-6-fosfat |
| MBS | Ester de maleimido benzoil anhidroxi succinimida |
| MDCK | Madin-Darby canine kidney |
| MGA | N-methyl-D-glucamine |
| MeAIB | Àcid N-metil- amino isobutic |
| MOPS | 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid |
| MTS | Methanethiosulfonate |
| NEM | N-ethyl maleimide |
| NIP | Nipecotic acid |
| NMDA | N-metil-D-aspartat |
| NO | Nitric Oxide |
| OK | Opossum kidney |
| ORF | Open reading frame |
| OMIM | Online Mendelian Inheritance in Man |
| PAGE | Polyacrilamide gel electrophoresis |
| PBS | Phosphate buffer saline |
| pCMB | p-clormercuribenzoic |
| pCMBS | p-clormercurifenilsulfònic |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PDC | L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylic acid |
| PK-C | Proteïna quinasa C |
| PMSF | Phenylmethylsulfonyl fluoride |
| PVDF | Difluorur de polivinilidè |
| rBAT | Related to b ⁰⁺ amino acid transport |
| RNA | Àcid ribonucleic |
| RNAasa | Ribonucleasa |
| SDS | Sodium dodecil sulfate |
| SNC | Sistema nerviós central |
| SOE | Splicing by overlap extension |
| SOS | L-serina-O-sulfat |
| SSC | Sodium chloride, sodium citrate |
| SSPE | Sodium chloride, sodium phosphate, EDTA |
| TBE | Tris-borat EDTA |
| TCA | Àcid tricloroacètic |
| TEMED | N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine |
| THA | Threo- β -hidroxyaspartate |
| TM | Transmembrana |
| Tm | Melting temperature |
| TRITC | Tetrametilrhodamina |
| TSH | Thyroid-stimulating hormone |
| TX-100 | Tritó X-100 |
| WGA | Wheat germ agglutinin |

Introducció

INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ: GENERALITATS DEL TRANSPORT D'AMINOÀCIDS EN MAMÍFERS

Els sistemes de transport d'aminoàcids en la membrana plasmàtica dels mamífers són essencials per diferents funcions:

- a) Mediació i regulació del flux de nutrients i precursors d'altres biomolècules.
- b) En l'SNC participen en la terminació i modulació de la transmissió sinàptica.
- c) Regulació de la pressió osmòtica.

Les estratègies experimentals utilitzades per estudiar el transport d'aminoàcids han estat les mesures de transport d'aminoàcids radioactius en òrgans amb perfusió, o en l'entrada en cèl·lules en cultiu o membranes plasmàtiques aïllades de diferents teixits. Així, es classificaven els sistemes de transport en funció de l'aminoàcid transportat (bàsics, neutres, etc), les propietats cinètiques -afinitat, farmacologia (inhibició per aminoàcids modificats com BCH, MeAIB), etc- i les propietats termodinàmiques del transport (equilibratiu, gradient electroquímic de sodi, etc). S'anomenaven amb diferents noms que recordaven el substrate transportat (A, alanina) i en majúscula o minúscula dependent de si era o no dependent de sodi. (Silbernagl, 1988; McGivan *et al.*, 1994; Collarini *et al.*, 1987; Kilberg *et al.*, 1993; Christensen, 1982; Christensen, 1990; Wang *et al.*, 1991; Christensen, 1984, Palacín *et al.*, 1998 articles).

A partir dels noranta s'inicia la biologia molecular en aquest camp amb el descobriment dels primers gens implicats (GAT-1, CAT-1, rBAT, GLT-1, etc) en aquest transport, amb tècniques com ara l'expressió funcional en oòcits, la purificació-reconstitució, l'aïllament per homologies, etc (Guastella *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1991; Kanai *et al.*, 1992; Bertran *et al.*, 1992, etc).

Així s'ha volgut correlacionar les activitats que s'havien trobat anteriorment amb les funcions que catalitzen les proteïnes que s'han anat aïllant. En la **taula 1** descriu aquestes activitats de transport i indico els gens que s'han associat a cadascuna d'aquestes activitats.

Aquesta introducció consta de les parts següents: En l'apartat 2 descriu amb més detall les famílies de proteïnes implicades en el transport d'aminoàcids. En cadascuna de les famílies hi ha 3 subapartats: a) Proteïnes conegudes. Expressió tissular i característiques funcionals. b) Relació estructura-funció. c) Paper fisiològic. En l'apartat 3 parlo dels sistemes de transport d'aminoàcids lisosomals, ja que en la present tesi s'han aïllat dos cDNAs de transportadors de la membrana lisosomal. Finalment, en l'apartat 4, desenvolupo les malalties hereditàries que es deuen a defectes en el transport d'aminoàcids.

He d'assenyalar ara ja que una de les famílies de transportadors d'aminoàcids, la família HAT (*Heteromultimeric amino acid transporters*) l'he desenvolupat en els apartats "Antecedents experimentals" i "Resultats i Discussió", ja que s'ha descobert durant la realització de la present tesi. De manera anàloga, també descriu la família de transportadors d'aminoàcids lisosomals trobats en aquesta tesi en l'apartat "Resultats i Discussió".

| Sistema de transport | Característiques funcionals | Proteïna aïllada |
|----------------------|---|-------------------------------|
| A | Aa neutres petits, altament regulat, tolera un grup <i>N</i> -metil, sensible al pH, presenta trasinhibició, ubic | ? |
| ASC | No aa <i>N</i> -metilats, presenta transestimulació | ASCT1? |
| N | Gln, Asn, His. Sensible al pH. Present en hepatòcits. Variant N ^m en múscul. | NAT (g17?) |
| BETA | β -alanina, taurina i GABA. Dependent de clorur. Hi ha variants. Present en diversos teixits | GAT-1,-2,-3, BGT-1, TAUT |
| GLY | Gly i sarcosina. Dependent de clor. Hi ha variants. Presents en diversos teixits. | GLYT-1,-2 |
| IMINO | Pro, OH-Prolina i <i>N</i> -metil-glicina. Inhibit per MeAIB, en membrana apical d'intestí | ? |
| PHE | Phe i Met. En membranes apicals | ? |
| B ⁰ | Amplia especificitat. S'inhibeix per BCH però no per MeAIB. En membranes apicals. També es diu NBB. | ASCT2? |
| L | Aminoàcids neutres ramificats sodi-independent, presenta transestimulació, s'inhibeix per BCH | 4F2hc/LAT-1,2 |
| B ^{0,+} | Amplia especificitat per aa zwitteriònics i bàsics. Accepta BCH però no MeAIB | B ^{0,+} AT |
| b ⁺ | Aa catiónics. No interactua amb homoserina | ? |
| y ⁺ | Aa catiónics. Aa neutres en presència de sodi amb baixa afinitat. Sensible a NEM. Ubic | CAT-1,-2,-3,-4 |
| y ⁺ L | Aa catiónics. Aa neutres en presència de sodi amb alta afinitat. Insensible a NEM. | 4F2hc/y ⁺ LAT-1,-2 |
| b ^{0,+} | Amplia especificitat per aa zwitteriònics i neutres, però baixa afinitat pels ramificats. No s'inhibeix per BCH | rBAT/b ^{0,+} AT |
| X _{AG} | L-Glu i D- i L-Asp. Depèn de K ⁺ . Ubicu. | EAAT-1,-2,-3,-4,-5 |
| asc | Aa neutres petits. Intercanviador. Present en eritròcits | 4F2hc/ascAT |
| T | Aa amb grups benzenoids amb diferents afinitats. Cèl·lules sanguínies. | ? |
| x _c | Intercanviador de Glu i cistina (aniònica). En hepatòcits i fibroblasts | 4F2hc/xcAT |

Taula 1. Relació entre els sistemes de transport d'aminoàcids i els gens que s'hi han relacionat.

2. PROTEÏNES IMPLICADES EN EL TRANSPORT D'AMINOÀCIDS EN MAMÍFERS EN LA MEMBRANA PLASMÀTICA

2.1 TRANSPORTADORS D'AMINOÀCIDS CATIÒNICS INDEPENDENTS DE SODI

2.1.1 PROTEÏNES CONEGUES. EXPRESSIÓ TISSULAR I CARACTERÍSTIQUES FUNCIONALS.

Hi ha quatre membres d'aquesta família, també coneguda com els CAT (*cationic amino acid transporter*). Tots pertanyen a la superfamília de transportadors específics per a aminoàcids, poliamines i colina (*APC family*) (Reizer *et al.*, 1993). En funció de les seves característiques (expressió, activitat,...) es considera que són

les proteïnes responsables del sistema de transport y^+ . El primer d'aquests membres (CAT-1) es va identificar com a receptor pel virus ecotròpic de la leucèmia murina (Wang *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 1991). El segon es va identificar com un gen d'expressió primerenca en limfòcits activats (MacLeod *et al.*, 1990), del qual es van trobar dos transcrits degut a *splicing* alternatiu: CAT-2 (també anomenat CAT-2b) i CAT-2a (Closs *et al.*, 1993). CAT-3 va ser identificat per homologia amb els transcrits anteriors (Hosokawa *et al.*, 1997) igual que CAT-4 (Sperandeo *et al.*, 1998). En la **figura 1** presento un alineament d'aquestes proteïnes. Mentre que CAT-1, CAT-2 i CAT-3 són semblants entre ells en un 60%, CAT-4 és semblant únicament en un 40%.

CAT-1 s'expressa àmpliament en tots els teixits excepte en fetge -sí en fetge regeneratiu com, per exemple, després d'una hepatectomia (Aulak *et al.*, 1996)- en forma de dos transcrits (3.4 kb i 7.9 kb). L'expressió del transcrit de 7.9 kb està sotmesa a regulació posttranscripcional, a causa de seqüències desestabilitzants (riques en AU) presents en l'extrem 3' (Aulak *et al.*, 1999). Aquesta regulació es dona en situacions com ara la regeneració hepàtica o per assequibilitat d'aminoàcids. Funciona com un transportador d'aminoàcids bàsics independents de sodi d'alta afinitat (K_m en el rang μM) i estereoespecífic. També transporta homoserina i cisteïna en presència de sodi. El transport depèn de voltatge, així la hiperpolarització incrementa la velocitat màxima i fa decreïxer la K_m per l'entrada (Kavanaugh *et al.*, 1993). Presenta transestimulació amb un grau més elevat que els altres membres de la família.

CAT-2a s'expressa en fetge, múscul, ronyó, pàncrees i pell. L'expressió en fetge decreix entre l'àrea portal i la vena central (Burger-Kentischer *et al.*, 1998). Transporta aminoàcids de forma independent de sodi amb baixa afinitat (K_m en el rang mM). No presenta transestimulació.

CAT-2 s'expressa de forma bastant ubíqua. La seva expressió s'incrementa en activar-se les cèl·lules amb diferents citocines (Aulak *et al.*, 1996). Les característiques de transport són molt similars a les descrites per a CAT-1. Les diferències més importants entre CAT-2 i CAT-2a es troben en el domini intracel·lular 4, entre els segments transmembrana postulats 8 i 9 (Closs *et al.*, 1997).

CAT-3 s'expressa únicament en el cervell, de forma predominant en l'eix mitjà talàmic-hipotalàmic. Fent servir un anticòs específic, s'ha observat que la proteïna s'expressa en neurones però no en cèl·lules glials o endotelials (Hosokawa *et al.*, 1999). També funciona com un transportador d'aminoàcids bàsics independent de sodi d'alta afinitat amb estereoespecificitat i amb transestimulació (Ito *et al.*, 1997).

CAT-4 s'expressa majoritàriament en cervell, testicles i placenta. L'expressió en oòcits indueix activitat de transport d'aminoàcids bàsics (Sperandeo *et al.*, 1998).

2.1.2 RELACIÓ ESTRUCTURA-FUNCIÓ

Els perfils d'hidrofobicitat per a aquestes proteïnes suggereix que presenten 12 o 14 dominis transmembrana on els extrems N i C-terminal serien citosòlics (vegeu **figura 1**). Algunes evidències experimentals estan a favor del model de 14 dominis

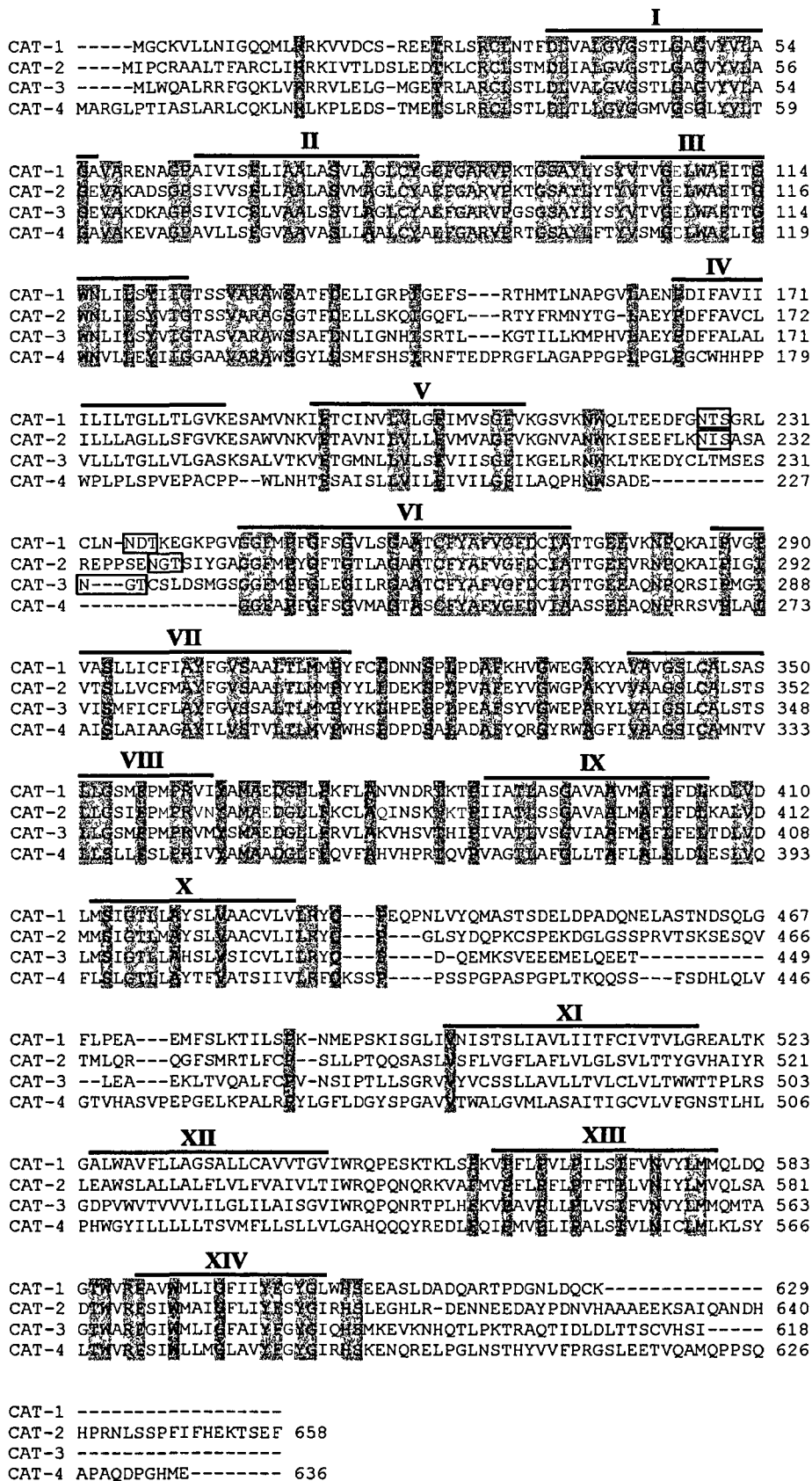


Figura 1. Multialineament dels membres de la família CAT. En gris mostro els residus conservats en tota la família. En vermell mostro el residu glutamat 107 que és important per a la funció i la zona d'splicing alternatiu en CAT-2a. Les línies indiquen els 14 dominis transmembrana putatius.

transmembrana com anticossos dirigits o el patró de glicosilació, però no se n'ha estudiat en detall la topologia (Kim *et al.*, 1993; Woodard *et al.*, 1994).

Estudis fets amb quimeres entre CAT-1, CAT-2 i CAT-2a mostren que les característiques del transport es troben en el domini divergent entre CAT-2 i CAT-2a. No s'han estudiat en detall els residus que es troben en aquesta regió (Closs *et al.*, 1993) (en vermell en la **figura 1**).

En el tercer domini transmembrana hi ha un residu, glutamat 107, que està conservat en la família APC, el qual si es canvia a aspartat però no glutamina, produeix una proteïna que arriba a la membrana però que no és funcional (Closs *et al.*, 1996).

El tercer domini extracel·lular, en concret els residus 232-237 de CAT-1, són essencials per a la unió del virus (Yoshimoto *et al.*, 1993; Albritton *et al.*, 1993). La causa de l'ecotropisme del virus (només infecta rata i ratolí) es troba en aquests residus. La unió del virus inhibeix de forma no competitiva l'entrada de substrats però no la sortida. La glicosilació no és important per a la funció de la proteïna, però pot provocar efectes estèrics en la interacció del virus amb el transportador, fet que explicaria la viabilitat de les cèl·lules de ratolí infectades amb el virus (Wang *et al.*, 1996). La proteïna CAT-4 no presenta cap seqüència *consensus* de glicosilació.

2.1.3 PAPER FISIOLÒGIC

Sembla que la funció de CAT-1 seria la de proveir la cèl·lula amb els aminoàcids bàsics necessaris per dur a terme les seves funcions: síntesi de proteïnes, urea, poliamines, òxid nítric, etc (Hyatt *et al.*, 1997). Així, la seva expressió es regula de forma posttranscripcional amb la concentració externa d'aminoàcids (Aulak *et al.*, 1999). També s'incrementa la seva expressió en cèl·lules proliferatives com ara en la regeneració hepàtica, limfòcits T i B activats, cèl·lules tumorals, etc Així el ratolí *knockout* per CAT-1 mor després d'anèmia del naixement (Perkins *et al.*, 1997). També és regulat per hormones com ara la insulina o la dexametasona (Hyatt *et al.*, 1997).

El fet que el fetge només expressi la isoforma CAT2a, que presenta una afinitat més baixa, permetrà que el fetge només acumuli aminoàcids bàsics quan les concentracions en plasma siguin elevades. L'expressió de CAT2a s'incrementa en múscul en situacions d'estrès, com ara deprivació de menjar, esplenectomia o hepatectomia (Kakuda *et al.*, 1998), potser impeding així la depleció d'aquests aminoàcids en situacions de proteòlisi. CAT-2a podria també estar implicat en el transport d'arginina en les cèl·lules β del pàncreas, ja que aquesta actua com un estimulador de la secreció d'insulina (Flodstrom *et al.*, 1999).

S'ha implicat el transportador CAT-2 en la formació d'òxid nítric en diferents cèl·lules com ara els macròfags activats per IFN- γ i LPS (Kakuda *et al.*, 1999), astròcits (Stevens *et al.*, 1996), cèl·lules musculars llises vasculars (VSMC) (Hattori *et al.*, 1999). En el cas dels macròfags s'ha implicat les MAP quinases en una regulació posttranscripcional del missatger de CAT-2 (Caivano, 1998). A més, els glucocorticoides inhibeixen la producció de NO en cèl·lules endotelials microvasculars cardíques a causa d'una inhibició en la síntesi de CAT-2 i CAT-1 (a

més d'inhibir la síntesi del cofactor de la NOS tetrahidrobiopterina), fet que reflecteix la importància de l'assequibilitat d'aminoàcids bàsics per produir òxid nítric (Simmoms *et al.*, 1996). El ratolí *knockout* per CAT-2 no produeix òxid nítric en alguns tipus cel·lulars però sí en d'altres, cosa que indica que la responsabilitat de proveir arginina per produir NO pot estar compartida per CAT-1 i CAT-2. De forma interessant, aquest ratolí és resistent a alguns tipus de tumors, fet que reflecteix la importància de controlar la producció de NO (MacLeod, C.L. *et al.*, Congrés a Colorado sobre transport d'aminoàcids).

No es coneix encara quina seria la funció de CAT-3 ni de CAT-4. Es postula que CAT-3 proveiria les neurones d'aminoàcids bàsics (Hokosawa *et al.*, 1999). El gen CAT-4 mapa en el cromosoma 22q11.2, en la zona suprimida en la síndrome velocardiofacial, però no se n'ha demostrat la implicació en aquest síndrome (Sperardeo *et al.*, 1998).

2.2 TRANSPORTADORS D'AMINOÀCIDS DEPENDENTS DE SODI I CLORUR

2.2.1 PROTEÏNES CONEGUDES. EXPRESSIÓ TISSULAR I CARACTERÍSTIQUES FUNCIONALS

Aquesta superfamília presenta com a característica funcional que el transport de substrat depèn de sodi i clorur. S'ha dividit funcionalment en dos superfamílies: els transportadors de neurotransmissors i els transportadors orfes. Els transportadors de neurotransmissors es subdivideixen també en tres subfamílies (Kanner, 1994; Uhl *et al.*, 1994): *a*) els transportadors de monoamines biogèniques -DAT, NET (Pacholczyk *et al.*, 1991) i SET-; *b*) els transportadors de GABA -GAT (Guastella *et al.*, 1991) i BGT-1 (Yamauchi *et al.*, 1992)-, taurina (TAUT) (Liu *et al.*, 1992) i creatina i *c*) els transportadors de glicina (GLYT) (Guatella *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1993), prolina (PROT) (Fremeau *et al.*, 1992) i el transportador $B^{0,+}$ ($ATB^{0,+}$) (Sloan *et al.*, 1999). En aquesta tesi només tractaré els transportadors d'aminoàcids, és a dir GAT (-1,-2,-3), BGT-1, TAUT, GLYT, PROT i $ATB^{0,+}$. En la **figura 2** presento un multialineament d'aquestes proteïnes, marcant els dominis transmembrana i alguns residus que s'han estudiat funcionalment.

GAT-1 s'expressa principalment en neurones però també en cèl·lules glials dels còrtex cerebral, cerebel, hipocamp i retina. Així, hi ha correlació entre GAT-1 i GAD67 (l'enzim que sintetitza el GABA) en l'*striatum* i el còrtex (Swam *et al.*, 1994; Minelli *et al.*, 1995), però no en les cèl·lules de Purkinje o les neurones motores espinals (Snow *et al.*, 1992; Rattray *et al.*, 1993). Així, té un paper presinàptic, postsinàptic i també regulador de la concentració de GABA en les cèl·lules glials. Durant el desenvolupament del cervell s'expressa en la matèria gris i en els axons en creixement (Jursky *et al.*, 1996), fet que quadra amb el fet que en expressar-se en cèl·lules MDCK presenti una localització apical (Pietrini *et al.*, 1994; Ahn *et al.*, 1996). En la retina s'expressa en les neurones amacrines (Honda *et al.*, 1995; Ikegaki *et al.*, 1994).

GAT-2 s'expressa també en el cervell amb localitzacions neuronals (pericària, dendrites i terminals d'axons formant sinapsis simètriques i asimètriques) i no-

neuronal (matèria aracnoide i pia, límits de la glia, cèl·lules endodurals i cèl·lules epitelials del plexe coroide) (Conti *et al.*, 1999). En retina s'expressa en les capes de l'epiteli pigmentat de la retina i de les fibres nervioses i en l'epiteli dels cossos ciliars (Honda *et al.*, 1995; Ikegaki *et al.*, 1994). També s'expressa en teixits perifèrics com ara el ronyó i el fetge (Borden *et al.*, 1995). En cèl·lules MDCK presenta una localització basolateral per uns 22 residus localitzats en l'extrem C-terminal (Muth *et al.*, 1998).

Es considera que GAT-3 funcionaria com un transportador de glia. Així, durant el desenvolupament, s'expressa en les cèl·lules de la glia perpendiculars a axons que expressen GAT-1 (Jursky *et al.*, 1996), i en la retina s'expressa en les cèl·lules Muller gials (Honda *et al.*, 1995; Ikegaki *et al.*, 1994). Presenta una localització apical en cèl·lules MDCK per una zona present en l'extrem C-terminal, en concret s'ha identificat la seqüència THF (Muth *et al.*, 1998). S'expressa en axons i membranes somatodendrítiques (Ahn *et al.*, 1996).

BGT-1 s'expressa en molts teixits perifèrics: ronyó, fetge, placenta, cor, múscul esquelètic però també en cervell, on tindria una localització glial. Presenta una localització basolateral en MDCK (Yamauchi *et al.*, 1992), a causa de la interacció entre un motiu en l'extrem C-terminal d'interacció amb la proteïna de la família PDZ LIN-7. Aquesta interacció determina la localització subcel·lular per un mecanisme de retenció que prevé la internalització en el domini basolateral (Perego *et al.*, 1999).

TAUT s'expressa en molts teixits com ara cervell, pulmó, ronyó, fetge, placenta, etc (Jhiang *et al.*, 1993).

GLYT1 presenta tres variants (1a, 1b, 1c) que provenen del mateix gen i que difereixen en les seqüències N-terminal (Borowsky *et al.*, 1993). L'expressió dels gens 1a o 1b depèn d'unes seqüències riques en AC i TG que formarien estructures enllaç que facilitarien o interferirien amb l'*splicing*, fet que faria transcriure una isoforma o una altra (Borowsky *et al.*, 1998). La isoforma 1c és una variant de *splicing* de la isoforma 1b (Adams *et al.*, 1995). GLYT1a és la única isoforma que s'expressa en teixits perifèrics com ara fetge, pulmó, melsa, timus associada als macròfags (Borowsky *et al.*, 1993). En l'SNC GLYT1a s'expressa en la matèria grissa, de forma paral·lela als receptors de glicina (GlyR) sensibles o no a estricnina en hipocamp, bulb olfactori, cerebel i medul·la espinal. GLYT1b/1c s'expressa en la matèria blanca. Trobem també expressió en zones del cervell on no hi ha GlyR, però col·localitza (Smith *et al.*, 1992) i modula la funció dels receptors de NMDA (*N*-metil-D-aspartat) (Bergeron *et al.*, 1998). Es pensa que en el cervell s'expressa en la glia i no en neurones (Zafra *et al.*, 1997). En canvi, en la retina sí que s'ha observat que GLYT1 s'expressa en les neurones amacrines que contenen glicina, però no en les neurones bipolars que també contenen glicina, fet que suggereix que podria haver-hi transport de glicina a través de unions comunicants de tipus gap entre aquestes cèl·lules (Pow *et al.*, 1999; Vaney *et al.*, 1998).

GLYT2 és específic de l'SNC -sistema auditiu, però no el cortex auditiu (Friauf *et al.*, 1999), nucli dels nervis crànials, espina dorsal (Zafra *et al.*, 1995), neurones Botzinger (Schreihöfer *et al.*, 1999), etc-. Col·localitza amb el GlyR sensible a estricnina i amb neurones amb gran quantitat de glicina (Zafra *et al.*, 1995). Presenta

una localització axonal, és a dir, presinàptica. Recentment, s'ha identificat una nova isoforma de GLYT2, GLYT2b amb cinc aminoàcids més que GLYT2 i que presenta la mateixa distribució i les mateixes característiques cinètiques, però que a diferència de GLYT2 no pot acumular aminoàcids, sinó únicament intercanviar-los (Ponce *et al.*, 1998).

PROT s'expressa únicament en l'SNC, concretament en neurones glutamatèrgiques (Fremeau *et al.*, 1992), en les membranes presinàptiques (Velaz-Faircloth *et al.*, 1995).

B⁰⁺AT s'expressa en pulmó (tràquea), glàndules salivars, glàndula mamària, estómac i glàndula pituïtària (Sloan *et al.*, 1999).

En la **taula 2** resumeixo les característiques funcionals d'aquests transportadors (Palacín *et al.*, 1998 articles).

| Transportador | Substrats (Km, µM) | Farmacologia (Ki, µM) | Lligands cotransportats |
|--------------------|---|--|---|
| GAT-1 | GABA (< 10), Betaïna (>> 500) β-Ala (> 2000) | NIP (< 10), ACHC (~ 100), L-DABA (< 30) | GABA, 2Na ⁺ , Cl ⁻ |
| GAT-2 | GABA (~ 20), β-Alanina (~ 30) Taurina (~ 500) | NIP (> 500), ACHC (> 500) L-DABA (> 100) | GABA, Na ⁺ , Cl ⁻ |
| GAT-3 | GABA (~ 1), β-Alanina (~ 100), Taurina (~ 1500) | NIP (50), ACHC (~ 800) L-DABA (~ 100) | GABA, > 1 Na ⁺ , Cl ⁻ |
| BGT-1 | GABA (< 100), Betaina (~ 400), L-Prolina (~ 900) | NIP (> 2000), ACHC (~ 2000) L-DABA (~ 2000) | GABA, 3 Na ⁺ , 1 o 2 Cl ⁻ |
| TAUT | Taurina (< 10), β-Alanina (~ 60) | Hipotaurina (< 10), L-Ala (> 250), GABA (>2000) | Taurina, 2 Na ⁺ , Cl ⁻ |
| GLYT1(A,B,C) | Glicina (< 50) | Sarcosina (< 100) | Glicina, > 1Na ⁺ , 1 Cl ⁻ |
| GLYT2 (B) | Glicina (~ 20) | Sarcosina (> 1000) | Glicina, > 1Na ⁺ , 1 Cl ⁻ |
| PROT | L-Prolina (< 10) | Sarcosina (30), NIP (>> 100), L-His, L-Cys (~ 80) | Prolina, Na ⁺ , Cl ⁻ |
| B ⁰⁺ AT | Aa no polars grans (<40), Aa polars grans (~ 100), Aa polars > 100 excepte serina (43), Aa aromàtics (< 100), Aa carregats positius (~ 100) | BCH inhibeix competitivament. Aa aniònics no inhibeixen. | 1 Aa, 2 o 3 Na ⁺ , 1 Cl ⁻ |

Taula 2. Resum de les característiques funcionals dels transportadors d'aminoàcids de la família de transportadors dependents de sodi i clorur.

2.2.2 RELACIÓ ESTRUCTURA-FUNCIÓ

Totes aquestes proteïnes transporten el substrat utilitzant l'ió de sodi i l'ió de clorur amb diferents estequiometries, cosa que provoca que el moviment del substrat provoqui corrents elèctriques. D'altra banda, també pot funcionar transportant en forma directa o reversa. Com es du a terme el transport? Hi ha diferents models per explicar-ho, però només citaré el model més actual (Hilgemann *et al.*, setembre 1999), per la proteïna GAT-1, que és el que millor s'ajusta a totes les dades experimentals.

Segons l'autor, el transportador existiria en dues conformacions E_{IN} i E_{OUT}. En l'estat E_{IN}, un ió de clorur i dos ions de sodi s'unirien de forma seqüencial des del costat citoplasmàtic; en l'estat E_{OUT}, un ió de sodi s'uniria al transportador i un ió de clorur, un ió de sodi i una molècula de GABA s'unirien des del costat extracel·lular. Així, quan els llocs d'unió de la conformació E_{IN} estan buits, s'esdevé una transició

```

GAT-2 -----
BGT-1 -----
GAT-3 -----
TAUT -----
GAT-1 -----
GLYT1 -----M 1
PROT -----
GLYT2 MDCSAPKEMNKL PANSPEAAAAQHDPGDCAPRTSPEQEL PAAAA P P P P R V P R S A S T G A Q 60
BO_+ -----

GAT-2 -----MDNRVSGTTSNGETKPVCPVMEK 23
BGT-1 -----MDGKVAVQEYGP PAVSWVPEEGEKLDQ 27
GAT-3 -----MTAEKALPLGNKKAEEARESEAPGGGCSSGGAAPARHPRV 41
TAUT -----MATKEKLQCLKDFHKDMVKPSPGKSPGTRPED 32
GAT-1 -----MATNGSKVADGQISTEVSEAPVANDKPKTLVVKVQ 35
GLYT1 AAAHGVPAPSSPEQVTLLEPVQRSFFLPPFSGATPSTSLAESVLKVVHGAYNSGLLEPQLMA 61
PROT -----MKKLQGAHLRKPVT PDLMLTPSDQGDVDLVDVFAA 35
GLYT2 TFQSADARACEAERPGVGSCKLSSPRAQAASAALRDLREAQGAQASPPPGSSSGPNALHC 120
BO_+ -----MDKLCPSFFKCREKEKVSAS---SE--- 23

GAT-2 VE----- 25
BGT-1 ED----- 29
GAT-3 KR----- 43
TAUT EA----- 34
GAT-1 KK----- 37
GLYT1 QHSLAMAQNG-----AVPS 75
PROT HR----- 37
GLYT2 KIPSLRGPEDANVSVGKGT LERNNTPVVGGVWMSQSTVVLGTDGITSVLPGSVATVATQ 180
BO_+ -----NFHVG----- 28

                Loop-I                II
GAT-2 ----EDGTLEREQWTKMFEVLSVAEIIIGLVNVAEPFLCYKNGGGAFFIYVLI FLFTC 81
BGT-1 ----EDQVKDRGQWTKMFEVLSVAEIIIGLVNVAEPFLCYKNGGGAFFIYVLI FFFVC 85
GAT-3 ----DKAVHERGHWNKVEFVLSVAEIIIGLVNVAEPFLCYKNGGGAFFIYVLI FVFFIC 99
TAUT ----EGKPPQREKWSKIDFVLSVAGFVGLGNVAEPFLCYKNGGGAFFIYVLI FIFLFGS 90
GAT-1 ----AADLPDRDWTWGRFDFLMSCVYAIIGLVNVAEPFLCGKNGGGAFFIYVLI FTLIFA 93
GLYT1 EATKRDQNLKRGWNGNQIEFVLT SVYAVGLGNVAEPFLCYRNGGGAFFIYVLI FIMLIFC 135
PROT ----GNWTGKLDLFLSCLCYCVGLGNVAEPFLRAYTNGGGAFFIYVLI FLMLAIC 86
GLYT2 EDEQGDENKARGNWSSKLDLFLSMVYAVGLGNVAEPFLAFOVGGGAFFIYVLI FLMLALA 240
BO_+ --E--NDENQDRGNWSSKSDYLLSMIYAVGLGNVAEPFLTYSNGGGAFFIYVLI FLMLALA 85

                III                III*
GAT-2 IIVVFLFLTALQYTNQGGITARRKICRIFESIYASQMIVSLLNVAIVVLAWALFVLF 141
BGT-1 IIVVFLVALQYTSQSVTARRKICLFOIIGLASVVIESYLNVAIILAWALFVLF 145
GAT-3 IIVVFLTALQYTSQGGITARRKVCILFEIYATQVIEAHLNVAIILAWAIFVLS 159
TAUT IIVVFLIIIGYTSQGGITARRKICLFSIIGYASVVIVSLLNVAIVILAWATVLF 150
GAT-1 IIVVFLFLCSLQYTSIIGLVNKLALMFKVLAALAVLFWLNIIVILISWAYVLY 152
GLYT1 IIVVFLFLSLFQGFASQCLGVNRIISPMFKVYIGMMVVSTYIGIINVVICIAFYFF 194
PROT IIVVFLFLSLQGFSSLPLAVNKLISLFLKALAAALLIIVGLVAIINMIIAYVLFVLF 145
GLYT2 IIVVFLFLVSLQGFASQCPVSVNKLALALQVCIAMLIISVLIATINVIICYTLFVLF 299
BO_+ IIVVFLFLCSLQGFASLIPVSVNRIILFLFQVSIITMVLISIFVTIINVIIAYSLYVME 144

GAT-2 SSFTTDFPQGSSEHNTENVEFQKTN-NS-----LN 173
BGT-1 SSFTSELETTENNENTEHNTDFLNHS-GA-----GT 177
GAT-3 NCFETTERATGHEHNTENVEFQKLN-VS-----NY 191
TAUT QSFQKELPAHNNHSNTPHEMEDTMRKNKS-----VW 183
GAT-1 NSFSTTTTPKQDNPNTDRFENYSMV-N----- 181
GLYT1 SSMTHVLETPAYNNPNTHTDAGVLDASNLTNNGSRPA-----ALPSNLSH 239
PROT ASLTSDEPTEHGGNWNTELELHRVSKDGN-----GA 178
GLYT2 ASFVSVDFPQGSNNPNTPEKDKTKLLLDSCVISDHPKIQIKNSTFCMTAYPNVTVMVF 359
BO_+ ASFQSELETKNKS-SVSDKNRSRSPIVTHCNVSTVNGKIQEI IQMKNKSVDINNFTCING 203

                IV
GAT-2 VT--SENATSPVIEFWERRVLKIS--DGIQHLISLRWEVLCVLLAVICYFCIWKVKS 229
BGT-1 VTP-FENFTSPVMEFWERRVLGIT--SGIHDLISLRWEALCVLLAVICYFCIWKVKS 234
GAT-3 SHVSLQATSPVMEFWERRVLAIS--DGI EHLNLRWEALCVLLAVICYFCIWKVKS 249
TAUT ITISSTNFTSPVIEFWERNVLSLS--PGIDHPSLKWDALCVLLVLCVFCICKVRS 241
GAT-1 ---TINMISAVVEFWERNMHQMT--DGLDKPQIRWPAITATAIILVYFCIWKVGV 235
GLYT1 LLNHSLQRTSPSEEWRLYVLKLS--DDIGNFEVRLPLGCGVSLVVFCLCIRVKS 297
PROT LPLNLTCTVSPSEEWRYVLIHQSGQIGISP EIRWNPCLCVLLAVVFLCCLIKVKS 238
GLYT2 TSQANKTFVSGSEEFYKVFVLKIS--AGIEYPEIRWNPALCVLLAVIVYASLAKVIKT 417
BO_+ SEIYQPGQLP-SEQYWNKVALQRS--SGMNETVIVWYVLCVLLAVLIVGAALFKVKS 260

```

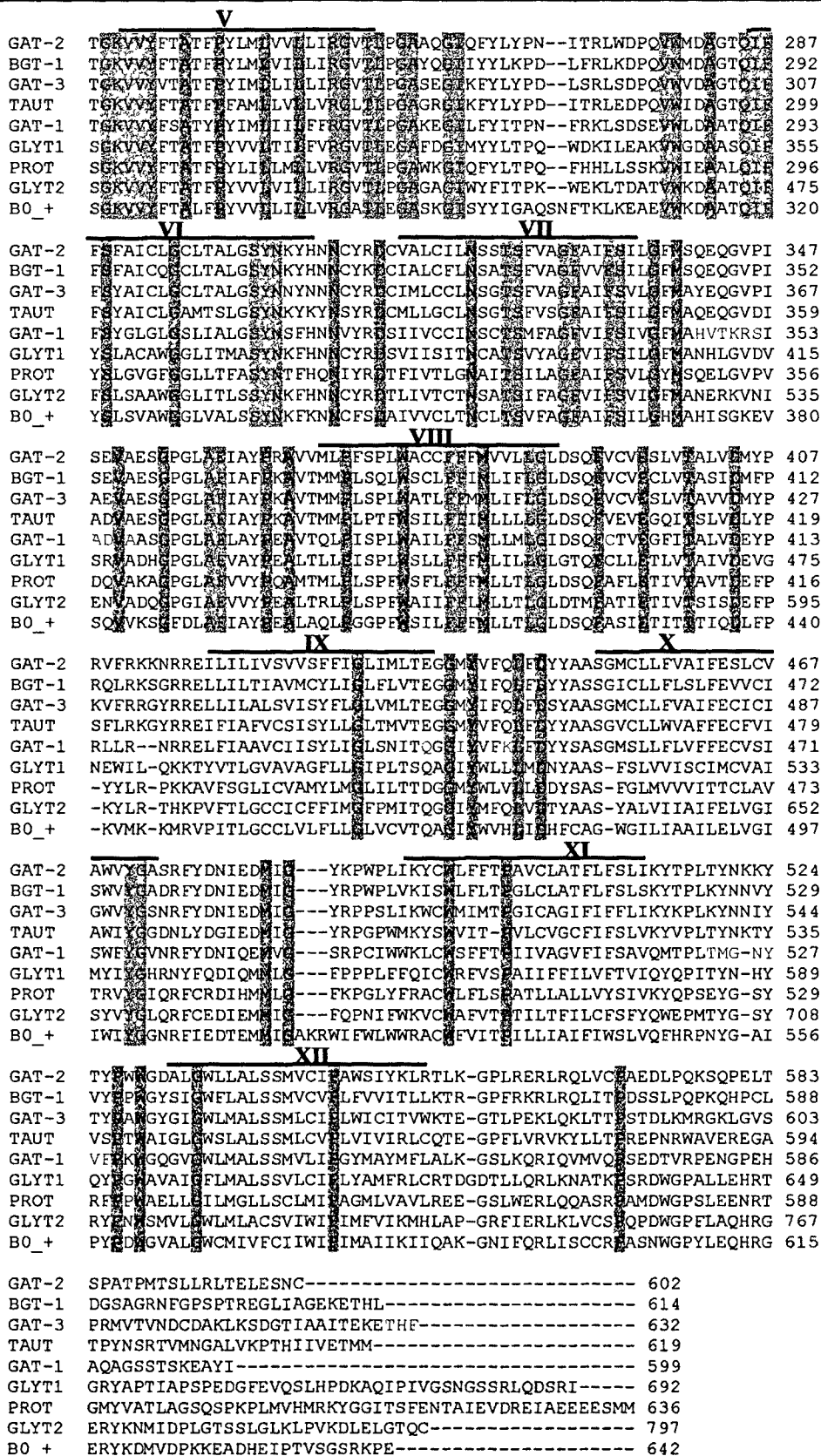


Figura 2. Alineament dels membres de transportadors d'aminoàcids dependents de sodi i clorur. En gris mostro els residus conservats en tota la família. En vermell mostro residus que s'han vist que són importants per a la funció (vegeu relació estructura-funció). Les línies indiquen els 12 dominis transmembrana putatius on el domini I (línies discontinües) representaria un domini transmembrana que es gira.

cap a l'estat E_{OUT} que obre els llocs d'unió i absorbeix un ió de sodi extracel·lular, transició que és la més electrogènica. Ara, des de l'estat E_{OUT} , una molècula de GABA i un ió de sodi es translocarien cap al citosol formant un estat intermediari, E_{IN}^* . La translocació de l'ió de clorur i la sortida de l'ió de sodi absorbit són necessaris per finalitzar un cicle de transport i arribar a l'estat E_{IN} . En l'estat E_{IN}^* , en absència d'ió de clorur pot haver-hi intercanvi GABA-GABA; així, l'ió de clorur permet que el transportador pugui acumular GABA. En la forma reversa de transport, un ió de clorur i de sodi s'absorbirien junts, i un altre ió de sodi i el GABA s'absorbirien i es translocarien. Aquesta reversibilitat de la funció té molta importància en la transmissió sinàptica, ja que amb la despolarització sinàptica les concentracions de sodi intracel·lulars s'incrementen de tal forma que poden permetre la sortida de GABA (Hilgemann *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 1999b)

Quins residus de la proteïna són necessaris per dur a terme aquesta funció? És necessari conèixer abans quina és la topologia de la proteïna. Aquesta qüestió s'ha dut a terme experimentalment per a GAT-1 i GLYT1. La topologia per a aquestes dues proteïnes no coincideix amb la deduïda a partir de l'algoritme d'hidrofobicitat: el primer domini transmembrana, que està altament conservat en tota la família, no travessaria la membrana al costat extracel·lular, sinó que tornaria a entrar pel costat citoplasmàtic (vegeu **figura 2**). Hi ha dues evidències que donen suport a aquesta hipòtesi: 1) la cisteïna 74 de GAT-1 és intracel·lular (per a reactius específics de grups sulfidril com MTS); 2) el primer domini extracel·lular (després del domini TMII), es pot glicosilar *in vitro*, fet que indica que no presenta una localització intracel·lular. En aquest bucle reentrant i en la zona anterior al segon domini transmembrana trobem una gran quantitat de residus de glicina (sis; tres d'ells seguits) conservats en tota la família, cosa que podria explicar la flexibilitat d'aquesta zona. Es creu que després hi hauria dos dominis transmembrana (III i III*) que serien més curts que la resta. Sembla que els altres dominis transmembrana estarien més d'acord amb el perfil d'hidrofobicitat i també per estudis de *glycosilation-scanning* (Olivares *et al.*, 1997; Bennet *et al.*, 1997).

Els dominis N i C-terminals són citosòlics i no sembla que tinguin un paper molt important en la funció, ja que la deleció d'aquests amb proteases de la proteïna GAT-1 no l'afecta funcionalment en assaigs de purificació-reconstitució (Kanner *et al.*, 1989; Mabweesh *et al.*, 1992). Per contra, per a GLYT1a, deleccions més llargues de 34 aminoàcids de l'extrem C-terminal, sí que poden afectar la funció (Olivares *et al.*, 1994). En canvi, com ja s'ha comentat abans, aquests dominis són necessaris en tots els membres de la família per al tràfic correcte cap a la membrana plasmàtica.

Les proteïnes d'aquesta família presenten N-glicosilació en el domini extracel·lular després del domini TMIII*. En concret, per a GLYT2, aquesta glicosilació consisteix en una estructura complexa en antena amb residus terminals d'àcid siàlic (Núñez *et al.*, 1994). La glicosilació no és important per a la funció, però sí per al tràfic correcte de la proteïna (Olivares *et al.*, 1995).

Els dominis extracel·lulars són importants per a la funció: en concret els dominis extracel·lulars del 4 al 6 (entre els TM 7 i 12), per estudis de quimeres entre diferents membres de la família, podrien formar una cavitat on s'unirien els substractes (residus en vermell en la **figura 2**) (Tamura *et al.*, 1995). S'han

identificat, per estudis de mutagènesi dirigida, alguns aminoàcids en dominis transmembrana o propers a ells importants per a la unió del substrat i dels ions, sobretot en GAT-1. En concret, es van analitzar residus que continguessin càrrega o fossin aromàtics (buscant interaccions de tipus π). Així, es va trobar que l'arginina 69 podria estar implicada en la unió de l'ió de clorur (Pantanowitz *et al.*, 1993) i el triptòfan 68 en la unió de l'ió de sodi i també el de clorur (Kleinberger-Doron *et al.*, 1994). Així, la proteïna GAT-1 amb la mutació Trp68Leu no permet (o és més lenta) la sortida intracel·lular del substrat, cosa que estaria d'acord amb el paper de l'ió de clorur explicat al principi d'aquest apartat (Mager *et al.*, 1996).

El residu triptòfan 222, que està conservat en la família de transportadors d'aminoàcids però no de neurotransmissors, estaria implicat en la interacció amb el grup carboxil dels aminoàcids (Kleinberger-Doron *et al.*, 1994). En canvi, el residu tirosina 140, que sí que està conservat en tots els membres de la família, interaccionaria amb el grup amino (Bismuth *et al.*, 1997).

Finalment, durant el cicle del transport hem comentat que han d'existir canvis conformacionals. La proteïna GAT-1 és sensible a l'acció de proteases, sensibilitat que es perd en afegir el substrat i els ions de sodi i clorur (Mabjeesh *et al.*, 1993). D'altra banda, el residu de cisteïna 399 és el responsable de la sensibilitat a reactius polars de grups sulfhidril. La sensibilitat es redueix al afegir sodi i clorur, mentre que la unió del GABA incrementa la sensibilitat, fet que indica que l'accessibilitat d'aquest residu depèn de la conformació de GAT-1 (Golovanevsky *et al.*, 1999). El residu de glutamat 101 és crític per als canvis de conformació associats al cicle de transport (Keshet *et al.*, 1995).

Probablement, estudis de *cysteine-scanning mutagenesis* aportaran noves dades sobre quins residus es mouen durant el cicle de transport i sobre altres aspectes com ara el refinament de la topologia i, molt més important, dades de proximitat entre dominis transmembrana (*helix-packing*).

2.2.3 PAPER FISIOLÒGIC

Els transportadors de neurotransmissors de les membranes presinàptiques i de la glia extreuen les molècules de neurotransmissors que s'alliberen a l'espai sinàptic en arribar l'estímul sinàptic, i finalitzen així la transmissió. Així, GAT-1 s'encarregaria de finalitzar la transmissió nerviosa en les sinapsis que depenen de GABA (Kanner, 1994). Aquesta funció quadra amb el fet que inhibidors específics del transportador GAT-1 provoquen l'efecte oposat al blocatge de la transmissió a través de GABA (Borden *et al.*, 1994). A més, l'activitat elèctrica associada al transport de GABA pot despolaritzar cèl·lules i obrir canals de calci sensibles al voltatge, amb la qual cosa ens podríem trobar amb un altre senyal intracel·lular (Haugh-Scheidt *et al.*, 1995). Com que no hi ha una col·localització completa, pot tenir altres funcions que tinguin a veure amb efectes que depenguin de la concentració de GABA. L'expressió en teixits perifèrics de GAT-2 fa suposar que tindria una funció no neuronal (Borden *et al.*, 1995). No es coneix amb detall quina podria ser la funció de GAT-3.

GLYT2 i GLYT1 participarien també en la finalització de les sinapsis, però en aquest cas glicinèrgiques. Per a GLYT2 s'ha suggerit que podria tenir un paper en la maduració de les sinapsis auditives. (Friauf *et al.*, 1999). La presència de GLYT1 en zones on no hi havia receptor de glicina suggerien que podia tenir funcions addicionals. S'havia suggerit que podia modular la transmissió glutamatèrgica a través de la funció del receptor de NMDA (*N*-metil-D-aspartat). Dades obtingudes *in vivo* de mesures de *whole-cell patch-clamp* en neurones piramidals de l'hipocamp demostren que la glicina o antagonistes de GLYT1 incrementen l'amplitud de la component de la corrent excitatòria postsinàptica deguda al receptor de NMDA (Bergeron *et al.*, 1998). Durant la isquèmia, l'expressió de GLYT1 s'incrementa en cèl·lules astrocítiques a prop de neurones piramidals CA1, probablement per reduir la concentració de glicina en els espais extracel·lulars locals (Fujita *et al.*, 1999).

PROT també tindria funcions de regulació en les transmissions sinàptiques de diferents formes. D'una banda, es pensa que la prolina també funcionaria com un neurotransmissor com el GABA o la glicina modulant altres sinapsis com ara la del receptor de glutamat i, d'altra banda, la prolina podria ser un intermediari en la síntesi de glutamat (Fremeau *et al.*, 1992).

BGT-1 i TAUT funcionariem com a transportadors d'osmòlits. L'acumulació d'osmòlits, mantenint la concentració d'ions constant, és crítica per a l'adaptació a l'estrès hipertònic (Kwon *et al.*, 1995). De fet, en el promotor de BGT-1 trobem elements de resposta a canvis en la tonicitat (TonE) (Takenaka *et al.*, 1994).

La funció associada a B⁰⁺AT és únicament especulativa: es coneix que els aminoàcids com ara leucina i arginina actuarien com a secretagogs per a hormones de la glàndula pituïtària. Així, el transportador podria regular aquest procés controlant la concentració d'aquests aminoàcids o gràcies a la despolarització que provoca el seu transport. En el pulmó, podria reduir la concentració d'aminoàcids del líquid de superfície de les vies aèries (Sloan *et al.*, 1999).

En general, ens trobem amb una família de transportadors on els substrats que són transportats duen a terme una funció determinada (osmòlits, transmissió sinàptica, secretagogo). Entendre la funció d'aquests substrats en termes de la concentració efectiva en cadascun dels teixits permetrà entendre molt millor quina és la funció del transportador. A més no es coneix amb detall si els corrents associats al moviment del transport fan alguna funció. Respondre a aquests interrogants, representa, segons la meua opinió, el repte principal a assolir en la recerca d'aquesta família.

2.3 TRANSPORTADORS D'AMINOÀCIDS ANIÒNICS I ZWITERIÒNICS DEPENDENTS DE SODI.

2.3.1 PROTEÏNES CONEGUDES. EXPRESSIÓ TISSULAR I CARACTERÍSTIQUES FUNCIONALS

Aquesta família presenta com a característica funcional que el transport és dependent d'ió de sodi i que poden funcionar com a canals d'anions. Es poden dividir en dues subfamílies: a) EAAT formats per EAAT1 (també anomenat GLAST) (Storck *et al.*, 1992), EAAT2 (o GLT-1) (Pines *et al.*, 1992), EAAT3 (o

EAAC1) (Kanai *et al.*, 1992), EAAT4 (Fairman *et al.*, 1995) i EAAT5 (Arriza *et al.*, 1997). Aquesta subfamília també presenta dependència de l'ió de potassi. b) ASCT formats per ASCT1 (Shafquat *et al.*, 1993, Arriza *et al.*, 1993) i ASCT2 (o ATB0) (Utsunomiya-Tate *et al.*, 1996; Kekuda *et al.*, 1997). En la figura 3 presento un multialineament d'aquestes proteïnes.

EAAT1 és un transportador únicament expressat en la glia i l'epèndima pel que fa al sistema nerviós (Rothstein *et al.*, 1994). També trobem expressió en teixits perifèrics com ara cor, múscul esquelètic, placenta i pulmó (Storck *et al.*, 1992).

EAAT2 també presenta una localització principal en la glia i de forma secundària en neurones. L'expressió en neurones és molt més àmplia del que es pensava en un principi: en trobem en el neocòrtex, en el bulb olfatori, en les neurones piramidals CA3 de l'hipocamp, etc. (Mennerick *et al.*, 1998; Berger *et al.*, 1998). S'ha vist que es pot expressar en neurones dependentment de la maduració del cervell: s'expressa primer en axons en creixement en la medulla espinal abans d'establir-se l'expressió dels astròcits (Yamada *et al.*, 1998; Northington *et al.*, 1998). També s'ha vist expressió en microcultius i neurones en cultiu d'hipocamp i en neurones de Purkinje (Brooks-Kayal *et al.*, 1998; Mennerick *et al.*, 1998). En teixits perifèrics també trobem expressió, juntament amb EAAT1, en la glàndula mamària (Martínez-López *et al.*, 1998).

En canvi, EAAT3 s'expressa majoritàriament en neurones de forma postsinàptica. És present, però no de forma generalitzada, en neurones glutamatèrgiques, però no està restringit, ja que també es troba en neurones colinèrgiques α -motores en la medulla espinal i cèl·lules Purkinje GABAèrgiques en el cerebel (Rothstein *et al.*, 1994; Hediger *et al.*, 1995; Velaz-Faircloth *et al.*, 1996). Recentment, també s'ha vist que hi ha expressió en la glia, particularment en oligodendròcits (Conti *et al.*, 1998; Kugler *et al.*, 1999). En teixits perifèrics s'expressa en intestí prim, ronyó, pulmó, cor i placenta (Kanai *et al.*, 1992). En el ronyó s'expressa de forma preferent en els segments S2 i S3 del túbul proximal i en l'intestí el trobem en cèl·lules epitelials (Shayakul *et al.*, 1997).

EAAT4 s'expressa en les neurones glutamatèrgiques del cerebel, específicament en cèl·lules de Purkinje, i amb expressió molt inferior en placenta (Fairman, W. 1995). La majoria de l'expressió de EAAT5 es troba en retina, i en grau molt menor en fetge, múscul esquelètic i cor (Arriza *et al.*, 1997).

ASCT1 s'expressa en múscul esquelètic, pàncrees, cervell, placenta, cor, pulmó, ronyó i fetge (Shafquat *et al.*, 1993). ASCT2 s'expressa en pulmó, intestí gros, ronyó, múscul esquelètic, testicles i teixit adipós blanc (Utsunomiya-Tate *et al.*, 1996; Kekuda *et al.*, 1997).

Les propietats funcional que es coneixen dels diferents membres d'aquesta família estan resumides en la taula 3 (Palacín *et al.*, 1998 articles).

| Transportador | Substrats (Km, μ M) | Farmacologia (Ki, μ M) | Lligands cotransportats | Canal de clor activat per lligand |
|---------------|--|--|---|-----------------------------------|
| EAAT1 | L-Glu, L-Asp, D-Asp (15-20), PDC (~ 30) | SOS (~ 100), DMG (~ 120), L α AA (> 1000), KA (> 3000) | 3 Na ⁺ (dins), K ⁺ (fora) | Si? (E _{REV} +9 mV) |
| EAAT2 | L-Glu, L-Asp, D-Asp (10-20), PDC (< 10) | SOS (~ 1200), DMG (~ 700), L α AA (> 1000), KA (< 60) | Na ⁺ (dins), K ⁺ (fora) | Si (E _{REV} +60 mV) |
| EAAT3 | L-Glu, L-Asp, D-Asp (30-50), PDC (~ 20) | SOS (~ 150), DMG (~ 250), L α AA (> 1000), KA (> 3000) | (2/3) Na ⁺ (dins), K ⁺ i OH ⁻ (fora) | Si? (E _{REV} +38 mV) |
| EAAT4 | L-Glu, L-Asp, D-Asp (2-3), PDC (~ 3), L α -aa (~ 200) | KA (> 5000) | Na ⁺ (dins), K ⁺ (?) | Si (E _{REV} -22 mV) |
| EAAT5 | L-Glu, L-Asp, D-Asp (13-64) | PDC (6), THA (1) | Na ⁺ (dins), K ⁺ (?) | Si (E _{REV} -20 mV) |
| ASCT1 | L-Cys (30), L-Ala, L-Ser, L-Thr, L-Val, L-Glu | MeAIB (> 10000) | Na ⁺ (dins), K ⁺ (?) | Si (E _{REV} -21 mV) |
| ASCT2 | L-Ala, L-Ser, L-Cys, L-Gln (20), aa ^o ramificats, L-Glu (1600), aa ^o | MeAIB (> 1000), aa ⁺ (> 1000), aa ^o (~ 1000) | Na ⁺ (dins), K ⁺ (?) | Si? (E _{REV} -30 mV) |

Taula 3. Resum de les característiques funcionals dels transportadors d'aminoàcids de la família de transportadors dependents de sodi.

2.3.2 RELACIÓ ESTRUCTURA-FUNCIÓ

El mecanisme de transport s'ha estudiat molt més per als membres de la família EAAT. Hi ha clares diferències entre els membres d'aquesta família. Un exemple seria el del transportador EAAT3, que transporta L-glutamat amb 2 o 3 ions de sodi, amb el cotransport d'un protó (o transport de bescanvi d'un ió hidroxil) i el transport de bescanvi d'un ió de potassi (Zerangue *et al.*, 1996). Els lligands s'unirien al transportador de la forma següent: primer s'unirien els ions de sodi i després el glutamat al costat extracel·lular, translocació del complex, sortida del glutamat i els ions de sodi, unió del potassi en el costat intracel·lular, i translocació i sortida de l'ió de potassi per començar un nou cicle (Kanner *et al.*, 1982; Kanner *et al.*, 1993). Veiem així que l'ió de potassi tindria un paper similar al que té l'ió de clorur en el mecanisme de transport de GABA per GAT-1. Els transportadors de la família ASC presenten dependència de l'ió de sodi però no de potassi i, de fet, no presenten dos residus (Tyr403 i Glu404) que s'han involucrat en la unió d'aquest ió en la família EAAT (vegeu més abaix). Funcionen com a intercanviadors d'aminoàcids, però no es coneix encara quin és el paper de l'ió de sodi (Zerangue *et al.*, 1996b; Torres-Zamorano *et al.*, 1998).

A més d'aquest mecanisme de transport, s'ha observat que aquests transportadors també poden funcionar com a canals d'anions (principalment anió de clorur) activats per lligand (sodi i glutamat) (Sonders *et al.*, 1996). Aquest flux de clor no està termodinàmicament acoblat al flux de l'aminoàcid a través del substrat. El potencial de reversió (E_{REV}) (vegeu taula anterior) és molt a prop del potencial d'equilibri de l'ió de clorur (-20 mV) en alguns membres de la família, com ara EAAT5 (Arriza *et al.*, 1994) i EAAT4 (Fairman *et al.*, 1995), però molt més lluny en altres com ara EAAT2 (Wadiche *et al.*, 1995).

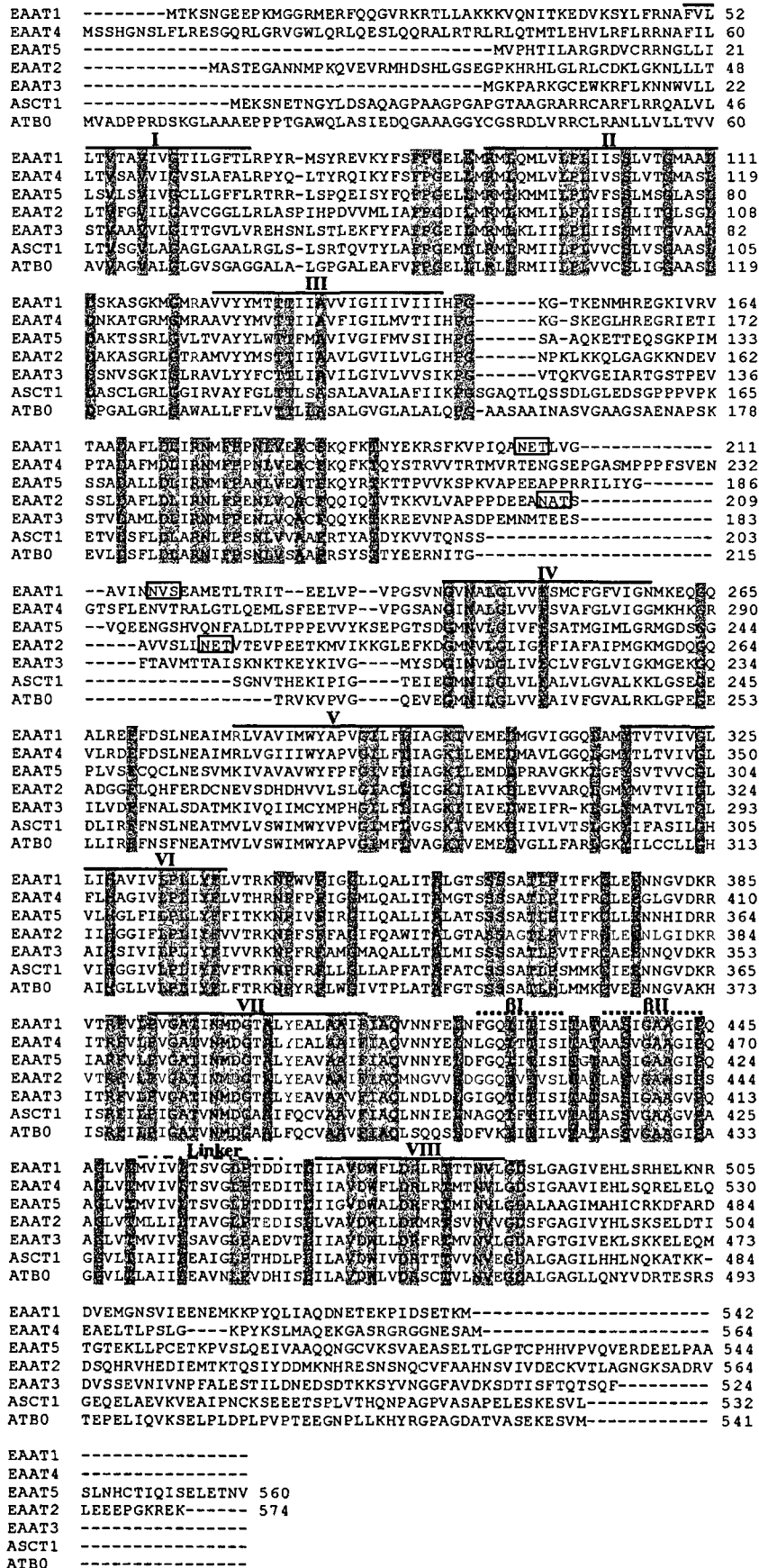


Figura 3. Multialineament dels membres de la família de transportadors dependents de sodi. Les línies discontinües representarien 2 zones amb conformació β i una zona hidrofòbica no transmembrana (*linker*).

Aquestes proteïnes presenten una predicció de topologia que no és molt evident. S'havien plantejat molts models diferents, però sembla que el més acceptat experimentalment és el descrit per Grunewald *et al.*, (1998). Va construir transportadors funcionals que contenen residus únics de cisteïna i en va estudiar la disposició topològica utilitzant reactius sulfhidril-biotinilats. Així, va descobrir que els dominis N i C-terminal són citosòlics i que hi ha 8 dominis transmembrana que podrien ser hèlix- α . Entre els dominis 7 i 8 transmembrana hi ha una regió semblant a un llaç, on trobem una zona hidrofòbica en la part extracel·lular (vegeu **figura 3**). Aquestes proteïnes presenten residus de glúcids en zones *consensus*, les quals, mutades, no afecten gens la funció (Condradt *et al.*, 1995).

Els transportadors de glutamat formen homomultímers, probablement dímers o trímers. Aquests multímers són específics de cada isoforma i no hi ha heteromultímers entre diferents membres de la mateixa família (Haugeto *et al.*, 1996).

Quins residus contribueixen a les diferents propietats d'aquests transportadors? EAAT1 i EAAT2 presenten una diferència clara en la sensibilitat a àcid cainic (KA). Fent quimeres entre aquestes dues proteïnes es va identificar una zona d'uns 76 aminoàcids important per la unió de a KA, però no per a les altres propietats funcionals (en blau, en la **figura 3**) (Vanderberg *et al.*, 1995).

Diferents estudis de mutagènesi dirigida, principalment en EAAT2, han trobat residus importants per a la funció: així, la mutació Arg122Leu provoca una disminució d'afinitat per L-Asp sense afectar al L-Glu (Conradt *et al.*, 1995b).

Mutacions en els residus Glu404 o Tyr403 bloquen el transportador en un estat intermediari on únicament es produeix intercanvi, ja que afecten la unió de potassi (Pines *et al.*, 1995; Kavanaugh *et al.*, 1997). Ens trobem amb el mateix fenotip que la mutació Trp68 en el transportador GAT-1 (Mager *et al.*, 1994). A més, la mutació Tyr403Phe provoca un increment de l'afinitat aparent per l'ió de sodi, sense canviar l'afinitat per L-glutamat o D-aspartat. És molt més interessant el fet que la selectivitat per l'ió de sodi està alterada, ja que la proteïna mutada accepta que, en lloc de sodi, pugui funcionar amb altres cations alcalins com ara liti o cesi, mentre que la proteïna salvatge no accepta aquestes modificacions (Zhang *et al.*, 1998). A més, la mutació Tyr403Cys es protegeix de l'acció de grups sulfhidril d'una forma dependent de l'ió de sodi. Tot això indica que en aquesta zona és a prop del porus del transportador que controla la selectivitat per l'ió de sodi i potassi. A més, aquesta zona es mou des d'un costat a l'altre de la membrana, ja que anàlegs no transportats incrementen la sensibilitat a agents sulfhidril i els substrats la fan decaure (Zarvib *et al.*, 1998).

A prop d'aquesta zona hi trobem 2 residus de serina, la serina 440 i la 443, les quals mutades a glicina i glutamina, respectivament, permeten la substitució de l'ió de sodi per liti. A més el transportador Ser440Cys és sensible a agents sulfhidrils, inhibició que es protegeix amb el substrat (Zhang *et al.*, 1999). Tots aquests resultats indiquen que aquesta estructura en forma de llaç tindria un paper molt important en acoblar els fluxos d'ions (sodi i potassi) i els fluxos de glutamat.

Hi ha un altre residu de serina que també té un paper important. L'activitat del transportador EAAT2 s'estimula per fosforilació per proteïna cinasa C (PK-C). La mutació Ser113Asn no afecta la funció del transportador, però sí l'estimulació per la cinasa (Casado *et al.*, 1993). Finalment, a part de la PK-C, es sap que altres proteïnes, probablement de la família PDZ, podrien fer disminuir l'afinitat del transportador, interactuant amb els últims 8 aminoàcids d'EAAT1 (Marie *et al.*, 1999).

2.3.3 PAPER FISIOLÒGIC

Igual que els transportadors de GABA en el sistema nerviós, els transportadors de glutamat tindrien la doble funció de terminar la sinapsi, traient el glutamat de l'esclatxa sinàptica, i proveir les neurones de nutrients (Hediger *et al.*, 1995).

Respecte a la primera funció, hem de pensar que la concentració de glutamat en neurones i glia és de l'ordre de mM, mentre que en el fluid extracel·lular és de l'ordre de μM (Benveniste *et al.*, 1994). Així, els transportadors necessiten altres forces per poder transportar el glutamat en contra de gradient: una és el gradient electroquímic de sodi, creat amb despesa d'energia (ATP) per la bomba Na^+/K^+ -ATPasa i, l'altre, la ràpida metabolització en la glia del glutamat a glutamina per l'acció de la glutamina-sintetasa (Hertz *et al.*, 1979). Mantenir unes concentracions baixes de glutamat en l'esclatxa sinàptica és molt important per prevenir efectes excitotòxics del glutamat (Bouvier *et al.*, 1992), que es poden apreciar, per exemple, en posar agents bloquejadors del transport de glutamat. Així, per exemple, en cerebel, en inhibir el transport amb PDC (veure taula 3), es produeix una prolongació del corrent mitjançat pel receptor d'AMPA després d'un estímul repetitiu i també una prolongació del corrent degut a receptors d'NMDA després d'estímuls repetitius i simples (Overstreet *et al.*, 1999). Per tant, els transportadors tenen un paper important en determinar el temps de durada de la transmissió sinàptica, assegurant una relació senyal/soroll alta en aquesta transmissió sinàptica glutamatèrgica. A més, en condicions basals, l'activitat dels transportadors compensa la sortida contínua de glutamat d'origen no vesicular de compartiments intracel·lulars, fet que protegeix les neurones (Jabaudon *et al.*, 1999).

Quins són els transportadors de glutamat encarregats de reabsorbir aquest glutamat en el cervell? Dependrà del tipus cel·lular en concret, però sembla que EAAT1 i EAAT2 serien els principals encarregats. Per exemple, en l'*striatum radiatum* de l'hipocamp tenim 3200 i 12000 transportadors/ μm^3 de teixit d'EAAT1 i EAAT2 respectivament, mentre que en la capa molecular del cerebel en tenim 18000 i 2800. En tot cas, el nombre de transportadors és 3 o 5 vegades superior al nombre de molècules de glutamat d'una vesícula sinàptica (Lehre *et al.*, 1998). Això explica el fet que encara que el temps del cicle de transport sigui de l'ordre de 70 mil·lisegons (Danbolt *et al.*, 1990), el temps de buidament de les molècules de glutamat en l'esclatxa sinàptica sigui d'1 o 2 mil·lisegons (Clements *et al.*, 1992). És a dir, la cinètica de buidament de glutamat es deu principalment a fenòmens de difusió i unió ràpida als transportadors de glutamat (Wadiche *et al.*, 1995b).

El nostre coneixement de les diferències entre la funció de cada transportador es basen en els estudis dels ratolins *knockout* i les diferències en l'expressió tissular.

Així, el ratolí *knockout* per EAAT1 presenta descoordinació motora per a funcions complicades (roda giratòria ràpida) però no per a funcions simples (roda giratòria lenta) (Watase *et al.*, 1998). A més, és molt més susceptible de presentar danys en el cerebel, on precisament s'expressa més (astròcits Bergmann). El compost pentilenetrazol indueix atacs epilèptics durant tractaments perllongats: el ratolí *knockout* és molt més sensible, cosa que indica que defectes en el transportador poden ser un dels factors que determinin la susceptibilitat als atacs (Watanabe *et al.*, 1998). En la retina (on s'expressa en les cel·lules de Muller), el ratolí *knockout* presenta ones *b* d'electroretinograma i potencials oscilatoris reduïts, cosa que indica que és necessari per a la transmissió entre els fotoreceptors i les cel·lules bipolars. A més, el ratolí presenta més facilitat a tenir danys en la retina després d'isquèmia (Harada *et al.*, 1998).

En canvi, en la retina, el ratolí *knockout* per EAAT2 no presenta cap alteració en l'electroretinograma i una mica més de sensibilitat a tenir danys després d'isquèmia, però no als mateixos nivells de EAAT1 (Harada *et al.*, 1998). Aquest ratolí mostra atacs espontanis letals d'epilèpsia, una degeneració neuronal selectiva en l'hipocamp i un increment de la susceptibilitat a danys corticals aguts. A més, la concentració de glutamat en l'esclètxa sinàptica és molt elevada (Tanaka *et al.*, 1997). Així, es podria postular que defectes en la funció d'EAAT2 podrien estar implicats en l'epilèpsia humana del lòbul temporal. Resultats experimentals amb pacients mostren que no s'ha observat cap canvi, però això no treu que podria estar implicat en altres tipus d'epilèpsia (Tessler *et al.*, 1999). En canvi, sí que és més clar el mecanisme pel qual mutants en l'enzim superòxid dismutasa dependent de $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ (SOD1) provoquen degeneració de les neurones motores en la malaltia ALS (*amyotrophic lateral sclerosis*): EAAT2 és una diana selectiva d'oxidació mitjançada per mutants de SOD1 (Trotti *et al.*, 1999), i la reactivitat es dona en l'extrem C-terminal (Trotti *et al.*, 1997). Així es podria postular que hi podria haver un lligand molecular entre la neurodegeneració oxidativa i la neurodegeneració excitotòxica produïda per nivells elevats de glutamat. A més en aquesta malaltia hi ha una forta reducció en l'expressió d'EAAT2 (Rothstein *et al.*, 1995). Per tant, podem concloure que, ja que EAAT2 és la isoforma predominant en el cervell, és també el responsable principal del manteniment dels nivells baixos de glutamat en l'esclètxa sinàptica. A més, EAAT2 podria tenir altres papers en el cervell com ara el control de l'osmolaritat, ja que selectivament s'indueix per estrès hipertònic en cel·lules de glioma C6 (Imura *et al.*, 1999). Es desconeix quin paper tindria EAAT2 en neurones.

Quina és la funció de EAAT3? Hem de recordar que EAAT3 s'expressa a nivells elevats en teixits perifèrics com ara el ronyó. El ratolí *knockout* desenvolupa aminoacidúria dicarboxílica, és a dir, hiperexcreció d'aminoàcids aniònics en la urina. Això indica que té com a funció principal la de reabsorbir aquests aminoàcids. Mitjançant el gradient de sodi creat per la bomba de Na^+/K^+ , i la metabolització per l'activitat de la γ -glutamilttransferasa-glutaminasa es tindrà la força termodinàmica per permetre l'acumulació de glutamat en el ronyó (Peghini *et al.*, 1997). Així, l'activitat està regulada per la privació d'aminoàcids; curiosament, no de forma directa sinó que sembla que implicaria la síntesi d'una proteïna activadora. En canvi, si que se'n produeix un increment de l'expressió per estrès hiperosmòtic (McGivan *et al.*, 1999). Totes aquestes evidències apunten al fet que EAAT3 té un paper molt important en el ronyó controlant el metabolisme intracel·lular de glutamat i

glutamina, la regulació del volum cel·lular i el balanç àcid-base (Welbourne *et al.*, 1999). A més d'aquest fenotip renal, el ratolí *knockout* presenta una activitat locomotora reduïda, sense cap tipus de neurodegeneració. Així, no és clar que EAAT3 pugui tenir algun paper en la finalització de la transmissió sinàptica, encara que hi ha discrepàncies entre el fenotip del ratolí *knockout* i una inhibició parcial de l'expressió per oligos antisentit (Rothstein *et al.*, 1996). Es postula que també podria tenir un paper aportant precursors per a la síntesi de GABA (es localitza en neurones GABAèrgiques) o que l'activitat elèctrica associada al transport de glutamat podria tenir algun paper en les neurones (Rothstein *et al.*, 1994; Hediger *et al.*, 1995). Es desconeix quin paper faria en la glia.

Haig de recordar ara que aquests transportadors, a més de l'activitat elèctrica associada al transport de glutamat, també presenten un flux d'anions no acoblat termodinàmicament i activat per substrat. A més d'aquesta conductància per anions, EAAT4 indueix una conductància selectiva de protons en estimular-se amb àcid araquidònic (Fairman *et al.*, 1999). Podem pensar llavors que aquests transportadors no únicament tenen la funció d'esclarir el glutamat que s'allibera durant la transmissió sinàptica, sinó que poden tenir un paper modulador en la senyalització neuronal. S'ha observat també que l'àcid araquidònic inhibeix EAAT2 quan està reconstituït de forma directa des de la fase aquosa (no a través de la membrana de fosfolípids), fet que és indicatiu de la complexitat reguladora que hi pot haver (Trotti *et al.*, 1995).

La importància d'aquesta conductància pels anions sí que és clara en EAAT5. La resposta a la llum que es dona en les cèl·lules bipolars de la retina es deu al tancament d'una conductància de clor postsinàptica que té les mateixes propietats funcionals que el transportador de glutamat EAAT5 (Grant *et al.*, 1995). A més, en els fotoreceptors dels cons de la salamandra, la conductància de clor actua de forma presinàptica a l'alliberació de glutamat per la mateixa cèl·lula, i això produeix una hiperpolarització que redueix l'excitabilitat cel·lular (Picaud *et al.*, 1995). Podríem pensar que aquesta també seria la funció de les altres isoformes EAAT en neurones.

El paper fisiològic dels transportadors ASCT1 i ASCT2 no es coneix. No és clar encara que aquestes isoformes equivalguin al sistema de transport ASC. Es postula que ASCT2 (també anomenat ATB⁰) podria correspondre al sistema B⁰, que tindria un paper important en la reabsorció d'aminoàcids zwitteriònics en ronyó i intestí prim (Kekuda *et al.*, 1997). Recentment, s'ha postulat que l'expressió d'ASCT2 en astroglia podria participar en el cicle glutamat-glutamina que es dona en el cervell (Broer *et al.*, 1999).

2.4 TRANSPORTADORS D'AMINOÀCIDS HETEROMULTIMÈRICS

Com que aquesta família s'ha estudiat i caracteritzat durant la present tesi, ja que representa l'objectiu principal del nostre grup de recerca, l'he desenvolupat en els apartats "Antecedents experimentals" i "Resultats i discussió" amb més extensió. Aquesta família de transportadors també ha rebut el nom d'HAT, de *heteromultimeric amino acid transporters*.

2.5 TRANSPORTADORS D'AMINOÀCIDS DEPENDENTS DE PROTÓ/HIDROXIL

Dins d'aquesta nova família de transportadors hi ha el sistema N de transport d'aminoàcids. Aquesta proteïna ha estat identificada pel grup de Robert Edwards. Encara que durant la redacció d'aquesta tesi els seus resultats no han estat publicats, la informació que ara escric prové del congrés fet el juliol de 1999 a Colorado sobre transport d'aminoàcids. Van trobar una proteïna homòloga als transportadors d'aminoàcids d'*Arabidopsis thaliana* AAP ("Arabidopsis amino acid permease") (Fischer, W.N. *et al.* 1995), la qual en expressar-se en cèl·lules o en oòcits no induïa cap tipus de transport. Van pensar, ja que els AAP són dependents de protó, que seria necessari crear un gradient de protons per expressar-la: així van expressar la proteïna en cèl·lules mutants per l'intercanviador Na^+/H^+ i van veure que podien expressar activitat de transport del sistema N.

Buscant en bases de dades David Torrents, del nostre grup, va trobar una proteïna anomenada *human transporter protein o g17*, que presenta homologia de l'ordre del 15% amb els transportadors d'aminoàcids AAP. A més, presenta homologia amb la proteïna SPBC1685 de *S. pombe* (20%), 14% amb la proteïna unc-47 de *C. elegans* i del 13% amb el transportador vesicular de GABA i glicina MMVIAAT. Desconeixem si és aquesta la proteïna responsable del sistema N, però al menys suggereix que hi pot haver una nova família de transportadors en humans com la que ja hi ha en plantes. He dut a terme la predicció per computadora dels dominis transmembrana (9 o 10, segons el programa utilitzat) de la qual presento una imatge (figura 4) (per a 10 dominis TM), un alineament entre AAP1-5 i g17, on es poden veure alguns aminoàcids conservats, en gris, en aquestes proteïnes i, en vermell, que estan conservats en les tres proteïnes citades anteriorment (Figura 5). D'especial interès són els residus Gly81, Leu87 i Pro382 que estan conservats en totes les proteïnes analitzades. Finalment, mostro un arbre filogenètic que indica el possible origen de cadascuna de les proteïnes comentades (figura 6).

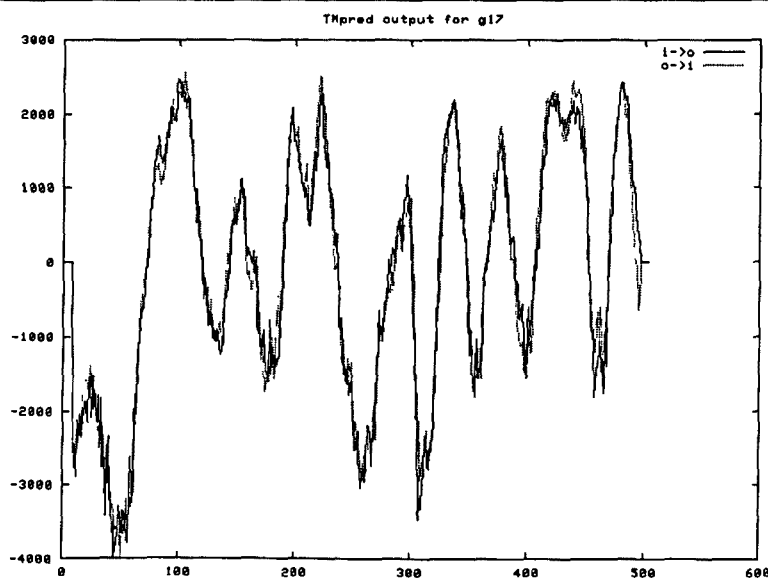


Figura 4. Predicció de l'estructura secundària de g17 (TMPred).

Introducció-22

```

aapI -----MKSFNTTEGHNHSTAESGDAYTVSDPTKNVDEDEGKERT----- 39
aapVI -----MEKKKSMFVEQSFPEHEIGDTNKNFDEDEGDKRT----- 35
aapIII -----MVQNHQTVLAVDMPQTGGSKYDDDDGKNRKT----- 32
aapV -----MVVQNVQDLVLPKHSSDSFDDDGKPKRT----- 30
aapII MGETAAANNRHHHHHGQVFDVASHDFVPPQPAFKCFDDDGKLRKT----- 48
aapIV -----MDVPRPAFKCFDDDGKLRKS----- 21
g17 ---MEAPLQTEMVELVPNGKHSEGLLPVITPMAGNQRVEDPAKSCMEKSFQKSPSKEP 57

          I                               II
aapI -----TWLTASAHIIITVIQGVVSLAWIAQLGWIAGTSILLIFSFIYFTT 90
aapVI -----TWMTGSAHIIITVIQGVVSLAWIAQLGWIAGTSILLIFSFIYFTT 86
aapIII -----VWWTASAHIIITVIQGVVSLAWIAQLGWIAGTSILLIFSFIYFTT 69
aapV -----TVWTASAHIIITVIQGVVSLAWIAQLGWIAGTSILLIFSFIYFTT 67
aapII -----VWWTASAHIIITVIQGVVSLAWIAQLGWIAGTSILLIFSFIYFTT 99
aapIV -----TVWTASAHIIITVIQGVVSLAWIAQLGWIAGTSILLIFSFIYFTT 58
g17 HFTDFEGKTFGMSVFNLSNIMCGSIIGLVYAMANTG---IILFLFLLLTAVALLS 113

          III                             IV
aapI ADCYRAPDPVTEKKNITYMDVVRSYLGRKVKQLCGVAQYGNLIGVTVGTTTASISLAV 150
aapVI ADCYRSPDPVTEKKNITYMEVVRSYLGRKVKQLCGLAQYGNLIGITIGTTASISLAV 149
aapIII AACYRSGDPVTEKKNITYMDAVRNLGKVKVTLCGVQYLNIFGVAIGTTAASISMAI 129
aapV CSCYRSGDPVTEKKNITYMDATHSNLGGIKVKVCGVQYVNLFGTAIGTTAASISMAI 127
aapII SDCYRTGDPVTEKKNITYMDAVRSILGKFKKICGLIQYLNLFGLAIGTTAASISMAI 159
aapIV SDCYRTGDPVTEKKNITYMDAVRSILGKFRFKICGLIQYLNLFGLAIGTTAASISMAI 118
g17 IHLLKSSGAVTIAEQLGYRAFETPKLAAALATLQNI GAMSSYLTKKELPQIQ 173

          V                               VI
aapI GKSICFHDKGHTADCTISNYPYMAVFGTIQVIFSQIPNFHKLIFLSIMAAMVMSITYTIG 210
aapVI KRSICFHNKGNHVKCATSNTPFMIIFAQIIFSQIPNFHNLWLSILAAMVMSICYSIG 206
aapIII KRSICFHF-----YMIAFGLVQILFSQIPDFDQLWLLSILAAMVMSITYSAG 175
aapV QRTSCQQ-----YMIAFGLVQIIFSQIPDFDQLWLLSIVAAMVMSIAYSAG 173
aapII KRSICFHKSGGKDPCHMSSNPYIMVFGVAEILISQVPPDFDQIWWWISIVAAMVMSITYSAG 219
aapIV KRSICFHF-----YMIMFGVTEILISQIKDFDQIWWWISIVAAMVMSITYSAG 164
g17 TFLLEEKTSDWYMNNGNYLVILSVTIIPLALMRQLGYLGYSGFSLSCMVFLLIIVYI 233

          VII                             VIII
aapI -----IGLAIATVAGG-KVGKTSMTGTAVG-----VDVTAQKIWRSFQAVGDIIFA 256
aapVI -----VGLSIKAAAGGGEHVRTTLTGVTG-----IDVSGAEKIWRWFQAIAGDIIFA 253
aapIII -----ALGIAQVVV-KVKGSLTGLHR-----TVTETQKYS----- 207
aapV -----ALGLVSKVVE-KEIKGSLTGTVTGVTLSGTVTSSQYS----- 212
aapII -----ALGIQVAAV-GVFKGSLTGISIG-----TVTQTKIWRWFQALGDIIFA 264
aapIV -----ALGIQVAAV-GVVKGSLTGISIG-----AVTQTKYS----- 197
g17 KKFHVPCPLPPNFNNTGFSHVEIVKEKVLQVEPEASAFCTPSYFTLNSQTAYTIPIM 293

          IX                             X
aapI YAYATVLI IQDTLRSSP-AENKAKKRALVGVSTTTFFIMCCGCIYAAAGDNAPGDF 315
aapVI YAYSTVLI IQDTLKAGPPSENAKRALVGVSTTTFFIMCCGCVYAAAGDAPGNF 313
aapIII --YSIIL IQDTVKSP-SEETK KATLVVSITTMFMCCGCMYAAAGDLSPGNI 264
aapV --YSMILT IQDTVKSP-AEVNTRKATFVVAITVFMCCGCVYAAAGDNAPGNI 269
aapII YSYSVLLI IQDTVRSPP-AESITK KATKIETITTFMCCGSMYAAAGDAAPGNI 323
aapIV --YSVLLI IQDTVRSPP-AESITK IATRIETAVTTFMCCGCMYAAAGDKAPGNI 254
g17 AFAFVCHPEVLPPIYTELKDPSSKMOHINLSTVYIMFMAALFVLTLYRGVESE 353

          XI                             XII
aapI TDFGFFERWLLIDFANACIAVHLIGAYQVFAQPFQVVEKCNRRYPDNKFI TSEYSVNV 375
aapVI TGFGFYERWLLIDFANACIAVHLIGAYQVFCQPFQVVESQAKRWPDNKFI TGEYKIHV 373
aapIII TGFGFYRWLLDIAN-----AQLPLFAIEKQASIFPDSFEI AKDIKIP 310
aapV AHGGFRNWLLDIAN-----LQPLFAI VEKEASRRFPESEFVTKI KIQ 315
aapII TGFGFYRWLLDIANAIVVHLVGAYQVFAQPFQVFAIEKSV AERYPDNDFLSKEFEIRI 383
aapIV TGFGFYRWLLDVAN-----AQLPLFAIEKQLAARFPDSDLVTKYEYIRI 300
g17 HTYSKVDWLLLCVR---VAVLTAVELTVFVLPVRRAIQMLFPNQEF SWLRHV 409

          XIII                            XIV
aapI PFLG-KFMISLFRVWRTAYVVI TTVVAMIFEFNAILGLGAASF WPLTVYFPVEMHIA 434
aapVI PCCG-DFSEIFRRLVWRTSYVVVAVVAMIFEFNDFLGLGAASF WPLTVYFPIEMHIA 432
aapIII PGFK-PLRLVERLIRWTVFVITTVISMLMPEFNDVVGILGALGFWK----- 357
aapV PFGK-PFNL LFRVWRTFFVITTVISMLMPEFNDVVGILGALGFWK----- 362
aapII PFGKSPYKVIFRMYRSGFVVITTVISMLMPEFNDVVGILGALGFWPLTVYFPVEMYIK 443
aapIV PGRSPYKVIFRAVYRSGFVVITTVISMLMPEFNDVVGILGALGFW----- 347
g17 IAVGLLTCNLVIFAPNILGFGVIGATSALILIFIPAFYFRIMP----- 457

          XV
aapI QTIKKYRARIALKTMCYVCLIVSLLAAGSAGLISSVKTYKPFRTMHE 485
aapVI QKILPKFTTWLTKILSWTCIVSLVAAAGSVQGLIQSLKDFKPFQAP-- 481
aapIII --KIPRWTRWVCLQVSLGCLVVSIAAAGSAGVLLDLKSKYKPFSEY- 405
aapV --NVPRWGTKWVCLQVLSVTCFLVSVAAAAGSVIGIVSDLKVYKPFQSEFT 411
aapII QRVEKWRTRWVCLQMLSVACLVISVAVGVSAGVMLDLKVYKPFKSTY- 493
aapIV -RVERWEMKWVCLQMLSCGLMI TLVAVGVSAGVMLDLKVYKPFKTTY- 396
g17 TESPARETPKILALCAMLGLLMTMSLSFTIWDWASGTRSHGGNH--- 504

```

Figura 5: Multialineament de g17 amb els membres de la família AAP.

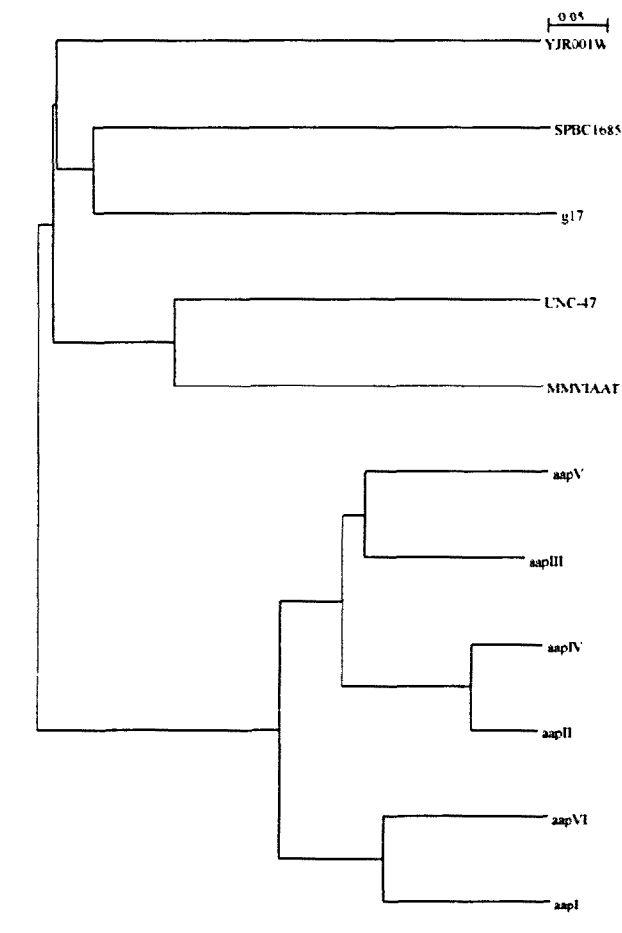


Figura 6. Arbre filogenètic d'alguns membres d'aquesta possible nova família de transportadors d'aminoàcids.

2.6 ALTRES PROTEÏNES INDIRECTAMENT IMPLICADES EN EL TRANSPORT D'AMINOÀCIDS

Durant el transcurs dels intents d'identificació d'alguns sistemes de transport (com, per exemple, L o A) o proteïnes que rescatin fenotips de defecte de transport en llevat, s'han identificat altres proteïnes que no sembla que hi estiguin directament implicades. Podríem considerar 3 tipus de proteïnes:

a) Proteïnes relacionades amb el citosquelet. Durant la purificació per reconstitució del sistema A, s'han trobat diferents proteïnes com ara la subunitat α_3 de la $\alpha_3\beta_1$ -integrina (McCormick *et al.*, 1995), γ -actina (Lin *et al.*, 1996), anquirina i fodrina (Handlogten *et al.*, 1996). És possible que aquestes proteïnes estiguin en contacte amb el transportador com s'ha vist en altres transportadors o canals a través dels dominis PDZ, agrupant-se en complexos funcionals (Fanning *et al.*, 1999, Craven *et al.*, 1998). S'ha de mencionar també que la proteïna 4F2hc que actua com a subunitat lleugera de diferents sistemes de transport (y^+L , L, etc) pot modular propietats de les integrines com ara la seva afinitat, fet que suggereix que pot haver-hi interaccions entre transportadors i proteïnes del citosquelet. Podríem suggerir que

aquestes proteïnes serien importants per mantenir la polaritat dels sistemes de transport en una cèl·lula determinada.

b) Proteïnes de xoc tèrmic. En línies cel·lulars CHO-K1 mutants que presenten més activitat de sistema A (Jones *et al.*, 1994) i en limfòcits B que presenten més activitat del sistema L en tractar-les amb èsters de forbol, hi ha un increment en l'expressió de la proteïna mitocondrial HSP60 (Woodlock *et al.*, 1997). Les proteïnes d'aquesta família s'han implicat en diferents processos que tenen relació amb canvis conformacionals provocats en altres proteïnes. Com que ara ja es coneixen les proteïnes responsables del sistema L (vegeu "Resultats i discussió"), es podria analitzar si hi ha una interacció física entre elles.

c) Proteïnes trobades en llevat. El transport d'aminoàcids en llevat està mediat per sistemes de transport generals i específics. Ljungdahl *et al.*, (1992), buscant transportadors d'aminoàcids, va aïllar mutants en llevat resistents a altes concentracions d'histidina. En trobar la proteïna mutada, SHR3, va veure que era una proteïna integral del reticle endoplasmàtic imprescindible per al transport de diferents permeases d'aminoàcids estructuralment relacionades des del reticle fins a la membrana plasmàtica. Probablement, SHR3 actua catalitzant un plegament específic o reaccions de translocació que s'esdevindrien posteriorment a la inserció en la membrana i que serien necessaris per a la sortida cap a la membrana. Així, faria una funció similar a la que duen a terme les proteïnes 4F2hc i rBAT en mamífers (veure "Resultats i discussió"). Perquè aquestes permeases d'aminoàcids necessiten factors únics per expressar-se funcionalment? L'autor postula que d'aquesta forma les cèl·lules de llevat podran expressar les proteïnes en la membrana de forma ràpida, en resposta a les condicions ambientals canviant (Ljungdahl *et al.*, 1992).

2.7 SISTEMES DE TRANSPORT D'AMINOÀCIDS NO IDENTIFICATS. FUTURES DIRECCIONS

Amb el descobriment de la família HAT, s'han pogut identificar la majoria de sistemes de transport que encara no s'havien identificat. Així, en aquests últims anys, s'ha identificat el sistema N, el sistema ASC, el sistema B⁰, el sistema L (2 variants), el sistema y⁺L (2 variants), el sistema b^{0,+}, el sistema X_c⁻, el sistema asc i el sistema B^{0,+}. Segurament hi ha encara altres gens homòlegs a aquests membres identificats que podran correspondre a altres variants com, per exemple, N^m, b⁺, etc.

Un dels sistemes de transport que encara no es coneix són els sistemes de transport de prolina (IMINO) i fenilalanina (PHE), presents en les membranes apicals de ronyó. Aquests sistemes podrien ser responsables de la malaltia iminoglicinúria (vegeu apartat 4). L'expressió funcional en oòcits o la recerca per homologia amb membres de la família GLYT podria representar una bona estratègia per intentar aïllar aquest transportador.

Un altre sistema que encara no es coneix i d'una alta importància fisiològica és el sistema de transport d'aminoàcids neutres petits A. Aquest sistema estaria altament regulat: creixement cel·lular, control hormonal, concentració d'aminoàcids i hiperosmolaritat (McGivan *et al.*, 1994). Diferents grups han intentat diferents

estratègies sense èxit: purificació per reconstitució, expressió funcional, modificació química per reactius, desenvolupament de línies cel·lulars amb defectes en el transport, etc. Una explicació possible és que aquest sistema de transport estigui format per diferents polipèptids, cosa que en faria molt més complicat l'aïllament. El sistema d'expressió en oòcits ha permès trobar fins a 3 gens involucrats en el transport, però també es cert que presenta uns nivells basals de transport d'alanina molt elevats.

Un cop estigui seqüenciat el genoma (cap al 2003), les homologies amb altres transportadors podrà ser una eina per identificar tots els gens implicats en el transport d'aminoàcids. En aquest moment serà important saber com caracteritzar aquests nous transportadors: eines com l'electrofisiologia permetran analitzar ràpidament quins substrats són transportats per cadascun dels nous gens. S'haurà de pensar llavors a tenir dos tipus de coneixement: un, explicar com funcionen aquests transportadors des del punt de vista mecanístic i, dos, entendre com funciona el transport d'aminoàcids des d'un punt de vista més fisiològic. Seran necessàries aproximacions interdisciplinàries per abordar aquest repte.

3. SISTEMES DE TRANSPORT D'AMINOÀCIDS LISOSOMALS

3.1 INTRODUCCIÓ

La funció primordial del lisosoma és la d'actuar com un lloc intracel·lular aïllat de la resta de la cèl·lula on es produeix la degradació de macromolècules, ja siguin de la pròpia cèl·lula o exògenes a ella. Això és així gràcies a les condicions fisicoquímiques que hi ha a l'interior. El lumen del lisosoma és a un pH àcid, al voltant de 5, a causa de l'acció d'una bomba de protons, que fa servir l'energia de la hidròlisi de l'ATP per bombejar protons cap a l'interior. A l'interior del lisosoma hi ha al voltant de 40 enzims hidrolítics: proteases, nucleases, glucosidases, lipases, fosfolipases, fosfatases i sulfatases. Tots aquests enzims presenten una activitat òptima a pH 5, fet que evita que destrueixin el citosol en el cas d'un trencament de la membrana (Alberts *et al.*, 1992).

El lisosoma pot obtenir el material que degrada a través de 3 rutes diferents: *a)* endocitosi: el material endocitat no reciclat passa a un compartiment endocític conegut com endolisosoma, el qual es converteix finalment en un lisosoma madur; *b)* autofagia: un determinat orgànul s'envolta de membranes del reticle endoplasmàtic i es forma un autofagosoma, que es fusionarà amb el lisosoma i s'iniciarà la seva digestió en el que es coneix com autofagolisosoma; *c)* fagocitosi de grans partícules i microorganismes: només es dona en cèl·lules especialitzades com ara els neutròfils i macròfags (Pisoni *et al.*, 1991).

Únicament es coneix a escala molecular el mecanisme pel qual les hidrolases lisosomals són transportades cap al lisosoma. Aquestes hidrolases en travessar el compartiment *cis*-Golgi pateixen una addició de grups de manosa-6-fosfat (M6P) als seus *N*-oligosacàrids. Aquests grups glucídics són reconeguts en el compartiment *trans*-Golgi per un receptor d'M6P, s'agrupen en vesícules recobertes de clatrina que es fusionen amb l'endolisosoma, i alliberen el seu contingut gràcies al pH àcid d'aquest compartiment. Això fa que el transport de les hidrolases sigui direccional.

També hi ha receptors d'M6P a la membrana plasmàtica que recupera enzims lisosomals que hagin escapat dels processos normals d'empaquetament (Alberts *et al.*, 1992).

Entre aquestes macromolècules que es degradaran podem considerar les següents: proteïnes, que donaran lloc a pèptids i aminoàcids, àcids nucleics, que donaran lloc a nucleòsids, sucres i ió de fosfat, i altres com ara lípids, sucres complexos, vitamines, etc, és a dir, tots els components que formen part d'una cèl·lula viva. Aquest fet feia plantejar la qüestió de com els productes finals d'aquesta degradació sortien a l'exterior a través de la membrana lisosomal (Pisoni *et al.*, 1991).

En el cas dels aminoàcids, fins als anys vuitanta es pensava que la membrana lisosomal era permeable a aquests. No va ser fins als treballs dels grups de Schulman (Gahl *et al.*, 1982) i Scheneider (Jonas *et al.*, 1982), que van observar que l'acumulació de cistina que es produïa en la malaltia genètica cistinosi es devia a un defecte en el transport lisosomal de cistina, que es va plantejar que hi havia sistemes de transport en la membrana lisosomal.

Després d'aquest primer treball, s'han identificat fins a 17 sistemes de transport. Alguns transportadors funcionen com a vies per treure els productes de degradació, mentre que altres transporten substrats a l'interior del lisosoma per ajudar als processos de degradació. Aquests transportadors poden ser similars als transportadors de la membrana plasmàtica o presentar diferències que els permetin treballar en l'ambient àcid del lisosoma (Pisoni *et al.*, 1991).

Tots els sistemes de transport descrits són independents de sodi. En algun cas són sensibles al gradient de pH o al potencial de membrana. Encara que podria ser que algun transportador fos present a la membrana plasmàtica i al lisosoma (per exemple, transportador de pèptids, PEPT1 (Fei *et al.*, 1994)), sembla que els transportadors lisosomals serien proteïnes completament diferents a les que hi ha a la membrana plasmàtica. La majoria dels sistemes de transport són d'especificitat àmplia: això es podria deure al fet que hi ha una gran diversitat en les macromolècules que es formen al lisosoma (Smith *et al.*, 1989).

Algunes malalties hereditàries es deuen a defectes en el transport de substrats en el lisosoma: *a)* la ja comentada cistinosi, per defectes en el transport de cistina i que comentaré més detalladament en l'apartat 4 d'aquesta introducció; *b)* la Malaltia de Salla (*Sialic acid storage disease*), deguda a defectes en un transportador d'àcid siàlic i glucurònic (Renlund *et al.*; Jonas *et al.*, 1986, Verheijen *et al.*, 1999); *c)* l'Acidúria metilmalònica: deguda a defectes en el transport de cobalamina (vitamina B₁₂) (Rosenblatt *et al.*, 1985).

3.2 METODOLOGIA PER ESTUDIAR EL TRANSPORT D'AMINOÀCIDS LISOSOMAL

Hi ha dues estratègies bàsiques per mesurar el transport d'aminoàcids en el lisosoma, que depenen de la puresa de la fracció de membrana de què es disposa:

a) Preparacions no totalment purificades. Com que hi ha altres orgànuls contaminants (principalment mitocondris), no es pot mesurar el transport de forma directa. El grup de Goldman (Goldman *et al.*, 1973) i més tard Reeves (Reeves *et al.*, 1979), van desenvolupar una estratègia per solucionar aquest problema: es tractava de carregar els lisosomes amb èsters d'aminoàcids. En incubar cèl·lules intactes o orgànuls aïllats amb l'èster de l'aminoàcid a pH neutre, el qual pot entrar per difusió dins del lisosoma. A l'interior del lisosoma és hidrolitzat per esterases (probablement catepsina G) per formar l'aminoàcid corresponent. Com que el pH luminal és àcid, l'aminoàcid no pot transportar-se per difusió i necessita sistemes de transport. Per tant, es poden estudiar aquests sistemes de transport mesurant la sortida d'aquests aminoàcids. D'aquesta forma es van caracteritzar inicialment el sistema de transport de cistina i el sistema *c* (vegeu apartat 3.3).

b) Preparacions purificades: Es pot mesurar el transport en el lisosoma intacte, obtingut a partir de centrifugacions en gradients de densitat en Percoll (Pisoni *et al.*, 1987), Percoll-metrimida (Storrie *et al.*, 1990), electroforesi (Harms *et al.*, 1980), etc, o en vesícules de membranes lisosomals (Mancini *et al.*, 1989). En el primer cas l'activitat es refereix al transport respecte a l'activitat latent de l'enzim β -hexosaminidasa (activitat en presència de detergent, menys activitat en absència d'aquest), la qual reflecteix la integritat de la membrana lisosomal.

A partir d'aquestes preparacions de membranes es poden intentar aïllar les proteïnes responsables d'aquesta activitat mitjançant un assaig de solubilització-reconstitució. Així s'ha pogut purificar la proteïna responsable del transport d'àcid siàlic (Mancini *et al.*, 1990).

c) Una altra estratègia per estudiar transportador lisosomals (si es coneix ja el cDNA) és la que s'ha fet amb les proteïnes MTP (Hogue *et al.*, 1996), LyCAT i LyMAT (tesi present). S'ha observat que si se suprimeixen els senyals de localització lisosomal de l'extrem C-terminal, i s'expressen aquests constructes en l'oòcit de *Xenopus*, les proteïnes es localitzen a la membrana plasmàtica i són funcionals com a transportadors.

3.3 SISTEMES DE TRANSPORT D'AMINOÀCIDS DESCRITS

3.3.1 SISTEMA DE TRANSPORT DE CISTINA

Aquest sistema de transport va ser el primer que va ser caracteritzat, per Gahl (Gahl *et al.*, 1982) i Jonas (Jonas *et al.*, 1982), ja que es volia demostrar que la cistinosi (vegeu apartat 4.6) es devia a un defecte en un transportador de cistina present a la membrana lisosomal.

Aquest sistema s'ha caracteritzat en diferents tipus cel·lulars: leucòcits, limfòcits, fibroblasts, hepatòcits i FRTL-5 (tiroides) (Pisoni *et al.*, 1991). La cistina es produeix en el lisosoma quan les proteïnes que presenten ponts disulfur es degraden. És un sistema molt específic, que reconeix únicament l'isòmer L de cistina i selenocistina i, amb baixa afinitat, cistationina, el disulfur mixt de cisteamina-cisteïna (veure 3.3.2) i cistamina. Presenta un pH òptim entre 5.5 i 6.5, una K_m entre 0.3-0.5 mM i presenta transestimulació. Treballant amb fibroblasts es va suggerir

que el lloc d'unió del substrat tindria dominis polars i apolars, que permetrien acomodar ramificacions en el carboni 3 i la substitució del sulfur per seleni o carboni (Greene *et al.*, 1990).

Fent servir l'inhibidor de la síntesi de proteïnes cicloheximida es va suggerir que la proteïna tindria una vida mitjana de 21 hores. La funció no era inhibida per l'inhibidor de glicosilació tunicamicina ni pels inhibidors del processament d'oligosacàrids castanospermina i desoximanojirimicina, fet que indicava que el transportador no tindria requeriments especials d'*N*-glicosilació (Gahl *et al.*, 1993).

El 1998, es va identificar el gen responsable de la malaltia cistinosi (CTNS). CTNS codifica per una proteïna anomenada cistinosa, amb una prognosi d'estructura de 7 dominis transmembrana. No s'ha demostrat encara que aquesta proteïna funcioni com un transportador de cistina en el lisosoma (Town *et al.*, 1998).

3.3.2 SISTEMA C: AMINOÀCIDS CATIÒNICS

Aquest sistema de transport va ser caracteritzat per Pisoni (Pisoni *et al.*, 1985); (Pisoni *et al.*, 1987). Aquest sistema és diferent al sistema y^+ en aspectes diferents: (1) presenta una especificitat àmplia de substrat, i accepta aminoàcids on el grup α -amino està monometilat o el grup ϵ -amino està trimetilat. No transporta aminoàcids neutres ni en presència de sodi; (2) no presenta un grau alt d'estereoespecificitat; (3) és molt sensible a canvis en el pH, transporta 10 vegades més a pH 7 que a pH 5; (4) presenta una K_m de 320 μ M, menys afí que el sistema y^+ .

Quina és la direcció del transport? La sensibilitat al pH afavoreix l'entrada neta d'aminoàcids dins del lisosoma. Així canvis en el gradient de protons afecten de forma directa a l'entrada i de forma inversa a la sortida d'aminoàcids. Com que presenta transestimulació, s'especula que el lisosoma podria ser una reserva d'aminoàcids, on el flux net estaria regulat per les necessitats nutricionals de la cèl·lula.

El descobriment del sistema *c* va permetre entendre el mecanisme pel qual la molècula cisteamina permetia reduir la concentració de cistina present en els lisosomes d'individus amb cistinosi. La cisteamina reaccionaria amb la cistina formant cisteïna i un disulfur mixt de cisteïna i cisteamina, el qual es va comprovar que era transportat per aquest sistema, ja que té càrrega positiva.

3.3.3 SISTEMA D: AMINOÀCIDS DICARBOXÍLICS

Aquest sistema ha estat caracteritzat per Collarini (Collarini *et al.*, 1989) en fibroblast humans. Presenta una afinitat alta per glutamat i aspartat, amb una K_m entre 4-12 μ M. El transport s'incrementa linealment amb el pH, i és major a pH bàsics (pH 8). Presenta una especificitat de substrat àmplia que té en compte la mida, la longitud i l'estereoespecificitat. La discriminació entre aminoàcids D i L es fa més apreciable quan la cadena de l'aminoàcid és més llarga de 6 carbonis. La *N*-metilació redueix el reconeixement per aquest sistema.

3.3.4 SISTEMES *E*, *F* I *P*: AMINOÀCIDS NEUTRES PETITS

Aquesta activitat de transport va ser descrita per Pisoni (Pisoni *et al.*, 1987b), que va caracteritzar el transport de prolina i alanina en lisosomes aïllats mitjançant separació en Percoll. Les cinètiques del transport de prolina indicaven la presència de dos components de transport: un d'afinitat alta, amb K_m de 0.01 mM, i que era inhibït per alanina (sistema *f*), i un d'afinitat baixa, amb K_m de 0.07 mM, que no era inhibït per alanina. Aquest últim sistema només era inhibït per 3,4-dehidro-L-prolina i, així, es va anomenar sistema *p* (prolina-específic).

El sistema *f* és semblant al sistema A present en la membrana plasmàtica excepte per algunes diferències: el sistema *f* es independent de sodi, i l'àcid 2-metilaminoisobutíric (MeAIB) no l'inhibeix de manera tan forta com ho fa en el sistema A. Probablement aquest sistema de transport no admet ramificacions en el carboni α , ja que l'àcid α -aminoisobutíric tampoc és efectiu com a inhibidor del transport de prolina. També hi ha diferències en la dependència del pH, ja que el transportador lisosomal té el pH òptim a 6.4.

En caracteritzar el transport d'alanina es va observar que no tot el transport s'inhibia per prolina, fet que indica l'existència d'una altra entitat de transport. Aquest altre sistema que va anomenar sistema *e*, no acceptava aminoàcids *N*-metilats. Aquest sistema de transport és molt semblant al sistema ASC descrit en fibroblasts (Gazzola *et al.*, 1980). Podria ser que hi hagués un transportador present en la membrana plasmàtica i en la membrana lisosomal.

En la figura 7 presento un esquema dels tres sistemes de transport que s'han descrit en aquest apartat.

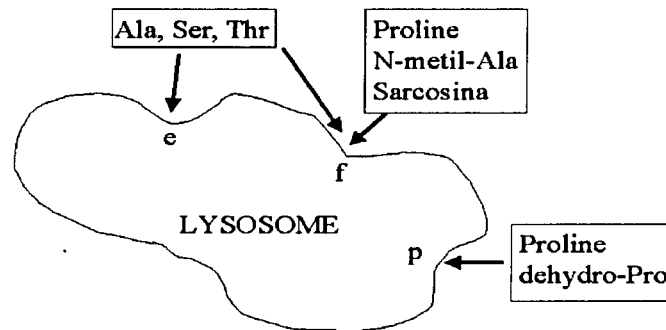


Figura 7. Sistemes de transport d'aminoàcids neutres petits lisosomals.

3.3.5 SISTEMA *H*: AMINOÀCIDS NEUTRES GRANS I HIDROFÒBICS

Aquest sistema de transport va ser caracteritzat per Bernar (Bernar *et al.*, 1986) en la línia cel·lular FRTL-5 derivada de tiroides, fent servir la tècnica de carregar els lisosomes amb èsters d'aminoàcids, en concret de tirosina. Aquest sistema reconeix específicament aminoàcids llargs com ara isoleucina, leucina, triptòfan, tirosina i fenilalanina. La valina i metionina també són transportats però amb afinitat més baixa. És esteroespecífic, amb una K_m per a tirosina de 20 μ M.

Harper (Harper *et al.*, 1988) va observar que el transport de tirosina s'incrementava unes 7 vegades quan s'afegia TSH en el medi de cultiu, increment que es podia mimetitzar amb cAMP, i que s'inhibia amb cicloheximida i actinomicina D, implicant la síntesi de noves proteïnes. És el primer cas de regulació hormonal d'un sistema de transport lisosomal.

La possible funció fisiològica seria la de permetre una síntesi elevada de tiroglobulina. Aquesta hipòtesi ha estat reforçada pels treballs de Tietze (Tietze *et al.*, 1989) i Andersson (Andersson *et al.*, 1990) on demostren que el metabòlit moniodotirosina, que es produeix en la degradació de la tiroglobulina, és reconegut pel sistema *h*.

Stewart (Stewart *et al.*, 1989) va caracteritzar també transport d'aminoàcids llargs com ara fenilalanina, leucina i triptòfan en fibroblast. És un sistema d'alta afinitat, però a diferència del sistema *h* és molt més selectiu per a l'esteroisòmer L. Això indica que hi poden haver altres variants d'aquest sistema dependent del teixit.

3.3.6 SISTEMA DE TRANSPORT DE CISTEÏNA

El sistema de transport de cisteïna tindria la funció d'introduir grups tiol dins del lisosoma. Presenta una K_m de 53 μM i presenta la més alta energia d'activació descrita per a un transportador lisosomal. És altament específic per l'esteroisòmer L i presenta requeriment estricte d'una cadena lateral amb un tiol i un grup α -amino, i no acomoda aminoàcids més llargs que la cisteïna. El grup α -carboxil no és necessari, ja que la cisteamina inhibeix fortament el transport de cisteïna. No s'observa cap transport entre els pH 4.8 i 6, però aquest incrementa entre 7 i 10 vegades entre els pH 6 i 7.5. Aquesta dependència del pH afavoriria l'entrada neta al lisosoma (Pisoni *et al.*, 1990).

Quina és l'explicació per aquesta dependència del pH? Pisoni *et al.*, (1995) va aportar noves dades. El transport de cisteïna és inactivat per DEPC d'una forma dependent de protó: no inactiva a pH < 6, inactiva en un 50% a pH 6.6 i inactiva de forma màxima a pH \geq 7.3. Aquesta correspondència entre la inactivació per DEPC i la corba d'activitat enfront del pH, suggereix que l'increment d'activitat que es dona entre pH 6 i 7.5 es deu a la desprotonació d'un residu d'histidina. Aquest residu d'histidina estaria en el lloc d'unió a substrat, ja que es protegeix per substrat. D'altra banda, sembla que l'activitat també seria sensible al gradient de protons transmembrana, ja que hi ha un increment d'1.5 vegades de transport de cistina quan s'estableix un gradient de pH i el pH extracel·lular és de 7.4.

Aquest transportador no és l'única font d'entrada de grups tiols dins del lisosoma. Recentment, s'ha caracteritzat la presència d'un nou transportador de cisteamina en fibroblasts humans que tindria una K_m de 0.88 mM i transportaria aminotiols i aminosulfits. Aquest transportador tindria importància en la vehiculació de fàrmacs per reduir la concentració de cistina en els pacients amb cistinosi (Pisoni *et al.*, 1995b).

L'entrada de cisteïna afavoriria la proteòlisi de dues maneres: ajudant les proteases lisosomals que depenen de grups tiol i reduint els ponts disulfur de les proteïnes



que es degraden. La importància fisiològica d'aquest transport de cisteïna en el lisosoma es posa de manifest en l'observació experimental que hi ha una correlació entre la capacitat de presentar antígens que tenen ponts disulfur per cèl·lules presentadores d'antigen com ara els macròfags, i el transport intracel·lular de cisteïna (Gainey *et al.*, 1996).

3.3.7 SISTEMA DE TRANSPORT DE TAURINA

Aquest sistema s'ha descrit en lisosomes de fetge (Vadgama *et al.*, 1991) El transport de taurina és independent de sodi amb un pH òptim de 6.5, amb una especificitat de substrat similar al sistema de transport BETA (vegeu **taula 1**) i una K_m de l'ordre de mM. El transport és sensible al gradient de potassi. Probablement, aquest transportador permeti adaptar els lisosomes a canvis de la pressió osmòtica.

3.3.8 ELS TRANSPORTADORS LISOSOMALS LyCAT I LyMAT

Aquestes dues proteïnes s'han descobert durant la present tesi, i per això he considerat més adient explicar el que sabem sobre aquestes en l'apartat "resultats i discussió".

4. MALALTIES HEREDITÀRIES ASSOCIADAES A DEFECTES EN EL TRANSPORT D'AMINOÀCIDS

4.1 CISTINÚRIA

La cistinúria és una malaltia autosòmica recessiva caracteritzada per una hiperaminoacidúria de cistina i aminoàcids dibàsics (Garrod, A.E. 1908). A causa de la baixa solubilitat de la cistina, aquesta precipita formant càlculs renals que produeixen obstrucció, infecció i fins i tot insuficiència renal. Dependent de l'autor hi ha 2 o 3 tipus de cistinúria: tipus I, recessiva; i tipus no-I, parcialment dominant (Morin *et al.*, 1971). Els tipus no-I es podrien dividir en tipus II o tipus III, dependent de si presenten o no defectes en els nivells plasmàtics de cistina després d'una dosi oral (Rosenberg *et al.*, 1966) (vegeu **Taula 1** "Antecedents").

Dent i Rose (1951) van postular que la cistinúria es deuria a un defecte d'un sistema de transport comú per a cistina i aminoàcids dibàsics. Aquest sistema es trobaria a la membrana apical del túbul proximal (segment S3) (Thier *et al.*, 1964).

Pras *et al.*, (1994) trobava que hi havia lligament entre la cistinúria i marcadors en el cromosoma 2p. El mateix any, a la mateixa revista que Pras *et al.*, (1994), Calonge *et al.*, (1994) va identificar el gen rBAT com a gen responsable de cistinúria i va trobar 6 mutacions en pacients; entre elles, la mutació M467T que es va comprovar que afectava la funció de la proteïna. En la **figura 8** mostro la localització de les mutacions que s'han trobat fins ara en la proteïna rBAT:

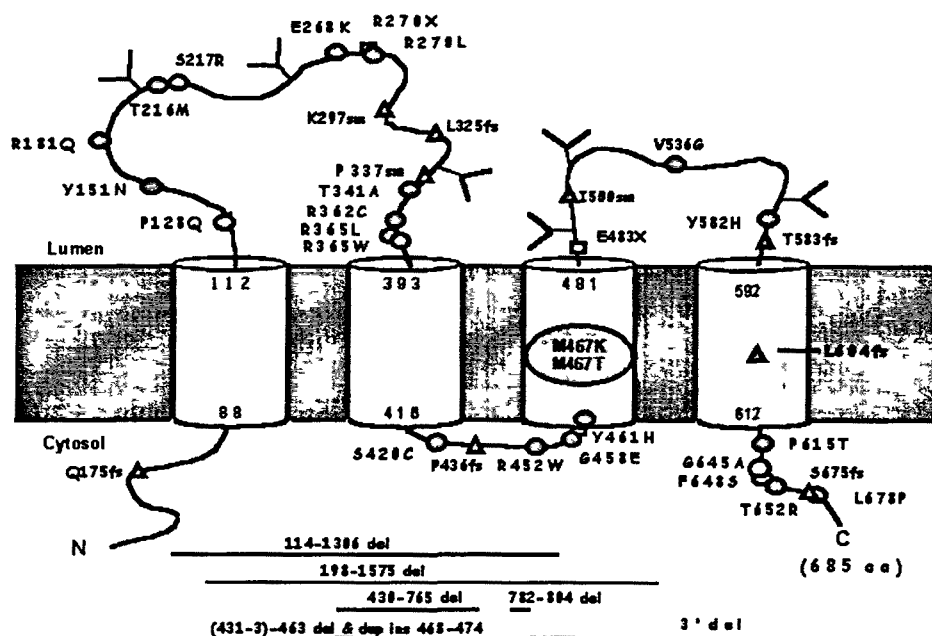


Figura 8. Representació esquemàtica de les mutacions puntuals, insercions i delecions que s'han trobat en el gen rBAT en pacients de cistinúria de tipus I.

Gasparini *et al.*, (1995) va anotar que totes les mutacions trobades en rBAT (44% dels cromosomes de cistinúria tipus I estudiats) eren de pacients de tipus I, sense cap alteració en malalts de tipus II i III. Aquest fet suggeria que hi havia heterogeneïtat genètica. Això va ser demostrat per Calonge *et al.*, (1995b) amb estudis de lligament, ja que les famílies amb cistinúria de tipus III no estaven lligades a gens de la banda cromosòmica 2p16.3, on es troba el gen rBAT. Més tard, Bisceglia *et al.*, (1997) va mapar el locus de cistinúria de tipus III en el cromosoma 19q13.1. Dades preliminars suggerien que el locus de cistinúria de tipus II també era al mateix locus. Stoller *et al.*, (1999) va demostrar que el gen de tipus II és al mateix locus, i afirma que les diferències fenotípiques es deuen a diferents al·lels del mateix locus. Per tant, podem parlar de dos tipus de cistinúria: tipus I i no-I.

El Consorci Internacional de Cistinúria (1999) va identificar el gen $b^{0,+}AT$ (vegeu "Resultats i discussió") com a gen responsable de la cistinúria de tipus no-I. Aquest gen és al locus anteriorment definit i indueix activitat $b^{0,+}$ en expressar-se en cèl·lules COS. S'han identificat diferents mutacions en $b^{0,+}AT$, entre elles, la mutació V170M que provoca una pèrdua de funció.

En la figura 9 mostro la localització de les mutacions que s'han trobat en $b^{0,+}AT$ en pacients cistinúrics de tipus no-I. Algunes d'elles (V170M) s'han expressat funcionalment, i s'ha observat un defecte funcional respecte a la proteïna salvatge (vegeu "Resultats i discussió").

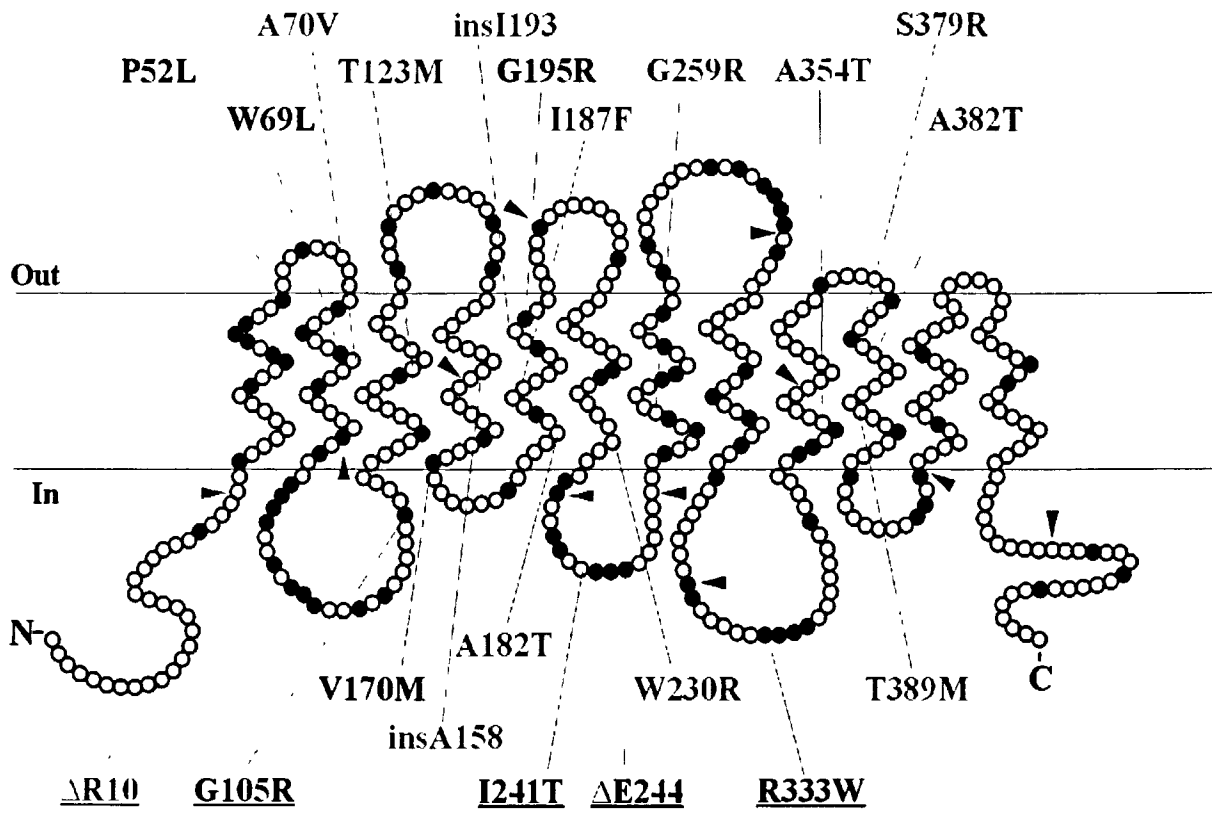


Figura 9. Representació esquemàtica de les mutacions que s'han trobat en pacients cistinúrics de tipus no-I. En negre es mostren els residus conservats en tota la família HAT (vegeu "Resultats i discussió"), subratllats si es troben en loops intracel·lulars. Es discuteix sobre si el canvi A354T no és un polimorfisme.

No és gaire clar encara per què mutacions en $b^{0,+}AT$ són parcialment dominants, mentre que mutacions en rBAT són recessives. Com que no hi ha una col·localització total en el túbul proximal, la hipòtesi més plausible és que aquestes dues proteïnes formarien part de dos sistemes de transport diferents: $b^{0,+}-1$, responsable de la reabsorció d'aminoàcids en el segment S1-S2 (baixa afinitat-alta capacitat) i format per $b^{0,+}AT$ i una subunitat homòloga a rBAT no identificada, i $b^{0,+}-2$, responsable del sistema de transport d'alta afinitat i baixa capacitat, format per rBAT i una subunitat homòloga a $b^{0,+}AT$ encara no identificada (vegeu "Resultats i discussió").

El desenvolupament de models animals *knockouts* per cada gen i la identificació d'altres gens homòlegs permetrà avançar més en l'enteniment d'aquesta malaltia. D'altra banda, la determinació de l'estructura genòmica (vegeu figura 10) està permetent fer de forma més fàcil el crivellatge de mutacions en tots els pacients existents, amb el que es podrà correlacionar en el futur alteracions del fenotip amb alteracions del genotip.

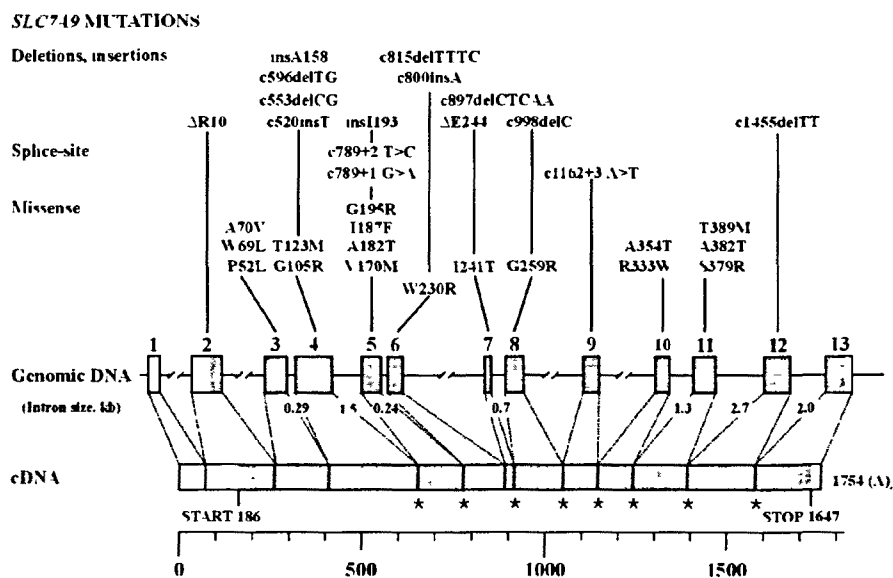


Figura 10. Estructura genòmica del gen b^{0+} AT. Localització de les mutacions trobades en pacients cistinúrics de tipus no-I.

4.2 INTOLERÀNCIA A PROTEÏNES AMB LISINÚRIA (LPI)

La LPI és una malaltia autosòmica recessiva que presenta com a símptomes clínics intolerància a les proteïnes, desenvolupament físic retardat, diarrea, malabsorció, hepatomegàlia, vòmits, cirrosi, retard mental, fragilitat muscular, osteopènia, proteïnosi alveolar, hiperexcreció d'aminoàcids bàsics, nivells baixos d'urea en sang i leucopènia. Aquesta malaltia és molt més freqüent a Finlàndia (1 de cada 60000 naixements).

El transport d'ornitina i arginina en cèl·lules de fetge i en la membrana basolateral de cèl·lules renals és defectuós (Rajantie *et al.*, 1981). Aquest defecte es va reproduir en línies cèl·lulars de fibroblast per Smith *et al.*, (1987). La deficient entrada d'ornitina no permetria que es desenvolupés el cicle d'urea amb l'enzim ornitina-transcarbamilasa i, així, l'administració oral de citrulina, que posteriorment es metabolitzaria a ornitina, (Carpenter *et al.*, 1985) millorava aquests símptomes.

Lauteala *et al.*, (1997) va mapar el locus de la LPI en el cromosoma 14q, entre els marcadors D14S72 i MYH7, interval que conté el locus TCRA. Torrents *et al.*, (1999) i Borsani *et al.*, (1999) han trobat mutacions en el gen y^+ LAT-1 responsables de LPI. Aquest gen s'expressa en la membrana basolateral del ronyó, i forma amb 4F2hc un dels transportadors y^+ L (vegeu "Resultats i discussió").

En la **taula 4** indico les mutacions que s'han trobat de y^+ LAT-1 en pacients que presenten aquesta malaltia. El mutant L334R, trobat en un pacient espanyol no funciona correctament (vegeu "Resultats i discussió"), igual que el mutant G54V, ja que inactiven el transportador (Mykkänen, J. Febrer 1999)

| Canvi de nucleòtid | Tipus de mutació | Origen ètnic |
|-----------------------|---|--------------|
| 539delTT (exó 3) | <i>Frameshift</i> després de V84 | Turquia |
| 447G→T (exó 3) | <i>Missense</i> (G54V) | Letònia |
| 447G→T (exó 3) | <i>Missense</i> (G54V) | Estònia |
| 1012G→A (exó 5) | <i>Nonsense</i> (W242X) | Marroc |
| 1012G→A (exó 5) | <i>Nonsense</i> (W242X) | Nord Africa |
| 1012G→A (exó 5) | <i>Nonsense</i> (W242X) | Marroc |
| 1012G→A (exó 5) | <i>Nonsense</i> (W242X) | Marroc |
| 911+1G→A (intró 4) | Lloc d' <i>splicing</i> (<i>skipping</i> exó 4) | Turquia |
| 1291delCTTT (exó 8) | <i>Frameshift</i> després de L334R | Espanya |
| 1291delCTTT (exó 8) | <i>Frameshift</i> després de L334R | Espanya |
| 1299G→A (exó 8) | <i>Missense</i> (G338D) | Suec |
| 1287T→G (exó 8) | <i>Missense</i> (L334R) | Espanya |
| 1471delTTCT (exó 9) | <i>Frameshift</i> després de L395 | Alemania |
| 1438duplAACTA (exó 9) | <i>Nonsense</i> (Y384X) | Canadà |
| 1181-2 A→T (intró 6) | Lloc d' <i>splicing</i> criptic i <i>frameshift</i> després de V298 | Finlàndia |
| 1548delC (exó 10) | <i>Frameshift</i> després de F420 | Aràbia |
| 1707C→T (exó 11) | <i>Nonsense</i> (R473X) | Austràlia |
| 1746delG (exó 11) | <i>Frameshift</i> després de L395 | Holanda |
| 1746delG (exó 11) | <i>Frameshift</i> després de L395 | Noruega |

Taula 4. Mutacions trobades en el gen y^+ LAT-1 que causen intolerància a proteïnes amb lisinúria.

Serà interessant disposar de models animals per entendre com mutacions en aquesta proteïna poden provocar tots aquestes manifestacions fenotípiques. Una possible explicació és que molts dels defectes es puguin deure a alteracions en cèl·lules del sistema immune, on y^+ LAT-1 s'expressa en nivells alts.

4.3 MALALTIA DE HARTNUP

La malaltia de Hartnup va ser descrita per Baron *et al.*, (1956). És una malaltia autosòmica recessiva que es caracteritza per tenir aminoacidúria, atàxia del cerebel, inestabilitat emocional i erupcions a la pell semblant a la pel·lagra (a causa d'una deficiència en niacina). Hi ha un defecte en el transport intestinal i renal d'alguns aminoàcids neutres (Scriver *et al.*, 1965), situat a la membrana apical (Shih *et al.*, 1971). El defecte de niacina és estrany, i així aquesta malaltia normalment és benigne, i es manifesta amb malnutrició.

Probablement es tracta d'una malaltia heterogènia, ja que s'han descrit pacients amb diferents fenotips (Seakins *et al.*, 1967). Scriver *et al.*, (1985) va postular que altres gens que controlen l'homeòstasi dels aminoàcids en plasma podrien afectar les anormalitats clíniques que es donen en pacients amb la malaltia, però va definir que hi hauria dues formes de la malaltia: una que afectaria el ronyó i l'intestí i una altra que afectaria només el ronyó.

Symula *et al.*, (1997) va mapar en ratolí el gen de la hiperfenilalaninanèmia 2 (*hph2*) en el cromosoma 7, una mutació recessiva que presenta un fenotip molt similar a la malaltia de Hartnup. Per sintènia el gen responsable correspon al locus del cromosoma humà 11q13.

Basant-se en les característiques del transport induït i la localització apical es pot postular que el transportador ASCT2 (vegeu "Introducció") seria un gen candidat per a aquesta malaltia, encara que no es localitza en el cromosoma 11.

4.4 IMINOGLICINÚRIA

La iminoglicinúria és una malaltia autosòmica recessiva, que presenta com a símptomes clínics retard mental, atròfia de la retina i hiperglicinúria i prolinúria. Els iminoàcids (prolina i hidroxiprolina) comparteixen el mateix mecanisme de reabsorció que la glicina (Rosenberg *et al.*, 1968). Hi ha diferents variants de la malaltia, que es creu que són degudes a diferents al·lels del mateix gen (Scriver *et al.*, 1985).

Hi ha evidències per pensar que hi ha dos transportadors de prolina dependents de sodi a les membranes apicals de ronyó: un d'alta afinitat compartit amb glicina i un altre de baixa afinitat no compartit amb glicina (Foreman *et al.*, 1985). El fet que el transport de prolina sigui també dependent de clorur suggereix que el transportador hauria de ser de la família de transportadors dependents de Na^+ i Cl^- (homòlegs a GLYT o PROT) (vegeu "Introducció").

4.5 AMINOACIDÚRIA DICARBOXÍLICA

Aquesta malaltia es caracteritza per la hiperexcreció d'aminoàcids aniònics, així com a retard mental. El defecte del transport s'ha associat al ronyó i l'intestí. El ratolí *knockout* pel transportador EAAT3, que està altament expressat en intestí i ronyó, desenvolupa aquesta malaltia (Peghini *et al.*, 1997). No s'han descrit encara mutacions en aquest gen en pacients que tinguin aquesta malaltia, encara que el número de pacients és molt limitat.

4.6 CISTINOSI

La cistinosi és una malaltia hereditària autosòmica recessiva, que presenta alteracions multitissulars als ulls (fotofòbia, cristalls a la còrnia i la conjuntiva, retinopatia), al ronyó (nefropatia, fallida renal, síndrome de Fanconi), metabòliques (hipotiroïdisme, fallida dels ovaris, insuficiència endocrina i exocrina, errors en les concentracions d'aigua i electròlits), retardament en el creixement, pèrdues de memòria, alteracions musculars (miopatia, disfunció motora oral, debilitat muscular general). La cistinosi s'ha classificat com una malaltia lisosomal d'acumulació de cistina. Així, probablement, tots aquests defectes es deuen a la deposició de cristalls de cistina en diferents òrgans.

Gahl *et al.*, (1984) va trobar, fent servir lisosomes de leucòcits, que els heterozigots presentaven velocitats de sortida de cistina un 50% inferior que els normals. Aquest efecte de la dosi gènica donava suport a la idea que el defecte bioquímic era el transport de cistina a través de la membrana lisosomal.

Per poder trobar el transportador lisosomal, Pisoni *et al.*, (1992) va desenvolupar un assaig de selecció, així els fibroblast de pacients amb cistinosi morien en tractar-se amb èster de cistina-dimetil (CDME).

Per tractar la cistinosi es fa servir el compost cisteamina (Gahl *et al.*, 1987; Kaiser-Kupfer *et al.*, 1987; Markello *et al.*, 1993), que forma un disulfid mixt amb la cistina, compost que pot sortir a través del sistema de transport lisosomal *c* (vegeu "Introducció"). D'aquesta manera s'aconsegueixen dissoldre els cristalls de cistina.

El gen de cistinosi va ser mapat al cromosoma 17p13 pel Cystinosis Collaborative Research Group (McDowell *et al.*, 1995). Així, Town *et al.*, (1998) va identificar el gen CTNS com a responsable de la malaltia, ja que s'han trobat diferents mutacions en els pacients amb cistinosi. CTNS codifica per la cistinosina, una proteïna de 367 aminoàcids amb predicció de 7 dominis transmembrana i amb característiques de proteïna lisosomal. És homòloga a la proteïna de llevat ERS1, que s'ha implicat en la retenció de proteïnes en el reticle endoplàsmic.

No s'ha demostrat encara que la cistinosina funcioni com a transportador de cistina. Un cas similar es dona en els pacients que pateixen la malaltia Nieman-Pick (Carstea *et al.*, 1997). El defecte consisteix en una sortida deficient de colesterol dels lisosomes, mentre que el gen responsable és homòleg a proteïnes implicades en l'homeòstasi del colesterol en el reticle. L'expressió de la proteïna en sistemes cel·lulars permetrà respondre a aquesta qüestió.

Antecedents

ANTECEDENTS

El coneixement de les diferents activitats de transport d'aminoàcids prové de l'anàlisi del transport d'aquests en cèl·lules o vesícules de membrana provinents del teixit que es vol analitzar. A causa de la presència escassa d'aquestes proteïnes en la membrana i també la seva baixa estabilitat, conèixer la proteïna responsable de la funció per una estratègia clàssica de purificació-reconstitució presenta moltes dificultats. A més, és possible que algunes entitats de transport estiguin formades per diferents polipèptids amb propietats fisicoquímiques diferents, i encara és més difícil poder arribar a tenir una fracció totalment pura del transportador analitzat. Davant d'aquestes dificultats, l'expressió funcional en oòcits de *Xenopus* representa una estratègia alternativa per a l'aïllament molecular de proteïnes implicades en el transport d'aminoàcids, sempre que les seves activitats siguin detectables en expressar-les en l'oòcit. (Soreq *et al.*, 1992)

D'aquesta forma, el nostre grup va expressar activitat independent de Na^+ de transport d'aminoàcids injectant en oòcits poli(A)⁺ de ronyó de conill. Aquesta activitat de transport era d'especificitat àmplia per a aminoàcids neutres i bàsics, i era saturable amb una K_m al voltant de 0.6 mM. El missatger responsable d'aquesta activitat tenia una mida entre 1.8 i 2.4 kb (evidenciat per separació del poli(A)⁺ per mida en gradients de sacarosa i injecció de les diferents fraccions en l'oòcit) (Bertran *et al.*, 1992). Amb aquestes evidències, el nostre grup, en col·laboració amb el grup del professor Heini Murer, va clonar per expressió funcional un cDNA que en expressar-se en oòcits induïa la mateixa activitat que es veia en injectar el poli(A)⁺ de ronyó (Bertran *et al.*, 1992b). A més, l'activitat d'aquest poli(A)⁺ s'inhibia en incubar aquest amb un oligo antisentit generat a partir de la seqüència d'aquest cDNA (Magagnin *et al.*, 1992). Aquesta proteïna es va anomenar rBAT (*related to b^{0,+} amino acid transport activity*), ja que l'activitat que induïa en oòcits era molt similar a la descrita en blastòcits de ratolí ($b^{0,+}$) per Van Winkle (Van Winkle *et al.*, 1988). La diferència que hi havia entre aquestes dues activitats era que rBAT també induïa transport de cistina. Independentment, dos grups diferents van clonar la mateixa proteïna de rata (Wells *et al.*, 1992; Tate *et al.*, 1992).

El transport induït per rBAT en oòcits de *Xenopus* era saturable, amb K_m per a aminoàcids bàsics i cistina entre 50-100 μM i variable per a aminoàcids neutres que depenen del grup radical: l'afinitat era més alta quan més gran era el grup radical. Així, a per aminoàcids com la L-leucina la K_m era de l'ordre de μM , per a altres com ara la L-alanina, de l'ordre de mM i, finalment l'L-glicina no era transportada. Aquesta activitat de transport no és estereoselectiva, els D-aminoàcids es transporten d'igual forma que els L-aminoàcids (Bertran *et al.*, 1992b)

Per transferència Northern es va analitzar l'expressió de l'RNA missatger. En condicions d'alta astringència, el cDNA d'rBAT hibrida amb transcrits de 2.2 i 3.8 kb presents en ronyó i mucosa intestinal. Aquestes diferències de mida es deuen a diferències en poliadenilació, fet que es va demostrar posteriorment en clonar-se el cDNA de 3.8 kb emprant també expressió funcional (Markovich *et al.*, 1993). En condicions de baixa astringència hi ha presència de senyal en cervell (3.8 i 5.4 kb) i en fetge (2.2 kb). Es pensa que deuen ser transcrits homòlegs però no idèntics, ja que no són protegits en un assaig de protecció a RNAases fent servir una sonda d'rBAT de rata (Pickel *et al.*, 1993; Yan *et al.*, 1992). La seqüència d'aminoàcids deduïda a partir de la seqüència de nucleòtids permetia predir una proteïna de 677 aminoàcids amb un pes molecular de 78 kD. A partir de

L'anàlisi d'hidrofobicitat i estudis fets amb sistemes de traducció *in vitro* es va suggerir que la proteïna rBAT seria una glicoproteïna de membrana de tipus II (el domini N-terminal seria citosòlic) amb un únic domini transmembrana (Wells *et al.*, 1992). El grup de S. Tate va estudiar més tard la topologia de la proteïna rBAT mitjançant anticossos policlonals dirigits contra diferents parts de la proteïna i, així, va deduir la presència de 4 dominis transmembrana, i que els extrems N i C-terminal són citosòlics (Mosckovitz *et al.*, 1994). Aquest tipus d'estructura no era usual per als transportadors de membrana descrits fins a aquell moment, fet que va fer plantejar la qüestió de si aquesta proteïna era un transportador per si mateix, un activador de sistemes de transport endògens en l'oòcit, o si formava part d'un complex heterooligomèric amb proteïnes ja presents en l'oòcit.

En mirar el banc de dades de gens clonats, es va trobar que el domini extracel·lular presentava una homologia alta amb una família d'enzims relacionats amb el catabolisme dels sucres. En canvi, la proteïna rBAT no presenta aquesta activitat, ja que presenta una mutació en un residu implicat en el centre actiu de reconeixement dels sucres (Wells *et al.*, 1992). A més, es va trobar que rBAT presentava un 30% d'identitat i un 50% de similitud amb la cadena pesada de l'antigen 4F2 (4F2hc) (Bertran, J. 1992c). L'antigen 4F2 (també anomenat CD98) és un heterodímer format per una proteïna glicosilada de 85 kD (4F2hc) que havia estat clonada fent servir l'anticòs monoclonal anti-CD98, unit covalentment per ponts disulfurs a una proteïna d'uns 40 kD altament hidrofòbica, no glicosilada i que no s'havia pogut microseqüenciar (Parmacek *et al.*, 1989; Quackenbusch *et al.*, 1986; Teixeira *et al.*, 1987). Es desconeixia la funció que tenia 4F2hc, només s'havia suggerit la seva implicació en el cicle cel·lular, ja que és un marcador de proliferació (Teixeria *et al.*, 1991), i també se l'havia implicat en la modulació dels nivells intracel·lulars de calci (Letarte *et al.*, 1986).

Sorprenentment, en injectar 4F2hc en l'oòcit, es va observar un increment d'una activitat de transport descrita per Rosa Devés com γ^L en eritròcits (Bertran *et al.*, 1992c; Wells, *et al.*, 1992b). Aquesta activitat es caracteritza per una inducció de transport d'aminoàcids dibàsics de forma independent de sodi i neutres de forma dependent de sodi (Devés *et al.*, 1992). S'ha demostrat que l'efecte del sodi sobre el transport d'aminoàcids neutres consisteix en la reducció de l'afinitat en unes 50 vegades. La predicció d'estructura de 4F2hc deduïda a partir de la seqüència d'aminoàcids era la d'una proteïna amb un únic domini transmembrana, fet que va plantejar els mateixos dubtes que amb la proteïna rBAT respecte a quina era l'entitat molecular responsable del transport.

En analitzar en més detall la seqüència d'aminoàcids de les dues proteïnes es va observar que hi havia un residu de cisteïna, just després del primer domini transmembrana que estava conservat en ambdues proteïnes. Es va hipotetitzar que aquest residu seria el responsable de la formació d'un pont disulfur amb la possible subunitat lleugera de la qual no es coneixia la seqüència.

D'aquesta forma es van identificar dues proteïnes, rBAT i 4F2hc, com una nova família de proteïnes implicades en el transport d'aminoàcids. En aquell moment, i a causa del fet que rBAT induïa transport de cistina en oòcits, es va plantejar la hipòtesi que rBAT fos un gen candidat per a la cistinúria. La cistinúria és una malaltia autosòmica recessiva que presenta com a fenotip bioquímic la hiperexcreció d'aminoàcids bàsics i cistina (Segal *et al.*, 1995). A causa de la solubilitat baixa de la cistina, aquesta precipita formant càlculs renals. Per demostrar aquesta hipòtesi, s'havien de trobar nous fets experimentals que estiguessin d'acord amb totes les alteracions descrites per a aquesta malaltia. Així, es va estudiar la

localització subcel·lular i l'expressió durant el desenvolupament de la proteïna rBAT. Es va demostrar que la proteïna rBAT es localitza en el domini apical del túbul proximal S3 i que la seva expressió era postnatal (Furriols *et al.*, 1993; Kanai *et al.*, 1992; Pickel *et al.*, 1993). Aquests fets coincidien amb el que es coneixia del transport de cistina i del lloc on residia el defecte causant de la cistinúria. D'aquesta forma, tots els fets apuntaven a rBAT com a gen candidat.

Com a primer pas per determinar si aquesta hipòtesi era certa, el nostre grup va aïllar i caracteritzar el cDNA corresponent a l'rBAT humà (Bertran *et al.*, 1993) i es va iniciar la recerca de mutacions (principalment de tipus puntual) mitjançant la tècnica coneguda com SSCP en la seqüència codificant del gen d'individus cistinúrics. Així, es van descobrir 6 mutacions puntuals, entre les quals destacava la mutació Met467Thr, per trobar-se en homozigosi (Calonge *et al.*, 1994). Per mutagènesi dirigida es va construir un cDNA de rBAT humà amb aquesta mutació i es va analitzar funcionalment en oòcits. Es va observar que aquest mutant presentava un defecte en el transport mesurat tres dies després de la injecció, fet que reafirmava la implicació d'rBAT en la cistinúria.

Sorprenentment, en realitzar el transport sis dies després de la injecció (vegeu figura 1), es va veure que no hi havia diferències respecte a la proteïna salvatge. Per poder explicar aquest comportament de manera més detallada i reafirmar de manera més forta la implicació d'rBAT en la cistinúria, vaig construir i analitzar el mutant Met467Lys, resultats que explico més endavant en l'apartat de "resultats".

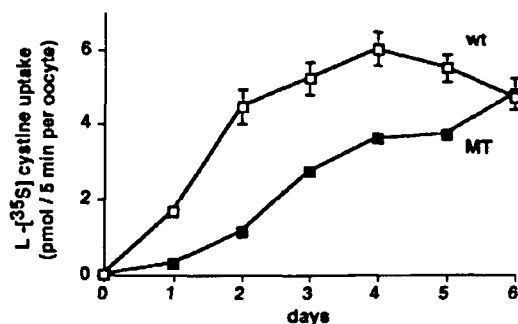


Figura 1. Anàlisi a diferents dies del transport de cistina induït en oòcits injectats amb la proteïna rBAT salvatge (WT) i la proteïna rBAT mutada amb el canvi Met467Thr (MT).

El nombre de mutacions trobades en el gen rBAT s'ha anat incrementant amb el temps. Han aparegut més mutacions puntuals i, fins i tot, alteracions més dràstiques com ara deleccions, codons d'*stop*, alteracions en l'*splicing*, etc (Gasparini *et al.*, 1995). Un altre resultat important va ser que el grup de Pras a Jerusalem, fent servir la genètica reversa, va posicionar el gen de la cistinúria entre dos marcadors de DNA polimòrfics, D2S119 i D2S117, presents en el cromosoma 2 (Pras *et al.*, 1994). El nostre grup ha trobat que el gen rBAT es mapa en el cromosoma 2p16.3, zona molt propera als dos marcadors citats anteriorment. (Calonge *et al.*, 1995)

Així i tot, uns resultats obtinguts pel grup d'A. Busch a Tübingen, en col·laboració amb el nostre grup, van suscitar gran controvèrsia (Busch *et al.*, 1994). Aquests resultats demostraven que l'activitat induïda per rBAT estava d'acord amb un intercanviador d'aminoàcids. (vegeu figura 2). Diferents grups van publicar que no podien comprendre

com un intercanviador podria servir com a mecanisme de reabsorció d'aminoàcids (Coady *et al.*, 1994; Miyamoto *et al.*, 1995). A més, cal recordar, que el fenotip de la cistinúria consisteix en la hiperexcreció d'aminoàcids bàsics i cistina, mentre que rBAT també indueix transport d'aminoàcids neutres. L'explicació d'aquest interrogant ha estat també un dels objectius de la meua tesi.

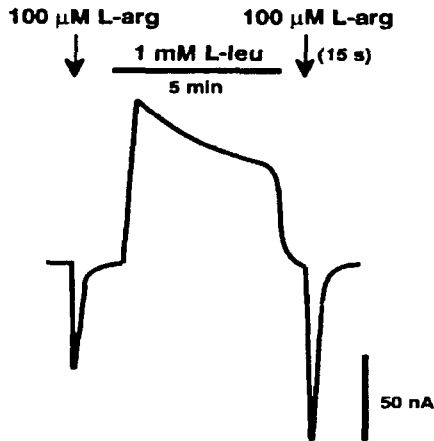


Figura 2. Corrents induïts en l'oòcit de *Xenopus* injectat amb cRNA d'rBAT en presència d'aminoàcids dibàsics (arginina) i neutres (leucina). Els corrents d'entrada es deuen a l'entrada de l'aminoàcid arginina i les corrents de sortida en posar leucina es deuen a la sortida dels aminoàcids bàsics.

Un detall important i no comentat fins ara és que la cistinúria és una malaltia heterogènia. S'han descrit tres tipus de cistinúria basant-se en les concentracions d'aminoàcids bàsics i cistina en homozigots i heterozigots per a la malaltia i en funció de l'absorció intestinal, com es veu detallat en la taula inferior.

| | | RONYÓ (EXCRECIÓ URINARIA) | INTESTÍ |
|-----------|-------------|---|--|
| TIPUS I | Heterozigot | Normal | |
| | Homozigot | Elevada per a C _{ss} C, Lys, Arg i Orn | No hi ha absorció de C _{ss} C i, per tant, la seva concentració en plasma no augmenta després de la administració oral. |
| TIPUS II | Heterozigot | Elevada per a C _{ss} C i Lys, i moderada per a Arg i Orn | |
| | Homozigot | Elevada per a C _{ss} C, Lys, Arg i Orn | No hi ha absorció de C _{ss} C i, per tant, la seva concentració en plasma no augmenta després de la administració oral. |
| TIPUS III | Heterozigot | Moderada per a C _{ss} C i Lys | |
| | Homozigot | Elevada per a C _{ss} C, Lys, Arg i Orn | Hi ha absorció de C _{ss} C i, per tant, la seva concentració en plasma no augmenta després de la administració oral. |

Taula 1. Classificació dels diferents tipus de cistinúria en funció del fenotip renal i intestinal.

El nostre grup va observar que hi havia famílies on no hi havia una cosegregació entre el locus rBAT i la cistinúria, fet que plantejava la possibilitat que la cistinúria fos una malaltia deguda a mutacions en diferents gens (Gasparini *et al.*, 1995). Una anàlisi més precisa del fenotip d'aquestes famílies va permetre dir que els tipus II i III de cistinúria no són causats per mutacions en rBAT (Calonge *et al.*, 1995). També hi ha algunes famílies del tipus I de cistinúria on no s'han trobat mutacions en el gen rBAT, fet que suggeria la possibilitat que hi hagués també un altre gen per a pacients de tipus I, encara que també es podria explicar a causa de la no detecció de la mutació per trobar-se en zones com ara el promotor, introns, etc.

Quins podrien ser aquests altres gens candidats de cistinúria?. Un possible candidat seria un altre transportador de cistina que estigués en els segments S1 i S2 del túbul renal. En aquesta línia, Segal, el 1977, va detectar fent servir vesícules apicals de ronyó de rata dos components de transport de cistina: un d'afinitat alta i capacitat baixa compartit amb aminoàcids bàsics (que podria correspondre a l'activitat deguda a rBAT) i un altre d'afinitat baixa ($K_m = 0.93$ mM) i capacitat alta (Segal *et al.*, 1977). A més, per estudis de microperfusió en túbuls aïllats, Völkl i Silbernagl van demostrar que al voltant del 90% de la cistina infosa pel túbul era reabsorbida pel túbul contornejat distal i que aquesta reabsorció era inhibida per fenilalanina a una concentració de 10 mM. Així, el gen o els gens responsables d'aquest sistema de transport podrien ser també gens de cistinúria (Völkl *et al.*, 1982).

Un altre gen candidat seria la possible subunitat lleugera, que igual que per a la proteïna 4F2hc estaria lligada a rBAT per ponts disulfur. Quines evidències hi ha sobre la presència d'aquesta subunitat?:

1. Si es fan experiments de transferència western fent servir un anticòs dirigit contra la proteïna rBAT amb membranes de ronyó, el pes que es detecta és diferent en funció de la presència o no d'agents reductors. Així, en absència d'agents reductors es detecten bandes de 125 kD de mobilitat electroforètica i de més alt pes molecular, mentre que la seva mobilitat en presència d'agents reductors és de 94 kD (Tate *et al.*, 1996). En tractar amb endoglicosidasa F aquesta banda de 94 kD passa a tenir una mobilitat que està d'acord amb el pes molecular deduït a partir de la seqüència d'aminoàcids. Per experiments de transferència western en gels de dues dimensions (primera dimensió no reductora, segona dimensió reductora) i per experiments de *crosslinking* amb reducció posterior, s'ha observat que la banda de 94 kD forma part d'aquest complex (Palacín *et al.*, 1996). Malauradament, no s'ha pogut immunoprecipitar aquest complex com s'havia fet en el cas de l'antigen 4F2, que demostrava directament que aquestes dues proteïnes interaccionen directament.
2. L'expressió de la proteïna rBAT en cèl·lules heteròlogues (COS, MDCK) no suposa cap activitat de transport: la proteïna o no arriba a la membrana o si hi arriba no indueix cap activitat de transport. En aquestes cèl·lules transfectades no s'han detectat per transferència western aquestes bandes de pes molecular més alt (125 kD) (Palacín *et al.*, 1996).
3. Ens podem preguntar llavors si podem detectar aquests complexos de pes molecular més alt en l'oòcit de *Xenopus*. En condicions no reductores s'ha

observat una lleugera banda de 125 kD (en comparació amb la intensitat de la banda de 94 kD), banda que s'ha postulat que seria homòloga a la detectada en membranes de ronyó (Wang *et al.*, 1995).

Així, totes aquestes evidències experimentals estan a favor d'un model on la proteïna rBAT estaria associada a una altra proteïna ("subunitat lleugera") mitjançant ponts disulfur. Aquesta possible proteïna seria, doncs, un altre gen candidat de cistinúria.

Objectius

OBJECTIUS

Tenint en compte els antecedents descrits en l'apartat anterior es van plantejar els següents tres objectius inicials:

- 1. Reafirmar la implicació d'rBAT en la malaltia cistinúria construint per mutagènesi dirigida cDNA d'rBAT que continguessin alteracions en la seqüència d'aminoàcids.**

Així es va construir el mutant Met467Lys i es va caracteritzar en oòcits l'activitat induïda per intentar explicar el possible defecte que patien pacients cistinúrics que tinguessin la proteïna rBAT amb aquesta alteració.

- 2. Intentar comprendre els mecanismes de reabsorció d'aminoàcids bàsics i cistina partint de les activitats induïdes per rBAT i 4F2hc en l'oòcit de *Xenopus*.**

D'aquesta manera també es volia comprendre com alteracions en l'activitat $b^{0,+}$ induïda per rBAT podrien explicar el fenotip cistinúric.

- 3. Estudiar el paper de les proteïnes rBAT i 4F2hc com a components i/o activadors dels sistemes de transport $b^{0,+}$ i y^+L respectivament.**

Es volia determinar primer quina era l'estructura del transportador per poder identificar més tard quina era l'entitat molecular responsable del transport i així entendre com aquestes dues proteïnes (la cadena lleugera i la cadena pesada) interaccionaven entre si.

