

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Biología
Universidad de Barcelona**

**Caracterización del transportador SteT:
primer modelo procariota de la familia LAT.**

**César del Rio Merino
Barcelona 2007**

Caracterización del transportador SteT: primer modelo procariota de la familia LAT.

Memoria presentada por

César del Rio Merino

Para optar al grado de

Doctor por la Universidad de Barcelona

Programa de Biotecnología 2002-2004

Tesis doctoral realizada bajo la dirección del Dr. Manuel Palacín Prieto en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Barcelona.

El Director,

El doctorando,

Dr. Manuel Palacín Prieto

César del Rio Merino

Barcelona, 2007

**Un científico debe tomarse la libertad
de plantear cualquier cuestión,
de dudar de cualquier afirmación,
de corregir errores.
Julius Robert Oppenheimer**

**Aunque ellos sean cien,
y yo sólo uno,
no significa que tengan razón
Albert Einstein**

AGRADECIMIENTOS

Muchas cosas han cambiado desde que Manuel me propusiera entrar en su laboratorio como alumno interno mientras acababa las carreras, con vistas a hacer la Tesis. En aquella época yo vivía con mis padres, a quien les he de agradecer muchas cosas, entre otras la enorme paciencia y el apoyo constante sin el que no hubiera podido llegar hasta aquí, casado con Laura y esperando a mi primer hijo, o hija, para finales de año. Por ello quiero dedicar esta Tesis a Laura, por estar siempre a mi lado, apoyarme y animarme en los momentos difíciles, por ser capaz de escucharme y comprenderme, una tarea nada fácil. También le quiero agradecer a Manuel la posibilidad que me dio de entrar en su laboratorio y hacer ciencia, por debatir durante horas sobre teorías y posibilidades, por contagiarme su entusiasmo por la ciencia, por tu “qué más tienes?”.

También le quiero agradecer el apoyo y los ánimos a mi hermana y a Ignasi, a mis abuelas Boni y Eladia, a amigos como Jaume, Sofía e Ivana, Raül, Irene y Angels, Susi y Josep, a mis suegros Julián y Mercedes y al resto de mi familia y de la familia de Laura que siempre que me ven me preguntan como me va la Tesis y asienten cuando les intento explicar un poco lo que hago, aunque apenas lo entiendan.

Y como no agradecer a mis compañeros de laboratorio, los insulinos, toda la ayuda prestada. Si os leéis la Tesis veréis que varios de ellos aparecen mencionados en uno u otro apartado porque me han ayudado con alguna técnica concreta, aunque muchos otros no lo hacen y lo merecen porque me ayudaron en el día a día. Joan, en ti es el primero que pienso, cuando entré al laboratorio te tomaste la molestia de presentarme a todos los que había en el laboratorio, y en aquel momento ya debían ser unos 40. Y no sólo por eso, también por estar siempre dispuesto a escuchar cualquier problema y encontrar una solución imaginativa. Gracias! También pienso en Joana, con quien empecé en el laboratorio y quien me enseñó las técnicas básicas de laboratorio. Y en Nuri, que me enseñó a reconstituir. Qué grande eres! Espero que sigas así siempre. Paola, a ti te va a tocar intentar acabar todo esto. Es una delicia estar a tu lado, siempre alegre, siempre amable. Serás una gran mamá! Y como no a José Luis. Espero que tengas suerte y consigas el tan ansiado cristal. Llegarás lejos, eres grande como persona, pero como investigador llegarás a donde te propongas. Como lo haces para conocer todas las técnicas? Ha sido un placer trabajar contigo, aunque haya sido tan poco tiempo, una pena por mi parte.

Gracias a los de Bio. A Mercè, gracias por ser como eres. A Lorena y Susana, las encargadas de organizar todas las fiestas y saraos. Gracias y perdón por no haber colaborado más. Carles ha sido un placer coincidir contigo, eres un gran investigador y llegarás muy lejos. A Jose y Vicente por intentar ilustrarme musicalmente. A Eleonora, espero que te vaya bien, tienes unos hijos preciosos. A Rosarinho, una pena que te hayas vuelto a Portugal. Suerte!

Gracias Antonio por tus sugerencias y encontrar siempre un momento para interesarte por como me va. Xavier gracias por traernos a Laura y a mí de vuelta en tu coche. Qué decir de Anna Gumà! Espero que vengas a esta Tesis con el bebe y así volver a verlo. Ha sido un placer conocerte. Albert,

aupa penya! Como va la sobreexpresión de rBAT? Eva, madraza, mucha suerte con los cristales, te la mereces. Josep, eres la enciclopedia del grupo, si se ha hecho tú lo recuerdas. Marta Camps y Manu siempre de buen humor. Luc, es imposible no pasarlo bien a tu lado. Hans, gracias por tus consejos y por la ayuda técnica. Eres un crack! Silvia y Deborah, fue bonito veros el día de mi boda. Sois estupendas! Laura, gracias por las alícuotas. Vicent y Jessica, hemos coincidido poco pero nos hemos echado unas risas en la comida. Víctor, gracias por tu interés y tu simpatía. Sonia, Ana Sancho, Jordi, Elena, Marc, Bárbara y Caroline, espero que os vaya bien. No me quiero olvidar de Virginia, Nónia y Mariona, que aunque estéis en el IRO coincidimos en los congresos de cistinuria, y nos echamos unas risas.

También agradecer a otros muchos que ya no están. David ya te vale irte ahora que te ibas a librar de mi! A Dani (tu manera de disfrutar la vida es contagiosa) y a Ana Vi por organizar salidas como la via ferrata y la subida al Puigmal, se os echa de menos. Albert Calvillo, tus expedientes X y tu humor son únicos, que lástima que te fueras tan pronto. Emma, aún recuerdo cuando me hiciste de amigo invisible. Óscar, o galego, siempre dispuesto a hablar un rato. Raúl, espero que te vaya bien en tu nueva etapa de jefe, seguro que seguirás trabajando tan duro como hasta ahora. Marta Pineda, se notó tu marcha, eras la mamá del grupo. Meri a veces creo que te quedabas a dormir en el laboratorio. Maite y Espe, qué carácter! Horacio, me dejaste asombrado con tu aplomo para exponer tu Tesis. Anna Abella, espero que te vaya tan bien como hasta ahora en el nuevo colegio, qué gran pérdida para la ciencia! Anna Ros, la simpatía hecha persona. Francesco, Judith Canici, Marta Carrasco, Sara, Eli, Bernhard, Perla, Meritxell, Reini, Jonás, Esther y Sergio, mucha suerte en la vida.

Gracias a Judith, tu honestidad me encanta, no cambies nunca! Dulce, haces honor al nombre. Muchas gracias también para los técnicos, a Míriam por organizar lo inorganizable, a Susanna Bial por dejarte casi monopolizar, a Juan Carlos por su buen humor. También a los que estuvieron pero ya no están como Judith García, Ana Pérez, Noemí (qué pasteles!) o Ruth.

A todos los nuevos que han entrado recientemente y que no hemos tenido oportunidad de conocernos que tengáis mucha suerte y no os desaniméis, que la Tesis es larga pero tiene fin.

Agradecer al Dr. Jordi Hernández-Borrell, la Dra. Teresa Montero el permitirme trabajar en su laboratorio y prestarme toda la ayuda posible con la fluorescencia. También a los recientes doctores en su laboratorio, Óscar y Sandra, por la ayuda y por esas conversaciones mientras esperaba la finalización de los espectros. También quiero agradecer su ayuda al resto de compañeros de otros grupos del Departamento de Bioquímica, que cuando he necesitado cualquier cosa siempre me han ayudado. Y como no al personal del departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Sobretudo a ti, Raquel, sin ti esta Tesis no hubiera sido posible! Es increíble la capacidad de solucionar problemas y arreglar aparatos que tienes, y siempre con alegría. Muchas gracias! Y a ti, Toni, siempre dispuesto a ayudar y traer lo que haga falta. Quién te abrirá ahora el laboratorio? También a los servicios científico-técnicos, sobretudo a la Dra. Carmen López y a Elisenda por su ayuda con la criofractura.

Espero no dejarme a nadie, si es así espero que me perdonen.

César

ÍNDICE

ÍNDICE	1
ABREVIATURAS	9
INTRODUCCIÓN	15
1. Sistemas de transporte de aminoácidos.....	17
1.1. Sistemas de transporte en mamíferos	19
2. La superfamilia de transportadores de Aminoácidos, Poliaminas y organoCationes (APC)	22
2.1. Familia de Transportadores Heteroméricos de Aminoácidos (HATs)	24
2.1.1. Generalidades de las subunidades pesadas (HSHATs).....	26
2.1.2. Generalidades de las subunidades ligeras (LSHATs).....	31
2.1.3. rBAT-b ⁰⁺ AT.....	32
2.1.4. Transportadores asociados a 4F2hc (SLC3A2).....	34
2.1.4.1 4F2hc-LAT-1.....	36
2.1.4.2 4F2hc-LAT-2.....	37
2.1.4.3 4F2hc-y ⁺ LAT-1.....	38
2.1.4.4 4F2hc-y ⁺ LAT-2.....	38
2.1.4.5 4F2hc-xCT.....	39
2.1.4.6 4F2hc-asc-1.....	40
2.1.5. Transportadores huérfanos	41
2.1.5.1 asc-2 (SLC7A12)	41
2.1.5.2 AGT-1 (SLC7A13).....	42
2.1.5.3 arpAT (SLC7A14).....	42
2.2. Aminoacidurias hereditarias.....	43
2.2.1. Cistinuria	43
2.2.2. Lisinuria con intolerancia a proteínas (LPI).....	44
3. Características estructurales de los transportadores.....	45
3.1. Hacia la estructura-función de los transportadores de la familia LAT	49
3.1.1 Subunidades pesadas (rBAT y 4F2hc).....	49
3.1.2 Subunidades ligeras	53
3.1.3. Estructura cuaternaria del complejo heteromérico.....	55
3.2. Relaciones de estructura-función en otros miembros de la superfamilia APC	56
ANTECEDENTES	65
OBJETIVOS	77
RESULTADOS	81
1. Caracterización funcional de SteT	83
1.1. Cinética y modo de transporte	83
1.2. Especificidad de sustrato	85
2. Caracterización estructural de SteT	88
2.1. Electroforesis en gel nativo (BN-PAGE)	88
2.2. Entrecruzamiento químico	89
2.3. Criofracura en el TEM.....	90
2.4. Tinción negativa en el TEM.....	92
3. Identificación de residuos relevantes	95
3.1 Efecto de los reactivos de cisteína sobre la función de SteT	95

3.2. Cisteína 291.....	103
3.3. El segmento transmembrana VIII.....	107
3.3.1 Actividad de mutantes únicos de cisteína.....	107
3.3.2 Efecto del MTSET.....	110
3.3.3 Efecto del DTT.....	110
3.3.4 Residuos K295 e I285.....	112
DISCUSIÓN.....	125
1. SteT, modelo procariota de los transportadores de la familia LAT.....	127
2. El segmento transmembrana VIII es una hélice α anfipática.....	129
3. Posibles mecanismos para SteT y las LSHATs.....	135
3.1. SteT podría presentar un modelo de ajuste inducido.....	136
3.2. El Modelo de <i>Alternating Access</i> o la existencia de al menos dos lugares de unión.....	140
4. El efecto del DTT.....	147
5. La cristalización de mutantes de proteínas integrales de membrana.....	151
CONCLUSIONES.....	155
BIBLIOGRAFÍA.....	161
1. Referencias bibliográficas.....	163
2. Webs.....	199
MATERIAL Y MÉTODOS.....	201
1. Herramientas informáticas y estadísticas.....	203
1.1. Bases de datos utilizadas.....	203
1.1.1. MEDLINE Entrez.....	203
1.1.2. GeneBank.....	203
1.1.3. Ensembl.....	203
1.2. Análisis de secuencias.....	204
1.2.1. Basic Local Alignment Tools (BLAST).....	204
1.2.2. CLUSTAL W.....	204
1.3. Análisis de proteínas.....	205
1.3.1. ExPASy (<i>Expert Protein Analysis System</i>) Proteomics Server.....	205
1.4. Otras páginas web de interés.....	206
1.4.1. Transport Classification Database (TCDB).....	206
1.4.2. The Stephen White Laboratory at UC Irving.....	206
1.4.3. Membrane Proteins of Known Structure.....	206
1.4.4. Pedro's BioMolecular Research Tools.....	206
1.4.5. Weizmann Institute Genome and Bioinformatics.....	206
1.4.6. Sequence interpretation Tools.....	207
1.4.7. HUGO Gene Nomenclature Committee.....	207
1.4.8. Celera Genomics.....	207
1.4.9. Toronto Research Chemicals.....	207
1.4.10. Anatrace.....	207
1.5. Diseño de oligonucleótidos (<i>primers</i>).....	207
1.5.1. Primer Select.....	207
1.6. Análisis estadístico.....	207
1.6.1. GraphPAD Prism v4.0.....	207

2. Técnicas de obtención, manipulación y análisis de DNA.....	207
2.1. Técnicas básicas generales.....	208
2.1.1. Generación y manipulación de bacterias competentes.....	208
2.1.2. Transformación de bacterias competentes.....	208
2.1.3. Obtención de plásmidos de cultivos bacterianos (MiniPrep y MaxiPrep, Qiagen).....	208
2.1.4. Análisis del DNA con enzimas de restricción.....	208
2.1.5. Electroforesis en geles de agarosa.....	208
2.1.6. Purificación del DNA a partir de un gel de agarosa o en solución.....	208
2.1.7. Tratamiento con fosfatasa alcalina.....	208
2.1.8. Extracción del DNA con fenol-cloroformo y precipitación con etanol.....	208
2.1.9. Ligación del DNA.....	208
2.1.10. PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	208
2.2. Mutagénesis dirigida.....	208
2.3. Secuenciación.....	209
3. Cultivos.....	209
3.1. Cultivos de células HeLa.....	210
3.1.1. Medios de cultivo.....	210
3.1.2. Condiciones de cultivo de células HeLa.....	210
3.1.2.1 Subcultivo.....	211
3.1.2.2 Congelación y descongelación.....	211
3.1.2.3 Detección de micoplasma.....	212
3.1.3. Transfección celular transitoria.....	212
3.2. Cultivos de <i>Pichia pastoris</i>	214
3.2.1. Soluciones.....	214
3.2.2. Transformación y selección de clones.....	214
3.2.3. Expresión.....	214
3.2.3.1 Pequeña escala.....	215
3.2.3.2 Media escala.....	215
3.3. Cultivos bacterianos.....	216
3.3.1. Sobreexpresión de proteína en <i>E. coli</i>	216
4. Técnicas de obtención, manipulación y detección de proteínas de membrana.....	216
4.1. Obtención de membranas totales de cultivos de <i>Pichia pastoris</i> o <i>E. coli</i>	216
4.2. Determinación de la concentración de proteínas.....	217
4.2.1. Método de Bradford.....	218
4.2.2. Método de BCA.....	218
4.2.3. Método de Schaffer Weissman.....	219
4.3 Purificación de proteínas de membrana con cola de histidinas.....	220
4.4. Determinación de la concentración de detergente.....	221
4.5. Electroforesis SDS-PAGE.....	222
4.5.1. Métodos de tinción de geles.....	224
4.5.1.1 Tinción <i>Coomassie Brilliant Blue</i>	224
4.5.1.2 Tinción de plata.....	224
4.5.2. Análisis por <i>Western blot</i>	225
4.5.2.1 Transferencia.....	225
4.5.2.2 Inmunodetección.....	226

Índice

4.6. Entrecruzamiento químico	227
5. Reconstitución de proteínas de membrana	228
5.1. Reconstitución directa de proteínas no purificadas	228
5.2. Reconstitución de proteínas previamente purificadas.....	231
6. Ensayos de transporte en proteoliposomas.....	233
7. Fluorescencia con proteínas purificadas	235
7.1. Fluorescencia de Trp.....	235
7.2. Fluorescencia en tiempo real	236
7.3. Fluorescencia de dímeros de estado excitado (excímeros).....	237
8. Criofractura en el TEM	238
APÉNDICES	241
APÉNDICE A: SOLUCIONES DE USO GENERAL	243
APÉNDICE B: CONSTRUCTOS DE DNA Y OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS	245
APÉNDICE C: ESTRUCTURA DE LOS REACTIVOS DE CISTEÍNA.....	249
ANEXO 1. PRODUCCIÓN Y RECONSTITUCIÓN DE HATs EN CÉLULAS HeLa	251
ANEXO 2. EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y RECONSTITUCIÓN DE b ^{0,+} AT Y xCT EN <i>PICHA</i> <i>PASTORIS</i>	265
ANEXO 3. ENSAYOS DE FLUORESCENCIA.....	277
ANEXO 4. ARTÍCULO DE PRIMER AUTOR.....	285

ABREVIATURAS

2D: bidimensional.
3D: tridimensional.
A. aeolicus: *Aquifex aeolicus*.
A. fulgidus: *Archaeoglobus fulgidus*.
A. nidans: *Aspergillus nidans*.
A. pernix: *Aeropyrum pernix*.
ABC: ATP-Binding Cassette.
AcrB: transportador *multidrug* acoplado a H⁺ de *E. coli*.
AIB: ácido aminoisobutírico.
APA: intercambiadores de Aminoácidos básicos y PoliAminas.
APC: transportadores de Aminoácidos, Poliaminas y organoCationes.
AroP: permeasa de aminoácidos aromáticos de *E. coli* de la superfamilia APC.
b^{0,+}AT: subunidad ligera de la familia LAT del transportador del sistema b^{0,+}.
B. cereus: *Bacillus cereus*.
B. subtilis: *Bacillus subtilis*.
B. pseudomallei: *Burkholderia pseudomallei*.
BCH: ácido 2-(-)-endoamino-bicicloheptano-2-carboxílico.
BM(PEO)₄: 1,11-bis-maleimidotetraetilenglicol.
BN-PAGE: electroforesis en gel nativo (*Blue-Native PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*).
CadB: intercambiador de cadaverina-lisina de *E. coli* de la superfamilia APC.
CAR: Región Anfipática Consensus.
Células OK: células renales polarizadas (*Opossum Kidney cells*).
Cl⁻: anión cloruro.
ClC: intercambiador de Cl⁻/H⁺ de *E. coli*.
CuPh: cobre (1,10-fenantrolina)₂.
DDM: n-dodecil-β-D-glucopiranosido de Anatraxe.
Dimedona: 5,5-dimetil-1,3-ciclohexanediona.
DM: n-decil-β-D-glucopiranosido de Anatraxe.
DMF: dimetilformamida.
DMSO: dimetilsulfóxido.
DMS: dimetilsuberimidato.
DSP: ditio-bis(succinimilpropionato).
DST: disuccinimiltartarato.
DTT: ditioneitol.
E. coli: *Escherichia coli*.
EC₅₀: concentración necesaria para obtener la mitad del efecto.
EDTA: etilendiaminotetracético.
EEM: error estándar de la media.
EmrD: intercambiador *multidrug* H⁺-dependiente de *E. coli* de la MFS.
ESI-MS: espectrometría de masas con ionización por electrospray.

Abreviaturas

GabP: transportador de ácido γ -aminobutírico de *E. coli*.
GalP: cotransportador de galactosa y H^+ de *E. coli*.
GlpF: aquagliceroporina de *E. coli*.
GlpT: intercambiador de glicerol-3-fosfato y fosfato inorgánico (P_i) de *E. coli* de la MFS.
Glt_{Ph} (aspartato): transportador de aspartato de *P. horikoshii*.
Glt_{Ph} (glutamato): transportador de glutamato de *P. horikoshii*.
GLUT-1: transportador de glucosa de la MFS.
GSH: glutatión.
 H^+ : protón.
H. influenzae: *Haemophilus influenzae*.
HAT: Transportador Heteromérico de Aminoácidos.
HPLC: cromatografía líquida de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography).
HSHATs: Subunidades Pesadas de los Transportadores Heteroméricos de Aminoácidos.
IAEDANS: ácido 5-(yodoacetamidoetil)aminonaftalen-1-sulfónico.
IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosido.
 K^+ : catión potasio.
kDa: kilodaltons.
 K_M : constante de Michaelis-Menten.
LacY: cotransportador de lactosa y H^+ de *E. coli* de la MFS.
LAT: Transportadores de L-Aminoácidos.
LB: *Luria Broth*.
LDAO: óxido de n-dodecil-N,N-dimetilamina.
LeuT: transportador de Leu Na^+/Cl^- -dependiente de *A. aeolicus*.
LPI: lisinuria con intolerancia a proteínas.
LSHATs: Subunidades Ligeras de los Transportadores Heteroméricos de Aminoácidos.
LysP: permeasa específica de lisina de *E. coli*.
M. jannaschii: *Metanococcus jannaschii*.
M. magnetotacticum: *Magnetospirillum magnetotacticum*.
M. marburgensis: *Mortierella marburgensis*.
M. thermoautotrophicum: *Methanobacterium thermoautotrophicum*.
M. tuberculosis: *Micobacterium tuberculosis*.
MCAT: transportadores de aminoácidos catiónicos de ratón de la superfamilia APC.
MCT1: transportador humano de la familia de monocarboxilatos de la MFS.
MFS: *Major Facilitatory Superfamily*.
MIANS: ácido 2-(4'-maleimidilnilino)naftalen-6-sulfónico.
MJ1267: transportador ABC de *M. jannaschii*.
MMTS: metilmetanotiosulfonato.
MTSEA: (2-aminoetil)metanotiosulfonato.
MTSES: (2-sulfonatoetil)metanotiosulfonato de Na^+ .
MTSET: [2-(trimetilamonio)etil]metanotiosulfonato.

Na⁺: catión sodio.
NBD: 7-cloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazola.
NEM: N-etilmaleimida.
NhaA: intercambiador de Na⁺ y H⁺ de *E. coli*.
O/N: *overnight*, 16 horas aproximadamente.
O. formigenes: *Oxalobacter formigenes*.
OD₆₀₀: absorbancia a 600 nm.
OG: β-D-octilglucósido de Roche.
OxIT: transportador de oxalato de *O. formigenes* de la MFS.
P. horikoshii: *Pyrococcus horikoshii*.
PCB: Parc Científic de Barcelona.
PCR: *Polymerase Chain Reaction*.
pCMB: paracloromercuribenzoato.
pCMBS: ácido paracloromercuribenzenosulfónico.
PDB: *Protein Data Bank*.
P-gp: P-glicoproteína, un transportador ABC humano.
PheP: transportador de alta afinidad de Phe de *E. coli* de la superfamilia APC.
PLs: proteolipasomas.
PM: pirenomaleimida.
PotE: transportador de poliaminas de *E. coli* de la superfamilia APC.
PrnB: transportador de Pro de *A. nidans* de la superfamilia APC.
RT-PCR: *Reverse Transcription-PCR*.
S. aureus: *Staphylococcus aureus*.
S. lividans: *Streptomyces lividans*.
S. oleracea: *Spinacia oleracea*.
S. tiphimurium: *Salmonella tiphimurium*.
SDS: dodecilsulfato de Na⁺.
SDS-PAGE: electroforesis en gel desnaturizante.
SPS: Superficie Polar Sensible.
SteT: Serine-threonine exchanger Transporter.
t_{1/2}: tiempo de vida media.
TCA: ácido tricloroacético.
TEM: Microscopio Electrónico de Transmisión.
TM: transmembrana.
U.: Universidad.
V_{máx}: velocidad máxima.
X. laevis: *Xenopus laevis*.
xCT: subunidad ligera de la familia LAT del transportador del sistema x_c⁻.
wt: *wild type* (el natural, sin mutaciones).

INTRODUCCIÓN

La memoria de esta Tesis doctoral recoge los resultados obtenidos de la caracterización funcional y estructural del transportador de aminoácidos procariota SteT. SteT es el primer homólogo procariota caracterizado de la familia de transportadores de L-aminoácidos (LAT).

En esta introducción se describen los sistemas de transporte de aminoácidos, la superfamilia de transportadores de aminoácidos, poliaminas y organocaciones (APC), la familia de transportadores heteroméricos de aminoácidos (HATs), sus enfermedades asociadas y las características estructurales y funcionales de transportadores de membrana, con especial énfasis en las estructuras tridimensionales (3D) y en la identificación de residuos clave.

1. Sistemas de transporte de aminoácidos.

Los aminoácidos son esenciales para la supervivencia celular: intervienen en la síntesis de proteínas, la regulación del metabolismo, el crecimiento celular, la regulación del volumen celular y la producción de energía metabólica, entre otros. Los aminoácidos pueden ser zwitteriónicos, aniónicos o catiónicos, y sus cadenas laterales pueden ser hidrofóbicas, semipolares o fuertemente hidrofílicas. Las cadenas laterales pueden ser alifáticas o aromáticas, y en ciertos casos pueden servir como donadores o aceptores de protones (H^+). Los aminoácidos de las proteínas pueden ser derivatizados por metilación, acetilación, formilación y fosforilación entre otras. Estos aminoácidos derivatizados pueden intervenir en una amplia variedad de funciones biológicas, tales como sensores, señalización intracelular y regulación génica. El paso de los aminoácidos a través del dominio hidrofóbico de la membrana plasmática está mediado por unas proteínas transportadoras. Estas proteínas transportadoras reconocen, unen y transportan estos aminoácidos desde el medio extracelular al interior de la célula, o viceversa.

Las proteínas transportadoras que se encuentran en membranas biológicas se dividen en canales y transportadores (Saier, 2000; Busch et al., 2002). Los canales funcionan como poros selectivos que se abren en respuesta a estímulos químicos o electrofisiológicos, permitiendo el movimiento de un sustrato a favor de un gradiente electroquímico. Los transportadores primarios translocan un sustrato a través de una membrana biológica en contra de un gradiente de concentración. Para poder realizar esta translocación, el transportador primario ha de acoplar el proceso de transporte a otro proceso que produzca energía, la hidrólisis de ATP, y ser capaz de prevenir que los dos procesos puedan darse de manera desacoplada en sus direcciones energéticamente favorables. Los transportadores secundarios utilizan el movimiento de un soluto a favor de gradiente de concentración para dirigir la translocación de otro sustrato a través de la membrana, mediante mecanismos de cotransporte o intercambio. Los cotransportadores (simportes) catalizan el movimiento de dos o más moléculas en la misma dirección. Los intercambiadores (que pueden ser transportadores

terciarios) catalizan el intercambio de una o más moléculas por otra en direcciones opuestas (Busch et al., 2002). Los uniportes (transportadores de difusión facilitada) transportan una única molécula a favor de su gradiente de concentración.

En 1992, un artículo de revisión describía el elevado crecimiento de la información sobre transportadores como la “explosión de transportadores” (Uhl et al., 1992). Desde entonces, la secuenciación del genoma ha producido la expansión de la información en una magnitud mucho más rápida, de manera que parece crecer exponencialmente. En 1999, se propuso un sistema de clasificación de las proteínas transportadoras (TC) basado en el análisis filogenético y las propiedades funcionales de cerca de 250 familias de transportadores secuenciados (Saier, 1999b). En 2002, cerca de 400 familias fueron incluidas en el sistema de clasificación TC (Busch et al., 2002). Este sistema ha sido adoptado por la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB). El análisis filogenético de las proteínas transportadoras integrales de membrana muestra que las familias de proteínas transportadoras de topología similar han evolucionado independientemente las unas de las otras, en diferentes momentos de la evolución y usando rutas diferentes (Saier, 1999b; Saier, 2000; Busch et al., 2002).

Por todo esto, no es sorprendente que muchas familias de proteínas transportadoras hayan evolucionado para controlar y facilitar el intercambio de aminoácidos entre las células y el entorno, los orgánulos u otras entidades vivas. Existen más de dos docenas de familias y superfamilias de proteínas transportadoras, que incluyen miembros capaces de transportar aminoácidos y sus derivados (Web1). La identificación de la mayoría de las proteínas transportadoras de aminoácidos, previamente caracterizadas fisiológicamente, ha facilitado su análisis funcional. El examen cuidadoso de las propiedades de estos miembros caracterizados funcionalmente muestra una serie de características comunes (Saier, 2000):

- El rango de sustratos transportados por un miembro individual de una familia puede ser estrecho o amplio, dependiendo del transportador. Una familia puede transportar una amplia variedad de compuestos estructuralmente relacionados.
- Únicamente dos tipos de energía se usan para la entrada o salida activa de aminoácidos y sus derivados: la energía electroquímica almacenada en gradientes de H^+ , Na^+ y similares o de otros aminoácidos, o la energía química en forma de ATP.
- Todos los miembros de una familia funcionan con una dirección preferencial de entrada o salida. Existen muy pocas excepciones, entre ellas la *Major Facilitatory Superfamily* (MFS).
- Algunas familias se encuentran en todos los reinos, mientras que otras están restringidas a un único reino. Las primeras corresponden a las familias ancestrales y las segundas a las familias de aparición reciente.
- Históricamente, los modos primarios de transporte involucran canales y transportadores. Los detalles de los mecanismos se van conociendo gracias al estudio de las estructuras 3D de alta resolución obtenidas.

- Algunas familias o subfamilias de transportadores de aminoácidos han evolucionado para realizar una función altamente específica. Un ejemplo es la germinación de esporas latentes en las especies de *Bacillus*, realizada por miembros de la familia SGP, perteneciente a la superfamilia APC.
- La síntesis, actividad y degradación de las proteínas de transporte está rigurosamente regulada mediante mecanismos universales como interacciones proteína-proteína, modificación covalente o unión de ligando.
- La clasificación y caracterización de las familias de transportadores ha revelado que el modo de transporte y el mecanismo de energía asociado están fuertemente conservados. Por el contrario, la topología, la polaridad del transporte y la especificidad de sustrato de las proteínas están sólo medianamente conservadas. Finalmente, los mecanismos reguladores están pobremente conservados, al ser de evolución reciente.

Las proteínas transportadoras de aminoácidos se clasifican en familias en función de su homología de secuencia y de sus propiedades funcionales, como la especificidad de sustrato, el mecanismo de transporte y el acoplamiento a iones. Constantemente se encuentra disponible un mayor número de secuencias, cuyo análisis revela la existencia de nuevas familias que se extienden a lo largo de líneas filogenéticas. Así pues, a pesar del organismo en el que la proteína transportadora se ha encontrado, puede haber proteínas homólogas en otros organismos con funciones similares. Actualmente se conocen alrededor de 120 familias de proteínas que forman un canal o un poro. De ellas, ~30 son sistemas de transporte primario y ~80 son transportadores secundarios (Web1). De los sistemas de transporte primarios, la superfamilia ABC (*ATP-Binding Cassette*) es la única capaz de transportar aminoácidos. El resto son transportadores secundarios, entre los que destacan la MFS con más de 1000 miembros secuenciados y la superfamilia APC con más de 250. En este último caso todos transportan aminoácidos además de otros sustratos.

A pesar del gran número de transportadores de membrana, la información sobre su estructura y función es muy escasa, debido a su naturaleza hidrofóbica y a la dificultad para expresarlos en gran cantidad en sistema heterólogos. No obstante, en los últimos años, se han desarrollado nuevas técnicas que permiten obtener más información sobre la estructura y el mecanismo de estos transportadores (Kaback et al., 2001).

1.1. Sistemas de transporte en mamíferos.

A partir de los trabajos pioneros del grupo de H. N. Christensen a principios de los años sesenta, se identificaron diferentes sistemas de transporte de aminoácidos para mamíferos con especificidades de sustrato amplias (diferentes aminoácidos comparten el mismo sistema de transporte) y solapadas (un mismo aminoácido puede ser transportado por varios sistemas). Esta disposición permite, por un lado, una fina regulación del flujo de aminoácidos tanto a nivel

celular como entre órganos y, por otro, una economía de estructuras mediando dichos flujos (Christensen, 1990).

La clasificación de los diferentes sistemas de transporte se hizo siguiendo criterios de funcionalidad, es decir, del tipo de aminoácido transportado y de la dependencia del ión sodio (Na^+) (Palacin et al., 1998; Broer, 2002). La nomenclatura adoptada utiliza acrónimos indicativos de la especificidad de sustrato y designa con mayúsculas los sistemas Na^+ -dependientes y con minúsculas los Na^+ -independientes. La excepción es el sistema L, que es Na^+ -independiente y por razones históricas se designa con mayúsculas (Oxender et al., 1963; Bannai, 1984b).

A partir de la década de los noventa, el desarrollo de la estrategia de la expresión funcional (Palacin et al., 1998; Romero et al., 1998) y, posteriormente, la secuenciación de ESTs (*Expressed Sequence Tag*) y de múltiples genomas (como el humano) permitieron hacer búsquedas por homología de secuencia. Esto permitió la identificación de un gran número de transportadores de aminoácidos. Su caracterización funcional en sistemas de expresión heterólogos permitió asociarlos a los sistemas de transporte descritos previamente, intentando mantener la nomenclatura adoptada para el sistema correspondiente (Christensen et al., 1994; Palacin et al., 1998).

Estos nuevos avances modificaron alguno de los conceptos anteriormente desarrollados por Crane (Crane, 1965) y Christensen (Christensen, 1966):

- El mecanismo de intercambio predomina en el transporte de aminoácidos y es esencial para el transporte vectorial a través del epitelio.
- Otros gradientes electroquímicos, a parte del Na^+ , dirigen el transporte o contribuyen en él.
- Algunos transportadores cruzan las fronteras de separación de clases de sustratos, p. e. transportando aminoácidos neutros y catiónicos a la vez (Broer, 2002).

En la Tabla 1 aparecen los distintos sistemas de transporte descritos y las isoformas clonadas asociadas a cada uno de ellos. También se especifican los sustratos y el mecanismo de transporte. Las isoformas de un mismo sistema presentan pequeñas variaciones en la afinidad y especificidad de sustrato para ajustarse a la función del tejido en el que se expresa el transportador.

Actualmente, siguiendo criterios de función fisiológica (Broer, 2002), podemos agrupar los transportadores de aminoácidos en:

- Transportadores de alta capacidad de acumulación (EAAT, transportadores acoplados a Na^+ y Cl^-): es el caso de los transportadores de neurotransmisores (sistemas X_{AG}^- , Gly y β), que capturan el exceso de neurotransmisor liberado (Glu, Gly y GABA), no inactivable metabólicamente, para evitar su excitotoxicidad; los transportadores de osmolitos (sistema β),

que mantienen altas concentraciones de gradiente de sustratos (betaina, taurina) en el riñón; o los transportadores apicales que median la reabsorción de aminoácidos en el epitelio (sistema B^{0,+}).

Sistema	Isoformas	Mecanismo	Sustratos
A	ATA1	Cotransporte 1Na ⁺ /AA	Gly, Ala, Ser, Cys, Gln, Asn, His, Met
	ATA2		Gly, Pro, Ala, Ser, Cys, Gln, Asn, His, Met
	ATA3		Gly, Pro, Ala, Ser, Cys, Asn, Met
asc	4F2hc-asc-1	Intercambio	Gly, Ala, Ser, Cys, Thr (D y L)
	asc-2/(?)		Gly, Ala, Ser, Thr
ASC	ASCT1	Intercambio Na ⁺ -dependiente	Ala, Ser, Cys
	ASCT2		Ala, Ser, Cys, Thr, Gln
b^{0,+}	rBAT-b ^{0,+} AT	Intercambio	Lys, Arg, Ala, Ser, Cys, Thr, Asn, Gln, His, Met, Ile, Val, Phe, Tyr, Trp, Cys ⁻
B⁰	B ⁰ AT-1	Cotransporte 2Na ⁺ /AA	Leu, Ile, Gln, Phe, Ala, Pro, Cys, Val, Met, Ser, Asn, (His, Gly, Thr, Trp, Tyr)
B^{0,+}	ATB ^{0,+}	Cotransporte 2Na ⁺ /1Cl ⁻ /AA	Ala, Ser, Cys, His, Met, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Trp, (Lys, Arg, Thr, Asn, Gln)
β (BETA)	GAT1	Cotransporte 2-3Na ⁺ /1Cl ⁻ /AA	GABA
	GAT2		GABA, betaína, Pro, β-Ala
	GAT 3		GABA, betaína, taurina
	GAT 4		GABA, betaína
Gly	GlyT1	Cotransporte 2-3Na ⁺ /1Cl ⁻ /AA	Gly
	GlyT2		Gly
IMINO	PAT1	Cotransporte 1H ⁺ /AA	Pro, Gly, Ala, β-Ala, AIB, GABA
	PAT2		Pro, Gly, Ala, MeAIB
	PAT3 (?)		?
L	4F2hc-LAT-1	Intercambio	His, Met, Leu, Ile, Val, Phe, Tyr, Trp, (Gln)
	4F2hc-LAT-2		Ala, Ser, Cys, Thr, Asn, Gln, His, Met, Leu, Ile, Val
	LAT-3		Leu, Ile, Val, Phe, Met
	LAT-4		Leu, Ile, Val, Phe, Met
N	SN1	Cotransporte Na ⁺ /AA acoplado a intercambio de H ⁺	Gln, Asn, His
	SN2		Gln, Asn, His, Ser, Gly
T	TAT1	Uniporte	Phe, Tyr, Trp,
X^{AG}	EAAT1	Cotransporte 3Na ⁺ /1H ⁺ /AA acoplado a intercambio de K ⁺	Glu, Asp
	EAAT2 (GLT1)		Glu, Asp
	EAAT3		Glu, Asp, Cys
	EAAT4		Glu, Asp
	EAAT5		Glu, Asp
x_c⁻	4F2hc-xCT	Intercambio	Glu, Cys ⁻ , (Asp)
y⁺	CAT-1	Uniporte	Arg, Lys, His, Orn
	CAT-2A/B		Arg, Lys, His, Orn
	CAT-3		Arg, Lys
	CAT-4 (?)		?
y⁺L	4F2hc-y ⁺ LAT-1	Intercambio 1Na ⁺ /AA	Lys, Arg, Gln, His, Met, Leu
	4F2hc-y ⁺ LAT-2		Lys, Arg, Gln, His, Met, Leu, Ala, Cys

Tabla 1. Clasificación de los sistemas de transporte de aminoácidos en mamíferos adaptada y actualizada de Palacin et al., 1998 y Broer, 2002. Los aminoácidos estándar se presentan en código de tres letras (Cys⁻: cistina, Orn: ornitina, GABA: ácido γ-aminobutírico, AIB: ácido aminoisobutírico, MeAIB: ácido metil-aminoisobutírico).

- Transportadores de débil capacidad de acumulación (familia ATA/SN, CAT, TAT): incluye aquellos que permiten una entrada o salida neta de sustrato en contra de gradiente, asociada al cotransporte de Na^+ o H^+ , o bien uniporters. Parecen implicados en mantener altas las concentraciones citosólicas de aminoácidos no esenciales (sistema A, sistema N) para permitir posteriormente la entrada de aminoácidos esenciales por otros transportadores (intercambiadores). La abundancia de uniporters (sistema y^+ , sistema T) es muy baja debido, quizás, a ser un mecanismo que no protege a la célula de la pérdida de metabolitos importantes ya que cambios en el contenido de aminoácidos en el plasma se trasladan al contenido intracelular.

- Intercambiadores (sistemas asc, ASC, $\text{b}^{0,+}$, L, y^+ , x^-): constituyen la gran mayoría de los transportadores de aminoácidos en mamíferos. Preferentemente, intercambian aminoácidos no esenciales por aminoácidos esenciales. Permiten generar asimetrías, clave para el flujo vectorial de aminoácidos. Un ejemplo es la reabsorción de aminoácidos en el riñón (sistema $\text{b}^{0,+}$, sistema L, sistema y^+L). Dentro de este grupo se encuentran los HATs, objeto de estudio del grupo de investigación en el que se ha realizado esta Tesis doctoral (ver apartado 2.1).

En conclusión, cada tipo celular de un organismo contiene una combinación determinada de transportadores en sus membranas. Esta combinación depende de su función biológica y es el resultado de la presencia de los sistemas de transporte ubicuos en alguna de sus variantes (p. e. sistemas A, ASC, L, y^+ , X_{AG}^-) y de los sistemas de transporte tejido-específicos (p. e. sistemas $\text{B}^{0,+}$, N^{m} , $\text{b}^{0,+}$) (Palacín et al., 1998).

2. La superfamilia de transportadores de Aminoácidos, Poliaminas y organoCationes (APC).

Las primeras bacterias probablemente poseían unos pocos transportadores. Gracias a la duplicación génica, la divergencia y la especiación, estos sistemas de transporte ancestrales se desarrollaron hasta formar las actuales superfamilias. La superfamilia APC es una de las mayores familias de transportadores. Sólo las superfamilias ABC y MFS tienen mayor número de miembros identificados. Hasta la fecha, la superfamilia de transportadores APC consta de 13 familias (Web1):

- 1- Familia de transportadores de aminoácidos (AAT).
- 2- Familia de intercambiadores de aminoácidos básicos y poliaminas (APA).
- 3- Familia de transportadores de aminoácidos catiónicos (CAT).
- 4- Familia de transportadores de aminoácidos y colina (ACT).
- 5- Familia de transportadores de etanolamina (EAT).
- 6- Familia de transportadores de arqueas y bacterias (ABT).
- 7- Familia intercambiadores de GABA (GGA).
- 8- Familia de transportadores de L-aminoácidos (LAT).

- 9- Familia de proteínas de germinación de esporas (SGP).
- 10- Familia de transportadores de aminoácidos de levadura (YAT).
- 11- Familia de transportadores de aspartato y glutamato (AGT).
- 12- Familia de cotransportadores de poliaminas y H⁺ (PHS).
- 13- Familia de transportadores de salida de aminoácidos (AAE).

La superfamilia APC incluye más de 250 miembros cuya función es de cotransporte soluto:cación o de intercambio soluto:soluto (Saier, 2000) y se encuentra presente en todos los reinos, desde procariotas hasta eucariotas superiores. Las proteínas tienen una longitud que oscila entre 350 y 850 aminoácidos. Las proteínas más pequeñas generalmente tienen un origen procariota, mientras que las mayores son de origen eucariota y poseen extensiones hidrofílicas en los extremos N y C-terminal.

Los algoritmos de hidrofobicidad, basados en alineamientos múltiples generados a partir de las secuencias completas de los integrantes de cada subfamilia, revelan que:

- La gran mayoría de los transportadores APC presentan una predicción de topología de 12 segmentos transmembrana (TM) (en concreto, en 10 de las 13 familias), habiéndose mantenido similares posiciones y longitudes relativas de los diferentes segmentos y bucles a lo largo de la evolución (Jack et al., 2000). Además, se ha descrito la existencia de un bucle reentrante entre los segmentos TM II y III (Gasol et al., 2004) en xCT, miembro de la familia LAT.
- Los miembros eucariotas de la familia CAT (Deves et al., 1998) y los procariotas de la familia AGT (Lorca et al., 2003) presentan 14 segmentos TM. Los dos segmentos adicionales se localizan en el extremo C-terminal de la proteína.
- Los miembros de la familia procariota SGP presentan sólo 10 segmentos TM, debido a un truncamiento C-terminal que elimina los TM XI y XII (Jack et al., 2000). Se ha descrito que los miembros de esta familia se comportan como receptores de aminoácidos más que como transportadores (Cabrera-Martínez et al., 2003).

Algunas de estas predicciones han sido comprobadas experimentalmente para miembros procariotas representativos de la superfamilia APC (Ellis et al., 1995; Pi et al., 1996; Cosgriff et al., 1997; Hu et al., 1998c) y para un miembro eucariota (Gasol et al., 2004) (ver apartado 3.2).

A pesar de ser una de las superfamilias con más miembros identificados, la superfamilia APC no presenta aparentemente una gran diversificación de sustratos. De hecho, aunque incluye a miembros con mecanismos de transporte diferentes, estequiometrías variadas y acoplamiento a diferentes iones, existe una importante relación filogenética entre ellos (Jack et al., 2000). Todos sus miembros caracterizados transportan aminoácidos o sus derivados. Además, aunque cada una de las familias presenta una “marca” única en su secuencia, todas presentan características topológicas uniformes (o casi uniformes) que le dan la entidad de superfamilia (Jack et al., 2000). En vista de las amplias especificidades de transportadores pertenecientes a otras superfamilias como la MFS (Saier, 1999b), es

sorprendente que la superfamilia APC no haya divergido más extensamente con respecto al reconocimiento de sustrato. No existe una explicación para este hecho, pero podría deberse a las restricciones en la arquitectura de la proteína.

2.1. Familia de Transportadores Heteroméricos de Aminoácidos (HATs).

Dentro de la superfamilia APC encontramos la familia LAT, definida con el nombre del primer miembro identificado (LAT-1), y cuyos miembros constituyen la subunidad ligera de los HATs. Los miembros de la familia HAT poseen la característica única de tener estructura heteromérica, cuya unidad funcional está compuesta, al menos, por una subunidad pesada (*Heavy Subunit Heteromeric Amino acid Transporter*, HSHAT) y una subunidad ligera (*Light Subunit Heteromeric Amino acid Transporter*, LSHAT) unidas mediante un puente disulfuro conservado entre los miembros de la familia (Wagner et al., 2001; Chillarón et al., 2001; Verrey et al., 2004) (Figura 1). Algunos de estos miembros están directamente relacionados con aminoacidurias hereditarias (ver apartado 2.2).

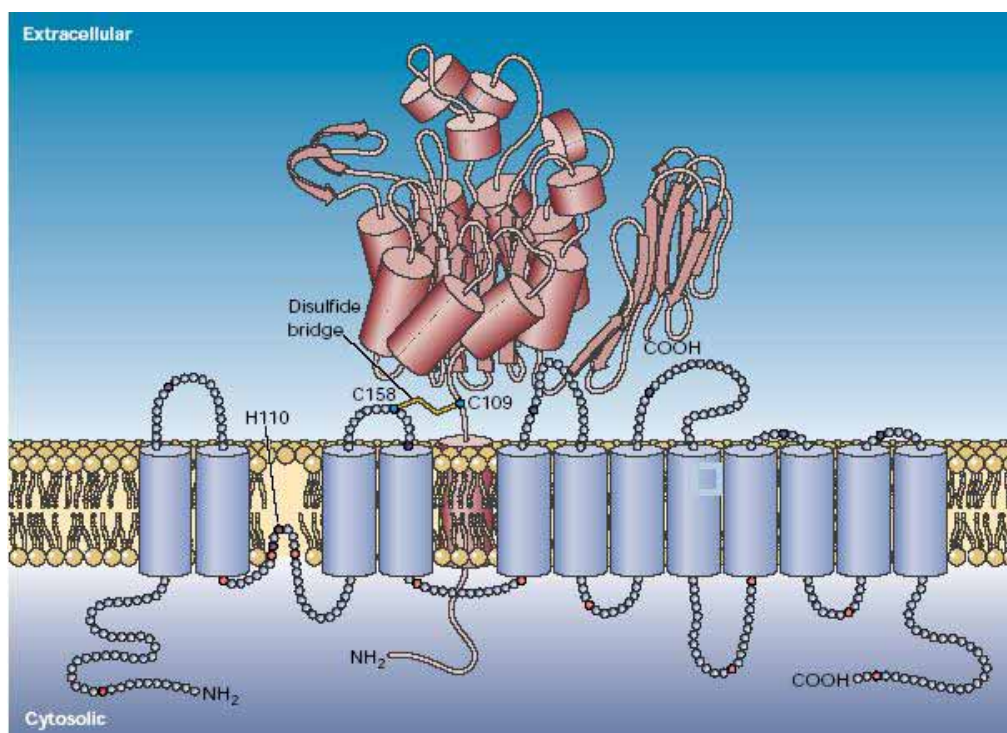


Figura 1. Representación esquemática de los transportadores heteroméricos de aminoácidos (familia HAT) adaptada de Palacin et al., 2005. La subunidad pesada HSHAT (rosa), está unida por el puente disulfuro S-S (amarillo), a la subunidad ligera LSHAT (violeta) con cisteínas conservadas (cisteína 158 para xCT humano y cisteína 109 para 4F2hc humano). Las cisteínas implicadas en el puente se localizan extracelularmente, después del segmento TM de la subunidad pesada. El dominio extracelular de la HSHAT es homólogo a glucosidasas (ver apartado 2.1.1). La topología de membrana de la subunidad ligera xCT, como modelo de las otras LSHAT, muestra 12 dominios TM con los extremos N y C-terminales

intracelulares y con un bucle reentrante (entre los segmentos TM II y III) (H110 corresponde al ápice del bucle). Se muestran los residuos con accesibilidad exterior (negro) e interior (rojo). Existen evidencias de que existe otro bucle reentrante entre los segmentos TM VIII y IX (datos no publicados).

La estructura heteromérica de esta familia y su mecanismo de transporte se ha conservado a lo largo de la evolución de los metazoos. Búsquedas por homología de secuencia en el genoma del nemátodo *C. elegans* han evidenciado la presencia de genes codificantes para proteínas con altos niveles de identidad de secuencia (28-45%) respecto a los integrantes mamíferos (Veljkovic et al., 2004). Las tres proteínas (AAT-1, 2 y 3) más homólogas a las subunidades ligeras de mamífero (39-45% identidad de secuencia) y las dos proteínas (ATG-1 y 2) homólogas a las subunidades pesadas contienen la cisteína conservada implicada en la formación del puente disulfuro. La caracterización funcional en oocitos de *X. laevis* muestra una actividad de transporte parecida al sistema L inducida por los complejos heteroméricos AAT-1/ATG-2 y AAT-3/ATG-2 (Veljkovic et al., 2004). Estos hechos evidencian que las principales características de la familia HAT se han conservado evolutivamente.

En la Tabla 2 se presentan los miembros de mamíferos de la familia HAT identificados hasta el momento y el sistema de transporte asociado. Se indica su localización cromosómica en humano y su relación con enfermedades hereditarias. Siguiendo la nomenclatura HUGO (*HUMAN Genome Organization*), los genes codificantes para cada proteína se denominan utilizando la raíz *SLC* (de *SoLute Carrier*), seguido de un numeral correspondiente a la familia "genética" a la que pertenece, la letra A, que actúa de separador, y finalmente el número del transportador (Hediger et al., 2004). Las subunidades pesadas pertenecen a la familia *SLC3* mientras que las subunidades ligeras pertenecen a la familia *SLC7*.

Subunidad pesada (HSHAT)	Subunidad ligera (LSHAT)	Nomenclatura HUGO	Sistema de transporte	Cromosoma humano	Enfermedad asociada
4F2hc (CD98hc)		<i>SLC3A2</i>		11q13	
	LAT-1	<i>SLC7A5</i>	L	16q24.3	
	LAT-2	<i>SLC7A8</i>	L	14q11.2	
	y ⁺ LAT-1	<i>SLC7A7</i>	y ⁺ L	14q11.2	LPI
	y ⁺ LAT-2	<i>SLC7A6</i>	y ⁺ L	16q22.1	
	Asc-1	<i>SLC7A10</i>	asc	19q12-13	
	xCT	<i>SLC7A11</i>	x _c ⁻	4q28-q32	
rBAT		<i>SLC3A1</i>		2p16.3-21	Cistinuria tipo I
	b ^{0,+} AT	<i>SLC7A9</i>	b ^{0,+}	19q12-13	Cistinuria tipo no-I
?	AGT-1	<i>SLC7A13</i>	-	8q21.3	
	Asc-2	<i>SLC7A12</i>	asc	-	
	arpAT	<i>SLC7A14</i>	-	-	

Tabla 2. Transportadores Heteroméricos de Aminoácidos (HATs). (?) no-Identificado; (-) no descrito; Adaptada de Chillaron et al., 2001.

2.1.1. Generalidades de las subunidades pesadas (HSHATs).

Esta familia, también denominada *SLC3*, está constituida por dos proteínas que comparten propiedades funcionales y estructurales: rBAT (*SLC3A1*) (*related to b^{0,+} Amino acid Transporter*; también denominado NBAT, D2) y 4F2hc (*SLC3A2*) (cadena pesada del antígeno de superficie 4F2, CD98 o FRP-1 (Fusion Regulatory Protein-1)). Las secuencias completas de rBAT en humano, rata, ratón, conejo y perro comparten una identidad que oscila entre el 69 y el 89%. La identidad de la secuencia de 4F2hc en humano, rata, ratón, hámster, pez cebra y lamprea varía entre el 31% y el 77%. Las secuencias humanas de rBAT y 4F2hc codifican glicoproteínas de 685 y 529 aminoácidos respectivamente, con un ~30% de identidad. En gel desnaturizante (SDS-PAGE) en condiciones reductoras, las formas glicosiladas de rBAT y 4F2hc tienen una movilidad de ~96 y ~85 kDa, mientras que las formas sin glicosilar tienen una movilidad de ~75 y ~60 kDa respectivamente (Palacín et al., 1998). En condiciones no reductoras ambas proteínas forman parte de un complejo con otra proteína. El tamaño de este complejo depende de la proteína asociada pero generalmente oscila entre 120 y 130 kDa (Chillaron et al., 2001).

rBAT y 4F2hc no poseen una secuencia líder que las dirija a la membrana. Los algoritmos de hidrofobicidad para ambas proteínas predicen una glicoproteína de tipo II, con un extremo N-terminal intracelular, un único dominio TM de 23 residuos y un extremo C-terminal extracelular (ectodominio), que presenta homología con las α -amilasas de insectos y α -glucosidasas bacterianas (Bertran et al., 1992b; Wells et al., 1992). El residuo de cisteína que participa en el puente disulfuro con la subunidad ligera se localiza extracelularmente, a una distancia de 4-5 aminoácidos del segmento TM.

El grupo de Ginsberg demostró que el extremo N-terminal de 4F2hc es intracelular y el C-terminal es extracelular (Fenczik et al., 2001). Otro argumento a favor de la estructura de un único dominio TM y un dominio C-terminal extracelular es la homología de este dominio con α -amilasas de insectos y las α -glucosidasas bacterianas (30-40% de identidad) (Quackenbush et al., 1987; Teixeira et al., 1987; Bertran et al., 1992b; Tate et al., 1992; Wells et al., 1992). La homología con las α -amilasas comienza con dos residuos de triptófano contiguos, situados unos pocos residuos más allá de la cisteína implicada en el puente disulfuro con la subunidad ligera. Esta homología se extiende hasta el extremo C-terminal del dominio extracelular y de las glucosidasas bacterianas (Chillaron et al., 2001). Estas enzimas pertenecen a la gran familia de las glicosilhidrolasas (Janecek, 1997), y muchos de ellos presentan una estructura similar:

- Un dominio A catalítico con una estructura de *TIM barrel* (β/α)₈.
- Un dominio B de unión a calcio que interrumpe el *TIM-barrel* sobresaliendo entre la tercera cadena β y la tercera hélice α .
- Un dominio C en el extremo C-terminal con una estructura de láminas β antiparalelas.

Recientemente, la purificación y cristalización del ectodominio de 4F2hc, realizada en nuestro grupo por la Dra. Joana Fort (J. Fort, Tesis doctoral; Fort et al., en preparación), y la difracción de rayos X realizada en colaboración con el Dr. Ignasi Fita, confirman una estructura 3D parecida a la de las glucosidasas bacterianas (Figura 2):

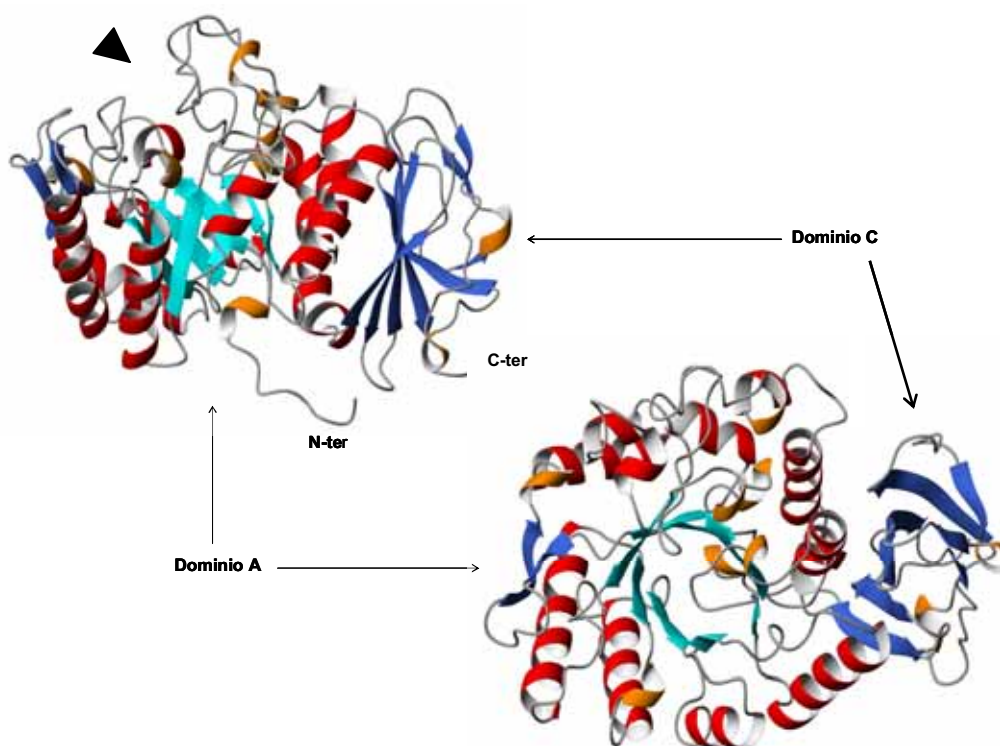


Figura 2. Estructura 3D del ectodominio de 4F2hc a 2.1 Å de resolución extraída de la Tesis doctoral de la Dra. J. Fort. En estas vistas laterales de la proteína se puede distinguir una estructura en barril (β/α)₈ y un dominio C-terminal de 8 láminas β en antiparalelo. La cabeza de flecha negra señala la posición de la hendidura “pseudocatalítica” de 4F2hc. Estas estructuras se encuentran depositadas en el *Protein Data Bank* (PDB) con los identificativos 2DH2 y 2DH3.

Se trata de un dominio triosa fosfato isomerasa *TIM-barrel* (β/α)₈ (aminoácidos 177-438) y 8 láminas β antiparalelas (residuos 439-529, dominio C). Por otro lado, estudios de dinámica molecular de la estructura realizados por el Dr. C. Ferrer-Costa a 10 ns muestran poco movimiento de la estructura. La distancia máxima, en RMSD, que alcanzan los modelos de dinámica es de 1.8 Å. Estos datos indican que la estructura del ectodominio de 4F2hc es muy estable, sin tendencia a tener grandes cambios conformacionales.

En la figura 3 se muestra el alineamiento estructural de la oligo-1,6-glucosidasa 1UOK con las proteínas humanas rBAT y 4F2hc.

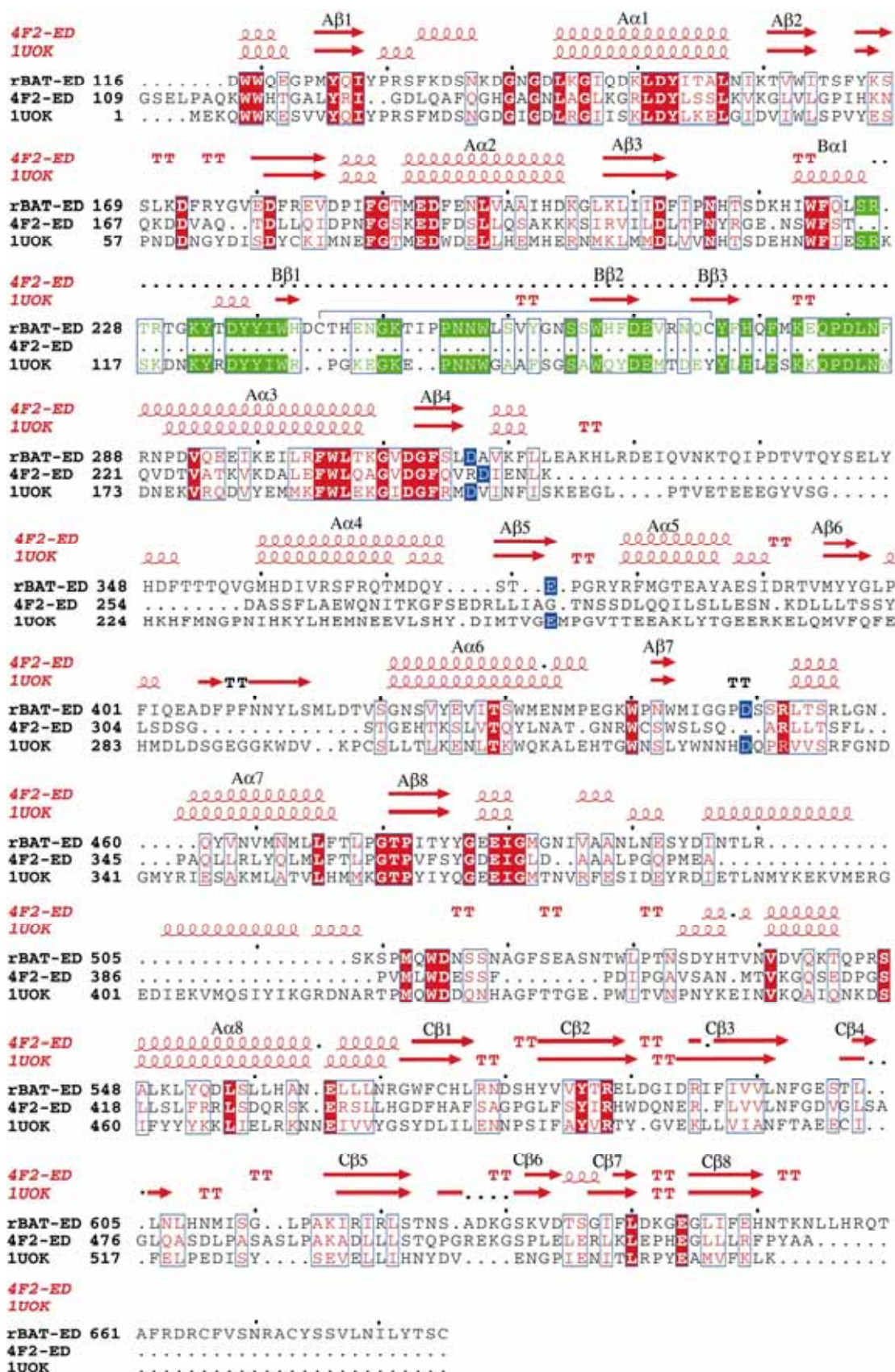


Figura 3. Alineamiento estructural entre la oligo-1,6-glucosidasa 1UOK de *Bacillus cereus* (*B. cereus*) (PDB ID: 1UOK) y el ectomonio de 4F2hc humano (PDB ID: 2DH2) extraído de Fort et al., en preparación. También se incluye el alineamiento de secuencia del ectodominio de rBAT humano. Los elementos de

estructura secundaria (hélices, láminas y giros) de las estructuras de 2DH2 y 1UOK están indicados en rojo en la parte superior de la secuencia. La identidad de secuencia permitió el modelado molecular de parte del dominio A (desde el N-terminal hasta A β 4 y desde A α 6 hasta el C-terminal) y una pequeña parte del dominio C. En contraste con el ectodominio de 4F2hc, el de rBAT tiene un dominio B ($\alpha\beta_3$) muy similar al de 1UOK. El modelaje del ectodominio de rBAT por Modeller (Sali et al., 1993) mostró que los residuos C242 y C273 están suficientemente próximos para formar un puente disulfuro (unidos en azul). Los residuos idénticos se resaltan en blanco dentro de cajas rojas, mientras que las sustituciones conservadas entre las tres posiciones están en rojo. Resaltados en blanco dentro de cajas verdes se encuentran las sustituciones conservadas entre la secuencia del dominio B de rBAT y 1UOK. Remarcados en cajas azules se encuentran los tres aminoácidos catalíticos conservados en las α -glucosidasas y su putativa conservación en los ectodominios de 4F2hc y rBAT.

Se observa que:

- El dominio extracelular de los miembros *SLC3* tiene una estructura de *TIM barrel* y un dominio C-terminal todo β (con la excepción de los últimos treinta residuos de rBAT), aunque en la zona entre las hélices α_4 y α_7 el alineamiento es de menor calidad.
- Existen tres residuos catalíticos y dos residuos de unión al sustrato en la zona del *TIM-barrel* que junto al dominio B constituyen el centro activo de la familia 13 de las glucosil-hidrolasas. Los dos residuos catalíticos (D199 y D329) y el residuo de unión al sustrato (H103) en 1UOK no se localizan en 4F2hc humano. De acuerdo con esto, Wells no observó actividad α -glucosidasa para 4F2hc expresada en oocitos de *X. laevis* (Wells et al., 1992). En nuestro grupo tampoco se observó tal actividad (J. Fort, Tesis doctoral). A pesar de ello, 4F2hc conserva una hendidura “pseudocatalítica” de función desconocida (figura 2).
- El dominio C (extremo C-terminal), con su estructura con 8 láminas β antiparalelas, se conserva en ambas HSHATs.

Con todos estos datos, la Dra. J. Fort, en nuestro grupo, ha modelado el dominio extracelular de rBAT humano por homología con los de 4F2hc y de la oligo-1,6-glucosidasa 1UOK de *B. cereus* (figura 4):

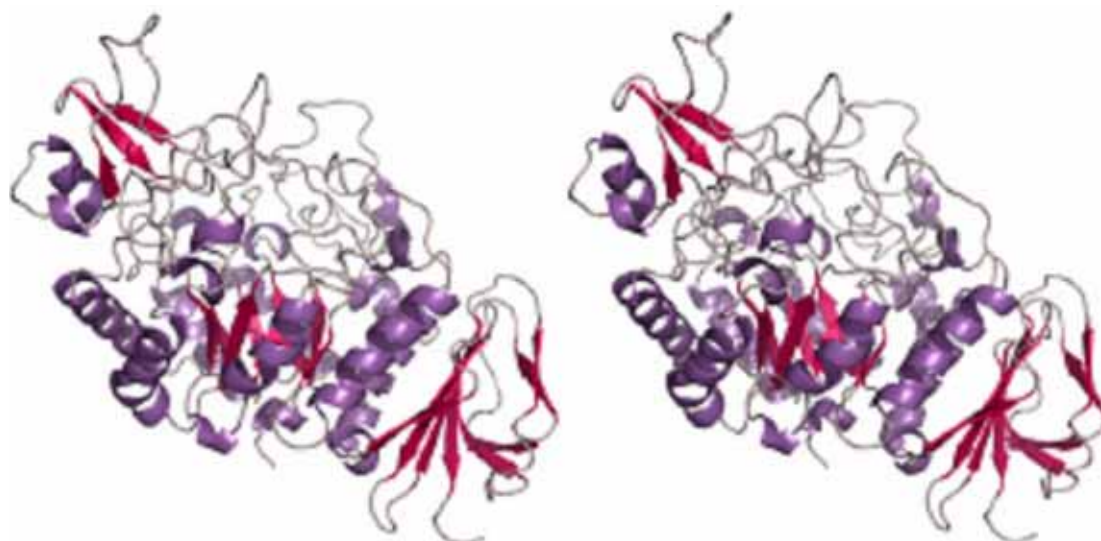


Figura 4. Modelos del ectodominio de rBAT extraídos de la Tesis doctoral de la Dra. J. Fort. Vista lateral estérica del ectodominio de rBAT.

En estos modelos se presentan conservados los residuos catalíticos y el dominio β (Figura 3), lo que sugiere que rBAT podría tener actividad glicolítica. El dominio B, incluyendo el motivo QPDLN (residuos 167-171 en 1UOK), se conserva en rBAT pero no en 4F2hc, sugiriendo que para rBAT las características estructurales de este dominio, en forma de $\alpha\beta$, se mantienen.

Cuando se identificaron rBAT y 4F2hc como proteínas de transporte, todavía no se conocía su participación en un heterodímero funcional. A partir de la caracterización de rBAT y 4F2hc se acumularon evidencias que apuntaban a que cada una de ellas formaba parte de un complejo heteromérico con otra proteína de un tamaño entre 30 y 40 kDa (Teixeira et al., 1987; Wang et al., 1995; Estevez et al., 1998). Estas evidencias son:

- rBAT y 4F2hc son proteínas poco hidrofóbicas para constituir un poro de paso de sustratos a través de la membrana. Además, la predicción de estructura revela un único dominio TM.
- El antígeno 4F2 forma parte de un heterodímero constituido por una proteína glicosilada de 85 kDa (4F2hc) unida por un puente disulfuro a una proteína de unos 40 kDa, altamente hidrofóbica y no glicosilada (Haynes et al., 1981; Quackenbush et al., 1987; Teixeira et al., 1987). Estudios del grupo de Tate evidenciaban la presencia de complejos de este tamaño de rBAT en preparaciones de membranas de riñón e intestino. Estudios por *Western blot* de rBAT en condiciones no reductoras revelaban un complejo de alto peso molecular (~250 kDa y ~125kDa) que pasaba a ser de ~90 kDa (el tamaño de rBAT) en condiciones reductoras (Wang et al., 1995).
- La transfección de rBAT en células COS indujo la expresión de la proteína pero ésta no llegaba a la membrana, y no se observaba el complejo de ~ 125 kDa, sugiriendo que en estas células probablemente no se expresaba la otra subunidad (Palacín et al., 1996).
- Estudios funcionales de mutaciones en rBAT (M467T y M467K) encontradas en pacientes de cistinuria de tipo I, mostraron que no existía correlación entre la cantidad de proteína rBAT presente en la membrana plasmática del oocito y la actividad de transporte inducida (Chillaron et al., 1997). Esto sugería que existía un factor endógeno (la subunidad ligera presente en el oocito), que limitaba la expresión de actividad de transporte.
- En oocitos de *X. laevis* observaciones similares (Estevez et al., 1998) mostraban que 4F2hc se asociaba con una subunidad endógena para dar actividad de transporte y^+L . La incubación con reactivos mercuriales impermeables a la membrana plasmática de oocitos inyectados con 4F2hc inactivaban la actividad de transporte y^+L inducido por 4F2hc. La mutación a serina de las 2 únicas cisteínas de 4F2hc no eliminaban el efecto de estos agentes, sugiriendo que afectaba las cisteínas de una proteína endógena del oocito (Estevez et al., 1998).
- Se evidenciaron diferentes actividades de transporte asociadas con la expresión de rBAT y 4F2hc en oocitos, aparte de $b^{0,+}$ y y^+L , respectivamente (Broer et al., 1995; Peter et al., 1996;

Broer et al., 1998; Peter et al., 1999) sugiriendo que rBAT y 4F2hc podían formar parte de distintos sistemas de transporte en función de la subunidad con la que se asociaban en el oocito.

En 1998, el grupo de F. Verrey publicó que la proteína ASUR4 inducía actividad de transporte L cuando se expresaba con 4F2hc en oocitos de *X. laevis* (Mastroberardino et al., 1998). ASUR4, posteriormente llamado LAT-1, fue el primer miembro identificado de la familia de LSHATs.

Desde el punto de vista funcional, el papel de la subunidad pesada parece relacionado con el transporte de la subunidad ligera a la membrana plasmática (Nakamura et al., 1999). La sustitución de una de las cisteínas que intervienen en el puente disulfuro por serina disminuye, pero no elimina la expresión del heterodímero en la membrana plasmática. Esto sugiere la importancia de interacciones no covalentes entre ambas subunidades (Estevez et al., 1998; Pfeiffer et al., 1998). Se ha observado que 4F2hc se localiza como monómero en la superficie de células COS, mientras que la subunidad ligera LAT-1, en ausencia de la subunidad pesada parece permanecer en un compartimento perinuclear, sugiriendo la necesidad de la subunidad pesada para alcanzar la superficie celular (Nakamura et al., 1999). Por otro lado, diferentes observaciones han implicado a las subunidades pesadas en la modulación de las propiedades funcionales de los holotransportadores (Peter et al., 2000; Rajan et al., 2000a). La Dra. N. Reig demostró, en nuestro laboratorio, que la reconstitución en liposomas de membranas de células transfectadas únicamente con $b^{0,+}$ AT, genera la misma actividad de transporte que la reconstitución de células transfectadas con rBAT y $b^{0,+}$ AT (Reig et al., 2002). Todo esto apunta que la subunidad ligera es la catalítica, mientras que la pesada es importante para el tránsito del holotransportador a la membrana (Nakamura et al., 1999).

2.1.2. Generalidades de las subunidades ligeras (LSHATs).

Como se ha comentado anteriormente, las LSHATs pertenecen a una gran superfamilia conocida con el nombre de transportadores APC.

Hasta el momento se han identificado 10 subunidades ligeras, la mayoría por homología de secuencia: seis de ellas se unen a 4F2hc para dar lugar al transportador funcional (LAT-1, LAT-2, y^+ LAT-1, y^+ LAT-2, asc-1, xCT), una de ellas se une a rBAT ($b^{0,+}$ AT), existen dos miembros “huérfanos” (asc-2, AGT-1), que no interactúan con las subunidades pesadas descritas y que quizás se unen a una posible subunidad pesada todavía por identificar y arpAT que puede heterodimerizar con rBAT, con 4F2hc o con otra subunidad pesada aún desconocida en el epitelio de riñón de ratón (Tabla 2). La asociación de estas proteínas con glicoproteínas de membrana de tipo II (HSHATs) hace que también se las conozca con el nombre gpaATs (*glycoprotein-associated Amino acid Transporters*).

Las diferentes LSHAT (excepto asc-2 y AGT-1, con identidades del 23-29%) mantienen identidades de secuencia aminoacídica que oscilan entre el 39 y 70% entre parálogos y entre el 85 y 98% entre ortólogos de mamífero (Chillarón et al., 2001; Wagner et al., 2001; Verrey et al., 2004). Presentan características estructurales y funcionales comunes:

- Son proteínas altamente hidrofóbicas que no se glicosilan (demostrado para LAT-1 y $b^{0,+}AT$), lo que provoca un aumento de su movilidad electroforética alrededor de los 40 kDa cuando su peso molecular corresponde a ~50 kDa.
- Sobre la base de su homología y de los algoritmos de hidrofobicidad, las subunidades ligeras presentan una predicción de estructura de 12 segmentos TM, con extremos N y C-terminal intracelulares, acorde con su función de transportador. Esta topología ha sido demostrada experimentalmente por estudios de SCAM (*Substituted Cysteines Accessibility Method*) a partir de un xCT sin cisteínas (xCT *cysless*), junto a la existencia de un bucle reentrante entre los segmentos TM II y III (Gasol et al., 2004; figura 1).
- Las LSHAT se unen con la correspondiente HSHAT mediante un puente disulfuro en el que interviene el residuo de cisteína conservado que se encuentra localizado en el bucle extracelular 3-4 (y el residuo ya descrito en las HSHATs).
- Los miembros LSHAT necesitan la coexpresión de su correspondiente HSHAT para alcanzar la membrana plasmática en un sistema de expresión heterólogo (Chillarón et al., 2001), aunque no es necesario que ambas se mantengan unidas por el puente disulfuro ya que otras interacciones no covalentes son suficientes para localizar el heterodímero en la membrana (Pfeiffer et al., 1998; Nakamura et al., 1999).
- Las LSHAT confieren la especificidad de transporte al complejo heteromérico, representando una gran diversidad de sustratos y acoplamiento a iones: aminoácidos neutros de tamaño grande (LAT-1, LAT-2) (Pineda et al., 1999; Rossier et al., 1999; Segawa et al., 1999; Rajan et al., 2000b), pequeño (asc-1, LAT-2) (Fukasawa et al., 2000), cargados negativamente (xCT) (Sato et al., 2000) y aminoácidos básicos y neutros (y^+LAT-1 , y^+LAT-2 y $b^{0,+}AT$) (Torrents et al., 1998; Chairoungdua et al., 1999; Feliubadaló et al., 1999; Pfeiffer et al., 1999a; Pfeiffer et al., 1999b; Kanai et al., 2000).
- Los transportadores heteroméricos se comportan como intercambiadores obligatorios con una estequiometría 1:1 y con una afinidad intracelular aparente por el sustrato mucho menor que la extracelular (Meier et al., 2002; Reig et al., 2002), excepto para el caso 4F2hc-asc-1, que se comporta como un intercambiador no obligatorio (Nakauchi et al., 2000; Pineda et al., 2004a).
- La subunidad ligera es capaz de mediar el transporte en ausencia de la subunidad pesada si conseguimos expresarla en superficie, como ocurre en un sistema reconstituido (Reig et al., 2002).

2.1.3. rBAT- $b^{0,+}AT$.

La proteína rBAT (*related to $b^{0,+}$ Amino acid Transporter*) (SLC3A1), fue la primera subunidad identificada de la familia HAT. Se clonó en 1992 por expresión funcional en oocitos

de *X. laevis* (Bertran et al., 1992b; Tate et al., 1992; Wells et al., 1992). La distribución tisular del mRNA de rBAT en humano, conejo y rata muestra una elevada expresión en riñón e intestino y una expresión menor en hígado y páncreas (Bertran et al., 1992b; Tate et al., 1992; Wells et al., 1992). La expresión del mRNA de rBAT en el riñón de rata se inicia en la última etapa de la vida fetal, se mantiene con unos niveles de expresión muy bajos en el comienzo de la vida postnatal, y se incrementa después de la lactancia hasta alcanzar el doble de expresión en el adulto (Furriols et al., 1993). Estudios de inmunocitoquímica han demostrado que rBAT se localiza en membranas apicales de células epiteliales de intestino y de túbulo proximal de riñón. A lo largo del túbulo, la expresión de rBAT se incrementa desde el segmento S1 hasta el segmento S3 (Kanai et al., 1992; Furriols et al., 1993; Pickel et al., 1993).

Inicialmente, la actividad de transporte de aminoácidos asociada a rBAT fue estudiada en oocitos de *X. laevis*. rBAT inducía un transporte independiente de Na^+ de cistina, aminoácidos básicos y neutros (Bertran et al., 1992b; Wells et al., 1992). Hoy en día, se sabe que esta actividad, similar a la actividad $\text{b}^{0,+}$ descrita en blastocistos de ratón (Van Winkle et al., 1988), tiene que ser debida a la interacción de rBAT con $\text{b}^{0,+}$ AT endógeno del oocito.

Una caracterización más exhaustiva de la actividad de rBAT demostró que la salida de aminoácidos mediada por rBAT a través de la membrana plasmática es dependiente de la presencia de aminoácidos en el medio extracelular (Coady et al., 1994; Ahmed et al., 1995; Chillaron et al., 1996). Además, el transporte es independiente de la presencia externa de los iones cloruro (Cl^-) y potasio (K^+) (Coady et al., 1994; Busch et al., 1994), de la sustitución de Na^+ por litio o colina, y de cambios en el pH y en la concentración de ATP (Coady et al., 1994). Por ello, el heterointercambio de sustratos mediado por rBAT en oocitos es electrogénico (Busch et al., 1994). Además, rBAT se comporta como un intercambiador obligatorio con una estequiometría 1:1 (Chillaron et al., 1996). El hecho de que un *knock down* de rBAT en células OK tenga una actividad de transporte $\text{b}^{0,+}$ -like disminuida (Mora et al., 1996) y que mutaciones en rBAT causan cistinuria de tipo I (Palacín et al., 2001) confirman el papel de esta proteína en el sistema de reabsorción de cistina de alta afinidad.

En 1999, tres laboratorios identificaron el transportador $\text{b}^{0,+}$ AT (*SLC7A9*), por homología de secuencia con el resto de miembros de la familia LSHAT clonados anteriormente (Chairoungdua et al., 1999; Feliubadaló et al., 1999; Pfeiffer et al., 1999a). El mRNA de $\text{b}^{0,+}$ AT se expresa en riñón e intestino delgado y en menor medida, en corazón, hígado, placenta y pulmón (Wagner et al., 2001). Por estudios de inmunolocalización en riñón se sabe que $\text{b}^{0,+}$ AT se encuentra en las membranas apicales de las células del túbulo proximal pero que sus niveles de expresión decrecen desde el segmento S1 al segmento S3 (Chairoungdua et al., 1999; Pfeiffer et al., 1999a; Rajan et al., 2000a), del mismo modo que y^+ LAT-1 y LAT-2 (Mizoguchi et al., 2001; Bauch et al., 2003).

Estudios posteriores han demostrado que $b^{0,+}$ AT interacciona con rBAT para constituir en membranas apicales de riñón de ratón y humano el transportador funcional rBAT- $b^{0,+}$ AT (Fernandez et al., 2002). Este complejo está asociado a un sistema de transporte descrito anteriormente como $b^{0,+}$ -like: transporte Na^+ -independiente de alta afinidad (K_M aparente $<50 \mu M$) para aminoácidos básicos y cistina, y transporte de menor afinidad (K_M aparente $>300 \mu M$) para aminoácidos neutros, mediado por un mecanismo de intercambio obligatorio 1:1 (Feliubadaló et al., 1999).

Los patrones de expresión opuestos a lo largo del túbulo proximal de $b^{0,+}$ AT y rBAT han sugerido la posibilidad de que ambas proteínas, *in vivo*, pudieran interaccionar con otras subunidades (Chairoungdua et al., 1999; Pfeiffer et al., 1999a). Sin embargo, un trabajo realizado en nuestro grupo demuestra, por experimentos de coprecipitación, que $b^{0,+}$ AT heterodimeriza exclusivamente con rBAT en membranas apicales (donde se localizan *in vivo*) (Fernández et al., 2002). Por otro lado, por inmunoprecipitaciones cuantitativas, se demuestra que la expresión de rBAT supera ampliamente la de $b^{0,+}$ AT, apoyando la hipótesis de la existencia de otra subunidad ligera que pudiera heterodimerizar con rBAT y que tuviera un patrón de expresión similar (Fernández et al., 2002).

El transportador rBAT- $b^{0,+}$ AT parece estar preparado para funcionar preferentemente en una dirección ya que:

- Existe una asimetría por la afinidad del sustrato a ambos lados de la membrana.
- El potencial de membrana favorece la entrada de aminoácidos con carga positiva.
- La rápida reducción de cistina a cisteína al entrar en la célula produce que la concentración intracelular de cistina sea siempre muy baja, favoreciendo su entrada.

En la Figura 5 se describe el papel de rBAT- $b^{0,+}$ AT en la reabsorción renal de aminoácidos.

Mutaciones en el gen *SLC7A9* causan cistinuria de tipo no-I (Feliubadaló et al., 1999) que, a diferencia de la cistinuria de tipo I causada por rBAT (ver apartado 2.1.1), tiene cierto grado de dominancia ya que los heterocigotos pueden tener un fenotipo similar al de los homocigotos (Dello Strologo et al., 2002).

2.1.4. Transportadores asociados a 4F2hc (*SLC3A2*).

A diferencia de rBAT, la proteína 4F2hc se expresa de forma ubicua, con un mayor nivel de expresión en testículo, pulmón, riñón, cerebro y bazo. Además parece estar presente en todas las células y líneas celulares tumorales (Parmacek et al., 1989; Nakamura et al., 1999). La localización de 4F2hc en riñón humano y de ratón se limita a la membrana basolateral del túbulo proximal contorneado (Quackenbush et al., 1986; Pfeiffer et al., 1999a). 4F2hc fue clonado usando un anticuerpo monoclonal (4F2) obtenido contra un antígeno de superficie de células de linfoblastoma (Hemler et al., 1982). Su elevada identidad de secuencia

con rBAT sugirió que podrían ser miembros de la misma familia, lo que llevó a verificar si 4F2hc inducía alguna actividad de transporte en oocitos.

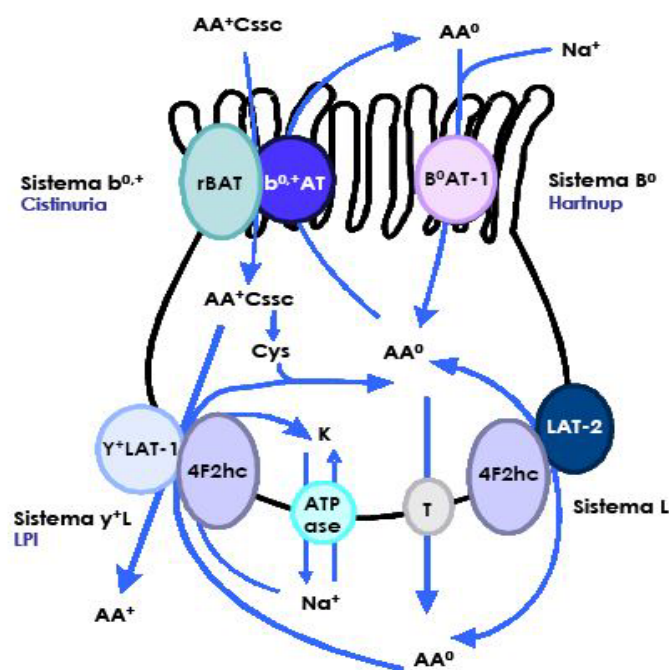


Figura 5. Modelo de reabsorción renal de cistina y aminoácidos neutros y básicos. AA⁺, aminoácidos básicos; AA⁰, aminoácidos neutros; Cssc, cistina; T, transportador unidireccional de aminoácidos neutros; ATPase, bomba Na⁺/K⁺ATPasa. Adaptado de Chillaron et al., 1996.

Inicialmente, la actividad de transporte de aminoácidos asociada a 4F2hc humano fue estudiada en oocitos de *X. laevis*. 4F2hc inducía una actividad de transporte de aminoácidos básicos independiente de Na⁺ y de aminoácidos neutros dependiente de Na⁺ con alta afinidad (rango micromolar). En ausencia de Na⁺, 4F2hc también transporta aminoácidos neutros con menor afinidad (Bertran et al., 1992b; Wells et al., 1992). Hoy en día, se sabe que esta actividad de transporte, similar a la actividad y⁺L descrita inicialmente en eritrocitos humanos por R. Devés (Deves et al., 1992) y más tarde en vesículas de membranas apicales de placenta humana (Eleno et al., 1994), es debida a la interacción de 4F2hc con diversas subunidades ligeras endógenas del oocito.

Aunque la expresión de 4F2hc en oocitos induce el sistema de transporte y⁺L, esta proteína se une a diferentes miembros de la familia de LSHATs (Tabla 2) y media el transporte de aminoácidos con características de otros sistemas (Pineda et al., 1999; Rossier et al., 1999; Bassi et al., 2001; Chairoungdua et al., 2001). Así, los heterodímeros formados por 4F2hc con las subunidades ligeras y⁺LAT-1, y⁺LAT-2, LAT-1, LAT-2, asc-1 y xCT inducen actividad de transporte de tipo y⁺L, L, asc y x_c⁻ respectivamente (Chillaron et al., 2001).

4F2hc (inicialmente denominado CD98hc), es una proteína multifuncional, que además del transporte de aminoácidos, regula la fusión celular (Tsurudome et al., 2000) y la adhesión β 1-integrina-dependiente (Fenczik et al., 1997). Recientemente, ha sido identificado en la superficie celular un complejo de CD98 con CD147 relacionado con la activación metabólica (Xu et al., 2005). Este complejo puede jugar un papel crítico en el metabolismo energético, probablemente por la coordinación del transporte de lactato (vía MCT1 y MCT4) y de aminoácidos (vía LAT-1). Además, 4F2hc está relacionado con la transformación celular:

- Está altamente expresado en la superficie de células tumorigénicas (Bellone et al., 1989; Dixon et al., 1990).
- Su expresión correlaciona con el desarrollo, la progresión y el potencial metastático del tumor (Holte et al., 1987; Esteban et al., 1990; Garber et al., 2001; Yoon et al., 2003).
- La sobreexpresión de 4F2hc confiere actividad tumorigénica a los fibroblastos NIH-3T3 (Hara et al., 2000).
- Su *knock out* en células madre embrionarias aumenta la apoptosis inducida por la falta de un correcto acoplamiento de la célula con la matriz extracelular, y bloquea la formación de teratocarcinomas en ratón (Feral et al., 2005).

La interacción con integrinas y el complejo CD147-CD98 puede explicar el papel de 4F2hc en la transformación celular.

2.1.4.1 4F2hc-LAT-1:

LAT-1 (*SLC7A5*) es el primer miembro identificado de la familia de subunidades ligeras, inicialmente denominada ASUR4 (*AldoSterone Up Regulated gene 4*). LAT-1 fue clonado por expresión funcional en oocitos de *X. laevis* a partir de una librería de cDNA obtenida de células A6 de riñón después de un tratamiento con aldosterona (Mastroberardino et al., 1998). Paralelamente, el grupo de Kanai aisló un cDNA de una librería de células de glioma C6 de rata por coexpresión funcional con 4F2hc, al que denominó LAT-1 (*L-type Amino acid Transporter-1*) (Kanai et al., 1998). En ambos casos, la nueva proteína identificada presentaba la capacidad de transportar aminoácidos neutros grandes en oocitos de *X. laevis* cuando se expresaba con 4F2hc (Mastroberardino et al., 1998; Kanai et al., 1998).

Como corresponde a una proteína asociada al sistema de transporte de tipo L (Oxender et al., 1963; Christensen, 1990), su actividad es Cl^- y Na^+ -independiente e inhibible por el ácido 2-(-)-endoamino-bicicloheptano-2-carboxílico (BCH). No es inhibible, sin embargo, por N-etilmaleimida (NEM). Esto sitúa al transportador LAT-1 dentro del subsistema L1 (Weissbach et al., 1982; Novak et al., 1994). Su espectro de selectividad de sustratos es relativamente amplio: aminoácidos neutros de cadena ramificada y aromática, con constantes de afinidad aparentes, en el rango micromolar alto (Mastroberardino et al., 1998; Kanai et al., 1998; Meier et al., 2002).

El heterodímero 4F2hc-LAT-1 es un intercambiador obligatorio, no permite ninguna salida de aminoácido apreciable en ausencia de aminoácido extracelular (no hay difusión facilitada). Su función de captación está altamente transestimulada por aminoácidos intracelulares y la estequiometría del intercambio es de 1:1 (Meier et al., 2002). La afinidad aparente para los aminoácidos extracelulares es 100 veces mayor que para los intracelulares, lo que sugiere que éstos últimos controlan la velocidad del transporte. La selectividad de la función de salida de aminoácidos es parecida a la captación pero presenta algunas diferencias: en particular, L-leucina, L-isoleucina y L-metionina son mejores sustratos de salida que de entrada (Meier et al., 2002). En conjunto, los datos experimentales indican que 4F2hc-LAT-1 no media una captación neta de aminoácidos sino que más bien está destinado a equilibrar las concentraciones relativas de los distintos aminoácidos a través de la membrana (Meier et al., 2002; Verrey, 2003).

LAT-1, en tejidos adultos, se expresa en cerebro (en la barrera hematoencefálica), placenta y ovario y, con menor medida, en pulmón, timo, testículos, piel, hígado, músculo esquelético y estómago (Kanai et al., 1998; Nakamura et al., 1999; Prasad et al., 1999). LAT-1 también se expresa en muchas líneas celulares tumorales, en células en proliferación y en tumores primarios humanos (Wolf et al., 1996; Yanagida et al., 2001). Este hecho ha señalado a LAT-1 como un posible marcador tumoral (Campbell et al., 2001), aunque su implicación en el proceso tumorigénico aportando algún tipo de ventaja nutricional a la célula todavía está por demostrar. Por su amplio espectro de sustratos transportados, LAT-1 también se ha propuesto como un posible transportador a través de la barrera hematoencefálica de drogas relacionadas con los aminoácidos, como puede ser la L-Dopa, hormonas tiroideas, gabapentina, melfalan o conjugados de cisteína (Kanai et al., 2001).

2.1.4.2 4F2hc-LAT-2:

LAT-2 (*SLC7A8*) fue identificado en nuestro grupo por homología de secuencia con LAT-1. LAT-2 se caracterizó funcionalmente en oocitos de *X. laevis* (Pineda et al., 1999). LAT-2, en asociación con 4F2hc, también media un transporte de tipo L pero incluso con un rango de selectividad de sustratos todavía mayor que LAT-1 ya que incluye los aminoácidos neutros pequeños (Pineda et al., 1999; Rossier et al., 1999). Se expresa fundamentalmente en la membrana basolateral del túbulo proximal renal (decreciendo de S1 a S3) e intestino delgado (Rossier et al., 1999; Bauch et al., 2003).

Funcionalmente, el heterodímero 4F2hc-LAT-2 intercambia aminoácidos neutros a través de la membrana basolateral equilibrando sus concentraciones relativas. De manera similar al heterodímero 4F2hc-LAT-1, 4F2hc-LAT-2 también presenta una afinidad aparente mucho menor por los aminoácidos intracelulares que por los extracelulares (a excepción de la glicina). En conjunto, podemos decir que 4F2hc-LAT-2 participa en una ruta de eflujo basolateral unidireccional de determinados aminoácidos neutros. Es un eficiente exportador de

L-cisteína (Meier et al., 2002; Fernández et al., 2003), un aminoácido que se importa a las células del túbulo proximal renal como L-cistina, mayoritariamente vía el transportador rBAT-b⁰⁺AT (ver apartado 2.1.3) (defectivo en cistinuria). El papel de 4F2hc-LAT-2 en el flujo basolateral de L-cisteína ha sido demostrado por un trabajo en nuestro grupo en un modelo de células OK (Fernández et al., 2003) (Figura 5). Esto implica que 4F2hc-LAT-2, al transportar L-cisteína proveniente de la reducción de L-cistina intracelular, tiene una función clave en el flujo transepitelial de cistina y sugiere que *SLC7A8* podría ser un gen modulador de la reabsorción renal de cistina (Fernández et al., 2003). Se está estudiando la posible asociación entre el grado de hiperexcreción de aminoácidos en orina y polimorfismos de LAT-2 en población normal y en pacientes de cistinuria y sus familiares.

2.1.4.3 4F2hc-y⁺LAT-1:

y⁺LAT-1 (*SLC7A7*) fue identificado por homología de secuencia a LAT-1 (52%). Cuando se coexpresa y⁺LAT-1 con 4F2hc, en oocitos de *X. laevis*, induce una actividad de transporte como la descrita para el sistema y⁺L (Torrents et al., 1998; Pfeiffer et al., 1999b). Los experimentos de caracterización funcional mostraron que el heterómero 4F2hc-y⁺LAT-1 es un intercambiador obligatorio de estequiometría 1:1 (Kanai et al., 2000) y que media la captación de aminoácidos neutros juntamente al Na⁺ con una afinidad aparente alta, preferentemente intercambiando estos aminoácidos neutros por aminoácidos catiónicos intracelulares, esta vez sin acompañamiento de Na⁺ (Torrents et al., 1998; Pfeiffer et al., 1999b; Kanai et al., 2000).

Esta función de eflujo de aminoácidos catiónicos junto con la alta expresión de y⁺LAT-1 en riñón e intestino delgado, sugirió que éste podía ser el transportador defectivo en la enfermedad hereditaria LPI. De hecho, se han encontrado mutaciones en el gen *SLC7A7* de pacientes con esta enfermedad (Borsani et al., 1999; Torrents et al., 1999), como se describe en el apartado 2.2.2.

Experimentos posteriores confirmaron la localización basolateral del transportador en células del túbulo proximal renal y del intestino delgado siguiendo un gradiente axial decreciente a lo largo del túbulo proximal (Bauch et al., 2003), de forma parecida a LAT-2 y b⁰⁺AT (Rossier et al., 1999; Pfeiffer et al., 1999b) (Figura 5).

2.1.4.4 4F2hc-y⁺LAT-2:

y⁺LAT-2 (*SLC7A6*) también se encontró en las bases de datos públicas por homología de secuencia a LAT-1 (50%). Se clonó a partir de mieloblastos humanos KG-1 (Nagase et al., 1996), inicialmente con el nombre KIAA0245 (*GenBank ac. No. D87432*). y⁺LAT-2 se expresa fundamentalmente en cerebro (tanto en neuronas como en astrocitos), testículos y glándula parótida y de forma más débil en intestino delgado, corazón y riñón de ratón.

En asociación con 4F2hc, y^+LAT-2 induce la actividad de transporte y^+L en oocitos de *X. laevis*: transporta aminoácidos básicos de forma Na^+ -independiente y neutros de forma Na^+ -dependiente, con afinidades en el rango micromolar (Torrents et al., 1998). A diferencia de y^+LAT-1 , que también media un transporte de tipo y^+L , tiene una especificidad de sustrato más amplia en la que se incluyen la arginina, lisina, leucina, glutamina, histidina, metionina y sorprendentemente glutamato (Broer et al., 2000). El transporte tiene una estequiometría de intercambio de 1:1, igual que los otros miembros de la familia (Chillarón et al., 2001; Verrey et al., 2004). Es interesante notar que y^+LAT-2 media una entrada eficiente de varios aminoácidos neutros y catiónicos (arginina, leucina, glutamina) mientras el eflujo o salida de aminoácidos catiónicos (arginina) es mucho más eficiente que el de los neutros (leucina, glutamina).

Aunque el papel fisiológico de este transportador todavía no está claro, podría estar implicado en la transferencia de arginina y glutamina en el cerebro y otros tejidos (Broer, 2002).

2.1.4.5 4F2hc-xCT:

xCT (*SLC7A11*) se identificó por expresión funcional a partir de RNA de macrófagos activados en oocitos de *X. laevis* (Sato et al., 1999). Los cDNA humano y de ratón codifican una proteína de 502 y 501 aminoácidos respectivamente, y son un 89% idénticas en su secuencia. El mensajero de xCT de ratón se expresa en macrófagos activados y cerebro. Concretamente, en cerebro se expresa con intensidad en el área postrema, en uno de los órganos circumventriculares, y más débilmente en el núcleo del tracto solitario (Sato et al., 2002). En los macrófagos se detectan tres transcritos de 12, 3.5 y 2.5 kb. En cerebro sólo se detecta el transcrito de 12 kb (Sato et al., 1999). El transcrito humano sólo se expresa en cerebro, aunque un análisis por RT-PCR detecta una expresión mínima en hígado, intestino, ovario, riñón, pulmón, islotes pancreáticos y las líneas celulares tumorales Caco-2 y HepG2 (Bassi et al., 2001).

La expresión de xCT y 4F2hc en oocitos de *X. laevis* induce la actividad de transporte x_c^- (Sato et al., 1999; Bassi et al., 2001). Esta actividad se caracteriza por el intercambio de cistina y glutamato independiente de Na^+ con una estequiometría 1:1 (Bannai et al., 1980). Esta actividad es responsable de la entrada de cistina y la salida de glutamato, debido a la baja concentración intracelular de cistina y a la elevada concentración de glutamato. La cistina, una vez que entra en la célula se reduce a cisteína y se incorpora a la síntesis de proteínas y de glutatión (GSH). La actividad x_c^- tiene un papel fisiológico directo en la regulación de la concentración intracelular de GSH (Bannai et al., 1986). La activación de macrófagos por lipopolisacáridos u otros agentes provoca un aumento en los niveles de expresión de xCT. Este incremento está modulado por la concentración de oxígeno: la hipoxia disminuye la expresión de xCT y también disminuye el contenido de GSH (Bridges et al., 2001; Sato et al., 2001). Los autores sugieren que el transporte de cistina vía xCT es el paso limitante en la generación de GSH, de manera que podría servir como una defensa antioxidante para los macrófagos,

especialmente en las regiones de inflamación (Sato et al., 2001). Por otro lado, en la región promotora del gen se ha encontrado una región de unión de un elemento de respuesta a electrófilos (EpRE)-like que media el incremento de la transcripción de xCT en respuesta a electrófilos como el dietilmaleato o el cadmio (Sasaki et al., 2002). La expresión de xCT en cerebro puede contribuir al mantenimiento de los niveles de GSH, protegiendo a las células del estrés oxidativo (Sato et al., 2002). Experimentos realizados con ratones defectivos de xCT, demuestran que el sistema xCT contribuye al mantenimiento del balance redox en el plasma *in vivo*. Por el contrario, este sistema es prescindible en el desarrollo de los mamíferos, aunque es de vital importancia para las células *in vitro* (Sato et al., 2005)

Recientemente, se ha visto que xCT es el receptor del herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV, *human herpesvirus 8*) (Kaleeba et al., 2006). Este herpesvirus es el agente causante del sarcoma de Kaposi y de otros síndromes linfoproliferativos asociados a menudo con el SIDA.

2.1.4.6 4F2hc-asc-1:

asc-1 (*asc-type aminoacid transporter-1*) (*SLC7A10*) fue identificado por homología de secuencia con LAT-2 (66%) a partir de una librería de expresión de ratón (Fukasawa et al., 2000). El mRNA de *asc-1* se expresa fundamentalmente en cerebro y riñón, y en menor medida en pulmón, intestino delgado, corazón, hígado y placenta. En asociación con 4F2hc media un transporte Na⁺-independiente de aminoácidos neutros pequeños, como glicina, L-alanina, L-serina, L-treonina, L-cistina, ácido α -aminoisobutírico y β -alanina. El heterómero 4F2hc-asc-1 también transporta D-isómeros, incluyendo D-serina con una alta afinidad. Este transportador es el único de la familia que, aún actuando preferentemente como un intercambiador, no es un intercambiador obligatorio y puede transportar aminoácidos en una sola dirección (Fukasawa et al., 2000; Pineda et al., 2004a). Estas características de transporte corresponden con las descritas anteriormente para un subtipo de transporte *asc* en linfocitos de sangre periférica (Albi et al., 1994).

Fisiológicamente, la relevancia de *asc-1* está todavía por determinar. El hecho que transporte D-serina, un putativo modulador endógeno de los receptores NMDA de glutamato, le atribuye cierta implicación en la regulación de la transmisión sináptica (Nakauchi et al., 2000). En riñón, se había sugerido su posible implicación en la reabsorción renal de cistina/cisteína, proponiéndose como gen adicional de cistinuria (Leclerc et al., 2001). Un trabajo reciente realizado en nuestro grupo (Pineda et al., 2004a) descarta esta posibilidad y propone que *asc-1* podría ser el responsable de los flujos basolaterales de los aminoácidos neutros pequeños entre las células del epitelio tubular y el *vasa recta* durante el reciclaje de aminoácidos, implicando a *asc-1* en la regulación y adaptación osmótica (Pineda et al., 2004a). En esta dirección, el análisis del gen de *asc-1* revela la presencia de motivos TonE (*Tonicity response*

Enhancers), relacionados con el aumento de la transcripción en respuesta a situaciones de hipertonicidad (Handler et al., 2001).

2.1.5. Transportadores huérfanos.

Como hemos visto en la tabla 2, las LSHATs asc-2 y AGT-1 no interaccionan con las dos subunidades pesadas descritas, pero probablemente se unen a otra subunidad pesada aún por identificar. Por el contrario, arpAT puede heterodimerizar con ambas o con otra subunidad pesada aún por identificar en el epitelio de riñón de ratón.

2.1.5.1 asc-2 (*SLC7A12*):

asc-2 ha sido identificado en las bases de datos por su homología (32-35%) con el resto de LSHATs (Chairoungdua et al., 2001). asc-2, a diferencia de asc-1, no existe en el genoma humano. El cDNA de ratón codifica una proteína de 465 aminoácidos con un peso molecular de 55 kDa. Tiene conservado el residuo de cisteína responsable en otros miembros de la familia LSHAT de la interacción con la subunidad pesada. asc-2 se expresa en riñón, placenta, pulmón, bazo, y músculo esquelético. La proteína se localiza en las células epiteliales del túbulo colector de riñón tanto en la membrana basal como apical y de manera menos abundante en el citoplasma. En condiciones reductoras el análisis por *Western blot* muestra que la proteína tiene el tamaño esperado en eritrocitos y en riñón. Por el contrario, en condiciones no reductoras, el tamaño de las bandas es superior y distinto en eritrocitos y riñón, lo que sugiere que asc-2 podría estar unido a proteínas diferentes, formar distintos puentes disulfuro intramoleculares u oligomerizar con otras proteínas a través de otros residuos de cisteína (Chairoungdua et al., 2001).

asc-2 no induce transporte cuando se expresa con 4F2hc o con rBAT. Esto es consistente con el hecho de que no colocaliza con ninguna de las dos proteínas *in vivo*, y sugiere que asc-2 heterodimeriza con una subunidad pesada no identificada. La caracterización funcional de esta proteína se ha llevado a cabo con dos proteínas de fusión que conectan el extremo C-terminal de asc-2 con el N-terminal de rBAT y 4F2hc. Estas proteínas de fusión alcanzan la membrana plasmática del oocito y expresan una actividad de transporte característica del sistema asc. Ambas proteínas de fusión exhiben propiedades idénticas de transporte respecto a la dependencia iónica y la afinidad y selectividad de sustrato, lo que sugiere que la subunidad pesada no afecta a las propiedades del transporte de asc-2. A diferencia del transporte inducido por 4F2hc-asc-1, el transporte es estereoselectivo y no acepta algunos de los sustratos de alta afinidad para asc-1 como AIB y β -alanina (Chairoungdua et al., 2001). Aunque el papel funcional de esta proteína no está definido, se especula que la alanina transportada por asc-2 en las células del túbulo colector podría servir como precursor para la síntesis de osmolitos orgánicos (Jans et al., 1988; Chairoungdua et al., 2001).

2.1.5.2 AGT-1 (SLC7A13):

AGT-1 se ha clonado a partir de una librería de cDNA de riñón de ratón por su homología con b^{0,+}AT de rata. El cDNA codifica una proteína de 478 aminoácidos con un peso molecular aparente de 51 kDa, cuya secuencia es un 35-37% idéntica al resto de LSHAT y un 48% idéntica a asc-2. Presenta una estructura similar a las subunidades de LSHATs y conserva el residuo de cisteína (residuo 129) responsable de la interacción con la subunidad pesada en otros miembros de la familia. AGT-1 se expresa en riñón y se localiza en la membrana basolateral del túbulo proximal recto, (segmento S3) y del túbulo distal. En un análisis por *Western blot* en condiciones reductoras de membranas totales de riñón de ratón, AGT-1 tiene una movilidad de 40 kDa, y en condiciones no reductoras forma parte de un complejo de 250 kDa. Esto indica que AGT-1 se une a otra/s proteína/s a través del residuo de cisteína conservado o a través de otros residuos de cisteína (Matsuo et al., 2002).

AGT-1 no expresa ninguna actividad de transporte cuando se expresa con rBAT o 4F2hc en oocitos de *X. laevis* o células COS-7, lo que sugiere que ninguna de las dos subunidades pesadas se une a AGT-1. La caracterización funcional se ha llevado a cabo construyendo dos proteínas de fusión con rBAT y 4F2hc de igual manera que para asc-2 (Matsuo et al., 2002). Ambas proteínas de fusión alcanzan la membrana plasmática y muestran idénticas propiedades de transporte. AGT-1 transporta L-glutamato y L-aspartato con alta afinidad (rango micromolar). El transporte es estereoselectivo e independiente de Na⁺ y Cl⁻. AGT-1 se diferencia de xCT en que no acepta aminoácidos ácidos de cadena larga como L-cistina aniónica, L-homocisteato y L-aminoadipato, y sí transporta aminoácidos ácidos de cadena corta como L-aspartato, o L-cisteín sulfinato. Considerando que la distribución de AGT-1 en los segmentos de la nefrona (localizado en la membrana basolateral) coincide con la distribución del transportador de glutamato dependiente de Na⁺ de alta afinidad EAAC1 (localizado en la membrana apical) (Shayakul et al., 1997), se especula que AGT-1 podría favorecer la salida de aminoácidos ácidos a través de la membrana basolateral y contribuir a la reabsorción renal de esos aminoácidos (Matsuo et al., 2002).

2.1.5.3 arpAT (SLC7A14):

Estudios recientes realizados por los Drs. L. Chillarón y E. Fernández en nuestro laboratorio han identificado *in silico* en el genoma de ratón un nuevo miembro de las LSHATs (Fernandez et al., 2005). Este nuevo miembro, y último de la familia LAT en mamíferos, ha sido denominado arpAT (*aromatic preferring Amino acid Transporter*) y presenta una identidad de secuencia con el resto de miembros de la familia del 32-43%. La caracterización funcional de arpAT muestra que es capaz de inducir un transporte de aminoácidos neutros, preferentemente aromáticos. Este transporte es independiente de Na⁺, transestimulable, estereoselectivo y de baja afinidad. Por todo esto, podría representar una variante del sistema de transporte de aminoácidos T, ya que se clonó por RT-PCR a partir de riñón de ratón (Fernandez et al., 2005).

La actividad de transporte de arpAT se induce cuando se coexpresa tanto con rBAT como con 4F2hc en células HeLa. El ortólogo humano de arpAT parece estar silenciado en los genomas de primates (presenta diversas mutaciones de parada y de cambio de pauta). Experimentos de *Northern blot* presentan señal de arpAT en riñón, intestino delgado, cerebro, hígado y corazón. Si se aumenta la astringencia de lavado, únicamente se mantiene la expresión en cerebro e intestino delgado, y se pierde la señal en riñón. Experimentos de hibridación *in situ* parecen confirmar que arpAT no se expresa en riñón (Fernandez et al., 2005). Se desconoce su papel fisiológico.

2.2. Aminoacidurias hereditarias.

La pérdida de función en alguno de los miembros de la familia HAT resulta en fallos en la reabsorción de aminoácidos en riñón e intestino. La enfermedad genéticamente asociada a b^{0,+}AT y rBAT se denomina cistinuria, mientras que la genéticamente asociada a y⁺LAT-1 se denomina LPI.

2.2.1. Cistinuria.

La cistinuria es una enfermedad autosómica recesiva, con una incidencia media de 1 de cada 7000 nacimientos (Chillarón et al., 2001), aunque varía considerablemente entre poblaciones. La enfermedad está causada por un defecto en el transporte de cistina y aminoácidos dibásicos a través de la membrana apical de las células epiteliales del túbulo proximal renal y del intestino delgado. Aproximadamente el 99% de los aminoácidos filtrados en el glomérulo se reabsorben mediante mecanismos de transporte localizados en la membrana apical de las células epiteliales del túbulo proximal (Silbernagl, 1988). Los pacientes cistinúricos excretan cantidades de cistina que oscilan entre el 50 y 200% del filtrado glomerular. Cuando la cistina llega al túbulo colector, donde la orina tiene un pH ácido, ésta precipita debido a su baja solubilidad, formando cálculos en el riñón que producen obstrucción, infección y, en último lugar, insuficiencia renal. La manifestación clínica de la enfermedad es la urolitiasis de cistina (Palacín et al., 2001). La cistinuria representa el 1-2% de todas las litiasis renales y un 6-8% en casos pediátricos.

El tratamiento de la enfermedad está dirigido a favorecer la dilución de la cistina y de los cálculos: se recomienda control dietético, minimizando la ingesta de metionina (precursor de cisteína), y entradas abundantes de líquidos y de alcalinizantes de la orina como el bicarbonato sódico y el citrato de potasio (Dent et al., 1955). En cuanto al tratamiento farmacológico, se han utilizado compuestos sulfhidrilo, como D-penicilamina (Crawhall et al., 1963) o α -mercaptopropionilglicina (King, 1968), que reaccionan con la cistina, forman compuestos más solubles y previenen su cristalización, aunque presentan efectos secundarios

como fiebre, erupciones cutáneas y proteinuria. Normalmente se combinan varios métodos para una prevención efectiva (Joly et al., 1999).

Se han establecido dos tipos de cistinuria: la de tipo I (MIM 220100) y la de tipo no-I (MIM 600918) (Palacín et al., 2000; Chillarón et al., 2001). Los heterocigotos de cistinuria de tipo I no presentan manifestaciones clínicas de la enfermedad, mientras en los heterocigotos de cistinuria de tipo no-I presentan un fenotipo variable con distintos niveles de hiperexcreción en orina de cistina y aminoácidos dibásicos.

La cistinuria de tipo I está generalmente asociada a mutaciones en el gen que codifica para rBAT (*SLC3A1*). Se han identificado más de 100 mutaciones distintas para rBAT: mutaciones *nonsense*, *missense*, de lugar de *splicing*, de cambio de pauta, grandes deleciones y reordenamientos cromosómicos (Palacín et al., 2005; Font-Llitjos et al., 2005). La mutación más frecuente es M467T, asociada a un defecto de tráfico (Chillarón et al., 1997).

La cistinuria de tipo no-I está generalmente asociada a mutaciones en el gen que codifica para b^{0,+}AT (*SLC7A9*). El Consorcio Internacional de Cistinuria (ICC) ha identificado más de 60 mutaciones diferentes en este gen, (Palacín et al., 2005). La mutación más frecuente (25%) es G105R, asociada a un problema en la estabilidad de la proteína (Font et al., 2001).

Un análisis reciente del fenotipo de pacientes heterocigotos portadores de mutaciones en el gen *SLC7A9*, demuestra que la excreción de aminoácidos es normal en un 14% de los casos (Dello Strologo et al., 2002). Estos resultados han obligado al ICC a establecer una nueva clasificación para la enfermedad:

- Cistinuria de tipo A, en la que los pacientes presentan mutaciones en los dos alelos del gen *SLC3A1* y los heterocigotos presentan excreción de aminoácidos normal.
- Cistinuria de tipo B, en la que los pacientes presentan mutaciones en los dos alelos del gen *SLC7A9* y los heterocigotos muestran generalmente hiperexcreción de cistina y aminoácidos básicos (sólo en el 14% de los casos la excreción es normal).
- Se propone la posible existencia de cistinuria de tipo AB, en la que los pacientes presentarían una mutación en el gen *SLC3A1* y otra en el gen *SLC7A9*, aunque no se ha encontrado ningún caso todavía (Dello Strologo et al., 2002).

2.2.2. Lisinuria con intolerancia a proteínas (LPI).

La LPI es una enfermedad autosómica recesiva poco frecuente (se conocen ~200 casos) causada por un defecto en el transporte de aminoácidos dibásicos a través de la membrana basolateral de las células epiteliales del túbulo renal y del intestino delgado (Simell, 2001). Su incidencia mayor es en la población finlandesa (1/60000), con un ~40% de los casos descritos (Palacín et al., 2000; Chillarón et al., 2001; Palacín et al., 2004).

La enfermedad se caracteriza por una absorción intestinal reducida, excreción renal aumentada, concentraciones bajas de aminoácidos dibásicos en plasma, aciduria orótica y disfunción del ciclo de la urea por falta de sustratos, resultando en hiperamonemia (Simell, 2001). Otras manifestaciones clínicas incluyen vómitos, diarrea, retardo en el desarrollo (provocado por deficiencia del aminoácido esencial lisina), hepatomegalia, episodios de coma hiperamonémico y osteoporosis. También se han descrito casos de proteinosis alveolar (Santamaria et al., 1996; Simell, 2001), aunque se desconoce el mecanismo patogénico que la provoca (Palacín et al., 2004).

El tratamiento de la LPI se dirige a la corrección del defecto funcional del ciclo de la urea para evitar los episodios de hiperamonemia. Esto puede conseguirse mediante la administración de citrulina, un aminoácido neutro que puede metabolizarse a arginina y ornitina, aportando intermediarios al ciclo de la urea (Carpenter et al., 1985). Por otro lado, la desnutrición provocada por la deficiencia del aminoácido esencial lisina se puede corregir con la administración de acetil-lisina, un análogo de la lisina que permite aumentar la concentración plasmática de este aminoácido a pesar de su poca disponibilidad y consiguiente alto precio (Rajantie et al., 1983).

La enfermedad está causada por mutaciones en el gen que codifica para γ^+ LAT-1 (SLC7A7), aunque otros factores además de éste deben tener alguna implicación (p. e., modulación del fenotipo) debido a la gran variedad de manifestaciones clínicas que se han descrito. Se han encontrado 31 mutaciones diferentes en dicho gen (Palacín et al., 2001; Kamada et al., 2001; Shoji et al., 2002), aunque la población finlandesa afectada presenta una mutación fundadora (IVS6-2AT) que altera un lugar de *splicing* creando una proteína truncada.

3. Características estructurales de los transportadores.

A finales de la década de los 90, el *boom* de la era de la clonación empezaba a decaer. Las bases de datos públicas contenían prácticamente la totalidad de las secuencias de los genomas conocidos y la identificación de nuevas proteínas era cada vez menos evidente. La proteómica estaba emergiendo con fuerza como un nuevo campo de conocimiento dirigido a la caracterización estructural y funcional del conjunto de proteínas de un organismo. En este contexto, aunque la identificación de nuevos miembros de la familia HAT no ha concluido, el interés de nuestro grupo de investigación empezó a orientarse hacia:

- El conocimiento de las relaciones estructura-función y de la estructura 3D de los transportadores HAT.
- Genómica funcional.
- Conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos responsables de las enfermedades cistinuria y LPI. Parte de los resultados presentados en esta tesis se engloban dentro del

primer apartado, por lo que a continuación se dedica un apartado de la Introducción a tratar este tema.

Las proteínas de membrana representan el 20-30% de los genes de un genoma (Wallin et al., 1998; Fleming, 2000; Stevens et al., 2000). Los transportadores son la principal clase de proteínas integrales de membrana, y al igual que los canales, están altamente relacionados con la fisiología y con enfermedades humanas como cistinuria, LPI, fibrosis quística, diabetes, resistencia a antibióticos, etc., por lo que su importancia en la industria farmacéutica es enorme, constituyendo ~70% de las dianas terapéuticas (Wu et al., 2003). A modo de ejemplo, la fluoxetina y el omeprazol, dos de los medicamentos más prescritos en todo el mundo, tienen como diana un transportador. Sin embargo, en 2003 menos del 1% de las proteínas de estructura conocida eran proteínas integrales de membrana (Wu et al., 2003).

La difracción por rayos X de cristales 3D es la técnica más poderosa para la determinación estructural de una proteína porque da información a nivel atómico. Pero la obtención de cristales de una proteína de membrana es extremadamente difícil, principalmente por dos motivos:

- Su carácter anfipático (compuestas por zonas altamente hidrofóbicas en contacto con los fosfolípidos y zonas hidrofílicas en contacto con la fase acuosa a ambos lados de la membrana) (Ostermeier et al., 1997).
- Las bajas concentraciones a las que se encuentran en los tejidos obliga a sobreexpresarlas en grandes cantidades, proceso costoso en muchas ocasiones (Tate, 2001). A pesar de los avances en las técnicas de producción y purificación proteicas, las estructuras de alta resolución conocidas de transportadores y canales corresponden mayoritariamente a organismos bacterianos, principalmente *Escherichia coli* (*E. coli*) (Dahl et al., 2004; Doyle, 2004; Web3).

Además de las dificultades para conseguir la cristalización de proteínas de membrana, estos cristales han de ser válidos para difractar por rayos X y después se ha de aplicar una metodología de cálculo muy complicada. Esta metodología puede llevar a estructuras erróneas, como los casos de EmrE (Ma et al., 2004; Pornillos et al., 2005) y MsbA (Chang et al., 2001; Chang et al., 2003), cuyas estructuras han sido recientemente retiradas del PDB. Los autores de los artículos en donde se publicaban estas estructuras se han retractado y han publicado una nota solicitando la disculpa por el error cometido al determinar la estructura de dichas proteínas.

En la Tabla 3 se muestran los principales transportadores y canales con estructura 3D publicada, el organismo de origen, la resolución alcanzada y la referencia del trabajo. En caso de haber más de una estructura publicada de la misma proteína en las mismas condiciones

únicamente se muestra la de mayor resolución (todas las estructuras de proteínas de membrana cristalizadas a alta resolución hasta la fecha están accesibles en Web3).

Proteína	Organismo	Resolución	Referencia
Transportadores de resistencia <i>multidrug</i>			
EmrE	<i>E. coli</i>	7 Å	(Ubarretxena-Belandia et al. 2003)
MDR1 P-gp	Células ováricas de hámster	10 Å	(Rosenberg et al. 2001)
AcrB	<i>E. coli</i>	2.8, 3.1 y 3.3Å	(Murakami et al. 2006)
Transportadores de la MFS			
LacY	<i>E. coli</i>	3.5 Å	(Abramson et al. 2003)
EmrD	<i>E. coli</i>	3.5 Å	(Yin et al. 2006)
OxIT	<i>O. formigenes</i>	12 Å	(Hirai et al. 2002)
GlpT (G-3-P)	<i>E. coli</i>	3.3 Å	(Huang et al. 2003)
Transportadores secundarios de aminoácidos			
LeuT	<i>A. aeolicus</i>	1.65 Å	(Yamashita et al. 2005)
Glt _{ph} (Glutamate)	<i>P. horikoshii</i>	3.5 Å	(Yernool et al. 2004)
Glt _{ph} (Aspartate)	<i>P. horikoshii</i>	3.0, 3.2 y 3.3Å	(Boudker et al. 2007)
Transportadores ABC			
BtuCD	<i>E. coli</i>	3.2 Å	(Locher et al. 2002)
Sav1866	<i>S. aureus</i>	3.0 Å	(Dawson et al. 2006)
ModB ₂ C ₂	<i>A. fulgidus</i>	3.1, 1.6 y 1.6Å	(Hollenstein et al. 2007)
HI1470	<i>H. influenzae</i>	2.4 Å	(Pinkett et al. 2007)
Intercambiadores			
NhaA	<i>E. coli</i>	3.4 Å	(Hunte et al. 2005)
Canales de Potasio			
KirBac 1.1	<i>B. pseudomallei</i>	3.6 Å	(Kuo et al. 2003)
KirBac 3.1	<i>M. magnetotacticum</i>	2.6 Å	(Gulbis et al. en preparación)
KcsA	<i>S. lividans</i>	2.0 Å	(Zhou et al., 2001)
K _v AP	<i>A. pernix</i>	3.2 Å	(Jiang et al. 2003a)
K _v 1.2	<i>R. norvegicus</i>	2.9 Å	(Long et al. 2005a y b)
NaK	<i>B. cereus</i>	2.4 y 2.8 Å	(Shi et al. 2006)
MthK (Ca ⁺ -dep)	<i>M. thermoautotrophicum</i>	3.3 Å	(Jiang et al. 2002)
Canales de Cloro (intercambiadores H ⁺ /Cl ⁻)			
CIC	<i>E. coli</i>	3.0 Å	(Dutzler et al. 2002)
CIC	<i>S. typhimurium</i>	3.5 Å	(Dutzler et al. 2002)
CIC	<i>E. coli</i>	2.5 Å	(Dutzler et al. 2003)
Canales iónicos mecánico-sensibles			
MscS	<i>E. coli</i>	3.7 Å	(Bass et al. 2003)
MscL	<i>M. tuberculosis</i>	3.5 Å	(Chang et al. 1998)

Proteína	Organismo	Resolución	Referencia
Aquaporinas y similares			
SecYEβ	<i>M. jannaschii</i>	3.5 Å	(van der Berg et al. 2004)
AQP0	cristalino ovino	1.9 y 2.4 Å	(Gonen et al. 2005)
AQP1	glóbulo rojo humano	3.7 Å	(Ren et al. 2001)
AQP1	glóbulo rojo bovino	2.2 Å	(Sui et al. 2001)
AQPM	<i>M. marburgensis</i>	1.7 y 2.3 Å	(Lee et al. 2005)
AQPZ	<i>E. coli</i>	2.5 Å	(Savage et al. 2003)
SoPIP2	<i>S. oleracea</i>	2.1 y 3.9 Å	(Törnroth-Horsefield et al. 2006)
GlpF	<i>E. coli</i>	2.2 Å	(Fu et al. 2000)
AmtB	<i>E. coli</i>	1.8 Å	(Zheng et al. 2004)
Amt-1	<i>A. fulgidus</i>	1.5 Å	(Andrade et al. 2005)

Tabla 3. Estructuras 3D de alta resolución de algunos de los transportadores y canales más representativos extraídas de Web3.

Estas estructuras explican los resultados de muchos estudios bioquímicos previos y arrojan nueva luz sobre sus mecanismos funcionales. Todos estos transportadores tienen estructuras de hélice α en sus dominios TM, como habían sugerido los estudios previos (Dahl et al., 2004). Aquí no se recogen las porinas de mitocondria que presentan una estructura todo β (Web3). Algunas de las hélices presentan formas irregulares con giros e inclinaciones. En conjunto, estos cristales demuestran la gran flexibilidad de las proteínas transportadoras, llevando a cabo movimientos sustanciales durante el proceso de translocación (Jiang et al., 2003a; Jiang et al., 2003b). Estos movimientos permiten distinguir, en cierta medida, entre transportadores y canales. Estas estructuras y otras de menor resolución han servido como base para la construcción de modelos 3D de proteínas. Estos modelos están permitiendo comprender los mecanismos funcionales y las estructuras moleculares. También han permitido la formulación de nuevas hipótesis con respecto a la estructura y la función, las cuales deben ser validadas experimentalmente.

La dificultad de obtener cristales de proteínas integrales de membrana ha obligado a desarrollar estrategias alternativas, menos precisas, para los estudios de estructura-función (Coutre et al., 2000; Kaback et al., 2001). La suma de estas estrategias permitió en el caso de LacY generar un modelo de alta resolución (Sorgen et al., 2002), que se confirmó tras la obtención de información a partir del cristal (Abramson et al., 2003). En este contexto, también se han desarrollado un elevado número de programas computacionales de predicción de topología a partir de la secuencia de la proteína de interés o del alineamiento por homología de los miembros de una familia (Persson et al., 1997; Tusnady et al., 1998; Hirokawa et al., 1998; Krogh et al., 2001) (ver apartado 1.3 de Material y Métodos). Las predicciones, aunque muy útiles y de acceso inmediato, no siempre alcanzan los niveles de precisión deseados o incluso han resultado ser incorrectas en algunos casos (p.e. canal de Cl⁻ CIC, Dutzler et al., 2002). Un

informe que ha evaluado el nivel de fiabilidad de estos programas basándose en estructuras de proteínas determinadas experimentalmente, afirma que incluso los mejores programas sólo llegan a predecir correctamente alrededor del 60% de las estructuras (Moller et al., 2001; Ikeda et al., 2002; Chen et al., 2002; Ikeda et al., 2003).

La evidencia experimental, aún con sus limitaciones tratándose de proteínas de membrana, es la forma más fiable de obtener información de las relaciones estructura-función. Existen diferentes aproximaciones bioquímicas de resolución grosera pero que aportan información valiosa a la espera de la obtención de cristales: estudios de topología, de interacción entre hélices, del estado de oligomerización, búsqueda de residuos clave, etc. La combinación de aproximaciones permite obtener una visión global de la organización estructural de la proteína y de sus mecanismos funcionales.

3.1. Hacia la estructura-función de los transportadores de la familia LAT.

Los trabajos realizados hasta el momento para enfocar esta cuestión se pueden dividir en tres líneas:

- Los dirigidos a la subunidad pesada (HSHAT), que por su interacción obligatoria con la subunidad ligera los incluimos en este apartado a pesar de no formar parte estrictamente de la superfamilia APC (Chillarón et al., 2001).
- Los dirigidos a la subunidad ligera (LSHAT) (Chillarón et al., 2001).
- Los dirigidos a establecer la estructura cuaternaria del complejo formado por la unión de ambas subunidades, fundamentalmente a través del estudio de la oligomerización.

3.1.1 Subunidades pesadas (rBAT y 4F2hc).

Se han publicado dos estudios basados en delecciones (Miyamoto et al., 1996; Deora et al., 1998) y otro en mutaciones (Peter et al., 2000) en el extremo C-terminal de rBAT que sugieren que este extremo es relevante para la interacción con la subunidad ligera. Los dos primeros se realizaron antes de la identificación de las subunidades ligeras y se basan en la expresión de rBAT en oocitos de *X. laevis* que, junto con la subunidad ligera endógena, induce actividad de transporte. El trabajo de Miyamoto (Miyamoto et al., 1996) con rBAT humano muestra que la delección 511-685, que elimina la última hélice α del *TIM-barrel*, el dominio C y la cola C-terminal (Figura 6), induce una actividad de transporte muy disminuida que se parece a la actividad γ^+L de 4F2hc. La expresión de rBAT con delecciones más largas en el extremo C-terminal anula cualquier actividad de transporte de rBAT en oocitos (Palacín et al., 1998). Los resultados sugieren que el dominio C-terminal de rBAT es relevante para la interacción con la subunidad endógena.

El trabajo de Deora (Deora et al., 1998), realizado con rBAT de rata, muestra que la deleción mínima 658-683, que elimina las cuatro últimas láminas β del dominio B y la cola C-terminal (Figura 6), elimina la actividad de transporte de rBAT. Los mutantes de la siguiente serie de deleciones (588-683, a partir de las seis últimas láminas β del dominio B) inducen una actividad de transporte casi como la de rBAT completo y con las características del sistema $b^{0,+}$. Deleciones más largas (566-683, eliminación de todo el dominio C; 508-683, eliminación a partir de la última hélice α del *TIM barrel*) anulan cualquier inducción de la actividad de transporte.

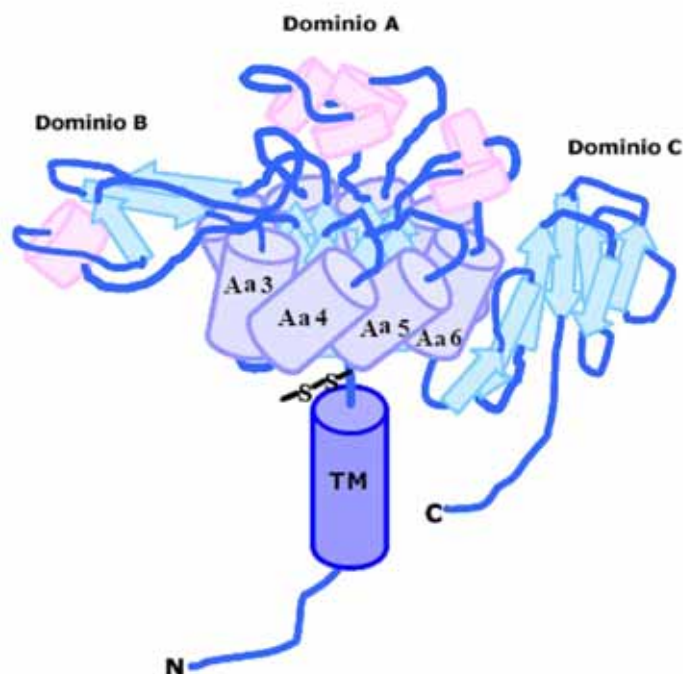


Figura 6. Representación del dominio extracelular con homología α -glucosidasas de rBAT. El dominio A está compuesto por 8 cadenas α y β alternadas, formando un *TIM-barrel*. El dominio B es más pequeño y sobresale entre la tercera cadena α y β del dominio A. El dominio C constituye el extremo C-terminal y presenta una estructura en láminas β antiparalelas. El esquema está basado en los resultados de modelaje molecular obtenidos a partir de los alineamientos de la estructura del ectodominio de 4F2hc (J. Fort, Tesis doctoral). Está representado el puente disulfuro (S-S) con la subunidad ligera.

No hay una razón evidente que explique la discrepancia de resultados entre la deleción 508-683 de rBAT de rata (Deora et al., 1998) y la 511-685 de rBAT humano (Miyamoto et al., 1996). Hay que tener en cuenta que estos experimentos se realizaron antes de la clonación de las subunidades ligeras y podrían interpretarse como diferentes interacciones con las subunidades ligeras endógenas del oocito, dependiendo de la deleción. En trabajos posteriores se confirma el papel relevante del extremo C-terminal de rBAT en la interacción con la subunidad ligera (Peter et al., 2000). El análisis de las mutaciones de los tres residuos de cisteína conservados (C664, C671 y C683 en rBAT de rata), localizados en la cola C-terminal de rBAT, muestra que la sustitución C664A elimina la interacción de rBAT con su subunidad $b^{0,+}$ AT y provoca la interacción funcional con una putativa subunidad de tipo y^+ LAT.

Estudios paralelos realizados en 4F2hc (Broer et al., 2001) parecen indicar, sorprendentemente, que en este caso la asociación con la subunidad ligera requiere dominios diferentes dependiendo del tipo de subunidad. Así, el tráfico a la membrana del heterodímero 4F2hc-LAT-1 requiere la cola N-terminal, el segmento TM y 30 aminoácidos extracelulares, incluyendo el puente disulfuro y la primera lámina β del dominio B (Figura 6). En cambio, el reconocimiento de LAT-2 y γ^+ LAT-2 requiere el dominio extracelular de 4F2hc completo. El grupo de Ginsberg realizó un estudio en el que se examina qué dominios de 4F2hc están implicados en el transporte y cuáles en la regulación de integrinas (Fenczik et al., 2001). Mediante la construcción de quimeras con la glicoproteína de tipo II CD69, los autores demuestran que el extremo N-terminal y el segmento TM de 4F2hc son necesarios para sus efectos en la función de las integrinas y el tráfico de LAT-1 a la membrana, mientras el dominio extracelular *glucosidasa-like* es necesario para la estimulación de la actividad de transporte inducida por LAT-1 (Fenczik et al., 2001). Recientemente el grupo de Verrey ha realizado estudios preliminares acerca de los dominios de rBAT y 4F2hc involucrados en la interacción funcional con las LSHATs (Franca et al., 2005). Proteínas quiméricas y truncadas de rBAT y 4F2hc, se coexpresaron en oocitos de *X. laevis* con $b^{0,+}$ AT o LAT-1. La asociación entre subunidad pesada y ligera se analizó por coimmunoprecipitación. Los resultados indican que en rBAT el segmento TM y la región citosólica, juegan un papel dominante en la interacción funcional y selectiva con $b^{0,+}$ AT. En cambio, tanto el dominio N-terminal como el dominio extracelular son necesarios para la interacción entre 4F2hc y LAT-1 (Franca et al., 2005).

La función más evidente para la subunidad pesada parece ser ayudar a la subunidad ligera a llegar a la membrana (Chillarón et al., 2001). De acuerdo con esta idea, varias de las mutaciones de cistinuria en rBAT muestran un defecto de tráfico (Chillarón et al., 1997; Saadi et al., 1998). Sin embargo, se ha demostrado que una mutación de cistinuria en rBAT (R365W) puede modificar las características de transporte del sistema $b^{0,+}$ (Pineda et al., 2004b). La mutación R365W, localizada en el dominio extracelular de rBAT, tiene un defecto específico en el eflujo de arginina, pero no en su influjo, y no afecta a las K_M aparentes extra e intracelulares de arginina. Este defecto en el mecanismo de intercambio podría explicarse por la existencia de dos vías alternativas de translocación del sustrato: una vía para influjo y otra para eflujo, la cual es defectiva en el mutante R365W (Pineda et al., 2004b).

La Dra. J. Fort en su Tesis doctoral ha conseguido cristalizar de dos formas el ectodominio de 4F2hc. Los cristales en forma de aguja son de tipo monoclinico y contienen 1 molécula por unidad asimétrica (figura 2). Estos cristales difractan a una resolución de 2.1 Å. Los cristales en forma de placa son ortorómbicos y contienen 2 moléculas por unidad asimétrica. Estos cristales difractan a una resolución de 2.8 Å. El ectodominio de 4F2hc homodimeriza en estos cristales con una coordinación de zinc en la interfase, cuya función es desconocida. Este homodímero es compatible con lo que se encuentra al sobreexpresar 4F2hc en células HeLa. Además experimentos realizados por L. Rodríguez en nuestro laboratorio,

muestran que las mutaciones a cisteína de los residuos S444 y S480 están a la distancia de entrecruzamiento químico que predice el cristal para el homodímero, confirmando la interacción a través del dominio C (figuras 2 y 7).

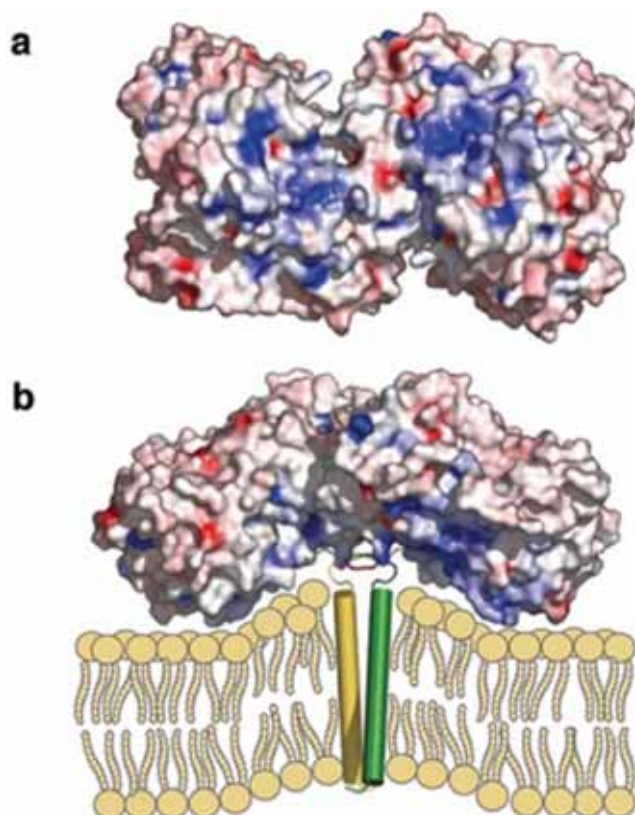


Figura 7. Modelo de interacción de 4F2hc con la membrana plasmática apoyado por las superficies electrostáticas del ectodominio de 4F2hc. a) Superficie electrostática de la región N-terminal del homodímero 4F2hc basada en estudios computacionales de *docking*. b) Modelo de la interacción del homodímero de 4F2hc con los fosfolípidos de membrana. Los residuos de carga positiva se muestran en azul y los de carga negativa en rojo.

Se ha realizado un modelo de la orientación del homodímero de 4F2hc en la membrana basándose en:

- La distribución de carga en la superficie de 4F2hc genera un dipolo eléctrico, que se dispone de manera adecuada para interactuar con los fosfolípidos de membrana tanto en el monómero como en el homodímero de 4F2hc.
- El extremo N-terminal del ectodominio de 4F2hc se encuentra en esta cara de carga positiva, en dirección al dominio C.
- La orientación de los extremos N-terminales del ectodominio de 4F2hc es compatible con la formación del puente disulfuro entre las C109 de cada 4F2hc, tal y como se produce en células HeLa *in vivo*. La proximidad en la secuencia de esta cisteína con el dominio TM de 4F2hc presupone que este no se encuentra muy alejado.

Estos resultados sugieren un tipo de interacción de 4F2hc con las cabezas polares de los fosfolípidos de membrana e hipotéticamente con la subunidad ligera (Joana et al., en preparación). La cara positiva del homodímero posee una forma cóncava y el ectodominio de 4F2hc es una estructura rígida. Por lo tanto, existen dos posibilidades: o bien el ectodominio se aplana para adaptarse a la membrana, o bien la deforma (figura 7b), como se ha demostrado para los homodímeros del dominio BAR (Blood et al., 2006).

3.1.2 Subunidades ligeras.

A pesar de los importantes papeles atribuidos a los HATs, sólo existen unos pocos estudios sobre las relaciones estructura-función de estos transportadores:

- La mayoría de los HATs son intercambiadores obligatorios con una estequiometría 1:1 (Chillarón et al., 2001). Se ha propuesto para $b^{0,+}AT$ un modelo secuencial de intercambio (Torras-Llort et al., 2001). Esto implica la existencia de un complejo ternario.
- Las subunidades ligeras parecen ser suficiente para la actividad de transporte, como se ha demostrado para $b^{0,+}AT$ (Reig et al., 2002).
- Usando xCT como modelo de las LSHATs, se ha confirmado la topología de membrana con 12 segmentos TM y se ha encontrado un bucle reentrante entre los segmentos TM II y III (Gasol et al., 2004).

Otros estudios están basados fundamentalmente en el análisis de mutaciones causantes de LPI, en y^+LAT-1 , y causantes de cistinuria, en $b^{0,+}AT$. De las 7 mutaciones *missense* de LPI descritas (Torrents et al., 1999; Palacín et al., 2000), dos de ellas han sido analizadas funcionalmente en oocitos de *X. laevis*: G54V (TM I) y L334R (bucle intracelular 8-9). Ambas llegan a la membrana de los oocitos inyectados con su cRNA, pero no inducen actividad de transporte (Mykkanen et al., 2000). El mismo efecto se ha observado en dos líneas celulares humanas diferentes (Tavoularis et al., 2003). Estas dos mutaciones, por tanto, inactivan la función del transportador y^+LAT-1 .

En cuanto a las 22 mutaciones de un sólo aminoácido descritas de cistinuria, 17 de ellas implican residuos localizados en segmentos TM y el resto, en bucles intracelulares de $b^{0,+}AT$ (Chillarón et al., 2001). Ninguna de las mutaciones se encuentra en un bucle extracelular. Lo mismo ocurre con las mutaciones *missense* de LPI mencionadas anteriormente. Esta asimetría ha sido interpretada en PotE, como la base estructural para proporcionar una respuesta rápida del transportador a cualquier cambio en las concentraciones celulares de los sustratos (Kashiwagi et al., 2000).

De las mutaciones *missense* descritas en $b^{0,+}AT$, 6 han sido analizadas funcionalmente en células HeLa en coexpresión con rBAT (Font et al., 2001). Los efectos sobre la inducción de transporte varían según la mutación, de una caída total de la actividad: G105R (bucle 2-3),

V170M (bucle 4-5), R333W (bucle 8-9) y A354T (TM IX), a caídas parciales >50%: A70V (TM II), A182T (TM V). La Dra. P. Bartoccioni en su Tesis doctoral demostró que las mutaciones V170M, R333W y A354T, que causan cistinuria de tipo no I, presentan defecto de biogénesis, al menos hasta su tránsito al complejo de Golgi unidos a rBAT. La mutación G105R (fenotipo no I) es un mutante de tráfico: se degrada con una vida media de ~ 90 minutos impidiendo su unión significativa a rBAT. La mutación A182T, que causa cistinuria de tipo I (60% de los alelos) y tiene un leve defecto de transporte (~ 65% respecto a b^{0,+}AT salvaje), presenta un defecto leve en el ensamblaje con rBAT. Esto puede explicar el transporte defectivo en células HeLa y el fenotipo I de algunos heterocigotos. *In vivo*, este defecto podría ser amplificado en algunos individuos (heterocigotos de tipo no I), debido a variaciones significativas de su entorno genético y metabólico, sugiriendo la existencia de *loci* modificadores de cistinuria. El análisis de las excreciones urinarias de cistina y los aminoácidos dibásicos arginina, lisina y ornitina en heterocigotos portadores de estas mutaciones revela que su severidad es mutación-específica (Font et al., 2001). Es decir, los heterocigotos portadores de mutaciones que anulan la actividad del sistema b^{0,+} presentan niveles de hiperexcreción altos (8-18 veces por encima de los individuos control), mientras los heterocigotos portadores de mutaciones que provocan caídas parciales de la actividad del sistema b^{0,+} están asociadas a fenotipos leves (5 veces por encima de los controles).

Si esta correlación se extiende a mutaciones menos comunes, se pueden extraer algunas conclusiones (Font et al., 2001):

- Las mutaciones de b^{0,+}AT y y⁺LAT-1 que afectan a residuos conservados dentro de la familia de las LSHATs, resultan en defectos severos en el transporte de aminoácidos o en fenotipos de excreción urinaria severos en los heterocigotos. Por el contrario, mutaciones en residuos no conservados están asociados con fenotipos leves.
- Cuatro mutaciones asociadas a fenotipos severos descritas en b^{0,+}AT o y⁺LAT-1 se encuentran en segmentos TM y corresponden a aminoácidos con cadenas laterales pequeñas (glicina, alanina o serina) en todos los miembros LSHAT; mientras otras mutaciones también situadas en segmentos TM pero con aminoácidos de cadenas laterales de tamaño variable, están asociadas a fenotipos leves.

También se ha señalado la relevancia del tamaño pequeño en las cadenas laterales (glicina, alanina o serina) en las regiones de contacto entre hélices α . Residuos altamente conservados con cadenas laterales pequeñas (glicina o alanina) están presentes en las zonas de contacto de las hélices α de los segmentos TM de la aquaporina AQP-1 (Murata et al., 2000). Además, se ha descrito el motivo GlyXXXGly (donde X corresponde a cualquier residuo y Gly puede sustituirse por Ser) como dominio de asociación entre hélices α TM (Russ et al., 2000). En este sentido, las hélices III y VI de la proteína AQP-1 contienen este motivo (donde Gly puede sustituirse por Ala). De forma similar, se han encontrado motivos SmXXXSm (donde Sm corresponde a residuos de cadena lateral pequeña, ya sea Gly, Ala o Ser) en los

segmentos TM I, VI, VII y VIII de los miembros de la familia LAT (Chillarón et al., 2001). Las mutaciones G259R en $b^{0,+}AT$ y G54V en y^+LAT-1 implican estos motivos SmXXXSm de asociación hélice-hélice en los segmentos TM VII y I, respectivamente. La mutación G259R está asociada a un fenotipo urinario severo en heterocigotos. La mutación G54V está asociada a un fenotipo de dramática pérdida de actividad (Mykkanen et al., 2000; Fenczik et al., 2001). Esto sugiere que los residuos con cadenas laterales pequeñas, que están conservados en los segmentos TM de los transportadores LSHATs, pueden estar implicados en las asociaciones hélice-hélice.

Se han identificado dos residuos críticos en xCT, H110 y C327, que se encuentran cerca del lugar de paso o de unión al sustrato (Gasol et al., 2004; Jiménez-Vidal et al., 2004). El residuo H110 se encuentra en el ápice externo del bucle reentrante, mientras C327 se encuentra en el segmento TM VIII. Ambos residuos muestran accesibilidad exterior y mutados a cisteína son dianas de reactivos sulfhidrilos que inactivan el transporte. La inactivación se protege por los sustratos de xCT con una EC_{50} similar a la K_M y de forma temperatura-independiente, sugiriendo que no depende de grandes cambios conformacionales provocados por el sustrato (Gasol et al., 2004; Jiménez-Vidal et al., 2004).

3.1.3. Estructura cuaternaria del complejo heteromérico.

Con la información estructural que se tiene hasta ahora de cristales bidimensionales (2D) de proteínas de membrana, se pueden considerar dos estados de oligomerización:

- El estado oligomérico primario se define como el número de monómeros que se requieren para formar un lugar de unión de sustrato y vía de translocación de sustrato a través de la membrana, pero no tiene porque ser la unidad funcional *in vivo*.
- El estado oligomérico secundario se define como el orden oligomérico que se encuentra *in vivo*, que podría implicar una mayor oligomerización tanto por razones de estabilidad o porque es un requerimiento obligatorio para la función.

La importancia de estas distinciones del estado oligomérico se ve apoyada por evidencias que sugieren que muchos transportadores, de los cuales el primer estado oligomérico es un monómero, funcionan como transportadores activos únicamente cuando han formado dímeros o tetrámeros en la membrana (Zottola et al., 1995; Schroers et al., 1998; Veenhoff et al., 2001; Gerchman et al., 2001).

El hecho que $b^{0,+}AT$ presente un mecanismo secuencial (Torras-Llort et al., 2001; Reig et al., 2002) sugirió que la unidad funcional de rBAT- $b^{0,+}AT$ podría ser un dímero de heterodímeros (rBAT- $b^{0,+}AT$)₂. Recientemente, se ha confirmado que el estado de oligomerización del complejo rBAT- $b^{0,+}AT$ *in vivo* es, como mínimo, un heterotetrámero, es decir, un dímero de heterodímeros (rBAT- $b^{0,+}AT$)₂ (Fernandez et al., 2006):

- Mediante la técnica de electroforesis en gel nativo (BN-PAGE) se detecta un complejo estable de ~550 kDa del que $b^{0,+}$ AT forma parte.
- El tratamiento con dodecilsulfato de Na^+ (SDS) y ditioneitol (DTT) es capaz de disgregar el supercomplejo de ~550 kDa en un complejo de ~250 kDa. Este complejo de ~250 kDa es resistente a urea, lo que indica un carácter de alta estabilidad para este complejo. Además, la estabilidad de este complejo no depende de la presencia del puente disulfuro, ya que en ausencia de SDS no es posible disociar las subunidades con DTT.
- El heterotetrámero es la estructura mayoritaria *in vivo* según los estudios de entrecruzamiento químico.
- Si tenemos en cuenta que las proteínas politépicas de membrana tienen una movilidad en BN-PAGE que les proporciona un tamaño que es 1.8 veces mayor (Heuberger et al., 2002), este complejo de ~250 kDa correspondería a un complejo de ~140 kDa, que es un tamaño molecular similar al observado para rBAT- $b^{0,+}$ AT cuando se resuelve en SDS-PAGE.

En contraste con los resultados obtenidos para el complejo rBAT- $b^{0,+}$ AT, los resultados del trabajo sugieren que los heterodímeros 4F2hc-LAT-2 y 4F2hc-xCT no forman oligómeros, o que si los forman no son tan estables como los heterotetrámeros de rBAT- $b^{0,+}$ AT (Fernandez et al., 2006). Además, la sustitución de la subunidad pesada 4F2hc por rBAT es suficiente para formar la estructura heterotetramérica (rBAT-xCT)₂, sugiriendo que la subunidad pesada es la responsable de que el transportador adquiera esta estructura (Fernandez et al., 2006). La expresión de concatenámeros de 2 subunidades ligeras (que difieren sólo por su sensibilidad a la inactivación por un agente sulfhidrilo) indica que un sólo heterodímero es la unidad funcional de los sistemas $b^{0,+}$ y x_c^- (Fernandez et al., 2006). Luego si se confirmara la existencia de dos vías de paso del sustrato, éstas deberían ocurrir en una única subunidad ligera.

3.2. Relaciones de estructura-función en otros miembros de la superfamilia APC.

La mayor parte de los trabajos publicados sobre relaciones estructurales de los miembros de la superfamilia APC han sido realizados en transportadores bacterianos, fundamentalmente de *E. coli*. A la espera de una mayor información 3D aportada por técnicas de cristalización, estos estudios ofrecen resultados en la determinación de la topología y la búsqueda de residuos clave implicados en la función de los transportadores de la familia.

Los modelos de predicción de estructura en 12 segmentos TM, con extremos N y C-terminal intracelulares, han sido comprobados experimentalmente mediante SCAM en xCT humano (Gasol et al., 2004), y siguiendo la estrategia de fusión con actividades enzimáticas, para los transportadores bacterianos LysP (Ellis et al., 1995), PheP (Pi et al., 1996), AroP (Cosgriff et al., 1997), PotE (Kashiwagi et al., 1997) y GabP (Hu et al., 1998c). En ellos también se mantiene la longitud relativa de los diferentes bucles, siendo especialmente cortos los bucles extracelulares 1-2, 9-10 y 11-12, y el intracelular 10-11. El resto de bucles parecen tener

tamaños más variables y seguramente son característicos de cada familia. En cualquier caso, los bucles extracelulares parecen tener una medida media más corta que los intracelulares.

Dado que los transportadores pertenecientes a una misma familia presentan perfiles de hidrofobicidad similares, sus estructuras secundarias y topologías también se esperan similares. Con ayuda de los resultados experimentales obtenidos hasta el momento y el alineamiento de los miembros de la superfamilia APC descritos, se puede llegar a un “modelo consenso” de topología para toda la superfamilia (Hu et al., 1998c). En este modelo, además de los datos experimentales y de homología, se aplican dos limitaciones:

- Se minimiza el número de residuos cargados embebidos en los dominios TM.
- Los espacios (*gaps*) en los alineamientos múltiples se relegan a zonas correspondientes a bucles, basándose en la teoría de que “inserciones” a lo largo de la evolución en las estructuras secundarias (p.e. hélices TM) son menos toleradas que inserciones en los bucles conectivos (Buhr et al., 1993). Apoyan esta idea estudios realizados con LacY (Manoil et al., 1997) y la observación que los transportadores eucariotas de la superfamilia APC son sustancialmente más largos que sus homólogos bacterianos, presentando esta longitud *extra* en las zonas “inserción-tolerantes” de los bucles hidrofílicos (Hu et al., 1998c).

En resumen, tanto los perfiles de hidrofobicidad como los tamaños de los bucles parecen servir de “marca” característica de los miembros de la superfamilia APC (Jack et al., 2000).

Las organizaciones topológicas presentadas para PheP (Pi et al., 1996) y AroP (Cosgriff et al., 1997) presentan una región de controversia entre los dominios TM IV y V. Mientras la topología de PheP maximiza las cargas consignadas al bucle citoplasmático 4-5, como mantiene el modelo “consenso”, la topología de AroP, más reciente, minimiza la longitud del bucle 4-5 y embebe en el segmento TM V a tres residuos cargados (E151, E153, K160), altamente conservados entre los miembros bacterianos y de levadura de la familia (Pi et al., 1993; Reizer et al., 1993). La inserción de residuos cargados en un entorno hidrofóbico es energéticamente desfavorable, sugiriendo una implicación en la función del transportador o en su estructura (Kaback, 1996). Se ha demostrado experimentalmente la relevancia funcional de estos residuos en AroP (Cosgriff et al., 1997): la sustitución individual de cada residuo por un aminoácido neutro como la alanina, anula la actividad del transportador.

Se reconoce de forma creciente, en cambio, que las regiones correspondientes a los bucles pueden contener importantes determinantes de las características cinéticas de los transportadores y de las propiedades de los lugares de reconocimiento y unión al sustrato, particularmente en los transportadores de GABA (Tamura et al., 1995; Hu et al., 1998a) y en otros miembros de la superfamilia APC (Closs et al., 1993; Closs et al., 1997). En este contexto, se han identificado tres residuos de glutamato funcionalmente claves en el transportador bacteriano PotE (Kashiwagi et al., 1997). Estos residuos, localizados en el lado citosólico de la membrana, son E77 (bucle 2-3), E207 (bucle 6-7) y E433 (extremo C-terminal),

al ser mutados individualmente a otros aminoácidos (Ala, Asp, Asn, Gln), disminuyen significativamente tanto la captación como el eflujo de putrescina (Kashiwagi et al., 1997). En un trabajo posterior, los autores identifican otros residuos implicados en la función de PotE. Los residuos C62 (bucle 2-3), W201 (TM VI), W292 (TM VIII) y Y425 (TM XII) están fuertemente implicados tanto en la entrada como en la salida de sustrato. Los residuos Y92 (TM III), C210 (bucle 6-7) y C285 y C286 (TM VIII) están implicados en menor medida. Las mutaciones de los residuos Y78 (bucle 2-3), Y90 (TM III) y W422 (TM XII) afectan principalmente a la actividad de entrada. Además estas mutaciones aumentan fuertemente los valores de la K_M , indicando que estos aminoácidos están involucrados en la entrada de sustrato. Las mutaciones en los residuos K301 y Y308 (bucle 8-9) afectan principalmente a la actividad de intercambio. La salida de sustrato a través de esos mutantes no es transestimulable por sustrato, indicando que esos aminoácidos están involucrados en el reconocimiento de sustrato. Con estos datos proponen un modelo de lugar de reconocimiento de la putrescina que implica la interacción de estos residuos con el sustrato (Kashiwagi et al., 2000; Figura 8).

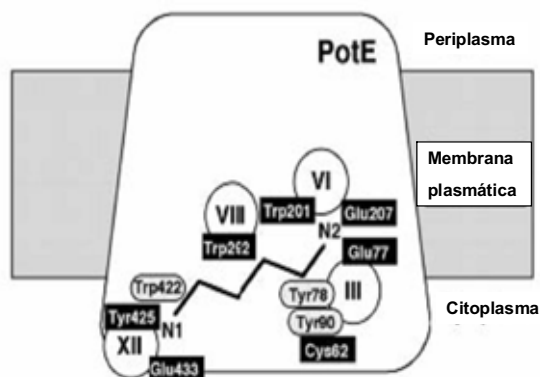


Figura 8. Modelo del lugar de unión de sustrato en PotE extraído de Kashiwagi et al., 2000. Los residuos mostrados en rectángulos están involucrados en la entrada y en la salida de putrescina. Los residuos mostrados en elipses están involucrados en la entrada de alta afinidad de putrescina.

Un primer análisis de mutaciones de residuos ácidos expuestos al espacio extracelular mostró que ninguno de ellos era esencial para la actividad de transporte (Kashiwagi et al., 1997; Kashiwagi et al., 2000). De hecho, los bucles extracelulares de PotE, característica común a la mayoría de los miembros de la superfamilia APC (Jack et al., 2000), son relativamente cortos a excepción del bucle 7-8. Este bucle comprende aproximadamente 32 aminoácidos y está altamente conservado entre las especies bacterianas, aunque su función es desconocida. Por su tamaño, se hipotetizó que podría estar implicado en la interacción con componentes periplásmicos o incluso con sustratos potenciales. Dos residuos de glutamato, E253 y E272, localizados en este bucle, no resultaron esenciales para la actividad del transportador (Kashiwagi et al., 1997). Estudios posteriores de deleciones y mutagénesis han demostrado que esta zona es necesaria para la captación de putrescina por parte de PotE (Minchin et al., 2004). Además, en este bucle, se han identificado dos residuos,

V249 y L254, esenciales para la función de transporte y altamente conservados en homólogos bacterianos. El residuo V249 se localiza en una región hidrofóbica en la perimembrana del segmento TM VII, cerca o en la superficie de la bicapa lipídica, y existe una buena correlación entre la hidrofobicidad del aminoácido introducido en esta posición y la constante de primer orden ($V_{\text{máx}}/K_M$) para la captación de putrescina (Minchin et al., 2004). Las K_M , a excepción de V249D, son similares al transportador salvaje, atribuyéndole más un papel en la configuración estructural de la proteína que en la unión al sustrato. El residuo L254 se encuentra en una región hidrofílica del bucle 7-8, y su sustitución provoca una caída del 60% en la captación de putrescina. El hecho que en el centro de este bucle exista una segunda zona hidrofóbica que se predice como hélice α , hace sugerir que parte del bucle no esté expuesto al ambiente acuoso y constituya un bucle reentrante implicado en el movimiento del sustrato a través del transportador (Minchin et al., 2004).

Recientemente se han encontrado residuos relevantes en CadB, un intercambiador de cadaverina-lisina. Los residuos Y73, Y89 y Y90 (bucle 2-3), E204 (bucle 6-7), Y235 (TM VII), D303 (bucle 8-9) y Y423 (TM XII) están fuertemente involucrados tanto en la entrada como en la salida de sustrato, mientras que los residuos Y55 (TM II), E76 (bucle 2-3), Y246 (bucle 7-8), Y310 (bucle 8-9), C370 (TM X) y E377 (bucle X-XI) lo están en menor medida (Soksawatmaekhin et al., 2006). Las mutaciones de los residuos W41 (TM II), Y174 (bucle 5-6), D185 (TM VI) y E408 (bucle XI-XII) tienen efectos débiles en la entrada. La disminución en la actividad de los mutantes se refleja en un aumento del valor de la K_M . La mutación del residuo R299 (bucle 8-9) afecta principalmente a la salida, sugiriendo que está relacionado con el reconocimiento del grupo carboxilo de la lisina. Estos resultados indican que los residuos involucrados tanto en la entrada como en la salida, o únicamente en la salida, están localizados principalmente en los bucles citoplasmáticos y en la parte citoplasmática de los segmentos TM. Por el contrario, los residuos involucrados en la entrada están localizados en bucles periplasmáticos y en los segmentos TM. El grupo tiol de la C370 parece importante tanto para la entrada como para la salida, pudiendo ser importante para el reconocimiento del grupo amino de la cadaverina, junto con la C397 (TM XI). Los resultados sugieren que una cavidad hidrofílica se forma por los segmentos TM II, III, VI, VII, X, XI y XII (Soksawatmaekhin et al., 2006).

Los datos de CadB contrastan con los de PotE, donde los residuos involucrados únicamente en la entrada están también localizados en los bucles citoplasmáticos y en el lado citoplasmático de los segmentos TM (Kashiwagi et al., 2000). El cambio conformacional de CadB durante la entrada y la salida de cadaverina debe ser mayor que el de PotE durante la entrada y salida de putrescina. Además, comparado con el reconocimiento de putrescina por PotE (Kashiwagi et al., 2000), muchos aminoácidos están involucrados en el reconocimiento de cadaverina por CadB (Soksawatmaekhin et al., 2006). El hecho de que la parte hidrofóbica que separa los dos grupos amino, sea mayor en la cadaverina que en la putrescina, haría

necesarios más aminoácidos aromáticos (especialmente tirosinas) para reconocer la cadaverina (Soksawatmaekhin et al., 2006).

En concordancia con los estudios realizados en PotE (Kashiwagi et al., 2000) y en CadB (Soksawatmaekhin et al., 2006), un trabajo realizado en PrnB de *A. nidans* (Tavoularis et al., 2003) identifica residuos relevantes en las mismas zonas: I119 y G120 (bucle 2-3), K245 y F248 (TM VI) y F278 (bucle 6-7). Los residuos K245 y F248 parecen estar directamente relacionados con la función del transportador y/o la unión al sustrato (Tavoularis et al., 2003,) y son críticos para el transporte de prolina (Kafasla et al., 2007). Por el contrario, ninguna de las cisteínas endógenas de PrnB, C54 (TM I), C353 (bucle 8-9) y C530 (extremo C-terminal), es necesaria para el mecanismo de transporte.

Una zona relevante en los transportadores de la superfamilia APC es la hélice VIII y el bucle citoplasmático contiguo (bucle 8-9) (figura 9). Esta zona contiene el CAR (Región Antipática Consenso), un dominio potencial de formación de un canal evolutivamente conservado en una multitud de transportadores, que incluye a los numerosos homólogos de GabP de la superfamilia APC (Hu et al., 1998a; figura 9a) y los transportadores de aminoácidos catiónicos de ratón (MCAT) (Closs et al., 1993; figura 9b). Se ha sugerido que el CAR podría estar implicado en la translocación del sustrato, debido a que contiene elementos (la cisteína firma de GabP) que afectan a la velocidad de los cambios conformacionales asociados a dicha translocación (Hu et al., 1998b). Dentro del CAR, se define la zona SPS (superficie polar sensible) (Hu et al., 1998c), que consiste en una serie de residuos polares distribuidos cada 3-4 residuos formando una cara en la hélice α durante 20 aminoácidos (exactamente el número necesario para atravesar la membrana), que se cree es un dominio potencial de formación de un canal evolutivamente conservado en varias familias de la superfamilia APC (Reizer et al., 1993; Sophianopoulou et al., 1995). Se ha demostrado que la mutación de residuos en la zona SPS es altamente deletérea para la función del transportador de GABA GabP. Dado que los segmentos anfipáticos parecen capaces de hacer movimientos transitorios dentro y fuera de la membrana (Slatin et al., 1994; Qiu et al., 1994), la zona del CAR podría aportar la base para un mecanismo de catálisis de "barrera móvil" (Henderson, 1991). Los estudios en GabP sitúan topológicamente la cisteína firma en el dominio TM VIII (Hu et al., 1998b) y la zona SPS en el espacio citosólico. Un trabajo más reciente identifica la C300 (TM VIII), la cisteína firma de GabP de *E. coli*, como la diana de inactivación del transportador por modificación con reactivos de cisteínas (Hu et al., 1999). La reactividad del residuo ante estos agentes depende de su estructura: reactivos cargados o voluminosos, que no se parecen a los sustratos transportados, no producen modificaciones en el transportador (Hu et al., 1999). Esta observación es consistente con la idea que el acceso a este residuo funcionalmente relevante requiere solutos que pasen a través de un espacio que imparte selectividad estructural parecida a un poro.

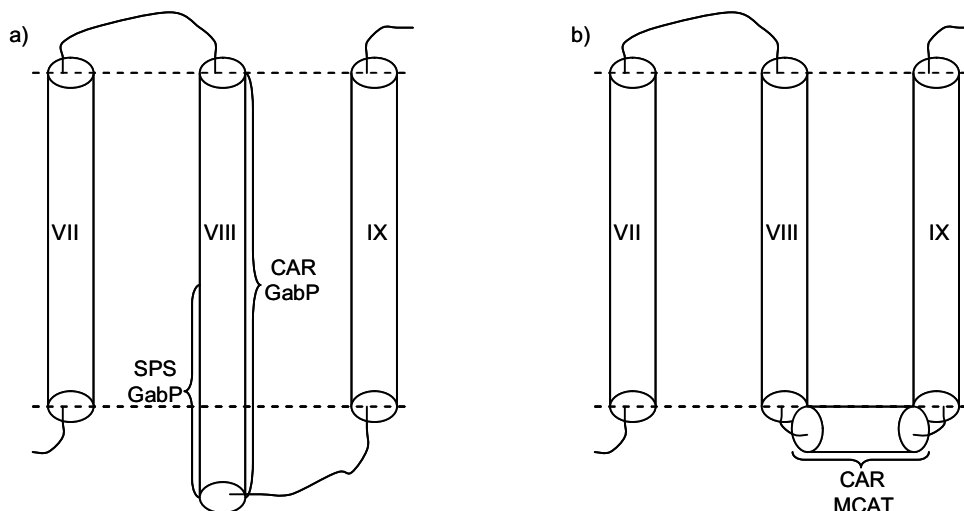


Figura 9. Esquema de los CAR de GabP y las proteínas MCAT. a) Esquema de la situación del CAR y el SPS en GabP. En GabP y otros miembros procaríotas de la familia APC se ha propuesto que el CAR comprende el segmento TM VIII y el inicio del bucle 8-9. La SPS se extiende desde la mitad del TM VIII hasta el final del CAR. b) Esquema del CAR en las proteínas MCAT. En estos casos se ha propuesto que el CAR comprende el bucle 8-9.

De hecho, la primera evidencia de que el CAR podía ser importante proviene de los “intercambios de dominios” entre proteínas MCAT con características cinéticas diferenciables, que son miembros de la superfamilia APC. Estos experimentos mostraban que las propiedades de transporte de las MCAT venían conferidas por un casete en el bucle 8-9 y no por diferencias sustanciales en el resto de la proteína (Closs et al., 1993). Curiosamente, secuencias similares a este casete presente en el bucle 8-9 de las MCAT de mamífero se encontraron superpuestas en el final del segmento TM VIII y la siguiente región hidrofílica en todas las permeasas de bacteria y hongo de la superfamilia APC (Sophianopoulou et al., 1995). Esta región coincide físicamente con la funcionalmente importante SPS descrita para GabP (Hu et al., 1998a). Que la homología de secuencia se superponga exactamente a la funcionalidad sugiere una potencial relación mecánica entre el casete totalmente citoplasmático de MCAT (bucle 8-9) y la parcialmente citoplasmática SPS.

Aparte de los estudios en transportadores bacterianos, también han aparecido algunas publicaciones sobre miembros de levaduras de la superfamilia APC (Gilstring et al., 2000; Regenberget al., 2001; Kim et al., 2003). El modelo de topología presentado anteriormente por los miembros bacterianos de la familia ha sido confirmado por el método de N-glicosilación para la permeasa Gap1p de *S. cerevisiae* (Gilstring et al., 2000). Se han seleccionado mutantes en Gap1p y en su homólogo Can1p que alteran la selectividad de sustrato (Regenberget al., 2001). Los autores localizan mutaciones distribuidas en seis regiones correspondientes a dominios TM, regiones citoplasmáticas y bucles externos. Es interesante resaltar tres residuos altamente conservados entre diferentes miembros de la superfamilia APC

y que se han relacionado con el reconocimiento de la arginina como sustrato (Regenberg et al., 2001):

- Ser152, localizada en el bucle intracelular 2-3, y conservada entre los transportadores.
- P313, también localizado en un bucle intracelular 6-7 (Reizer et al., 1993), aunque su sustitución en el transportador PheP provocó efectos modestos (Pi et al., 1998).
- E367, localizado en el bucle extracelular 7-8. Este bucle parece ser un buen candidato para el reconocimiento de varias cadenas laterales de sustratos de diferentes miembros de la superfamilia APC por su variabilidad de secuencias y tamaños (Regenberg et al., 2001).

El dominio TM III se ha propuesto por el grupo de Pittard (Cosgriff et al., 1997) como implicado en el reconocimiento de sustrato de forma general en la superfamilia APC a raíz de sus estudios de quimeras entre AroP y PheP. Estos estudios han permitido identificar una pequeña región del segmento TM III de AroP que puede conferir a una proteína predominantemente PheP la habilidad de transportar Trp (Cosgriff et al., 2000). En este segmento se ha encontrado un residuo clave para el transporte de triptófano, Y103 de AroP (en PheP este residuo corresponde a una Phe). Los residuos A107 y V114, también en el segmento TM III, son importantes para AroP, ya que su mutación causa la pérdida de función en las quimeras. Estos residuos corresponden a una Gly y una Ala en PheP y flanquean un residuo de Glu altamente conservado en la posición 110. En apoyo a esta idea, los residuos T173 de Can1p y W239 de Gnp1p alteran la especificidad del transportador al ser sustituidos (Regenberg et al., 2001). Mutaciones que afectan a segmentos TM e influyen en la preferencia de sustratos ya han sido descritas anteriormente en otros transportadores: LacY de *E. coli* (Varela et al., 1997; Venkatesan et al., 1998), los transportadores de purinas UapA y UapC de *A. nidulans* (Diallinas et al., 1998) y los transportadores de hexosas de Ga12 y Hxt2 de *S. cerevisiae* (Kasahara et al., 1996).

En resumen, se encuentran residuos importantes en localizaciones citosólicas, extracelulares e incluso en dominios TM. Seguramente, algunas de estas mutaciones afectan al reconocimiento de sustrato de forma indirecta, aunque es probable que residuos a ambos lados de la membrana entren en contacto con el sustrato en los diferentes pasos del proceso de transporte. Las zonas más relevantes parecen estar situadas en los bucles 2-3, 6-7, 7-8 y 8-9 y los segmentos TM III, VI y VIII.

ANTECEDENTES

Para conseguir cristalizar una proteína hacen falta grandes cantidades de esa proteína con un elevado grado de pureza. Debido a las dificultades y el elevado coste de purificar las LSHAT humanas a partir de cultivos de HeLa y a la falta de actividad de $b^{0,+}AT$ producido en *Pichia pastoris* (ver Anexo 2), en septiembre de 2003 la Dra. N. Reig realizó una búsqueda usando el algoritmo BLAST con todas las LSHAT humanas conocidas contra las bases de datos no redundantes de secuencias de proteínas (*non-redundant GenBank CDS translations + RefSeq Proteins + PDB + SwissProt + PIR + PRF*) con el fin de identificar posibles candidatos procariotas de la familia LAT. Aparecieron únicamente cinco secuencias, dos de *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) (*ykbA* e *yfnA*) y tres de *E. coli* (*yhfM*, *yjdE* y *PotE*). No se conocía la función de las proteínas codificadas por estas secuencias, excepto en el caso de *PotE*. *PotE* estaba descrito como intercambiador de putrescina y ornitina (Kashiwagi et al., 1992; Kashiwagi et al., 1997) y estaba asignado a la familia APA, familia perteneciente a la superfamilia APC como las LSHATs (Jack et al., 2000; Lorca et al., 2003). El resto eran simplemente proteínas hipotéticas que estaban también clasificadas en la familia APA, a excepción de *yfnA* que estaba agrupada en la familia CAT, también perteneciente a la superfamilia APC. Hoy se sabe que *yjdE* corresponde a *AdiC* (*arginine/agmatine exchanger*).

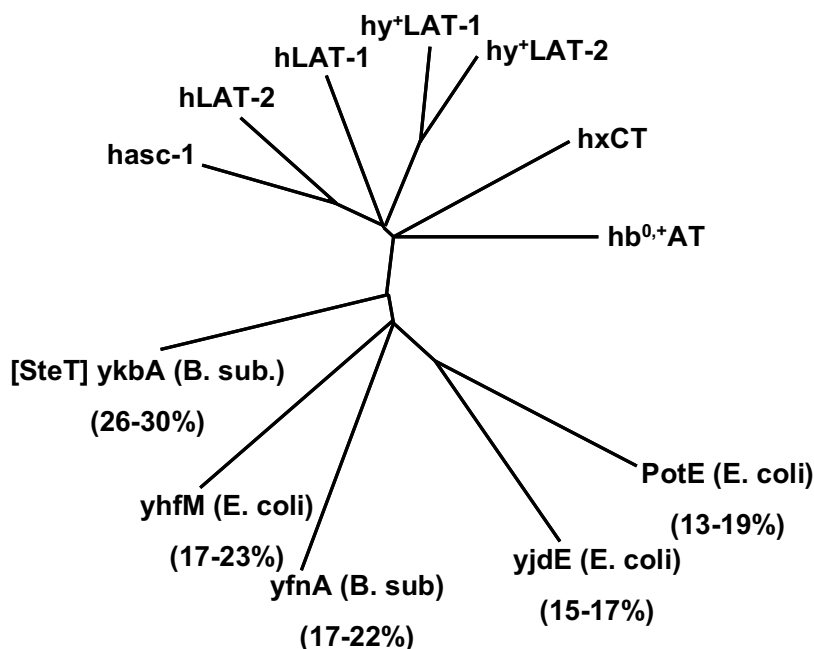


Figura 10. Relaciones filogenéticas de las LSHAT humanas con los procariotas con más identidad de secuencia encontrados por la Dra. N. Reig mediante una búsqueda por BLAST (realizada el 29-9-2003). Entre paréntesis se muestra el organismo del que proceden así como el rango de identidad de secuencia entre dicha proteína y las LSHAT humanas.

Para el estudio de la relación filogenética de estos candidatos con la familia LAT, se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias de dichas proteínas para ver cuales poseían una mayor identidad de secuencia y un clustalW para obtener un árbol filogenético que reflejara

Antecedentes

cuáles poseían una mayor proximidad con las LSHAT humanas (figura 10). ykbA, que será renombrada a partir de aquí SteT debido a su función de transporte que veremos más adelante, se mostró claramente como la más cercana a la familia LAT, siendo además con diferencia la que más identidad de secuencia presentaba, entre un 26 y un 30% con la mayoría de las LSHAT humanas y en torno al 20% con AGT-1 y asc-2 (tabla 4). Además esta identidad de secuencia está repartida por toda la proteína, con lo que sería un buen modelo para permitir resolver la estructura de las LSHAT humanas a partir de la de SteT.

	SteT	b⁰+AT	xCT	LAT-1	LAT-2	y⁺LAT-1	y⁺LAT-2	asc-1	AGT-1
b⁰+AT	26								
xCT	29	42							
LAT-1	28	43	45						
LAT-2	30	39	41	51					
y⁺LAT-1	28	42	42	45	46				
y⁺LAT-2	29	41	42	45	45	70			
asc-1	30	39	39	45	63	42	43		
AGT-1	20	31	30	29	23	30	31	28	
M_{masc}-2	18	29	26	27	23	26	25	24	23

Tabla 4. Porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos entre SteT y las principales LSHATs. En negrita se resaltan las identidades de SteT superiores a un 25%.

Actualmente hay muchos genomas completamente secuenciados que nos permiten realizar estudios mucho más completos para poder determinar con una mayor seguridad si SteT forma parte de la familia LAT. En enero de 2007 el Dr. D. Torrents (Barcelona Supercomputing Center) realizó una comparación por BLAST de SteT con todos los demás miembros de la superfamilia APC. SteT claramente estaba presente en la familia LAT antes que con cualquier otro transportador (incluido PotE). El Dr. D. Torrents realizó un nuevo análisis filogenético usando una colección restringida de subfamilias cercanas a la APC que permitió el uso de algoritmos de alineamiento más precisos como ProbCons (Do et al., 2005) y una posterior examinación y verificación manual de los resultados que proporcionó una clasificación filogenética más consistente (Reig et al., 2007). Las comparaciones de secuencia y el árbol filogenético construido indicaron que SteT muy probablemente pertenecía a la familia LAT. El Dr. M. Saier ha incluido recientemente a SteT como el primer miembro procariota de la familia LAT (Web 1).

La Dra. N. Reig clonó las cinco secuencias procariotas iniciales en el vector de expresión pTTQ18 (cedido por el Dr. S. Baldwin, U. de Leeds), inducible por IPTG y añadió una cola de 6 His en el N-terminal o en el C-terminal para su posterior purificación.

La expresión en *E. coli* BL21 la realizó inicialmente en medio LB a 37 °C. Se indujo con 0.5 mM IPTG cuando la densidad celular del cultivo alcanzó una OD₆₀₀ ~ 0.5 y después de 4

horas de inducción se analizó el nivel de expresión mediante *Coomassie Brilliant Blue* o con la sonda HisProbe-HRP (Pierce) (figura 11):

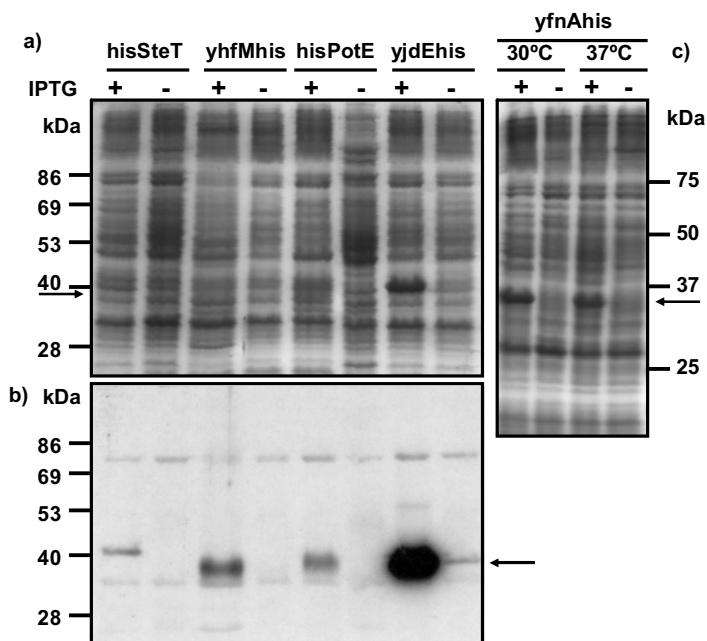


Figura 11. a) *Coomassie Brilliant Blue* de membranas totales de *E. coli* sobreexpresando los constructos indicados (SteT, yhfM, PotE, yjdE) con una cola de 6 histidinas en el N-terminal (his antes del nombre) o en el C-terminal (his después del nombre) inducidos a 37 °C con 0.5 mM IPTG durante 4h (+) o no inducidos (-). La flecha indica la posición de las bandas de las proteínas expresadas. b) Análisis realizado con la sonda HisProbe-HRP a las mismas membranas totales de a). La flecha indica la posición de las bandas de las proteínas expresadas. Se muestra una gran expresión de yjdE y una menor expresión del resto. c) *Coomassie Brilliant Blue* de membranas totales de *E. coli* sobreexpresando el constructo de yfnA con una cola de 6 histidinas en el C-terminal) inducidos a 30 °C o a 37 °C con 0.5 mM IPTG durante 4h (+) o no inducidos (-). La flecha indica la posición de las bandas de las proteínas expresadas. La expresión de yfnA parece bastante buena tanto a 30 °C como a 37 °C.

A continuación se muestra un resumen de la expresión de estas proteínas (tabla 5):

Resultados iniciales de expresión:
PotEhis: muy buena expresión (20% proteína membrana)
hisPotE: baja expresión
SteThis: baja expresión a 37°C pero alta a 30°C
hisSteT: baja expresión
yhfMhis: baja expresión
yjdEhis: muy buena expresión
yfnAhis: buena expresión tanto a 37°C como a 30°C

Tabla 5. Cuadro resumen de la expresión de los homólogos procariotas encontrados por la Dra. N. Reig. La posición de "his" refleja la posición de la cola de histidinas en la proteína.

La expresión de las proteínas con la cola de histidinas en el C-terminal fue muy superior a las que la tenían en el N-terminal. Consecuentemente se continuó optimizando la expresión de SteT y PotE con la cola de histidinas en el C-terminal, induciendo a diferentes temperaturas (30 ó 37 °C) para intentar mejorar su expresión (figura 12):

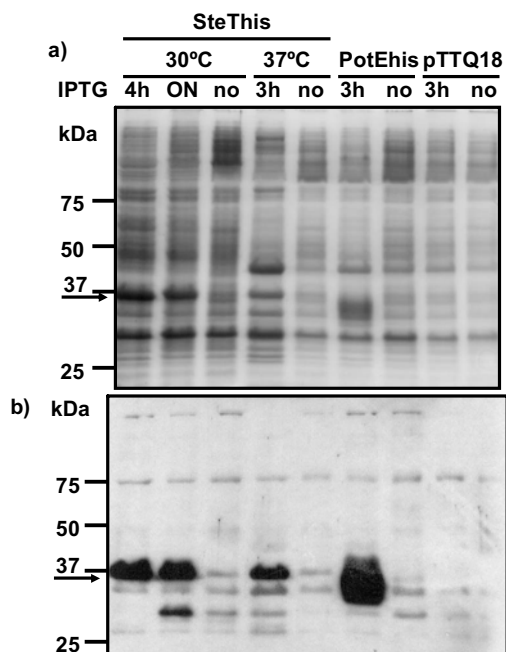


Figura 12. a) *Coomassie Brilliant Blue* de membranas totales de *E. coli* sobreexpresando los constructos indicados (SteT, PotE) con una cola de 6 histidinas en el C-terminal o el vector vacío (pTTQ18) inducidos con 0.5 mM IPTG a la temperatura indicada (en caso de no indicarse es a 37 °C) durante las horas indicadas o no inducido (no). La flecha indica la posición de las bandas de las proteínas expresadas. b) Análisis realizado con la sonda HisProbe-HRP a las mismas membranas totales de a). La flecha indica la posición de las bandas de las proteínas expresadas. Se aprecia una mayor expresión y una menor degradación de SteT a 30 °C respecto 37 °C, especialmente a 4h de inducción, aunque es menor que la expresión de PotE a 3h.

Nos focalizamos en PotE como control positivo de actividad y en SteT como candidato para estudios de función y de estructura por ser la más homóloga a las LSHAT humanas. Las diferentes bandas observadas con la sonda HisProbe-HRP en la expresión de SteT se atribuyen a degradación de la región N-terminal, ya que la sonda reconoce las 6 His que están en el C-terminal, produciendo una disminución de la expresión de SteT en membrana. Por este motivo se escogió 30 °C y 3 horas de inducción como las condiciones idóneas de expresión para SteT. PotE no presentaba esta degradación y se optó por producirlo a 37 °C y 3 horas de inducción.

El siguiente paso fue pasar a las pruebas de solubilidad y purificación de ambas proteínas. Para determinar la concentración mínima suficiente para solubilizar PotE se utilizaron los detergentes DDM, LDAO y OG en un rango de concentraciones entre un 0.5 y un 2% (v/v) (figura 13). La opción escogida fue 0.5% DDM ya que a esta concentración ya se

conseguía solubilizar totalmente PotE, mientras que LDAO sólo solubiliza parcialmente PotE y OG no consigue solubilizar PotE en absoluto.

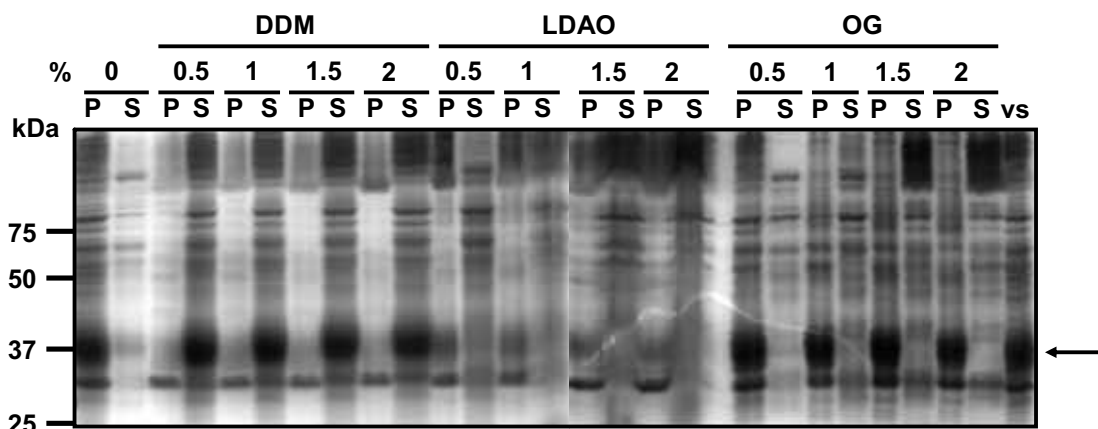


Figura 13. *Coomassie Brilliant Blue* del sobrenadante (S) y el precipitado (P) después de 1 hora de centrifugación a 100000 g y 4 °C de la solubilización con el detergente indicado de las membranas totales de *E. coli* sobreexpresando PotE. La concentración de detergente se muestra en porcentaje. Se observa que sin detergente casi todo PotE está en el precipitado mientras que un 0.5% de DDM ya es suficiente para que casi todo PotE esté en el sobrenadante. El carril vs representa las membranas antes de la solubilización. La flecha señala la altura de la banda correspondiente a PotE.

Para determinar la concentración mínima suficiente para solubilizar SteT se realizaron pruebas con DDM y LDAO en un rango de concentraciones entre un 0.5 y un 2% (v/v) (figura 14). En este caso tanto un 0.5% de DDM como de LDAO conseguían solubilizar totalmente SteT. Finalmente se eligió 0.5% DDM ya que permitía trabajar tanto con PotE como con SteT.

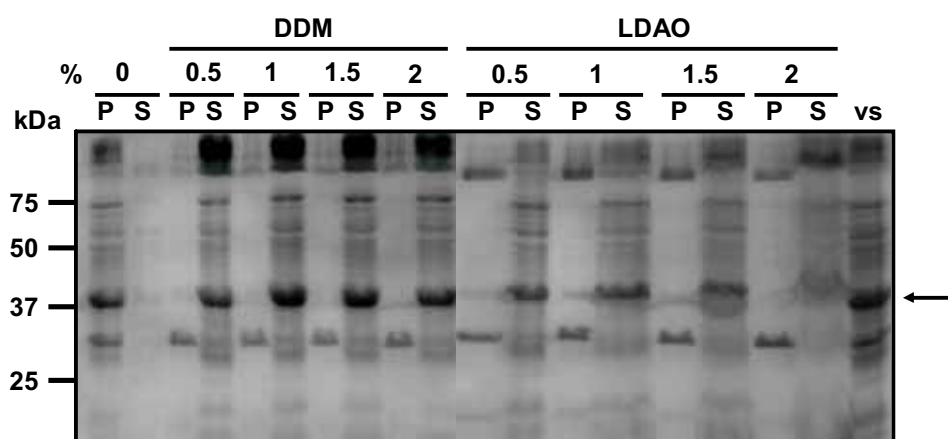


Figura 14. *Coomassie Brilliant Blue* del sobrenadante (S) y el precipitado (P) después de 1 hora de centrifugación a 100000 g y 4 °C de la solubilización con el detergente indicado de las membranas totales de *E. coli* sobreexpresando SteT. La concentración de detergente se muestra en porcentaje. Se observa que sin detergente casi todo SteT está en el precipitado mientras que un 0.5% de DDM o de LDAO ya es suficiente para que casi todo SteT esté en el sobrenadante. El carril vs representa las membranas antes de la solubilización. La flecha señala la altura de la banda correspondiente a SteT.

La Dra. N. Reig optimizó las condiciones de purificación con una columna de afinidad de níquel de SteT con la cola de 6 histidinas en el C-terminal, consiguiendo un rendimiento de 1 mg de SteT con una pureza superior al 86% por cada litro de cultivo de *E. coli*. La proteína purificada se reconstituyó en PLs con una relación proteína:lípido de 1:100 (figura 15) para poder realizar ensayos de transporte. SteT migra como una banda prominente a ~40 kDa (ver carriles 5-7), similar a la del monómero de las LSHAT humanas que poseen un peso molecular de ~50 kDa. Esta diferencia se atribuye a la hidrofobicidad de estas proteínas integrales de membrana.

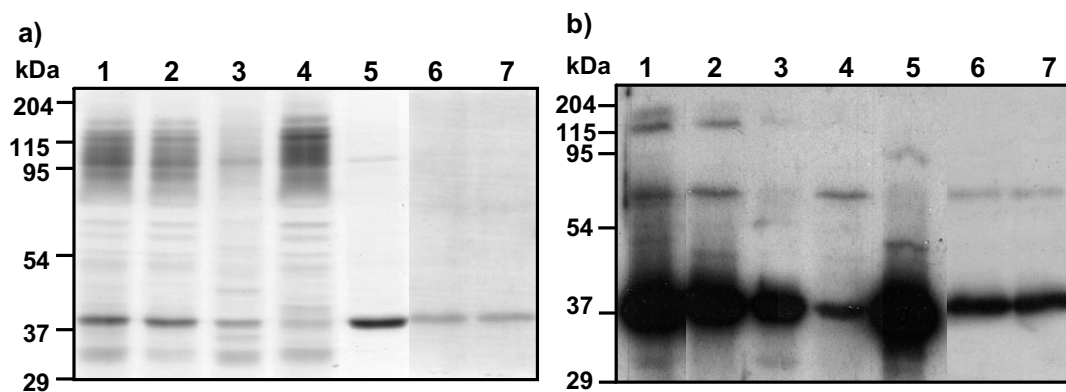


Figura 15. Purificación y reconstitución de SteT en PLs. La purificación de SteT expresado con una cola de 6 histidinas se realizó mediante una cromatografía de afinidad de Níquel. a) SDS-PAGE teñido con *Coomassie Brilliant Blue* correspondiente a la figura 2 del artículo adjunto al final de esta Tesis doctoral y b) análisis realizado con la sonda HisProbe-HRP de los diferentes pasos de purificación: carril 1, Membranas totales de *E. coli* sobreexpresando SteT; carril 2, sobrenadante después de solubilizar con 0.5% DDM y ultracentrifugar; carril 3, precipitado posterior a la ultracentrifugación; carril 4, fracción no unida a la columna de Ni²⁺-NTA; carril 5, elución de la columna. SDS-PAGE de SteT purificado y reconstituido en PLs (relación 1:100 proteína:lípido) con (carril 6) o sin 4 mM L-serina (carril 7). Los geles mostrados fueron teñidos con *Coomassie Brilliant Blue*. Se cargaron por carril: 8 µg (carriles 1-4), 4 µg (carril 5), 2 µg (carriles 6-7). SteT migra como una banda prominente a ~40 kDa (ver carriles 5-7). Estos geles han sido realizados por el autor de esta memoria.

PotE fue purificado y reconstituido con un rendimiento de 3 mg de PotE con una pureza de un 95% por cada litro de cultivo de *E. coli* gracias a su alto nivel de expresión en *E. coli*.

Al inicio de este trabajo SteT era una proteína hipotética de *B. subtilis* de función desconocida. Basándose en la relación filogenética de SteT con las LSHAT humanas la Dra. N. Reig asumió que podía ser un intercambiador de aminoácidos y puso a punto una sencilla metodología de dos pasos para determinar la actividad de transporte de aminoácidos de SteT usando PotE como control positivo de actividad por estudios anteriores en células enteras y vesículas derivadas de las mismas (Kashiwagi et al., 1992; Kashiwagi et al., 1997).

En el primer paso se generaron unos PLs de PotE (PotE-PLs) y de SteT (SteT-PLs) que contenían en su interior una mezcla de 10 L-aminoácidos (Arg, Orn, Gly, Pro, Ala, Leu,

Met, Phe, Tyr, Glu) y se ensayó el transporte con combinaciones de varios aminoácidos radioactivos agrupados por similitudes. Como era de esperar PotE mostró actividad al añadir ornitina y putrescina como sustrato, mientras que SteT poseía actividad al añadir una combinación que contenía L-serina, L-glicina y L-prolina (figura 16a).

Para precisar cuáles de los tres aminoácidos eran sustrato de SteT se repitió el experimento la misma muestra de SteT-PLs pero poniendo únicamente un aminoácido radioactivo cada vez y se comprobó que L-serina era el único de los tres capaz de ser transportado en los SteT-PLs. Finalmente se generaron SteT-PLs que contenían únicamente L-serina en su interior y se vio que SteT poseía una actividad de intercambio de L-serina (figura 16b).

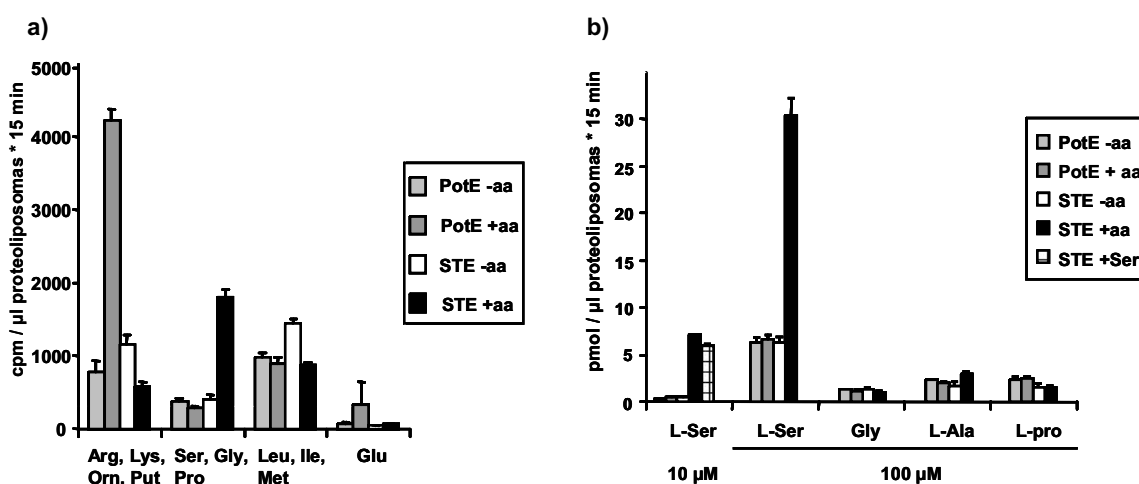


Figura 16. *Screening* de aminoácidos sustrato para la actividad de transporte de SteT correspondiente a la figura 3 del artículo adjunto al final de esta Tesis doctoral. a) El transporte de la mezcla indicada de 10 μM de aminoácidos marcados radiactivamente (agrupados por similitud estructural) fue testada en PLs que contenían SteT o PotE. Los PLs fueron cargados (PotE +aa y SteT +aa) o no (PotE -aa y SteT -aa) con una mezcla de diez L-aminoácidos representativos (Arg, Orn, Gly, Pro, Ala, Leu, Met, Phe, Tyr, Glu) cada uno a 2 mM. b) El transporte de los aminoácidos indicados marcados radiactivamente (a 10 o 100 μM) en PLs que no contienen aminoácidos (PotE -aa y SteT -aa) o que contienen una mezcla de diez aminoácidos representativos como en a) (PotE +aa y SteT +aa) o 2 mM Ser (SteT +Ser). El transporte fue medido durante 15 minutos y está expresado en $\text{cpm} / \mu\text{l PLs} \cdot 15 \text{ minutos}$ en a) y como $\text{pmol} / \mu\text{l PLs} \cdot 15 \text{ minutos}$ en b). Se muestra un experimento representativo (a, b) con tres réplicas por condición. Cuando no se aprecian las barras de error estándar de la media (EEM) es porque son menores que los símbolos.

El siguiente paso fue establecer si SteT poseía un mecanismo secuencial de transporte similar al determinado por la Dra. M. Torras-Llort para $\text{b}^{0,+}\text{AT}$ en vesículas de membranas apicales de intestino de pollo (Torras-Llort et al., 2001). Para ello se realizó un análisis cinético del transporte de SteT a diferentes concentraciones internas y externas de sustrato tal como se indica en la figura 17a. La linealización de Lineweaver-Burk mostró una serie de líneas que

convergirían, como corresponde a un mecanismo secuencial, presentando un rango de K_M interna entre 1 y 5 mM y un rango de K_M externa entre 1 y 3 mM.

Para precisar el valor de K_M el autor de esta memoria realizó una cinética con SteT-PLs que contenían 15 mM de L-serina en su interior con más puntos y que dio como resultado una K_M externa de 1.2 ± 0.2 mM y una $V_{m\acute{a}x}$ estimada de 67 ± 4 pmol / μg proteína \cdot min (media \pm EEM) (figura 17b). El *turnover* calculado para SteT fue de 0.06s^{-1} .

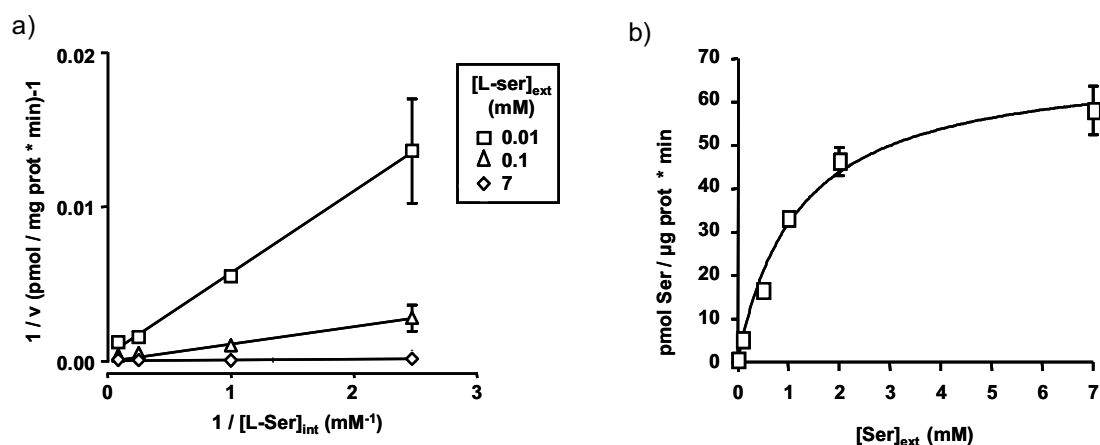


Figura 17. a) Análisis cinético del transporte de SteT correspondiente a la figura 5 del artículo adjunto al final de esta Tesis doctoral. El transporte de L-serina marcada radiactivamente a diferentes concentraciones en el medio externo (como se indica) y en el interno (0.4, 1, 4 y 12 mM) fue medido en PLs de SteT (SteT-PLs) durante 1 minuto en condiciones lineales. El transporte transestimulado fue calculado sustrayendo el transporte en SteT-PLs que no contenían L-serina en su medio interno ensayado a las tres concentraciones externas indicadas de L-serina. Se muestra la linealización de Lineweaver-Burk del transporte transestimulado con las diferentes concentraciones externas e internas de L-serina. Las líneas convergen en valores negativos del eje X apoyando un modelo secuencial de intercambio. La representación inversa (concentraciones externas de L-serina en el eje X para cada concentración interna de L-serina) genera una representación similar. Los valores de K_M aparente estimados (calculados a partir de la intersección en el eje X para cada línea) oscilan de 1.2 a 5.3 y de 1.5 a 3.1 mM para la L-serina interna y externa respectivamente. La $V_{m\acute{a}x}$ estimada con 12 mM de L-serina interna fue de 67 ± 3 pmol / μg proteína \cdot min (media \pm EEM). Se muestra un experimento representativo con 3 réplicas por condición. b) El transporte de L-serina marcada radiactivamente a diferentes concentraciones externas (0.01, 0.1, 0.5, 1, 2 y 7 mM) fue medido en SteT-PLs que contenían 15 mM L-serina o L-arginina en condiciones lineales. El transporte transestimulado fue calculado sustrayendo el transporte en SteT-PLs que contenían L-arginina de los obtenidos por los que contenían L-serina. L-Arg se usó como sustrato control negativo como se observa en la figura 16 SteT no es capaz de transportarla. El análisis *Non-parametric* (GraphPad; Sigma) estimó una K_M aparente externa de 1.2 ± 0.2 mM. La $V_{m\acute{a}x}$ estimada fue de 67 ± 4 pmol / μg proteína \cdot min (media \pm EEM). Se muestra un experimento representativo con 3 réplicas por condición. Cuando no se aprecian las barras de EEM es porque son menores que los símbolos.

Conclusiones de los antecedentes:

- Se encontraron cinco candidatos procariotas a las LSHATs: ykbA (SteT) e yfnA de *B. subtilis* e yhfM, yjdE y PotE de *E. coli*.
- Se escogió PotE como control positivo de actividad y SteT como el procariota con más homología a las LSHAT humanas.
- Se determinó la función de SteT como intercambiador de L-serina.
- Se determinó que SteT poseía un mecanismo similar de transporte que las LSHAT humanas.

OBJETIVOS

Con la identificación de los nuevos homólogos procariotas, su posterior clonación y expresión, así como la purificación de SteT y la averiguación de su función y mecanismo de transporte, decidimos:

1. Caracterizar funcionalmente SteT como modelo procariota de las LSHATs:

Una vez determinada la estabilidad de SteT en PLs para ver el rango de tiempo de trabajo, queríamos ver el efecto de los iones sobre su transporte. Con estos datos queríamos realizar estudios cinéticos y determinar que aminoácidos además de L-serina eran sus sustratos.

2. Caracterizar estructuralmente SteT como modelo procariota de las LSHATs:

Pretendíamos establecer su estado cuaternario mediante técnicas como electroforesis en gel nativo (BN-PAGE), entrecruzamiento químico, criofractura en el microscopio electrónico de transmisión (TEM) y tinción negativa en el TEM e incluso medir el tamaño de SteT por estas dos últimas técnicas.

3. Identificar residuos relevantes del transportador e identificar mutantes relevantes para estudios estructurales:

Partiendo de la inhibición del transporte de L-serina por MTSET queríamos encontrar cuál era su diana y si ésta también lo era de otros reactivos de cisteína. Descubrimos que el DTT ejercía un efecto positivo sobre el transporte y buscamos su diana. Como todos los estudios iniciales nos condujeron al segmento TM VIII, decidimos realizar varios mutantes que nos permitieran descubrir posibles lugares de interacción con el sustrato.

RESULTADOS

1. Caracterización funcional de SteT.

1.1. Cinética y modo de transporte.

Inicialmente determinamos la estabilidad funcional de SteT en los SteT-PLs para ver el rango de tiempo que teníamos para trabajar con una determinada preparación. Para ello medimos la velocidad inicial de transporte de L-serina en SteT-PLs recién generados y en esos mismos SteT-PLs a diferentes tiempos posteriores (mantenidos en todo momento en hielo) (figura 18). Se aprecia una caída de la actividad de SteT que obedece a una exponencial de primer orden con el tiempo ($y = 3.92 \cdot e^{-0.0015 \cdot x}$) con un $t_{1/2}$ de 464 minutos. La pérdida en dos horas es de un 16%, con lo que todos los estudios de esta Tesis doctoral se han realizado con PLs generados no más de dos horas antes.

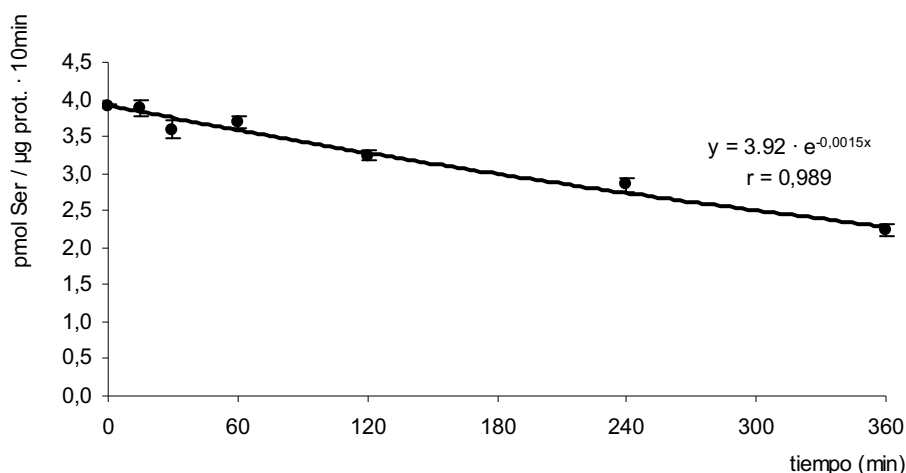


Figura 18. Estabilidad funcional de SteT en PLs a lo largo del tiempo. El transporte de 10 μM L-serina marcada radiactivamente fue medido durante 10 minutos en PLs recién generados (tiempo 0) y a diferentes tiempos posteriores (mantenidos en todo momento en hielo). Se aprecia una caída que sigue una exponencial de primer orden de la actividad de SteT con el tiempo ($y = 3.92 \cdot e^{-0.0015 \cdot x}$) con un $t_{1/2}$ de 464 minutos. Los datos corresponden a un experimento representativo, realizado con 3 réplicas. Cuando no se aprecian las barras de EEM es porque son menores que los símbolos.

Para comprobar si algún ión era cotransportado por SteT, medimos el efecto de diversos iones en el transporte de L-serina a través de los SteT-PLs. Para ello sustituimos el Cl^- de colina (colinaCl) que utilizamos normalmente para compensar la fuerza iónica por diferentes sales: acetato de litio (LiAc), cloruro potásico (KCl), acetato potásico (KAc) y cloruro sódico (Na). En la figura 19a vemos que el Cl^- no ejerce ningún papel (no hay diferencia significativa entre KCl y KAc), el eliminar el gradiente de K^+ disminuye ligeramente el transporte (la diferencia entre ColinaCl y KCl y entre LiAc y KAc es significativa al 99%) y el añadir Na^+ produce un ligero descenso (la diferencia entre ColinaCl y Na es significativa al 95%). La

Resultados

acidificación del medio disminuye ligeramente el transporte (la diferencia entre pH =7.4 y pH = 6.5 y pH = 5.5 es significativa al 95%) (figura 19b). Pese al ligero efecto negativo observado al eliminar el gradiente de K^+ , la valinomicina no es capaz de activar el transporte de SteT, mientras que sí lo hace claramente para PotE (es significativo al 99.9%), cuyo transporte es electrogénico (figura 19c). La conclusión que sacamos es que, a pesar de algunos efectos de escasa magnitud, el intercambio de L-serina a través de SteT-PLs es mayormente independiente de los iones que haya en el medio.

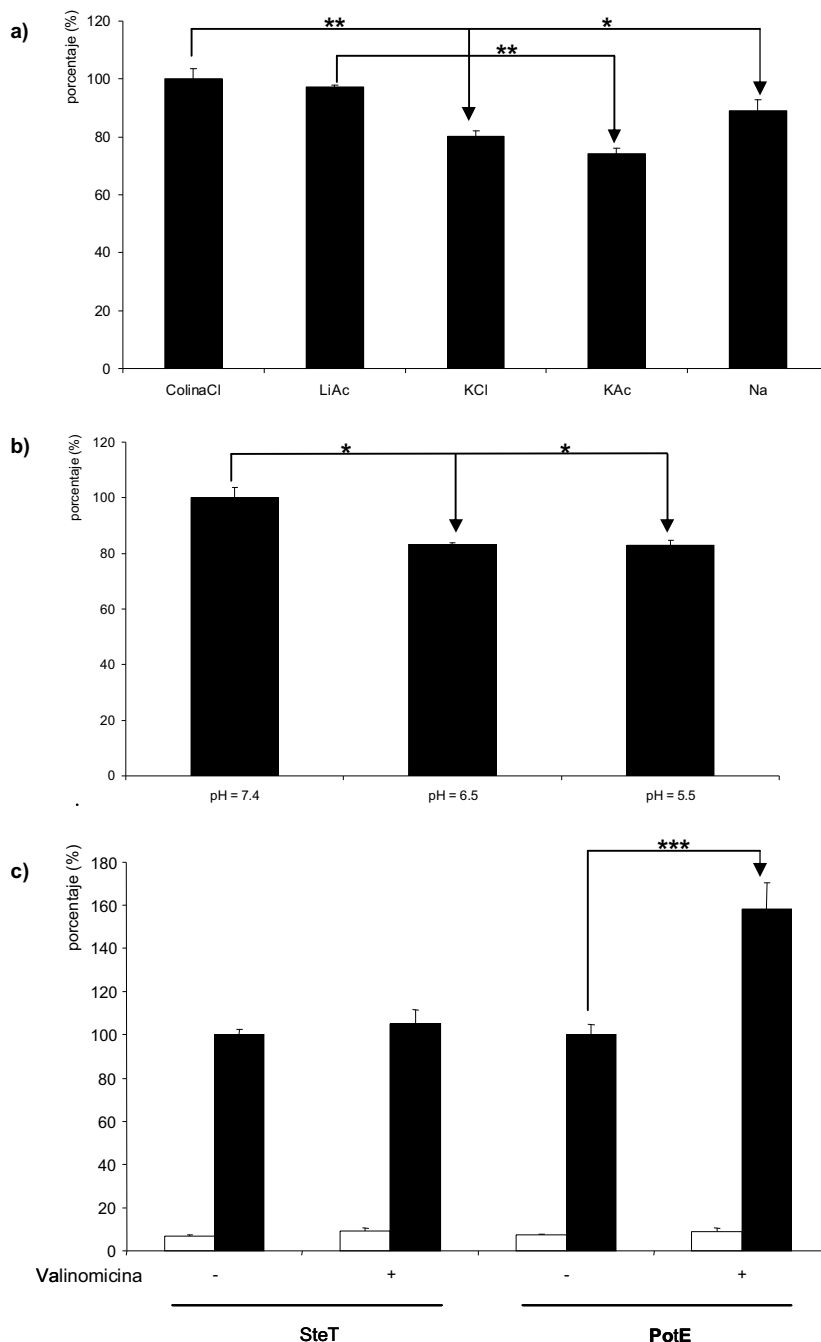


Figura 19. Análisis del efecto de los principales iones sobre el transporte de L-serina en SteT-PLs. a) Se representa el porcentaje de transporte resultante con diferentes iones en el medio externo (como se

indica) respecto al transporte neto de 10 μM L-serina marcada radiactivamente durante 10 minutos con cloruro de colina (método estándar). Los datos corresponden a un experimento representativo, realizado con 3 réplicas. b) Se representa el porcentaje de transporte resultante con diferentes pHs en el medio externo (como se indica) respecto al transporte neto de 10 μM L-serina marcada radiactivamente durante 10 minutos a pH 7.4 (método estándar). Los datos corresponden a un experimento representativo, realizado con 3 réplicas. Este apartado fue realizado por la Dra. N. Reig. c) Se representa el porcentaje de transporte resultante sin (-) o con valinomicina (+) en el medio externo respecto al transporte neto de 10 μM L-serina marcada radiactivamente durante 10 minutos sin valinomicina. Las barras blancas corresponden a PLs sin aminoácidos en el interior mientras que las barras negras corresponden a PLs que contienen 4 mM L-serina. Se usó PotE como control positivo que se estimula notoriamente a diferencia de SteT. Este apartado fue realizado en nuestro laboratorio por M. Ratera. Cuando no se aprecian las barras de EEM es porque son menores que los símbolos.

Para confirmar que SteT media un intercambio obligatorio hicimos una cinética de entrada de serina radioactiva en presencia o ausencia, respectivamente, de L-serina en el interior (figura 20a). Esta cinética demuestra que SteT es un intercambiador obligatorio, ya que cuando tiene sustrato en ambos lados se observa un *overshoot* que después tiende hacia el equilibrio, mientras que si no hay sustrato en uno de los lados se produce una entrada por difusión simple a través de los PLs que responde a la Ley de Fick. El Dr. J. L. Gelpí con estos datos simuló el transporte. Para ello asumió un intercambio obligatorio de estequiometría 1:1 y un flujo de difusión pasiva que explica la entrada en los SteT-PLs que no contienen aminoácido alguno. Con los datos experimentales determinó un coeficiente de difusión de $2.5 \cdot 10^{-6} \text{ min}^{-1}$, un volumen interno de los SteT-PLs de 62 nl/ μg de proteína purificada y unas constantes de afinidad interna y externa de 2.0 y 1.2 mM respectivamente. El mejor ajuste con los datos experimentales se obtiene cuando añadimos una inactivación de la actividad de transporte con el tiempo cuya naturaleza es desconocida. El resultado de la simulación son las líneas que se muestran en la figura y que se adaptan a los puntos determinados experimentalmente. La simulación apoya un intercambio obligatorio y electroneutro de L-serina a través de SteT e indica que este intercambio es balanceado, probablemente con una estequiometría 1:1.

Igualmente hicimos la cinética de salida en SteT-PLs precargados con L-serina marcada radiactivamente y diluidos en un medio de transporte sin o con L-serina respectivamente (figura 20b). Los resultados demostraron la bidireccionalidad del transportador.

1.2. Especificidad de sustrato.

Para caracterizar la especificidad de sustrato de SteT se realizó un patrón de cis-inhibiciones del transporte de L-serina (figura 21a) en el que se ve que un exceso de 500 veces de L-serina o de L-treonina en el medio externo anulan casi por completo el intercambio L-serina/L-serina, sugiriendo que L-treonina también es un excelente sustrato. Los aminoácidos

Resultados

relacionados estructuralmente con la L-serina (D-serina, homoserina y fosfoserina) también inhiben el transporte aunque en un menor grado. Por otro lado, aminoácidos como L-glicina, L-prolina, L-arginina, L-cisteína, L-lisina y L-glutamato no inhiben de manera significativa el transporte del sustrato radioactivo. Sorprendentemente, los aminoácidos aromáticos L-fenilalanina, L-tirosina y en menor medida L-triptófano inhiben el transporte de manera significativa indicando que pueden ser sustratos de SteT.

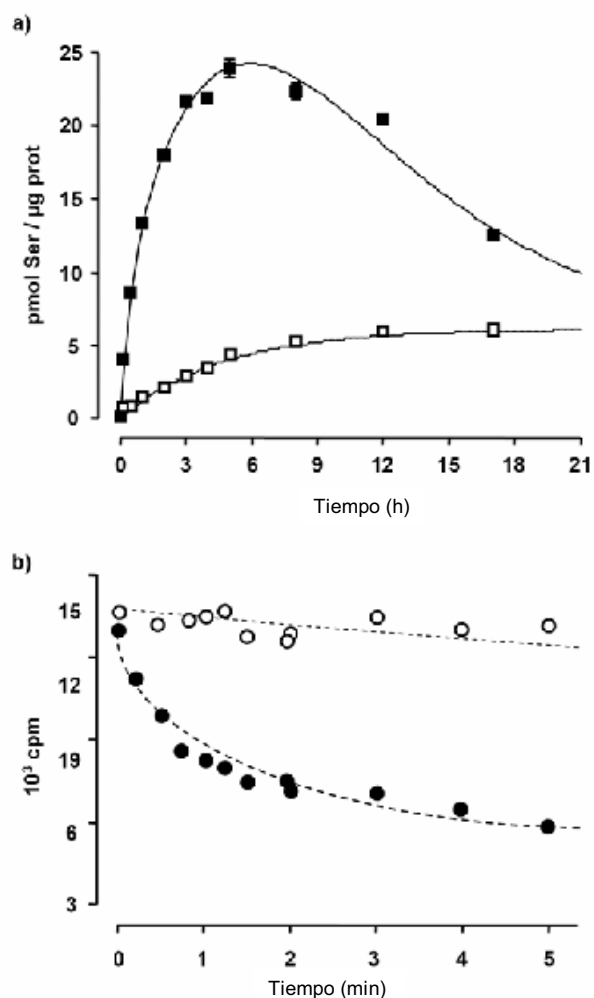


Figura 20. Cinética del transporte de L-serina en SteT-PLs correspondiente a la figura 4 del artículo adjunto al final de esta Tesis doctoral. a) Entrada (pmol/ μg proteína) de 10 μM L-serina marcada radiactivamente en SteT-PLs que contienen 4 mM L-serina (cuadrados negros) o L-arginina (cuadrados blancos). L-arginina no es sustrato de SteT (ver el patrón de inhibiciones y la transestimulación) y se usó de control negativo. Los datos corresponden a un experimento representativo, realizado con 3 réplicas. Cuando no se aprecian las barras de EEM es porque son menores que los símbolos. Tres experimentos adicionales dieron resultados similares. Las líneas continuas corresponden a líneas de progreso simuladas asumiendo una estequiometría de intercambio de sustrato 1:1 además de difusión simple para el transporte en SteT-PLs que contienen 4 mM L-serina y difusión simple para el transporte en SteT-PLs que contienen 4 mM L-arginina. b) Salida de L-serina a través del transportador SteT: SteT-PLs que contienen 4 mM L-serina fueron cargados con 10 μM L-serina marcada radiactivamente durante 2h.

Después, los SteT-PLs fueron diluidos 13 veces con medio conteniendo (círculos cerrados) o no (círculos abiertos) 7 mM L-serina fría. La salida de L-serina fue dramáticamente estimulada por L-serina en el medio externo. Se muestra un experimento representativo. Un segundo experimento dio resultados similares. Cuando no se aprecian las barras de EEM es porque son menores que los símbolos.

Para comprobar si L-treonina y estos aminoácidos aromáticos son sustrato de SteT se realizó un experimento de transestimulación cargando SteT-PLs con estos aminoácidos y usando L-serina como control positivo y L-arginina como control negativo ($95 \pm 6\%$ de actividad residual en el patrón de inhibiciones), debido a las dificultades para realizar un transporte de L-fenilalanina, L-tirosina y L-triptófano en SteT-PLs, ya que el basal es muy elevado, sugiriendo que se adsorben inespecíficamente a los filtros o a los PLs. El transporte fue claramente transestimulado por L-serina y por L-treonina, y en menor medida por L-fenilalanina, L-tirosina y L-triptófano, a diferencia de L-arginina que no es capaz de transestimular el transporte por encima del basal (figura 21b).

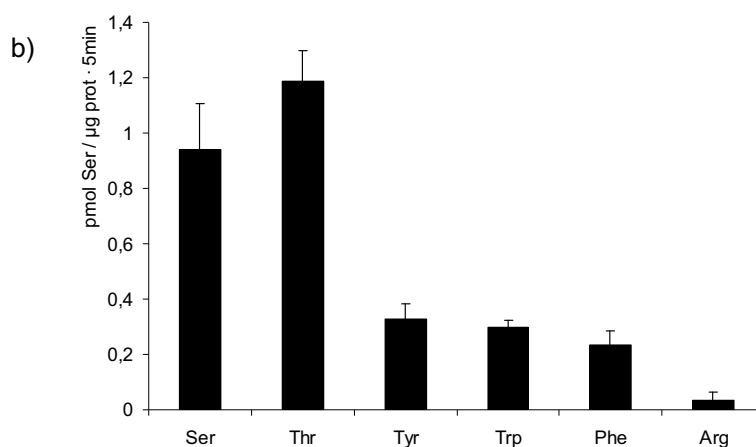
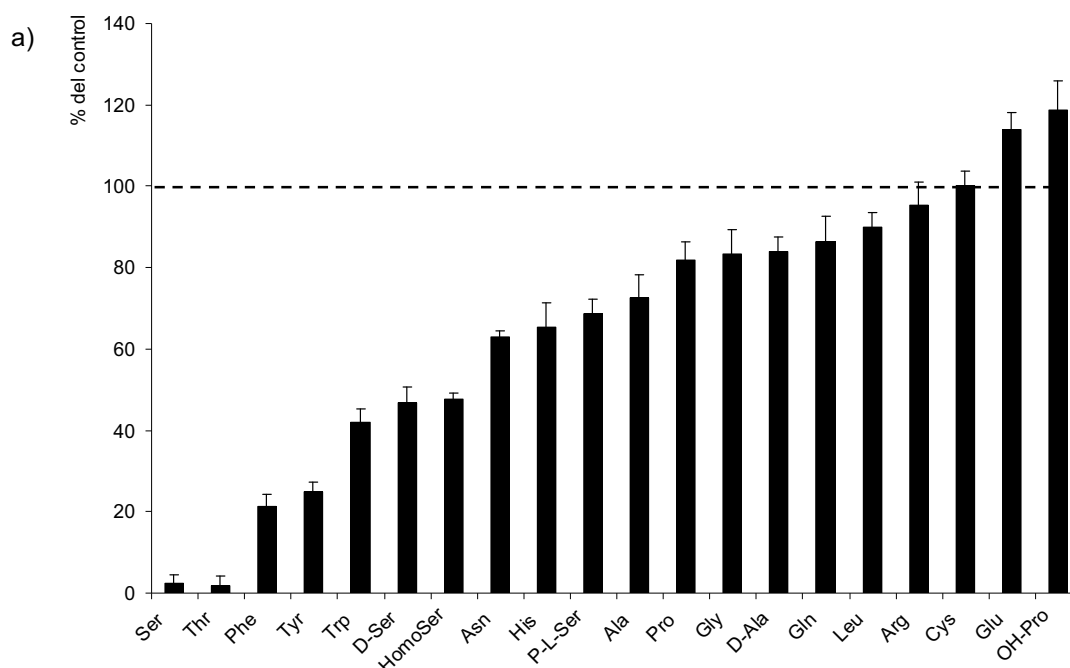


Figura 21. a) Patrón de cis-inhibición de aminoácidos de la actividad de transporte de SteT correspondiente a la figura 6a del artículo adjunto al final de esta Tesis doctoral. El transporte de 10 μ M L-serina marcada radiactivamente fue medido en SteT-PLs que no contenían aminoácidos o que contenían 4 mM L-serina durante 5 minutos (condiciones lineales). El transporte fue medido en ausencia o presencia de los aminoácidos indicados a 5 mM en el medio externo (2 mM en el caso de L-tirosina). El transporte transestimulado fue calculado sustrayendo el transporte en SteT-PLs que no contenían L-serina de aquél en SteT-PLs que contenían L-serina. El transporte se expresa como el porcentaje del transporte en SteT-PLs que contenían 4 mM L-serina y sin cis-inhibidores (5.2 ± 1.2 pmol / μ g proteína \cdot 5 min). Los datos son de 2-3 experimentos con 3 réplicas por condición. b) Transestimulación de la actividad de transporte de SteT correspondiente a la figura 6b del artículo adjunto al final de esta Tesis doctoral. El transporte de 10 μ M L-serina marcada radiactivamente fue medido en SteT-PLs que contenían 4 mM del aminoácido indicado (2 mM en el caso de la L-tirosina) durante 5 minutos. L-arginina se usó como control negativo porque este aminoácido no inhibe el transporte de L-serina vía SteT (ver apartado a). El transporte se expresa en pmol / μ g proteína \cdot 5 min. Se muestra un experimento representativo con 3 réplicas por condición. Dos experimentos adicionales dieron similares resultados.

Estos resultados demuestran que SteT exhibe una actividad de intercambio obligatorio para L-serina, L-treonina y en menor medida para aminoácidos aromáticos, por lo que renombramos ykbA como SteT cuyas siglas se refieren a Serine/threonine exchanger Transporter.

2. Caracterización estructural de SteT.

Se utilizaron tres técnicas diferentes para determinar el estado oligomérico (estructura cuaternaria) de SteT: BN-PAGE, entrecruzamiento químico y microscopía electrónica.

2.1. Electroforesis en gel nativo (BN-PAGE).

Enviamos membranas de *E. coli* sobreexpresando SteT y PotE a F. Casagrande en el laboratorio del Dr. D. Fotiadis (Biozentrum, U. de Basilea, Suiza). Se realizó un BN-PAGE de SteT que mostró que en estas condiciones es un monómero (figura 22). SteT fue solubilizado con DM y purificado en una columna de níquel. Esta proteína se corrió en un gel con un gradiente lineal del 5 al 12% de acrilamida usando tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), catalasa (232 kDa), lactato deshidrogenada (140 kDa) y albúmina de suero bovino (66 kDa) como marcadores de peso molecular. SteT presenta una banda principal de peso molecular aparente \sim 80 kDa que corresponde al monómero y dos débiles bandas a \sim 155 y 205 kDa que corresponderían al dímero y al trímero (reaccionan con la sonda HisProbe-HRP). La banda brillante que aparece a \sim 40 kDa corresponde a micelas mixtas de detergente y *Coomassie Brilliant Blue* G-250. No se pudo realizar un BN-PAGE con PotE debido a su elevada tendencia a precipitar en este tipo de geles.

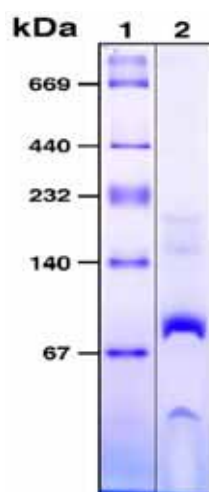
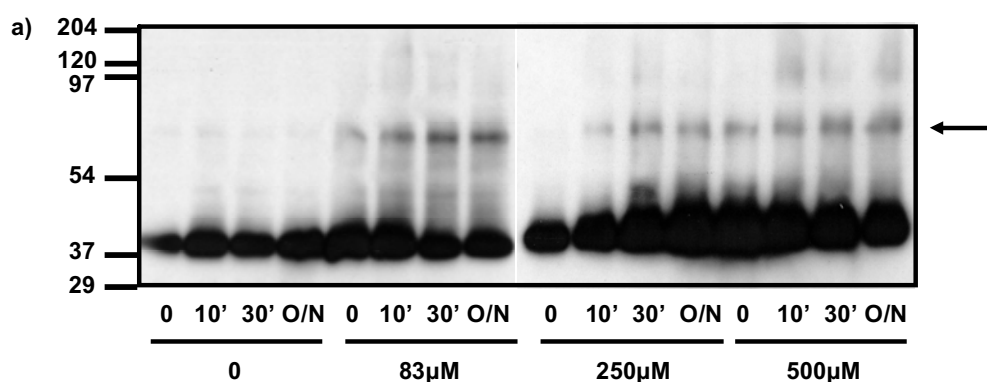


Figura 22. BN-PAGE de la proteína SteT purificada. Estándar de proteína (carril 1) y proteína SteT con una cola de His purificada (carril 2). Se aprecian cuatro bandas con M_{obs} de ~40 kDa, ~80 kDa, ~155 kDa y ~205 kDa. La banda principal corresponde al monómero de SteT (banda a ~80 kDa). La banda azul brillante a ~40 kDa corresponde a la micela de detergente/*Coomassie Brilliant Blue G-250*, mientras que las tenues bandas de proteína a ~155 kDa y ~205 kDa corresponden a SteT y podrían representar dímeros y trímeros de la proteína.

2.2. Entrecruzamiento químico.

El entrecruzamiento químico realizado con reactivos de aminos (DSP, DST, DMS) o de sulfhidrilos (BM(PEO)₄) de brazos espaciadores de diferentes longitudes (12.0, 6.3, 11.0 y 17.8 Å respectivamente), a diferentes concentraciones (de 0, 25, 83, 100, 250, 500, 1000, 2000, 5000 y 10000 μ M), tiempos (de 0, 10, 30, 90 min y O/N), temperaturas (0 o 25 °C) y pHs (de 6.5, 7.4, 8.0 y 9.0) no consiguió nunca más de un 10% de dímero, lo cual es un valor asumible por el movimiento aleatorio de SteT en unas membranas en las que está sobreexpresado y confirma lo observado en el BN-PAGE. En la figura 23 se muestra un ensayo de entrecruzamiento de SteT con DSP resuelto en un gel sin DTT (figura 23a) o con DTT (figura 23b) para romper el entrecruzador y comprobar si el dímero observado en el gel sin DTT era específico.



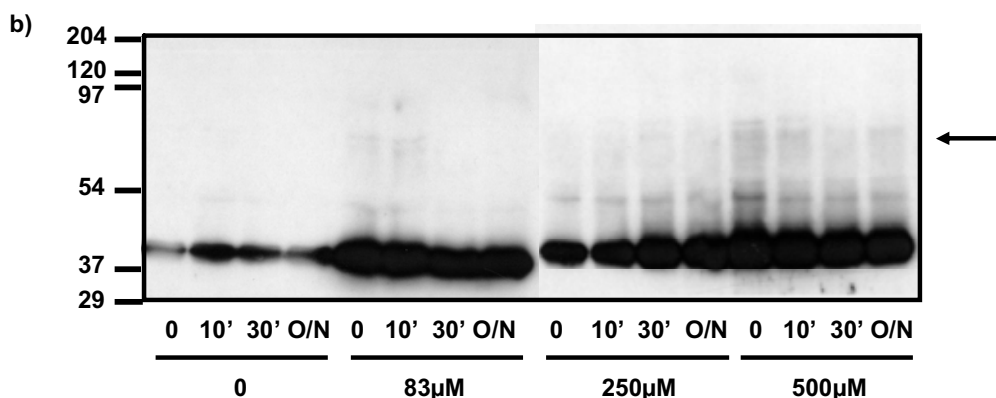


Figura 23. Entrecruzamiento químico de SteT en membranas. Membranas totales de *E. coli* transformadas con SteT fueron lavadas 3 veces con un tampón HEPES-NaOH (pH 8.0) en un homogeneizador de vidrio, y diluidas con el mismo tampón a 1 mg de proteína/ml. Se muestra el entrecruzamiento con DSP a 25 °C y diferentes concentraciones y tiempos. La reacción fue parada con 50 mM Tris (pH 7.4). Se resolvió un gel de SDS-PAGE en ausencia (a) o en presencia (b) de 100 μM DTT para romper el entrecruzador. Las flechas indican la aparición del dímero que en ningún caso fue superior al 10%.

2.3. Criofractura en el TEM.

Otra aproximación fue realizar criofractura en el TEM para estimar el tamaño funcional de SteT y PotE reconstituidos en los PLs. Estos experimentos se hicieron en colaboración con la Dra. C. López (Serveis Científico-Tècnics de la U. Barcelona-Parc Científic de Barcelona (PCB)) utilizando las mismas muestras de PLs usadas para los estudios funcionales de SteT y PotE. Usamos el mutante C154G de LacY de *E. coli* (cedido por el Dr. R. Kaback) como control positivo, ya que su tamaño es conocido en muestras de criofractura e incluso en el cristal 3D. En las imágenes, los PLs aparecen como superficies cóncavas y convexas de un diámetro medio de 150 a 200 nm (figura 24), dato que coincide con los valores que obtuvimos mediante *dynamic light scattering* en el laboratorio de la Dra. M^a Luisa García (Facultad de Farmacia, U. de Barcelona) (datos no mostrados).

La mayoría de las caras fracturadas de los SteT-PLs contenían entre 0 y 2 partículas intramembranas para una relación proteína:lípido de 1:100, y entre 0 y 6 para una relación proteína:lípido de 1:40 (figura 24b y c). Un número similar de partículas (0-2 y 0-7) fue observado en las caras fracturadas de los PotE-PLs (figura 24d). En los LacY-PLs también observamos 0-2 en las caras fracturadas correspondientes a una relación proteína:lípido 1:100. Estas partículas estaban ausentes en los liposomas control (figura 24a), demostrando que las partículas observadas corresponden a las proteínas reconstituidas.

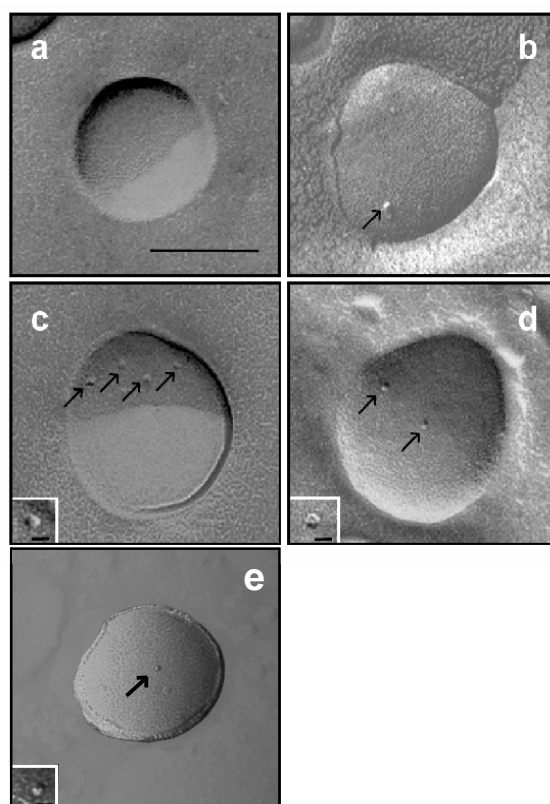


Figura 24. Criofractura en el TEM de SteT, PotE y LacY purificados y reconstituidos en PLs. a) Los liposomas control no contienen partículas intramembrana. b-d) PLs de SteT preparados para los ensayos de transporte a una relación proteína:lípido de 1:100 (b) y 1:40 (c). Las partículas intramembrana (flechas) aparecen tanto en las caras cóncavas (b) como en las convexas (c) de las vesículas unilamelares, indicando una inserción aleatoria de la proteína en la bicapa. d) PLs de PotE preparados por M. Ratera para los ensayos de transporte a una relación proteína:lípido de 1:100. e) PLs de LacY preparados como los anteriores a una relación proteína:lípido 1:100. Barra de escala: 100 nm. Detalles: vista de mayor magnificación de una partícula de SteT (c), de PotE (d) y de LacY (e). Barra de escala del detalle: 10 nm. Las flechas señalan las partículas intramembrana.

Con una mayor magnificación podemos observar que todas ellas tienen una forma redondeada (ver detalles en figura 24). Medimos las partículas observadas en los PLs, en negativos a 50000x digitalizados, con la ayuda del programa AnalySIS (figura 25). La medición de 119 partículas de SteT dio una media de 7.37 ± 0.07 nm (a), ligeramente inferior a la media de 8.05 ± 0.12 nm resultante de la medición de 109 partículas de PotE y ligeramente superior a la media de 5.99 ± 0.06 nm resultante de la medición de 72 partículas de LacY. Estructuralmente y funcionalmente se sabe que LacY es un monómero con un peso molecular semejante a SteT. La mínima diferencia entre el tamaño de LacY y el de SteT parece indicar que SteT también debe ser un monómero, y aunque la diferencia con PotE es mayor no parece suficiente para justificar que sea un dímero. Como control interno, M. Ratera realizó también las medidas obteniendo resultados similares.

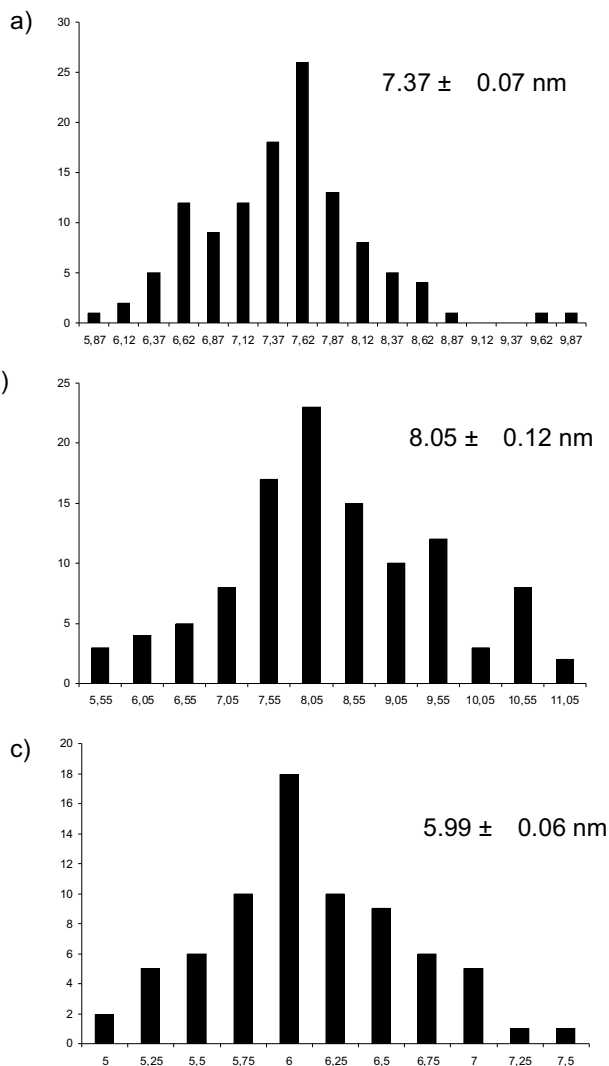


Figura 25. Histogramas de las mediciones de las partículas de SteT, PotE y LacY observadas en los PLs por criofractura en el TEM. Mediante el programa AnalySIS se midió el tamaño de lado a lado perpendicular al sombreado de las partículas en los negativos a 50000x digitalizados de las réplicas de los PLs observados en el microscopio electrónico. Se muestran los histogramas centrados en la media obtenida y con un rango de los grupos proporcional al EEM. a) Histograma de SteT resultante de la medición de 119 partículas con una media 7.37 ± 0.07 nm. b) Histograma de PotE resultante de la medición de 109 partículas con una media 8.05 ± 0.12 nm. c) Histograma de LacY resultante de la medición de 72 partículas con una media 5.99 ± 0.06 nm.

2.4. Tinción negativa en el TEM.

En el laboratorio del Dr. D. Fotiadis también se midieron las partículas de SteT solubilizadas con DM por tinción negativa en el TEM (figura 26). En la imagen vemos que la preparación de SteT es homogénea (figura 26a), a diferencia de la de PotE que no lo es ni solubilizado con DDM, ni con DM, ni con otros detergentes, por lo que se observan partículas con diferentes grados de agregación que se remarcan con círculos discontinuos de diferentes

tamaños (figura 26c). En la ampliación de la imagen de SteT se ve la forma redondeada, con una tendencia elíptica, de SteT con una depresión central (figura 26b) que le da una apariencia de *donut* y un tamaño de $\sim 6 \times \sim 7$ nm.

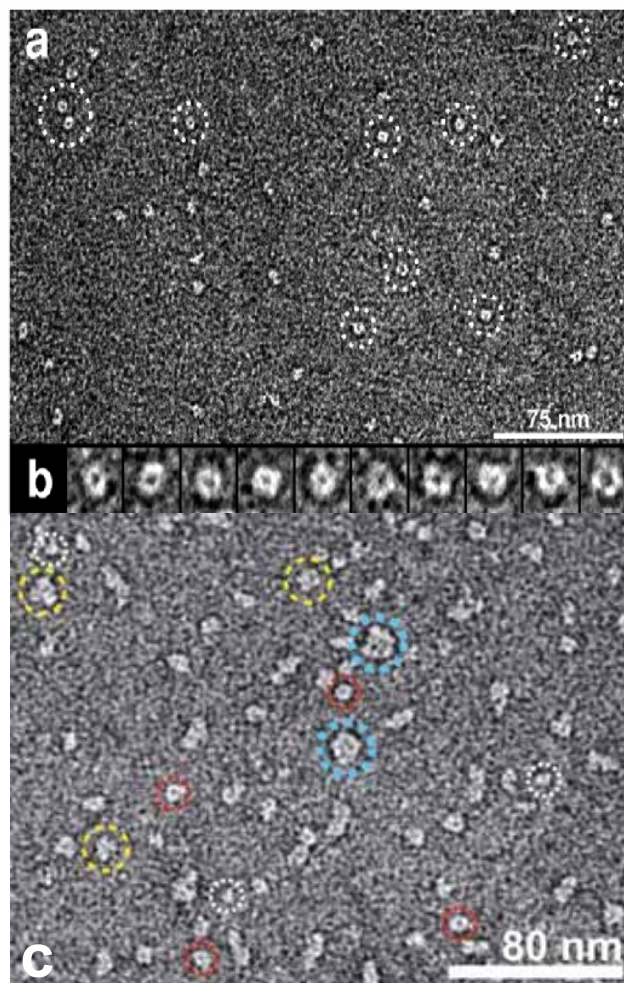


Figura 26. Imagen de TEM de SteT teñido negativamente. a) La homogeneidad de las proteínas de SteT solubilizado en DM se refleja en la micrografía electrónica correspondiente a la figura 8 del artículo adjunto al final de esta Tesis doctoral. b) Galería de vistas superiores seleccionadas con círculos discontinuos en a). Las proteínas de SteT son elípticas (diámetros: $\sim 6 \times \sim 7$ nm) y con una forma de donut con una depresión central. El tamaño de la ventana de las partículas magnificadas en la galería es de 12nm. c) La falta de homogeneidad de las proteínas de PotE solubilizado en DDM se refleja en la micrografía electrónica. Se remarcan con círculos discontinuos de diferentes tamaños los diferentes estados de agregación de PotE observados.

Si realizamos una comparación del diámetro de SteT con el de LacY fusionada con el citocromo b_{562} (11.6 kDa) y el de GalP medido en las mismas condiciones experimentales (figura 27) vemos que el diámetro medido en cristales 2D por tinción negativa de LacY es de 6.4 nm (a), el observado para GalP es de 8.3 nm (comunicación personal del Dr. D. Fotiadis) y

Resultados

el observado para SteT de 7.6 nm. De nuevo sabemos que LacY y GalP son monómeros, luego el tamaño de SteT corresponde también al de un monómero.

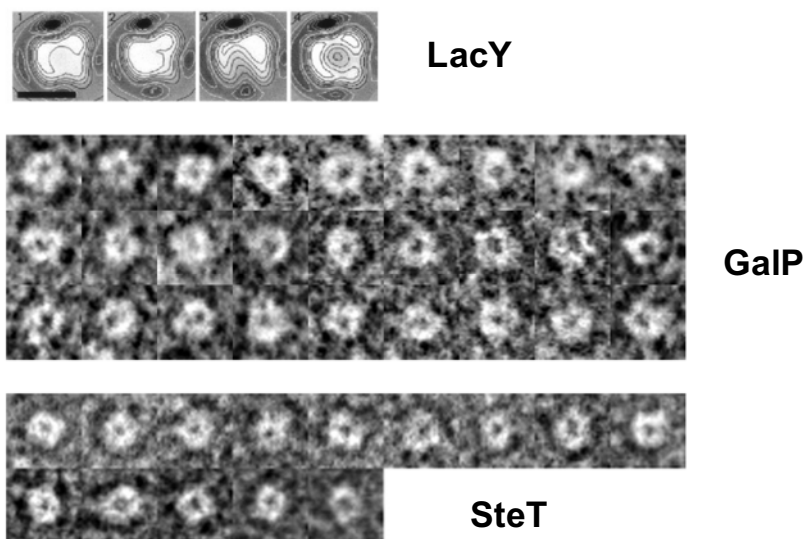


Figura 27. Comparativa de las imágenes de partículas con tinción negativa de LacY, GalP y SteT. Comparativa entre el tamaño del diámetro de LacY fusionada con el citocromo b_{562} (~ 6.4 nm) publicado por Zhuang et al., 1999 y el observado por el Dr. D. Fotiadis para GalP (~ 8.3 nm) y SteT (~ 7.6 nm). La barra en la primera imagen de LacY es de 5 nm. El tamaño de las ventanas de GalP y SteT es de 12.8 nm.

A partir de las membranas de *E. coli* sobreexpresando SteT que le enviamos al Dr. D. Fotiadis se obtuvieron varios cristales 2D, el mejor de los cuales difractó a una resolución máxima de 26 Å (figura 28), lo cual sólo permite vislumbrar una imagen general del transportador.

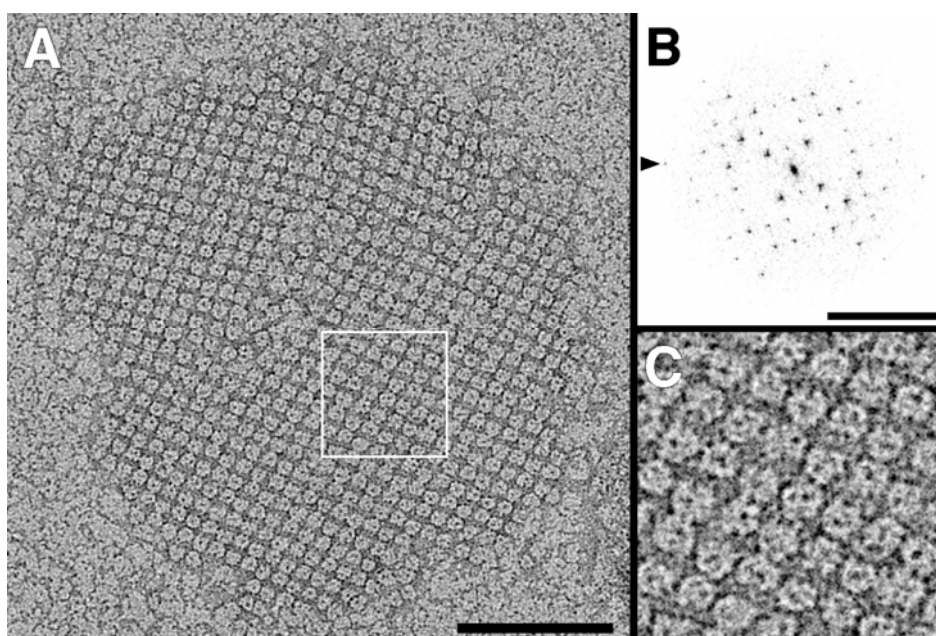


Figura 28. Cristal 2D de SteT. a) Imagen del cristal 2D de SteT en el TEM. La barra corresponde a 100 nm. b) Powerspectrum obtenido con el cristal de (A) indicando una difracción de 26 Å (cabeza de flecha). La barra corresponde a 3 nm⁻¹. c) Ampliación del área recuadrada en el panel (A) enmarcada en la misma ventana. El lado de la ventana corresponde a 80 nm.

3. Identificación de residuos relevantes.

3.1 Efecto de los reactivos de cisteína sobre la función de SteT.

En ausencia de un cristal de resolución atómica, los reactivos de cisteína son de gran utilidad en los estudios de estructura-función de proteínas de membrana. Para ello analizamos el efecto de varios reactivos de cisteína (MTSET, MTSEA, MTSES, pCMB, pCMBS y NEM) a elevadas concentraciones para ver su máximo efecto sobre el transporte de L-serina en los SteT-PLs (figura 29):

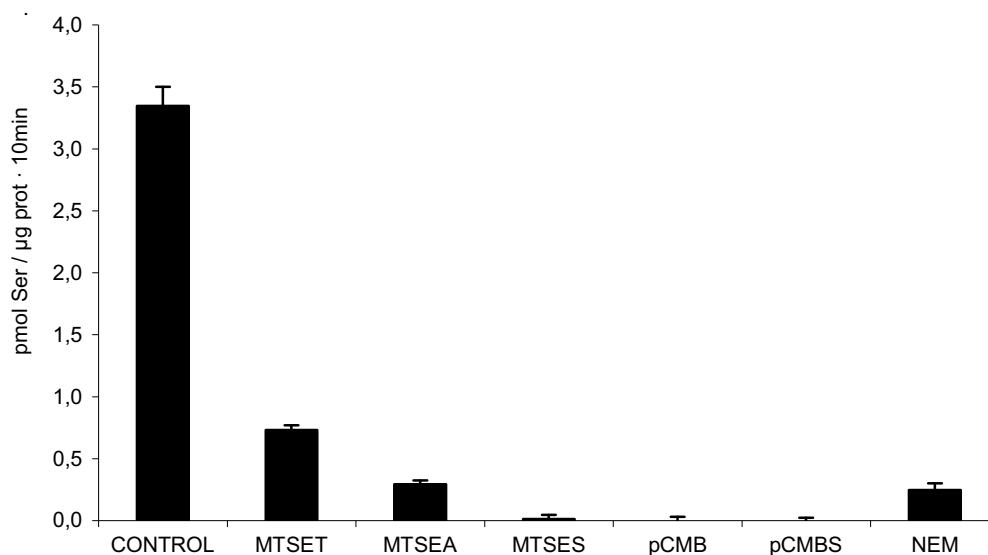


Figura 29. Efecto de los reactivos de cisteína en SteT. Los PLs de SteT purificado fueron tratados con 1 mM MTSET, 2.5 mM MTSEA, 1 mM MTSES, 1 mM pCMB, 1 mM pCMBS o 1 mM NEM durante 5 minutos a temperatura ambiente y ultracentrifugados para eliminar los reactivos antes del transporte. El transporte de 10 µM L-serina marcada radiactivamente se midió durante 10 minutos en SteT-PLs que contenían 4 mM de L-arginina o de L-serina. El transporte a través de SteT fue calculado sustrayendo el transporte en SteT-PLs que contenían L-arginina del obtenido por los que contenían L-serina. El transporte a través de los SteT-PLs que contenían L-arginina no se vio afectado por los reactivos de cisteína. Se muestra un experimento representativo (media ± EEM).

La entrada a través de los SteT-PLs que contenían L-arginina no se vio afectada, es decir, no se modificó el flujo pasivo a través de los PLs (resultados no mostrados). Por el

Resultados

contrario, el transporte activo de L-serina por SteT fue inhibido fuertemente en presencia de estos reactivos: MTSET un 78%, MTSEA un 91%, MTSES un 97%, pCMB un 100%, pCMBS un 100% y NEM un 93%. La inhibición de MTSET se ha realizado en 8 experimentos independientes con una media de un 76% de inhibición.

Para demostrar que los efectos observados eran específicos de una de las cisteínas endógenas, se repitió el experimento anterior con SteT *cys/less* (figura 30):

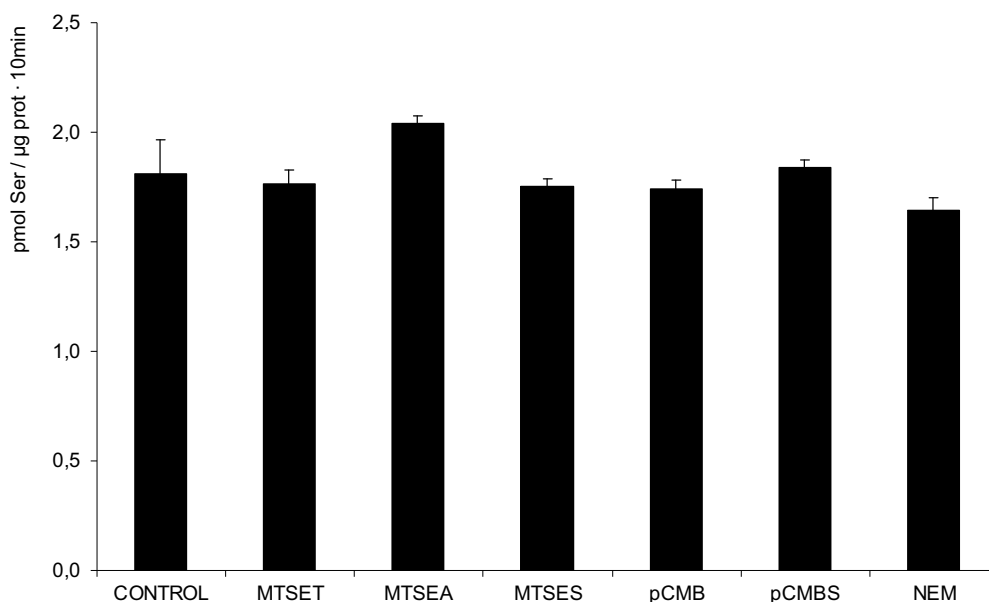


Figura 30. Efecto de los reactivos de cisteína en SteT *cys/less*. Los PLs de SteT *cys/less* purificado fueron tratados con 1 mM MTSET, 2.5 mM MTSEA, 1 mM MTSES, 1 mM pCMB, 1 mM pCMBS o 1 mM NEM durante 5 minutos a temperatura ambiente y ultracentrifugados para eliminar los reactivos antes del transporte. El transporte de 10 μM L-serina marcada radiactivamente se midió durante 10 minutos en SteT*cys/less*-PLs que contenían 4 mM de L-arginina o de L-serina. El transporte a través de SteT fue calculado sustrayendo el transporte en SteT-PLs que contenían L-arginina del obtenido por los que contenían L-serina. El transporte a través de los SteT-PLs que contenían L-arginina no se vio afectado por los reactivos de cisteína. Se muestra un experimento representativo (media ± EEM).

Claramente se aprecia que ninguno de ellos produce ningún efecto sobre SteT *cys/less*. Esto parece indicar que la modificación covalente de una o varias de las cisteínas endógenas de SteT bloquea su actividad, ya sea tapando el lugar de unión del sustrato directamente o impidiendo algún tipo de cambio conformacional durante el proceso de transporte. Para ver cuál o cuáles de las cinco cisteínas endógenas de SteT era la responsable de la inhibición de MTSET se mutaron individualmente cada una de ellas y se repitió el experimento anterior para ver si desaparecía el efecto (figura 31).

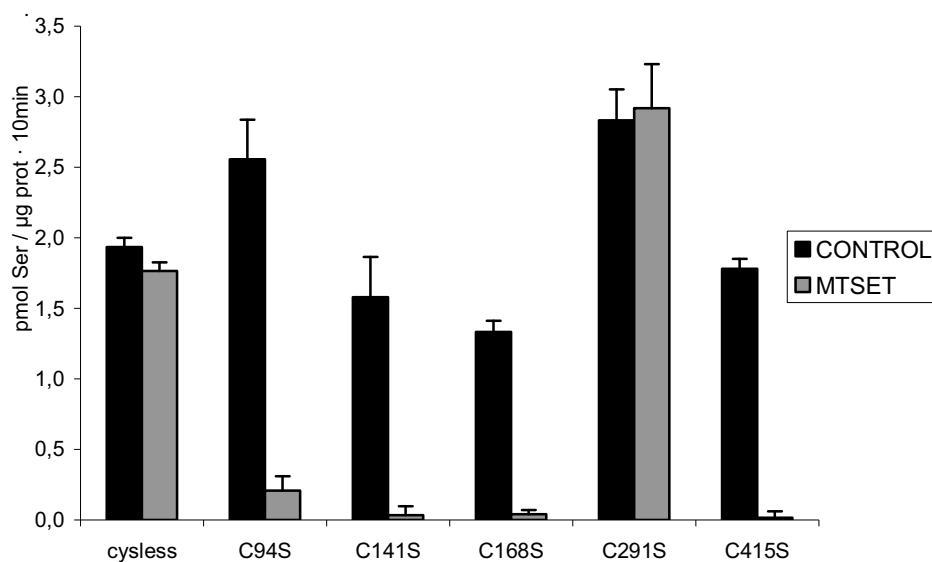


Figura 31. Efecto del MTSET en mutantes de SteT defectivos de una cisteína. Los PLs de SteT *cysless*, SteT C94S, SteT C141S, SteT C168S, SteT C291S y SteT C415S purificados fueron tratados con 1 mM MTSET o el volumen equivalente de DMSO durante 5 minutos a temperatura ambiente y ultracentrifugados para eliminar el MTSET antes del transporte. El transporte de 10 µM L-serina marcada radiactivamente se midió durante 10 minutos en los diferentes SteT-PLs que contenían 4 mM de L-arginina o de L-serina. El transporte a través de SteT fue calculado sustrayendo el transporte en SteT-PLs que contenían L-arginina del obtenido por los que contenían L-serina. El transporte a través de los SteT-PLs que contenían L-arginina no se vio afectado por el MTSET. Se muestra un experimento representativo (media ± EEM)

Observamos de nuevo claramente que el MTSET no inhibe a SteT *cysless*. Al eliminar individualmente las cisteínas 94, 141, 168 ó 415 no se consigue suprimir el efecto inhibitorio de MTSET, mientras que eliminando la cisteína 291, el transporte permanece intacto. Esto sugiere que MTSET está inhibiendo el transporte de L-serina a través de SteT mediante la modificación de la cisteína 291.

El siguiente paso fue determinar si la cisteína 291 es por sí suficiente para justificar la inhibición de los reactivos de cisteína observada en SteT. Para ello se reintrodujo dicha cisteína en SteT *cysless* y se realizó el ensayo en presencia de los diferentes reactivos de cisteína (figura 32).

Como podemos observar en la figura 32 todos los reactivos inhiben totalmente la actividad de SteT, demostrando que únicamente la modificación covalente de este residuo por los diferentes reactivos produce esta pérdida de actividad. Estos experimentos sugieren que la cisteína 291, localizada en el interior del segmento TM VIII de SteT, es bastante accesible al medio externo, ya que reacciona con todos los reactivos utilizados.

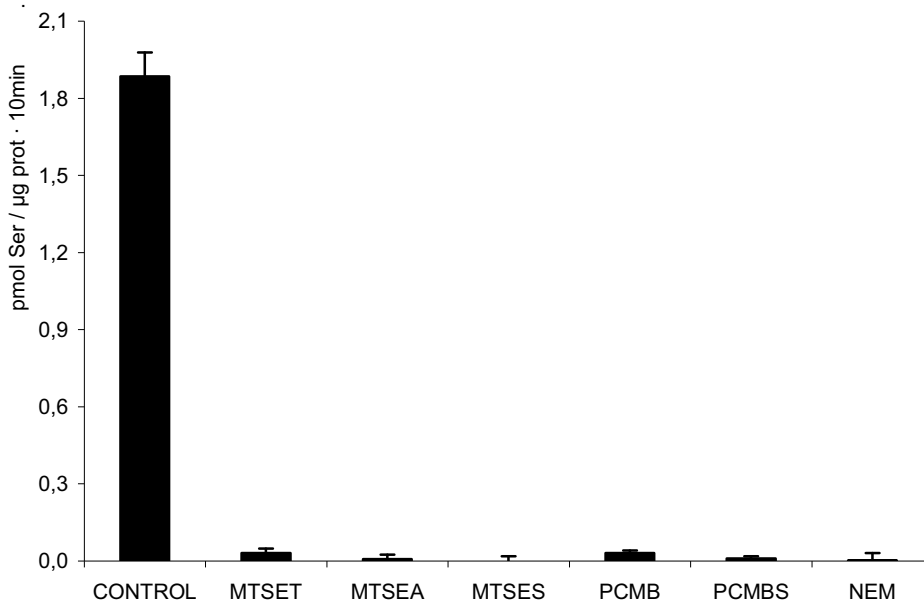


Figura 32. Efecto de los reactivos de cisteína en *cysless* C291. Los PLs de *cysless* C291 purificado fueron tratados con 1 mM MTSET, 2.5 mM MTSEA, 1 mM MTSES, 1 mM pCMB, 1 mM pCMBS o 1 mM NEM durante 5 minutos a temperatura ambiente y ultracentrifugados para eliminar los reactivos antes del transporte. El transporte de 10 µM L-serina marcada radiactivamente se midió durante 10 minutos en SteT-PLs que contenían 4 mM de L-arginina o de L-serina. El transporte a través de SteT fue calculado sustrayendo el transporte en SteT-PLs que contenían L-arginina del obtenido por los que contenían L-serina. El transporte a través de los SteT-PLs que contenían L-arginina no se vio afectado por los reactivos de cisteína. Se muestra un experimento representativo. Cuando no se aprecian las barras de EEM es porque son menores que los símbolos.

Aunque parece claro que la cisteína 291 es diana de los reactivos de cisteína, puede que no sea la única diana de estos reactivos, de manera que repetimos este experimento con SteT C291S para ver cual es el efecto de los reactivos de cisteína cuando no está presente la cisteína 291 (figura 33).

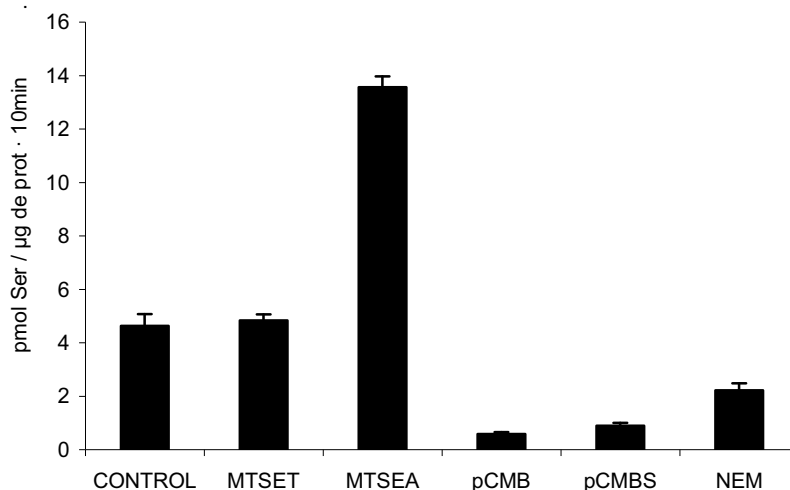


Figura 33. Efecto de los reactivos de cisteína en SteT C291S. Los PLs de SteT C291S purificado fueron tratados con 1 mM MTSET, 2.5 mM MTSEA, 1 mM MTSES, 1 mM pCMB, 1 mM pCMBS o 1 mM NEM durante 5 minutos a temperatura ambiente y ultracentrifugados para eliminar los reactivos antes del transporte. El transporte de 10 μ M L-serina marcada radiactivamente se midió durante 10 minutos en SteT-PLs que contenían 4 mM de L-arginina o de L-serina. El transporte a través de SteT fue calculado sustrayendo el transporte en SteT-PLs que contenían L-arginina del obtenido por los que contenían L-serina. El transporte a través de los SteT-PLs que contenían L-arginina no se vio afectado por los reactivos de cisteína. Se muestra un experimento representativo donde MTSET no afectó (104%), MTSEA estimuló un 292%, pCMB inhibió un 87%, pCMBS inhibió un 81% y NEM inhibió un 52%. Cuando no se aprecian las barras de EEM es porque son menores que los símbolos.

Podemos observar que cuando la cisteína 291 no está presente MTSET no tiene ningún efecto significativo sobre el transporte. Sorprendentemente, la presencia de MTSEA se torna en un fuerte efecto de activación, es decir, que MTSEA es capaz de unirse a otra u otras cisteínas endógenas de SteT y, en ausencia de la cisteína 291, activar el transporte. Finalmente, el efecto producido por NEM disminuye a aproximadamente la mitad, sugiriendo que este reactivo interacciona con otra cisteína además de la cisteína 291. Por el contrario pCMB y pCMBS siguen inhibiendo el transporte de manera importante indicando que la cisteína 291 no es su principal diana de inactivación.

Para determinar cual es la otra diana a la que se une MTSEA, se realizó un ensayo con MTSEA en SteT *cys/less* al que reintroducimos individualmente cada una de las cisteínas endógenas (figura 34a). Observamos que la única que posee un efecto de activación significativo es la cisteína 415, aunque el cambio observado aquí no justifica completamente el efecto observado en el experimento anterior (figura 33). Debido a la elevada velocidad de transporte observada en este mutante repetimos el experimento midiendo el transporte de serina a tiempos más cortos para asegurarnos estar en velocidad inicial (figura 34b). Pese a que el efecto del MTSEA fue ligeramente superior (146%) al calculado en el experimento anterior, todavía el incremento de actividad es menor al encontrado en el mutante SteT C291S (292%).

Es conocido que el DTT es capaz de eliminar el MTSET unido a cisteínas (Borre et al., 2002; Pal et al., 2006), por lo tanto decidimos probar si también era capaz de realizarlo en nuestros PLs como prueba adicional de la interacción del MTSET con una cisteína de SteT. Para ello realizamos un ensayo donde se añadió MTSET a la muestra, a continuación centrifugábamos para eliminar el MTSET, y finalmente hacíamos el tratamiento con DTT. Con posterioridad centrifugábamos para eliminar el DTT antes de realizar el transporte de L-serina en los SteT-PLs (figura 35). Se utilizó también una muestra control en la que no se añadió MTSET.

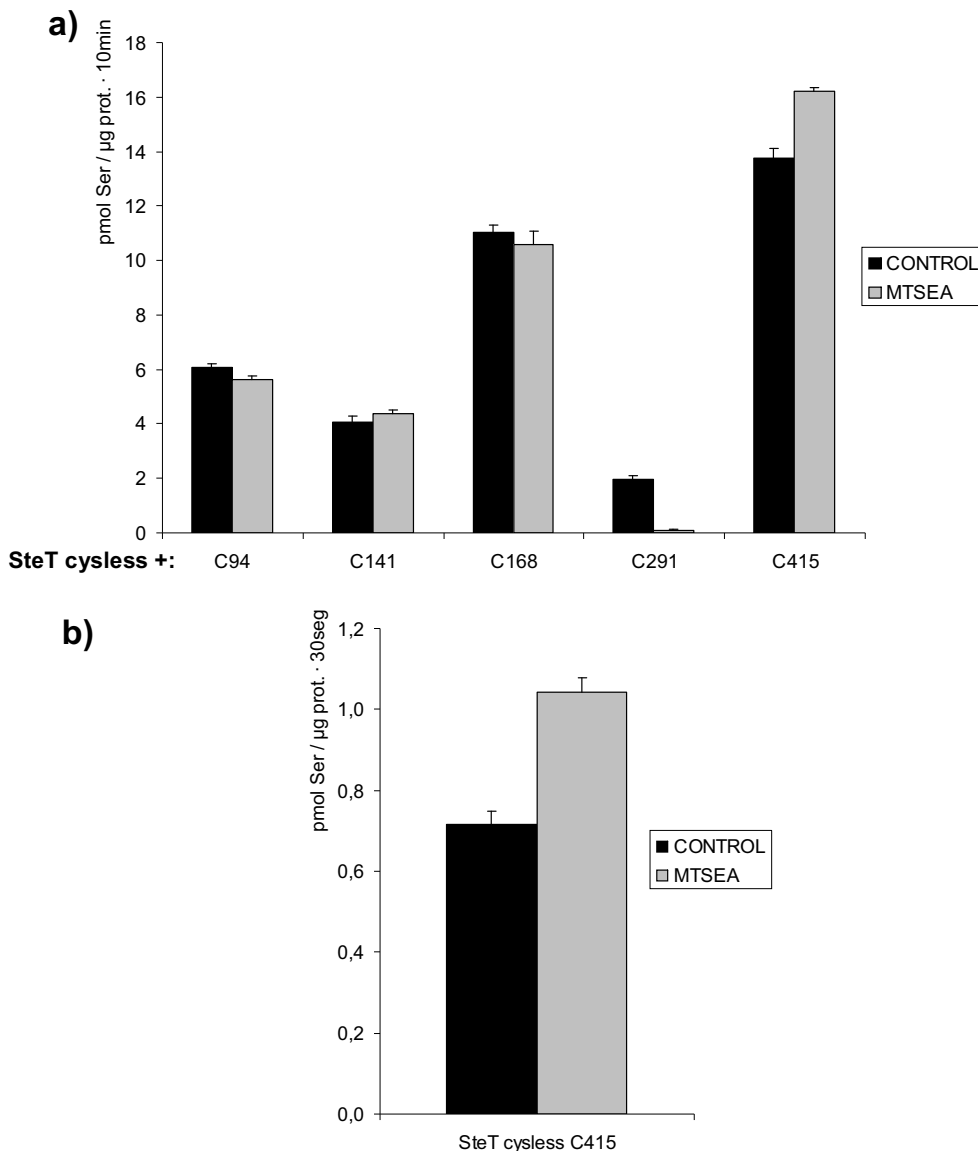


Figura 34. Efecto del MTSEA en mutantes de SteT defectivos de una cisteína. Los PLs de *cysless* C94, *cysless* C141, *cysless* C168, *cysless* C291 y *cysless* C415 purificados fueron tratados con 2.5 mM MTSEA o el volumen equivalente de DMSO durante 5 minutos a temperatura ambiente y ultracentrifugados para eliminarlos antes del transporte. a) El transporte de 10 μM L-serina marcada radiactivamente se midió durante 10 minutos en los diferentes SteT-PLs que contenían 4 mM de L-arginina o de L-serina. El transporte a través de SteT fue calculado sustrayendo el transporte en SteT-PLs que contenían L-arginina del obtenido por los que contenían L-serina. El transporte a través de los SteT-PLs que contenían L-arginina no se vio afectado por el MTSEA. De los SteT-PLs que contienen L-serina sólo el correspondiente a *cysless* C415 se estimuló significativamente con MTSEA, mientras que *cysless* C291 se inhibió significativamente como era de esperar. b) El transporte de 10 μM L-serina marcada radiactivamente se midió durante 30 segundos en los PLs de *cysless* C415 que contenían 4 mM de L-arginina o de L-serina. El transporte a través de SteT fue calculado sustrayendo el transporte en SteT-PLs que contenían L-arginina del obtenido por los que contenían L-serina. El transporte a través de los SteT-PLs que contenían L-arginina no se vio afectado por el MTSEA. En estas condiciones la estimulación es mayor y claramente significativa indicando que la C415 debe ser la diana que produce la estimulación en

SteT C291S, aunque es posible que no sea la única. Se muestra un experimento representativo. Cuando no se aprecian las barras de EEM es porque son menores que los símbolos.

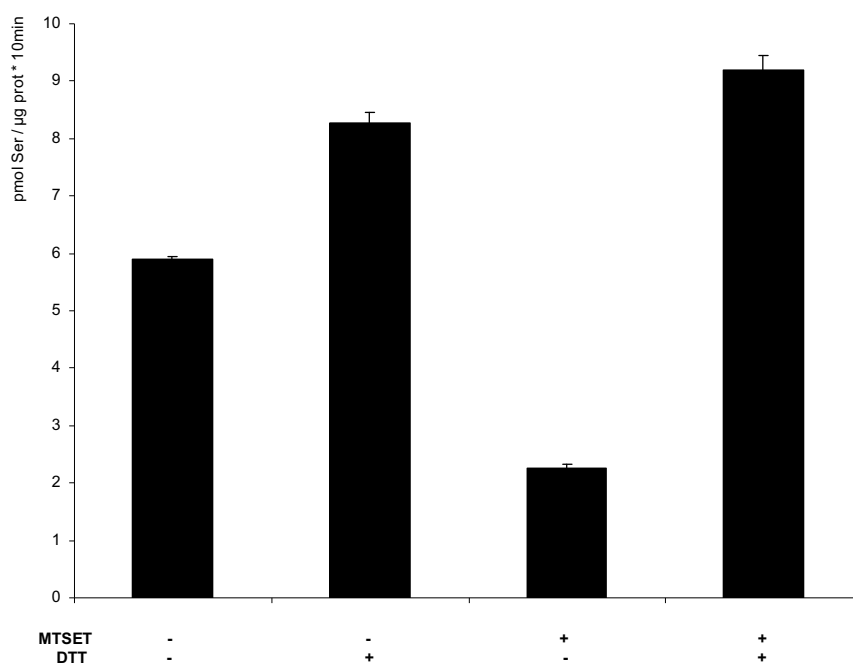


Figura 35. Efecto del DTT antes y después del tratamiento con MTSET en los SteT-PLs. Los PLs de SteT purificado fueron tratados con 1 mM MTSET o el volumen equivalente de DMSO durante 5 minutos a temperatura ambiente y ultracentrifugados para eliminarlo antes del tratamiento con 10 mM DTT durante 5 minutos a temperatura ambiente y ultracentrifugados de nuevo para eliminarlo antes del transporte. El transporte de 10 µM L-serina marcada radiactivamente se midió durante 10 minutos en los diferentes SteT-PLs que contenían 4 mM de L-arginina o de L-serina. El transporte a través de SteT fue calculado sustrayendo el transporte en SteT-PLs que contenían L-arginina del obtenido por los que contenían L-serina. El transporte a través de los SteT-PLs que contenían L-arginina no se vio afectado por el MTSET ni por el DTT. Vemos que la adición de MTSET produce una inhibición significativa, pero el posterior tratamiento con DTT no sólo lo revierte sino que al igual que el tratamiento sin MTSET y con DTT es capaz de activar significativamente el transporte. Se muestra un experimento representativo.

Observamos en la figura 35 que la adición de MTSET produce una inhibición del 72% (la media de 8 experimentos es de un $76 \pm 4\%$), pero el posterior tratamiento con DTT no sólo revierte este efecto, sino que siguiendo la línea de los experimentos posteriores, el tratamiento sin MTSET y con DTT es capaz de activar el transporte un 156 y un 140% respectivamente (la media de 7 experimentos es de un $156 \pm 6\%$).

Para ver si la modificación que libera el DTT es total o hay una población modificada y otra no, realizamos un experimento que nos permite cuantificar el efecto que produce un agente oxidante (cobre (1,10-fenantrolina)₂, CuPh) sobre la actividad tanto de SteT *cys/less* como de SteT (figura 36), de manera que si existe una población no modificada, que

teóricamente es la que genera el transporte cuando no hacemos el tratamiento con DTT, la oxidación con CuPh la bloquearía inactivando completamente el transportador.

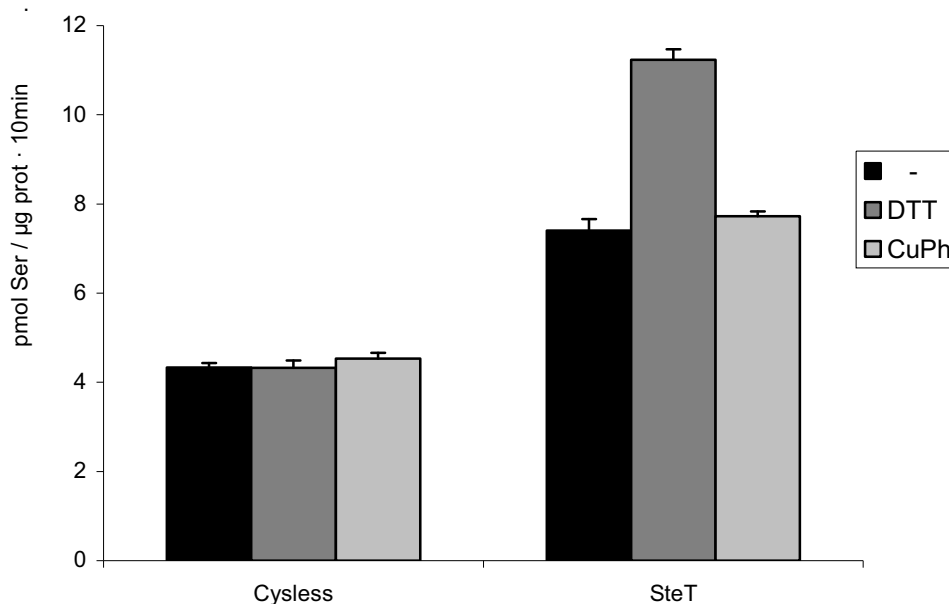


Figura 36. Efecto del DTT y de la CuPh en SteT y SteT *cysless*. Los PLs de SteT *cysless* y SteT purificados fueron tratados con 10 mM DTT o 100 µM CuPh durante 5 minutos a temperatura ambiente y ultracentrifugados para eliminarlos antes del transporte. El transporte de 10 µM L-serina marcada radiactivamente se midió durante 10 minutos en los diferentes SteT-PLs que contenían 4 mM de L-arginina o de L-serina. El transporte a través de SteT fue calculado sustrayendo el transporte en SteT-PLs que contenían L-arginina del obtenido por los que contenían L-serina. El transporte a través de los SteT-PLs que contenían L-arginina no se vio afectado ni por el DTT ni por la CuPh. De los SteT-PLs que contienen L-serina sólo el correspondiente a SteT se estimuló significativamente con DTT. El tratamiento con CuPh no produjo efectos significativos en ningún caso. Se muestra un experimento representativo.

Observamos que el tratamiento con CuPh no tiene ningún efecto significativo ni sobre SteT ni sobre SteT *cysless*, mientras que el efecto del DTT es específico de SteT y no se da en SteT *cysless*. Estos datos sugieren que el DTT reduciría una oxidación preexistente (p. e. un puente disulfuro) activando el transportador. Sin embargo, la actividad residual de SteT no parece deberse a la existencia de una población no modificada, sino más bien a que el bloqueo en el transporte no es total.

Decidimos explorar cuál de las cisteínas podría formar parte de este hipotético puente disulfuro. Por lo tanto decidimos ver el efecto del DTT en el transporte de mutantes de SteT donde las cisteínas fueron mutadas individualmente (figura 37).

Observamos que el DTT activa significativamente a SteT C94S, SteT C141S, SteT C168S y SteT C415S mientras que en SteT *cysless* y en SteT C291S el efecto es nulo. Esto indica que la cisteína 291 es la única diana que produce la estimulación y descarta que se trate

de un puente disulfuro entre dos cisteínas de la misma proteína. Además el hecho de que MTSET sea capaz de unirse a la cisteína 291 como hemos demostrado anteriormente (figuras 30, 31 y 32) es una prueba concluyente de que la cisteína 291 no está formando un puente disulfuro, ya que el MTSET no desplaza puentes disulfuro. Para acabar de demostrar que el efecto del DTT se producía únicamente a través de la cisteína 291 realizamos el ensayo del DTT en *cys/less* C291 produciendo una activación del 206% del transporte de L-serina (datos no mostrados).

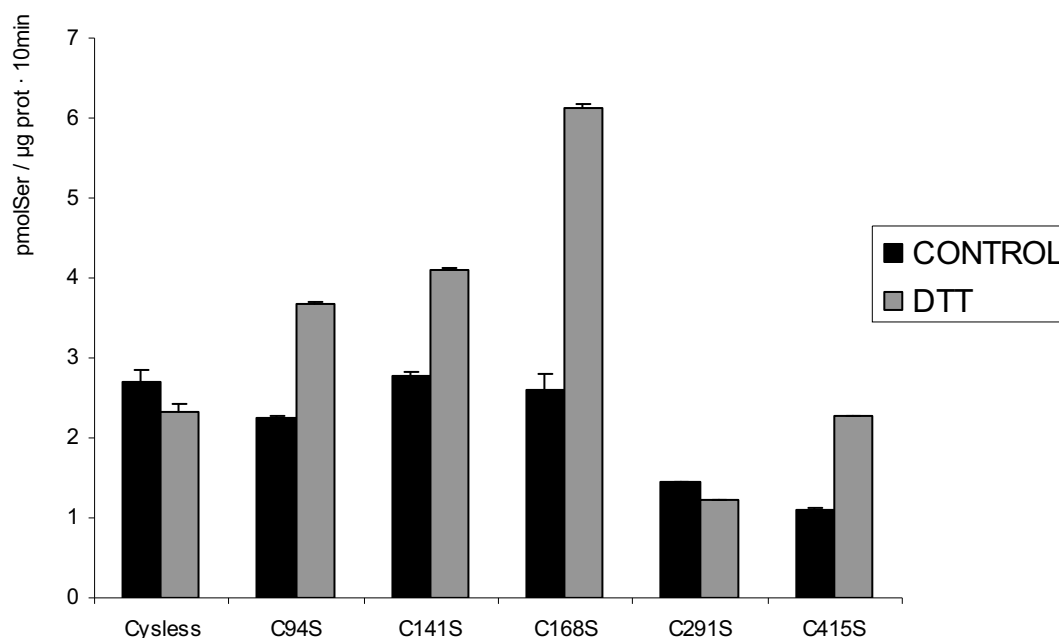


Figura 37. Efecto del DTT en mutantes de SteT defectivos de una cisteína. Los PLs de SteT *cys/less*, SteT C94S, SteT C141S, SteT C168S, SteT C291S y SteT C415S purificados fueron tratados con 10 mM DTT durante 5 minutos a temperatura ambiente y ultracentrifugados para eliminar el DTT antes del transporte. El transporte de 10 µM L-serina marcada radiactivamente se midió durante 10 minutos en los diferentes SteT-PLs que contenían 4 mM de L-arginina o de L-serina. El transporte a través de SteT fue calculado sustrayendo el transporte en SteT-PLs que contenían L-arginina del obtenido por los que contenían L-serina. El transporte a través de los SteT-PLs que contenían L-arginina no se vio afectado por el DTT. La estimulación por DTT se ha realizado 3 veces en SteT *cys/less* con una media del 87% y dos veces en SteT C291S con una media del 86%. Se muestra un experimento representativo. Cuando no se aprecian las barras de EEM es porque son menores que los símbolos.

3.2. Cisteína 291.

Hasta ahora sólo hemos encontrado un residuo interesante, la cisteína 291 en el segmento TM VIII, así que decidimos estudiar más profundamente las cisteínas endógenas de SteT y además con los conocimientos de la topología de xCT realizados en nuestro grupo por la Dra. E. Gasol (Gasol et al., 2004) decidimos construir mutantes únicos de cisteína en la zona

Resultados

del primer bucle reentrante y en la zona de un posible segundo bucle reentrante (datos no publicados) para estudiar su actividad y como les afecta el tratamiento con MTSET y DTT. En estas zonas además se han localizado residuos relevantes en transportadores de la superfamilia APC (ver apartado 3.2 de la Introducción).

El análisis de la actividad de los mutantes generados sobre SteT *cysless* reveló que la mutación del ápice del primer bucle reentrante (L78C en SteT) causa la completa inactivación del transportador, mientras que mutar dos residuos después (T80C) produce un mayor transporte que SteT *cysless*, casi recuperando la actividad de SteT (figura 38). Por otro lado el ápice del posible segundo bucle reentrante (K317C en SteT) tiene valores similares a SteT *cysless* mientras que la mutación del siguiente residuo (L318C) produce una fuerte inactivación del transportador.

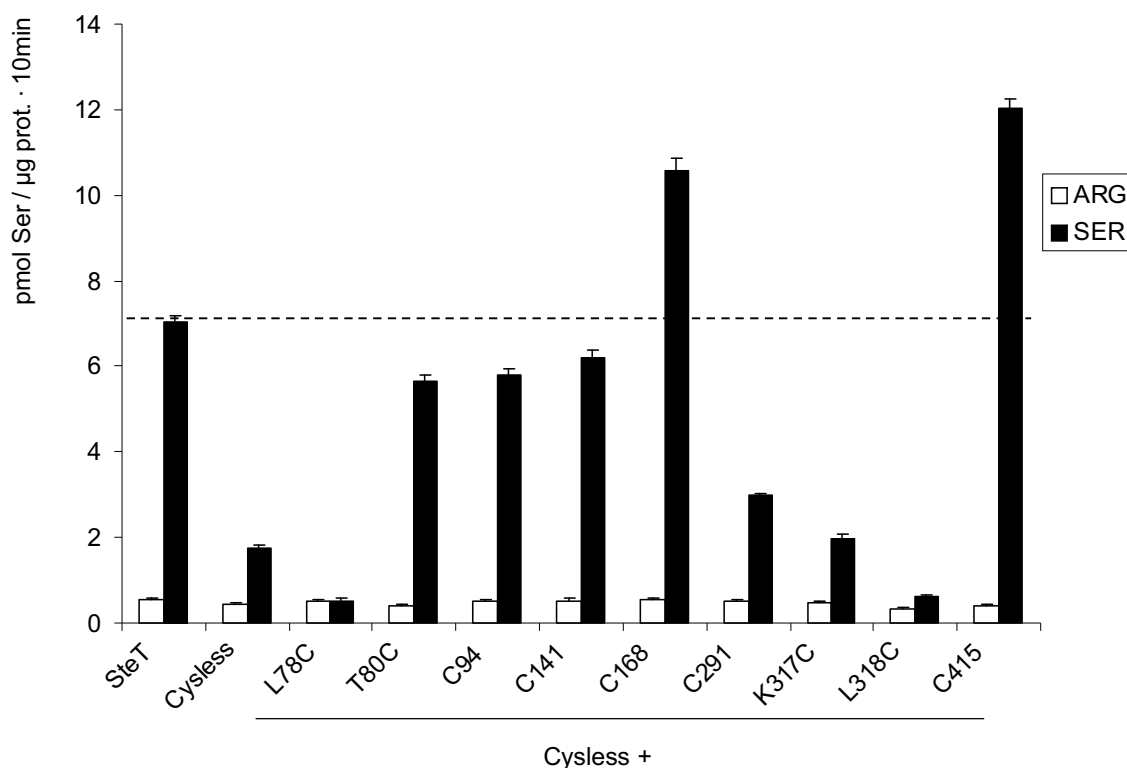


Figura 38. *Screening* de nuevos mutantes en zonas potencialmente relevantes de SteT. El transporte de 10 μ M L-serina marcada radiactivamente se midió durante 10 minutos en los PLs de SteT, SteT *cysless*, *cysless* L78C, *cysless* T80C, *cysless* C94, *cysless* C141, *cysless* C168, *cysless* C291, *cysless* K317C, *cysless* L318C y *cysless* C415 purificados que contenían 4 mM de L-arginina (barras blancas) o de L-serina (barras negras). La línea discontinua superior indica el transporte total de SteT. Se muestra un experimento representativo. Cuando no se aprecian las barras de EEM es porque son menores que los símbolos.

El análisis del efecto del MTSET y del DTT sobre estos mutantes no reveló ningún efecto relevante excepto en *cysless* C291 donde MTSET inhibe notoriamente el transporte y el DTT es capaz de estimularlo, repitiendo el patrón observado en SteT (figura 39).

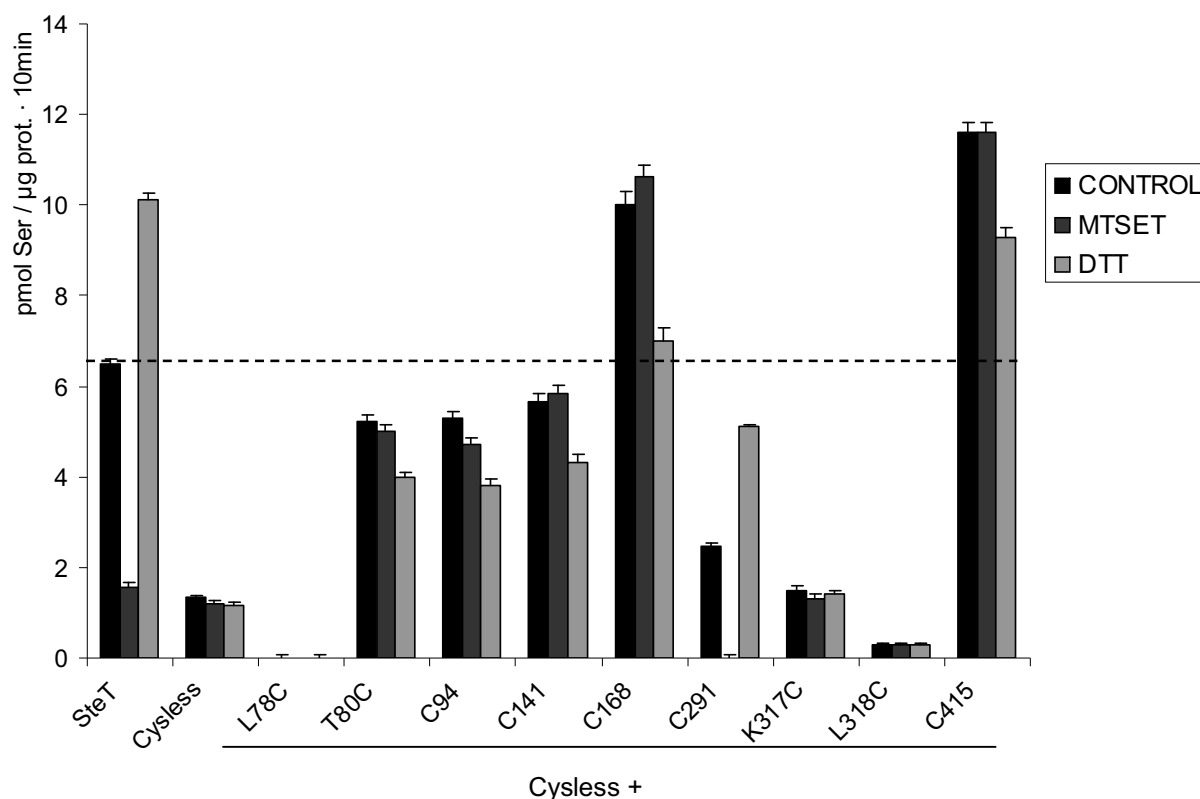


Figura 39. *Screening* de nuevos mutantes en zonas potencialmente relevantes de SteT. Los PLs de SteT, SteT *cysless*, *cysless* L78C, *cysless* T80C, *cysless* C94, *cysless* C141, *cysless* C168, *cysless* C291, *cysless* K317C, *cysless* L318C y *cysless* C415 purificados fueron tratados con 1 mM MTSET o 10 mM DTT durante 5 minutos a temperatura ambiente y ultracentrifugados para eliminarlos antes del transporte. El transporte de 10 μ M L-serina marcada radiactivamente se midió durante 10 minutos en los PLs que contenían 4 mM de L-arginina o de L-serina. El transporte a través de los diferentes mutantes de SteT fue calculado sustrayendo el transporte de los que contenían L-arginina del obtenido por los que contenían L-serina. El transporte a través de los SteT-PLs que contenían L-arginina no se vio afectado por los reactivos de cisteína. De los que contenían L-serina el más relevante es sin duda el *cysless* C291, situado en medio del TM VIII pero aún así accesible a ambos reactivos, ya que reproduce el comportamiento de SteT. La línea discontinua indica el transporte neto de SteT. Se muestra un experimento representativo. La inhibición de *cysless* L78C con MTSET no se realizó. Cuando no se aprecian las barras de EEM es porque son menores que los símbolos.

En vista de estos resultados decidimos analizar más en detalle los efectos observados en la cisteína 291. Para ello estudiamos si éramos capaces de proteger por sustrato el efecto del MTSET tanto en SteT como en *cysless* C291 y para ello comparamos el transporte de L-serina resultante del tratamiento con MTSET en un medio sin aminoácidos o con L-arginina (no es sustrato de SteT como se vio en la figura 21) con el resultante de proteger con L-serina (figura 40).

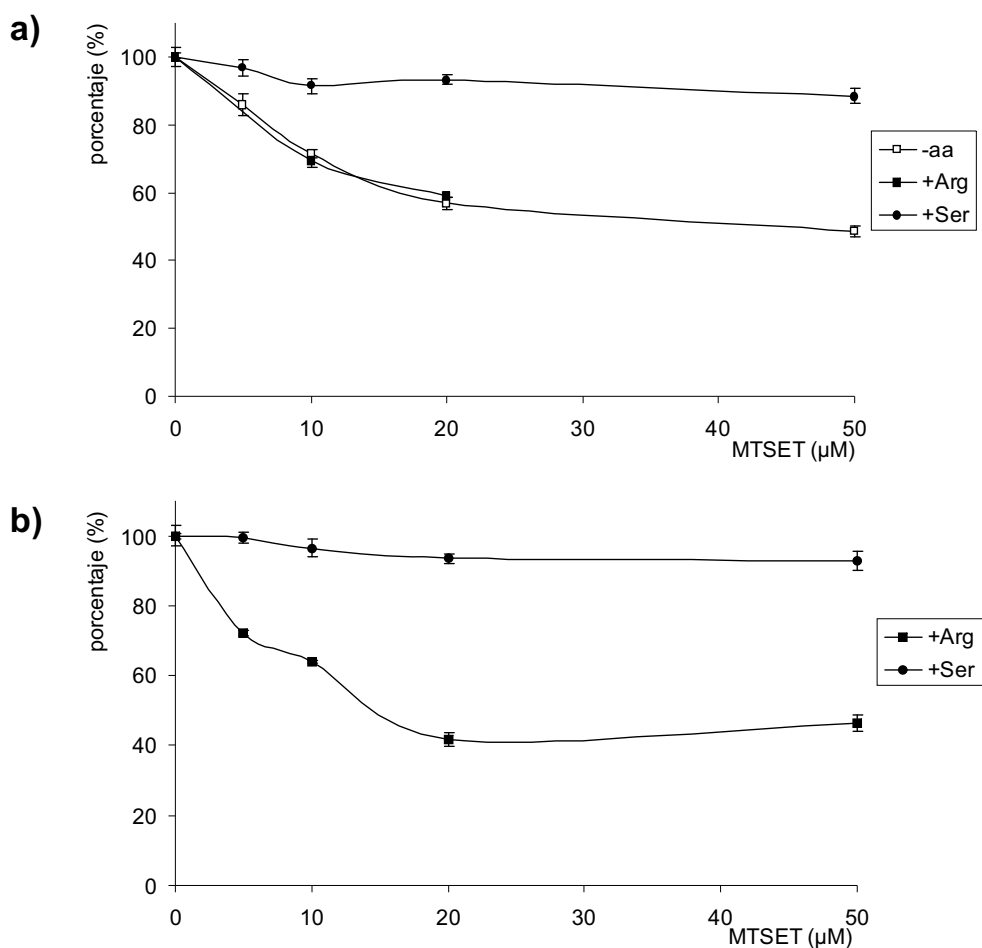


Figura 40. Protección del efecto del MTSET en SteT y en *cysless* C291. Los PLs de SteT (a) y *cysless* C291 (b) purificados fueron tratados con la cantidad indicada en cada caso de MTSET durante 5 minutos a temperatura ambiente en un tampón que contenía 30 mM L-serina (+Ser), 30 mM L-arginina (+Arg) o ningún amino ácido (-aa) y ultracentrifugados para eliminar tanto el MTSET como la L-serina y la L-arginina antes del transporte. El transporte de 10 μM L-serina marcada radiactivamente se midió durante 10 minutos en los PLs que contenían 4 mM de L-arginina o de L-serina. El transporte a través de los diferentes mutantes de SteT fue calculado sustrayendo el transporte de los que contenían L-arginina del obtenido por los que contenían L-serina. El transporte a través de los SteT-PLs que contenían L-arginina no se vio afectado por los reactivos de cisteína. Se representa el porcentaje de transporte resultante respecto al transporte neto de 10 μM L-serina marcada radiactivamente a 10 minutos en cada caso. Se muestra un experimento representativo. Cuando no se aprecian las barras de EEM es porque son menores que los símbolos.

Como se puede observar en la figura 40 hay una protección específica del efecto del MTSET por sustrato tanto en SteT como en *cysless* C291. Así, L-serina es capaz de proteger, mientras que L-arginina (no es sustrato de ninguno de ellos) es indistinguible de no añadir ningún aminoácido.

En la tabla 6 se muestra un resumen de las protecciones alcanzadas:

MTSET	4 mM Ser	30 mM Ser
5 μ M		88% (n=2)
10 μ M	59% (n=1)	88% (n=5)
20 μ M		90% (n=3)
50 μ M		60% (n=4)
100 μ M	15% (n=2)	24% (n=1)

Tabla 6. Resumen de la protección por sustrato. El porcentaje de protección de la inhibición de MTSET del transporte de L-serina mediado por SteT-PLs se calcula como 100 multiplicado por la resta entre el transporte con L-serina menos el transporte sin L-serina protegiendo a esa concentración de MTSET y todo ello dividido por el transporte de L-serina cuando no se añade MTSET menos el transporte de sin L-serina protegiendo a esa concentración de MTSET. La protección es específica ya que no hay diferencias entre no añadir aminoácidos o añadir 30 mM L-arginina.

Los resultados muestran que en SteT cuando la protección se realiza con 4 mM L-serina se consigue un 59% de protección de la inactivación por 10 μ M MTSET, mientras que si la protección se realiza con 30 mM L-serina se alcanza una protección alrededor del 90% para concentraciones de MTSET de 5 a 20 μ M. Esto apunta a una EC_{50} menor de 4 mM, que estaría en el rango de 1-2 mM, un valor similar al de la K_M aparente de SteT. Este resultado es similar al obtenido por la Dra. M. Jiménez-Vidal en nuestro laboratorio con el efecto de pCMB y pCMBS sobre la cisteína 327 del segmento TM VIII de xCT (Jiménez-Vidal et al., 2004).

3.3. El segmento transmembrana VIII:

3.3.1 Actividad de mutantes únicos de cisteína.

En vista de que el residuo más interesante de SteT identificado en nuestros estudios, era la cisteína 291 que teóricamente se encuentra en medio del segmento TM VIII, se realizaron mutaciones de los residuos colindantes a la C291 sobre la base del *cysless* para poder estudiar posteriormente los efectos de MTSET y DTT.

El análisis de la actividad de los mutantes del segmento TM VIII en PLs que contenían L-arginina o L-serina deparó varias sorpresas (figura 41).

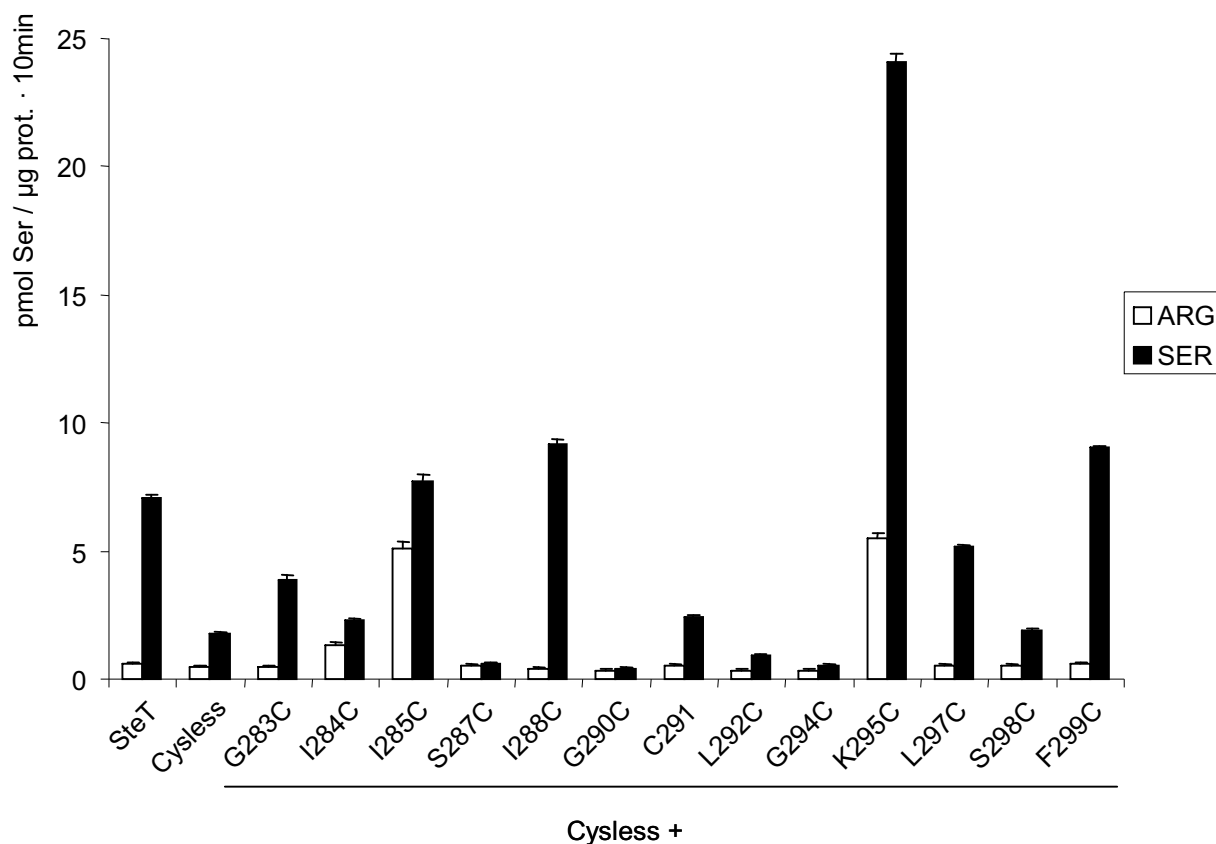


Figura 41. *Screening* de nuevos mutantes en el segmento TM VIII de SteT. El transporte de 10 μ M L-serina marcada radiactivamente se midió durante 10 minutos en los PLs de SteT, SteT *cysless*, *cysless* G283C, *cysless* I284C, *cysless* I285C, *cysless* S287C, *cysless* I288C, *cysless* G290C, *cysless* C291, *cysless* L292C, *cysless* G294C, *cysless* K295C, *cysless* L297C, *cysless* S298C y *cysless* F299C purificados que contenían 4 mM de L-arginina (barras blancas) o de L-serina (barras negras). La línea discontinua superior indica el transporte total de SteT. Los mutantes señalados por una cabeza negra de flecha muestran un transporte muy por encima de la Ley de Fick en los PLs que contienen L-arginina (el resultado para *cysless* I284C es aún preliminar). Se muestra un experimento representativo. Cuando no se aprecian las barras de EEM es porque son menores que los símbolos.

Como se observa en la figura los mutantes *cysless* I285C y *cysless* K295C y en menor medida (es un resultado aún preliminar) *cysless* I284C (señalados por una cabeza de flecha negra) presentan un elevado transporte en PLs que contienen L-arginina, muy por encima de la estimación de la Ley de Fick. Esto puede deberse a que hemos desacoplado el transportador, o bien que debido a las mutaciones L-arginina ha pasado a ser sustrato del transportador y por tanto es capaz de transestimular el transporte de L-serina.

En el caso del mutante *cysless* K295C el transporte en los PLs que contienen L-serina está también muy elevado siendo incluso varias veces superior al de SteT y un orden de magnitud superior al de SteT *cysless*. También presentan una elevada actividad intrínseca los mutantes *cysless* I285C, *cysless* I288C y *cysless* F299C, situándose incluso por encima de la

de SteT. Debido a su elevada actividad estos mutantes no se encuentran en velocidad lineal en estas condiciones por lo que repetimos el transporte usando un tiempo de 30 segundos (resultados no mostrados). En condiciones lineales, la velocidad inicial de *cysless* K295C es 53 veces superior a la de SteT y 260 veces la de SteT *cysless*.

El análisis de los efectos del MTSET y del DTT deparó aún más sorpresas (figura 42):

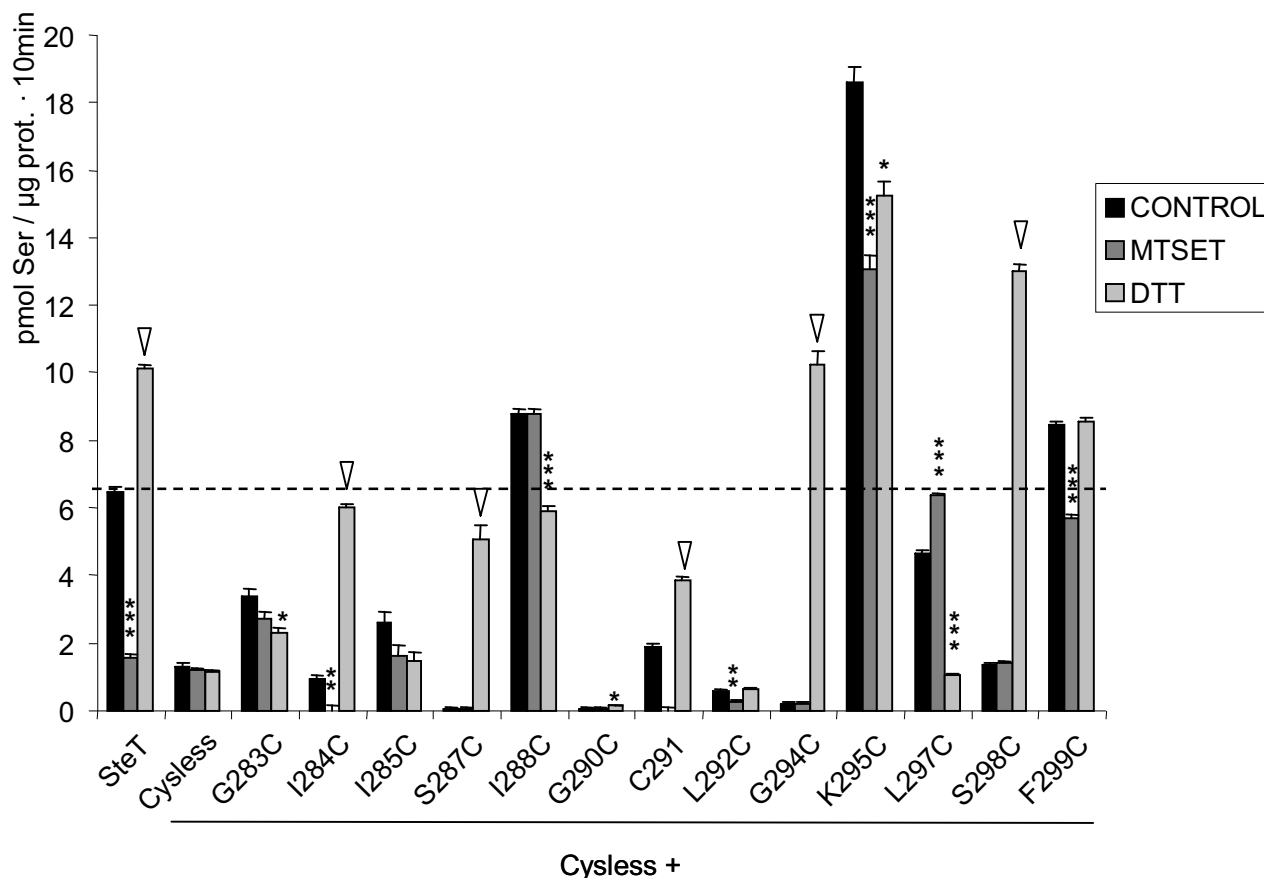


Figura 42. *Screening* de nuevos mutantes en el segmento TM VIII de SteT. Los PLs de SteT, SteT *cysless*, *cysless* G283C, *cysless* I284C, *cysless* I285C, *cysless* S287C, *cysless* I288C, *cysless* G290C, *cysless* C291, *cysless* L292C, *cysless* G294C, *cysless* K295C, *cysless* L297C, *cysless* S298C y *cysless* F299C purificados fueron tratados con 1 mM MTSET o 10 mM DTT durante 5 minutos a temperatura ambiente y ultracentrifugados para eliminarlos antes del transporte. El transporte de 10 μ M L-serina marcada radiactivamente se midió durante 10 minutos en los PLs que contenían 4 mM de L-arginina o de L-serina. El transporte a través de los diferentes mutantes de SteT fue calculado sustrayendo el transporte de los que contenían L-arginina del obtenido por los que contenían L-serina. El MTSET inhibe significativamente además de en SteT, en los mutantes *cysless* I284C, *cysless* C291, *cysless* L292C, *cysless* K295C y *cysless* F299C, mientras que en el mutante *cysless* L297C activa significativamente. El DTT produce activaciones significativas en mutantes como el *cysless* I284C, *cysless* S287C, *cysless* G290C, *cysless* C291, *cysless* G294C y *cysless* S298C que están señalados por una cabeza de flecha vacía, mientras que en los mutantes *cysless* G283C, *cysless* I288C, *cysless* K295C y *cysless* L297C inhibe significativamente. La línea discontinua indica el transporte neto de SteT. Se muestra un

experimento representativo. Cuando no se aprecian las barras de EEM es porque son menores que los símbolos.

3.3.2 Efecto del MTSET.

No parece casualidad la periodicidad de los residuos que presentan inhibición por MTSET al ser mutados a cisteína: I284, C291, L292, K295 y F299, ya que es justamente la periodicidad de una hélice α , indicando claramente que sólo la unión del MTSET a los residuos situados en esa cara de la hélice es capaz de bloquear el transporte, probablemente al producir la obturación del poro por el que pasa el sustrato, aunque no se puede descartar alteraciones en los movimientos conformacionales durante el ciclo de transporte. El residuo I288 no se ve afectado por el tratamiento con MTSET, al igual que el residuo S287, pero debido a la nula actividad de este último si no se realiza un tratamiento previo con DTT, cuyo efecto sobre el posterior tratamiento con MTSET no es conocido, no podemos sacar conclusiones definitivas sobre el efecto del MTSET en esta posición, aunque no parece ser importante.

3.3.3 Efecto del DTT.

Al igual que el efecto del MTSET, el hecho de que los residuos que presentan activación por el tratamiento con DTT se encuentren cada 3-4 residuos no parece casualidad. Sorprendentes son los casos de *cys/less* S287C y *cys/less* G294C que pasan de estar prácticamente inactivos a tener una actividad similar a la de SteT y muy superior a la de SteT *cys/less* (el transporte total de estos mutantes se multiplica por 9 y 20 respectivamente). El efecto de activación del DTT es también muy potente en los mutantes *cys/less* I284C y *cys/less* S298C donde este tratamiento multiplica el transporte neto (descontado ya el transporte inespecífico) por 6 y por 10 respectivamente. Por el contrario, la fuerte inhibición que provoca el tratamiento con DTT en el mutante *cys/less* L297C parece indicar que el transportador prefiere tener un residuo voluminoso en esta posición, ya que además de inhibir el transporte neto un 80% por la acción del DTT, la unión de MTSET en esta posición lo estimula un 137%.

Una vez visto que el efecto del DTT no se circunscribe a la cisteína 291, sino que su efecto es incluso mucho más potente en otros residuos, nos dispusimos a estudiar más en profundidad dicho efecto. Para tal fin lo primero que realizamos fue una dosis respuesta de DTT para determinar su EC_{50} (figura 43).

Como se puede ver en la figura 43 el tratamiento que realizamos con 10 mM DTT ya consigue el efecto máximo. De hecho aunque no se muestra en la figura, el tratamiento con 50 mM DTT en *cys/less* G294C no produjo ningún aumento del efecto respecto el tratamiento con 10 mM. La media de dos experimentos fue analizada mediante el programa Graph Pad y se

calculó una EC_{50} del DTT de $186 \pm 42 \mu\text{M}$ ($r = 0.997$) para *cysless* S287C y de $160 \pm 34 \mu\text{M}$ ($r = 0.992$) para *cysless* G294C.

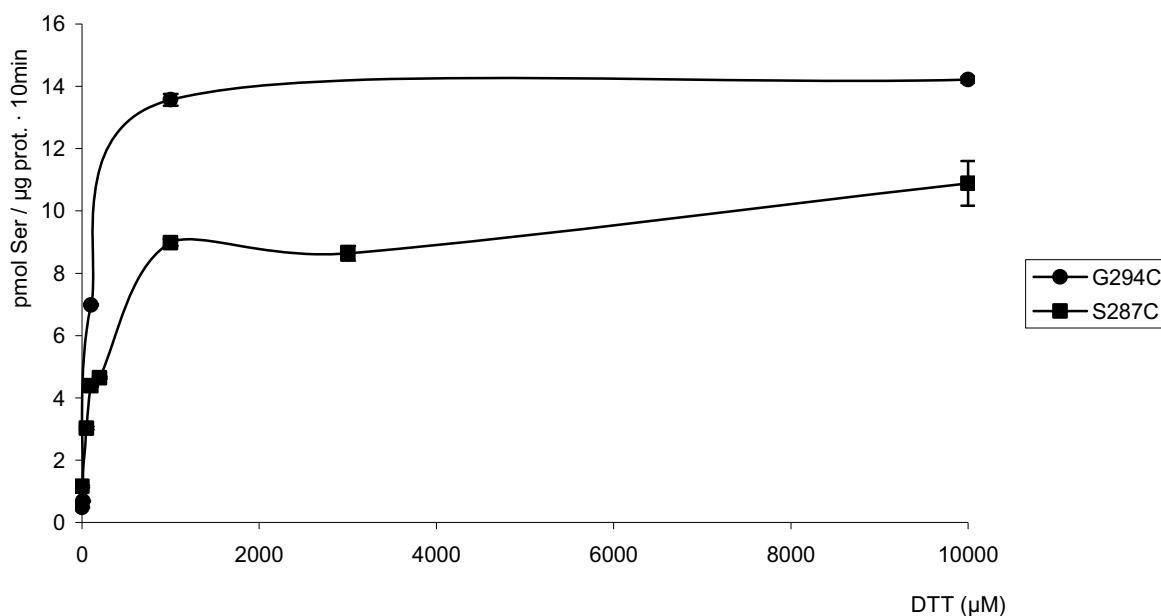


Figura 43. Determinación del EC_{50} del DTT en *cysless* G294C y *cysless* S287C. Los PLs de *cysless* G294C y de *cysless* S287C purificados fueron tratados con 0, 10 μM , 100 μM , 1 mM, 10 mM o 50 mM DTT durante 5 minutos a temperatura ambiente y ultracentrifugados para eliminar el DTT antes del transporte. El transporte de 10 μM L-serina marcada radiactivamente se midió durante 10 minutos en los PLs que contenían 4 mM de L-arginina o de L-serina. El transporte neto a través de los PLs fue calculado sustrayendo el transporte de los que contenían L-arginina del obtenido por los que contenían L-serina. Se muestra un experimento representativo de cada mutante. Cuando no se aprecian las barras de EEM es porque son menores que los símbolos.

Para estudiar si el efecto del DTT era protegible por sustrato, en vez de realizar el tratamiento con 10 mM DTT, lo realizamos con 100 μM , una dosis suficientemente grande para apreciar un efecto significativo en *cysless* G294C pero no demasiado como para no poder ver los efectos de protección por el sustrato en caso de haberlos (figura 44).

Como se puede apreciar en la figura 44 el efecto de 100 μM DTT sigue siendo muy grande en *cysless* G294C cuando no se añade el sustrato durante el tratamiento, pero este decae cuanto más sustrato se añade consiguiendo una protección de hasta el 70% del efecto cuando se añade 15 mM de L-serina. Además el análisis mediante el programa Graph Pad calculó una $EC_{50} = 1.1 \pm 0.2 \text{ mM}$ con una $r = 0.95$. La EC_{50} de protección coincide exactamente con la K_M aparente del sustrato, lo cual implica que *cysless* G294C une sustrato y que su defecto es de $V_{\text{máx}}$, probablemente indicando que el DTT está liberando algo que obstruye el paso del sustrato o impide los movimientos conformacionales necesarios para el transporte, pero no bloquea la unión del sustrato.

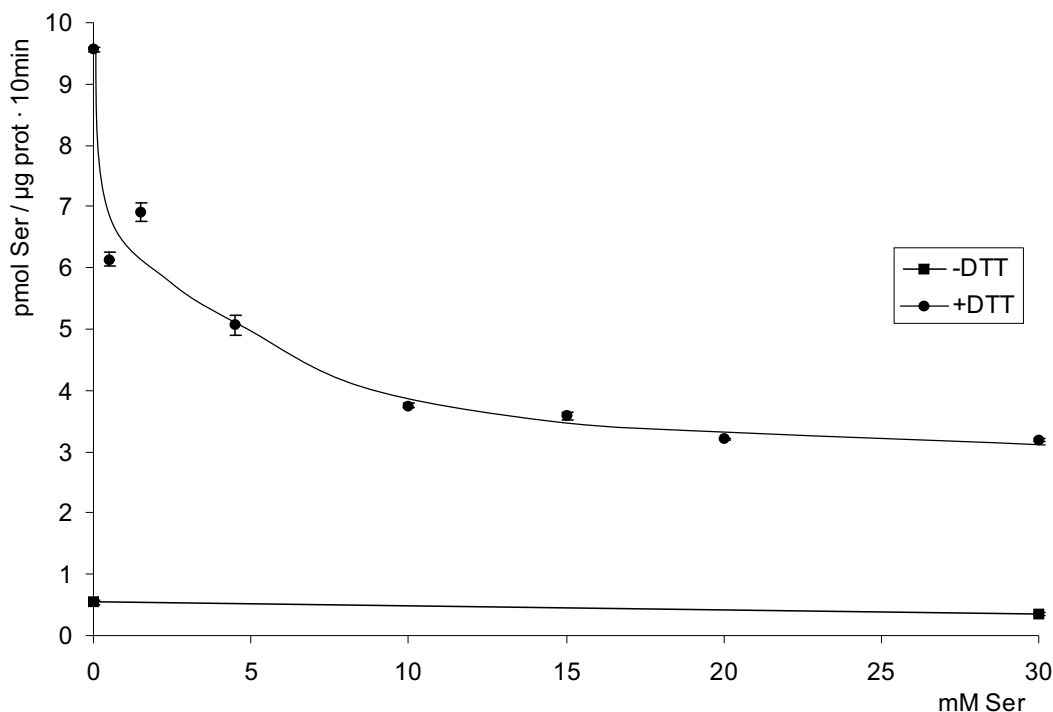


Figura 44. Protección del efecto del DTT en *cysless* G294C. Los PLs de *cysless* G294C purificados fueron tratados con 0 (-DTT) o con 100 μ M DTT (+DTT) durante 5 minutos a temperatura ambiente y ultracentrifugados para eliminar el DTT antes del transporte. El transporte de 10 μ M L-serina marcada radiactivamente se midió durante 10 minutos en los PLs que contenían 4 mM de L-arginina o de L-serina. El transporte neto a través de los PLs fue calculado sustrayendo el transporte de los que contenían L-arginina del obtenido por los que contenían L-serina. Se muestra un experimento representativo. Cuando no se aprecian las barras de EEM es porque son menores que los símbolos.

Si realizamos una cinética con los dos mutantes con mayor efecto del DTT obtenemos con el programa Graph Pad una K_M aparente de $654 \pm 94 \mu\text{M}$ y una $V_{m\acute{a}x}$ estimada de 43 ± 2 pmol/ μg proteína \cdot min ($r = 0.98$) para *cysless* G294C (figura 45) y una K_M aparente de $566 \pm 59 \mu\text{M}$ y una $V_{m\acute{a}x}$ estimada de 44 ± 1 pmol/ μg proteína \cdot min ($r = 0.991$) para *cysless* S298C (datos no mostrados). Los valores determinados para SteT (ver figura 17b en Antecedentes) eran una K_M aparente de 1.2 ± 0.2 mM y una $V_{m\acute{a}x}$ estimada de 67 ± 4 pmol/ μg proteína \cdot min ($r = 0.995$). La disminución de la K_M aparente a la mitad no justifica un efecto de 20 y 10 veces de activación por DTT en *cysless* G294C y *cysless* S298C respectivamente.

3.3.4 Residuos K295 e I285.

Además del efecto del MTSET y del DTT, hemos encontrado dos residuos relevantes para el transporte, ya que sus mutaciones a cisteína en entorno *cysless* producen un elevado transporte de L-serina cuando hay L-arginina en el interior de los PLs y además la mutación K295C produce un transporte muy superior ya no al *cysless*, sino al propio SteT.

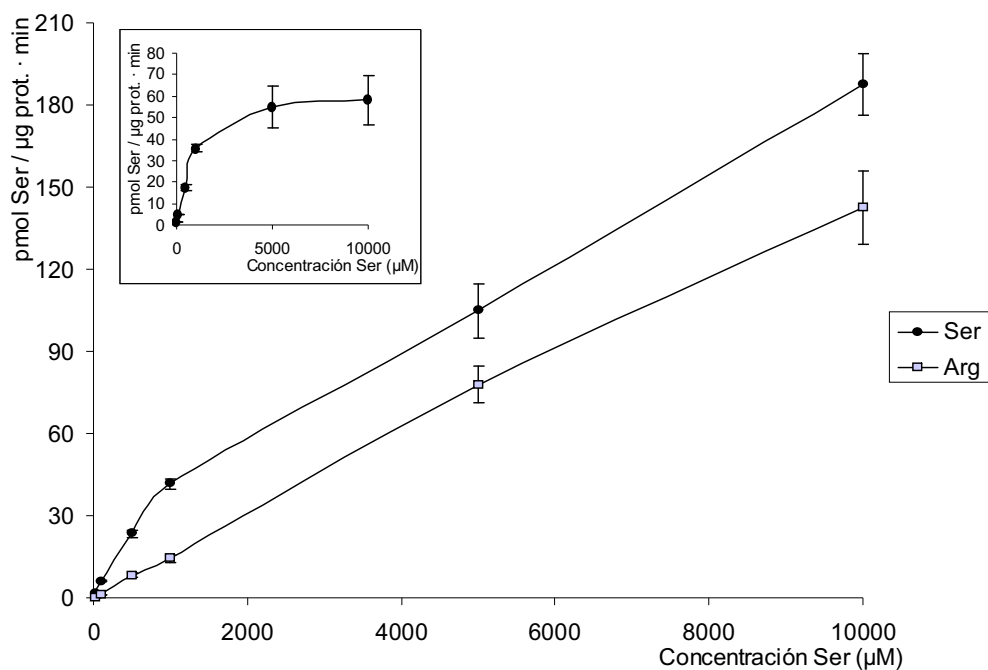


Figura 45. Cinética de *cys/less* G294C. Los PLs de *cys/less* G294C purificados fueron tratados con 10 mM DTT durante 5 minutos a temperatura ambiente y ultracentrifugados para eliminar el DTT antes del transporte. El transporte de L-serina marcada radiactivamente a diferentes concentraciones externas (0.01, 0.1, 0.5, 1, 5 y 10 mM) fueron medidas en PLs de *cys/less* G294C que contenían 15 mM L-serina o L-arginina en condiciones lineales. En el recuadro interior se muestra el transporte transestimulado que fue calculado sustrayendo el transporte en SteT-PLs que contenían L-arginina de los obtenidos por los que contenían L-serina. Se muestra un experimento representativo con 3 réplicas por condición. Cuando no se aprecian las barras de EEM es porque son menores que los símbolos.

Para estudiar la naturaleza de la activación de esta mutación realizamos más mutaciones en la posición 295 sobre la base del *cys/less*, generando mutantes que en esta posición tuvieran una Gly (K295G), una Leu (K295L), una Arg (K295R) o un Glu (K295E). El mutante *cys/less* K295E no se sobreexpresaba (se probó con dos clones del mutante diferentes en dos experimentos diferentes) con lo que no se pudieron hacer estudios de actividad. Los mutantes *cys/less* K295L y *cys/less* K295R se sobreexpresaban poco, pero suficiente para poder hacer estudios de actividad corrigiendo por proteína (figura 46).

En la figura 46 se observa que los mutantes *cys/less* K295L y *cys/less* K295R están completamente inactivos y el único mutante que mantiene cierta actividad es *cys/less* K295G, aunque muy inferior a la de *cys/less* K295C. Esto nos indica que la elevada actividad en esta posición es debido a la presencia de una cisteína y no a tener un aminoácido más pequeño (el mutante *cys/less* K295G tiene actividad pero mucho menor que *cys/less* K295C y el mutante *cys/less* K295L que posee una cadena lateral de tamaño superior a *cys/less* K295C está completamente inactivo). Además le resulta muy perjudicial para la actividad tener en esta posición un aminoácido cargado, ya sea positivamente (el mutante *cys/less* K295R está

Resultados

completamente inactivo) o negativamente (el mutante *cysless* K295E ni siquiera se sobreexpresa probablemente por problemas de plegamiento). Cabe destacar que *per se* la mutación K295C en el *cysless* aumenta 260 veces la actividad, pero la presencia de esta lisina en la posición 295 de SteT no es un error de secuenciación, ya que otros miembros de la superfamilia APC como el Threonine-transporter también presentan una lisina en esta posición y tienen una gran actividad de transporte en las mismas condiciones que SteT (experimento realizado por M. Ratera en nuestro laboratorio).

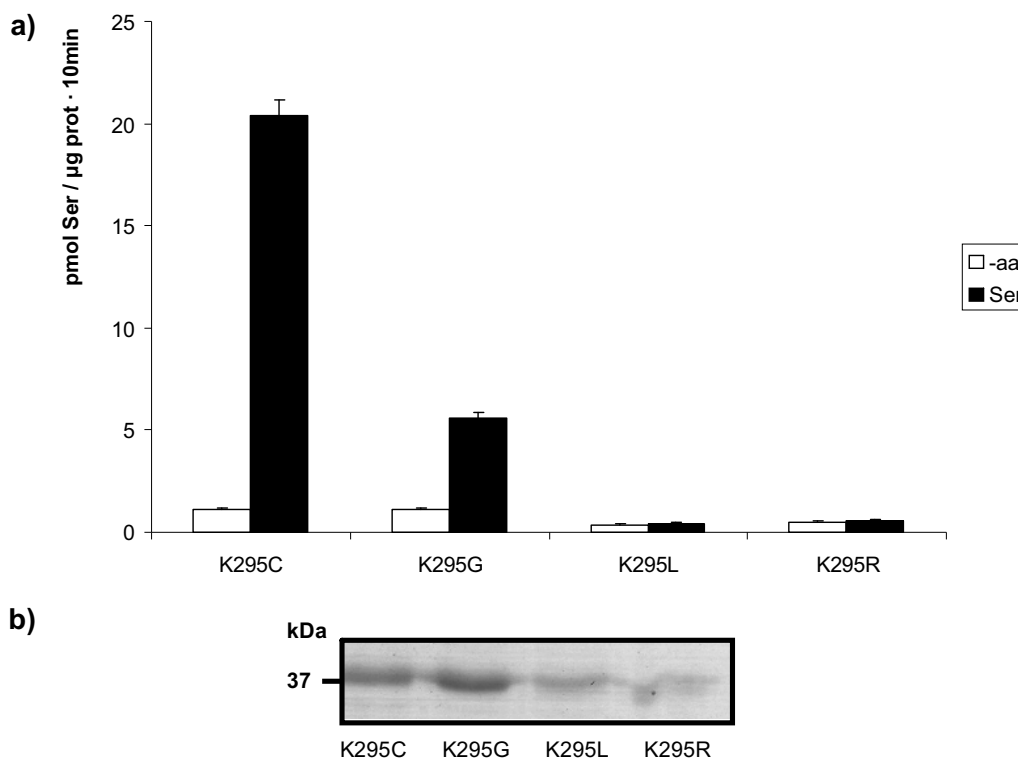


Figura 46. Efecto de las sustituciones en la posición 295 de SteT *cysless*. a) El transporte de 10 μ M L-serina marcada radiactivamente se midió durante 10 minutos en los PLs de *cysless* K295C, *cysless* K295G, *cysless* K295L, *cysless* K295R y *cysless* K295E purificados que contenían nada (barras blancas) o 4 mM de L-serina (barras negras). Se muestra un experimento representativo. b) *Coomassie Brilliant Blue* donde se cargó 10 μ L de cada uno de los mutantes purificados antes de reconstituirlos. Se aprecia que las purificaciones de *cysless* K295C y *cysless* K295G fueron aceptables mientras que las de *cysless* K295L y *cysless* K295R fueron mediocres debido a la baja sobreexpresión en las membranas de *E. coli*. Cuando no se aprecian las barras de EEM es porque son menores que los símbolos.

El siguiente paso fue hacer una cinética de entrada de L-serina en PLs de *cysless* K295C que contenían L-serina y L-arginina (figura 47).

En la cinética de entrada de *cysless* K295C podemos observar un *overshoot* mucho más grande que con SteT (figura 20a), ya que como hemos comentado anteriormente es 53 veces más rápido que SteT y 260 veces que SteT *cysless* en velocidad inicial. Para comprobar

si el efecto que produce este aumento es sobre la K_M aparente o sobre la $V_{m\acute{a}x}$, intentamos realizar una cinética de transporte para *cysless* K295C, pero debido a su elevadísima actividad de transporte no fue posible, ya que perdimos la linealidad en los puntos de mayor concentración y posiblemente también un poco en los de menor concentración. A pesar de ello podemos asegurar que la $V_{m\acute{a}x}$ está clarísimamente aumentada respecto SteT, aunque no podemos decir si también está afectada la K_M aparente.

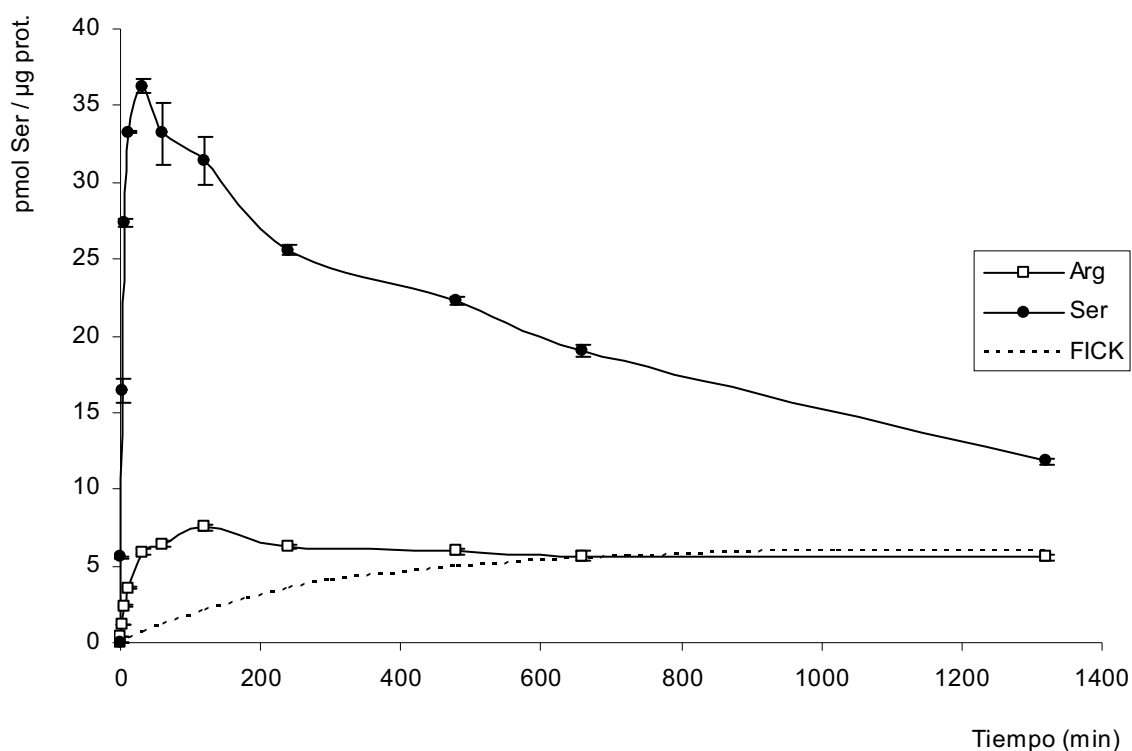


Figura 47 Cinética de entrada de L-serina a través del tiempo en PLs de *cysless* K295C (K295C-PLs). Entrada (pmol/mg proteína) de 10 μ M L-serina marcada radiactivamente en K295C-PLs que contienen 4 mM L-serina (círculos negros) o L-arginina (cuadrados blancos). Los datos corresponden a un experimento representativo, realizado con 3 réplicas. Cuando no se aprecian las barras de EEM es porque son menores que los símbolos. Otro experimento adicional dio resultados similares. Las líneas discontinuas corresponden a la Ley de Fick calculada con SteT-PLs. Se aprecia un ligero *overshoot* en los K295C-PLs que contienen L-arginina. L-arginina no es sustrato de SteT (ver figura 21) luego, o bien hemos desacoplado el transportador, o L-arginina es sustrato de *cysless* K295C, aunque con menor eficiencia que L-serina.

Si se confirmara que el aumento de 53 veces de la velocidad inicial es debido a un efecto únicamente sobre la $V_{m\acute{a}x}$ del transportador, esto aumentaría el *turnover* de nuestro transportador hasta 3 s^{-1} , lo cual lo situaría en el rango alto de los transportadores de membrana purificados y reconstituidos como se puede observar en la tabla 7.

Resultados

PROTEINA	TURNOVER (segundo ⁻¹)	SUSTRATO	FUENTE	BIBLIOGRAFIA
SteT	0.06	SERINA	<i>E. coli</i>	Reig et al. 2007
hSLGT	6	GLUCOSA	<i>Pichia Pastoris</i>	Web 2
vSLGT	0.4	GALACTOSA	<i>Vibrio Parahaemolyticus</i>	Turk et al. 2000
PutP	1	PROLINA	<i>E. coli</i>	Turk et al. 2000
Lactose:H+ symporter	3 - 4	LACTOSA	<i>E. coli</i>	Wright et al. 1984
K+/H+ antiporter	1000	K+	Rata	Li et al. 1990
CFTR	0.2	ATP	Células epiteliales	Kogan et al. 2002
CFTR	1	Cl-	Células epiteliales	Bear et al. 1997
Mannose phosphotransferase	1.2	MANOSA	<i>E. coli</i>	Mao et al. 1995
PTS (phosphotransferase system)	4	MANITOL	<i>E. coli</i>	Elferink et al. 1990
Na+/glucose transporter	4	GLUCOSA	Brush border	Peerce et al. 1990
Histidine periplasmic permease	0.02	HISTIDINA	<i>Salmonella Typhimurium</i>	Bishop et at. 1989
UhpT	20	AZUCAR-PI	<i>E. coli</i>	Tamai et al 1997

Tabla 7. Tabla resumen de *turnover* de proteínas de membrana purificadas y reconstituidas. Vemos que el valor del *turnover* de SteT, $0.06s^{-1}$, está en el rango bajo de *turnover* que varía desde $0.02 s^{-1}$ para la *Histidina periplasmic permease* de *Salmonella typhimurium* a los $1000 s^{-1}$ del intercambiador de K^+/H^+ de rata.

Otra cosa destacable en la cinética de entrada de *cysless* K295C es que hay un pequeño *overshoot* cuando dentro de los PLs añadimos L-arginina en vez de L-serina, el cual descartaría que el transporte esté desacoplado, e implicaría que L-arginina ha pasado de no ser sustrato en absoluto, a ser sustrato aunque bastante peor que L-serina. Para comprobarlo se realizó un experimento de cis-inhibición del transporte de L-serina con un exceso de 500

veces de L-arginina fría debería inhibir dicho transporte. El resultado de dicho transporte fue una fuerte inhibición del transporte de L-serina (datos no mostrados; otro experimento se muestra en la figura 49), confirmando que L-arginina posiblemente es sustrato de *cys/less* K295C, a diferencia de SteT donde claramente no lo era.

También podría ser que L-arginina se uniera al transportador y lo bloqueara en una conformación “abierta” en el sentido de flujo contrario. Para resolver estas preguntas se realizó un transporte de L-serina y otro de L-arginina marcadas radiactivamente en PLs que contenían 4 mM L-serina, 4 mM L-arginina o ningún aminoácido (figura 48):

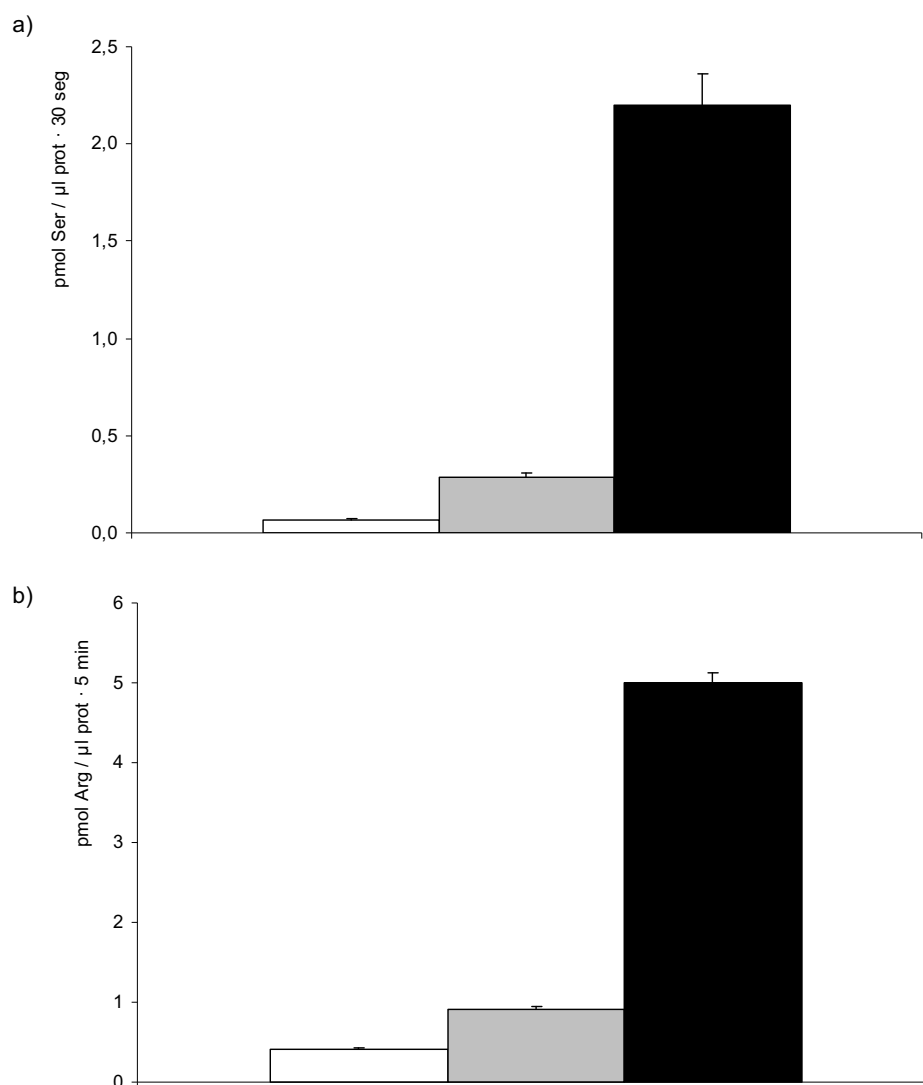


Figura 48. a) Transporte de L-serina en *cys/lessK295C*-PLs. El transporte de 10 µM L-serina marcada radiactivamente se midió durante 30 segundos en los diferentes *cys/lessK295C*-PLs que contenían ningún aminoácido (barra blanca), 4 mM de L-arginina (barra gris) o 4 mM de L-serina (barra negra). Se muestra un experimento representativo. b) Transporte de L-arginina en *cys/lessK295C*-PLs. El transporte de 10 µM L-arginina marcada radiactivamente se midió durante 5 minutos en los diferentes *cys/lessK295C*-PLs que

Resultados

contenían ningún aminoácido (barra blanca), 4 mM de L-arginina (barra gris) o 4 mM de L-serina (barra negra). Se muestra un experimento representativo.

Este experimento muestra que L-arginina es capaz de transestimular el transporte de L-serina ligeramente por encima del basal, pero muy por debajo del intercambio serina-serina (es 8 veces inferior) (figura 48a). Por el contrario, cuando hacemos transporte de L-arginina (figura 48b), se observa que L-serina transestimula mucho mejor que L-arginina, y que el transporte arginina-arginina está claramente por encima del basal. En conclusión, L-arginina es claramente sustrato de *cys/less* K295C, aunque peor que L-serina. Esta es una clara diferencia con SteT, del cual L-arginina claramente no es sustrato, ya que ni se transporta (figura 16a), ni es capaz de inhibir el transporte de L-serina (figura 21a), ni de transestimular su transporte (figura 21b).

Para comprobar si había algún otro aminoácido que había cambiado su comportamiento, decidimos realizar un patrón de cis-inhibiciones de *cys/less* K295C (figura 49):

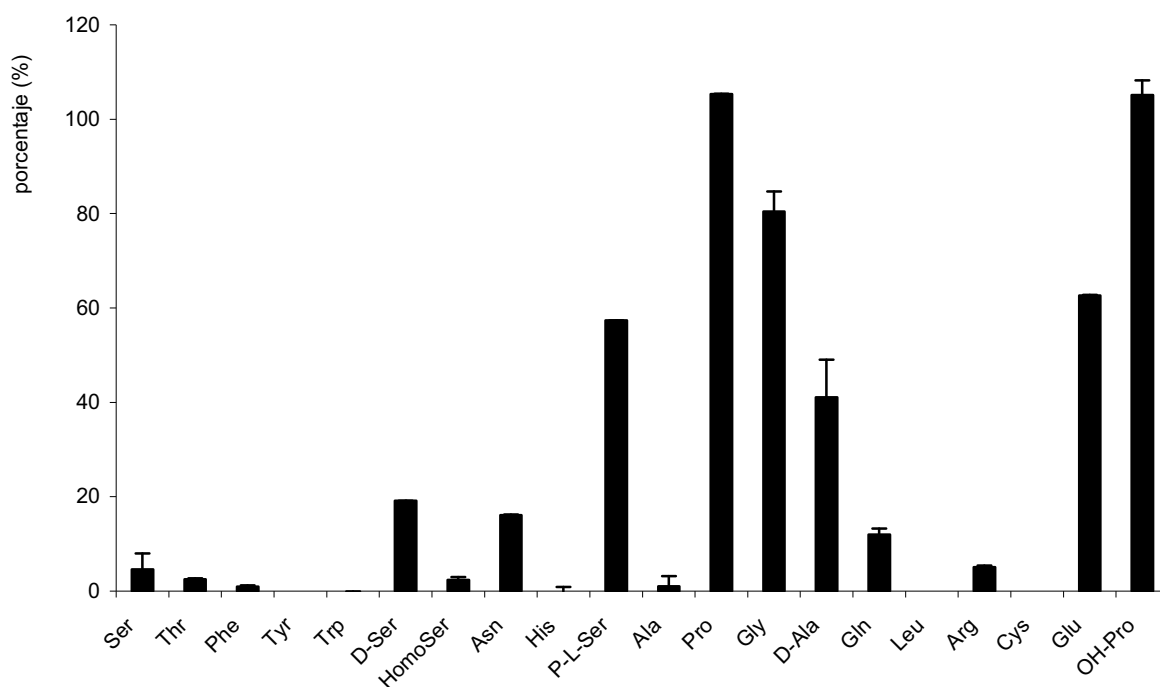


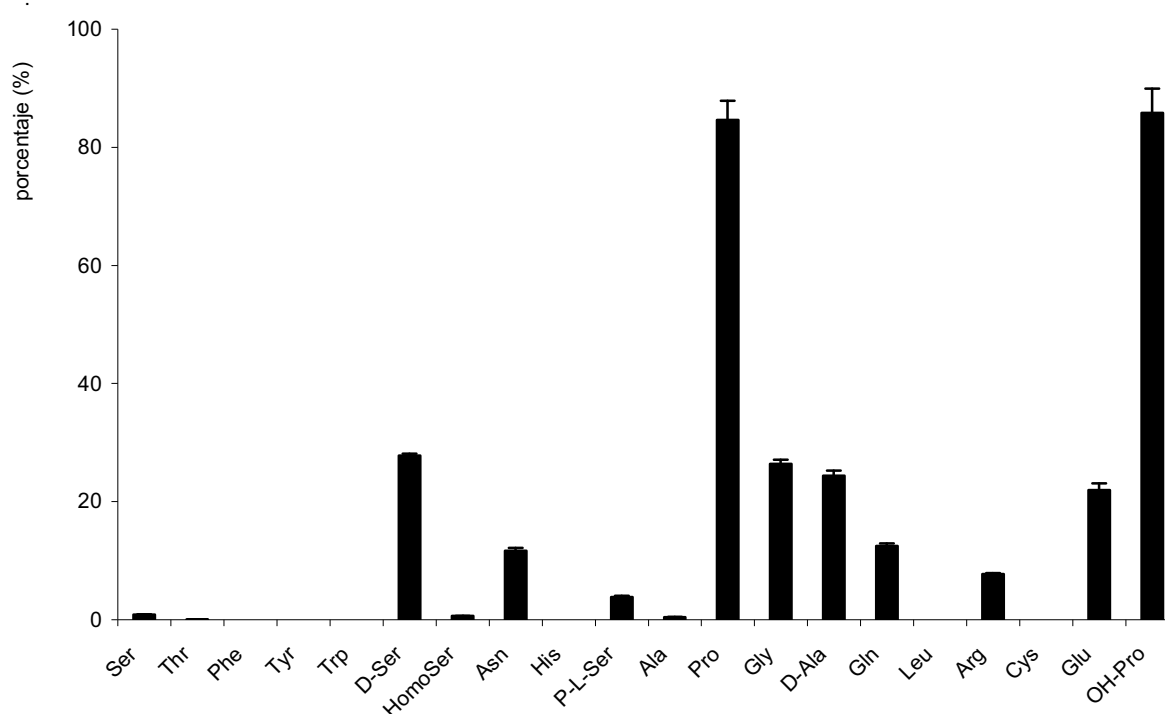
Figura 49. Especificidad de sustrato del transporte de *cys/less* K295C. Patrón de cis-inhibición de aminoácidos de la actividad de transporte de *cys/less* K295C. El transporte de 10 μ M L-serina marcada radiactivamente fue medido en K295C-PLs que no contenían aminoácidos o que contenían 4 mM L-serina durante 30 segundos (condiciones lineales). El transporte fue medido en ausencia o presencia de los aminoácidos indicados a 5 mM en el medio externo (2 mM en el caso de L-tirosina). El transporte transestimulado fue calculado sustrayendo el transporte en K295C-PLs que no contenían L-serina de aquél en K295C-PLs que contenían L-serina. El transporte se expresa como el porcentaje del transporte en K295C-PLs que contenían 4 mM L-serina y sin cis-inhibidores (3.3 ± 0.1 pmol / μ g proteína \cdot 30

segundos). Los datos son de un experimento con 3 réplicas por condición. Cuando no se aprecian las barras de EEM es porque son menores que los símbolos.

Como se aprecia en la figura el patrón de inhibiciones de *cys/less* K295C es muy diferente del de SteT (ver figura 21a). Para ver mejor las diferencias los aminoácidos que producen la cis-inhibición están en orden de mayor a menor inhibición en SteT, de manera que queda claro que los aminoácidos aromáticos y homoserina ahora son capaces de inhibir totalmente el transporte, al igual que His, Ala, Gln, Leu, Arg y Cys que antes no conseguían inhibir más de un 35% en el mejor de los casos y ahora son capaces de inhibir completamente, o casi, el transporte.

Sin embargo, el transportador sigue sin verse inhibido en absoluto por Pro ni OH-Pro. Gly sigue provocando una inhibición insignificante, indicando que el transportador necesita una cadena lateral con la que interaccionar. Glu y P-L-serina, que son los únicos con carga negativa, aunque inhiben, son de los que menos lo hacen, indicando que los sustratos con carga negativa no interaccionan bien con el transportador. Los D-aminoácidos, D-Ser y D-Ala son capaces de inhibir, pero mucho menos que los análogos L-aminoácidos, indicando que el transportador sigue siendo estereoespecífico.

Se podría pensar que estos cambios en la especificidad de sustrato no se deben únicamente a la mutación K295C, sino a la suma de la eliminación de las 5 cisteínas endógenas, de manera que creamos el mutante K295C en entorno *wt* para ver si SteT K295C recreaba las características de *cys/less* K295C.



Resultados

Figura 50. Especificidad de sustrato del transporte de SteT K295C. Patrón de cis-inhibición de aminoácidos de la actividad de transporte de SteT K295C. El transporte de 10 μ M L-serina marcada radiactivamente fue medido en wt K295C-PLs que no contenían aminoácidos o que contenían 4 mM L-serina durante 30 segundos (condiciones lineales). El transporte fue medido en ausencia o presencia de los aminoácidos indicados a 5 mM en el medio externo (2 mM en el caso de L-tirosina). El transporte transestimulado fue calculado sustrayendo el transporte en wt K295C-PLs que no contenían L-serina de aquél en wt K295C-PLs que contenían L-serina. El transporte se expresa como el porcentaje del transporte en wt K295C-PLs que contenían 4 mM L-serina y sin cis-inhibidores (5.0 ± 0.2 pmol / μ g proteína \cdot 30 segundos). Los datos son de un experimento con 3 réplicas por condición. Cuando no se aprecian las barras de EEM es porque son menores que los símbolos.

SteT K295C posee una velocidad inicial similar a la de *cys/less* K295C y como éste su transporte de L-serina se inhibe por un exceso de 500 veces de L-arginina fría (datos no mostrados). Para acabar de demostrar las similitudes realizamos el patrón de cis-inhibiciones en SteT K295C (figura 50). Como se aprecia en esta figura el patrón de inhibiciones de SteT K295C es casi idéntico al de *cys/less* K295C indicando que es la posición 295 la que produce estos cambios en el transportador. Únicamente Gly y los cargados negativamente (P-L-Ser y Glu) inhiben un 50% más en entorno *wt* que en entorno *cys/less*, quizás debido a que el tiol de la C291 consiga estabilizar mejor esta carga negativa que el hidroxil de la serina que la sustituye en el *cys/less*. También se aprecia que Pro e OH-Pro son los únicos que no consiguen inhibir fuertemente el transporte en wt K295C, lo que supone un cambio total del patrón de inhibiciones respecto al del *wt*.

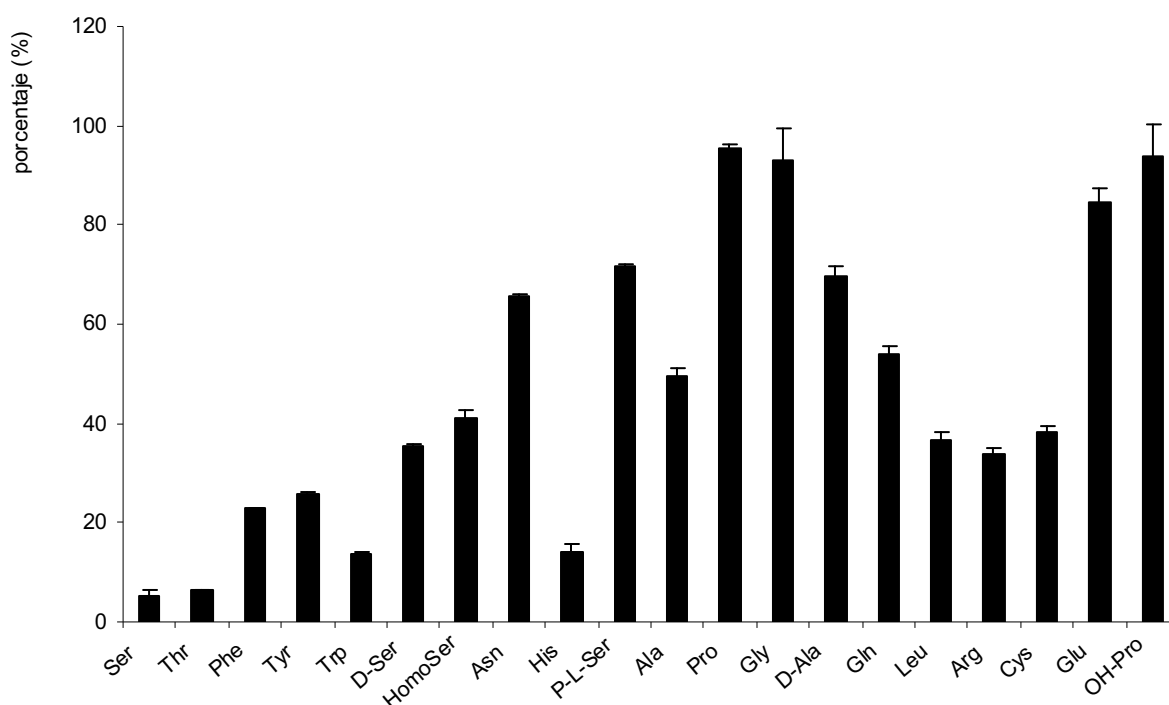


Figura 51. Especificidad de sustrato del transporte de *cys/less* I285C. Patrón de cis-inhibición de aminoácidos de la actividad de transporte de *cys/less* I285C. El transporte de 10 μ M L-serina marcada radiactivamente fue medido en I285C-PLs que no contenían aminoácidos o que contenían 4 mM L-serina

durante 10 minutos (condiciones lineales). El transporte fue medido en ausencia o presencia de los aminoácidos indicados a 5 mM en el medio externo (2 mM en el caso de L-tirosina). El transporte transestimulado fue calculado sustrayendo el transporte en I285C-PLs que no contenían L-serina de aquél en I285C-PLs que contenían L-serina. El transporte se expresa como el porcentaje del transporte en I285C-PLs que contenían 4 mM L-serina y sin cis-inhibidores (8.7 ± 0.1 pmol / μg proteína \cdot 10 min). Los datos son de un experimento con 3 réplicas por condición. Cuando no se aprecian las barras de EEM es porque son menores que los símbolos.

A la vista de lo que hemos descubierto en la posición 295, nos preguntábamos si en la posición 285 también habría un cambio en el patrón de inhibiciones, y si éste sería de nuevo idéntico al de los mutantes K295C en entorno *wt* o *cysless*. Para verlo realizamos el patrón de cis-inhibiciones con *cysless* I285C (figura 51). Observamos que el patrón de cis-inhibiciones de *cysless* I285C es un punto intermedio entre el de los mutantes K295C (en entorno *wt* y *cysless*) y el de SteT. Las inhibiciones son, en general, menores que en los mutantes K295C, pero mayores que en SteT, especialmente las producidas por His, Ala, Leu, Arg y Cys.

Para demostrar la especificidad de residuo de estos cambios de patrón de inhibiciones realizamos en *cysless* G294C el patrón de cis-inhibiciones con los aminoácidos que dan más diferencia entre SteT y SteT K295C, *cysless* K295C y *cysless* I285C (figura 52), ya que podría ser que al no tener casi actividad sin el tratamiento con DTT se nos hubiera pasado que la mutación en esta posición también altere la especificidad de sustratos.

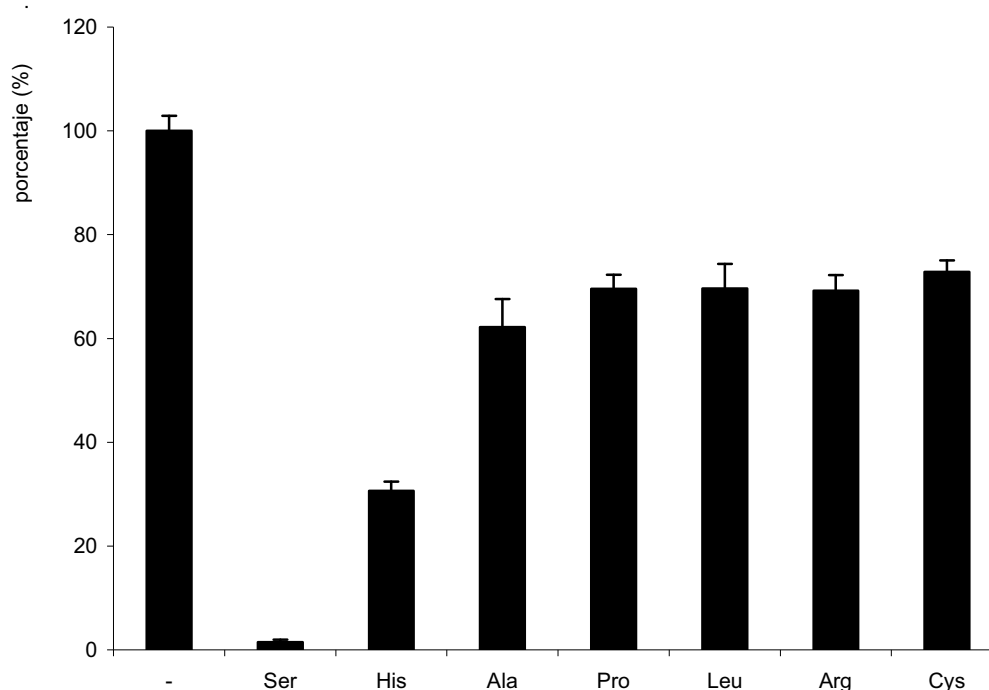


Figura 52. Especificidad de sustrato del transporte de *cysless* G294C. Patrón de cis-inhibición de aminoácidos de la actividad de transporte de *cysless* G294C. Los PLs de *cysless* G294C purificado G294C-PLs fueron tratados con 10 mM DTT durante 5 minutos a temperatura ambiente y

Resultados

ultracentrifugados para eliminar el DTT antes del transporte. El transporte de 10 μ M L-serina marcada radiactivamente fue medido en G294C-PLs que no contenían aminoácidos o que contenían 4 mM L-serina durante 30 segundos (condiciones lineales). El transporte fue medido en ausencia o presencia de los aminoácidos indicados a 5 mM en el medio externo (2 mM en el caso de L-tirosina). El transporte transestimulado fue calculado sustrayendo el transporte en G294C-PLs que no contenían L-serina de aquél en G294C-PLs que contenían L-serina. El transporte se expresa como el porcentaje del transporte en G294C-PLs que contenían 4 mM L-serina y sin cis-inhibidores (1.25 ± 0.05 pmol / μ g proteína \cdot 30 segundos). Los datos son de un experimento con 3 réplicas por condición.

	SteT	SteT K295C	cysless K295C	cysless I285C	cysless G294C
NO AA	100	100	100	100	100
L-SER	2	1	5	5	2
L-THR	2	0	2	6	
L-PHE	21	0	1	23	
L-TYR	25	0	0	26	
L-TRP	42	0	0	14	
D-SER	47	28	19	36	
L-HOMOSER	48	1	2	41	
L-ASN	63	12	16	66	
L-HIS	65	0	0	14	31
P-L-SER	69	4	57	72	
L-ALA	73	0	1	49	60
L-PRO	82	81	105	95	64
GLY	83	26	80	93	
D-ALA	84	24	41	70	
L-GLN	86	12	12	54	
L-LEU	90	0	0	37	67
L-ARG	95	8	5	34	67
L-CYS	100	0	0	38	70
L-GLU	114	22	63	84	
OH-PRO	119	86	105	94	

Tabla 8. Resumen de las actividades residuales en porcentaje obtenidos en los patrones de cis-inhibición correspondientes a SteT y varios de sus mutantes.

Como era de esperar, el patrón de cis-inhibiciones de *cysless* G294C es similar al de SteT, aunque con inhibiciones ligeramente superiores (entre un 10 y un 30% más fuertes), que en parte se explican por el decaimiento de la actividad con el tiempo (ver figura 18) ya que en este experimento, a diferencia de los anteriores, el punto sin cis-inhibidor se realizó únicamente al principio para ahorrar grupos. De todos modos, las inhibiciones producidas en *cysless* G294C en ningún caso llegan a ser del nivel de las obtenidas con las mutaciones K295C e I285C, confirmando la importancia de estas últimas.

Si resumimos los resultados de los diferentes patrones de cis-inhibición comentados anteriormente en una tabla podremos observar más claramente las diferencias (tabla 8).

DISCUSIÓN

1. SteT, modelo procariota de los transportadores de la familia LAT.

Poco se sabe sobre la estructura de las LSHATs. La elucidación de su estructura está principalmente limitada por su baja expresión en células nativas y tejidos, y la dificultad de sobreexpresar estas proteínas en sistemas heterólogos (ver Anexo 2). Por ello, elucidar la estructura atómica de un miembro procariota con elevada identidad de secuencia con las LSHATs eucariotas es una excelente alternativa para entender el mecanismo molecular de los HATs.

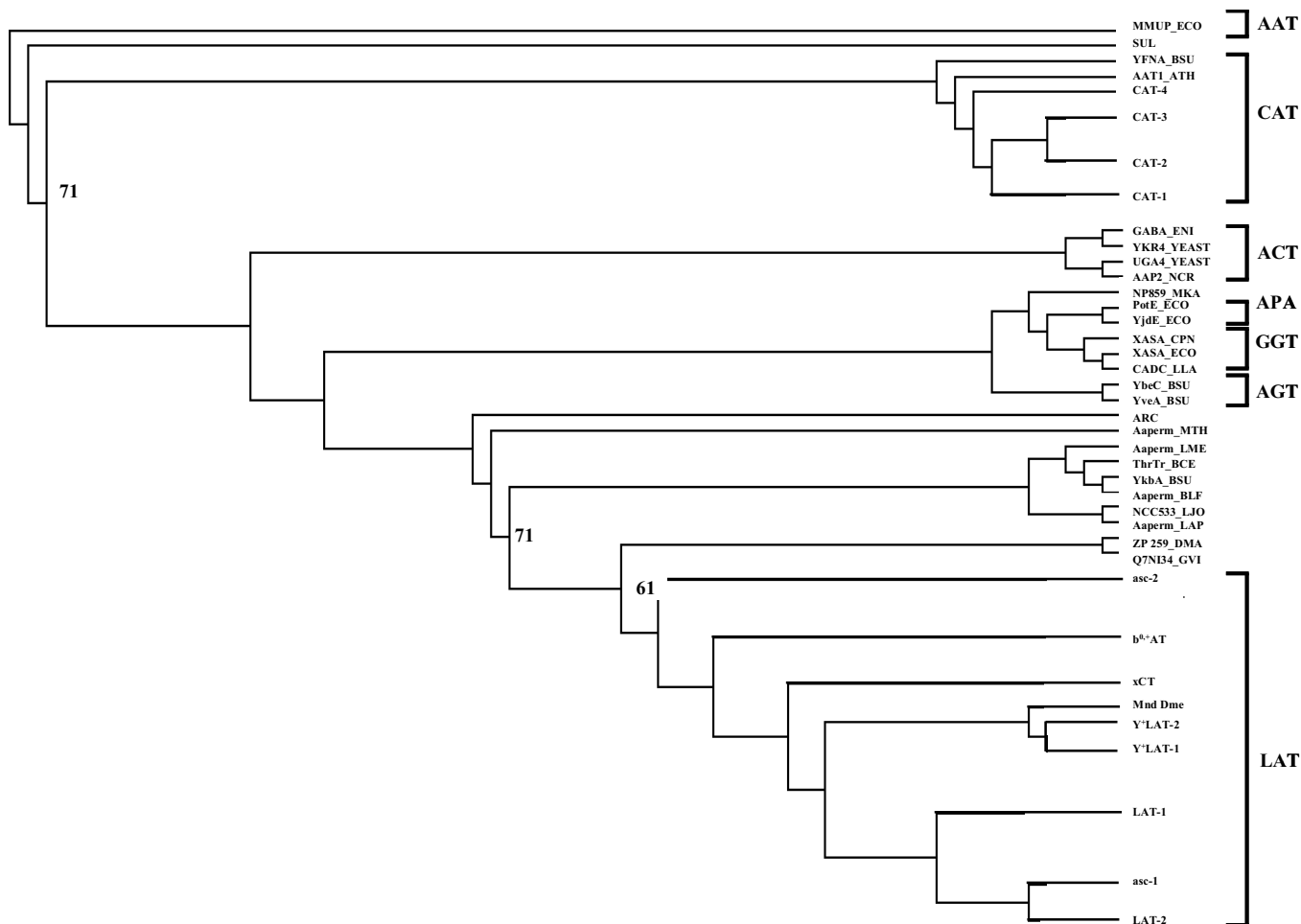


Figura 53. Relación filogenética de SteT con otros miembros procariotas y eucariotas de la superfamilia APC. El árbol ilustra las relaciones filogenéticas de SteT (*ykbA_BSU*) con todos los miembros alineables de la superfamilia APC que están funcionalmente caracterizados o son transportadores de aminoácidos putativos. La abreviatura de cada una de las subfamilias está en negrita. Los valores de *bootstrap* (como porcentaje de 1000 réplicas) están indicados para los nodos que separan SteT de los miembros de la familia LAT. Para simplificar el árbol, las ramas terminales que incluyen claros ortólogos fueron colapsadas y se muestra sólo el nombre de un transportador representativo.

Se identificó, utilizando el algoritmo BLAST, una secuencia de *B. subtilis*, *ykbA*. Esta secuencia, que hemos renombrado como SteT, presenta un 30% de identidad de secuencia

aminoacídica con las LSHATs humanas (ver tabla 4 en Antecedentes). Utilizando el programa ClustalW, SteT se alinea en la familia LAT, que a su vez se integra dentro de la superfamilia APC. Actualmente se conocen muchas más secuencias de transportadores procariotas y existen programas de cálculo más potentes que permiten realizar asignaciones mucho más precisas. Con los datos actuales, SteT sigue alineándose dentro de la familia LAT, o bien formando parte de una nueva familia muy próxima a la familia LAT y que estaría constituida únicamente por proteínas procariotas (figura 53).

El hecho que SteT sea un intercambiador obligatorio de aminoácidos (ver figura 16 en Antecedentes), y que presente un mecanismo de transporte similar al descrito para $b^{0,+}$ AT (ver figura 17 en Antecedentes; Torras-Llort et al., 2001), refuerza la idea que SteT es el primer miembro identificado y caracterizado de la familia LAT. Esto convierte a SteT en un excelente modelo para el estudio funcional y estructural de las proteínas de la familia LAT.

Los estudios de SteT por criofractura en el TEM indican que la proteína está integrada en la bicapa lipídica de vesículas unilamelares (ver figura 24 en Resultados). El hecho de observar partículas tanto en las caras cóncavas como en las convexas de las imágenes de los SteT-PLS de criofractura en el TEM indica que las partículas de SteT reconstituidas se encuentran en ambas orientaciones en la bicapa. Este hecho hace que en este sistema no se pueda comprobar si SteT presenta diferente afinidad por el sustrato en cada lado de la membrana, como en el caso de $b^{0,+}$ AT (Reig et al., 2002) y para otras LSHATs expresadas en oocitos (Meier et al., 2002). Además, el ajuste de los datos cinéticos a las ecuaciones de Michaelis-Menten no revela una segunda K_M para L-serina y da una única K_M aparente externa de 1.2 mM para L-serina (ver figura 17b en Antecedentes). Esto sugiere que SteT tiene afinidades similares a ambos lados de la membrana.

El gel de BN-PAGE de SteT purificado muestra una banda principal con una masa molecular aparente de ~80 kDa (ver figura 22 en Resultados). Esta discrepancia en el peso molecular es debido a que la proteína migra asociada con micelas de detergente y *Coomassie Brilliant Blue* G-250. Si se aplica el factor de conversión de Heuberger (Heuberger et al., 2002) la masa molecular que se obtiene corresponde a ~45 kDa, muy cerca de su peso molecular teórico (49 kDa). Esto indica que la mayoría de moléculas de SteT se encuentra en forma de monómero. Los experimentos de entrecruzamiento químico realizados con un amplio rango de reactivos específicos de grupos amino (DSP, DST y DMS) y de grupos tiol (BM(PEO)₄) apoyan este resultado (ver figura 23 en Resultados).

La medición de las partículas de SteT mediante criofractura en el TEM (ver figura 25 en Resultados) dio un diámetro medio de ~7.4 nm, ligeramente inferior al determinado para PotE (~8 nm) y superior al estimado para el monómero de LacY (~6 nm), que coincide con estudios previos (Costello et al., 1987). LacY posee 12 segmentos TM, una masa similar a la de SteT y

PotE y es funcional y estructuralmente un monómero (Abramson et al., 2003). Esto sugiere que estructuralmente SteT y PotE también son monómeros. Es posible que la réplica de platino-carbono depositada para producir nuestras réplicas nos haya producido una sobreestimación del verdadero diámetro de la partícula por valor de ~2 nm, tal como se ha visto anteriormente en otros transportadores estudiados con esta técnica (Turk et al., 2000). Así pues, el diámetro de las partículas de SteT y PotE estaría en el rango de 5 a 6 nm.

La tinción negativa en el TEM de SteT reveló una estructura elíptica en forma de *donut* con unos diámetros de ~7 por ~6 nm (ver figura 26b en Resultados). De manera similar a la criofractura en el TEM, las dimensiones medidas están sobreestimadas. Las proteínas de membrana solubilizadas en detergente tienen unido un cinturón de detergente y lípidos endógenos que ha de ser considerado. El verdadero volumen de la proteína es un 20% menor que el estimado con esta técnica según la bibliografía (Dekker et al., 1988). Así pues, las dimensiones corregidas de SteT por tinción negativa estarían en consonancia con las obtenidas por criofractura. La *red permease* consiste en fusionar el citocromo c en uno de los bucles de LacY, con una masa molecular comparable a SteT, y forma monómeros y trímeros (Zhuang et al., 1999). Las dimensiones del monómero de la *red permease* reconstituida en membranas lipídicas mediante tinción negativa son de 5 por 4 nm, y por tanto son similares a las dimensiones de SteT después de la corrección del detergente unido a la proteína. A parte del tamaño, SteT y LacY poseen una estructura global similar y una hendidura central pronunciada. Por su parte GalP, que posee 12 segmentos TM y es un monómero (Henderson 1993), determinado en las mismas condiciones que SteT en el laboratorio del Dr. D. Fotiadis posee un tamaño sin corregir el detergente unido de 8.3 nm, similar a SteT. Finalmente, el transportador de glutamato GlpT, tiene una estructura cuaternaria trimérica, cuyo monómero tiene una masa molecular similar a SteT. Las dimensiones estimadas del monómero de GlpT por tinción negativa en el TEM son similares a las de SteT. Todos estos datos constituyen un soporte adicional a la naturaleza monomérica de SteT.

Al igual que en la superfamilia APC, la mayoría de las proteínas de la MFS poseen 12 segmentos TM en una única cadena polipeptídica, con ambos el N- y el C-terminal en el lado citoplasmático de la membrana (Pao et al., 1998). Es el caso de OxIT (Hirai et al., 2002), GlpT (Huang et al., 2003) y LacY (Abramson et al., 2003). Estos transportadores parecen funcionar como monómeros (Veenhoff et al., 2002).

2. El segmento transmembrana VIII es una hélice α anfipática.

Como hemos visto en el apartado 3.2 de la Introducción, no existe mucha bibliografía de estructura-función de proteínas que pertenezcan a la superfamilia APC y a pesar de su baja identidad de secuencia (en torno al 25%, justo en el umbral para hacer estudios de homología útiles), hemos alineado el segmento TM VIII de SteT con el de varias de ellas como son xCT,

Discusión

PotE, GabP y PheP (figura 54). También alineamos el segmento TM VIII de OxIT, LacY y MCT1 que pertenecen a la MFS. La MFS es una superfamilia estructuralmente similar a la superfamilia APC, posiblemente sea la más parecida, pero, a diferencia de la APC, tiene varias estructuras 3D resueltas (ver tabla 3 en Introducción).

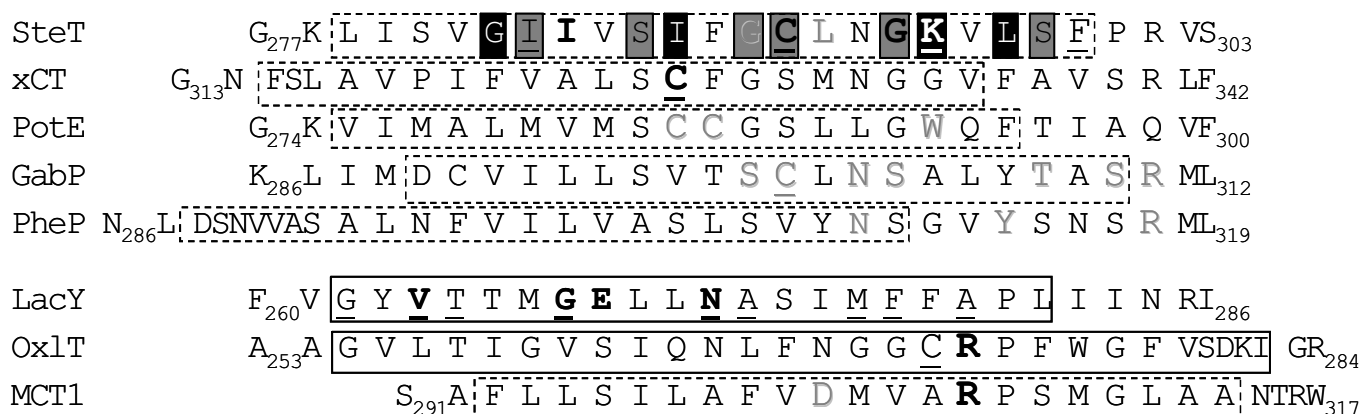


Figura 54. Datos del segmento TM VIII de transportadores de las superfamilias APC y de la MFS. Hemos recuadrado el segmento TM VIII con línea discontinua si es teórico y con línea continua si hay un cristal que lo delimita exactamente. Representamos ligeramente más grandes los residuos relevantes. Resaltamos en negrita los residuos que tienen interacción directa o indirecta con el sustrato. Están subrayados aquellos residuos que se unen a un reactivo inactivando el transportador. En SteT, con fondo gris hemos marcado los residuos que presentan activación significativa con DTT y con fondo negro si lo que presentan es una inactivación con DTT. Finalmente, aquellos residuos que al mutarlos se inactiva casi o totalmente el transporte se representan en gris y sombreados.

Anteriormente hemos comentado la inhibición que producen pCMB y pCMBS en la C327 de xCT, descrita por la Dra. M. Jiménez-Vidal (Jimenez-Vidal et al., 2004). Esta inhibición se protege por varios sustratos con una EC₅₀ similar a su K_M aparente y no por aminoácidos que no son sustrato. Además esta protección es independiente de la temperatura, sugiriendo que no depende de grandes cambios conformacionales provocados por el sustrato. Los resultados indican que la C327 es un residuo funcionalmente importante y que a pesar de estar en el interior del segmento TM VIII es accesible al medio acuoso externo. Todo esto sugiere que la C327 está estructuralmente próxima al lugar de paso o de unión del sustrato.

Se han descrito en el segmento TM VIII de PotE varios aminoácidos probablemente implicados en la unión del sustrato como son los residuos C285 y C286 que se alinean una vuelta de hélice antes de la C291 de SteT y sobretodo el W292 que se alinea una vuelta de hélice después de la C291 (Kashiwagi et al., 2000). El residuo W292 podría estar estabilizando junto al W201 (TM VI) y la Y425 (TM XII) el esqueleto de butano de la putrescina (sustrato de PotE) en el lugar de unión. La mutación del residuo W292 a Leu causa la total inactivación de la actividad tanto de entrada, como de salida del sustrato. Por su parte las mutaciones de C285

y C286 a Ala producen una fuerte inactivación de dichas actividades y se sugiere que forman un puente disulfuro importante para mantener la estructura activa de PotE.

Como hemos visto en el apartado 3.2 de la Introducción, GabP tiene un CAR en el segmento TM VIII y el bucle que lo conecta con el segmento TM IX. Mutaciones en los residuos S299, C300, N302, S303, T307, S309, R310, S314, R317 y R318 del CAR producen reducciones drásticas de la actividad de GabP. Además, en esta región está la cisteína firma de la familia a la que pertenece GabP, C300, que se alinea con la C291 de SteT. La mutación de C300 a Ala produce la pérdida casi total de la actividad (Hu et al., 1998b) y también es la diana de los reactivos MTS (sobretudo MMTS y MTSEA) y pCMBS produciendo la inhibición de su actividad (Hu et al., 1999).

En PheP también existe un CAR como el de GabP aunque con ciertas diferencias: no presenta ningún residuo de cisteína (esencial en GabP), parece que el segmento TM VIII está desplazado respecto al de GabP, únicamente mutaciones en los residuos N309, Y313, R317 y F320 producen reducciones drásticas de la actividad de PheP y el papel importante de Y313 en PheP no se corresponde con el papel poco importante de Y306 en GabP (Pi et al., 2002). Además R317 (alineable con R301 de SteT y conservada en todas las LSHATs y más de 30 miembros procariotas de la superfamilia APC (Hu et al., 1998a) parece formar un puente salino con E234, que se encuentra en el bucle 6-7 (alineable con la E217 de SteT y conservada en todas las LSHATs y más de 30 miembros procariotas de la superfamilia APC), probablemente con una función estructural.

LacY, que pertenece a la MFS, tiene en el segmento TM VIII el residuo E269 que es irremplazable. Sus mutaciones a Asp, Gln o Cys producen la pérdida total de actividad (Frillingos et al., 1998). Este residuo juega un papel esencial en el mecanismo de transporte ya que podría ser el residuo clave en el acoplamiento entre la unión del sustrato y la translocación del H⁺ (Vázquez-Ibar et al., 2004). Además, E269 es esencial para la afinidad y la especificidad del transporte. El puente de hidrógeno entre E269 y W151 (TM V) juega un papel crítico en la arquitectura del lugar de unión como se demuestra con las mutaciones en E269, ya que éstas alteran dramáticamente el entorno de W151 de una manera que correlaciona con la afinidad de unión de los sustratos de LacY. También en el segmento TM VIII se encuentran los residuos G262, V264, T265, G268, N272, A273, M276, F277 y A279 que son inhibibles por NEM y de estos, V264, G268 y N272 además se protegen por sustrato (Frillingos et al., 1998).

El residuo R272 en el segmento TM VIII de OxlT, perteneciente a la MFS, es importante para su actividad de transporte ya que su mutación a Ala o Gln elimina totalmente su actividad, mientras que su mutación a Lys mantiene actividad, aunque 200 veces menor que el *wt* debido a efectos sobre la K_M y la $V_{m\acute{a}x}$ (Yang et al., 2005). La mutación de R272 a Cys inhibe totalmente el transporte mientras que un tratamiento con MTSEA es capaz de recuperar

parcialmente la actividad (Wang et al., 2006). Los datos sugieren que el residuo R272, crítico para la unión del sustrato, junto a K355 (TM XI), realiza una aportación crucial para el potencial positivo del lugar de unión al sustrato, que le permite interaccionar con el anión oxalato (a pH fisiológico posee doble carga negativa) en un paso clave para generar los cambios conformacionales entre los estados abierto y cerrado del transportador (Hirai et al., 2004). Además la C271 es diana de pCMB causando la inactivación del transporte pero es insensible a MTSEA (Yang et al., 2005).

Además en MCT1 de rata, un transportador de lactato de la MFS, en el segmento TM VIII se encuentran la D302 y la R306 (el único residuo cargado y conservado en medio de un segmento TM en toda la familia). Mutaciones en la R306 provocan una fuerte pérdida de actividad ya que es crucial para la unión del sustrato y posterior acoplamiento con la translocación del H^+ (Rahman et al., 1999). Por su parte cualquier mutación de D302 comporta la pérdida total de actividad y junto a su proximidad a R306 sugiere que es importante para el mecanismo de transporte. Se sugirió entonces que D302 y E369 estarían involucrados en el transporte del H^+ (Galic et al., 2003), de manera que inicialmente el H^+ estaría unido a D302 y la unión del sustrato a R306 desplazaría el H^+ a E369, rompiendo su puente salino con R143, y por tanto provocando el reordenamiento de las hélices.

Como podemos observar en la figura 54 los efectos se suelen repartir en diferentes puntos del segmento TM VIII en los diferentes transportadores, de manera que decidimos realizar varios mutantes en esta zona para ver cuales son los residuos, además de la C291, que son relevantes para SteT. De todos ellos cabe destacar la posición K295 y la I285 ya que su mutación a cisteína altera la especificidad en el reconocimiento de la cadena lateral del sustrato, así como las posiciones C291 y G294 ya que el sustrato es capaz de proteger los efectos del MTSET y del DTT respectivamente.

Además, como se ve en la figura 54, los residuos relevantes de SteT presentan una periodicidad de 3-4 residuos que confirma que el segmento TM VIII realmente se trata de una hélice α con importantes implicaciones funcionales. En la figura 55 hemos generado un modelo de dicha hélice, en el que se ve claramente la cara que se activa por DTT (resaltada en rojo), mientras que la cara resaltada en verde corresponde a los que presentan inactivación por MTSET, no se activan por DTT y en general presentan una alta actividad intrínseca (figura 55).

Asumiendo una conformación de hélice α en el segmento TM VIII, la distancia entre los carbonos α de los residuos I285 y K295 es de 15.5 Å, mientras que la distancia entre las cadenas laterales de estas posiciones oscila entre 14.6 y 19.4 Å, en función de la conformación que adopten. Si se considera que adoptan las conformaciones más habituales para estos residuos en proteínas de membrana, la distancia sería de 16.0 Å. Esta distancia es demasiado grande para corresponder a un único lugar de unión del sustrato.

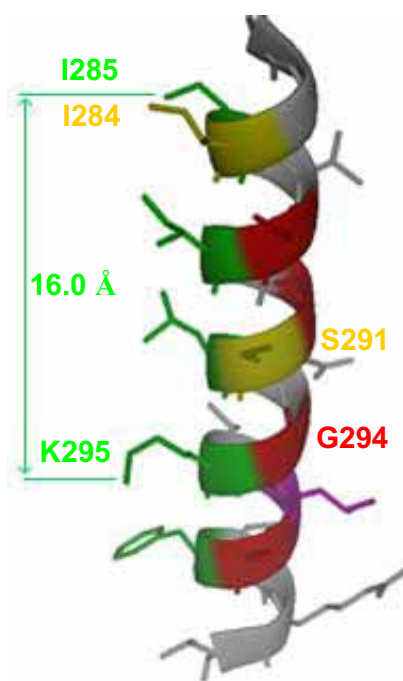


Figura 55. Modelo del segmento TM VIII de SteT. Utilizando el programa PyMOL Viewer. Se ha diseñado la hélice correspondiente al TM VIII de SteT desde la V282 hasta la V302 poniendo las conformaciones de los residuos estadísticamente más probables y que no entren en conflictos estéricos. En verde se ha resaltado la cara cuyo transporte de L-serina presenta inactivación por MTSET, se mantiene inalterado con el tratamiento con DTT y en general presenta una elevada actividad al sustituir el residuo por una cisteína. En rojo se ha resaltado la cara de la hélice que presenta un transporte de L-serina aumentado al hacer el tratamiento con DTT. La distancia entre las conformaciones más probables de las cadenas laterales de los residuos I285 y K295 es de 16 Å.

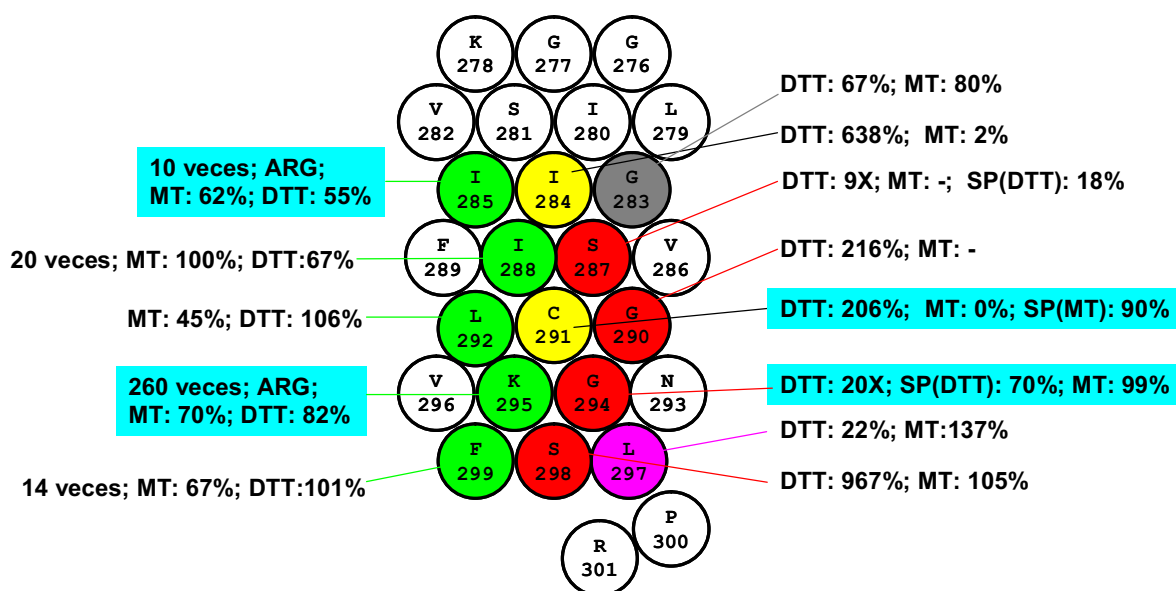


Figura 56. Esquema resumen de los principales efectos hallados en el segmento TM VIII de SteT. Se muestran en amarillo los residuos que son diana de la inactivación por MTSET y de la activación por DTT. En rojo, la cara formada por los residuos que son diana de la activación por DTT y no de la inactivación

por MTSET. En verde, la cara formada por los residuos que son diana de la inactivación por MTSET y no de la activación por DTT. En violeta, el residuo que es diana de la inactivación por DTT y de la activación por MTSET. En gris, el residuo analizado que no entra en ninguno de los grupos anteriores. Los valores expresados en porcentaje y en veces son relativos al transporte neto (transporte total menos transporte inespecífico), mientras que los expresados en X son relativos al transporte total, debido a que el transporte neto es nulo o casi nulo. SP indica protección por sustrato relativa al reactivo entre paréntesis. ARG significa que se ha alterado el patrón de cis-inhibición. Con una caja azul hemos resaltado los residuos que presentan interacción directa o indirecta con el sustrato. Los residuos que no presentan color no han sido estudiados.

Para verlo más claramente podemos ponerlo en 2D de manera que cada fila representa una vuelta de hélice y por tanto los residuos que están encima o debajo en el plano lo están también en la hélice real (figura 56). Los extremos de la hélice no son conocidos. El residuo K278 podría situarse en el exterior de la hélice y por el otro lado de la hélice, los algoritmos teóricos indican que acabaría en la P300. Esto es debido a que los residuos de Pro no están favorecidos en las hélices α , debido a que el nitrógeno del esqueleto no está disponible para formar puentes de hidrógeno, y a las restricciones estéricas causadas por su estructura de anillo. Además el siguiente residuo, R301, contiene una carga positiva, con lo que está más favorecido fuera que dentro de la hélice. Pero, como hemos indicado anteriormente, este residuo podría estar formando un puente salino con el residuo E217, neutralizando así su carga. Finalmente, diferentes estudios en péptidos modelo (Piela et al., 1987; Deber et al., 1990; von Heijne, 1991; Ballesteros et al., 1992; Nilsson et al., 1998; Jacob et al., 1999) y estudios de cristales de proteínas de membrana (Bywater et al., 2001) indican que las Pro no rompen las hélices, únicamente les provocan un giro de 30°, debido a la falta de un enlace de hidrógeno entre el átomo de nitrógeno del imido de la Pro y el átomo de oxígeno del carbonilo del residuo precedente.

Nuestros datos con SteT concuerdan con la SPS observada en el CAR de GabP y PheP que consiste en una serie de residuos polares distribuidos cada 3-4 residuos formando una cara en la hélice α , y que se cree es un dominio potencial de formación de un canal evolutivamente conservado en varias familias de la superfamilia APC (Reizer et al., 1993; Sophianopoulou et al., 1995), donde se podría incluir la familia LAT. Además, diferentes estudios demuestran que los residuos de esta región son los que dan la especificidad de transporte a los miembros de la superfamilia APC (Hu et al., 1998b; Pi et al., 2002).

Para ver si la SPS está realmente conservada en la familia LAT, hemos realizado un alineamiento de la zona final del segmento TM VIII y el inicio del bucle 8-9 con GabP, PheP y las LSHATs (figura 57) donde el grado de conservación de la secuencia de aminoácidos es muy superior al global de estas mismas proteínas, sugiriendo la existencia de la SPS en la familia LAT.

Como se ha comentado en el apartado 3.2 de la Introducción, la SPS de GabP forma parte de un dominio anfipático mayor, el CAR que podría funcionar como un canal lleno de moléculas de agua por donde pasaría el sustrato y que se movería arriba y abajo en la membrana, debido a un movimiento dinámico o a la existencia de un bucle reentrante. La existencia de un bucle reentrante en esta zona ha sido sugerida por estudios de SCAM realizados por la Dra. E. Gasol, L. Rodríguez y R. Brauner en nuestro grupo (no publicados). Además, la observación de que la reactividad de la C300 de GabP depende de la estructura del reactivo de cisteína es consistente con la idea de que el acceso a este residuo ocurre a través de espacios ocluidos tipo canal a modo de filtro selectivo (Hu et al., 1999). También se sabe, que las mutaciones R333W en b^{0,+}AT y L334R en y⁺LAT-1, que estarían presentes en este hipotético CAR, causan respectivamente cistinúria y LPI en los pacientes que las presentan.

TMVIII

GabP	S ₂₉₆	V	T	S	C	L	N	S	A	L	Y	T	A	S	R	M	L	Y	S	L	S	R ₃₁₇
PheP	A ₃₀₃	S	L	S	V	Y	N	S	G	V	Y	S	N	S	R	M	L	F	G	L	S	V ₃₂₄
SteT	S ₂₈₇	I	F	G	C	L	N	G	K	V	L	S	F	P	R	V	S	F	A	M	A	E ₃₀₈
xCT	S ₃₂₆	C	F	G	S	M	N	G	G	V	F	A	V	S	R	L	F	Y	V	A	S	R ₃₄₇
b ^{0,+} AT	S ₃₁₂	T	I	G	A	A	N	G	T	C	F	T	A	G	R	L	I	Y	V	A	G	R ₃₃₃
y ⁺ LAT-1	S ₃₁₉	C	F	G	G	L	N	A	S	I	V	A	A	S	R	L	F	F	V	G	S	R ₃₄₀
y ⁺ LAT-2	S ₃₂₇	C	F	G	G	L	N	A	S	I	F	A	S	S	R	L	F	F	V	G	S	R ₃₄₈
LAT-1	S ₃₃₄	C	F	G	S	V	N	G	S	L	F	T	S	S	R	L	F	F	V	G	S	R ₃₅₅
LAT-2	S ₃₂₅	T	F	G	G	V	N	G	S	L	F	T	S	S	R	L	F	F	A	G	A	R ₃₄₆
Asc-1	S ₃₂₅	T	F	G	G	I	N	G	Y	L	F	T	Y	S	R	L	C	F	S	G	A	R ₃₄₆
AGT-1	S ₃₀₇	L	F	S	N	L	L	I	S	I	F	K	S	S	R	P	I	Y	L	A	S	Q ₃₂₈
MMasc-2	F ₂₉₉	L	L	G	S	V	S	C	G	I	V	S	A	S	R	V	F	Y	S	A	S	Q ₃₂₀

Figura 57. Alineamiento del final del segmento TM VIII y el inicio del bucle 8-9 de GabP y PheP con las LSHATs. Se resalta ligeramente más grandes y en negrita los residuos polares que formarían la SPS.

3. Posibles mecanismos para SteT y las LSHATs.

Los transportadores secundarios y terciarios (intercambiadores) son típicas proteínas de membrana que se plegan como un haz de hélices α hidrofóbicas, las cuales están orientadas más o menos perpendiculares a la membrana. A ambos lados de la membrana, los segmentos TM están conectados con bucles hidrofílicos de longitudes varias. Hasta la fecha, diez estructuras de cristales 3D de transportadores secundarios y terciarios se han descrito. Estas estructuras han proporcionado un primer vistazo de la diversidad estructural y mecánica que puede estar presente en la mayoría de familias diferentes de transportadores secundarios y terciarios. Las estructuras del transportador *multidrug* acoplado a H⁺ AcrB (Murakami et al., 2002), el intercambiador *multidrug* H⁺-dependiente EmrD (Yin et al., 2006) de

E. coli, el cotransportador de lactosa y H^+ LacY (Abramson et al., 2003), el intercambiador de glicerol-P/P_i GlpT (Huang et al., 2003), el intercambiador de Na^+/H^+ NhaA (Hunte et al., 2005) y el intercambiador de Cl^-/H^+ CIC (Dutzler et al., 2002) de *E. coli*, el transportador homólogo de glutamato Glt_{Ph} (Yernool et al., 2004) de la arquea *P. horikoshii*, el transportador homólogo de aspartato Na^+ -acoplado Glt_{Ph} (Boudker et al., 2007) de la arquea *P. horikoshii*, el transportador de Leu Na^+/Cl^- -dependiente LeuT (Yamashita et al., 2005) de *A. aeolicus* y el intercambiador mitocondrial de ATP/ADP (Pebay-Peyroula et al., 2003) de *Bos taurus* representan siete estructuras diferentes y posiblemente catalizan la translocación por siete mecanismos diferentes (Sobczak et al., 2005a; Sobczak et al., 2005b; Web 3). Se necesitan más estructuras 3D de transportadores secundarios para determinar el número de plegamientos diferentes, y se necesitan más estudios funcionales para determinar el número de mecanismos diferentes de translocación en las muchas familias de transportadores que han sido identificadas.

3.1. SteT podría presentar un modelo de ajuste inducido.

LAT-1 es un miembro de las LSHATs que transporta aminoácidos neutros grandes con cadenas laterales ramificadas o aromáticas (Kanai et al., 1998). LAT-1 presenta una amplia especificidad de sustrato, que le permite aceptar compuestos derivados de aminoácidos como sustituyentes metilo en el carbono α , sugiriendo que la interacción del carbono α con el lugar de unión no es esencial (Uchino et al., 2002). Por el contrario, una carga positiva y una negativa en el carbono α son imprescindibles para el transporte, indicando la existencia de sitios para su reconocimiento. Además parece ser que la interacción hidrofóbica entre la cadena lateral y el lugar de unión es crucial para la estabilidad de la unión del sustrato. Por el contrario, otro miembro de las LSHATs, γ^+ LAT-1 cotransporta aminoácidos neutros con Na^+ o aminoácidos básicos de manera Na^+ -independiente (Kanai et al., 2000), por lo que se propone que el lugar de unión de la cadena lateral ha de reconocer esta carga positiva. Por lo tanto, aunque el lugar de unión del sustrato de γ^+ LAT-1 posee un perfil espacial similar al de LAT-1, evolutivamente ha adquirido un mecanismo adicional para reconocer cargas positivas. Con estos datos se ha propuesto un modelo preliminar del lugar de unión de aminoácidos de las LSHATs (Kanai et al., 2001) donde los autores sugieren la existencia de tres lugares de reconocimiento: uno para el grupo α -carboxilo, otro para el grupo α -amino y otro para las cadenas laterales. Mientras que el último sería divergente en cada miembro de la familia, los dos primeros deberían ser muy similares o estarían conservados a lo largo de todos los miembros.

En este sentido, la posición K295 de SteT podría corresponder al lugar de unión de las cadenas laterales, ya que la mutación K295C permite ampliar el rango de cadenas laterales aceptadas por el transportador (ver figuras 48, 49 y 50 en Resultados). Además, esta posición está conservada respecto al Threonine-transporter que posee una actividad de intercambio de aminoácidos tales como L-serina y L-treonina (datos obtenidos por M. Ratera en nuestro

laboratorio). Por el contrario, esta posición no está conservada en otros miembros de la familia LAT como xCT, LAT-1 o y⁺LAT-1 que reconocen otros aminoácidos como sustrato.

El hecho que las mutaciones K295C e I285C produzcan un cambio en el patrón de cis-inhibición (ver figuras 49 y 51 respectivamente en Resultados), pero que, sin embargo, estos mutantes sigan sin verse inhibidos significativamente por glicina, puede indicar que el transportador necesita una cadena lateral con la que interaccionar, es decir, que el mecanismo de reconocimiento del sustrato por SteT siga la teoría del ajuste inducido, según la cual el centro activo adopta la conformación idónea sólo en presencia del sustrato y es la unión del sustrato al centro activo la que desencadena un cambio conformacional que da lugar al transporte.

La interacción sustrato-proteína del ajuste inducido en el centro catalítico (figura 58) proporciona la energía catalítica necesaria para superar la barrera de activación necesaria para el transporte (Klingerberg 2005). Se invoca un estado de transición en el cual el lugar de unión asume el mejor ajuste para el sustrato, mientras que en los dos estados basales (interno y externo) el ajuste es peor. La máxima energía de unión liberada en el estado de transición, proporciona la energía catalítica para permitir los cambios conformacionales asociados con el transporte. Este mecanismo de ajuste inducido proporciona reglas específicas para las características del transporte y para las complementariedades sustrato-proteína según que el ligando sea transportado o actúe como inhibidor. A pesar de que el modelo de ajuste inducido es más evidente en los transportadores secundarios y facilitados que usan la energía intrínseca de unión, se ha propuesto que en los transportadores primarios (dependientes de la hidrólisis de ATP) pueden también ser usados para maximizar el ajuste de la transición. Los cambios moleculares implicados en el ajuste inducido serán una guía para analizar la dinámica del lugar de unión con la ayuda de diferentes estructuras 3D del transportador que reflejen los diferentes estados conformacionales durante el transporte.

La teoría del ajuste inducido ha sido demostrada en canales como GlpF (de Groot et al., 2001) y transportadores ABC como la glicoproteína P (P-gp) (Loo et al., 2003) o como el MJ1267 de *M. jannaschii* (Karpowich et al., 2001) e incluso miembros de la MFS como LacY (Vázquez-Ibar et al., 2004; Weinglass et al., 2004; Mirza et al., 2006).

GlpF es una aquagliceroporina bacteriana que facilita la entrada pasiva altamente eficiente y específica de agua y otros solutos neutros pequeños a través de las membranas biológicas (Agre et al., 1998). Una cuestión especialmente intrigante era como GlpF facilita el paso de moléculas de glicerol (grandes) mientras entorpece el paso de moléculas de agua (pequeñas). Simulaciones de dinámica molecular de GlpF sugieren la existencia de movimientos de la compuerta (*gating motions*) debidos a un ajuste inducido desencadenados

por el paso del glicerol como el mecanismo principal de bloqueo del paso de agua en GlpF (de Groot et al., 2001).

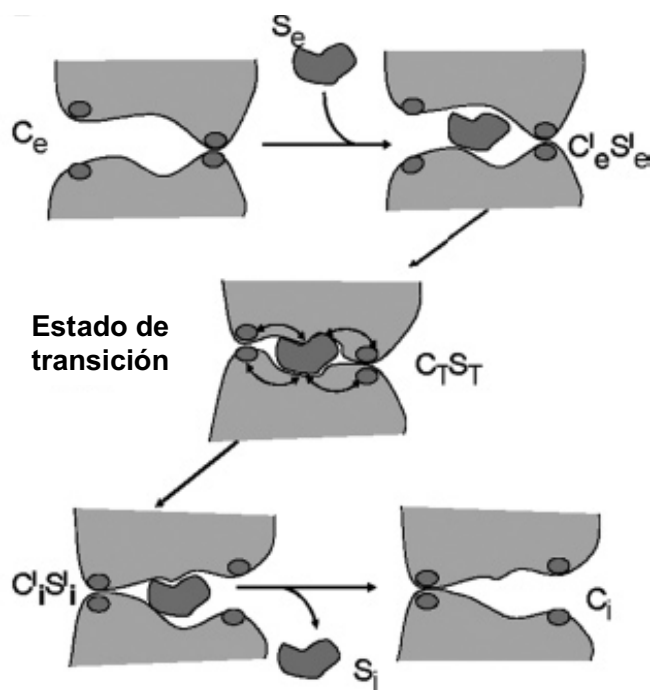


Figura 58. Esquema representativo del modelo de ajuste inducido extraído de Klingenberg 2005.

P-gp es un transportador ABC donde los segmentos TM que constituyen el lugar de unión del sustrato son bastante móviles, de manera que se hipotetizó que la unión del sustrato ocurre a través de un mecanismo de ajuste inducido y para corroborarlo usaron *cysteine scanning mutagenesis* y entrecruzamiento oxidativo (Loo et al., 2003). La habilidad de los sustratos para cambiar el patrón de entrecruzamiento proporciona evidencias directas de que el empaquetamiento de los segmentos TM en el lugar de unión del sustrato cambia cuando P-gp se une a un sustrato u otro. Estos datos corroboran este mecanismo de ajuste inducido por el cual P-gp puede acomodar una amplia gama de compuestos.

MJ1267 de *M. jannaschii* es otro transportador ABC donde la comparación de las estructuras cristalinas de la proteína unida o no al sustrato revelaron un cambio conformacional en el lugar de unión debido a un ajuste inducido probablemente como consecuencia de la unión del sustrato (Karpowich et al., 2001). El ajuste inducido y la rotación del subdominio de hélice α , que contiene la secuencia firma del transportador (LSGGQ), pueden jugar un papel en controlar el cambio dependiente de sustrato en la afinidad de interacción que se cree representa el motor (*power-stroke*) de los transportadores ABC.

En la LacY la disposición de los residuos implicados en la unión del sustrato en diferentes conformeros sugiere que la unión del sustrato en LacY implica un mecanismo de ajuste inducido (Vázquez-Ibar et al., 2004; Weinglass et al., 2004; Mirza et al., 2006). Cuando

el sustrato no está unido a LacY, los residuos esenciales para la unión del sustrato y la especificidad (R144, E126 y E269) no se encuentran en la configuración correcta para unir sustrato (Weinglass et al., 2004; Mirza et al., 2006). La siguiente secuencia de eventos se ha sugerido basándose en cambios estructurales. El sustrato reconoce inicialmente el residuo W151 a través de un empaquetamiento hidrofóbico inespecífico entre el anillo galactopiranosil del sustrato y el anillo indol del W151 (Guan et al., 2003; Vázquez-Ibar et al., 2004). Esta interacción orienta el entorno del galactopiranosil para interactuar con los residuos R144, E126 y E269 (figura 59). La presencia del sustrato, reorienta los anteriores residuos configurando la estructura del lugar de unión, es decir, el sustrato induce la formación del lugar de unión siguiendo una estrategia de ajuste inducido. Esta reorientación implica la rotura de un puente salino entre R144 y E126, formando un puente de hidrógeno bidentado entre R144 y los grupos O4 y O3 del anillo galactopiranosil. Posteriormente, el residuo E269 protonado se mueve de un entorno relativamente hidrofóbico, se desprotona y forma un puente salino con el residuo R144, un enlace de hidrógeno con el sustrato y un puente de hidrógeno con el residuo W151 para completar la unión del mismo. Finalmente se desencadena el cambio conformacional global que permite la accesibilidad del lugar de unión al otro lado de la membrana.

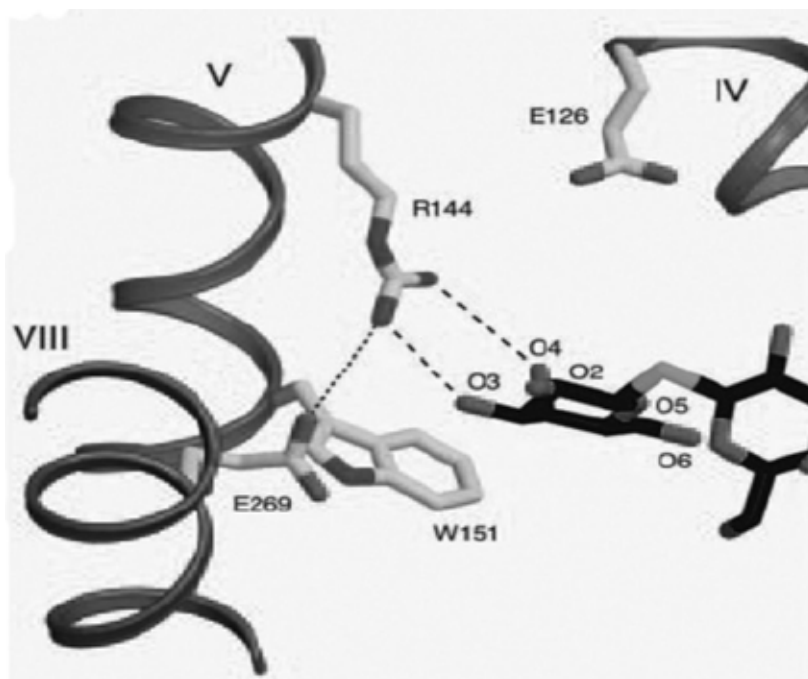


Figura 59. Detalle de las interacciones más importantes en el lugar de unión del sustrato de la LacY extraído de Vázquez-Ibar et al., 2004.

En este sentido cabe destacar que en el apartado 2 de la Discusión hemos mencionado la existencia de un puente salino en PheP, probablemente conservado en SteT y todas las LSHATs humanas y que correspondería a los residuos R301 y E217 de SteT. El residuo R301 está localizado en el hipotético CAR de SteT y podría estar implicado en el mecanismo de

ajuste inducido análogamente a LacY. En un futuro próximo, la implicación de estos residuos en la formación de un puente salino en SteT, así como su implicación en el posible mecanismo de ajuste inducido de SteT y del resto de miembros de la familia LAT debería ser estudiado detalladamente.

3.2. El Modelo de *Alternating Access* o la existencia de al menos dos lugares de unión.

Las características esenciales del modelo de *Alternating access* (figura 60) vienen definidas por cuatro condiciones (Tanford 1983):

- El transportador ha de tener al menos dos estados conformacionales distintos (cada uno accesible sólo desde un lado de la membrana).
- En general, la afinidad por el sustrato debe ser mayor en el estado accesible desde el lado de unión o carga y mucho menor en el estado accesible desde el lado de descarga.
- El cambio de una conformación a la otra involucra el movimiento del lugar de unión (los sustratos permanecen unidos) o la reorganización dentro del lugar es topológicamente equivalente a tal movimiento.
- Finalmente el regreso a la conformación original ocurre con los lugares de unión desocupados (específicamente este sería el caso del uniporte).

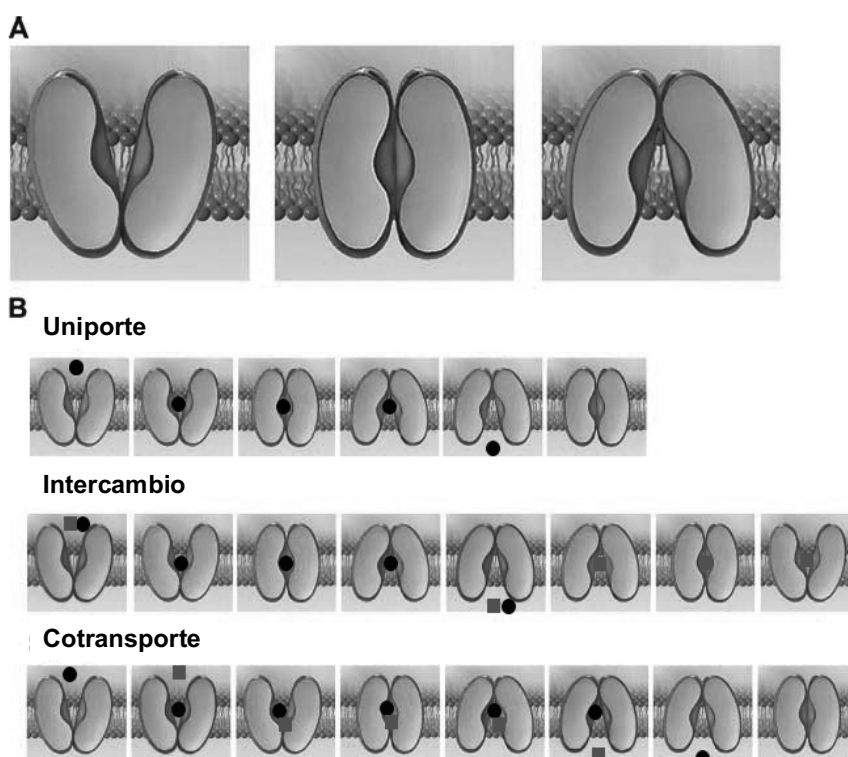


Figura 60. Esquemas representativos del modelo de *Alternating Access* extraídos de Hirai et al., 2004. En A podemos observar los tres estados conformacionales propuestos durante un ciclo de transporte. En B podemos observar la descripción específica de la secuencia de eventos en uniportes (arriba), intercambios (en medio) y cotransportes (abajo).

De acuerdo con el modelo de *Alternating access*, un transportador contiene un único lugar de unión central para los sustratos que se expone alternativamente a cada lado de la membrana a través de cambios conformacionales, lo que implica que la accesibilidad a los residuos críticos dependería del estado conformacional de la proteína y su accesibilidad debería estar influenciada por los sustratos y el potencial de membrana. Además todos los sustratos transportados en la misma dirección (cotransporte) deben estar unidos antes de producirse la translocación, como se ha demostrado para LacY (Kaback et al., 2007) o para el transportador de serotonina SERT (Zhang et al., 2006). Otros estudios encuentran discrepancias con que este último siga un mecanismo de *Alternating access* (Adams et al., 2003). Cuando los sustratos son transportados en direcciones opuestas (intercambio), el acoplamiento para ser eficiente requiere que el cambio conformacional ocurra únicamente cuando el sustrato está unido y no cuando el lugar de unión está vacío, como en el caso del transportador de GABA GAT1 en el que se propone la existencia de múltiples intermediarios en un mecanismo de transporte basado en un modelo de *Alternating access* de unión secuencial (Bicho et al., 2005).

Se han publicado los modelos atómicos de las estructuras de tres proteínas bacterianas de la MFS, GlpT (Huang et al., 2003), LacY (Abramson et al., 2003) y recientemente EmrD (Yin et al., 2006). Las dos primeras son estructuras de una conformación “abierta al citoplasma”, en la cual el lugar de unión del sustrato está expuesto preferentemente al medio acuoso en el lado citoplasmático y cerrado al medio acuoso en el lado periplásmico. Por el contrario, la estructura de EmrD no posee una forma de V y probablemente corresponde a un estadio intermedio. El conocimiento de la arquitectura de las proteínas de la MFS también proviene de la determinación de la estructura del estado unido a oxalato de OxIT determinada a 6.5 Å usando crió-microscopía electrónica (Heymann et al., 2001; Hirai et al., 2002; Heymann et al., 2003). La conformación “abierta” en la cual han sido cristalizadas LacY y GlpT es diferente de la conformación reportada para el estado “cerrado” de OxIT en la cual la cavidad central se estrecha hasta una abertura más estrecha en ambos extremos periplásmico y citoplasmático. Aunque OxIT y GlpT son intercambiadores y LacY es un cotransportador, las arquitecturas globales y los posicionamientos de las hélices de las tres proteínas son extraordinariamente similares, incluyendo la simetría entre el C y el N-terminal (Hirai et al., 2003). Combinando el conocimiento de las estructuras atómicas de los estados “abiertos” de GlpT y LacY con el mapa del estado “cerrado” de OxIT se obtiene un modelo para los cambios conformacionales que ocurren durante el transporte de oxalato (Hirai et al., 2004).

En el caso de la familia LAT, nuestro grupo y otros han encontrado evidencias de la existencia de dos lugares de paso del sustrato en transportadores de la familia LAT. Diversos estudios apoyan esta hipótesis:

- En rBAT expresado en oocitos de *X. laevis*, AIB es capaz de inducir corrientes de salida (debidas a la salida de aminoácidos básicos) similares a las causadas por Ala en términos de afinidad, corrientes máximas y curvas I-V, pero el transporte de AIB es más de 30 veces más lento que el de Ala. Estos datos indican que la entrada de aminoácidos no está estequiométricamente relacionada con la salida, demostrando que la asunción de que rBAT funciona como un intercambiador clásico es falsa y proponiendo un modelo de poro de doble compuerta (Coady et al., 1996).

- En la cinética de $b^{0,+}AT$ realizada en vesículas de membranas apicales de intestino de pollo, la K_M aparente de un lado es independiente de la concentración de sustrato al otro lado, de manera que las rectas en la representación de Lineweaver-Burk confluyen indicando que se trata de un mecanismo secuencial y no ping-pong, es decir, se necesita la formación de una terna (Torras-Illort et al., 2001). Además la K_M aparente externa es entre 14 y 21 veces mayor que la K_M aparente interna, sugiriendo un orden de unión para la formación del complejo ternario. Resultados cinéticos semejantes se han obtenido para el intercambio serina-serina de SteT (ver figura 17 en Antecedentes).

- El mutante de rBAT R365W muestra en oocitos de *X. laevis* un defecto en la salida de Arg, pero no afecta al influjo de Arg, ni a las K_M aparentes para Arg, ni al transporte de Leu ni Lys (Pineda et al., 2004b). En células HeLa sólo hay expresión funcional a 33 °C y en estas condiciones se observa una reducción del 50% de la entrada de Arg, mientras que la salida de Arg queda anulada completamente. Esto sugiere que existen dos vías de transporte de sustrato, una de entrada y otra de salida.

Observamos en SteT que dos residuos situados en el segmento TM VIII, separados por 10 residuos (~16 Å), son cruciales en la selectividad del sustrato. La primera zona donde interacciona el sustrato es la agrupación C291, G294 y K295. Aquí hemos demostrado que MTSET al unirse a la C291 bloquea el transporte (ver figuras 29, 30, 31 y 32 en Resultados) y que el sustrato es capaz de proteger con una afinidad en un rango similar a la K_M aparente (ver figura 40 y tabla 6 en Resultados). También hemos demostrado que el DTT activa fuertemente la actividad del mutante *cysless* G294C (ver figura 42 en Resultados) y que de nuevo el sustrato es capaz de proteger este efecto, con una afinidad idéntica a la K_M aparente (ver figura 44 en Resultados). Por último, la mutación K295C provoca tanto en el entorno *cysless* como en el *wt* un aumento enorme de la actividad y además provoca un cambio en el reconocimiento del sustrato por parte del transportador, como en el caso de L-arginina (ver figura 48 en Resultados) y probablemente en otros como indica el patrón de cis-inhibición (ver figuras 49 y 50 en Resultados), demostrando que hemos alterado la especificidad del sustrato.

Por otro lado, la mutación I285C también altera, aunque en menor medida, el patrón de cis-inhibición (ver figura 51 en Resultados), indicando que el sustrato también interacciona con

la posición I285 y los datos preliminares apuntan a que la posición I284 también parece sufrir algún cambio en su comportamiento con L-arginina (ver figura 41 en Resultados). Así pues, dos residuos separados aproximadamente 16 Å en la hélice VIII (ver figura 55) parecen reconocer la cadena lateral de los sustratos.

Además, como se aprecia en la figura 61, el segmento TM VIII parece tener una doble simetría en este punto, formando dos alas casi idénticas centradas en el residuo C291: S287, C291, K295 e I288, C291, G294 por un lado y en el residuo S281: I284, S281, K278 e I285, S281, G277 por el otro lado. Sería, pues, muy interesante crear y estudiar los siguientes mutantes: *cysless* G277C, *cysless* K278C y *cysless* S281C, con el fin de confirmar la existencia de este segundo lugar de unión, que contradeciría la hipótesis actual del modelo de *Alternating access* (figura 60) y que al haberse cristalizado alguna de sus conformaciones está considerado como el más plausible en transportadores como LacY (Abramson et al., 2003), GlpT (Huang et al., 2003), NhaA (Hunte et al., 2005), Glp_{ph} (glutamato) (Yernool et al., 2004) y Glp_{ph} (aspartato) (Boudker et al., 2007).

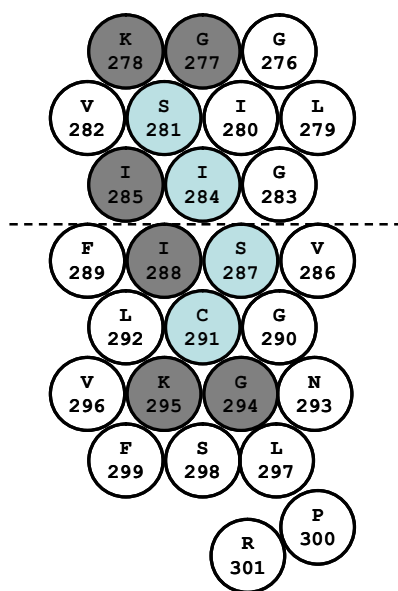


Figura 61. Esquema de la simetría de los dos posibles lugares de unión del sustrato en el segmento TM VIII. Se representa con una línea discontinua el plano de simetría. Se resaltan con gris oscuro los residuos exactamente conservados (K, G e I) y en gris claro los residuos no exactamente conservados (C o S y S o I).

Una explicación podría ser que estemos delante de intercambiadores obligatorios que seguirían un modelo de poro con doble compuerta en el que habría un lugar de unión accesible desde cada lado de la membrana como el propuesto para b^{0,+}AT (Coady et al 1996). Otro modelo, posiblemente más probable sería un modelo de *Double alternating access* basado en el modelo de *Aternating access*, pero con dos lugares de paso para el sustrato. Cada uno de

ellos tendría un lugar de unión del sustrato en un lado distinto de la membrana y la unión de ambos sustratos desencadenaría los cambios conformacionales del proceso de intercambio. Este modelo ha sido propuesto para $b^{0,+}AT$ (Torras-Illort et al., 2001), y para el intercambiador de aspartato/glutamato de la membrana mitocondrial interna, el cual incluye dos “subunidades” o vías de paso funcionales con lugares de unión alternando en cada dominio de la membrana en el cual el paso de translocación está bajo el control del potencial de membrana (Dierks et al., 1988). Estudios estructurales realizados por la Dra. E. Fernández en nuestro laboratorio han demostrado que la subunidad pesada es la que determina el estado oligomérico en la familia LAT, de manera que rBAT y $b^{0,+}AT$ forman un heterotetrámero (dímero de heterodímeros) mientras que 4F2hc y xCT forman un heterodímero (Fernandez et al., 2006). La existencia de un heterotetrámero podría implicar la existencia de un único poro en cada heterodímero que deberían funcionar de manera coordinada, pero eso no es posible ya que en ambos casos se ha determinado que la unidad funcional es el heterodímero. Por otro lado, no parece ser tampoco el caso de SteT, ya que nuestros resultados sugieren que SteT es funcional como monómero (ver apartado 2 de Resultados y Reig et al., 2007).

En el caso de OxIT se ha descrito la existencia de un sitio activo bifuncional (Yang et al., 2005), cuyo modelo estructural coloca dos residuos cargados positivamente (R272 en el segmento TM VIII y K355 en el segmento TM XI) en la cavidad central separados 10 Å a lo largo del lugar de paso del sustrato, sugiriendo que las interacciones electrostáticas entre esos residuos y el sustrato (el anión oxalato que posee dos cargas negativas) son un paso clave en la generación del cambio conformacional entre los estados abierto y cerrado del transportador (Hirai et al., 2004; figura 62):

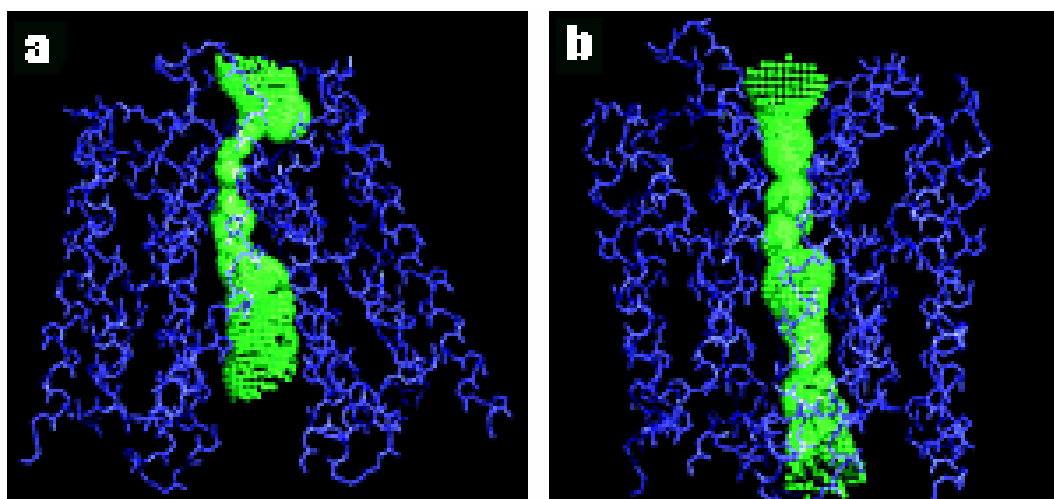


Figura 62. Visualización de la forma de la cavidad interna de OxIT extraída de Hirai et al., 2004. Se muestran las conformaciones abierta al citoplasma (a) y unida al sustrato, “cerrada” (b). En ambas el lado citoplasmático es el superior.

El caso de OxlT es muy similar al caso de GlpT y UhpT donde el lugar de unión del anión incorpora dos residuos de Arg separados por una distancia similar formando una pequeña región discoidal de ~ 10 Å a lo largo del lugar de paso y de ~ 3 Å de ancho en el centro de la membrana que sirve de dominio de unión del sustrato (Fann et al., 1998; Huang et al., 2003). Esto es diferente para SteT, ya que los dos posibles lugares de unión están a una distancia mayor (ver figura 55) y ambos parecen reconocer la misma cadena lateral. En este sentido, existe un modelo preliminar del lugar de unión de aminoácidos de las LSHATs (Kanai et al 2001), en donde los autores sugieren la existencia de tres lugares de reconocimiento: uno para el grupo α -carboxilo, otro para el grupo α -amino y otro para las cadenas laterales. Las posiciones I285 y K295 de SteT podrían corresponder a dos lugares de unión de la cadena lateral.

Asumiendo la existencia de dos lugares de unión, otra posibilidad podría ser que los transportadores de la familia LAT se comporten como canales con ocupación múltiple de sustrato sin grandes cambios conformacionales, una idea recientemente ofrecida que entra en conflicto con los modelos tradicionales (DeFelice et al., 2007) y que se ha confirmado al menos bajo ciertas condiciones en la Na^+/K^+ ATPasa, en los intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la familia NCXs, en los transportadores de glutamato de la familia EAAT, en el transportador de glucosa GLUT-1, en los transportadores de monoaminas como los de serotonina, norepinefrina y dopamina y en el transportador de GABA (Cammack et al., 1996). También se ha demostrado que varios de los canales de Cl^- CIC se comportan como transportadores intercambiadores de Cl^-/H^+ . Este modelo justificaría el hecho de no haber encontrado cambios conformacionales mediante fluorescencia (ver Anexo 3).

A continuación, a modo de ejemplo, se describen las evidencias de ocupación múltiple de sustrato por GLUT1 y CIC-4 y CIC-5.

GLUT1 es un transportador facilitado de glucosa, miembro de la MFS, que no ha sido cristalizado hasta la fecha pero cuya estructura 3D ha sido modelada por homología a partir de los cristales de LacY y GlpT de *E. coli*. Las doce hélices TM están ordenadas alrededor de un poro central lleno de agua formando un canal de 15 Å de largo y 8 Å de ancho cerca de su punto medio (Hirai et al., 2002; Abramson et al., 2003). Las simulaciones de dinámica molecular muestran que la glucosa se une cerca de esta posición dentro del poro, de modo similar al sustrato de la LacY (Abramson et al., 2003). Basándose en un modelo 3D de GLUT1 (PDB ID: 1SUK), el programa de reconocimiento molecular AUTODOCK 3 revela la existencia de nueve lugares de unión de hexosas a lo largo de todo el canal "hidrofilico" (Cunningham et al., 2006). Cinco de estos lugares están a una distancia de entre 3 y 5 Å de 10 mutaciones missense causantes de patologías debido a déficits en el transportador de glucosa y otros tres sitios están a 8 Å de otras dos mutaciones missense. D-glucosa se uniría a cinco sitios en la abertura externa del canal, con afinidad creciente hacia el poro central. Posteriormente, pasa

por un canal estrecho a un vestíbulo interno que contiene cuatro sitios de menor afinidad. Las β -D-hexosas presentan el doble de afinidad que sus α -anómeros a los 23 residuos aromáticos en el mecanismo de transporte, sugiriendo que los hidrógenos de las hexosas endocíclicos forman enlaces π con los anillos aromáticos y se desliza entre los sitios en vez de ser translocado vía un único sitio alternante (*single alternating site*).

Los canales de Cl^- humanos CIC-4 y CIC-5 y el bacteriano CIC-ec1 se comportan como transportadores intercambiadores de Cl^- - H^+ , ya que el flujo de Cl^- en una dirección está estequiométricamente acoplado con el movimiento de H^+ en la dirección opuesta, revelando un comportamiento típico de intercambiadores y no de canales (Pusch et al., 2006). CIC-4 y CIC-5 se sitúan en membranas intracelulares y están implicados en la acidificación de compartimentos intracelulares (endosomas, lisosomas), a diferencia de CIC-0, CIC-1, CIC-2 y CIC-K que se sitúan en la membrana citoplasmática y se comportan como canales de Cl^- . La estructura cristalina de dos CIC procariotas (Dutzler et al., 2002) reveló la existencia de dos poros idénticos, cada uno de los cuales formando parte de una subunidad dentro de una proteína de membrana homodimérica. Las subunidades individuales están compuestas de dos mitades aproximadamente repetidas que cruzan la membrana con direcciones opuestas, a diferencia de los canales de K^+ que presentan subunidades idénticas con la misma orientación en la membrana. Esta disposición hace que los canales de Cl^- tengan un poro con forma de reloj de arena con una constricción estrecha (su filtro de selectividad) cerca del centro de la membrana, mientras que el canal de K^+ tiene una cavidad en el centro de la membrana. Esto es debido a que los aniones son más estables que los cationes en la membrana, y quizás por eso los canales de Cl^- no requieren un amplio poro relleno de agua cerca del centro de la membrana para minimizar la barrera dieléctrica (dentro de la membrana existe un potencial positivo). En este sentido la presencia de varios residuos con carga positiva en el hipotético CAR de las LSHATs se justificaría por la existencia de un amplio poro relleno de agua, aunque varios de ellos podrían estar formando puentes salinos con carboxilatos.

Una manera de afianzar si SteT se comporta como un canal sería si el doble mutante I285CK295C presentara un efecto aditivo. Otra manera más determinante para probar el modelo de dos lugares de paso sería hacer el transporte con vesículas de *E. coli*, donde se puede orientar el transportador y ver si análogamente a lo observado para el mutante de rBAT R365W (Pineda et al., 2004b) una posición controla una dirección y la otra posición controla la otra dirección, cosa que en nuestros estudios no podemos determinar al tener una incorporación de SteT aleatoria en la membrana de los PLs.

Otra manera de confirmar la existencia de dos lugares de unión sería la cristalización, ya sea 2D o 3D, de un miembro de esta familia con dos sustratos por molécula de transportador. En este sentido la Dra. E. Valencia y M. Ratera están trabajando en nuestro laboratorio con varios homólogos procariotas (entre ellos SteT), y en la cristalización 2D

colaboramos con el Dr. D. Fotiadis y F. Casagrande (Biozentrum, U. de Basilea, Suiza). Por su parte el Dr. A. Rosell, también en nuestro laboratorio, está intentando la cristalización 3D con las LSHAT humanas producidas en *Pichia pastoris*, ya sea de manera aislada o en forma de heterodímero con su subunidad pesada correspondiente y el Dr. J. L. Vázquez-Ibar lo está intentando mediante el uso del vector pMIS 3.0E (regalo del Dr. S. Choe, Salk Institute, EEUU) que expresa la proteína Mistic, una inusual proteína integral de membrana de *B. subtilis* capaz de plegarse autónomamente dentro de la membrana, saltándose la maquinaria celular de translocación (Roosild et al., 2005). Este es un trabajo largo y arduo que esperamos rinda sus frutos en breve y confirme nuestra hipótesis.

4. El efecto del DTT.

Respecto el efecto del DTT sobre SteT (ver figuras 35 y 36 en Resultados) y varios de sus mutantes únicos de cisteína (ver figuras 39 y 42 en Resultados), lo más probable es que la cisteína esté modificada y al añadir DTT lo que estemos haciendo sea reducir la modificación de su cadena lateral al tiol original, lo cual causa que mutantes de SteT como el *cysless* S287C y el *cysless* G294C sean inactivos al tener el poro bloqueado hasta que el DTT lo desbloquea, mostrando entonces una gran actividad (ver figura 42 en Resultados). El hecho de que el DTT sea capaz de producir dicha reducción indica que la Cys pueda estar nitrosilada (Cys-SNO), formando un enlace disulfuro (Cys-SS-R) o bien en forma de ácido sulfénico (Cys-SOH), pero no formando óxidos superiores como ácidos sulfinínicos (Cys-SO₂H) o sulfónicos (Cys-SO₃H) ya que el DTT no es capaz de romper estos enlaces (Kim et al., 2002). El β-mercaptoetanol, al igual que el DTT, es capaz de activar el transporte en *cysless* S287C y *cysless* G294C (datos no mostrados), pero al igual que el DTT también es capaz de reducir enlaces disulfuro, cisteínas nitrosiladas (Rhee et al., 2005) y ácidos sulfénicos (Guo et al., 1991; Suh et al., 2000), con lo que no nos permite descartar ninguna opción.

Hay varias maneras de saber si es un ácido sulfénico (Kim et al., 2002): si el arsenito sódico es capaz de reducirlo (es un agente reductor específico de ácidos sulfénicos), si una vez reaccionado con dimedona el DTT no pudiera liberarlo (se forma un aducto covalente resistente al DTT) o mediante la medición a 347 nm posterior a la reacción con NBD (se forma un aducto que absorbe a esa λ).

Por el contrario, si la modificación fuera una nitrosilación o una glutationilación el DTT sería capaz de revertirla, pero no así el arsenito sódico y además sería estable durante varios días (Kim et al., 2002). Se puede determinar la estequiometría de la nitrosilación por el método modificado de Saville seguido de quimioluminiscencia para verificar su presencia (Hausladen et al., 1996). La glutationilación se puede cuantificar por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Kim et al., 2002): se añade un exceso de DTT a la proteína purificada para liberar el GSH, se ultracentrifuga con un Amicon, se añade monobromobimano en exceso y el complejo

formado entre el GSH y el monobromobimano se puede separar por HPLC usando una columna C₁₈ detectando por fluorescencia y usando una curva estándar para cuantificarlo.

Otra manera de determinar la modificación es por isoelectroenfoque (Ji et al., 1999), ya que tanto la glutationilación como la oxidación a ácido sulfénico de una cisteína aumentan la carga negativa de la proteína, mientras que la nitrosilación no produce cambio en la carga. Aunque la mejor manera de determinar la modificación presente en estas cisteínas es por espectrometría de masas con ionización por electrospray (ESI-MS), ya que nos permite discernir cuál de ellas es la que se está dando (Kim et al., 2002). En el caso de OxyR se modificó *in vitro* la proteína y por ESI-MS se pudo distinguir el monómero en la forma reducida (pico a 34272), de la glutationilada (pico a 34581) y de la que estaba en forma de ácido cisténico (pico a 34292). Experimentos en esta línea están en curso a cargo del Dr. J. L. Vázquez-Ibar en nuestro laboratorio.

Respecto al origen de la modificación existen tres posibilidades: que la oxidación la produzca la propia *E. coli* durante el proceso de sobreexpresión de SteT, que la oxidación la produzcan los lípidos totales de *E. coli* que utilizamos para reconstituir a SteT o bien que SteT se oxide por su exposición al aire (se ha comprobado que la exposición al aire de proteínas purificadas puede producir una modificación por ácido sulfénico (Kim et al., 2002)).

Una manera de saber si la modificación la produce *E. coli* es haciendo el transporte con vesículas *right-side-out*. Si los mutantes *cysless* S287C o *cysless* G294C únicamente presentan actividad en estas vesículas después del tratamiento con DTT se demostraría que la oxidación la realiza *E. coli*, mientras que si la presentan sin necesidad del tratamiento con DTT se demostraría que la oxidación es posterior, ya sea en la purificación o por los lípidos usados en la reconstitución. El problema puede venir del basal de transporte que tengan estas vesículas ya que no se trata de proteína purificada y *E. coli* tiene cuatro sistemas de transporte de L-serina (Hama et al., 1988): el sistema de serina-treonina que está acoplado con Na⁺, el sistema de L-Ala, L-Ser, L-Thr y L-Leu que es sensible a choques osmóticos, el sistema glicina-alanina que media el cotransporte de L-Ser y H⁺ (aunque no está presente en todas las cepas de *E. coli*) y finalmente un sistema de cotransporte específico de L-Ser y H⁺.

Se ha visto que la oxidación de cisteínas de proteínas y su posterior reducción es una respuesta temprana al estrés oxidativo (Thomas et al., 1995) que sirve a las células para mantener el equilibrio redox y también para regular la actividad de ciertas proteínas. Lo único en común en las cisteínas modificadas es que esos sitios están en contacto directo con la fase acuosa para que los materiales solubles en agua puedan oxidarlos o reducirlos. Estas modificaciones pueden incluir formación de puentes disulfuro (Hsp33, Rara y OxyR), nitrosilación (Ras y OxyR), glutationilación (PTP1B, GapDH y OxyR) o formación de un ácido sulfénico (PTP1B y OxyR) (figura 63) produciendo la activación (Hsp33, OxyR, PKC y Raf-

kinase) o inactivación (p53, PTEN) de la proteína modificada (Leichert et al., 2004). Además, como se ha visto en OxyR, diferentes modificaciones del grupo tiol pueden tener efectos funcionales distintos en la misma proteína, convirtiéndose en una forma más de regulación de su actividad (Kim et al., 2002). Existen datos que sugieren un código para el control redox a través del cual las proteínas alostéricas pueden favorecer respuestas escalables (*graded*) (cooperativas) o máximas (no cooperativas), y a través de las cuales se pueden alcanzar respuestas diferenciales a las señales relacionadas con el estado redox.

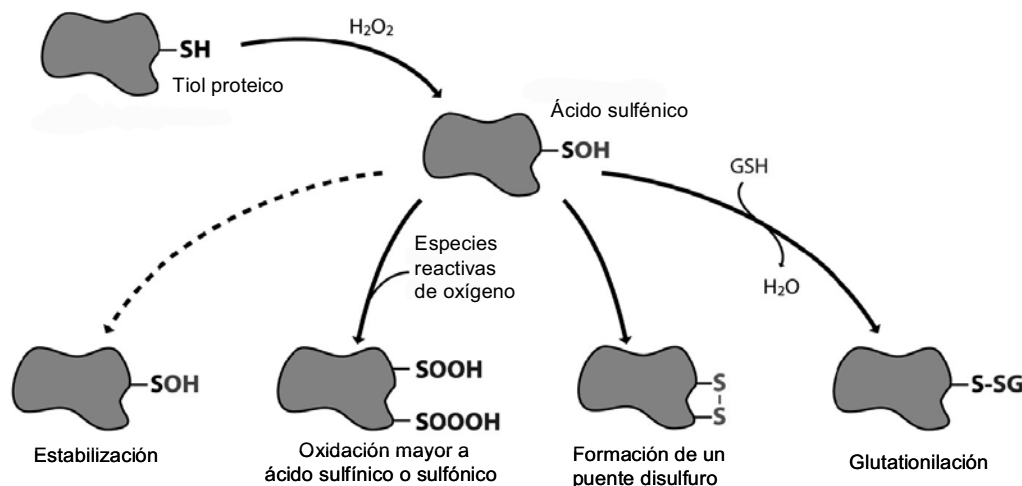


Figura 63. Esquema de la oxidación de una cisteína en una proteína adaptado de Kiley et al., 2004. El estrés oxidativo genera especies reactivas de oxígeno que oxidan el grupo tiol de la cisteína a ácido sulfénico (R-SOH). Este ácido sulfénico es un intermediario inestable que puede estabilizarse, oxidarse a ácido sulfínico (R-SOOH) o sulfónico (R-SOOOH) o bien formar un enlace de puente disulfuro intramolecular o extramolecular (R-S-S-R'), normalmente con una molécula de GSH (R-S-S-G).

OxyR es una proteína de unión al DNA, donde la C199 situada en un bolsillo relativamente hidrofóbico es crítica para la actividad (Kim et al., 2002). La modificación de esta cisteína puede ser de diferentes maneras: formando un ácido sulfénico (Cys-SOH), formando una nitrosocisteína (Cys-SNO) o uniéndose a una molécula de GSH mediante un enlace disulfuro (Cys-SSG). Estas modificaciones son mecanismos de activación de OxyR *wt*, y curiosamente, las diferentes formas oxidadas de OxyR son funcionalmente distintas ya que las modificaciones le confieren características estructurales diferentes. La forma obtenida por purificación estándar había sido oxidada por el aire formando un ácido sulfénico, lo que demuestra que esto podría estar pasándonos a nosotros al purificar SteT.

El canal de Cl^- ATP-dependiente CFTR humano es inhibido debido a la glutacionilación de la C1344 que está próxima a la secuencia firma en el segundo dominio de unión de nucleótidos (Wang et al., 2005). Hay tres líneas de evidencias que lo apoyan: los canales pueden protegerse de la inhibición con un pretratamiento con NEM o bajando el pH, los

canales pueden rescatarse por agentes reductores como el DTT o glutaredoxinas purificadas, incluyendo un mutante que específicamente reduce disulfuros mixtos entre GSH y cisteína dentro de proteínas y finalmente la glutatiónilación reversible de CFTR en microsomas puede detectarse bioquímicamente bajo las mismas condiciones.

Los transportadores de glutamato GLAST, GLT1, EAAC1 y EAAT4 reconstituidos en liposomas son inhibidos por radicales de oxígeno, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y peroxinitrito ($ONOO^-$) que es una combinación del óxido nítrico (NO) y el radical superóxido (O_2^-) de manera rápida y dosis-dependiente (Trotti et al., 1996). Se postula que estos transportadores tienen regiones conservadas en su estructura que les confieren vulnerabilidad a estas sustancias, probablemente residuos de cisteínas. Además otras especies reactivas de oxígeno e incluso el NEM también son capaces de inhibir el transporte de glutamato en sinaptosomas (Berman et al., 1997).

A pesar de que la glutatiónilación de proteínas es un modo común de regulación redox en eucariotas, muy pocas proteínas de *E. coli* se conocen que se modifiquen de esta manera. Se ha visto que cuando *E. coli* está expuesta a condiciones no ideales de crecimiento y estrés oxidativo desarrolla una auxotrofia para metionina debido a un efecto en MetE (Metionina sintasa independiente de cobalamina) que es la enzima que cataliza el paso final de la producción de metionina en *E. coli*. Posteriores experimentos han demostrado que esta enzima purificada es inactivada por una reacción con GSH que produce la glutatiónilación de la C645, que está situada estratégicamente en la entrada del sitio activo (Hondorp et al., 2004). La glutatiónilación de la proteína le proporciona una estrategia para modular *in vivo* la actividad de la enzima protegiendo en condiciones de estrés oxidativo el sitio activo de daños oxidativos permanentes y permitiéndole recuperar la enzima reducida en condiciones normales. Esto nos indica que la sobreexpresión en discontinuo de una proteína por parte de *E. coli* puede ser una situación de estrés suficiente para producir una glutatiónilación de SteT.

Además de SteT, varias LSHATs poseen una cisteína en la región del segmento TM VIII (ver figura 57) que proponemos forma el poro por el que pasa el sustrato y por tanto podría estar siendo modulada por alguna de estas modificaciones *in vivo*. Además, recientemente se ha comprobado en nuestro grupo, que MTSEA es capaz de inhibir el transporte de $b^{0,+}AT$ en células HeLa, a través de la C321, situada en el segmento TM VIII (Fernandez et al. 2006). Especialmente relevante es el caso de xCT, que además de poseer una cisteína en esta región y haberse demostrado que el pCMB y el pCMBS son capaces de bloquear su actividad de transporte uniéndose a ella (Jimenez-Vidal et al., 2004), se cree que su papel fisiológico está implicado en la captación de cistina para la síntesis de GSH y su mantenimiento (Chillaron et al., 2001). Esto da a xCT un papel relevante en situaciones de estrés oxidativo, por lo que no parece descabellado pensar que podría sufrir estas modificaciones *in vivo*, ya que la actividad de este transportador está regulada bidireccionalmente por el nivel de estrés oxidativo.

En esta dirección se han publicado numerosos trabajos (Bannai, 1984; Bannai et al., 1986; Bannai et al., 1989; Ishii et al., 1992; Sagara et al., 1993; Sato et al., 1995a; Sato et al., 1995b; Sato et al., 1998) que demuestran en diferentes células (fibroblastos, células neuronales y de la glía, macrófagos, células pancreáticas y hepatocitos) que la actividad x_c^- (de la cual es responsable xCT) es disminuida por la hipoxia crónica (3% O_2) en fibroblastos y que la subsiguiente exposición a oxígeno normal recupera la actividad de transporte (Bannai et al., 1989). Los agentes electrofílicos (Bannai et al., 1984; Bannai et al., 1986), los lipopolisacáridos (LPS) (Sato et al., 1995a; Sato et al., 1995b) y la depleción de cistina también alteran la actividad de transporte del sistema x_c^- . Aparte del sistema nervioso central, xCT se expresa o se induce en otros tipos celulares (Chillaron et al., 2001; Wagner et al., 2001). Entre éstos se encuentra la retina, un tejido particularmente expuesto al estrés oxidativo y donde xCT ejercería funciones paralelas a las descritas en el sistema nervioso central (Bridges et al., 2001; Tomi et al., 2002), con especial relevancia en las células de Müller (Tomi et al., 2003).

Además se ha visto que el GSH forma complejos con metalotioneinas de Cu^{2+} , Cd^{2+} y Zn^{2+} de vertebrados e invertebrados (Thomas et al., 1995). Los metales coordinados al dominio N-terminal de las metalotioneinas son cinéticamente lábiles, por lo que el GSH puede jugar un papel importante en la modulación del intercambio de metal (Jiang et al., 1998). En este sentido, xCT forma un complejo con 4F2hc (CD98) en el cual la Dra. J. Fort en nuestro laboratorio ha descubierto un lugar de unión de Zn^{2+} de muy alta afinidad (aparece en un cristal de 4F2hc en el que únicamente había trazas de Zn^{2+}) que podría servir para atraer la molécula de GSH hacia xCT o modificar la actividad del complejo 4F2hc-xCT.

Por tanto, la idea de que xCT, b^{0+} AT u otros HATs tengan una regulación por modificación de los residuos de cisteína en el segmento TM VIII es muy sugerente, pero obviamente requiere de su demostración experimental *in vivo*.

5. La cristalización de mutantes de proteínas integrales de membrana.

La inherente flexibilidad conformacional puede dificultar la obtención de cristales estables de transportadores. Por ello, se ha propuesto el uso de inhibidores para hacer más rígida su estructura. Esta estrategia podría permitir la cristalización de transportadores flexibles (Tate 2001). Pese a los pocos cristales de proteínas de membrana que han difractado suficientemente bien para establecer estructuras 3D con resoluciones $< 4 \text{ \AA}$, encontramos varios ejemplos de transportadores movidos por potencial electroquímico (uniportes, cotransportadores e intercambiadores) donde se ha recurrido a mutantes para obtener un cristal que no se podía obtener con la proteína *wt*, es el caso de LacY y GlpT.

La LacY es un transportador de membrana muy dinámico en el que el sustrato produce amplios cambios conformacionales (Kaback 2005; Guan et al., 2006; Mirza et al., 2006). Por contra, el mutante LacY C154G es capaz de unir sustratos con relativa alta afinidad pero está conformacionalmente bloqueado y por tanto es capaz de translocar muy poco sustrato a través de la membrana (Menick et al., 1985; van Iwaarden et al., 1993; Smirnova et al., 2003; Ermolova et al., 2005). Además este mutante exhibe una alta termoestabilidad y tiene una menor tendencia a agregar que el *wt* (Smirnova et al., 2003), lo cual ha permitido su cristalización y la determinación de su estructura por difracción de rayos X a 3.5 Å de resolución (Abramson et al., 2003).

Otro caso es el de GlpT cuyo *wt* produjo cristales que difractaron únicamente a 25 Å de resolución, pero la identificación de un núcleo rígido de la proteína por proteólisis limitada y espectrometría de masas resultó en cristales mejor ordenados (Lemieux et al., 2003), de manera que un mutante sin el primer residuo y truncado en el aminoácido 448 (el *wt* tiene 452), capaz de retener la actividad en PLs, produjo los cristales 2D que difractaron a una resolución de 3.7 Å. Sin embargo el empaquetamiento en la tercera dimensión era parcialmente desordenado. Este problema fue solucionado usando una mezcla de detergentes y manipulando las interacciones iónicas en la solución de cristalización. Los cristales resultantes de GlpT difractaron isotrópicamente a 3.3 Å de resolución y permitieron la determinación de la estructura por cristalografía de rayos X.

En este sentido, el mutante *cys/less* G294C está bloqueado (ver figura 41 en Resultados) de manera similar al mutante LacY C154G, lo cual puede ser de utilidad a la hora de cristalizarlo. Como hemos visto anteriormente, este mutante no tiene actividad de transporte hasta que no realizamos el tratamiento con DTT (ver figura 42 en Resultados), pero mantiene la capacidad de unir sustrato (ver figura 44 en Resultados, donde el sustrato bloquea la activación por DTT), con lo cual su inactividad no se debe a un mal plegamiento de la proteína. Además en experimentos realizados por el Dr. J. L. Vázquez-Ibar en nuestro grupo, este mutante presenta un sólo pico al ser purificado por una columna de exclusión molecular de sefrosa Superdex 200 10/300GL (GE Healthcare) (figura 64) obteniendo una proteína tan pura que no se aprecia ninguna otra banda en un gel de *Comasie Brilliant Blue* cuando se cargan 2 µg. Además si se realiza un tratamiento con DTT antes de pasar la proteína por la columna de sefrosa se sigue obteniendo un único pico, de igual tamaño al obtenido cuando no se realiza el tratamiento con DTT (datos no mostrados), lo cual descarta la homodimerización a través de la C294 como causa de la inactivación de este mutante. Otra característica interesante del *cys/less* G294C es que presenta una elevada estabilidad en solución una vez purificado y concentrado a más de 10 mg/ml, a diferencia del *wt* que no aguanta muchas horas sin precipitar en estas condiciones. Con todos estos datos, *cys/less* G294C parece un buen candidato para la cristalización, como así parecen sugerir unos primeros ensayos de cristalización 2D realizados por M. Ratera en el laboratorio del Dr. D. Fotiadis en Basilea.

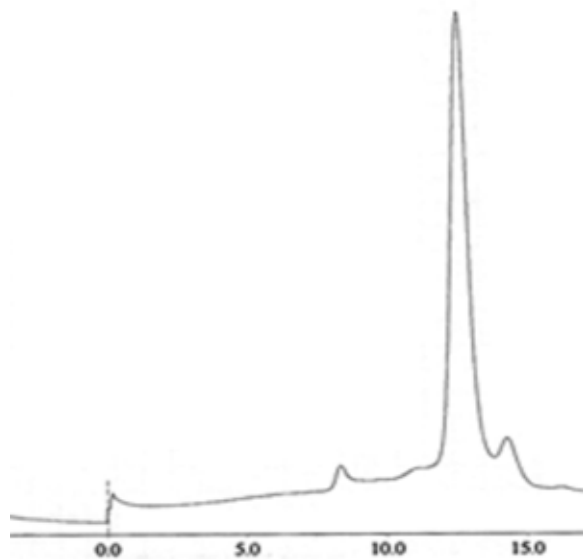


Figura 64. Cromatografía de exclusión molecular de sefarosa Superdex 200 10/300GL realizada por el Dr. J. L. Vázquez-Ibar en nuestro laboratorio con el mutante *cys/less* G294C previamente purificado con una cromatografía de afinidad con una resina de cobalto (similar a la de níquel) que muestra un único pico muy preponderante.

CONCLUSIONES

La proteína ykbA de *Bacillus subtilis*, purificada y reconstituida en proteoliposomas (PLs), presenta actividad de intercambio de L-serina, L-threonina y L-aminoácidos aromáticos. Por ello la renombramos como SteT (Serine/threonine exchanger Transporter). Los estudios cinéticos de la actividad de SteT son compatibles con un mecanismo secuencial de intercambio. SteT se agrupa filogenéticamente dentro de la familia LAT. Por todo ello, SteT es el primer homólogo procariota de la familia LAT que ha sido identificado y caracterizado. Proponemos SteT como modelo procariota para el estudio funcional y estructural de la familia LAT.

Los estudios estructurales de SteT mediante electroforesis no desnaturalizante y TEM con tinción negativa y con criofractura en PLs indican que el intercambiador es funcional como monómero. SteT tiene apariencia de *donut* elíptico con diámetros exteriores de ~6 y ~7 nm.

El residuo C291 en el segmento transmembrana (TM) VIII de SteT es la única diana de inactivación por MTSET y de activación por DTT. El sustrato L-serina protege de la inactivación por MTSET. Por tanto, el sustrato bloquea directamente o provoca un cambio conformacional que bloquea la accesibilidad de MTSET al residuo.

El segmento TM VIII presenta dos caras funcionalmente diferenciables con periodicidad de hélice α . Una cara está formada por los residuos I285, I288, L292, K295 y F299 que mutados a cisteína muestran inhibición por MTSET y son insensibles a DTT. La otra cara, adyacente a la anterior, está formada por los residuos S287, G290, G294 y S298 que mutados a cisteína muestran activación por DTT y son insensibles a MTSET. Los residuos I284 y C291 poseen características de ambas ya que se inactivan por MTSET y se activan por DTT.

DTT activa ~20 veces SteT *cys/less* G294C en PLs, muy probablemente incrementado la $V_{\text{máx}}$ sin afectar la K_M aparente. Esta activación es protegible por el sustrato L-serina con una EC_{50} similar a su K_M aparente. Por tanto, el sustrato bloquea directamente o provoca un cambio conformacional que bloquea la accesibilidad de DTT al residuo.

La mutación K295C, tanto en su entorno *cys/less* como *wt*, genera un transportador ~50 y ~260 veces más rápido que SteT y SteT *cys/less* respectivamente. La mutación K295G provoca un efecto muy inferior y la mutación K295L rinde un transportador inactivo. Estos datos sugieren que no hay una relación directa entre el tamaño de la cadena lateral en la posición 295 y la actividad de SteT, si no que la presencia de cisteína es la causante del aumento de actividad.

Los residuos I285 y K295 parecen presentar interacción con la cadena lateral del sustrato ya que las mutaciones I285C y K295C producen un cambio dramático en el patrón de cis-inhibición. En estos mutantes la mayoría de los aminoácidos estudiados inhiben

Conclusiones

ampliamente el transporte de L-serina, con la excepción de L-prolina, L-hidroxiprolina, L-glutamato y glicina. En este sentido, SteT *cys/ess* K295C presenta un claro cambio de especificidad de sustrato ya que, a diferencia de SteT, transporta L-arginina. El hecho de que I285 y K295 disten ~ 16 Å indicaría la existencia de al menos dos lugares de unión independientes de la cadena lateral del sustrato, contradiciendo el modelo de *Alternating access*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Referencias bibliográficas:

Abramson J., Smirnova I., Kasho V., Verner G., Kaback H. R. and Iwata S.

Structure and Mechanism of the Lactose Permease of *Escherichia coli*.

Science 301: 610-615, 2003.

Adams S. V. and DeFelice L. J.

Ionic Currents in the Human Serotonin Transporter Reveal Inconsistencies in the Alternating Access Hypothesis.

Biophys. J. 85: 1548-1559, 2003.

Agre P., Bonhivers M. and Borgnia M. J.

The Aquaporins, Blueprints for Cellular Plumbing Systems.

J. Biol. Chem. 273 (24): 14659-14662, 1998.

Ahmed A., Peter G. J., Taylor P. M., Harper A. and Rennie M. J.

Sodium-independent currents of opposite polarity evoked by neutral and cationic amino acids in neutral and basic amino acid transporter cRNA-injected oocytes.

J. Biol. Chem. 270: 8482-8486, 1995.

Albi J. L., Canals P., Gallardo M. A. and Sánchez J.

Na⁺-independent L-alanine uptake by trout cells. Evidence for the existence of at least two functionally different asc systems.

J. Membr. Biol. 140: 189-196, 1994.

Andrade S. L., Dickmanns A., Ficner R. and Einsle O.

Crystal structure of the archaeal ammonium transporter Amt-1 from *Archaeoglobus fulgidus*.

Proc. Natl. Acad. Sci. 102: 14994-14999, 2005.

Auer M., Kim M. J., Lemieux M. J., Villa A., Song J., Li X. D. and Wang D. N.

High-yield expression and functional analysis of *Escherichia coli* glycerol-3-phosphate transporter.

Biochemistry 40 (22): 6628-6635, 2001.

Ballesteros J. A. and Weinstein H.

Analysis and refinement of criteria for predicting the structure and relative orientations of transmembranal helical domains.

Biophys. J. 62: 107-109, 1992.

Bannai S. and Kitamura E.

Transport interaction of L-cystine and L-glutamate in human diploid fibroblasts in culture.

J. Biol. Chem. 255: 2372-2376, 1980.

Bannai S.

Induction of cystine and glutamate transport activity in human fibroblasts by diethyl maleate and other electrophilic agents.

J. Biol. Chem. 259 (4): 2435-2440, 1984a.

Bibliografia

Bannai S.

Transport of cystine and cysteine in mammalian cells.

Biochim. Biophys. Acta 779: 289-306, 1984b.

Bannai S., Christensen H. N., Vadgama J. V., Ellory J. C., Englesberg E., Guidotti G. G., Gazzola G. C., Kilberg M. S., Lajtha A. and Sacktor B.

Amino acid transport systems.

Nature 311 (5984): 308, 1984.

Bannai S. and Tateishi N.

Role of membrane transport in metabolism and function of glutathione in mammals.

J. Membr. Biol. 89 (1): 1-8, 1986.

Bannai S., Sato H., Ishii T. and Sugita Y.

Induction of cystine transport activity in human fibroblasts by oxygen.

J. Biol. Chem. 264 (31): 18480-18484, 1989.

Bartoccioni P., Tesis doctoral.

Bass R. B., Strop P., Barclay M. and Rees D. C.

Crystal Structure of *Escherichia coli* MscS, a Voltage-modulated and mechanosensitive channel.

Science 298: 1582-1587, 2002.

Bassi M. T., Gasol E., Manzoni M., Pineda M., Riboni M., Martin R., Zorzano A., Borsani G. and Palacin M. Identification and characterisation of human xCT that co-expresses, with 4F2 heavy chain, the amino acid transport activity system x_c^- .

Pflugers Arch. 442: 286-296, 2001.

Bauch C., Forster N., Loffing-Cueni D., Summa V. and Verrey F.

Functional cooperation of epithelial heteromeric amino acid transporters expressed in madin-darby canine kidney cells.

J. Biol. Chem. 278: 1316-1322, 2003.

Bear C. E., Li C., Galley K., Wang Y., Garami E. and Ramjeesingh M.

Coupling of ATP Hydrolysis with Channel Gating by Purified, Reconstituted CFTR.

J. Bioenerg. Biomembr. 29 (5): 465-473, 1997.

Bellone G., Alloatti G., Levi R., Geuna M., Tetta C., Peruzzi L., Letarte M. and Malavasi F.

Identification of a new epitope of the 4F2/44D7 molecular complex present on sarcolemma and isolated cardiac fibers.

Eur. J. Immunol. 19: 1-8, 1989.

Berman S. B. and Hastings T. G.

Inhibition of glutamate transport in synaptosomes by dopamine oxidation and reactive oxygen species.

J. Neurochem. 69 (3): 1185-1195, 1997.

Bertran J., Werner A., Moore M. L., Stange G., Markovich D., Biber J., Testar X., Zorzano A., Palacin M. and Murer H.

Expression cloning of a cDNA from rabbit kidney cortex that induces a single transport system for cystine and dibasic and neutral amino acids.

Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 5601-5605, 1992b.

Bicho A. and Grever C.

Rapid Substrate-Induced Charge Movements of the GABA Transporter GAT1.

Biophys. J. 89: 211-231, 2005.

Bishop L., Agbayani R. Jr., Ambudkar S. V., Maloney P. C. and Ames G. F.

Reconstitution of a bacterial periplasmic permease in proteoliposomes and demonstration of ATP hydrolysis concomitant with transport.

Proc. Natl. Acad. Sci. 86 (18): 6953-6967, 1989.

Blood P. D. and Voth G. A.

Direct observation of Bin/amphiphysin/Rvs (BAR) domain-induced membrane curvature by means of molecular dynamics simulations.

Proc. Natl. Acad. Sci. 103: 15068-15072, 2006.

Borgnia M. J. and Agre P.

Reconstitution and functional comparison of purified GlpF and AqpZ, the glycerol and water channels from *Escherichia coli*.

Proc. Natl. Acad. Sci. 98 (5): 2888-2893, 2001.

Borre L., Kavanaugh M. P. and Kanner B. I.

Dynamic Equilibrium between Coupled and Uncoupled Modes of a Neuronal Glutamate Transporter.

J. Biol. Chem. 277 (16): 13501-13507, 2002.

Borsani G., Bassi M. T., Sperandio M. P., De Grandi A., Buoninconti A., Riboni M., Manzoni M., Incerti B., Pepe A., Andria G., Ballabio A. and Sebastio G.

SLC7A7, encoding a putative permease-related protein, is mutated in patients with lysinuric protein intolerance.

Nat. Genet. 21: 297-301, 1999.

Boudker O., Ryan R. M., Yernool D., Shimamoto K. and Gouaux E.

Coupling substrate and ion binding to extracellular gate of a sodium-dependent aspartate transporter.

Nature 445: 387-393, 2007.

Bridges C. C., Kekuda R., Wang H., Prasad P. D., Mehta P., Huang W., Smith S. B. and Ganapathy V.

Structure, function, and regulation of human cystine/glutamate transporter in retinal pigment epithelial cells.

Invest Ophthalmol. Vis. Sci. 42: 47-54, 2001.

Broer S., Broer A. and Hamprecht B.

The 4F2hc surface antigen is necessary for expression of system L-like neutral amino acid-transport activity in C6-BU-1 rat glioma cells: evidence from expression studies in *Xenopus laevis* oocytes.

Biochem. J. 312 (3): 863-870, 1995.

Bibliografia

- Broer A., Hamprecht B. and Broer S.
Discrimination of two amino acid transport activities in 4F2 heavy chain-expressing *Xenopus laevis* oocytes.
Biochem. J. 333 (3): 549-554, 1998.
- Broer A., Wagner C. A., Lang F. and Broer S.
The heterodimeric amino acid transporter 4F2hc/ γ^+ LAT2 mediates arginine efflux in exchange with glutamine.
Biochem. J. 349 (3): 787-795, 2000.
- Broer A., Friedrich B., Wagner C. A., Fillon S., Ganapathy V., Lang F. and Broer S.
Association of 4F2hc with light chains LAT1, LAT2 or γ^+ LAT2 requires different domains.
Biochem. J. 355: 725-731, 2001.
- Broer S.
Adaptation of plasma membrane amino acid transport mechanisms to physiological demands.
Pflugers Arch. 444: 457-466, 2002.
- Buhr A. and Erni B.
Membrane topology of the glucose transporter of *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem. 268: 11599-11603, 1993.
- Busch A. E., Herzer T., Waldegger S., Schmidt F., Palacin M., Biber J., Markovich D., Murer H. and Lang F.
Opposite directed currents induced by the transport of dibasic and neutral amino acids in *Xenopus* oocytes expressing the protein rBAT.
J. Biol. Chem. 269: 25581-25586, 1994.
- Busch W. and Saier M. H. Jr.
The transporter classification (TC) system, 2002.
Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 37 (5): 287-337, 2002.
- Bywater R. P., Thomas D. and Vriend G.
A sequence and structural study of transmembrane helices.
J. Comput. Aided. Mol. Des. 15: 533-552, 2001.
- Cabrera-Martinez R. M., Tovar-Rojo F., Vepachedu V. R. and Setlow P.
Effects of overexpression of nutrient receptors on germination of spores of *Bacillus subtilis*.
J. Bacteriol. 185 (8): 2457-2464, 2003.
- Cammack J. N. and Schwartz E. A.
Channel behavior in a γ -aminobutyrate transporter.
Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 723-727, 1996.
- Campbell W. A. and Thompson N. L.
Overexpression of LAT1/CD98 light chain is sufficient to increase system L-amino acid transport activity in mouse hepatocytes but not fibroblasts.
J. Biol. Chem. 276: 16877-16884, 2001.

- Carpenter T. O., Levy H. L., Holtrop M. E., Shih V. E. and Anast C. S.
Lysinuric protein intolerance presenting as childhood osteoporosis. Clinical and skeletal response to citrulline therapy.
N. Engl. J. Med. 312: 290-294, 1985.
- Closs E. I., Lyons C. R., Kelly C. and Cunningham J. M.
Characterization of the Third Member of the MCAT Family of Cationic Amino Acid Transporters. Identification of a domain that determines the transport properties of the MCAT proteins.
J. Biol. Chem. 268 (28): 20796-20800, 1993.
- Closs E. I., Graf P., Habermeier A., Cunningham J. M. and Forstermann U.
Human cationic amino acid transporters hCAT-1, hCAT-2A, and hCAT-2B: three related carriers with distinct transport properties.
Biochemistry 36: 6462-6468, 1997.
- Coady M. J., Jalal F., Chen X., Lemay G., Berteloot A. and Lapointe J. Y.
Electrogenic amino acid exchange via the rBAT transporter.
FEBS Lett. 356: 174-178, 1994.
- Coady M. J., Chen X. Z. and Lapointe J. Y.
rBAT is an amino acid exchanger with variable stoichiometry.
J. Membr. Biol. 149 (1): 1-8, 1996.
- Coligan J. E., Dunn B. M., Ploegh H. L., Speicher D. W. and Wingfield P. T.
Current Protocols in Protein Sciences.
Ed. John Wiley & Sons, Inc. USA. 2001.
- Cosgriff A. J. and Pittard A. J..
A topological model for the general aromatic amino acid permease, AroP, of *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. 179 (10): 3317-3323, 1997.
- Cosgriff A. J., Brasier G., Pi J., Dogovski C., Sarsero J. P. and Pittard A. J.
A study of AroP-PheP chimeric proteins and identification of a residue involved in tryptophan transport.
J. Bacteriol. 182 (8): 2207-2217, 2000.
- Costello M. J., Escaig J., Matsushita K., Viitanen P. V., Menick D. R. and Kaback H. R.
Purified lac permease and cytochrome o oxidase are functional as monomers.
J. Biol. Chem. 262: 17072-17082, 1987.
- Coutre J. and Kaback H. R.
Structure-function relationships of integral membrane proteins: membrane transporters vs channels.
Biopolymers 55: 297-307, 2000.
- Crane R. K.
Na⁺-dependent transport in the intestine and other animal tissues.
Fed. Proc. 25: 1000-1006, 1965.
- Crawhall J. C., Scowen E. F. and Watts R.
Effect of penicillamine on cystinuria.
Br. Med. J. 5330: 588-590, 1963.

Bibliografía

- Cunningham P., Afzal-Ahmed I. and Naftalin R. J.
Docking Studies Show That D-Glucose and Quercetin Slide through the Transporter GLUT1.
J. Biol. Chem. 281 (9): 5797-5803, 2006.
- Chairoungdua A., Segawa H., Kim J. Y., Miyamoto K., Haga H., Fukui Y., Mizoguchi K., Ito H., Takeda E., Endou H. and Kanai Y.
Identification of an amino acid transporter associated with the cystinuria-related type II membrane glycoprotein.
J. Biol. Chem. 274: 28845-28848, 1999.
- Chairoungdua A., Kanai Y., Matsuo H., Inatomi J., Kim D. K. and Endou H.
Identification and characterization of a novel member of the heterodimeric amino acid transporter family presumed to be associated with an unknown heavy chain.
J. Biol. Chem. 276: 49390-49399, 2001.
- Chang G., Spencer R. H., Lee A. T., Barclay M. T. and Rees D. C.
Structure of the MscL homolog from *Mycobacterium tuberculosis*: a gated mechanosensitive ion channel.
Science 282: 2220-2226, 1998.
- Chang G. and Roth C. B.
Structure of MsbA from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters.
Science 293: 1793-1800, 2001.
- Chang G.
Structure of MsbA from *Vibrio cholera*: a multidrug resistance ABC transporter homolog in a closed conformation.
J. Mol. Biol. 330 (2): 419-430, 2003.
- Chen C. P., Kernytsky A. and Rost B.
Transmembrane helix predictions revisited.
Protein Sci. 11: 2774-2791, 2002.
- Chillaron J., Estevez R., Mora C., Wagner C. A., Suessbrich H., Lang F., Gelpi J. L., Testar X., Busch A. E., Zorzano A. and Palacin M.
Obligatory amino acid exchange via systems b^{0,+}-like and y⁺L-like. A tertiary active transport mechanism for renal reabsorption of cystine and dibasic amino acids.
J. Biol. Chem. 271: 17761-17770, 1996.
- Chillarón J., Estévez R., Samarzija I., Waldegger S., Testar X., Lang F., Zorzano A., Busch A. and Palacín M.
An intracellular trafficking defect in type I cystinuria rBAT mutants M467T and M467K.
J. Biol. Chem. 272: 9543-9549, 1997.
- Chillaron J., Roca R., Valencia A., Zorzano A. and Palacin M.
Heteromeric amino acid transporters: biochemistry, genetics, and physiology.
Am. J. Physiol. Renal. Physiol. 281 (6): 995-1018, 2001.
- Choa S.-H., Leea C.-H., Ahna Y., Kima H., Kimb H., Ahnb C.-Y., Yanga K.-S. and Lee S.-R.
Redox regulation of PTEN and protein tyrosine phosphatases in H₂O₂-mediated cell signaling.
FEBS Lett. 560: 7-13, 2004.

- Christensen H. N.
Methods for distinguishing amino acid transport systems of a given cell or tissue.
Fed. Proc. 25: 850-853, 1966.
- Christensen H. N.
Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism.
Physiol Rev. 70: 43-77, 1990.
- Christensen H. N., Albritton L. M., Kakuda D. K. and MacLeod C. L.
Gene-product designations for amino acid transporters.
J. Exp. Biol. 196: 51-57, 1994.
- Dahl S. G., Sylte I. and Ravna A. W.
Structures and models of transporter proteins.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 309: 853-860, 2004.
- Dawson R. J. P. and Locher K. P.
Structure of a bacterial multidrug ABC transporter.
Nature 443: 180-185, 2006.
- DeFelice L. J. and Goswami T.
Transporters as Channels.
Annu. Rev. Physiol. 69: 87-112, 2007.
- de Groot B. L. and Grubmüller H.
Water Permeation Across Biological Membranes: Mechanism and Dynamics of Aquaporin-1 and GlpF.
Science 294: 2353-2357, 2001.
- Deber C. M., Glibowicka M. and Woolley G. A.
Conformations of proline residues in membrane environments.
Biopolymers 29 (1): 149-157, 1990.
- Dekker J. P., Boekema E. J., Witt H.T. and Rögner M.
Refined purification and further characterization of oxygen-evolving and tris-treated photosystem II particles from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus sp.*
Biochim. Biophys. Acta 936: 307-318, 1988.
- DelloStrologo L., Pras E., Pontesilli C., Beccia E., Ricci-Barbini V., de Sanctis L., Ponzzone A., Gallucci M., Biscaglia L., Zelante L., Jimenez-Vidal M., Font M., Zorzano A., Rousaud F., Nunes V., Gasparini P., Palacin M. and Rizzoni G.
Comparison between SLC3A1 and SLC7A9 cystinuria patients and carriers: a need for a new classification.
J. Am. Soc. Nephrol. 13: 2547-2553, 2002.
- Dent and Senior.
Studies on the treatment of cystinuria.
Br. J. Urol. 27: 317, 1955.

Bibliografia

- Deora A. B., Ghosh R. N. and Tate S. S.
Progressive C-terminal deletions of the renal cystine transporter, NBAT, reveal a novel bimodal pattern of functional expression.
J. Biol Chem. 273: 32980-32987, 1998.
- Deves R., Chavez P. and Boyd C. A.
Identification of a new transport system (γ^+L) in human erythrocytes that recognizes lysine and leucine with high affinity.
J. Physiol. 454: 491-501, 1992.
- Deves R. and Boyd C. A.
Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function.
Physiol. Rev. 78: 487-545, 1998.
- Deves R. and Boyd C. A.
Surface antigen CD98 (4F2): not a single membrane protein, but a family of proteins with multiple functions.
J. Membr. Biol. 173 (3): 165-177, 2000.
- Diallinas G., Valdez J., Sophianopoulou V., Rosa A. and Scazzocchio C.
Chimeric purine transporters of *Aspergillus nidulans* define a domain critical for function and specificity conserved in bacterial, plant and metazoan homologues.
EMBO J. 17: 3827-3837, 1998.
- Dierks T., Riemer E. and Kramer R.
Reaction mechanism of the reconstituted aspartate/glutamate carrier from bovine heart mitochondria.
Biochim. Biophys. Acta 943 (2): 231-244, 1988.
- Dixon W. T., Sikora L. K., Demetrick D. J. and Jerry L. M.
Isolation and characterization of a heterodimeric surface antigen on human melanoma cells and evidence that it is the 4F2 cell activation/proliferation molecule.
Int. J. Cancer 45: 59-68, 1990.
- Do C. B., Mahabhashyam M. S., Brudno M. and Batzoglou S.
ProbCons: Probabilistic consistency-based multiple sequence alignment.
Genome Res. 15: 330-340, 2005.
- Doyle D. A.
Structural themes in ion channels.
Eur. Biophys. J. 33: 175-179, 2004.
- Dutzler R., Campbell E. B., Cadene M., Chait B. T. and MacKinnon R.
X-ray structure of a CIC chloride channel at 3.0Å reveals the molecular basis of anion selectivity.
Nature 415: 287-294, 2002.
- Dutzler R., Campbell E. B. and MacKinnon R.
Gating the selectivity filter in CIC chloride channels.
Science 300: 108-112, 2003.

- Eleno N., Deves R. and Boyd C. A.
Membrane potential dependence of the kinetics of cationic amino acid transport systems in human placenta.
J. Physiol. 479 (2): 291-300, 1994.
- Elferink M. G., Driessen A. J. and Robillard G. T.
Functional reconstitution of the purified phosphoenolpyruvate-dependent mannitol-specific transport system of *Escherichia coli* in phospholipid vesicles: coupling between transport and phosphorylation.
J Bacteriol. 172 (12): 7119-7125, 1990.
- Ellis J., Carlin A., Steffes C., Wu J., Liu J. and Rosen B. P.
Topological analysis of the lysine-specific permease of *Escherichia coli*.
Microbiology 141 (8): 1927-1935, 1995.
- Ermolova N., Guan L. and Kaback H. R.
Intermolecular thiol cross-linking via loops in the lactose permease of *Escherichia coli*.
Proc. Natl. Acad. Sci. 100 (18): 10187-10192, 2003.
- Ermolova N. V., Smirnova I. N., Kasho V. N. and Kaback H. R.
Interhelical Packing Modulates Conformational Flexibility in the Lactose Permease of *Escherichia coli*.
Biochemistry 44: 7669-7677, 2005.
- Eskandari S., Wright E. M., Kreman M., Starace D. M. And Zampighi G. A.
Structural analysis of cloned plasma membrane proteins by freeze-fracture electron microscopy.
Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 11235-11240, 1998.
- Esteban F. Ruiz-Cabello F., Concha A., Perez Ayala M., Delgado M. and Garrido F.
Relationship of 4F2 antigen with local growth and metastatic potential of squamous cell carcinoma of the larynx.
Cancer 66: 1493-1498, 1990.
- Estevez R., Camps M., Rojas A. M., Testar X., Deves R., Hediger M. A., Zorzano A. and Palacin M.
The amino acid transport system $y^+L/4F2hc$ is a heteromultimeric complex.
FASEB J. 12: 1319-1329, 1998.
- Fang G., Konings W. N. and Poolman B.
Kinetics and substrate specificity of membrane-reconstituted peptide transporter DtpT of *Lactococcus lactis*.
J. Bacteriol. 182 (9): 2530-2535, 2000.
- Fann M.-C., Davies A. H., Varadhachary A., Kuroda T., Sevier C., Tsuchiya T. and Maloney P. C.
Identification of Two Essential Arginine Residues in UhpT, the Sugar Phosphate Antiporter of *Escherichia coli*.
J. Membr. Biol. 164: 187-195, 1998.

Bibliografia

Feliubadaló L., Font M., Purroy J., Rousaud F., Estivill X., Nunes V., Golomb E., Centola M., Aksentjevich I., Kreiss Y., Goldman B., Pras M., Kastner D. L., Pras E., Gasparini P., Bisceglia L., Beccia E., Gallucci M., de Sanctis L., Ponzone A., Rizzoni G. F., Zelante L., Bassi M. T., George A. L. Jr., Palacín M. and International Cystinuria Consortium.

Non-type I cystinuria caused by mutations in SLC7A9, encoding a subunit (b^{0,+}AT) of rBAT.
Nat. Genet. 23: 52-57, 1999.

Fenczik C. A., Sethi T., Ramos J. W., Hughes P. E. and Ginsberg M. H.
Complementation of dominant suppression implicates CD98 in integrin activation.
Nature 390 (6655): 81-85, 1997.

Fenczik C. A., Zent R., Dellos M., Calderwood D. A., Satriano J., Kelly C. and Ginsberg M. H.
Distinct domains of CD98hc regulate integrins and amino acid transport.
J. Biol. Chem. 276: 8746-8752, 2001.

Feral C. C., Nishiya N., Fenczik C. A., Stuhlmann H., Slepak M. and Ginsberg M. H.
CD98hc (SLC3A2) mediates integrin signaling.
Proc. Natl. Acad. Sci 102: 355-360, 2005.

Fernandez E., Carrascal M., Rousaud F., Abian J., Zorzano A., Palacín M. and Chillaron J.
rBAT-b^(0,+)AT heterodimer is the main apical reabsorption system for cystine in the kidney.
Am. J. Physiol. Renal. Physiol. 283: 540-548, 2002.

Fernández E., Torrents D., Chillarón J., Martín D. R., Zorzano A. and Palacín M.
Basolateral LAT-2 has a major role in the transepithelial flux of L-cystine in the renal proximal tubule cell line OK.
J. Am. Soc. Nephrol. 14: 837-847, 2003.

Fernandez E., Torrents D., Zorzano A., Palacín M. and Chillaron, J.
Identification and functional characterization of a novel low affinity aromatic-preferring amino acid transporter (arpAT). One of the few proteins silenced during primate evolution.
J. Biol. Chem. 280: 19364-19372, 2005.

Fernandez E., Jimenez-Vidal M., Calvo M., Zorzano A., Tebar F., Palacín M. and Chillaron J.
The structural and functional units of heteromeric amino acid transporters. The heavy subunit rBAT dictates oligomerization of the heteromeric amino acid transporters.
J. Biol. Chem. 281 (36): 26552-26561, 2006.

Fleming K. G.
Riding the wave: structural and energetic principles of helical membrane proteins.
Curr. Opin. Biotechnol. 11: 67-71, 2000.

Font M. A., Feliubadaló L., Estivill X., Nunes V., Golomb E., Kreiss Y., Pras E., Bisceglia L., d'Adamo A. P., Zelante L., Gasparini P., Bassi M. T., George A. L. Jr., Manzoni M., Riboni M., Ballabio A., Borsani G., Reig N., Fernandez E., Zorzano A., Bertran J. and Palacín M.
Functional analysis of mutations in SLC7A9, and genotype-phenotype correlation in non-Type I cystinuria.
Hum. Mol. Genet. 10: 305-316, 2001.

Font-Llitjos M., Jimenez-Vidal M., Bisceglia L., Di Perna M., de Sanctis L., Rousaud F., Zelante L., Palacin M. and Nunes V.

New insights into cystinuria: 40 new mutations, genotype-phenotype correlation, and digenic inheritance causing partial phenotype.

J. Med. Genet. 42 (1): 58-68, 2005.

Fort J., Tesis doctoral.

Fort J., R de la Ballina L., Burghardt H. E., Ferrer-Costa C., Turnay J., Ferrer-Orta C., Usón I., Zorzano A., Fernández-Recio J., Orozco M., Lizarbe M. A., Fita I. and Palacin M.

The structure of human 4F2hc ectodomain, from Heteromeric Amino acid Transporters, provides a model for the interaction with the plasma membrane.

En preparación.

Franca R., Veljkovic E., Walter S., Wagner C. A. and Verrey F.

Heterodimeric amino acid transporter glycoprotein domains determining functional subunit association.

Biochem. J. 388 (2): 435-443, 2005.

Frillingos S., Sahin-Tóth M., Wu J. and Kaback H. R.

Cys-scanning mutagenesis: a novel approach to structure-function relationships in polytopic membrane proteins

FASEB J. 12: 1281-1299, 1998.

Fryxell K. B., O'Donoghue K., Graeff R. M., Lee H. C. and Branton W. D.

Functional expression of soluble forms of human CD38 in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*.

Protein Expr. Purif. 6 (3): 329-336, 1995.

Fu D., Libson A., Miercke L. J., Weitzman C., Nollert P., Krucinski J. and Stroud R. M.

Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity.

Science 290: 481-486, 2000.

Fukasawa Y., Segawa H., Kim J. Y., Chairoungdua A., Kim D. K., Matsuo H., Cha S. H., Endou H. and Kanai Y.

Identification and characterization of a Na⁽⁺⁾-independent neutral amino acid transporter that associates with the 4F2 heavy chain and exhibits substrate selectivity for small neutral D- and L-amino acids.

J. Biol. Chem. 275: 9690-9698, 2000.

Furriols M., Chillaron J., Mora C., Castello A., Bertran J., Camps M., Testar X., Vilaro S., Zorzano A. and Palacin M.

rBAT, related to L-cysteine transport, is localized to the microvilli of proximal straight tubules, and its expression is regulated in kidney by development.

J. Biol. Chem. 268: 27060-27068, 1993.

Galic S., Schneider H.-P., Bröer A., Deitmer J. W. and Bröer S.

The loop between helix 4 and helix 5 in the monocarboxylate transporter MCT1 is important for substrate selection and protein stability.

Biochem. J. 376: 413-422, 2003.

Bibliografía

Garber M. E., Troyanskaya O. G., Schluens K., Petersen S., Thaesler Z., Pacyna-Gengelbach M., van de Rijn M., Rosen G. D., Perou C. M., Whyte R. I., Altman R. B., Brown P. O., Botstein D. and Petersen I. Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. Proc. Natl. Acad. Sci. 98: 13784-13789, 2001.

Gasol E., Tesis doctoral.

Gerchman Y., Rimon A., Venturi M. and Padan E. Oligomerization of NhaA, the Na⁺/H⁺ antiporter of *Escherichia coli* in the membrane and its functional and structural consequences. Biochemistry 40: 3403-3412, 2001.

Gasol E., Jimenez-Vidal M., Chillaron J., Zorzano A. and Palacin M. Membrane topology of system x_c⁻ light subunit reveals a re-entrant loop with substrate-restricted accessibility. J. Biol. Chem. 279 (30): 31228-31236, 2004.

Gilstring C. F. and Ljungdahl P. O. A method for determining the in vivo topology of yeast polytopic membrane proteins demonstrates that Gap1p fully integrates into the membrane independently of Shr3p. J. Biol. Chem. 275: 31488-31495, 2000.

Gochenauer G. E. and Robinson M. B. Dibutyl-*c*-AMP (dbcAMP) up-regulates astrocytic chloride-dependent L-[³H]glutamate transport and expression of both system x_c⁻ subunits. J. Neurochem. 78: 276-286, 2001.

Gonen T., Cheng Y., Sliz P., Hiroaki Y., Fujiyoshi Y., Harrison S. C. and Walz T. Lipid-protein interactions in double-layered two-dimensional AQP0 crystals. Nature 438: 633-638, 2005.

Guan L., Hu Y. and Kaback H. R. Aromatic Stacking in the Sugar Binding Site of the Lactose Permease. Biochemistry 42: 1377-1382, 2003.

Guan L. and Kaback H. R. Lessons from Lactose Permease. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 35: 67-91, 2006.

Gulbis J. M., Kuo A., Smith B., Doyle D. A., Edwards A., Arrowsmith C. and Sundstrom M. En preparación.

Guo W. X. and Ziegler D. M. Estimation of flavin-containing monooxygenase activities in crude tissue preparations by thiourea-dependent oxidation of thiocholine. Anal. Biochem. 198 (1): 143-148, 1991.

Hama H., Shimamoto T., Tsuda M. and Tsuchiya T. Characterization of a Novel L-Serine Transport System in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 170 (5): 2236-2239, 1988.

- Handler J. S. and Kwon H. M.
Transcriptional regulation by changes in tonicity.
Kidney Int. 60: 408-411, 2001.
- Hara K., Kudoh H., Enomoto T., Hashimoto Y. and Masuko T.
Enhanced tumorigenicity caused by truncation of the extracellular domain of GP125/CD98 heavy chain.
Oncogene 19: 6209-6215, 2000.
- Hausladen A., Privalle C. T., Keng T., DeAngelo J. and Stamler J. S.
Nitrosative Stress: Activation of the Transcription Factor OxyR.
Cell 86: 719-729, 1996.
- Haynes B. F., Hemler M. E., Mann D. L., Eisenbarth G. S., Shelhamer J., Mostowski H. S., Thomas C. A., Strominger J. L. and Fauci A. S.
Characterization of a monoclonal antibody (4F2) that binds to human monocytes and to a subset of activated lymphocytes.
J. Immunol. 126: 1409-1414, 1981.
- Hediger M. A., Romero M. F., Peng J., Rolfs A., Takanaga H. and Bruford E. A.
The ABC of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins.
Pflugers Arch. 447: 465-468, 2004.
- Hemler M. E. and Strominger J. L.
Characterization of antigen recognized by the monoclonal antibody (4F2): different molecular forms on human T and B lymphoblastoid cell lines.
J. Immunol. 129: 623-628, 1982.
- Henderson P. J.
Studies of translocation catalysis.
Biosci. Rep. 11: 477-453, 1991.
- Henderson P. J.
The 12-transmembrane helix transporters.
Curr. Opin. Cell. Biol. 5 (4): 708-721, 1993.
- Heuberger E. H., Veenhoff L. M., Duurkens R. H., Friesen R. H., and Poolman B.
Oligomeric state of membrane transport proteins analyzed with blue native electrophoresis and analytical ultracentrifugation.
J. Mol. Biol. 317: 591-600, 2002.
- Heymann J. A. W., Sarker R., Hirai T., Shi D., Milne J. L. S., Maloney P. C. and Subramaniam S.
Projection structure and molecular architecture of OxIT, a bacterial membrane transporter.
EMBO J. 20 (16): 4408-4413, 2001.
- Heymann J. A. W., Hirai T., Shi D. and Subramaniam S.
Projection structure of the bacterial oxalate transporter OxIT at 3.4 Å resolution.
J. Struct. Biol. 144: 320-326, 2003.

Bibliografia

- Hirai T., Heymann J. A. W., Shi D., Sarker R., Maloney P. C. and Subramaniam S.
Three-dimensional structure of a bacterial oxalate transporter.
Nat. Struct. Biol. 9 (8): 597-600, 2002.
- Hirai T., Heymann J. A. W., Maloney P. C. and Subramaniam S.
Structural Model for 12-Helix Transporters Belonging to the Major Facilitator Superfamily.
J. Bact. 185 (5): 1712-1718, 2003.
- Hirai T. and Subramaniam S.
Structure and Transport Mechanism of the Bacterial Oxalate Transporter OxIT.
Biophys. J. 87: 3600-3607, 2004.
- Hirokawa T., Boon-Chieng S. and Mitaku S.
SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins.
Bioinformatics. 14: 378-379, 1998.
- Hofmann K. and Stoffel W.
TMBASE - A database of membrane spanning protein segments.
Biol. Chem. Hoppe-Seyler 374: 166, 1993.
- Hollenstein K., Frei D. C. and Locher K. P.
Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein.
Nature 446: 213-216, 2007.
- Holte H., Davies C. D., Kvaloy S., Smeland E. B., Foss-Abrahamsen A., Kaalhus O., Marton P. F. and Godal T.
The activation-associated antigen 4F2 predicts patient survival in low-grade B-cell lymphomas.
Int. J. Cancer 39: 590-594, 1987.
- Hondorp E. R. and Matthews R. G.
Oxidative Stress Inactivates Cobalamin-Independent Methionine Synthase (MetE) in *Escherichia coli*.
PLoS Biol. 2 (11): 1738-1753, 2004.
- Hu L. A. and King S. C.
Functional sensitivity of polar surfaces on transmembrane helix 8 and cytoplasmic loop 8-9 of the *Escherichia coli* GABA (4-aminobutyrate) transporter encoded by gabP: mutagenic analysis of a consensus amphipathic region found in transporters from bacteria to mammals.
Biochem. J. 330: 771-776, 1998a.
- Hu L. A. and King S. C.
Functional Significance of the "Signature Cysteine" in Helix 8 of the *Escherichia coli* 4-Aminobutyrate Transporter from the Amine-Polyamine-Choline Superfamily.
J. Biol. Chem. 273 (32): 20162-20167, 1998b.
- Hu L. A. and King S. C.
Membrane topology of the *Escherichia coli* gamma-aminobutyrate transporter: implications on the topography and mechanism of prokaryotic and eukaryotic transporters from the APC superfamily.
Biochem. J. 336 (1): 69-76, 1998c.

- Hu L. A. and King S. C.
Identification of the amine–polyamine–choline transporter superfamily ‘ consensus amphipathic region ’ as the target for inactivation of the *Escherichia coli* GABA transporter GabP by thiol modification reagents. Role of Cys-300 in restoring thiol sensitivity to GabP lacking Cys.
Biochem. J. 339: 649-655, 1999.
- Huang Y., Lemieux M. J., Song J., Auer M. and Wang D.-N.
Structure and Mechanism of the Glycerol-3-Phosphate Transporter from *Escherichia coli*.
Science 301: 616-620, 2003.
- Hughes R. C.
Galectins as modulators of cell adhesion.
Biochimie. 83 (7): 667-676, 2001.
- Hunte C., Screpanti E., Venturi M., Rimon A., Padan E. and Michel H.
Structure of a Na⁺/H⁺ antiporter and insights into mechanism of action and regulation by pH.
Nature 435 (30): 1197-1202, 2005.
- Ikeda M., Arai M., Lao D. M. and Shimizu T.
Transmembrane topology prediction methods: a re-assessment and improvement by a consensus method using a dataset of experimentally-characterized transmembrane topologies.
In Silico. Biol. 2: 19-33, 2002.
- Ikeda M., Arai M., Okuno T. and Shimizu T.
TMPDB: a database of experimentally-characterized transmembrane topologies.
Nucleic Acids Res. 31: 406-409, 2003.
- Ishii T., Sato H., Miura K., Sagara J. and Bannai S.
Induction of cystine transport activity by stress.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 663: 497-498, 1992.
- Jack D. L., Paulsen I. T. and Saier M. H. Jr.
The amino acid/polyamine/organocation (APC) superfamily of transporters specific for amino acids, polyamines and organocations.
Microbiology 146: 1797-1814, 2000.
- Jacob J., Duclouhier H. and Cafiso D. S.
The Role of Proline and Glycine in Determining the Backbone Flexibility of a Channel-Forming Peptide.
Biophys. J. 76: 1367-1376, 1999.
- Janecek S., Svensson B. and Henrissat B.
Domain evolution in the alpha-amylase family.
J. Mol. Evol. 45: 322-331, 1997.
- Jans A. W. and Leibfritz D.
A ¹³C-NMR study on the influxes into the tricarboxylic acid cycle of a renal epithelial cell line, LLC-PK1/C14: the metabolism of [2-¹³C]glycine, L-[3-¹³C]alanine and L-[3-¹³C]aspartic acid in renal epithelial cells.
Biochim. Biophys. Acta 970: 241-250, 1988.

Bibliografía

- Ji Y., Akerboom T. P. M., Sies H. and Thomas J. A.
S-Nitrosylation and S-Glutathiolation of Protein Sulfhydryls by S-Nitroso Glutathione.
Arch. Biochem. Biophys. 362 (1): 67-78, 1999.
- Jiang L.-J., Maret W. and Vallee B. L.
The glutathione redox couple modulates zinc transfer from metallothionein to zinc-depleted sorbitol dehydrogenase.
Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 3483-3488, 1998.
- Jiang Y., Lee A., Chen J., Cadene M., Chait B. T. and MacKinnon R.
Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel.
Nature 417: 515-522, 2002.
- Jiang Y., Lee A., Chen J., Ruta V., Cadene M., Chait B. T. and MacKinnon R.
X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel.
Nature 423: 33-41, 2003a.
- Jiang Y., Ruta V., Chen J., Lee A. and MacKinnon R.
The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel.
Nature 423: 42-48, 2003b.
- Jiménez-Vidal M., Tesis doctoral.
- Jimenez-Vidal M., Gasol E., Zorzano A., Nunes V., Palacin M. and Chillaron J.
Thiol modification of cysteine 327 in the eighth transmembrane domain of the light subunit xCT of the heteromeric cystine/glutamate antiporter suggests close proximity to the substrate binding site/permeation pathway.
J Biol Chem. 279 (12): 11214-11221, 2004.
- Joly D., Rieu P., Mejean A., Gagnadoux M. F., Daudon M. and Jungers P.
Treatment of cystinuria.
Pediatr. Nephrol. 13: 945-950, 1999.
- Jung H., Jung K. and Kaback H. R.
A conformational change in the lactose permease of *Escherichia coli* is induced by ligand binding or membrane potential.
Protein Sci. 3 (7): 1052-1057, 1994a.
- Jung H., Jung K. and Kaback H. R.
Dynamics of lactose permease of *Escherichia coli* determined by site-directed fluorescence labeling.
Biochemistry 33 (13): 3980-3985, 1994b.
- Kaback H. R.
Use of site-directed mutagenesis to study the mechanism of a membrane transport protein.
Biochemistry 26: 2071-2076, 1987.
- Kaback H. R.
Handbook of Biological Physics, 1996. Elsevier, Amsterdam.

- Kaback H. R., Sahin-Toth M. and Weinglass A. B.
The kamikaze approach to membrane transport.
Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2: 610-620, 2001.
- Kaback H. R.
Structure and mechanism of the lactose permease.
C. R. Biol. 328 (6): 557-567, 2005.
- Kaback H. R., Dunten R., Frillingos S., Venkatesan P., Kwaw I., Zhang W. and Ermolova N.
Site-directed alkylation and the alternating access model for LacY.
Proc. Natl. Acad. Sci. 104 (2): 491-494, 2007.
- Kaleeba J. A. and Berger E. A.
Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus fusion-entry receptor: cystine transporter xCT.
Science. 311 (5769): 1921-1924, 2006.
- Kamada Y., Nagaretani H., Tamura S., Ohama T., Maruyama T., Hiraoka H., Yamashita S., Yamada A., Kiso S., Inui Y., Ito N., Kayanoki Y., Kawata S. and Matsuzawa Y.
Vascular endothelial dysfunction resulting from L-arginine deficiency in a patient with lysinuric protein intolerance.
J. Clin. Invest. 108: 717-724, 2001.
- Kanai Y., Stelzner M. G., Lee W. S., Wells R. G., Brown D. and Hediger M. A.
Expression of mRNA (D2) encoding a protein involved in amino acid transport in S3 proximal tubule.
Am. J. Physiol. 263: 1087-1092, 1992.
- Kanai Y., Segawa H., Miyamoto K.-i., Uchino H., Takeda E. and Endou H.
Expression Cloning and Characterization of a Transporter for Large Neutral Amino Acids Activated by the Heavy Chain of 4F2 Antigen (CD98).
J. Biol. Chem. 273 (37): 23629-23632, 1998.
- Kanai Y., Fukasawa Y., Cha S. H., Segawa H., Chairoungdua A., Kim D. K., Matsuo H., Kim J. Y., Miyamoto K.-i., Takeda E. and Endou H.
Transport Properties of a System y^+L Neutral and Basic Amino Acid Transporter.
J. Biol. Chem. 275 (27): 20787-20793, 2000.
- Kanai Y. and Endou H.
Heterodimeric Amino Acid Transporters: Molecular Biology and Pathological and Pharmacological Relevance.
Curr. Drug Metab. 2: 339-354, 2001.
- Karpowich N., Martsinkevich O., Millen L., Yuan Y.-R., Dai P. L., MacVey K., Thomas P. J. and Hunt J. F.
Crystal Structures of the MJ1267 ATP Binding Cassette Reveal an Induced-Fit Effect at the ATPase Active Site of an ABC Transporter.
Structure 9: 571-586, 2001.
- Kasahara M., Shimoda E. and Maeda M.
Transmembrane segment 10 is important for substrate recognition in Ga12 and Hxt2 sugar transporters in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
FEBS Lett. 389: 174-178, 1996.

Bibliografia

- Kashiwagi K., Shibuya S., Suzuki F., Kobayashi H. and Igarashi K.
Excretion of putrescine by the putrescine ornithine antiporter encoded by the potE gene of *Escherichia coli*.
Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 4529-4533, 1992.
- Kashiwagi K., Shibuya S., Tomitori H., Kuraishi A. and Igarashi K.
Excretion and Uptake of Putrescine by the PotE Protein in *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem. 272 (10): 6318-6323, 1997.
- Kashiwagi K., Kuraishi A., Tomitori H., Igarashi A., Nishimura K., Shirahata A. and Igarashi K.
Identification of the Putrescine Recognition Site on Polyamine Transport Protein PotE.
J. Biol. Chem. 275 (46): 36007-36012, 2000.
- Kiley P. J. and Storz G.
Exploiting Thiol Modifications.
PLoS Biol. 2 (11): 1714-1717, 2004.
- Kim S. O., Merchant K., Nudelman R., Beyer W. F. Jr., Keng T., DeAngelo J., Hausladen A. and Stamler J. S.
OxyR: A Molecular Code for Redox-Related Signaling.
Cell 109: 383-396, 2002.
- Kim H., Melen K. and von Heijne G.
Topology models for 37 *Saccharomyces cerevisiae* membrane proteins based on C-terminal reporter fusions and predictions.
J. Biol. Chem. 278: 10208-10213, 2003.
- King J. S. Jr.
Treatment of cystinuria with alpha-mercaptopropionylglycine: a preliminary report with some notes on column chromatography of mercaptans.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 129: 927-932, 1968.
- Klingenberg M.
Ligand-Protein Interaction in Biomembrane Carriers. The Induced Transition Fit of Transport Catalysis.
Biochemistry 44 (24): 8563-8570, 2005.
- Kogan I., Ramjeesingh M., Li C. and Bear C. E.
Studies of the Molecular Basis of Cystic Fibrosis Using Purified Reconstituted CFTR Protein.
Cystic Fibrosis Methods and Protocols 143-159, 2002.
- Krogh A., Larsson B., von Heijne G. and Sonnhammer E. L.
Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes.
J. Mol. Biol. 305: 567-580, 2001.
- Kuo A., Gulbis J. M., Antcliff J. F., Rahman T., Lowe E. D., Zimmer J., Cuthbertson J., Ashcroft F. M., Ezaki T. and Doyle D. A.
Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state.
Science 300: 1922-1926, 2003.

- Laemmli U. K.
Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227: 680-685, 1970.
- Leclerc D., Wu Q., Ellis J. R., Goodyer P. and Rozen R.
Is the SLC7A10 gene on chromosome 19 a candidate locus for cystinuria?
Mol. Genet. Metab. 73: 333-339, 2001.
- Lee J. K., Kozono D., Remis J., Kitagawa Y., Agre P. and Stroud R. M.
Structural basis for conductance by the archaeal aquaporin AqpM at 1.68 Å.
Proc. Natl. Acad. Sci. 102: 18932-18937, 2005.
- Leichert L. I. and Jakob U.
Protein Thiol Modifications Visualized In Vivo.
PLoS Biol. 2 (11): 1723-1737, 2004.
- Lemieux M. J., Song J., Kim M. J., Huang Y., Villa A., Auer M., Li X.-D. and Wang D.-N.
Three-dimensional crystallization of the *Escherichia coli* glycerol-3-phosphate transporter: A member of the major facilitator superfamily.
Protein Sci. 12: 2748-2756, 2003.
- Li X. Q., Hegazy M. G., Mahdi F., Jezek P., Lane R. D. and Garlid K. D.
Purification of a reconstitutively active K⁺/H⁺ antiporter from rat liver mitochondria.
J. Biol. Chem. 265 (25): 15316-15322, 1990.
- Liu X., Charrier L., Gewirtz A., Sitaraman S. and Merlin D.
CD98 and intracellular adhesion molecule I regulate the activity of amino acid transporter LAT-2 in polarized intestinal epithelia.
J. Biol. Chem. 278 (26): 23672-23677, 2003.
- Locher K. P., Lee A. T. and Rees D. C.
The *E. coli* BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism.
Science 296: 1091-1098, 2002.
- Locher K. P., Bass R. B. and Rees D. C.
Structural biology. Breaching the barrier.
Science 301 (5633): 603-604, 2003.
- Long S. B., Campbell E. B. and Mackinnon R.
Crystal Structure of a Mammalian Voltage-Dependent Shaker Family K⁺ Channel.
Science 309: 897-903, 2005a.
- Long S. B., Campbell E. B. and Mackinnon R.
Voltage Sensor of Kv1.2: Structural Basis of Electromechanical Coupling.
Science 309: 903-908, 2005b.
- Loo T. W., Bartlett M. C. and Clarke D. M.
Substrate-induced Conformational Changes in the Transmembrane Segments of Human P-glycoprotein. Direct evidence for the substrate-induced fit mechanism for drug binding.
J. Biol. Chem. 278 (16): 13603-13606, 2003.

Bibliografia

- Lopez O., de la Maza A., Coderch L., Lopez-Iglesias C., Wehrli E. and Parra, J. L.
Direct formation of mixed micelles in the solubilization of phospholipid liposomes by Triton X-100.
FEBS Lett. 426: 314-318, 1998.
- Lorca G., Winnen B. and Saier M. H. Jr.
Identification of the L-Aspartate Transporter in *Bacillus subtilis*.
J. Bacteriol. 185 (10): 3218-3222, 2003.
- Ma C. and Chang G.
Crystallography of the integral membrane protein EmrE from *Escherichia coli*.
Acta Cryst. 60: 2399-2402, 2004.
- Manoil C. and Bailey J.
A simple screen for permissive sites in proteins: analysis of *Escherichia coli* lac permease.
J. Mol. Biol. 267: 250-263, 1997.
- Mao Q., Schunk T., Flükiger K. and Erni B.
Functional Reconstitution of the Purified Mannose Phosphotransferase System of *Escherichia coli* into Phospholipid Vesicles.
J. Biol. Chem. 270 (31): 5258-5265, 1995.
- Mastroberardino L., Spindler B., Pfeiffer R., Skelly P. J., Löffing J., Shoemaker C. B. and Verrey F.
Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family.
Nature 395: 288-291, 1998.
- Matsuo H., Kanai Y., Kim J. Y., Chairoungdua A., Kim D. K., Inatomi J., Shigeta Y., Ishimine H., Chaekuntode S., Tachampa K., Choi H. W., Babu E., Fukuda J. and Endou H.
Identification of a novel Na⁺-independent acidic amino acid transporter with structural similarity to the member of a heterodimeric amino acid transporter family associated with unknown heavy chains.
J. Biol. Chem. 277: 21017-21026, 2002.
- Meier C., Ristic Z., Klauser S. and Verrey F.
Activation of system L heterodimeric amino acid exchangers by intracellular substrates.
Embo J. 21 (4): 580-589, 2002.
- Menick D. R., Sarkar H. K., Poonian M. S. and Kaback H. R.
Cys154 is important for lac permease activity in *Escherichia coli*.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 132 (1): 162-170, 1985.
- Minchin R. F. and McCoubrie J. E.
Mutational analysis of the large periplasmic loop 7-8 of the putrescine transporter PotE in *Escherichia coli*.
Int. J. Biochem. Cell Biol. 36: 271-280, 2004.
- Mirza O., Guan L., Verner G., Iwata S. and Kaback H. R.
Structural evidence for induced fit and a mechanism for sugar/H⁺ symport in LacY.
EMBO J. 25: 1177-1183, 2006.

Miyamoto K., Segawa H., Tatsumi S., Katai K., Yamamoto H., Taketani Y., Haga H., Morita K., and Takeda E.

Effects of truncation of the COOH-terminal region of a Na⁺-independent neutral and basic amino acid transporter on amino acid transport in *Xenopus* oocytes.

J. Biol. Chem. 271: 16758-16763, 1996.

Mizoguchi K., Cha S. H., Chairoungdua A., Kim D. K., Shigeta Y., Matsuo H., Fukushima J., Awa Y., Akakura K., Goya T., Ito H., Endou H. and Kanai Y.

Human cystinuria-related transporter: localization and functional characterization.

Kidney Int. 59: 1821-1833, 2001.

Moller S., Croning M. D. and Apweiler R.

Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions.

Bioinformatics 17: 646-653, 2001.

Mora C., Chillaron J., Calonge M. J., Forgo J., Testar X., Nunes V., Murer H., Zorzano A. and Palacin M.

The rBAT gene is responsible for L-cystine uptake via the b^(0,+)-like amino acid transport system in a "renal proximal tubular" cell line (OK cells).

J. Biol. Chem. 271: 10569-10576, 1996.

Murakami S., Nakashima R., Yamashita E. and Yamaguchi A.

Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB.

Nature 419: 587-593, 2002.

Murakami S., Nakashima R., Yamashita E., Matsumoto T. and Yamaguchi A.

Crystal structures of a bacterial multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism.

Nature 443: 173-179, 2006.

Murata K., Mitsuoka K., Hirai T., Walz T., Agre P., Heymann J. B., Engel A. and Fujiyoshi Y.

Structural determinants of water permeation through aquaporin-1.

Nature 407: 599-605, 2000.

Mykkanen J., Torrents D., Pineda M., Camps M., Yoldi M. E., Horelli-Kuitunen N., Huoponen K., Heinonen M., Oksanen J., Simell O., Savontaus M. L., Zorzano A., Palacin M. and Aula P.

Functional analysis of novel mutations in γ^+ LAT-1 amino acid transporter gene causing lysinuric protein intolerance (LPI).

Hum. Mol. Genet. 9: 431-438, 2000.

Nagase T., Seki N., Ishikawa K., Ohira M., Kawarabayasi Y., Ohara O., Tanaka A., Kotani H., Miyajima N. and Nomura N.

Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. VI. The coding sequences of 80 new genes (KIAA0201-KIAA0280) deduced by analysis of cDNA clones from cell line KG-1 and brain.

DNA Res. 3: 321-354, 1996.

Nakamura E., Sato M., Yang H., Miyagawa F., Harasaki M., Tomita K., Matsuoka S., Noma A., Iwai K. and Minato N.

4F2 (CD98) heavy chain is associated covalently with an amino acid transporter and controls intracellular trafficking and membrane topology of 4F2 heterodimer.

J. Biol. Chem. 274: 3009-3016, 1999.

Bibliografía

- Nakashima I., Kato M., Akhand A. A., Suzuki H., Takeda K., Hossain K. and Kawamoto Y..
Redox-Linked Signal Transduction Pathways for Protein Tyrosine Kinase Activation.
Antioxid. Redox Signal. 4 (3): 517-531, 2002.
- Nakauchi J., Matsuo H., Kim D. K., Goto A., Chairoungdua A., Cha S. H., Inatomi J., Shiokawa Y., Yamaguchi K., Saito I., Endou H. and Kanai Y.
Cloning and characterization of a human brain Na⁽⁺⁾-independent transporter for small neutral amino acids that transports D-serine with high affinity.
Neurosci. Lett. 287: 231-235, 2000.
- Nilsson I. M., Sääf A., Whitley P., Gafvelin G., Waller C. and von Heijne G.
Proline-induced Disruption of a Transmembrane α -Helix in its Natural Environment.
J. Mol. Biol. 284: 1165-1175, 1998.
- Novak D. A., Kilberg M. S. and Beveridge M. J.
Ontogeny and plasma-membrane domain localization of amino acid transport system L in rat liver.
Biochem. J. 301 (3): 671-674, 1994.
- Ostermeier C. and Michel H.
Crystallization of membrane proteins.
Curr. Opin. Struct. Biol. 7: 697-701, 1997.
- Oxender D. L. and Christensen H. N.
Distinct mediating systems for the transport of neutral amino acids by the Ehrlich cell.
J. Biol. Chem. 238: 3686-3698, 1963.
- Pagliuca C., Goetze T. A., Wagner R., Thiel G., Moroni A. and Parcej D.
Molecular properties of Kcv, a virus encoded K⁺ channel.
Biochemistry 46 (4): 1079-1090, 2007.
- Pal S. K., Takimoto K., Aizenman E. and Levitan E. S.
Apoptotic surface delivery of K⁺ channels.
Cell Death Differ. 13: 661-667, 2006.
- Palacín M., Chillarón J. and Mora C.
Role of the b^(0,+)-like amino acid-transport system in the renal reabsorption of cystine and dibasic amino acids.
Biochem. Soc. Trans. 24: 856-863, 1996.
- Palacín M., Estévez R., Bertran J. and Zorzano A.
Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters.
Physiol. Rev. 78: 969-1054, 1998.
- Palacín M., Bertran J., and Zorzano A.
Heteromeric amino acid transporters explain inherited aminoacidurias.
Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. 9: 547-553, 2000.
- Palacín M., Borsani G. and Sebastio G.
The molecular bases of cystinuria and lysinuric protein intolerance.
Curr. Opin. Genet. Dev. 11: 328-335, 2001.

- Palacín M. and Kanai Y.
The ancillary proteins of HATs: SLC3 family of amino acid transporters.
Pflugers Arch. 447: 490-494, 2004.
- Palacin M., Nunes V., Font-Llitjos M., Jimenez-Vidal M., Fort J., Gasol E., Pineda M., Feliubadalo L., Chillaron J. and Zorzano A.
The genetics of heteromeric amino acid transporters.
Physiology 20: 112-124, 2005.
- Pao S. S., Paulsen I. T. and Saier M. H. Jr.
Major facilitator superfamily.
Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62 (1): 1-34, 1998.
- Parmacek M. S., Karpinski B. A., Gottesdiener K. M., Thompson C. B. and Leiden J. M.
Structure, expression and regulation of the murine 4F2 heavy chain.
Nucleic Acids Res. 17: 1915-1931, 1989.
- Pebay-Peyroula E., Dahout-Gonzalez C., Kahn R., Trézéguet V., Lauquin G. J.-M. and Brandolin G.
Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside.
Nature 426: 39-44, 2003.
- Peerce B. E. and Clarke R. D.
Isolation and reconstitution of the intestinal Na⁺/glucose cotransporter.
J. Biol. Chem. 265 (3): 1731-1736, 1990.
- Persson B. and Argos P.
Prediction of membrane protein topology utilizing multiple sequence alignments.
J. Protein Chem. 16: 453-457, 1997.
- Peter G. J., Davidson I. G., Ahmed A., McIlroy L., Forrester A. R. and Taylor P. M.
Multiple components of arginine and phenylalanine transport induced in neutral and basic amino acid transporter-cRNA-injected *Xenopus* oocytes.
Biochem. J. 318 (3): 915-922, 1996.
- Peter G. J., Davies A., Watt P. W., Birrell J. and Taylor P. M.
Interactions between the thiol-group reagent N-ethylmaleimide and neutral and basic amino acid transporter-related amino acid transport.
Biochem. J. 343 (1): 169-176, 1999.
- Peter G. J., Panova T. B., Christie G. R. and Taylor P. M.
Cysteine residues in the C-terminus of the neutral- and basic-amino-acid transporter heavy-chain subunit contribute to functional properties of the system b^(0,+)-type amino acid transporter.
Biochem. J. 351 (3): 677-682, 2000.
- Pfeiffer R., Spindler B., Loffing J., Skelly P. J., Shoemaker C. B. and Verrey F.
Functional heterodimeric amino acid transporters lacking cysteine residues involved in disulfide bond.
FEBS Lett. 439: 157-162, 1998.

Bibliografía

Pfeiffer R., Loffing J., Rossier G., Bauch C., Meier C., Eggermann T., Loffing-Cueni D., Kuhn L. C. and Verrey F.

Luminal heterodimeric amino acid transporter defective in cystinuria.

Mol. Biol. Cell 10: 4135-4147, 1999a.

Pfeiffer R., Rossier G., Spindler B., Meier C., Kuhn L. and Verrey F.

Amino acid transport of γ^+ L-type by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of the glycoprotein-associated amino acid transporter family.

EMBO J. 18: 49-57, 1999b.

Pi J., Wookey P. J. and Pittard A. J.

Site-directed mutagenesis reveals the importance of conserved charged residues for the transport activity of the PheP permease of *Escherichia coli*.

J. Bacteriol. 175: 7500-7504, 1993.

Pi J. and Pittard A. J.

Topology of the phenylalanine-specific permease of *Escherichia coli*.

J. Bacteriol. 178: 2650-2655, 1996.

Pi J., Dogovski C. and Pittard A. J.

Functional consequences of changing proline residues in the phenylalanine-specific permease of *Escherichia coli*.

J. Bacteriol. 180: 5515-5519, 1998.

Pi J., Chow H. and Pittard A. J.

Study of Second-Site Suppression in the *pheP* Gene for the Phenylalanine Transporter of *Escherichia coli*.

J. Bact. 184 (21): 5842-5847, 2002.

Pickel V. M., Nirenberg M. J., Chan J., Moskovitz R., Udenfriend S. and Tate S. S.

Ultrastructural localization of a neutral and basic amino acid transporter in rat kidney and intestine.

Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 7779-7783, 1993.

Piela L., Nemethy G., and Scheraga H. A.

Proline-induced constraints in alpha-helices.

Biopolymers 26 (9): 1587-1600, 1987.

Pineda M., Fernández E., Torrents D., Estévez R., López C., Camps M., Lloberas J., Zorzano A. and Palacín M.

Identification of a membrane protein, LAT-2, that co-expresses with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transport activity with broad specificity for small and large zwitterionic amino acids.

J. Biol. Chem. 274: 19738-19744, 1999.

Pineda M., Font M., Bassi M. T., Manzoni M., Borsani G., Marigo V., Fernández E., Martín D. R., Purroy J., Zorzano A., Nunes V. and Palacín M.

The amino acid transporter asc-1 is not involved in cystinuria.

Kidney Int. 66 (4): 1453-64, 2004a.

- Pineda M., Wagner C. A., Broer A., Stehberger P. A., Kaltenbach S., Gelpi J. L., Martin del Rio R., Zorzano A., Palacin M., Lang F. and Broer S.
Cystinuria-specific rBAT(R365W) mutation reveals two translocation pathways in the amino acid transporter rBAT-b^{0,+}AT.
Biochem J. 377 (3): 665-674, 2004b.
- Pinkett H. W., Lee A. T., Lum P., Locher K. P. and Rees D. C.
An inward-facing conformation of a putative metal-chelate-type ABC transporter.
Science 315: 373-377, 2007.
- Poolman B., Modderman R. and Reizer J.
Lactose transport system of *Streptococcus thermophilus*. The role of histidine residues.
J. Biol Chem. 267: 9150-9157, 1992.
- Pornillos O., Chen Y.-J., Chen A. P. and Chang G.
X-ray Structure of the EmrE Multidrug Transporter in Complex with a Substrate.
Science 310 (5756): 1950-1953, 2005.
- Prasad P. D., Wang H., Huang W., Kekuda R., Rajan D. P., Leibach F. H. and Ganapathy V.
Human LAT1, a subunit of system L amino acid transporter: molecular cloning and transport function.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 255: 283-288, 1999.
- Pusch M., Zifarelli G., Murgia A. R., Picollo A. and Babini E.
Channel or transporter? The CLC saga continues
Exp. Physiol. 91 (1): 149-152, 2005.
- Quackenbush E. J., Gougos A., Baumal R. and Letarte M.
Differential localization within human kidney of five membrane proteins expressed on acute lymphoblastic leukemia cells.
J. Immunol. 136: 118-124, 1986.
- Quackenbush E., Clabby M., Gottesdiener K. M., Barbosa J., Jones N. H., Strominger J. L., Speck S. and Leiden J. M.
Molecular cloning of complementary DNAs encoding the heavy chain of the human 4F2 cell-surface antigen: a type II membrane glycoprotein involved in normal and neoplastic cell growth.
Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 6526-6530, 1987.
- Qiu X. Q., Jakes K. S., Finkelstein A. and Slatin S. L.
Site-specific biotinylation of colicin Ia. A probe for protein conformation in the membrane.
J. Biol. Chem. 269: 7483-7488, 1994.
- Radian R. and Kanner B. I.
Reconstitution and purification of the sodium- and chloride-coupled gamma-aminobutyric acid transporter from rat brain.
J. Biol. Chem. 260: 11859-11865, 1985.
- Rahman B., Schneider H.-P., Bröer A., Deitmer J. W. and Bröer S.
Helix 8 and Helix 10 Are Involved in Substrate Recognition in the Rat Monocarboxylate Transporter MCT1.
Biochemistry 38: 11577-11584, 1999.

Bibliografía

Rajan D. P., Huang W., Kekuda R., George R. L., Wang J., Conway S. J., Devoe L. D., Leibach F. H., Prasad P. D. and Ganapathy V.

Differential influence of the 4F2 heavy chain and the protein related to b^(0,+) amino acid transport on substrate affinity of the heteromeric b^(0,+) amino acid transporter.

J. Biol Chem. 275: 14331-14335, 2000a.

Rajan D. P., Kekuda R., Huang W., Devoe L. D., Leibach F. H., Prasad P. D. and Ganapathy V.

Cloning and functional characterization of a Na⁽⁺⁾-independent, broad-specific neutral amino acid transporter from mammalian intestine.

Biochim. Biophys. Acta 1463: 6-14, 2000b.

Rajantie J., Simell O. and Perheentupa J.

Oral administration of epsilon N-acetyllysine and homocitrulline in lysinuric protein intolerance.

J. Pediatr. 102: 388-390, 1983.

Redding K., Holcomb C. and Fuller R. S.

Immunolocalization of Kex2 protease identifies a putative late Golgi compartment in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

J. Cell. Biol. 113 (3): 527-538, 1991.

Regenberg B. and Kielland-Brandt M. C.

Amino acid residues important for substrate specificity of the amino acid permeases Can1p and Gnp1p in *Saccharomyces cerevisiae*.

Yeast 18: 1429-1440, 2001.

Reig N., Tesis doctoral.

Reig N., Chillaron J., Bartoccioni P., Fernandez E., Bendahan A., Zorzano A., Kanner B., Palacin M. and Bertran J.

The light subunit of system b^(0,+) is fully functional in the absence of the heavy subunit.

EMBO J. 21 (18): 4906-4914, 2002.

Reig N., del Rio C., Casagrande F., Ratera M., Gelpi J. L., Torrents D., Henderson P. J., Xie H., Baldwin S. A., Zorzano A., Fotiadis D. and Palacin M.

Functional and structural characterization of the first prokaryotic member of the lat family: A model for APC transporters.

J. Biol. Chem. 282 (18): 13270-13281, 2007.

Reizer J., Finley K., Kakuda D., Macleod C. L., Reizer A. and Saier M. H. Jr.

Mammalian integral membrane receptors are homologous to facilitators and antiporters of yeast, fungi, and eubacteria

Protein Sci. 2: 20-30, 1993.

Ren G., Reddy V. S., Cheng A., Melnyk P. and Mitra A. K.

Visualization of a water-selective pore by electron crystallography in vitreous ice.

Proc. Natl. Acad. Sci. 98: 1398-1403, 2001.

Rhee K. Y., Erdjument-Bromage H., Tempst P. and Nathan C. F.

S-nitroso proteome of *Mycobacterium tuberculosis*: Enzymes of intermediary metabolism and antioxidant defense.

Proc. Natl. Acad. Sci. 102 (2): 467-472, 2005.

- Romero M. F., Kanai Y., Gunshin H. and Hediger M. A.
Expression cloning using *Xenopus laevis* oocytes.
Methods Enzymol. 296: 17-52, 1998.
- Roosild T. P., Greenwald J., Vega M., Castronovo S., Riek R. and Choe S.
NMR Structure of Mistic, a Membrane-Integrating Protein for Membrane Protein Expresión.
Science 307: 1317-1321, 2005.
- Rosenberg M. F., Mao Q., Holzenburg A., Ford R. C., Deeley R. G. and Cole S. P.
The structure of the multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). Crystallization and single-particle analysis.
J. Biol. Chem. 276: 16076-16082, 2001.
- Rossier G., Meier C., Bauch C., Summa V., Sordat B., Verrey F. and Kuhn L. C.
LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine.
J. Biol. Chem. 274: 34948-34954, 1999.
- Russ W. P. and Engelman D. M.
The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association.
J. Mol. Biol. 296: 911-919, 2000.
- Saadi I., Chen X. Z., Hediger M., Ong P., Pereira P., Goodyer P. and Rozen R.
Molecular genetics of cystinuria: mutation analysis of SLC3A1 and evidence for another gene in type I (silent) phenotype.
Kidney Int. 54: 48-55, 1998.
- Sagara J., Miura K. and Bannai S.
Cystine uptake and glutathione level in fetal brain cells in primary culture and in suspension.
J. Neurochem. 61: 1667-1671, 1993.
- Saier M. H. Jr.
A functional-phylogenetic system for the classification of transport proteins.
J. Cell. Biochem. 32-33: 84-94, 1999a.
- Saier M. H. Jr.
Classification of transmembrane transport systems in living organisms.
Biomembrane Transport. Edited by L. Van Winkle. San Diego, CA: Academic Press: 265-276, 1999b.
- Saier M. H. Jr.
Vectorial metabolism and the evolution of transport systems.
J. Bacteriol. 182 (18): 5029-5035, 2000.
- Sali A. and Blundell T. L.
Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints.
J. Mol. Biol. 234: 779-815, 1993.
- Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T.
Molecular cloning. A laboratory Manual.
Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

Bibliografia

Santamaria F., Parenti G., Guidi G., Rotondo A., Grillo G., Larocca M. R., Celentano L., Strisciuglio P., Sebastio G. and Andria G.

Early detection of lung involvement in lysinuric protein intolerance: role of high-resolution computed tomography and radioisotopic methods.

Am. J. Respir. Crit. Care Med. 153: 731-735, 1996.

Sasaki H., Sato H., Kuriyama-Matsumura K., Sato K., Maebara K., Wang H., Tamba M., Itoh K., Yamamoto M. and Bannai S.

Electrophile response element-mediated induction of the cystine/glutamate exchange transporter gene expression.

J. Biol. Chem. 277: 44765-44771, 2002.

Sato H., Fujiwara K., Sagara J. and Bannai S.

Induction of cystine transport activity in mouse peritoneal macrophages by bacterial lipopolysaccharide.

Biochem. J. 310: 547-551, 1995a.

Sato H., Takenaka Y., Fujiwara K., Yamaguchi M., Abe K. and Bannai S.

Increase in cystine transport activity and glutathione level in mouse peritoneal macrophages exposed to oxidized low-density lipoprotein.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 215: 154-159, 1995b.

Sato H., Kuriyama-Matsumura K., Siow R. C., Ishii T., Bannai S. and Mann G. E.

Induction of cystine transport via system x_c^- and maintenance of intracellular glutathione levels in pancreatic acinar and islet cell lines.

Biochim. Biophys. Acta 1414: 85-94, 1998.

Sato H., Tamba M., Ishii T. and Bannai S.

Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins.

J. Biol. Chem. 274: 11455-11458, 1999.

Sato H., Tamba M., Kuriyama-Matsumura K., Okuno S. and Bannai S.

Molecular cloning and expression of human xCT, the light chain of amino acid transport system x_c^- .

Antioxid. Redox. Signal. 2: 665-671, 2000.

Sato H., Kuriyama-Matsumura K., Hashimoto T., Sasaki H., Wang H., Ishii T., Mann G. E. and Bannai S.

Effect of oxygen on induction of the cystine transporter by bacterial lipopolysaccharide in mouse peritoneal macrophages.

J. Biol. Chem. 276: 10407-10412, 2001.

Sato H., Tamba M., Okuno S., Sato K., Keino-Masu K., Masu M. and Bannai S.

Distribution of cystine/glutamate exchange transporter, system x_c^- , in the mouse brain.

J. Neurosci. 22: 8028-8033, 2002.

Sato H., Shiya A., Kimata M., Maebara K., Tamba M., Sakakura Y., Makino N., Sugiyama F., Yagami K., Moriguchi T., Takahashi S. and Bannai S.

Redox imbalance in cystine/glutamate transporter-deficient mice.

J. Biol. Chem. 280 (45): 37423-37429, 2005.

- Savage D. F., Egea P. F., Robles-Colmenares Y., Lii J. D. and Stroud R. M.
Architecture and selectivity in aquaporins: 2.5 Å x-ray structure of aquaporin z.
PLoS. Biol. 1: 72, 2003.
- Schroers A., Burkovski A., Wohlrab H. and Kramer R.
The phosphate carrier from yeast mitochondria. Dimerization is a prerequisite for function.
J. Biol. Chem. 273: 14269-14276, 1998.
- Segawa H., Fukasawa Y., Miyamoto K., Takeda E., Endou H. and Kanai Y.
Identification and functional characterization of a Na⁺-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity.
J. Biol. Chem. 274: 19745-19751, 1999.
- Shayakul C., Kanai Y., Lee W. S., Brown D., Rothstein J. D. and Hediger M. A.
Localization of the high-affinity glutamate transporter EAAC1 in rat kidney.
Am. J. Physiol 273: 1023-1029, 1997.
- Shi N., Ye S., Alam A., Chen L. and Jiang Y.
Atomic structure of a Na⁺- and K⁺-conducting channel.
Nature 440: 570-574, 2006.
- Shoji Y., Noguchi A., Shoji Y., Matsumori M., Takasago Y., Takayanagi M., Yoshida Y., Ihara K., Hara T., Yamaguchi S., Yoshino M., Kaji M., Yamamoto S., Nakai A., Koizumi A., Hokezu Y., Nagamatsu K., Mikami H., Kitajima I. and Takada G.
Five novel SLC7A7 variants and y⁺L gene-expression pattern in cultured lymphoblasts from Japanese patients with lysinuric protein intolerance.
Hum. Mutat. 20: 375-381, 2002.
- Silbernagl S.
The renal handling of amino acids and oligopeptides.
Physiol Rev. 68: 911-1007, 1988.
- Simell O.
Lysinuric protein intolerance and other actionic aminoacidurias.
Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases. McGraw-Hill, New York. 4933-56, 2001.
- Sitia R. and Molteni S. N.
Stress, Protein (Mis) folding, and Signaling: The Redox Connection.
Sci. STKE 239: 1-5, 2004.
- Slatin S. L., Qiu X. Q., Jakes K. S. and Finkelstein A.
Identification of a translocated protein segment in a voltage-dependent channel.
Nature 371: 158-161, 1994.
- Smirnova I. N. and Kaback H. R.
A Mutation in the Lactose Permease of Escherichia coli That Decreases Conformational Flexibility and Increases Protein Stability.
Biochemistry 42: 3025-3031, 2003.

Bibliografia

- Sobczak I. and Lolkema J. S.
Structural and mechanistic diversity of secondary transporters.
Curr. Opin. Microbiol. 8: 161-167, 2005a.
- Sobczak I. and Lolkema J. S.
The 2-Hydroxycarboxylate Transporter Family: Physiology, Structure, and Mechanism.
Microbiol. Mol. Biol. Rev. 69 (4): 665-695, 2005b.
- Soksawatmaekhin W., Uemura T., Fukiwake N., Kashiwagi K. and Igarashi K.
Identification of the Cadaverine Recognition Site on the Cadaverine-Lysine Antiporter CadB.
J. Biol. Chem. 281 (39): 29213-29220, 2006.
- Sophianopoulou V. and Diallinas G.
Amino acid transporters of lower eukaryotes: regulation, structure and topogenesis.
FEMS Microbiol. Rev. 16 (1): 53-75, 1995.
- Sorgen P. L., Hu Y., Guan L., Kaback H. R. and Girvin M. E.
An approach to membrane protein structure without crystals.
Proc. Natl. Acad. Sci. 99: 14037-14040, 2002.
- Stevens T. J. and Arkin I. T.
Do more complex organisms have a greater proportion of membrane proteins in their genomes?
Proteins 39: 417-420, 2000.
- Suda K., Filipek S., Palczewski K., Engel A. and Fotiadis D.
The supramolecular structure of the GPCR rhodopsin in solution and native disc membranes.
Mol. Membr. Biol. 21 (6): 435-446, 2004.
- Suh J.-K., Poulsen L. L., Ziegler D. M. and Robertus J. D.
Redox Regulation of Yeast Flavin-Containing Monooxygenase.
Arch. Biochem. Biophys. 381 (2): 317-322, 2000.
- Sui H., Han B. G., Lee J. K., Walian P. and Jap B. K.
Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel.
Nature 414: 872-878, 2001.
- Tamai E., Fann M. C., Tsuchiya T. and Maloney P. C.
Purification of UhpT, the sugar phosphate transporter of *Escherichia coli*.
Protein Exp. Purif. 10 (2): 275-282, 1997.
- Tamura S., Nelson H., Tamura A. and Nelson N.
Short external loops as potential substrate binding site of gamma-aminobutyric acid transporters.
J. Biol. Chem. 270: 28712-28715, 1995.
- Tanford C.
Translocation pathway in the catalysis of active transport.
Proc. Natl. Acad. Sci. 80: 3701-3705, 1983.

- Tate S. S., Yan N. and Udenfriend S.
Expression cloning of a Na⁽⁺⁾-independent neutral amino acid transporter from rat kidney.
Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 1-5, 1992.
- Tate C. G.
Overexpression of mammalian integral membrane proteins for structural studies.
FEBS Lett. 504 (3): 94-98, 2001.
- Tavoularis S. N., Tazebay U. H., Diallinas G., Sideridou M., Rosa A., Scazzocchio C. and Sophianopoulou V.
Mutational analysis of the major proline transporter (PrnB) of *Aspergillus nidulans*.
Mol. Membr. Biol. 20: 285-297, 2003.
- Teixeira S., Di Grandi S. and Kuhn L.C.
Primary structure of the human 4F2 antigen heavy chain predicts a transmembrane protein with a cytoplasmic NH2 terminus.
J. Biol. Chem. 262: 9574-9580, 1987.
- Thomas J. A., Poland B. and Honzatko R.
Perspectives in Biochemistry and Biophysics. Protein Sulfhydryls and Their Role in the Antioxidant Function of Protein S-Thiolation.
Arch. Biochem. Biophys. 319 (1): 1-9, 1995.
- Tomi M., Hosoya K., Takanaga H., Ohtsuki S. and Terasaki T.
Induction of xCT gene expression and L-cystine transport activity by diethyl maleate at the inner blood-retinal barrier.
Invest Ophthalmol. Vis. Sci. 43: 774-779, 2002.
- Tomi M., Funaki T., Abukawa H., Katayama K., Kondo T., Ohtsuki S., Ueda M., Obinata M., Terasaki T. and Hosoya K.
Expression and regulation of L-cystine transporter, system x_c⁻, in the newly developed rat retinal Muller cell line (TR-MUL).
Glia 43: 208-217, 2003.
- Törnroth-Horsefield S., Wang Y., Hedfalk K., Johanson U., Karlsson M., Tajkhorshid E., Neutze R. and Kjellbom P.
Structural mechanism of plant aquaporin gating.
Nature 439: 688-694, 2006.
- Torras-Llort M., Torrents D., Soriano-Garcia J. F., Gelpí J. L., Estévez R., Ferrer R., Palacín M and Moreto M.
Sequential amino acid exchange across b^(0,+)-like system in chicken brush border jejunum.
J. Membr. Biol. 180 (3): 213-220, 2001.
- Torrents D., Estévez R., Pineda M., Fernández E., Lloberas J., Shi Y. B., Zorzano A. and Palacín M.
Identification and characterization of a membrane protein (y⁺L amino acid transporter-1) that associates with 4F2hc to encode the amino acid transport activity y⁺L. A candidate gene for lysinuric protein intolerance.
J. Biol. Chem. 273: 32437-32445, 1998.

Bibliografía

Torrents D., Mykkanen J., Pineda M., Feliubadaló L., Estévez R., de Cid R., Sanjurjo P., Zorzano A., Nunes V., Huoponen K., Reinikainen A., Simell O., Savontaus M. L., Aula P. and Palacín M.
Identification of SLC7A7, encoding y⁺LAT-1, as the lysinuric protein intolerance gene.
Nat. Genet. 21: 293-296, 1999.

Trotti D., Rossi D., Gjesdal O., Levy L. M., Racagni G., Danbolt N. C. and Volterra A.
Peroxynitrite Inhibits Glutamate Transporter Subtypes.
J. Biol. Chem. 271 (11): 5976-5979, 1996.

Tsurudome M. and Ito Y.
Function of fusion regulatory proteins (FRPs) in immune cells and virus-infected cells.
Crit. Rev. Immunol. 20: 167-196, 2000.

Turk E., Kim O., le Coutre J., Whitelegge J. P., Eskandari S., Lam J. T., Kreman M., Zampighi G., Faull K. F. and Wright E. M.
Molecular Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* vSGLT. A model for sodium-coupled sugar cotransporters.
J. Biol. Chem. 275 (33): 25711-25716, 2000.

Tusnady G. E. and Simon I.
Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction.
J. Mol. Biol. 283: 489-506, 1998.

Ubarretxena-Belandia I., Baldwin J. M., Schuldiner S. and Tate C. G.
Three-dimensional structure of the bacterial multidrug transporter EmrE shows it is an asymmetric homodimer.
EMBO J. 22: 6175-6181, 2003.

Uchino H., Kanai Y., Kim D. K., Wempe M. F., Chairoungdua A., Morimoto E., Anders M. W., and Endou H.
Transport of Amino Acid-Related Compounds Mediated by L-Type Amino Acid Transporter 1 (LAT1): Insights Into the Mechanisms of Substrate Recognition.
Mol. Pharmacol. 61 (4): 729-737, 2002.

Uhl G. R. and Hartig P. R.
Transporter explosion: update on uptake.
Trends. Pharmacol. Sci. 13 (12): 421-425, 1992.

Urbani A. and Warne T.
A colorimetric determination for glycosidic and bile salt-based detergents: applications in membrane protein research.
Anal. Biochem. 336: 117-124, 2005.

van den Berg B., Clemons W. M., Collinson I., Hartmann E., Harrison S. C. and Rapoport T. A.
X-ray structure of a protein-conducting channel.
Nature 427: 36-44, 2004.

- van Iwaarden P. R., Driessen A. and Konings W. N.
What we can learn from the effects of thiol reagents on transport proteins.
Biochim. Biophys. Acta 1113: 161-170, 1992.
- van Iwaarden P. R., Driessen A. J. M., Lolkema J. S., Kaback H. R. and Konings W. N.
Exchange, Efflux, and Substrate Binding by Cysteine Mutants of the Lactose Permease of *Escherichia coli*.
Biochemistry 32: 5419-5424, 1993.
- van Winkle L. J., Campione A. L. and Gorman J. M.
Na⁺-independent transport of basic and zwitterionic amino acids in mouse blastocysts by a shared system and by processes which distinguish between these substrates.
J. Biol. Chem. 263: 3150-3163, 1988.
- Varela M. F., Brooker R. J. and Wilson T. H.
Lactose carrier mutants of *Escherichia coli* with changes in sugar recognition (lactose versus melibiose).
J. Bacteriol. 179: 5570-5573, 1997.
- Vázquez-Ibar J. L., Guan L., Svrakic M. and Kaback H. R.
Exploiting luminescence spectroscopy to elucidate the interaction between sugar and a tryptophan residue in the lactose permease of *Escherichia coli*.
Proc. Natl. Acad. Sci. 100 (22): 12706-12711, 2003.
- Vázquez-Ibar J. L., Guan L., Weinglass A. B., Verner G., Gordillo R. and Kaback H. R.
Sugar Recognition by the Lactose Permease of *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem. 275 (47): 49214-49221, 2004.
- Veenhoff L. M., Heuberger E. H. and Poolman B.
Lactose transport protein is a cooperative dimer with two sugar translocation pathways.
EMBO J. 20: 3056-3062, 2001.
- Veenhoff L. M., Heuberger E. H. and Poolman B.
Quaternary structure and function of transport proteins.
Trends. Biochem. Sci. 27 (5): 242-249, 2002.
- Veenstra M., Lanza S., Hirayama B. A., Turk E. and Wright E. M.
Local conformational changes in the *Vibrio* Na⁺/galactose cotransporter.
Biochemistry 43 (12): 3620-3627, 2004.
- Veljkovic E., Stasiuk S., Skelly P. J., Shoemaker C. B. and Verrey F.
Functional Characterization of *Caenorhabditis elegans* Heteromeric Amino acid Transporters.
J. Biol. Chem. 279: 7655-7662, 2004.
- Venkatesan P. and Kaback H. R.
The substrate-binding site in the lactose permease of *Escherichia coli*.
Proc. Natl. Acad. Sci. 95 (17): 9802-9807, 1998.
- Verrey F.
System L: heteromeric exchangers of large, neutral amino acids involved in directional transport.
Pflugers Arch. 445: 529-533, 2003.

Bibliografía

Verrey F., Closs E. I., Wagner C. A., Palacín M., Endou H. and Kanai Y.
CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters.
Pflugers Arch. 447: 532-542, 2004.

von Heijne G.
Proline kinks in transmembrane alpha-helices.
J. Mol. Biol. 218 (3): 499-503, 1991.

Wagner C. A., Lang F. and Broer S.
Function and structure of heterodimeric amino acid transporters.
Am. J. Physiol. Cell Physiol. 281: 1077-1093, 2001.

Wallin E. and von Heijne G.
Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms.
Protein Sci. 7: 1029-1038, 1998.

Wang Y. and Tate S.S.
Oligomeric structure of a renal cystine transporter: implications in cystinuria.
FEBS Lett. 368: 389-392, 1995.

Wang W., Oliva C., Li G., Holmgren A., Lillig C. H. and Kirk K. L.
Reversible Silencing of CFTR Chloride Channels by Glutathionylation.
J. Gen. Physiol. 125 (2): 127-141, 2005.

Wang X., Sarker R. I. and Maloney P. C.
Analysis of Substrate-Binding Elements in OxIT, the Oxalate:Formate Antiporter of *Oxalobacter formigenes*.
Biochemistry 45: 10344-10350, 2006.

Waniewski R. A. and Martin D. L.
Characterization of L-glutamic acid transport by glioma cells in culture: evidence for sodium-independent, chloride-dependent high affinity influx.
J. Neurosci. 4 (9): 2237-2246, 1984.

Weinglass A., Whitelegge J. P., Faull K. F. and Kaback H. R.
Monitoring Conformational Rearrangements in the Substrate-binding Site of a Membrane Transport Protein by Mass Spectrometry.
J. Biol. Chem. 279 (40): 41858-41865, 2004.

Weiss H. M., Haase W., Michel H. and Reilander H.
Expression of functional mouse 5-HT_{5A} serotonin receptor in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: pharmacological characterization and localization.
FEBS Lett. 377 (3): 451-456, 1995.

Weissbach L., Handlogten M. E., Christensen H. N. and Kilberg M. S.
Evidence for two Na⁺-independent neutral amino acid transport systems in primary cultures of rat hepatocytes. Time-dependent changes in activity.
J. Biol. Chem. 257: 12006-12011, 1982.

- Wells R. G. and Hediger M. A.
Cloning of a rat kidney cDNA that stimulates dibasic and neutral amino acid transport and has sequence similarity to glucosidases.
Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 5596-5600, 1992.
- Wigler M., Sweet R., Sim G. K., Wold B., Pellicer A., Lacy E., Maniatis T., Silverstein S. and Axe R.
Transformation of mammalian cells with genes from procaryotes and eucaryotes.
Cell 16: 777-785, 1979.
- Wolf D. A., Wang S., Panzica M. A., Bassily N. H. and Thompson N. L.
Expression of a highly conserved oncofetal gene, TA1/E16, in human colon carcinoma and other primary cancers: homology to *Schistosoma mansoni* amino acid permease and *Caenorhabditis elegans* gene products.
Cancer Res. 56: 5012-5022, 1996.
- Wright J. K. and Overath P.
Purification of the lactose:H⁺ carrier of *Escherichia coli* and characterization of galactoside binding and transport.
Eur. J. Biochem. 138: 497-508, 1984.
- Wu J., Kaback H. R.
Cysteine 148 in the lactose permease of *Escherichia coli* is a component of a substrate binding site. 2. Site-directed fluorescence studies.
Biochemistry 33 (40): 12166-12171, 1994.
- Wu C. C. and Yates J. R.
The application of mass spectrometry to membrane proteomics.
Nat. Biotechnol. 21: 262-267, 2003.
- Xie Z., Turk E. and Wright E. M.
Characterization of the *Vibrio parahaemolyticus* Na⁺/Glucose cotransporter. A bacterial member of the sodium/glucose transporter (SGLT) family.
J. Biol. Chem. 275 (34): 25959-26964, 2000.
- Xu D. and Hemler M. E.
Metabolic activation-related CD147-CD98 complex.
Mol. Cell. Proteomics. 4 (8): 1061-1071, 2005.
- Yamaguchi A., Nakatani M. and Sawai T.
Aspartic acid-66 is the only essential negatively charged residue in the putative hydrophilic loop region of the metal-tetracycline/H⁺ antiporter encoded by transposon Tn10 of *Escherichia coli*.
Biochemistry 31: 8344-8348, 1992.
- Yamashita A., Singh S. K., Kawate T., Jin Y. and Gouaux E.
Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters.
Nature 437: 215-223, 2005.

Bibliografia

Yanagida O., Kanai Y., Chairoungdua A., Kim D. K., Segawa H., Nii T., Cha S. H., Matsuo H., Fukushima J., Fukasawa Y., Tani Y., Taketani Y., Uchino H., Kim J. Y., Inatomi J., Okayasu I., Miyamoto K., Takeda E., Goya T. and Endou H.

Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines.

Biochim. Biophys. Acta 1514: 291-302, 2001.

Yang Q., Wang X., Ye L., Mentrikoski M., Mohammadi E., Kim Y.-M. and Maloney P. C.

Experimental tests of a homology model for OxlT, the oxalate transporter of *Oxalobacter formigenes*.

Proc. Natl. Acad. Sci. 102: (24) 8513-8518, 2005.

Yernool D., Boudker O., Jin Y. and Gouaux E.

Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*.

Nature 431: 811-818, 2004.

Yin Y., He X., Szewczyk P., Nguyen T. and Chang G.

Structure of the Multidrug Transporter EmrD from *Escherichia coli*.

Science 312: 741-744, 2006.

Yoon J. H., Kim Y. B., Kanai Y., Endou H. and Kim D. K.

Sequential increases in 4F2hc expression during DMBA-induced hamster buccal pouch carcinogenesis.

Anticancer Res. 23: 3877-3881, 2003.

Zhang Y.-W. and Rudnick G.

The Cytoplasmic Substrate Permeation Pathway of Serotonin Transporter.

J. Biol. Chem. 281 (47): 36213-36220, 2006.

Zheng L., Kostrewa D., Berneche S., Winkler F. K. and Li X. D.

The mechanism of ammonia transport based on the crystal structure of AmtB of *Escherichia coli*.

Proc. Natl. Acad. Sci. 101: 17090-17095, 2004.

Zhou Y., Morais-Cabral J. H., Kaufman A. and MacKinnon R.

Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å.

Nature 414: 43-48, 2001.

Zhuang J., Prive G. G., Werner G. E., Ringler P., Kaback H. R. and Engel A.

Two-dimensional crystallization of *Escherichia coli* lactose permease.

J. Struct. Biol. 125: 63-75, 1999.

Zottola R. J., Cloherty E. K., Coderre P. E., Hansen A., Hebert D. N. and Carruthers A.

Glucose transporter function is controlled by transporter oligomeric structure. A single, intramolecular disulfide promotes GLUT1 tetramerization.

Biochemistry 34: 9734-9747, 1995.

2. Webs:

Web 1: <http://www.tcdb.org>.

Web 2: <http://dspace.hrz.uni-dortmund.de:8080/dspace/bitstream/2003/21356/3/tyagi.doc>.

Web 3: http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_Proteins_xtal.html.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Herramientas informáticas y estadísticas.

1.1. Bases de datos utilizadas.

1.1.1. MEDLINE Entrez:

Base de datos de publicaciones que pertenece a la *Nacional Library of Medicine* (NLM). Dispone de información bibliográfica del campo de la biomedicina, con citas a más de 4500 revistas publicadas en EEUU, Europa y otros países, la gran mayoría de ellas de lengua inglesa y que se actualiza semanalmente. La búsqueda puede realizarse por palabra clave, autor, revista, año de publicación o cualquier combinación de estos. El resultado aparece en forma de listado de referencias con libre acceso al resumen de cada artículo y en la mayoría de los casos con un enlace al artículo completo, cuyo acceso puede requerir de una suscripción a la revista o el pago del artículo. El acceso es a través de la dirección: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>.

1.1.2. GeneBank:

Es una base de datos de secuencias que pertenece al *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) y dispone de las secuencias de DNA de todas las fuentes públicas disponibles (Benson et al., 1998). Estas secuencias son enviadas directamente por los laboratorios que las han identificado o bien son adquiridas de las bases de datos públicas internacionales como el *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) o la *DNA Database of Japan* (DDBJ). Cada secuencia de DNA se acompaña de la secuencia de proteína que se deriva de ella y de la información proporcionada por la fuente que la envía: publicación, localización cromosómica, localización de diferentes motivos funcionales, etc. Todas las secuencias disponibles se pueden encontrar en *GenBank Database Query Form*: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/query_form.html Las secuencias nuevas se envían directamente mediante conexión *on line* con el GeneBank a través de la dirección: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt/index.html>.

1.1.3. Ensembl:

Es una base de datos fundada inicialmente por la fundación privada *The Wellcome Trust* y que ahora forma parte de un proyecto común entre el Instituto Sanger y el EMBL-EBI. Dispone de secuencias de DNA genómico de humano, ratón, rata, mosquito, *D. melanogaster*, *C. elegans* entre otras. Estas secuencias son proporcionadas por laboratorios que forman parte de los proyectos de secuenciación del genoma, de ESTs y por un intercambio regular de la información de secuencias del NCBI. Además, proporciona información sobre la localización de un gen conocido en el genoma y la predicción de su estructura. Las secuencias se hacen públicas cada semana y son sometidas en la dirección <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/trace.cgi?cmd=show&f=rfc>. El acceso puede realizarse vía <http://www.ensembl.org/>.

1.2. Análisis de secuencias.

1.2.1. Basic Local Alignment Tools (BLAST):

Los programas BLAST se utilizan para encontrar en las bases de datos secuencias similares de DNA y proteína. Estos programas comparan una secuencia de proteína o de DNA “problema” con todas las secuencias de las bases de datos en cualquier combinación posible entre DNA y proteína. El resultado se muestra como una lista de alineamientos de más a menos calidad entre las secuencias encontradas en la base de datos y la secuencia “problema” enviada. El tiempo requerido para obtener el resultado es proporcional al tamaño de la secuencia y al de la base de datos utilizada en la búsqueda. Los programas más recientes como el *Gapped* BLAST son más sensibles que el BLAST original, ya que dejan pequeños agujeros donde la homología de la secuencia se interrumpe. De esta manera se pueden encontrar con más facilidad similitudes de secuencia en zonas donde hay pequeñas inserciones, deleciones o errores de secuencia. *Gapped BLAST* se encuentra en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

Existen diferentes subprogramas que pueden utilizarse en diferentes bases de datos entre las que se destaca la *non-redundant* (nr), la cual recopila secuencias de DNA no redundantes (a partir de ESTs) y secuencias de proteínas (SwissProt, EMBL, Spupdate y secuencias de DNA traducidas que pertenecen al GenBank) y el genómico, que comprende todas las secuencias conocidas, más o menos ordenadas y localizadas, pertenecientes al genoma de una determinada especie.

Los diferentes subprogramas BLAST son:

- **BLASTn**: compara una secuencia “problema” de DNA con las secuencias presentes en la base de datos de DNA.
- **BLASTp**: compara una secuencia “problema” de proteína con las secuencias presentes en la base de datos de proteína.
- **BLASTx**: traduce a proteína una secuencia “problema” de DNA según las seis pautas de lectura posibles y las compara con las secuencias presentes en la base de datos de proteína.
- **tBLASTn**: compara una secuencia peptídica “problema” con las secuencias peptídicas obtenidas de la traducción del DNA de la base de datos.
- **tBLASTx**: traduce tanto la secuencia de DNA “problema” como las secuencias de DNA de las bases de datos y compara todas las secuencias peptídicas resultantes.

1.2.2. CLUSTAL W:

Este programa compara múltiples secuencias de DNA o proteína y muestra el mejor alineamiento posible. En esta Tesis doctoral se ha utilizado el acceso a través del *European Bioinformatic Institute* (EBI; <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>) que permite alineamientos

múltiples de hasta de treinta secuencias de DNA o de proteína y que, además de indicar los residuos conservados, calcula la identidad en porcentaje entre las secuencias enviadas y permite la construcción de árboles filogenéticos.

1.3. Análisis de proteínas.

1.3.1. ExPASy (*Expert Protein Analysis System*) Proteomics Server:

Es un servidor que pertenece al Instituto Suizo de Bioinformática (SIB) dedicado especialmente al análisis de secuencias de proteína y estructuras. Fue creado en 1993 y ofrece acceso libre a un amplio espectro de bases de datos, programas y enlaces que permiten desde la identificación de proteínas hasta la predicción de su estructura y la creación de un modelo 3D. Se accede a través de la dirección: <http://us.expasy.org/>.

A continuación se destacan los más relevantes para la realización de este trabajo:

- **HMMTOP (*Hidden Markov Model for Topology Prediction*)**: es un programa desarrollado en *The Institute of Enzymology*, dentro de la *Hungarian Academy of Biological Sciences Research Center* en Budapest, para la predicción de hélices TM y la topología de proteínas. El método se basa en el principio de la máxima divergencia en la composición de los segmentos de aminoácidos (Tusnady et al., 1998). Al someter la secuencia de la proteína de interés, el programa hace una predicción del número de segmentos TM, especificando el intervalo de residuos de cada segmento, indica la localización de los extremos terminales y la entropía del modelo. Testado para 148 proteínas conocidas, el programa fue capaz de predecir correctamente las hélices TM en 131 de ellas y, la topología, en 105. Se puede encontrar directamente en: <http://www.enzim.hu/hmmtop>.

- **TMHMM**: es un programa de predicción de hélices TM del Center for *Biological Sequence Analysis* de Dinamarca (CBS). Aunque se basa en el mismo método que el HMMTOP (Moller et al., 2001), tiene varias ventajas:

- Asocia un valor de probabilidad para la predicción de cada segmento, dando una idea de la fiabilidad de dicha predicción.

- Presenta el resultado también de forma gráfica.

- Permite someter varias secuencias a la vez, como alineamientos de proteínas de una misma familia, aumentando la fiabilidad del resultado. Se puede encontrar en: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>.

- **TMpred**: es un programa de predicción de segmentos TM y de su orientación de la organización suiza independiente EMBnet. El resultado se presenta en forma de algoritmos, basándose en el análisis de la base de datos de proteínas de membrana TMbase (Hofmann et al., 1993). No es tan preciso como los anteriores pero da el perfil de hidrofobicidad de la proteína y es útil para tener una aproximación inicial del número de TM que puede presentar y su orientación. Es parecido al *Hydrophobicity Search Server*. Se encuentra en la dirección http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html.

- **Swiss-Prot Database:** es una base de datos de proteínas desarrollada en el propio Instituto Suizo de Bioinformática (SIB) desde 1987. Ofrece información acerca de la función, dominios estructurales, modificaciones post-traduccionales, etc. de las proteínas que contiene. Se actualiza permanentemente y está integrada en una amplia red de bases de datos diferentes a la propia. Está disponible en: <http://us.expasy.org/sprot/>.

- **SWISS-MODEL:** es un programa de modelaje molecular a partir de estructuras proteicas homólogas a la proteína de interés. Se inició en 1993 y está en evolución constante pero hay que tomar los resultados con mucha precaución ya que es un procedimiento no experimental. Se accede por: <http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>.

1.4. Otras páginas web de interés.

1.4.1. Transport Classification Database (TCDB):

Base de datos del Dr. Milton Saier Jr. donde se detalla un sistema de clasificación para las proteínas de membrana conocidas llamado TC (*Transporter Classification system*) aprobado por la IUBMB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) y que es análogo al EC (*Enzyme Commission system*) usado para clasificar enzimas, pero que además incorpora información filogenética adicional así como referencias bibliográficas y bases de datos estructurales. Además permite la búsqueda de homólogos de una secuencia "problema" con la base de datos. <http://tcdb.org> (Web1 en Bibliografía).

1.4.2. The Stephen White Laboratory at UC Irving:

Página web localizada en el departamento de Fisiología y Biofísica del Colegio de Medicina de la U. de California que incluye una completa y actualizada base de datos de proteínas de membrana cristalizadas en 3D con las condiciones de cristalización, enlaces al PDB para ver las imágenes y enlaces a los artículos donde se publicaron. http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_Proteins_xtal.html (Web3 en Bibliografía)

1.4.3. Membrane Proteins of Known Structure:

Recopilación actualizada de las proteínas de membrana con estructura resuelta. Aparecen clasificadas e incluye las condiciones de cristalización y las referencias bibliográficas. Es una página de Hartmut Michel (U. de Frankfurt). <http://www.mpibp-frankfurt.mpg.de/michel/public/memprotstruct.html>.

1.4.4. Pedro's BioMolecular Research Tools:

Uno de los enlaces más completos a páginas utilizadas en Biología Molecular. http://www.biophys.uni-duesseldorf.de/BioNet/Pedro/research_tools.html.

1.4.5. Weizmann Institute Genome and Bioinformatics:

<http://bip.weizmann.ac.il/index.html>.

1.4.6. Sequence interpretation Tools:

<http://www.genome.ad.jp/SIT/SIT.html>.

1.4.7. HUGO Gene Nomenclature Committee:

Contiene la base de datos de los genes humanos descritos agrupados por familias. Muestra el nombre del gen, el símbolo aprobado, su localización y el número de acceso a la secuencia con el enlace correspondiente. <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature>.

1.4.8. Celera Genomics:

Página privada que, con suscripción, permite acceder a todas las secuencias disponibles de los proyectos de secuenciación de genomas. <http://www.celera.com/>.

1.4.9. Toronto Research Chemicals:

Página de la empresa canadiense suministradora de todos los reactivos de cisteína utilizados en esta Tesis doctoral. Aporta amplia información bibliográfica sobre estos productos. <http://www.trc-canada.com>.

1.4.10. Anatrace:

Página de la empresa estadounidense suministradora de los detergentes DDM y DM utilizados en esta Tesis doctoral. Aporta amplia información bibliográfica sobre estos productos y sobre la purificación de proteínas de membrana. <http://www.anatrace.com>.

1.5. Diseño de oligonucleótidos (*primers*).**1.5.1. Primer Select:**

Es un programa perteneciente al paquete DNASTAR que busca oligonucleótidos sobre una secuencia introducida por el usuario, permitiendo fijar determinados parámetros como la temperatura de hibridación, la longitud de los oligonucleótidos y del producto de PCR. Se puede adquirir en: <http://dnastar.com>.

1.6. Análisis estadístico:**1.6.1. GraphPAD Prism v4.0:**

Este programa permite realizar el análisis de diferentes estadísticos como el test t o introduciendo las medias, errores y número de repeticiones obtener los valores de K_M y $V_{m\acute{a}x}$ mediante regresión no lineal aplicando la ecuación de Michaelis Menten.

2. Técnicas de obtención, manipulación y análisis de DNA.

En la realización de esta Tesis doctoral las técnicas de manipulación de DNA han sido

ampliamente utilizadas.

2.1. Técnicas básicas generales.

Estas técnicas son más o menos comunes en todos los laboratorios de Biología Molecular, y se pueden encontrar ampliamente detalladas en los manuales *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (Sambrook et al., 1989) y *Current Protocols in Molecular Biology* (Coligan et al., 2001), así como en anteriores Tesis doctorales de nuestro grupo de investigación.

A continuación aparece una lista de las técnicas relacionadas con la manipulación de DNA utilizadas habitualmente durante la realización de esta Tesis doctoral:

2.1.1. Generación y manipulación de bacterias competentes.

2.1.2. Transformación de bacterias competentes.

2.1.3. Obtención de plásmidos de cultivos bacterianos (MiniPrep y MaxiPrep, Qiagen).

2.1.4. Análisis del DNA con enzimas de restricción.

2.1.5. Electroforesis en geles de agarosa.

2.1.6. Purificación del DNA a partir de un gel de agarosa o en solución.

2.1.7. Tratamiento con fosfatasa alcalina.

2.1.8. Extracción del DNA con fenol-cloroformo y precipitación con etanol.

2.1.9. Ligación del DNA.

2.1.10. PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

2.2. Mutagénesis dirigida.

Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en esta Tesis doctoral. La eliminación de cisteínas endógenas para la construcción de SteT *cysless* (sin cisteínas) y su posterior introducción individualizada en las posiciones de interés se realizó mediante mutagénesis dirigida. Existe un *kit* comercial (*QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit*; 200518 Stratagene) que permite la obtención rápida de los plásmidos mutantes a partir de DNA de doble cadena con una eficiencia de alrededor del 80%.

El método se basa en una amplificación del DNA por PCR con dos oligonucleótidos complementarios a cada una de las cadenas de DNA parental y que contienen la mutación deseada. Se utiliza como polimerasa la Pfu Turbo, que replica ambas cadenas del plásmido con alta fidelidad sin desplazar el oligonucleótido mutado. Después de la amplificación, un tratamiento con Dpn I (endonucleasa específica de DNA metilado) nos sirve para digerir la cadena parental y seleccionar las cadenas sintetizadas *in vitro*. A continuación se transforma el DNA en células *E. coli XL1-Blue* supercompetentes y se analizan los clones seleccionados primero por restricción y después por secuenciación.

Los mutantes generados durante esta Tesis doctoral han seguido el programa de PCR que se detalla a continuación, partiendo de 20 ng de DNA parental: 30 segundos de desnaturalización a 95 °C, 1 minuto de anillamiento a 55 °C y 12 minutos de elongación a 68 °C, repetido por 18 ciclos; y una bajada final de temperatura hasta 15 °C ó 4 °C.

En el apéndice B se encuentran detallados los oligonucleótidos de mutagénesis utilizados en la realización de esta Tesis doctoral. En su diseño se tuvo en cuenta:

- Situar la mutación en el centro del oligonucleótido.
- Cercano a los 30 pares de bases de longitud.
- Asegurar un contenido de GC mínimo del 40%, procurando terminar en una o más G o C.

2.3. Secuenciación.

Es una reacción que se utiliza para conocer la secuencia de un fragmento de DNA después de una amplificación por PCR, una mutagénesis, una construcción, etc. En este trabajo se ha utilizado el *kit* comercial *ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction*. Esta reacción consiste en una PCR cuya amplificación es aritmética y en la que se incluyen dideoxinucleótidos fluorescentes. El programa de PCR utilizado se detalla a continuación: 30 segundos de desnaturalización a 96 °C, 15 segundos de anillamiento a 37 °C y 4 minutos de elongación a 60 °C, repetido durante 25 ciclos; y bajada final de temperatura hasta 15 °C.

Finalizada la amplificación, se procede a la precipitación de la muestra con etanol y EDTA: se añaden 10 µl de agua destilada, 63 µl de etanol 95% y 5 µl de EDTA 125 mM, se agita con *vortex* y se deja incubando durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrifuga 20 minutos a 14000 rpm a 4 °C, se aspira el sobrenadante, se lava dos veces el precipitado con 200 µl de etanol 70% seguido de una centrifugación de 5 minutos a 14000 rpm y se deja secar al aire.

Las reacciones de secuencia de esta Tesis doctoral han sido analizadas por los Serveis Científico-Tècnics de la U. de Barcelona. Con esta técnica se han confirmado todas las mutaciones introducidas por mutagénesis dirigida y la fidelidad del cDNA restante.

3. Cultivos.

Cuando se manipulan células en cultivo se deben seguir unas normas muy estrictas de limpieza y esterilidad con la finalidad de minimizar cualquier riesgo de contaminación. La sala de cultivos celulares está separada del resto del laboratorio y se trabaja siempre dentro de una campana de flujo laminar vertical que se limpia con etanol al 70% antes de empezar a trabajar, a parte de haber sido irradiada con rayos UV cuando no estaba siendo utilizada. El uso de

llama dentro de ésta es opcional. Con levaduras y bacterias se trabaja siempre al lado de la llama de un mechero Bunsen. Para evitar contaminaciones no se debe pasar las manos o cualquier objeto no estéril sobre el material estéril. Los medios de cultivo, las soluciones y todos los materiales que entran en contacto con las células han de esterilizarse, bien por filtración con filtros de 0,22 µm de diámetro de poro o por otros métodos (autoclave, irradiación, etc.). Estas condiciones se mantienen cuando las botellas se abren y cierran sólo dentro de la campana. Además, estas soluciones se atemperan a 37 °C antes de ser utilizadas con células HeLa o a 30 °C si son para levadura. Los restos biológicos se tratan con lejía al 30% y los materiales utilizados se autoclavan. Una vez finalizado el trabajo dentro de la campana se limpia la superficie con etanol al 70% y se reduce el flujo a las condiciones de mantenimiento. Generalmente, las células se mantienen en incubadores con las siguientes condiciones: 37 °C, 90% de humedad relativa y 5% de CO₂. Por el contrario, las levaduras se mantienen en tubos *Falcon* en la cámara fría (aguantan meses) o en forma de gliceroles congelados en el -80 °C. Finalmente, las bacterias se mantienen en placas de LB-agar en la cámara fría (aguantan semanas) o en forma de gliceroles congelados en el -80 °C.

3.1. Cultivos de células HeLa.

3.1.1. Medios de cultivo:

Los medios de cultivo se guardan a 4 °C hasta la fecha de caducidad que indica la casa comercial y, una vez suplementados, se mantienen como máximo un mes a esta temperatura. La suplementación consiste en la adición de sustancias como L-glutamina, antibióticos o suero a partir de un stock que se mantiene a -20 °C. Los antibióticos utilizados rutinariamente son la penicilina y la estreptomina: la primera es un agente bacteriostático que sólo elimina bacterias en crecimiento (inhibe la síntesis de peptidoglicanos de la pared bacteriana), y la segunda es un aminoglucósido que inhibe específicamente la síntesis proteica del ribosoma bacteriano 70S. El suero que se ha utilizado es *Fetal Bovine Serum* (FBS). El suero se somete a un tratamiento previo de inactivación (30 minutos a 56 °C) del sistema del complemento y de anticuerpos que pueden estar presentes.

3.1.2. Condiciones de cultivo de células HeLa:

Durante la realización de esta Tesis doctoral se ha trabajado con el tipo de línea celular llamado HeLa. Las células HeLa (ATCC CCL-2) proceden de adenocarcinoma de cérvix humano. Presentan un fenotipo epitelial y tienen incorporado secuencias del papilomavirus humano 18 (HPV-18). Estas células son ampliamente utilizadas para el estudio de diferentes proteínas expresadas de manera transitoria. Proliferan muy rápido por lo que deben subcultivarse al menos dos veces por semana, normalmente lunes y viernes. El número de pases afecta a la transfección transitoria. A partir del pase 35-40 el porcentaje de células transfectadas decae considerablemente.

Las células HeLa se han mantenido en incubadores con 90% de humedad relativa, 5%

de CO₂ y temperatura de 37 °C. Han crecido en el medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, 41966-029 GIBCO; con L-glutamina y D-glucosa) suplementado con 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (17-602A, BioWhitaker) y 10% (v/v) de FBS previamente inactivado (ver apartado 3.1.1).

3.1.2.1 Subcultivo:

El subcultivo consiste en la separación de las células de la superficie donde están adheridas por acción de una proteasa y su redistribución posterior en placas para realizar experimentos o, simplemente, mantenerlas en crecimiento.

Materiales y reactivos:

- PBS (Sodium Phosphate Buffer) estéril
- Tripsina-EDTA (5% y 2%, respectivamente) (25300-062, GIBCO)
- Medio de cultivo suplementado

Procedimiento:

Normalmente se subcultivan células a partir de placas de 100 mm de diámetro que alcanzan el 100% de confluencia o incluso el 150%. Se elimina el medio que cubre las células y se hacen 2 lavados con 10 ml de PBS. Se añade 1 ml de tripsina y se incuba a temperatura ambiente durante 3 minutos aproximadamente. El proceso puede tener lugar a 37 °C pero evitando siempre una sobreexposición a la tripsina ya que ésta puede causar daños importantes en las células. Una vez tripsinizadas, se acaban de desenganchar de la placa con ligeros golpes contra la palma de la mano e inmediatamente se añaden 9 ml de medio suplementado. Las células se resuspenden con una pipeta de 10 ml hasta conseguir una suspensión que se plaquea diluida en función de la cantidad y del tiempo en el que necesitamos las células. Así, si una placa de 100 mm confluyente al 100% se tripsiniza y se siembra a un 10% de confluencia tardará 2-3 días en volver a un 100% de confluencia. En el caso de que se utilicen para una transfección transitoria, a partir de una placa confluyente al 100% se siembra a un 20% a primera hora de la mañana, de manera que si se transfecta por la tarde estará a un 30-40% de confluencia. No conviene hacer diluciones mayores ya que la homogeneidad de la población podría verse alterada.

3.1.2.2 Congelación y descongelación:

Las células tripsinizadas se sedimentan a 1200 rpm (200 g) durante 4 minutos y se resuspenden en 10 ml de medio de cultivo DMEM (previamente en hielo) que contiene 20% de FBS y 10% de DMSO (D2650, Sigma) como agente crioprotector. La suspensión se distribuye en criotubos (tres por placa de 10 cm confluyente), enfriados previamente en hielo, que se colocan en un recipiente de isopropanol para congelar células y se congela a -80 °C. Después de 24 horas se pasan a un tanque de nitrógeno líquido. Es muy importante que el proceso de congelación sea lento. Por esto, se recomienda el uso del tanque de isopropanol en el que la

temperatura disminuye 1 °C por minuto.

La descongelación, en cambio, es un proceso que debe llevarse a cabo de manera muy rápida. El criotubo se saca del tanque de nitrógeno líquido y se descongela a 37 °C. La suspensión de células se diluye en 10 ml de medio de cultivo que está a 37 °C y se precipita a 200 g durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se elimina el sobrenadante, las células se resuspenden en 10 ml de medio de cultivo fresco y se siembran en una placa de 100 mm. Al día siguiente se cambia el medio para eliminar las células muertas no adheridas a la placa.

3.1.2.3 Detección de micoplasma:

El micoplasma es un parásito intracelular que puede afectar a los cultivos celulares sin indicios aparentes de contaminación. Por eso es aconsejable realizar un test de micoplasma periódicamente. En este trabajo se ha utilizado el *EZ PCR Mycoplasma Test Kit* (Biological Industries Co.) basado en la amplificación por PCR del genoma del parásito. Contiene oligonucleótidos degenerados capaces de amplificar un trozo de secuencia de las ocho especies más comunes del parásito. Para que el test sea fiable se utiliza 1 ml de medio de cultivo que haya estado en contacto con las células un mínimo de 48 horas.

3.1.3. Transfección celular transitoria:

El estudio funcional de una proteína requiere, en muchos casos, su expresión transitoria en una línea celular. En este trabajo se ha utilizado el método de transfección basado en la introducción de un coprecipitado de DNA exógeno y fosfato cálcico dentro de la célula (Wigler et al., 1979; Sambrook et al., 1989). El mecanismo por el cual el precipitado entra en la célula no está muy claro, aunque se cree que inicialmente se adhiere a la superficie de la célula y por endocitosis se incorpora al interior de ésta. Este precipitado se forma al mezclar dos soluciones, una salina que contiene cloruro cálcico y otra de tamponación que contiene el fosfato. El DNA presente queda incorporado en los cristales del precipitado formado.

Uno de los parámetros más importantes en este método es el pH de la solución que contiene el fosfato. Pequeñas variaciones en este factor determinan el tamaño del precipitado y por consiguiente su endocitosis en la célula. Se recomienda probar la eficiencia de transfección con soluciones de fosfato de diferente pH dentro de un rango óptimo teórico de 6.5-7. Este rango puede variar considerablemente entre las diferentes líneas celulares y la calidad del DNA que se utiliza.

Para monitorizar la eficiencia de transfección, en este trabajo se ha utilizado un plásmido que codifica la *Green Fluorescent Protein* (GFP). Las células se cotransfectan con el plásmido de interés y un 10% de plásmido GFP. De esta manera, se puede conocer el porcentaje de células transfectadas cuando se cuentan en un citómetro de flujo. Normalmente las eficiencias de transfección oscilan entre el 70-90%. Muestras con eficiencias inferiores al 50% son descartadas.

Un parámetro que puede ser importante en la formación del precipitado es la cantidad

de DNA. En este trabajo se ha utilizado siempre la misma cantidad en función del número de células a transfectar: 20 µg de DNA en una placa de 100 mm; 40 µg de DNA en una placa de 150 mm.

Finalmente, se debe tener en cuenta la densidad del cultivo celular en el momento de la transfección. Este parámetro depende del tipo celular y del método de transfección que se utilizan. Las transfecciones con fosfato cálcico de células HeLa se realizan sobre cultivos que se encuentran entre un 20% y un 40% de confluencia.

Materiales y reactivos:

- Solución de calcio: CaCl₂ 500 mM y BES 100 mM (Fluka). El pH se ajusta a 6.95, se filtra y se conserva a temperatura ambiente. Si se prepara más de 50 ml se hacen alícuotas que se mantienen a -20 °C.
- Solución de fosfato: NaCl 50 mM, Na₂HPO₄ 0.75 mM, NaH₂PO₄ 0.75 mM y BES 50 mM. Se hacen alícuotas que oscilan entre sí 0.02 puntos de pH con NaOH. Se filtran y se guardan a temperatura ambiente.
- Agua inyectable de Braun (Aqua B. Braun, B. Braun Medical SA) o H₂O MilliQ estéril.
- Preparaciones de DNA concentradas a 1mg/ml obtenidas a partir de un cultivo bacteriano de 500 ml por MaxiPrep (12163, Qiagen).
- PBS estéril.

Procedimiento:

Todo el proceso de transfección se lleva a cabo en una campana de flujo laminar ya que implica la manipulación de células en cultivo. Las células se siembran el día antes o el mismo día por la mañana teniendo en cuenta que deben alcanzar el 20-40% de confluencia en el momento de la transfección. El medio de cultivo se reemplaza por medio fresco antes de la transfección. La mezcla de DNAs para transfectar células crecidas en una placa de 10 cm de diámetro se prepara en un tubo estéril de 15 ml: 18 µg del DNA de interés, 2 µg de plásmido GFP y hasta 250 µl de agua. Si se trata de una placa de 15 cm se utiliza el doble y si es una transfección doble o triple, se mezclan cantidades equimolares de DNA. Se añaden 250 µl de la solución de calcio y se agita vigorosamente para mezclar el calcio y el DNA. Se introduce una pipeta de 2 ml y con el pipeteador automático se hacen burbujas mientras se añaden 500 µl de la solución de fosfato gota a gota. Se deja reposar 15 minutos a temperatura ambiente para favorecer la formación de los precipitados. Es importante que la temperatura de la campana no sea elevada. Transcurrido este tiempo, se vuelve a hacer burbujas con el pipeteador automático durante 15-20 segundos y se añade a las células gota a gota mientras se agita la placa para distribuir la solución de transfección.

Pasadas 12-20 horas se sacan las células del incubador, se lavan dos veces con PBS y se añade medio de cultivo fresco. Es conveniente que se reserve una alícuota de cada grupo (5-10%) para sembrar en un pocillo de una placa de 6 y se destine para saber el porcentaje de transfección en el citómetro de flujo. El método se basa en la distribución de las células según

su fluorescencia. Las células transfectadas contienen el plásmido de GFP y, por tanto, emiten fluorescencia en comparación con el resto. Al cabo de 24-48 horas de la transfección se puede realizar la monitorización de la transfección y el experimento.

Todos los porcentajes de transfección evaluados durante esta Tesis doctoral se han realizado en la unidad de citometría de los Serveis Científico-Tècnics de la U. de Barcelona. La eficiencia mínima necesaria para los experimentos de transporte está en el 50-60%. Generalmente, las transfecciones obtenidas oscilaban alrededor del 85%.

3.2. Cultivos de *Pichia pastoris*.

3.2.1. Soluciones:

- YPD: 10 g extracto de levadura + 20 g tristona + 900 ml H₂O MilliQ. Se autoclava. Una vez enfriado se añaden 100 ml dextrosa 20% autoclavada.
- BMGY: 10 g extracto de levadura + 20 g triptona + 700 ml H₂O MilliQ. Se autoclava. Una vez enfriado se añaden 100 ml KPi 1M pH 6.0, 100 ml YNB 10X, 100 ml GY 10X y 2 ml B 500X.
- BMMY: 10 g extracto de levadura + 20 g triptona + 700 ml H₂O MilliQ. Se autoclava. Una vez enfriado se añaden 100 ml KPi 1M pH 6.0, 100 ml YNB 10X, 100 ml M 10X y 2 ml B 500X.
- GY 10X: glicerol 10% estéril.
- M 10X: metanol 5% estéril.
- YNB 10X: 6.8 g YNB w/o (NH₄)₂SO₄ + 20 g (NH₄)₂SO₄ + 200 ml H₂O MilliQ, se calienta suavemente hasta su disolución y se filtra estérilmente.
- B 500X: 0.02% biotina.

3.2.2. Transformación y selección de clones:

Se sigue el protocolo *EasySelect™ Pichia Expression Kit version G* de Invitrogen. La cepa de *Pichia pastoris* usada en este trabajo es la GS115.

Para transformar de forma estable *Pichia pastoris*, se debe utilizar DNA lineal, de manera que una vez obtenida la MaxiPrep del constructo a transformar, éste se digiere con el enzima de restricción SacI que produce un único corte en el vector y no corta ninguno de nuestros insertos. Una vez digerido se transforma por el método del acetato de litio y se plaquea en placas de YPD suplementadas con 100 µg/ml de zeocina, un antibiótico específico para cultivo de levaduras para seleccionar las que han introducido el plásmido, ya que contiene una resistencia a este antibiótico. Estas placas se dejan en una estufa a 30 °C durante 2-3 días, para que las colonias alcancen un tamaño adecuado.

Para comprobar si dichas colonias poseen el constructo, se hace un tratamiento con litocasa y después una PCR con oligonucleótidos específicos del vector y otra PCR con oligonucleótidos internos de la proteína a expresar.

3.2.3. Expresión:

3.2.3.1 Pequeña escala:

Para optimizar los diferentes parámetros de la expresión de nuestras proteínas se realizan expresiones piloto que consisten en el crecimiento en un agitador a 30 °C, 225 rpm y O/N de 200 µl de un inóculo procedente de un cultivo líquido crecido O/N y guardado a 4 °C en 25 ml de medio BMGY con 100 µg/ml de zeocina hasta alcanzar una OD₆₀₀ entre 2 y 6. Entonces se centrifuga 5 minutos a 1500 g y se resuspende el precipitado de levaduras para que quede a una OD₆₀₀ de 1 en tampón BMMY de manera estéril. Se introduce en un erlenmeyer de 250 ml estéril y se deja creciendo en las mismas condiciones. Cada 24 horas se adiciona metanol para mantener la concentración en un 0.5%. Cada 12 horas se coge una alícuota de 1 ml, se mira en el microscopio óptico que no esté contaminada y se centrifuga a 1500 g durante 10 minutos. Se congela el precipitado a -20 °C para analizarlo posteriormente.

Una vez se tienen todos los tiempos se lisan las levaduras. Para ello se resuspenden los precipitados con 100 µl de tampón de lisis: 50 mM NaPi pH 7.4, 5% glicerol, 1 mM PMSF y 1 mM EDTA y se añade el mismo volumen de *glass beads* (Sigma, G9143-250G). Se hacen 8 ciclos de 30 segundos de agitación con *vortex* más 30 segundos en hielo. Se centrifuga durante 10 minutos a 13000 rpm y se guarda el sobrenadante en hielo. Se valora el sobrenadante por el método de BCA (apartado 4.2.2) antes de cargarlo en una electroforesis SDS-PAGE (apartado 4.5) que se teñirá con *Coomassie Brilliant Blue* o haremos un análisis por *Western blot*.

3.2.3.2 Media escala:

A partir de los resultados de las expresiones piloto se escogen los mejores clones de cada proteína así como los tiempos de inducción óptimos y se preparan los cultivos de *Pichia pastoris* con más volumen para obtener proteína en mayor cantidad.

A 1 erlenmeyer de 2 litros con 400 ml de medio BMGY se añaden 400 µl de zeocina y 200 µl de un cultivo O/N guardado en la nevera y se deja creciendo a 225 rpm y 30 °C hasta el día siguiente.

Al día siguiente se mira la OD₆₀₀ de una dilución 1/10, hasta que esté en torno a 0.4 (el cultivo tiene una OD₆₀₀ de 4). Se centrifuga de manera estéril el cultivo durante 10 minutos a 1500 g y temperatura ambiente. Se analizan 2 µl del cultivo en el microscopio óptico a 100 aumentos para ver que no haya contaminación. Se resuspende el precipitado en 100 ml de BMMY estéril.

Se añaden 175 ml de medio BMMY a cada uno de los 4 erlenmeyers de 1 litro autoclavados y 25 ml del precipitado resuspendido. Se pone en un agitador a 30 °C y 225 rpm.

Cada 24 horas se añade 1 ml de metanol puro estéril en cada erlenmeyer para mantener la inducción y se analizan 2 µl del cultivo en el microscopio óptico a 100 aumentos para ver que no haya contaminación.

A las 80 horas de estar en medio BMMY se mide la OD₆₀₀ final, que suele ser 16-20 y se centrifugan los cultivos durante 5 minutos a 1500 g y 4 °C. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el precipitado en 30 ml de Tris 20 mM pH 8, 0.5 mM EDTA. Se congela en N₂

líquido y se guarda a -80 °C hasta su uso.

3.3. Cultivos bacterianos.

3.3.1. Sobreexpresión de proteína en *E. coli*:

La Dra. N. Reig puso a punto las condiciones de expresión de SteT como se muestra en el apartado de Antecedentes de esta Tesis doctoral.

Una vez clonado y totalmente secuenciado el constructo con la proteína a sobreexpresar en la cepa *BL21DE3*, se pica una colonia individual de la placa en un tubo *Falcon* de 15 ml con 3 ml de LB y 100 µg/ml de ampicilina y se deja durante unas 6-10 horas a 37 °C y 250 rpm. Pasado este tiempo se añade 1 ml de este crecimiento en un erlenmeyer de 500 ml o 1 litro con 200 ml de LB salt (ver Apéndice A) y 100 µg/ml de ampicilina y se deja O/N a 37 °C y 250 rpm.

Al día siguiente se añaden 16 ml del crecimiento O/N a cada uno de los 8 erlenmeyers de 2 litros con 800 ml de LB salt y 50 µg/ml de ampicilina (al fermentador de 10 litros se añaden 200 ml de crecimiento O/N y 50 µg/ml de ampicilina y al fermentador de 50 litros se añade 1 litro de crecimiento O/N y 50 µg/ml de ampicilina) y se deja crecer a 30 °C y 250 rpm hasta conseguir una $OD_{600} \sim 5$ (aproximadamente tarda 3-3.5 horas). En este momento se añade 0.5 mM de IPTG y se vuelve a dejar a 30 °C y 250 rpm durante 3 horas. Pasado este tiempo se centrifuga 10 minutos a 10000 g y 4 °C, se descarta el sobrenadante y se resuspende el precipitado en el tampón de lisis: 20 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA pH 8.0 antes de congelarlo a -20 °C.

4. Técnicas de obtención, manipulación y detección de proteínas de membrana:

En esta Tesis doctoral se ha trabajado exclusivamente con proteínas de membrana, las cuales por sus características de hidrofobicidad necesitan condiciones especiales para mantenerse solubles en un entorno acuoso.

4.1. Obtención de membranas totales de cultivos de *Pichia pastoris* o *E. coli*:

Este método se ha utilizado para la obtención de muestras de proteína a partir de cultivos de *Pichia pastoris* o *E. coli* para purificarlas, analizarlas por *Coomassie Brilliant Blue* y por *Western blot* y reconstituirlas en PLs para realizar ensayos de transporte. Dado que nuestro objeto de estudio han sido proteínas integrales de membrana, una de las estrategias que hemos usado para enriquecer las preparaciones en las proteínas de interés ha sido realizar lavados para eliminar aquellas proteínas de membrana que no son integrales.

Materiales y reactivos:

- *French Press*.
- Tubos Beckman de 30 ml.
- Tubos Beckman de 80 ml para ultracentrifuga.
- Jeringa con aguja de 10 cm de longitud.
- Jeringuilla con aguja de 20 G.
- Homogeneizador de vidrio conectado a un politrón.
- Precipitado de células correspondiente a varios litros de cultivo de *E. coli* resuspendido en tampón de lisis.
- Tampón de lisis (TL): 20 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA, pH 8.0.
- Tampón de lavado (TW): 20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 8.0.
- Tampón de resuspensión (TR): 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8.0.

Procedimiento:

Se descongela rápidamente el precipitado de células correspondiente a varios litros de cultivo de *Pichia pastoris* o *E. coli* resuspendido en TL y se mantiene en hielo. Se lisan las células en la *French Press*: 3 pasadas a 20000 psi manteniendo en todo momento la muestra en hielo. Se centrifugan las células rotas en tubos Beckman de 30 ml durante 10 minutos a 10000 g y 4 °C. El precipitado obtenido corresponde a restos grandes de células, o células que no se han roto. Podemos resuspenderlo en tampón TL y guardarlo a -20 °C para analizarlo. También podemos separar una pequeña fracción del sobrenadante (que llamamos SN1), para testarlo al final del proceso. Se realiza una ultracentrifugación del SN1. Para eso se ha de traspasar a un tubo Beckman de ultracentrifuga de 80 ml y equilibrar muy bien los tubos en una balanza de precisión. Se centrifuga el SN1 durante 1 hora a 4 °C y 100000 g, que equivale a 42000 rpm en un rotor T875 de ultracentrifugación de ángulo fijo. Como resultado de la ultracentrifugación, se obtienen un sobrenadante y un precipitado. La fracción de membranas totales corresponde a esta última, y se resuspenden en 30 ml de TL con una jeringa con una aguja de 10 cm de longitud antes de homogeneizarlo durante 1.5 minutos con un homogeneizador de vidrio conectado a un politrón. Se repite la ultracentrifugación y la resuspensión se hace ahora con el tampón TW. Se repite la ultracentrifugación y la resuspensión se realiza con un volumen de 2-3 ml de tampón TR y con la ayuda de una jeringuilla con una aguja de 20 G. Se congelan en N₂ líquido pequeñas alícuotas (200-500 µl) y se guardan a -80 °C hasta su uso.

4.2. Determinación de la concentración de proteínas.

Existen distintos métodos para la valoración de la concentración de proteínas. En esta Tesis doctoral se han utilizado tres de ellos: el método de Bradford y el método de BCA para proteínas en solución y el método de Schaffer weissman para proteínas contenidas en PLs. La elección entre Bradford y BCA depende de la presencia de detergentes y otros compuestos en

la muestra, en cuyo caso se suele recomendar el uso del método de BCA para evitar interferencias en la lectura de la absorbancia ya que es más tolerante con determinados detergentes y concentraciones.

4.2.1. Método de Bradford:

El método se basa en el cambio del pico de absorbancia en una solución ácida de *Coomassie Brilliant Blue G-250* cuando se une a proteínas. El cambio del máximo de absorbancia es de 465 a 595 nm. No se aconseja para muestras que contengan concentraciones significativas de detergentes ya que pueden interferir en la lectura de la absorbancia.

Materiales y reactivos:

- Solución comercial *BioRad Protein Assay* (Coomassie Brilliant Blue, ácido fosfórico y metanol) diluida 1/5 con H₂O MilliQ (BioRad, 500,0006).
- Solución de γ -globulinas bovinas (1mg/ml) en tampón fosfato (Na₂HPO₄ 50 mM, NaH₂PO₄ 50 mM) pH 7.4. Se conserva a -20 °C.
- Cubetas de plástico para espectrofotómetro de 1.5 ml de capacidad (aunque también puede hacerse en placas de 96 pocillos para un lector de ELISA).

Procedimiento:

Se prepara la cantidad necesaria de reactivo Bradford diluido teniendo en cuenta que se añade 1 ml por cubeta y que todas las muestras se hacen por duplicado (incluyendo la curva patrón). La curva patrón comprende de 0 a 20 μ g de γ -globulinas. En las cubetas se depositan de 2 a 10 μ l de las muestras. Se agitan las cubetas por inversión evitando siempre la formación de espuma y se mide la absorbancia a 595 nm. Cuando las proteínas están demasiado concentradas es necesario hacer diluciones en H₂O MilliQ.

4.2.2. Método de BCA:

En el caso que la muestra de proteína en solución contenga detergentes se utiliza el método de BCA, de la casa comercial Pierce (*Pierce BCA Protein Assay Reagent 23225*). Se basa en la reacción de Biuret. Las proteínas reaccionan con el cobre en la forma Cu²⁺, formando Cu¹⁺ en medio alcalino que reacciona con el reactivo BCA y forma un compuesto de color púrpura. La lectura de la absorbancia se hace a 562 nm y se utiliza una solución de albúmina 2 mg/ml para hacer la curva-patrón.

Materiales y reactivos:

- Pierce BCA Protein Assay Reagent (23225, Pierce)
- Albúmina 2 mg/ml (Pierce, 23225)
- Placas de plástico de 96 pocillos
- Lector de ELISA (*Biowhittaker Microplate Reader 2001*).

Procedimiento:

El reactivo que contiene el Cu^{2+} se diluye 1/50 con la solución de dilución y se añaden 200 μl de esta solución por cada 10 o 20 μl de muestra, en el caso de utilizar placas de 96 pocillos. Se debe tener en cuenta que las muestras se hacen por triplicado, incluida la curva patrón que comprende de 0 a 20 μg de proteína. Como indican las instrucciones del *kit*, se incubaba durante 30 minutos a 37 °C y se procede a la lectura de la absorbancia.

4.2.3. Método de Schaffer Weissman:

Este método permite la valoración de proteínas en muestras que además de detergentes tienen lípidos, como son los PLs. Se basa en la disolución de los PLs por la acción del SDS, la precipitación de las proteínas con el TCA y su tinción con Negro Amido. La lectura de la absorbancia se hace a 630 nm.

Materiales y reactivos:

- Albúmina 2 mg/ml (Pierce, 23225).
- Tampón 1: Tris-HCl 1M pH 7.5, 10% SDS.
- TCA 60% y 6%.
- Filtros Sartorius de nitrato de celulosa con poros de 0,45 μm de diámetro (Sartorius, 11306-25-N).
- Placas de Petri.
- Negro Amido al 0.1% disuelto en metanol:ácido acético:agua, 45:10:45 (en volumen).
- Tampón 2: metanol:ácido acético:agua, 90:2:8 (en volumen).
- Tampón 3: 25 mM NaOH, 0.05 mM EDTA pH 8, 50% etanol.
- Cubetas de plástico para espectrofotómetro de 1.5 ml de capacidad.

Procedimiento:

Se prepara en *ependorfs* una recta patrón de 0 a 20 μg de albúmina (típicamente usamos 0, 1, 2, 5, 10, 15 y 20 μg) y se ajusta el volumen a 270 μl con H_2O MilliQ. Se cogen 20 μl de cada uno de los PLs a valorar (y de los lípidos totales de *E. coli* porque contienen proteína que se restará al valor obtenido a los PLs) por duplicado y se ajusta el volumen como en el patrón de albúmina.

La valoración se hace de 10 en 10 puntos. Se añaden 30 μl del tampón 1 a esos 10 *ependorfs*, se agita con *vortex* y se deja 10 minutos a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo cada minuto se añaden 60 μl de TCA 60% a un *ependorf* y se agita con *vortex*. Al pasar 20 minutos de la adición, se recoge todo el contenido del *ependorf* con una pipeta y se deja ir en un filtro colocado en el sistema de filtración, gota a gota, en la parte central. Se lava el *ependorf* con 300 μl de TCA 6%, se recoge con la misma pipeta y se pasa por el filtro. Se lava el filtro 2 veces con 2 ml de TCA 6%. Se retira el filtro del sistema de filtración y se coloca en una placa de Petri con unas gotas de agua para que no se seque.

Se tiñen los filtros en una placa de Petri durante 3 minutos en la solución de Negro

Amido. Se lavan en otra placa de Petri durante 30 segundos con H₂O MilliQ. Se pasan a otra placa de Petri con tampón 2 durante 1 minuto. Se repiten los dos últimos pasos 2 veces más y finalmente se dejan en la placa de Petri con H₂O MilliQ durante 2 minutos antes de ponerlos a secar en una bandeja con papel.

La proteína aparece de forma visible como redondas de color azul, que se recortan y se introducen en *ependorfs* a los que se añade 1 ml del tampón 3. Se deja eluir 1 hora a temperatura ambiente con agitación ocasional antes de traspasarlo a las cubetas. Se mide la absorbancia a 630 nm antes de 2 horas.

4.3 Purificación de proteínas de membrana con cola de histidinas.

Se ha utilizado un procedimiento en discontinuo usando una resina de níquel: *Ni-NTA Agarose* (Qiagen) para purificar las proteínas sobreexpresadas con una cola de 6 histidinas situada en la región C-terminal de la proteína. Esta resina de agarosa de ácido níquel-nitrilotriacético posee iones níquel inmovilizados en su superficie capaces de interaccionar fuertemente con estos residuos de histidinas. Este método permite la purificación de proteínas expresadas en diferentes sistemas celulares en condiciones tanto nativas como desnaturalizantes. Las condiciones de purificación fueron establecidas por la Dra. N. Reig como se explica en el apartado de Antecedentes de esta Tesis doctoral.

Materiales y reactivos:

- Ni-NTA Agarose (Qiagen, 1018244).
- Membranas totales obtenidas como explica el apartado 4.1.
- Tampón de solubilización (TS): 20 mM Tris-HCl pH 8, 20% glicerol, 50 mM NaCl, 0.5% DDM.
- Tampón de lavado (TL): 20 mM Tris-HCl pH 8, 20% glicerol, 200 mM NaCl, 0.05% DDM, 10 mM Imidazol.
- Tampón de elución (TE): tampón de lavado suplementado con 500 mM Imidazol.
- Tampón de centrifugación (TC): 20 mM Tris-HCl pH 8, 20% glicerol, 200 mM NaCl, 0.05% DDM.
- Tubos Beckman para ultracentrifuga de 8 ml.
- Aguja de 20 G.
- Columna de purificación *Poly-Prep Chromatography Columns* 0.8 x 4 cm (Biorad).
- Amicon Ultra de 4 y de 15 ml con membrana de celulosa regenerada y un poro de 10 kDa (Millipore, UFC801096 y UFC901024).

Procedimiento:

Antes de la purificación, la resina se lava 3 veces con 10 ml H₂O MilliQ que se descartan tras centrifugar 1 minuto a ~160 g y después 3 veces más con TL. Finalmente se resuspende con 5 ml de TL y se deja equilibrar en un orbital durante 1 hora aproximadamente a 4 °C.

La solubilización se realiza descongelando rápidamente las membranas totales con la proteína a purificar sobreexpresada en TS a una concentración de proteína de 2 mg/ml de y se deja 1 hora a 4 °C en un agitador orbital. Pasado este tiempo se ultracentrifuga en los tubos Beckman durante 1 hora a 100000 g y 4 °C. Se resuspende el precipitado con H₂O MilliQ en el mismo volumen de la solubilización con la ayuda de una aguja de 20 G y se guardan unos 50 µl junto con 50 µl del sobrenadante para su posterior valoración y realización de un *Coomassie Brilliant Blue* y/o un *Western blot*. El sobrenadante se incuba con la resina equilibrada (anteriormente se ha centrifugado la resina para descartar el sobrenadante como en los lavados) durante al menos 2 horas. Pasado este tiempo se centrifuga la resina durante 1 minuto a ~160 g y 4 °C y se guardan 50 µl de la fracción no unida a la columna. Se resuspende la resina en 10 ml de TL y se vuelve a centrifugar. Se repite el lavado 2 veces más y finalmente se resuspende en 5 ml por cada columna que se quiera preparar (en cada columna se añade como máximo 1.5 ml de resina inicial) y se ponen estos 5 ml a empaquetarse en una columna. Una vez empaquetada la resina y sin dejar que se seque, se llena la columna con el TL (~15 ml) y se deja que pase a través de la resina. Se repite el lavado una vez más antes de añadir 10 ml de TE. Se recoge la elución y se concentra en un Amicon Ultra a 3220 g y 4 °C hasta obtener un volumen inferior a 1 ml. Para reducir la cantidad de imidazol se añaden 10 ml del TC y se vuelve a concentrar hasta el volumen de interés. Se valora la concentración de esta proteína por el método de BCA (ver apartado 4.2.2) y se analiza su pureza por *Coomassie Brilliant Blue*.

4.4. Determinación de la concentración de detergente.

Para la valoración de detergentes se utiliza un protocolo de valoración de azúcares, ya que el detergente utilizado en esta Tesis doctoral es DDM, que tiene como base un azúcar, de hecho es un maltósido por lo que hay que tener en cuenta que cada molécula de DDM se descompondrá en dos moléculas de azúcares. Este protocolo es una adaptación realizada por el autor de esta Tesis doctoral del método descrito en el artículo Urbani et al., 2005. Este método se basa en la reacción colorimétrica del azúcar del detergente con el fenol y el ácido sulfúrico. Más concretamente, mediante reacciones de condensación de derivados furfúricos, generados por la deshidratación de azúcares en ácido sulfúrico concentrado, con moléculas aromáticas como el fenol, se genera un cromógeno p-semiquinonoide. Esto permite una cuantificación precisa del detergente unido a proteínas de membrana midiendo la absorbancia a 490 nm.

Materiales y reactivos:

- DDM 10%.
- Ácido sulfúrico 95%.
- Fenol 5% en peso disuelto en H₂O MilliQ.
- Baño de agua a temperatura ambiente.

- Cubetas de plástico para espectrofotómetro de 1.5 ml de capacidad.

Procedimiento:

Se hace una recta patrón de DDM de 0 a 160 μg (típicamente 0, 4, 8, 12, 16, 20, 40, 80 y 160 μg). La linealidad se pierde a partir de 20 μg , pero visualmente podemos distinguir si una muestra está más cerca del patrón de 40, 80 o 160 μg para diluirla adecuadamente antes de volver a valorarla.

Se añaden 50 μl de muestra (ha de tener entre 2.5 y 10 μg de proteína) en un *eppendorf* de 2ml. Se añaden de manera que quede homogéneo sin necesidad de agitar con *vortex*, y en este orden, 250 μl de fenol 5% y 600 μl de ácido sulfúrico 95%, sin cerrar el *eppendorf* ya que la reacción es fuertemente exotérmica. Se observa la aparición de color, desde amarillo para las que contienen menos detergente, pasando por el naranja y el rojo hasta llegar al granate de las más concentradas. Se deja enfriar los *eppendorfs* durante 20 minutos en un baño a temperatura ambiente. Una vez enfriados se tapan los *eppendorfs* y se agitan con *vortex* antes de traspasar el contenido a las cubetas. Se mide la absorbancia a 490 nm.

4.5. Electroforesis SDS-PAGE.

La electroforesis de proteínas en un gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) es uno de los sistemas más comúnmente utilizados para separar proteínas en función de su masa molecular (Laemmli 1970). Previo a la electroforesis, se añade a la muestra de proteínas tampón de carga que contiene una cantidad de SDS suficiente para desnaturalizarlas y conferirles carga negativa. De esta manera, se mantiene constante su relación carga/masa. Cuando estas muestras se someten a un campo eléctrico establecido sobre un gel que contiene una malla del polímero acrilamida-bisacrilamida, las proteínas se resuelven en función de su tamaño. En este tipo de electroforesis se preparan dos geles de diferente pH y concentración de acrilamida: el gel concentrador y el gel separador. En el gel concentrador las proteínas se mueven muy rápido debido al gran tamaño de poro facilitando así que todas entren a la vez en el gel separador. El porcentaje de acrilamida del gel separador varía en función de la masa molecular de las proteínas que nos interesa separar. Para el caso de las LSHATs, que se encuentran alrededor de los 40-50 kDa, un gel del 10% de acrilamida permite que se separen bien.

En paralelo a las muestras, se corren estándares preteñidos de diferentes tamaños moleculares, lo que nos permite visualizar la separación de las proteínas y calcular aproximadamente su tamaño molecular.

En este trabajo se ha utilizado el sistema de electroforesis Mini-Protean (BioRad). Permite trabajar con volúmenes de muestra relativamente pequeños (20-100 μl) y manipular fácilmente los geles. Una vez hecha la electroforesis, las proteínas pueden visualizarse directamente mediante una tinción con *Coomassie Brilliant Blue* o con Nitrato de plata. Si se

quiere detectar una proteína concreta se hace un análisis por *Western blot*.

Materiales y reactivos:

- Tampón de carga Laemmli x3 (LSB x3): 4 ml Tris-HCl 1.5 M pH 6.8, 12 ml glicerol 87%, 1.2 g SDS, 1 mg Azul de Bromofenol y H₂O MilliQ hasta 20 ml. A partir de éste se hacen diluciones en H₂O MilliQ para obtener LSB x2 y LSB x1.
- Gel concentrador (*stacking gel*): Acrilamida 3.3%; bis-N,N'-metilenbisacrilamida 0.088%; Tris-HCl 0.125 M pH 6.8; SDS 0.1%; Persulfato amónico 0.1%, y TEMED 6.6 mM. Se preparan 3 ml.
- Gel separador (*running gel*): Acrilamida 6%, 7.5%, 10%, o 12% según el tamaño de proteínas que queremos separar; bis-N,N'-metilenbisacrilamida 0.27%; Tris-Base 0.375 M pH 8.8; SDS 0.1%; Persulfato amónico 0.1%, y TEMED 2.2mM. Se preparan 7.5 ml.
- Tampón de electroforesis x10: Tris-Base 250 mM, glicina 1.9 M y SDS 0.1%. Se guarda a temperatura ambiente.
- Marcadores de tamaño molecular preteñidos (*Broad range molecular weight markers*; BioRad, 161-0318).
- DTT 2 M en agua destilada. Se conserva a -20 °C y cuando se descongela se mantiene en hielo.
- MiniProtean (BioRad).
- Jeringas Hamilton de 25 y 50 µl.
- Isopropanol.

Procedimiento:

- **Polimerización de los geles:** Se montan los vidrios del sistema de electroforesis según las instrucciones del fabricante. Se prepara el gel separador teniendo en cuenta que el TEMED es catalizador de la reacción de polimerización por lo que se añade en último lugar. El gel se vierte entre los vidrios hasta que el volumen ocupe tres cuartas partes de éstos aproximadamente. Se deposita una ligera capa de isopropanol para nivelar el gel, eliminar burbujas de aire y evitar que el oxígeno inhiba la polimerización. Una vez polimerizado el gel (tarda 10-15 minutos aproximadamente), se decanta el isopropanol y se añade el gel separador. Inmediatamente se coloca el peine sumergiéndolo en el gel y se deja que polimerice a temperatura ambiente.

- **Preparación de las muestras:** En un *ependorf* se deposita la cantidad de proteínas deseada teniendo en cuenta el volumen máximo final que entra en el pocillo del gel concentrador: 80 µl en un peine de 10 pocillos de 1.5 mm de grosor y 40 µl en un peine de 15 pocillos de 1.5 mm de grosor, ambos para un sistema MiniProtean. Se añade LSB x2 necesario para que la concentración de LSB final sea x1. En el caso de que el volumen de la muestra sea muy grande se utiliza LSB x3. Cuando las muestras se tratan con DTT (para eliminar interacciones por puentes disulfuro), éste se añade sobre la muestra con LSB a una concentración final de 100 mM. A diferencia de cuando se trabaja con proteínas solubles, con

proteínas de membrana no se hierven las muestras para evitar su agregación, en su lugar una vez preparadas se dejan 5 minutos a temperatura ambiente antes de cargarlas.

- **Electroforesis:** Una vez preparadas las muestras y polimerizado el gel concentrador se sacan los peines, se colocan los geles en el sistema y se sumerge en una cubeta con tampón de electroforesis. Se cargan las muestras y los marcadores de peso molecular con una jeringa Hamilton. Se coloca la tapa con los electrodos y se conecta a una fuente de alimentación. Se fija el amperaje a 30 mA por gel y se corre durante 90 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se desmonta el sistema y se separan los vidrios. A continuación, el gel se puede teñir para visualizar las proteínas (ver apartado 4.5.1) o para un análisis de *Western blot* (ver apartado 4.5.2).

4.5.1. Métodos de tinción de geles:

La detección de proteínas en geles de poliacrilamida es esencial para la purificación y el análisis de proteínas. Todos los protocolos implican la fijación de la proteína al gel. En esta Tesis doctoral se han utilizado 2 métodos de tinción para monitorizar los pasos de purificación de SteT y sus mutantes por histidinas:

- Con Coomassie Brilliant Blue, que es un método barato, sencillo y capaz de detectar 0.1 µg de proteína.
- Con Nitrato de plata, que es un método más sensible que el anterior capaz de detectar 1-10 ng de proteína.

4.5.1.1 Tinción *Coomassie Brilliant Blue*:

Materiales y reactivos:

- Solución de tinción: ácido acético 7.5%, isopropanol 25%, Coomassie Brilliant Blue 0.05%.
- Solución desteñidora: ácido acético 7.5%, isopropanol 7.5%.

Procedimiento:

Se sumerge el gel en una cubeta con solución de tinción y se deja 1-2 horas a temperatura ambiente en agitación suave. Se hacen varios lavados a temperatura ambiente con la solución desteñidora, al principio cada 15 minutos y después cada varias horas hasta que se observan las proteínas fijadas teñidas en el gel. También se puede dejar directamente destiñendo O/N a temperatura ambiente. De manera optativa, se puede secar el gel en un secador durante 2 horas a 80 °C para conservarlo.

4.5.1.2 Tinción de plata:

Existe un *kit* comercial de la casa Pierce (*GelCode SilverSNAP Stain Kit*, 24602) para la tinción con plata de proteínas. Incluye cinco pasos: fijación del gel, lavado, tinción, revelado y parada. Los volúmenes necesarios para teñir un gel del sistema Miniprotean son la mitad de los indicados en el manual de instrucciones. Todos los recipientes que se utilizan han de ser de vidrio y el que contiene el gel debe utilizarse exclusivamente para este tipo de tinción.

4.5.2. Análisis por *Western blot*:

El análisis por *Western blot* permite la identificación de una proteína separada por electroforesis mediante un anticuerpo o sonda que la reconoce específicamente. Para realizar este reconocimiento es necesario transferir las proteínas desde el gel a una membrana de PVDF o nitrocelulosa, de forma que quedan inmovilizadas por adsorción. Una vez transferidas, esta membrana se incuba con el anticuerpo primario y su presencia se revela con un segundo anticuerpo conjugado a peroxidasa, o bien se incuba directamente con una sonda que ya está unida a peroxidasa. En ambos casos, la peroxidasa en presencia de sustrato genera luz.

4.5.2.1 Transferencia:

Cuando las proteínas separadas por electroforesis se quieren destinar a análisis por *Western blot* es necesario transferirlas a una membrana de PVDF o nitrocelulosa, de forma que quedan inmovilizadas por adsorción.

Materiales y reactivos:

- Tampón de transferencia pH 8.3: 25 mM Tris-base, 192 mM glicina, 20% metanol.
- Membrana PVDF (Inmobilon™-P; Millipore, IPVH00010).
- Papel Whatmann 3MM.
- Mini-Protean TransBlot Cell (BioRad).

Procedimiento:

Después de la electroforesis se descarta el gel concentrador y el gel separador se sumerge en el tampón de transferencia. Se corta un trozo de membrana del mismo tamaño que el gel, se activa en metanol durante 1 minuto y después se hidrata en agua destilada durante 1 minuto. Se cortan dos trozos de papel Whatmann del mismo tamaño. Se prepara una bandeja que contiene 500 ml de tampón de transferencia en la que se hace el montaje. Sobre la parte negra del sistema y en el siguiente orden se colocan una esponja, un papel Whatmann, el gel, la membrana, un papel Whatmann y una esponja. La membrana se puede marcar con lápiz o mediante un pequeño corte para controlar la orientación con respecto al gel y saber el orden de carga de las muestras. Es muy importante que no queden burbujas entre el gel y la membrana porque eso impide la transferencia de las proteínas. Finalmente, se cierra el sistema procurando que no se muevan los elementos que hay en el interior. Se coloca en una cubeta de transferencia orientado de manera que las proteínas migren del gel a la membrana al desplazarse hacia al polo positivo. El sistema dispone de un bloque de hielo que evita un calentamiento excesivo. Se llena la cubeta con tampón de transferencia y se aplica una corriente constante de 250 mA durante 1 hora o bien se deja O/N con agitación a un voltaje constante de 30 V. Una vez acabada la transferencia se desmonta el sistema procurando que la membrana no se seque.

4.5.2.2 Inmunodetección:

La inmunodetección permite la identificación mediante un anticuerpo o una sonda específica, de una proteína previamente separada por electroforesis y transferida a una membrana. El proceso consiste en el bloqueo de la membrana mediante la incubación en una solución rica en proteínas, la incubación con el anticuerpo primario y con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa HRP (*horse rabish peroxidase*) o la incubación con una sonda como la HisProbe-HRP (Pierce) que ya está unida a la peroxidasa HRP y la detección con el sistema ECL (*Enhanced Chimioluminiscence*) de la casa comercial Amersham.

Materiales y reactivos:

- Solución de bloqueo: depende del tipo de anticuerpo primario que se utiliza. En este trabajo se han utilizado: $\alpha b^{0,+}AT$ y αHis con leche desnatada al 5% en PBS y $\alpha Express$ con leche desnatada al 3% en TBS. Con la sonda HisProbe-HRP se utiliza leche desnatada al 3% en PBST (0.2% Tween 20).
- Solución de anticuerpo primario: generalmente se prepara en la solución de bloqueo diluida. En este trabajo se ha utilizado una dilución 1/1000 de $\alpha b^{0,+}AT$ en leche 1% en PBS, una dilución 1/5000 de αHis en leche 5% en PBS, una dilución 1/5000 de $\alpha Express$ en leche 1% en TBST (0.05% Tween 20) o una dilución 1/5000 de la sonda HisProbe-HRP en TBST (0.2% Tween 20).
- Tampón de lavado: $\alpha b^{0,+}AT$ con Tween 20 al 0.3% en PBS, αHis con Tween 20 al 0.05% en PBS, $\alpha Express$ con Tween 20 al 0.05% en TBS y la sonda HisProbe con Tween 20 al 0.2% en TBS.
- Solución de anticuerpo secundario: 1:25000 en la misma solución que se diluye el anticuerpo primario, excepto αHis en leche 5% en PBST (0.05% Tween 20). Se han utilizado anticuerpos generados en burro acoplados a HRP, que reconoce anticuerpos policlonales de conejo (*HRP-conjugated donkey anti-rabbit solution*, Sigma) para $\alpha b^{0,+}AT$ o que reconoce anticuerpos policlonales de conejo (*HRP-conjugated donkey anti-mouse solution*, Sigma) para αHis y $\alpha Express$.
- Reactivo ECL: este reactivo permite la detección de anticuerpos y sondas conjugados con HRP debido a que la peroxidasa cataliza una reacción química que produce luz. (Amersham, RPN 2209).
- Películas para autorradiografía.
- Soluciones de revelado y fijación (Kodak)

Procedimiento:

Para evitar al máximo la adsorción de anticuerpos en la membrana, ésta se preincuba con una solución rica en proteínas, la solución de bloqueo. Las incubaciones posteriores con los anticuerpos primario y secundario o bien con la sonda específica también se hacen en soluciones que contienen proteínas. El bloqueo se lleva a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente con la solución adecuada para cada anticuerpo primario o la sonda HisProbe-HRP.

Finalizado este tiempo se incuba con 5 ml de solución de anticuerpo primario o HisProbe-HRP (membrana de 9x5 cm) durante 16 horas a 4 °C (anticuerpos primarios) o 1 hora a temperatura ambiente (HisProbe-HRP). Para eliminar el exceso de anticuerpo o sonda y las interacciones inespecíficas de éste, se hacen 3 lavados de la membrana con tampón de lavado durante 10 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Una vez lavada, la membrana, si se incubó con el anticuerpo primario se incuba con la solución de anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente y se hacen 3 lavados de 10 minutos a temperatura ambiente, y si se incubó con la sonda se pasa directamente al siguiente paso. Se eliminan los restos de tampón de lavado con PBS, se cubre la membrana con un plástico para evitar que se seque y se añaden 500 µl del reactivo ECL sobre la cara de la membrana que contiene las proteínas. Después de 1 minuto se limpian los restos de reactivo y las proteínas se detectan con una exposición a una película fotográfica.

4.6. Entrecruzamiento químico.

Una técnica complementaria al BN-PAGE o a la cromatografía de exclusión en gel para determinar el estado oligomérico de proteínas de membrana es el entrecruzamiento químico. Para aumentar las posibilidades de éxito, se suelen probar diferentes entrecruzadores, variando el grupo con el que interaccionan (amino o tiol), la longitud del brazo, el pH de la reacción, la temperatura y el tiempo.

Siguiendo los consejos de la casa comercial Pierce y la bibliografía existente (Xie et al., 2000; Ermolova et al., 2003; Suda et al., 2004) decidimos probar los reactivos de aminos (DSP, DST, DMS) y el de sulfhidrilos (BM(PEO)₄), cuyos brazos espaciadores poseen diferentes longitudes (12.0, 6.3, 11.0 y 17.8 Å respectivamente).

Materiales y reactivos:

- Membranas totales obtenidas como explica el apartado 4.1.
- DSP: se prepara fresco a 100 mM en DMSO.
- DST: se prepara fresco a 25 mM en DMSO
- DMS: se prepara fresco a 100 mM en H₂O MilliQ.
- BM(PEO)₄: se prepara fresco a 10 mM en H₂O MilliQ.
- Tampones de entrecruzamiento: 20 mM MES, 300 mM NaCl, pH 6.5; 20 mM Hepes-NaOH pH 8-9, 150 mM NaCl; PBS pH 7.4, 150 mM NaCl;
- Tampón de parada: 1 M Tris-HCl pH 7.5.

Procedimiento:

Las membranas totales se diluyen a 2 mg/ml con la adición del tampón de entrecruzamiento correspondiente (con el pH de interés) y del entrecruzador a las concentraciones que se quieran estudiar (0, 25, 83, 100, 250, 500, 1000, 2000, 5000 y 10000 µM). Las diferentes muestras se dejan en hielo o a temperatura ambiente según convenga.

Inmediatamente se coge una alícuota (que será el tiempo 0), se pone en hielo y se le añade el mismo volumen de tampón de parada para parar la reacción. Igualmente se van sacando alícuotas a los diferentes tiempos de interés (10, 30 90 minutos y O/N y se van parando como el tiempo 0.

Una vez parados todos los tiempos (se deja al menos 10 minutos), se añade la misma cantidad de LSB 2x y según convenga se añade o no DTT antes de cargarlo en un gel de SDS-PAGE, que será transferido y revelado con la sonda HisProbe como se indica en el apartado 4.5.

5. Reconstitución de proteínas de membrana.

La mayoría de proteínas de membrana sólo tienen actividad si se encuentran en un entorno adecuado de fosfolípidos y orientadas correctamente en una membrana. La reconstitución es el proceso por el cual una proteína de membrana solubilizada es reincorporada en una bicapa de fosfolípidos artificial o natural. Este es un método muy utilizado para el estudio de la función de este tipo de proteínas una vez purificadas, ya que para ello primero hace falta extraerlas de su entorno solubilizándolas con detergentes, y una vez purificadas, hay que retornarlas a un entorno similar al original para conseguir que mantengan su actividad. La mayoría de procesos de reconstitución constan de tres fases:

- 1) Solubilización de la proteína de membrana con un detergente adecuado y purificación con los pasos que sean necesarios, si es el caso.
- 2) Incorporación de la proteína solubilizada en vesículas de lípidos preformadas y desestabilizadas por el detergente.
- 3) Eliminación del detergente para conseguir una preparación de PLs que contienen la proteína incorporada en una bicapa lipídica.

5.1. Reconstitución directa de proteínas no purificadas.

La reconstitución ha sido un método clásico de estudio de proteínas de membrana como receptores y transportadores. En nuestro caso, hemos utilizado este método para estudiar la función de transportadores de aminoácidos una vez incorporados en los PLs resultantes del proceso. Basándose en el protocolo de reconstitución directa descrito por el grupo del Dr. B. Kanner, de Jerusalén (Radian et al., 1985), que permite una reconstitución fácil, rápida y eficiente, de todas las proteínas de la membrana de las células transfectadas previamente, la Dra. N. Reig adaptó esta metodología a la reconstitución de b^{0,+}AT en nuestro laboratorio. Pequeñas modificaciones del protocolo desarrollado por la Dra. N. Reig en su Tesis doctoral fueron suficientes para conseguir la reconstitución directa de xCT y de los concatenámeros rBAT-b^{0,+}AT y 4F2hc-xCT. Este método consta de la solubilización de las proteínas de membrana con un detergente no muy agresivo, como es el colato de sodio, en presencia de fosfolípidos de cerebro y asolectina, para tratar de evitar al máximo los procesos

de inactivación que suelen estar relacionados con el proceso de solubilización de las proteínas con detergentes. Una vez conseguida la solubilización e incorporación de las proteínas en las vesículas, se elimina el detergente utilizando columnas cromatográficas de gel filtración, y los PLs resultantes ya están listos para realizar ensayos de transporte.

Los protocolos de preparación de los reactivos necesarios se encuentran explicados en la Tesis doctoral de la Dra. N. Reig, ya que tanto el detergente como los lípidos han de estar purificados al máximo para evitar problemas relacionados con impurezas u oxidación de los componentes, ya que podrían afectar a la estructura de las vesículas y de las proteínas, afectando también su función.

Materiales y reactivos:

- Solución reserva de asolectina.
- Solución reserva de lípidos de cerebro.
- Tampón de diálisis (TD) (corresponde al medio interno de las vesículas): 0.5 mM EDTA, 1 mM MgSO₄, 5 mM TrisSO₄ pH 7.4, 1% glicerol, 120 mM KPi (tampón fosfato) pH 7.4 y 2 mM L-leucina (b⁰⁺AT) o 2mM L-glutamato (xCT) cuando convenga. Se prepara a partir de una solución reserva llamada A+G 50x, que contiene todos los componentes excepto el tampón fosfato (ver Apéndice A).
- Solución reserva 50 mM de L-leucina (b⁰⁺AT) o L-glutamato (xCT).
- Sephadex G50 (Sigma).
- Células transfectadas en placas de 15 cm de diámetro.
- PBS.
- NaCl 5 M.
- Colato de sodio (NaCho) al 20%.
- Tubos *pyrex* de borosilicato de 16x100 mm y de 13x100 mm (Corning, 99445-16 y 99445-13).
- Jeringuillas de 1 ml y algodón para preparar las columnas.
- Tubo *Corning* de 15 ml.
- Sonicador de baño *Ultrasonic cleaner* BRANSON 200 de 50-60 Hz.

Procedimiento:

El día anterior al experimento de reconstitución se prepara el TD que se necesitará para el experimento, teniendo en cuenta si se han de hacer dos diferentes (con o sin aminoácido). También se calcula la cantidad de Sephadex G50 que se necesita para hacer las columnas de cada tipo y se pone a incubar con el TD correspondiente O/N a 4 °C. Se pesa 1 g de Sephadex por cada 15 ml de TD, y se calcula que aproximadamente esta cantidad sirve para hacer unas 6 columnas. También se pueden preparar las columnas necesarias utilizando una jeringuilla de 1 ml sin aguja con una bolita de algodón en la parte de abajo para taponar. Las jeringuillas se ponen en tubos de borosilicato de 13x100 mm convenientemente rotulados, pero no las llenamos de Sephadex hasta el día siguiente.

El día del experimento, lo primero que se hace es preparar las vesículas de cada tipo.

Se calcula la cantidad de asolectina y lípidos de cerebro que se utilizará teniendo en cuenta que se necesitan 112 μl de liposomas por columna. Así, para preparar 120 μl , se pipetea 12 μl de asolectina (1/10 del volumen final) y 36 μl de lípidos de cerebro (3 volúmenes de asolectina) en un tubo de borosilicato de 16x100 mm, siempre bajo una ligera corriente de N_2 gas cada vez que se abren y cierran las botellas de las reservas de lípidos. Si se quisieran preparar dos tipos de liposomas (con o sin aminoácido), se pipetearían las cantidades necesarias de lípidos en dos tubos de borosilicato. Se secan los disolventes con una corriente de N_2 gas de manera que quede una película de lípidos secos por las paredes del tubo. Se resuspenden los lípidos con 120 μl del TD correspondiente y se mantienen los tubos en hielo y tapados con *parafilm*. Se sonicar los tubos en un sonicador de baño haciendo 4 pulsos de 30 segundos, y agitando con *vortex* entre ellos. Una vez sonicados queda una suspensión lechosa que se guarda en hielo y tapada con *parafilm*.

A continuación se llenan las columnas con el Sephadex equilibrado en el TD de cada tipo. Se comprueba que queden todas las jeringuillas llenas de Sephadex. Una vez llenas, se guardan las columnas en la cámara fría.

Se sacan las placas de células HeLa transfectadas (ver apartado 3.1.3) y se lavan las células dos veces con 20 ml de PBS frío, sobre una superficie fría. Se rascan las placas con 1 ml de PBS frío y se recogen las células en un tubo *corning* que se centrifuga a 4 °C para hacerlas sedimentar. Se resuspenden las células en el mínimo volumen de PBS, de manera que quede una elevada concentración de proteínas (alrededor de 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Se mantienen en hielo.

Se prepara la mezcla de liposomas y NaCl. Para cada columna se preparan 175 μl de mezcla, que contiene 112 μl de liposomas, 46 μl de H_2O bidestilada y 17 μl de NaCl 5 M. Si queremos preparar una mezcla con 2 mM aminoácido (para los liposomas que han de tener aminoácido en el interior), esta mezcla contendrá 112 μl de liposomas, 39 μl de H_2O bidestilada, 17 μl de NaCl 5 M y 7 μl de leucina 50 mM. En un *ependorf* se añaden 25 μl de la suspensión de células y 175 μl de la mezcla de liposomas y NaCl correspondiente preparada en el paso anterior. Se agita con *vortex* para asegurar que se homogeniza. El contenido de un *ependorf* será lo que se pase por una columna. Se preparan también liposomas controles que no tendrán proteína, sino que se preparan añadiendo 25 μl de PBS y 175 μl de cada mezcla de liposomas. Se tratarán estos liposomas controles igual que todos los otros que sí contienen proteína. Estas vesículas servirán como control negativo a la hora de valorar la concentración de proteína, ya que los lípidos solos dan señal con los métodos utilizados para valorarlos (método de BCA, ver apartado 4.2.2).

Se añaden 10 μl de NaCho 20% en cada *ependorf*. Se agitan con *vortex* y se dejan en hielo incubando durante 10 minutos. Durante la incubación, se centrifugan las columnas a 1500 g durante 2 minutos y medio a 4 °C. Después de la centrifugación, las columnas se cambian de tubo, para pasarlas a otro tubo limpio de borosilicato de 13x100 mm convenientemente rotulado indicando que tipo de liposomas se cargará. Después de los 10 minutos de incubación, se agita con *vortex* la mezcla de células (o PBS) con liposomas, se recoge todo el contenido del

eppendorf con una pipeta, y se añaden con cuidado sobre la columna adecuada (si los liposomas eran con aminoácido, la mezcla también y esta primera columna también). Hay que ponerlo justo sobre el Sephadex, intentando evitar que resbale por las paredes de la jeringuilla sin penetrar por la columna. Se centrifugan las columnas cargadas a 1500 g y 4 °C durante 2 minutos y medio. Se repite la centrifugación otra vez. El volumen que se recupera de una columna suele estar entre 100 y 200 μ l.

Se sacan las columnas vacías, se agitan con *vortex* los tubos con liposomas que han salido, y se añaden sobre la segunda columna (esta segunda columna en ningún caso tendrá aminoácido en el tampón de equilibrado). Las columnas y los liposomas que se obtienen siempre han de mantenerse en hielo. Los liposomas obtenidos de esta segunda columna ya se pueden utilizar para hacer el ensayo de transporte. Con los liposomas que se obtienen de una columna, aproximadamente se pueden hacer 10 puntos de transporte. Es recomendable no hacer el paso por la segunda columna hasta que todo esté preparado para realizar el ensayo de transporte inmediatamente, para minimizar las pérdidas de aminoácido que podrían tener los liposomas cargados al encontrarse en un medio donde no hay aminoácido.

5.2. Reconstitución de proteínas previamente purificadas.

La reconstitución ha sido un método clásico de estudio de proteínas de membrana como receptores y transportadores. En nuestro caso, hemos utilizado este método para estudiar la función de transportadores de aminoácidos una vez incorporados en los PLs previamente generados por nosotros mismos basándonos en artículos anteriores (Fang et al., 2000; Borgnia et al., 2001; Auer et al., 2001). Este método consta de la solubilización de las proteínas de membrana con DDM, su posterior purificación con una columna de afinidad de níquel y su reconstitución en PLs de lípidos totales de *E. coli* mediante la adición de OG. Una vez conseguida la solubilización e incorporación de las proteínas en las vesículas, se elimina el detergente mediante diálisis, y los PLs resultantes ya están listos para realizar ensayos de transporte o de fluorescencia.

Materiales y reactivos:

- Solución reserva de lípidos totales de *E. coli* en cloroformo a 50 mg/ml.
- Tampón de centración (TC): 20 mM Tris-HCl pH 8, 20% glicerol, 200 mM NaCl, 0.05% DDM.
- Tampón de hervido (TH): 200 mM NaHCO₃, 0.5 mM EDTA pH 8.
- Tampón de diálisis (TD) (corresponde al medio interno de las vesículas): 0.5 mM EDTA, 1 mM MgSO₄, 5 mM TrisSO₄ pH 7.4, 1% glicerol, 120 mM KPi (tampón fosfato) pH 7.4 y 4 mM L-serina cuando convenga. Se prepara a partir de una solución reserva llamada A+G 50x, que contiene todos los componentes excepto el tampón fosfato (ver Apéndice A).
- Solución reserva L-serina 50 mM.
- Membranas de diálisis *Dialysis Tubing Cellulose Membrana* 10 mm x 6 mm (Sigma).
- Proteína purificada como explica el apartado 4.3.

Material y métodos

- Tubos *pyrex* de borosilicato de 16x100 mm y de 13x100 mm (Corning, 99445-16 y 99445-13).
- EDTA 0.5 M pH 8.
- NaCl 5 M.
- DDM al 10%.
- OG al 10%.
- Varilla de vidrio.
- Sonicador de baño Ultrasonic cleaner BRANSON 200 de 50-60 Hz.
- Tubos Microfuge® de polialómero de 1.5 ml (Beckman, 357448).
- Filtros de policarbonato de 19 mm de diámetro y con poros de 400 nm de diámetro (Avestin).
- *Extruder* LiposoFast-Pneumatic Actuator (Avestin).

Procedimiento:

Una vez obtenida la proteína pura como se indica en el apartado 4.3, se valora por el método de BCA (apartado 4.2.2) y se diluye hasta una concentración de 0.4 mg/ml con el TC si se realizarán ensayos de transporte o de criofractura con ellos o a 1 mg/ml si se utilizarán en estudios de fluorescencia o de criofractura.

Las bolsas de diálisis se activan con tres ciclos de hervido. Para ello se calienta un vaso con 250 ml de TH dos minutos en el microondas y después se pone tapado en una placa calefactora hasta que arranca a hervir. Se cortan las membranas de diálisis necesarias para el experimento y se ponen en el vaso una vez está hirviendo durante 5 minutos. Una vez pasados se ponen las membranas en un vaso con H₂O destilada durante 5 minutos. Se repite el ciclo de hervido y H₂O destilada 2 veces más. Se guardan las membranas en un tubo *Falcon* de 50 ml con 20 ml del TD correspondiente para cada membrana.

Se pone en un tubo de borosilicato la cantidad necesaria de la reserva de lípidos totales de *E. coli* en cloroformo. Se elimina el cloroformo bajo una suave corriente de N₂ gas hasta formar una fina capa en el tubo y con la ayuda de una varilla de vidrio se acaba de secar hasta formar un polvo blanco. Estos lípidos se rehidratan en el TD correspondiente para obtener una concentración de 40 mg/ml. Después de 4 ciclos de 30 segundos de sonicación y agitación con *vortex* se extruyen a través de un filtro de policarbonato de 400 nm con la ayuda de un *extruder* para obtener vesículas unilamelares de un tamaño homogéneo.

Se mezclan el mismo volumen de proteína pura (a 0.4 mg/ml para ensayos de transporte o criofractura y a 1 mg/ml para estudios de fluorescencia o de criofractura) que de lípidos de *E. coli* a 40 mg/ml sonicados y extrudidos (relación 1:100 y 1:40 respectivamente) y después se añade un 1.25% de OG. Se agita con *vortex* y se introduce la mezcla en la bolsa de diálisis previamente activada para eliminar los detergentes. Se dializa O/N contra 100 volúmenes de TD a 4 °C con agitación suave. A la mañana siguiente se cambia el TD por otro fresco y se deja dializar hasta el día siguiente que se realizará el ensayo de transporte.

El día del transporte, criofractura o estudio de fluorescencia se saca el contenido de la bolsa de diálisis y se introduce en tubos de microultracentrifuga. Se centrifuga durante 1 hora a 4 °C y 100000 g. Se descarta el sobrenadante y se resuspenden los PLs en un tercio del

volumen inicial de TD sin aminoácido y en frío. Es recomendable empezar el transporte cuanto antes una vez resuspendidos ya que hay una caída exponencial de la actividad con el tiempo (ver figura 18 en Resultados).

Si se quiere realizar un tratamiento con DTT o con algún reactivo de cisteínas los PLs se resuspenden en 400 μ l de TD sin aminoácido (excepto en los experimentos de protección que se añade la concentración apropiada del aminoácido correspondiente) y a temperatura ambiente por cada tratamiento. Se añade el DTT o el reactivo de cisteínas correspondiente a la concentración adecuada y se deja 5 minutos a temperatura ambiente. Una vez pasado este tiempo se centrifuga como antes y se descarta el sobrenadante resuspendiendo los PLs en un tercio del volumen inicial que introducimos en la bolsa de diálisis de TD sin aminoácido y en frío.

6. Ensayos de transporte en proteoliposomas.

El análisis funcional de las proteínas objeto de nuestro estudio se ha realizado mediante ensayos de transporte en liposomas. Estos ensayos consisten en cuantificar la cantidad de aminoácido marcado radiactivamente que se acumula dentro de los liposomas después de la incubación de estos en el medio de transporte. Hemos realizado estos ensayos a partir de células HeLa transfectadas transitoriamente o a partir de proteína producida en *E. coli* que posteriormente hemos purificado, comparando entre sí las características de transporte de los diferentes constructos transfectados o de los diferentes grupos de transfección.

Los ensayos de transporte en liposomas se han hecho siguiendo la técnica de filtración rápida. Esta técnica consiste en incubar los liposomas con el medio de transporte durante el tiempo necesario. Una vez se para el transporte, los liposomas quedan adsorbidos en filtros de 0.45 μ m de diámetro de poro. En estos filtros se hacen los lavados y finalmente se cuenta la radioactividad retenida en el filtro, que corresponde al aminoácido marcado que ha entrado al interior de las vesículas. Cada filtro representa un punto de transporte. En cada experimento hemos realizado triplicados para cada condición de transporte, y hemos representado los valores como la media \pm EEM.

Materiales y reactivos:

- Medio de transporte: 150 mM cloruro de colina, 10 mM Tris-Hepes pH 7.4, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0.5 μ Ci L-[³H]-aminoácido por filtro (arginina para b⁰⁺AT, glutamato para xCT y serina para SteT) y L-aminoácido frío hasta conseguir la concentración de aminoácido deseada. En los transportes de b⁰⁺AT se añadió 2.8 μ M valinomicina (Sigma).
- Medio de parada: 150 mM cloruro de colina; 10 mM Tris-Hepes pH 7.4 y 5 mM L-aminoácido correspondiente. Se mantiene en hielo.
- Filtros Sartorius de nitrato de celulosa con poros de 0,45 μ m de diámetro (Sartorius, 11306-25-N). Los mantenemos en una placa de Petri llena de medio de parada.

- Baño a 37 °C en los casos de b^{0,+}AT y xCT. SteT se realiza a temperatura ambiente.
- Sistema de filtración con vacío.
- Líquido de centelleo EcoLite (ICN).

Procedimiento:

Se preparan los tubos de transporte con 180 µl de medio de transporte colocados en la base del tubo, sin tocar las paredes. En los casos de b^{0,+}AT y xCT tanto el medio de transporte como estos tubos se mantienen en el baño a 37 °C, mientras que para SteT se dejan en una gradilla a temperatura ambiente. Se pipetea 10 µl de vesículas (se agita con *vortex* primero para poder pipetear una suspensión homogénea), y se coloca la gota en la pared del tubo de transporte, sin que toque al medio. Se agita con *vortex* el tubo de transporte, y en este momento del primer contacto entre los liposomas y el medio, comienza a contar el tiempo de transporte. Se deja el tubo según corresponda en el baño a 37 °C o en la gradilla a temperatura ambiente durante el tiempo de transporte. Una vez finalizado el tiempo, se añaden 850 µl de medio de parada frío, se agita con *vortex*, y se recoge todo el contenido del tubo de transporte con una pipeta. Dejamos ir la solución en un filtro colocado en el sistema de filtración, gota a gota, en la parte central. Se lava el tubo de transporte con 1ml de tampón de parada, se recoge con la pipeta y se pasa por el filtro. Se lava el filtro 3 veces con 2 ml de tampón de parada. Se retira el filtro del sistema de filtración y se deja sobre una superficie para que se seque. Una vez seco, se introduce en un microvial y se añaden 3 ml de líquido de centelleo. Se rotula convenientemente el tapón del vial y ya se puede contar la radioactividad con un contador β.

Para hacer los puntos de tiempo 0, se preparan tubos de transporte con 180 µl de medio de transporte y 850 µl de medio de parada frío, y se dejan en hielo. Aquí se añaden 10 µl de vesículas, y después de agitar con *vortex*, se recogen con la pipeta y se pasan lentamente por un filtro preparado en el sistema de filtración. Se lava el filtro 3 veces con 2 ml de tampón de parada y se procesa como anteriormente. El valor de estos puntos nos da idea de la unión inespecífica del aminoácido radioactivo a los filtros, y se resta al valor de transporte obtenido en los diferentes tiempos.

Para hacer las cuentas totales de los medios de transporte, se lava los filtros 3 veces con 2 ml de medio de parada, se retiran del sistema de filtración y se añaden 10 µl de medio de transporte con una pipeta. Una vez secos, se procesan como los demás. Su contaje servirá para calcular la actividad específica del medio de transporte correspondiente.

Se valora la concentración de proteínas de los liposomas utilizando el método de Schaffer weissman (ver apartado 4.2.3).

Se calculan los valores de transporte teniendo en cuenta los valores del contaje de cada filtro (en cpm), su concentración de proteínas (en µg/µl), y la actividad específica del medio de transporte (en cpm/pmol del aminoácido transportado). Expresamos los valores de transporte como pmol de aminoácido transportado por µg de proteína y por tiempo.

7. Fluorescencia con proteínas purificadas.

Diferentes técnicas de espectroscopia de fluorescencia han sido ampliamente usadas en proteínas de membrana para intentar determinar sus cambios conformacionales. No hay que olvidar que la intensidad de fluorescencia que se obtiene en estos ensayos es una intensidad relativa, no absoluta, de manera que estos ensayos consisten en medir la cantidad de fluorescencia obtenida con la proteína en ausencia del sustrato y compararla a la que se obtiene en presencia del sustrato y ver si hay diferencias significativas. En el caso de proteínas de membrana se puede realizar en PLs (Jung et al., 1994a; Jung et al., 1994b; veenstra et al., 2004), aunque múltiples estudios han demostrado que la proteína purificada en solución con detergente es un método más sencillo e igual de eficaz para determinar la existencia de cambios conformacionales (Smirnova et al., 2003) o el lugar de unión del sustrato (Wu et al., 1994; Venkatesan et al., 1998).

7.1. Fluorescencia de Trp.

La fluorescencia de Trp ha sido ampliamente utilizada para describir cambios conformacionales debido a la sensibilidad de su emisión con respecto al entorno. Cuando algún Trp se encuentra en un TM cuyo entorno se altera debido a un cambio conformacional, se producen cambios en su espectro de emisión. Esto se ha observado en varias proteínas de membrana, entre ellas la LacY (Vázquez-Ibar et al., 2003).

Materiales y reactivos:

- PLs como los obtenidos para el transporte en el apartado 5.2 pero con relaciones proteína:lípido 1:100, 1:40 ó 1:7 para tener suficiente sensibilidad.
- Tampón de diálisis (TD) (corresponde al medio interno de las vesículas): 0.5 mM EDTA, 1 mM MgSO₄, 5 mM TrisSO₄ pH 7.4, 1% glicerol, 120 mM KPi (tampón fosfato) pH 7.4 y 4 mM L-serina cuando convenga. Se prepara a partir de una solución reserva llamada A+G 50x, que contiene todos los componentes excepto el tampón fosfato (ver Apéndice A).
- Solución reserva L-serina o L-arginina 50 mM.
- Cubeta de cuarzo suprasil® de 1 ml y un paso de luz de 10 mm (Hellma).
- H₂O MilliQ y etanol para lavar.
- Papel especial de fluorescencia.
- Núcleo de agitación magnética.
- Espectrofluorímetro SLM-Aminco 8100 termostatzado con un baño de agua.

Procedimiento:

Se configuran las rendijas del monocromador de excitación a 8 nm y el monocromador de emisión a 4 nm. Las longitudes de onda de excitación y emisión que se utilizan para la fluorescencia de Trp son: $\lambda_{\text{excitación}} = 295 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 325 \text{ nm}$ o entre 310-400 nm.

Se introducen 25-50 μ l de PLs (con una relación proteína:lípido de 1:100, 1:40 e incluso 1:10) en la cubeta y se añaden el tampón de diálisis y las soluciones de aminoácidos necesarios para completar 1 ml de volumen final. Se introduce la varilla de agitación magnética y se coloca la cubeta dentro del espectrofluorímetro. Se deja homogeneizar durante unos minutos, mientras se atempera a 25 °C, antes de realizar la lectura a 325 nm si es en tiempo real o entre 310-400 nm si es un espectro de emisión. Se repite el experimento sin sustrato, con sustrato y con un aminoácido que no es sustrato a diferentes concentraciones (0-30 mM final) con el fin de observar diferencias en los espectros.

7.2. Fluorescencia en tiempo real.

Consiste en introducir en la proteína un fluoróforo externo mediante la modificación covalente selectiva de un residuo de cisteína. Para realizar estos estudios de fluorescencia de cisteínas se suele generar una proteína *cys/less*, que consiste en eliminar todas las cisteínas endógenas, para posteriormente introducir cisteínas únicas en posiciones relevantes, de manera que al añadir un reactivo de cisteínas, se modifica la posición deseada a estudiar. Si el entorno de esa cisteína se modifica debido a un cambio conformacional de la proteína, probablemente resultará en un cambio en su espectro de emisión, ya sea en forma de desplazamiento del máximo, o en forma de variación de la intensidad de fluorescencia observada. Como control negativo se utiliza la proteína *cys/less*, ya que al no poseer ninguna cisteína no debería dar señal. Para la realización de estos ensayos existen múltiples reactivos con diferentes propiedades (van Iwaarden et al., 1992). De todos estos, en esta memoria hemos utilizado MIANS e IAEDANS que son reactivos muy sensibles al estado de solvatación acuosa y PM ya que también ha sido ampliamente usado.

Materiales y reactivos:

- Proteína purificada como explica el apartado 4.3, o PLs como los obtenidos para el transporte en el apartado 5.2 pero con relaciones proteína:lípido 1:100, 1:40 ó 1:10 para tener suficiente sensibilidad.
- Tampón de diálisis (TD) (corresponde al medio interno de las vesículas): 0.5 mM EDTA, 1 mM MgSO₄, 5 mM TrisSO₄ pH 7.4, 1% glicerol, 120 mM KPi (tampón fosfato) pH 7.4 y 4 mM L-serina cuando convenga. Se prepara a partir de una solución reserva llamada A+G 50x, que contiene todos los componentes excepto el tampón fosfato (ver Apéndice A).
- Solución reserva L-serina o L-arginina 50 mM.
- DDM 10%.
- Cubeta de cuarzo suprasil® de 1 ml y un paso de luz de 10 mm (Hellma).
- H₂O MilliQ y etanol para lavar.
- Papel especial de fluorescencia.
- Núcleo de agitación magnética.
- Espectrofluorímetro SLM-Aminco 8100 termostaticado con un baño de agua.

- Jeringa Hamilton.
- Reactivos de cisteínas: MIANS 1M en DMSO, PM 1M en metanol o IAEDANS 1M en DMF.

Procedimiento:

Se configuran las rendijas del monocromador de excitación a 8 nm y el monocromador de emisión a 4 nm. Las longitudes de onda de excitación y emisión dependen del reactivo de cisteínas utilizado en cada experimento, para el MIANS: $\lambda_{\text{excitación}} = 330 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 410 \text{ nm}$, para el PM: $\lambda_{\text{excitación}} = 338 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 375 \text{ nm}$ y para el IAEDANS: $\lambda_{\text{excitación}} = 336 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 490 \text{ nm}$.

Se introducen 0.01-0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteína purificada o 25-50 μl de PLs (con una relación proteína:lípido de 1:100, 1:40 e incluso 1:10) en la cubeta y se añaden el tampón de diálisis y las soluciones de aminoácidos necesarios para completar 1 ml de volumen final. En el caso de proteína en solución se añade DDM a una concentración final de 0.01%. Se introduce la varilla de agitación magnética y se coloca la cubeta dentro del espectrofluorímetro. Se deja homogeneizar durante unos minutos, mientras se atempera a 25 °C, antes de realizar la lectura a la λ adecuada. Una vez registrado el espectro durante 60-90 segundos se introduce con una jeringa Hamilton 5 μl de reactivo de cisteínas (queda 5 mM final) y se registra el cambio de intensidad de fluorescencia. Se repite el experimento sin sustrato, con sustrato y con un aminoácido que no es sustrato a diferentes concentraciones (0-30 mM final) con el fin de observar diferencias en los espectros.

7.3. Fluorescencia de dímeros de estado excitado (excímeros).

Una manera de determinar si dos residuos de una proteína lejanos en la secuencia aminoacídica están próximos espacialmente es mediante la formación de excímeros. El PM es capaz de unirse a los residuos de cisteína, de manera que si se genera un doble mutante de cisteína sobre la base de un *cys/ess*, el PM posiblemente se unirá a ambos. Si además estos dos residuos están próximos espacialmente, cuando se produzca la excitación, una molécula de PM excitada podría emitir la energía a la λ habitual (375 nm) o pasar la energía a la otra molécula de PM, que a su vez emitiría esta energía a una λ mayor (450-475 nm) y por tanto diferenciable de la primera.

Materiales y reactivos:

- Proteína purificada como explica el apartado 4.3.
- Tampón de diálisis (TD) (corresponde al medio interno de las vesículas): 0.5 mM EDTA, 1 mM MgSO_4 , 5 mM TrisSO_4 pH 7.4, 1% glicerol, 120 mM KPi (tampón fosfato) pH 7.4 y 4 mM L-serina cuando convenga. Se prepara a partir de una solución reserva llamada A+G 50x, que contiene todos los componentes excepto el tampón fosfato (ver Apéndice A).
- Tampón de Sephadex (TS): 20 mM Tris-HCl pH 8, 20% glicerol, 150 mM NaCl, 0.02% DDM.
- Solución reserva L-serina o L-arginina 50 mM.
- DDM 10%.

- Cubeta de cuarzo suprasil® de 1 ml y un paso de luz de 10 mm (Hellma).
- H₂O MilliQ y etanol para lavar.
- Papel especial de fluorescencia.
- Núcleo de agitación magnética.
- Espectrofluorímetro SLM-Aminco 8100 termostatzado con un baño de agua.
- Jeringa Hamilton.
- Reactivo de cisteína: PM 1M en metanol.

Procedimiento:

Para realizar estos experimentos, la proteína purificada (ver apartado 4.3 de Material y Métodos) se incubó con 2 mM TCEP y 100 mM NaCl durante 2 horas en un orbital a 4 °C. Después se adicionó 100 µM PM (exceso de 50 veces la proteína) y se dejó protegido de la luz en el orbital a 4 °C O/N. Al día siguiente, se adicionó 5 mM DTT para bloquear el exceso de PM y se cargó en una columna de Sephadex G50 equilibrada en TS. Se centrifugó las columnas cargadas con la muestra a 200 g durante 30 segundos a 4 °C. Se separó la elución y se adicionaron 200 µl de TS y se repitió la centrifugación. Se volvió a separar la elución y de nuevo se adicionaron 200 µl de TS y se repitió la centrifugación, guardando esta última elución. Se valoró cada elución por el método de BCA y se vio que las primeras eluciones no contenían proteína detectable, las segundas contenían entre 0.3 y 0.63 µg/µl y las terceras entre 0.14 y 0.37 µg/µl.

Se configuran las rendijas del monocromador de excitación a 8 nm y el monocromador de emisión a 4 nm. Se fija la longitud de onda de excitación para el PM: $\lambda_{\text{excitación}} = 338 \text{ nm}$ y se recoge con una $\lambda_{\text{emisión}}$ entre 360 y 550 nm.

Se introducen 0.01-0.08 µg/µl de proteína purificada en la cubeta y se añaden el tampón de diálisis, DDM a una concentración final de 0.01% y las soluciones de aminoácidos necesarios para completar 1 ml de volumen final. Se introduce la varilla de agitación magnética y se coloca la cubeta dentro del espectrofluorímetro. Se deja homogeneizar durante unos minutos, mientras se atempera a 25 °C, antes de realizar la lectura.

8. Criofractura en el TEM.

La técnica de criofractura en el TEM consiste en fracturar a baja temperatura y alto vacío un material que ha sido previamente criofijado (congelación ultrarrápida o vitrificación). Esta fractura es irregular y ocurre preferencialmente a través de líneas de debilidad como la bicapa lipídica de las membranas. Esto es debido a que dentro de la bicapa no hay agua, de manera que tras la criofijación no hay hielo, sino que se generan grietas. Estas grietas son los puntos débiles por los cuales se produce la fractura. La superficie fracturada se sombrea a baja temperatura y alto vacío con platino y carbono, obteniéndose una réplica de la superficie. Esta réplica se coloca en una rejilla y se observa mediante TEM.

La criofractura de PLs es una técnica que permite observar las membranas y por ende

permite estudiar los PLs (tipo, tamaño, homogeneidad) así como medir las partículas proteicas embebidas en sus membranas (Eskandari et al., 1998; Turk et al., 2000). Los estudios de criofractura en el TEM realizados en esta Tesis doctoral se realizaron como describe Lopez et al., 1998.

Materiales y reactivos:

- Liposomas obtenidos como en el apartado 5.2 con una relación proteína:lípido 1:100 ó 1:40.
- Rejillas de cobre de 200 mesh y de oro de 400 mesh.
- Propano líquido a -189 °C.
- Equipo de criofractura BALTEC BAF 060 (BALTEC, Liechtenstein).
- Microscopio electrónico Jeol 1010 (Jeol, Japan) equipado con cámara CCD Megaview III (Software Imaging System).
- Partículas de oro de 10 nm de diámetro (Chemicon).
- Escáner Artixkan 2500f.
- Programa AnalySIS (Software Imaging System).

Procedimiento:

La suspensión de liposomas obtenidos como en el apartado 5.2 se coloca entre dos rejillas de cobre usando una rejilla de oro de 400 mesh como espaciador haciendo un *sandwich*. Las muestras se congelan por inmersión en propano líquido a -189 °C en un equipo de fabricación casera en el laboratorio de la Dra. C. López (Serveis Científico-Tècnics de la U. de Barcelona-PCB), y se fracturan a -150 °C y 10^{-8} mbar en un equipo de criofractura. Las réplicas se obtienen por sombreado unidireccional a 45° con 2 nm de Pt/C y a 90° con 20 nm de C, y posteriormente se las hace flotar en H₂O destilada durante 5 minutos para eliminar los restos de muestra que quedan pegados a la réplica.

Las micrografías electrónicas se toman a 50000x en el microscopio electrónico a 80 kV. Estas micrografías se escanean y el diámetro de las partículas se mide en éstas con la ayuda del programa AnalySIS. El diámetro se obtiene midiendo el ancho de las partículas de borde a borde (*edge-to-edge*) en dirección perpendicular a la dirección de la sombra. La repetición de la medida de las partículas individuales muestra un error de ± 0.2 nm. La precisión de las medidas fue comprobada mediante la medición de partículas de oro de 10 nm de diámetro colocadas directamente en rejillas de cobre. El resultado de la medición de 125 partículas fue de 9.94 ± 0.04 nm. Todos los valores indicados corresponden a la media \pm EEM.

APÉNDICES

APÉNDICE A: SOLUCIONES DE USO GENERAL.**- AMPICILINA:**

Se disuelve en H₂O MilliQ a 100 mg/ml.

La solución se filtra con filtros de 0.22 µm de diámetro y se alícuota.

Se guarda a -20 °C. A temperaturas superiores a 55 °C la ampicilina se inactiva.

- LB:

Triptona 1%.

Extracto de levadura 0.5%.

NaCl 0.5%.

El pH se ajusta a 7.5 con NaOH y se autoclava.

En el caso de preparar **LB salt**, en vez de NaCl 0.5% se prepara con NaCl 1%.

En el caso de preparar **LB-agar**, se añade 1.5% agar (p/v) a la botella que contiene el LB justo antes de autoclararlo. Una vez autoclavado, se deja atemperar hasta 50 °C. En este momento se le añade el antibiótico que sea necesario. Se añade el medio sobre las placas y se dejan enfriar a temperatura ambiente. Se guardan a 4 °C en posición invertida.

- PBS:

NaCl 136 mM.

KCl 2.7 mM.

Na₂HPO₄ 8 mM.

KH₂PO₄ 1.5 mM.

El pH se ajusta a 7.4 con HCl.

Si se ha de utilizar para cultivos celulares, se ha de autoclarar la solución.

Se guarda a temperatura ambiente.

- TBS:

Tris base 0.05 M.

NaCl 0.15 M.

Se ajusta el pH a 7.5 con HCl.

Se guarda a temperatura ambiente.

- LSB:

Se prepara una solución madre de LSB x4:

Tris-HCl 0.4 M, pH 6.8.

Glicerol 80% (v/v).

SDS 8% (p/v).

Dilución 1/250 de una solución de azul de bromofenol al 10%.

A partir de éste, se obtienen las demás concentraciones por dilución.

Se guarda a temperatura ambiente.

- **TrisHepes 1M:**

Solución de Hepes 1M equilibrada a pH 7.4 con Tris base en polvo.

Se guarda a 4 °C.

- **Tampones para reconstitución:**

Tampón de diálisis (para 50 ml):

1 ml de tampón A+G 50x.

6 ml KPi 1 M pH 7.4.

43 ml H₂O MilliQ.

Si se quiere preparar tampón de diálisis con aminoácido, se añade el volumen necesario de aminoácido 50 mM y se resta este volumen del que se añadía de agua.

Se guarda a 4 °C.

Tampón A+G 50x (para 100 ml):

5 ml NaEDTA 0.5 M pH 7.4.

5 ml MgSO₄ 1 M.

25 ml TrisSO₄ 1M pH 7.4 (se prepara H₂SO₄ 1 M y se lleva a pH 7.4 con Tris base en polvo).

15 ml H₂O MilliQ.

50 ml glicerol.

Todas las soluciones excepto el glicerol se filtran a través de un filtro de 0.22 µm de diámetro antes de añadirlas.

Se guarda a 4 °C.

- **KPi 1 M pH 7.4:**

Se preparan 150 ml de KH₂PO₄ 1 M y 500 ml de K₂HPO₄ 1 M, se mezclan las dos soluciones hasta obtener una solución de pH 7.4. Se filtra a través de un filtro de 0.22 µm de diámetro.

Se guarda a 4 °C.

APÉNDICE B: CONSTRUCTOS DE DNA Y OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS.

Vectores de expresión en células HeLa:

- **pcDNA4-His-b⁰⁺AT**: este vector permite la expresión en células de mamífero de la proteína b⁰⁺AT con una extensión en el extremo N-terminal que contiene una cola de 6 histidinas y el epítipo Xpress. Fue construido por la Dra. N. Reig en su Tesis doctoral sobre el vector pCDNA4/HisMaxA.
- **pcDNA4-His-b⁰⁺AT-rBAT**: este vector permite la expresión en células de mamífero, de la proteína b⁰⁺AT unida mediante un conector de 10 aminoácidos (GAAPDGAPGC) a la proteína rBAT y además posee una extensión en el extremo N-terminal que contiene una cola de 6 histidinas y el epítipo Xpress. Fue construido por la Dra. N. Reig en su Tesis doctoral sobre el vector pCDNA4/HisMaxA.
- **pcDNA4-His-xCT**: este vector permite la expresión en células de mamífero de la proteína xCT con una extensión en el extremo N-terminal que contiene una cola de 6 histidinas y el epítipo Xpress. Fue construido por la Dra. E. Gasol en su Tesis doctoral sobre el vector pCDNA4/HisMaxA.
- **pcDNA4-His-xCT-4F2hc**: este vector permite la expresión en células de mamífero, de la proteína xCT unida mediante un conector de 10 aminoácidos (GAAPDGAPGC) a la proteína 4F2hc y además posee una extensión en el extremo N-terminal que contiene una cola de 6 histidinas y el epítipo Xpress. Fue construido por la Dra. M. Jiménez-Vidal en su Tesis doctoral sobre el vector pCDNA4/HisMaxA.

Vectores de expresión en *Pichia pastoris*:

- **pPICZB-His-b⁰⁺AT**: este vector permite la expresión en células de *Pichia pastoris* de la proteína b⁰⁺AT con una extensión en el extremo N-terminal que contiene una cola de 6 histidinas y una diana de enteroquinasa para liberarla. Fue construido por el autor de esta Tesis doctoral mediante una PCR con los oligonucleótidos PichiaD y PichiaR (ver Apéndice B) sobre la base pcDNA4-His-b⁰⁺AT. Estos oligonucleótidos introducen b⁰⁺AT entre unas dianas EcoRI y XbaI y además alteran el codón siguiente al ATG inicial, mutándolo a TCT para una mejor expresión en *Pichia pastoris*.
- **pPICZB-His-b⁰⁺AT-rBAT**: este vector permite la expresión en células de *Pichia pastoris* de la proteína b⁰⁺AT unida mediante un conector de 10 aminoácidos (GAAPDGAPGC) a la proteína rBAT y además posee una extensión en el extremo N-terminal que contiene una cola de 6 histidinas y una diana de enteroquinasa para liberarla. Fue construido por el autor de esta Tesis doctoral mediante una PCR con los oligonucleótidos PichiaD y P6linkrBATrev (ver Apéndice B) sobre la base pcDNA4-His-b⁰⁺AT-rBAT. Estos oligonucleótidos introducen el concatenámero b⁰⁺AT-rBAT entre unas dianas EcoRI y XbaI y además alteran el codón siguiente al ATG inicial, mutándolo a TCT para una mejor expresión en *Pichia pastoris*.

- **pPICZB-His-xCT:** este vector permite la expresión en células de *Pichia pastoris* de la proteína xCT con una extensión en el extremo N-terminal que contiene una cola de 6 histidinas y una diana de enteroquinasa para liberarla. Fue construido por el autor de esta Tesis doctoral mediante una PCR con los oligonucleótidos PichiaD y xCTrev (ver Apéndice B) sobre la base pcDNA4-His-xCT. Estos oligonucleótidos xCT entre unas dianas EcoRI y XbaI y alteran el codón siguiente al ATG inicial, mutándolo a TCT para una mejor expresión.

Vectores de expresión en *E. coli*:

- **pTTQ18:** SteT y todos sus mutantes han sido clonados y expresados en este vector cedido por el Dr. S. Baldwin (U. de Leeds) que posee una extensión en el extremo C-terminal que contiene una cola de 6 histidinas. SteT fue clonado por la Dra. N. Reig entre las dianas EcoRI y PstI. Las diferentes mutaciones fueron realizadas por el autor de esta Tesis doctoral sobre este constructo utilizando el protocolo descrito en el apartado 2.2 de Material y Métodos con los oligonucleótidos descritos a continuación.

Oligonucleótidos usados en la realización de esta Tesis doctoral:

- **Clonaje de b^{o+}AT, el concatenámero b^{o+}AT-rBAT y xCT en *Pichia pastoris*:**

b^{o+}AT:

PichiaD 5'- CTATTGAATTCAAAATGTCTGGGGTTCTCATCATCATCA – 3'

PichiaR 5' – CTATTTCTAGAAGCTTGTTACTCAGGGTCTT – 3'

b^{o+}AT-rBAT:

PichiaD 5'- CTATTGAATTCAAAATGTCTGGGGTTCTCATCATCATCA – 3'

P6linkrBATrev: 5'- CTATTTCTAGATGCCTAACACGAGGTATA -3'

xCT:

PichiaD 5'- CTATTGAATTCAAAATGTCTGGGGTTCTCATCATCATCA – 3'

xCTrev 5' – CTATTTCTAGATCATAACTTATCTTCTTCTGGTA – 3'

- **Mutagenesis de STET:**

Generación de SteT *cysless*:

C94Sdir 5'-GCGAGTTTTGGGGATTTTTGTCCGGCTGGGTGCAGATTATC-3'

C94Srev 5'-GATAATCTGCACCCAGCCGGACAAAAATCCCCAAAACCTCGC-3'

C141Sdir 5'-ATAGCAGTTCTCTTTTTATCGGTCATTAATATTATCGGTAC-3'

C141Srev 5'-GTACCGATAATATTAATGACCGATAAAAAGAGAACTGCTAT-3'

C168Sdir 5'-AAACTGATTCCGATTGCCTCCATCATCGTCTTTGGCCTTTG-3'

C168Srev 5'-CAAAGGCCAAAGACGATGATGGAGGCAATCGGAATCAGTTT-3'

C291Sdir 5'-ATCGTCAGCATCTTTGGGTCGTTAAATGGAAAGGTGCTTTC-3'

C291Srev 5'-GAAAGCACCTTTCCATTTAACGACCCAAAGATGCTGACGAT-3'

C415Sdir 5'-CATTACAGATAACAATGAGCTCCGGATTATCCATCCTCATCG-3'

C415Srev 5'-CGATGAGGATGGATAATCCGGAGCTCATTGTATCTGTAATG-3'

Introducción de cisteínas únicas en SteT *cys*less:

L78Cdir: 5'-GATTCCAAAACCGGCGGGTGCTATACGTACCTTGAAGAAG-3'
 L78Crev: 5'-CTTCTTCAAGGTACGTATAGCACCCGCCGGTTTTTGAATC-3'
 T80Cdir: 5'-CAAAAACCGGCGGGGCTTTATTGCTACCTTGAAGAAGTGTAC-3'
 T80Crev: 5'-GTACACTTCTTCAAGGTAGCAATAAAGCCCGCCGGTTTTTG-3'
 S94Cdir: 5'-GCGAGTTTTGGGGATTTTTGTGCGGCTGGGTGCAGATTATC-3'
 S94Crev: 5'-GATAATCTGCACCCAGCCGCACAAAATCCCCAAAACCTCGC-3'
 S141Cdir: 5'-ATAGCAGTTCTCTTTTTATGCGTCATTAATATTATCGGTAC-3'
 S141Crev: 5'-GTACCGATAATATTAATGACGCATAAAAAGAGAACTGCTAT-3'
 S168Cdir: 5'-AAACTGATTCCGATTGCCTGCATCATCGTCTTTGGCCTTTG-3'
 S168Crev: 5'-CAAAGGCCAAAGACGATGATGCAGGCAATCGGAATCAGTTT-3'
 G283Cdir: 5'-CGGAAAGCTGATCAGTGTATGCATTATCGTCAGCATCTTTG-3'
 G283Crev: 5'-CAAAGATGCTGACGATAATGCATACACTGATCAGCTTTCCG-3'
 I284Cdir: 5'-GAAAGCTGATCAGTGTAGGGTGCATCGTCAGCATCTTTGGG-3'
 I284Crev: 5'-CCCAAAGATGCTGACGATGCACCCTACACTGATCAGCTTTC-3'
 I285Cdir: 5'-GCTGATCAGTGTAGGGATTTGCGTCAGCATCTTTGGGTCGT-3'
 I285Crev: 5'-ACGACCCAAAGATGCTGACGCAAATCCCTACACTGATCAGC-3'
 S287Cdir: 5'-CAGTGTAGGGATTATCGTCTGCATCTTTGGGTCGTAAATG-3'
 S287Crev: 5'-CATTTAACGACCCAAAGATGCAGACGATAATCCCTACACTG-3'
 I288Cdir: 5'-GTGTAGGGATTATCGTCAGCTGCTTTGGGTCGTAAATGGA-3'
 I288Crev: 5'-TCCATTTAACGACCCAAAGCAGCTGACGATAATCCCTACAC-3'
 G290Cdir: 5'-GATTATCGTCAGCATCTTTTGGTCTGTTAAATGGAAAGGTGC-3'
 G290Crev: 5'-GCACCTTTCCATTTAACGAGCAAAGATGCTGACGATAATC-3'
 S291Cdir: 5'-ATCGTCAGCATCTTTGGGTCGTAAATGGAAAGGTGCTTTC-3'
 S291Crev: 5'-GAAAGCACCTTTCCATTTAAGCACCCAAAGATGCTGACGAT-3'
 L292Cdir: 5'-CGTCAGCATCTTTGGGTCGTGCAATGGAAAGGTGCTTTCTT-3'
 L292Crev: 5'-AAGAAAGCACCTTTCCATTGCACGACCCAAAGATGCTGACG-3'
 G294Cdir: 5'-ATCTTTGGGTCGTAAATTGCAAGGTGCTTTCTTTCCCGCG-3'
 G294Crev: 5'-CGCGGGAAAGAAAGCACCTTGCAATTTAACGACCCAAAGAT-3'
 K295Cdir: 5'-CTTTGGGTCGTAAATGGATGCGTGCTTTCTTTCCCGCGTG-3'
 K295Crev: 5'-CACGCGGGAAAGAAAGCACGCATCCATTTAACGACCCAAAG-3'
 K295Gdir: 5'-CTTTGGGTCGTAAATGGAGGCGTGCTTTCTTTCCCGCGTG-3'
 K295Grev: 5'-CACGCGGGAAAGAAAGCACGCCTCCATTTAACGACCCAAAG-3'
 K295Ldir: 5'-CTTTGGGTCGTAAATGGACTGGTGCTTTCTTTCCCGCGTG-3'
 K295Lrev: 5'-CACGCGGGAAAGAAAGCACCCAGTCCATTTAACGACCCAAAG-3'
 K295Rdir: 5'-CTTTGGGTCGTAAATGGACGCGTGCTTTCTTTCCCGCGTG-3'
 K295Rrev: 5'-CACGCGGGAAAGAAAGCACGCGTCCATTTAACGACCCAAAG-3'
 K295Edir: 5'-CTTTGGGTCGTAAATGGAGAAGTGCTTTCTTTCCCGCGTG-3'
 K295Erev: 5'-CACGCGGGAAAGAAAGCACTTCTCCATTTAACGACCCAAAG-3'
 L297Cdir: 5'-GGGTCGTAAATGGAAAGGTGTGCTTTTCCCGCGTGTTTC-3'

L297Crev: 5'-GAAACACGCGGGAAAGAGCACACCTTTCCATTTAACGACCC-3'
S298Cdir: 5'-GTAAATGGAAAGGTGCTTTGCTTCCCGCGTGTTTCATTTG-3'
S298Crev: 5'-CAAATGAAACACGCGGGAAAGCAAAGCACCTTTCCATTTAAC-3'
F299Cdir: 5'-ATGGAAAGGTGCTTTCTTGCCCGCGTGTTTCATTTGCAATG-3'
F299Crev: 5'-CATTGCAAATGAAACACGCGGGCAAGAAAGCACCTTTCCAT-3'
K317Cdir: 5'-CAAACAGCTTCCATTTGCTGAATGCCTGTCACATGTACACC-3'
K317Crev: 5'-GGTGTACATGTGACAGGCATTTCAGCAAATGGAAGCTGTTTG-3'
L318Cdir: 5'-CAGCTTCCATTTGCTGAAAAATGCTCACATGTACACCCGTC-3'
L318Crev: 5'-GACGGGTGTACATGTGAGCATTTTTTCAGCAAATGGAAGCTG-3'
S415Cdir: 5'-CATTACAGATACAATGAGCTGCGGATTATCCATCCTCATCG-3'
S415Crev: 5'-CGATGAGGATGGATAATCCGCAGCTCATTGTATCTGTAATG-3'

Mutación del residuo K295 en SteT:

wtK295Cdir: 5'-CTTTGGGTGCTTAAATGGATGTGTGCTTTCTTTCCCGCGTG-3'
wtK295Crev: 5'-CACGCGGGAAAGAAAGCACACATCCATTTAAGCACCCAAAG-3'

APÉNDICE C: ESTRUCTURA DE LOS REACTIVOS DE CISTEÍNA.

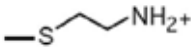
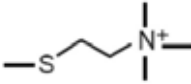
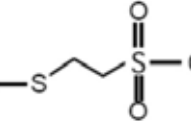
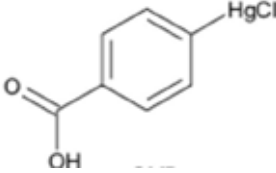
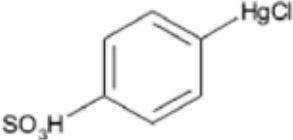
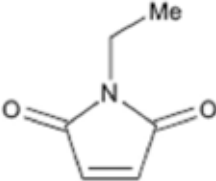
MTSET	
MTSEA	
MTSES	
pCMB	
pCMBS	
NEM	

Tabla 9. Estructuras de los reactivos de cisteínas usados en los ensayos de transporte.

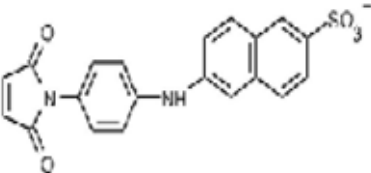
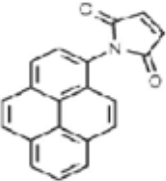
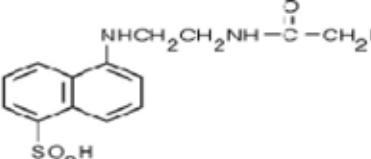
MIANS	
PM	
IAEDANS	

Tabla 10. Estructuras de los reactivos de cisteínas usados en los ensayos de fluorescencia.

ANEXO 1. PRODUCCIÓN Y RECONSTITUCIÓN DE HATs EN CÉLULAS HeLa:

OBJETIVOS:

Aprovechando la técnica de reconstitución directa de proteínas no purificadas basada en el protocolo descrito por el grupo del Dr. B. Kanner (U. de Jerusalén, Israel) (Radian et al., 1985) e implementada por la Dra. N. Reig en nuestro laboratorio decidimos:

1. Reconstituir y caracterizar funcionalmente el concaténmero rBAT-b^{0,+}AT.

Queríamos estudiar si el concaténmero rBAT-b^{0,+}AT posee las mismas características cinéticas que b^{0,+}AT aislado para intentar averiguar si rBAT ejerce algún efecto modulador sobre el transporte.

2. Reconstituir y caracterizar funcionalmente xCT y el concaténmero 4F2hc-xCT.

Queríamos estudiar si análogamente a b^{0,+}AT, xCT por sí sólo es suficiente para generar la actividad x_c⁻ de transporte y si el concaténmero 4F2hc-xCT posee las mismas características cinéticas que xCT aislado para intentar averiguar si 4F2hc ejerce algún efecto modulador sobre el transporte. También queríamos caracterizar la cloruro-dependencia descrita para el sistema de transporte x_c⁻.

3. Purificar, reconstituir y caracterizar funcionalmente b^{0,+}AT y xCT.

Queríamos reconstituir b^{0,+}AT y xCT producido en células HeLa y posteriormente purificados con una columna de níquel en PLs para estudiar sus características cinéticas en un sistema libre de subunidades pesadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

1. Reconstitución y caracterización funcional del concaténmero rBAT-b^{0,+}AT:

Siguiendo el protocolo de reconstitución directa de proteína no purificada se decidió transfectar células HeLa con el concaténmero rBAT-b^{0,+}AT y con b^{0,+}AT únicamente para su uso como control positivo de transporte. El ensayo de transporte de 0.5 μM L-arginina marcada en los PLs resultantes mostró que el transporte del concaténmero rBAT-b^{0,+}AT era muy inferior al de b^{0,+}AT sólo. Por ello, se procedió a repetir el transporte aumentando la concentración de aminoácido para tener suficiente sensibilidad (figura 1).

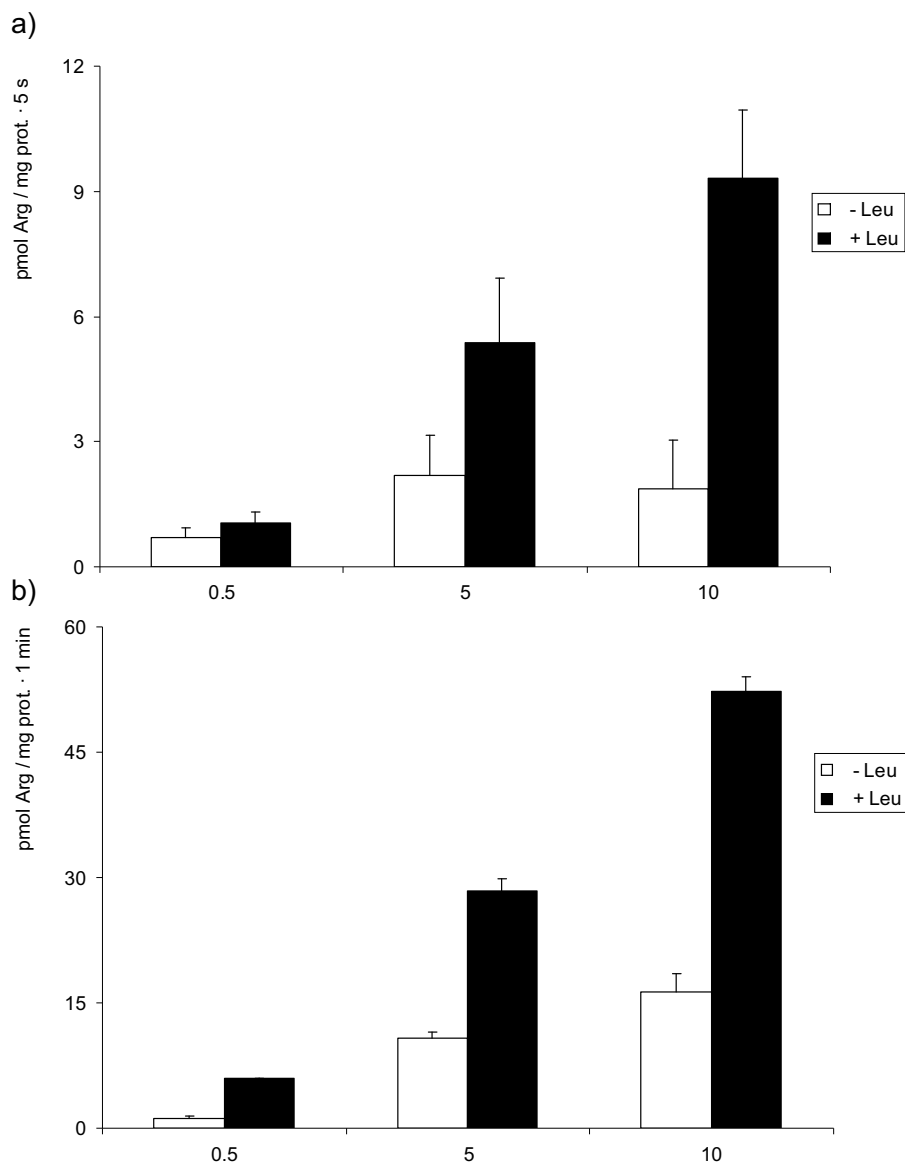


Figura 1. Ensayo de transporte en PLs provenientes de células HeLa transfectadas con el concatenámero rBAT-b^{0,+}AT. El transporte de 0.5, 5 ó 10 μM de L-arginina marcada radiactivamente se midió durante 5 segundos (a) ó 1 minuto (b) en PLs que contenían 2 mM L-leucina (barras negras) o ningún aminoácido (barras blancas). Se muestra un experimento representativo. Cuando no se aprecian las barras de EEM es porque son menores que los símbolos.

Estos resultados confirmaron que el concatenámero rBAT-b^{0,+}AT, al igual que b^{0,+}AT sólo, se comporta como un intercambiador obligatorio y se decidió que los transportes con el concatenámero rBAT-b^{0,+}AT se realizarían con 10 μM L-arginina.

Como se observó al realizar el *Western blot* de los extractos de células HeLa y los PLs usados en el transporte de la figura 1, la baja sensibilidad era debida a la baja cantidad de concatenámero rBAT-b^{0,+}AT producida por las células HeLa, lo cual redundaba en una baja cantidad de concatenámero rBAT-b^{0,+}AT presente en los PLs obtenidos a partir de éstas (figura

2). Esto no hace si no demostrar que el concatenámero rBAT-b^{0,+}AT posee la misma dificultad de expresión que rBAT.

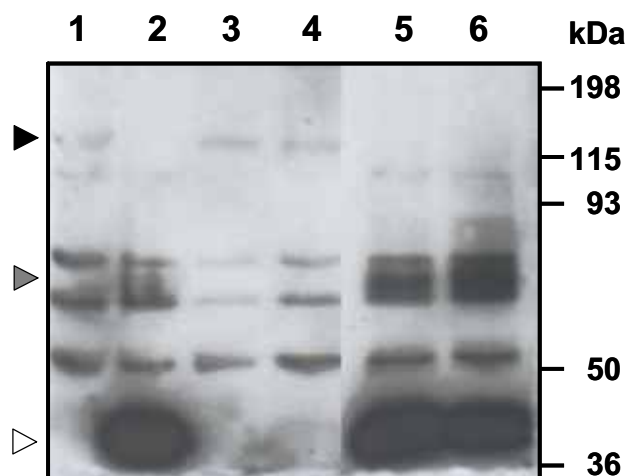


Figura 2. *Western blot* con ab^{0,+}AT de extractos de las células HeLa transfectadas con el concatenámero rBAT-b^{0,+}AT (1) o con b^{0,+}AT (2) y de los PLs obtenidos a partir de ellas: 3 y 4 de las transfectadas con el concatenámero sin o con leucina en su interior respectivamente, y 5 y 6 de las transfectadas con b^{0,+}AT sin y con leucina respectivamente. La cabeza de flecha negra indica la posición de la banda correspondiente al concatenámero rBAT-b^{0,+}AT, la cabeza de flecha vacía la correspondiente a b^{0,+}AT y la cabeza de flecha gris la correspondiente al homodímero de b^{0,+}AT.

Para determinar la linealidad del transporte a través del concatenámero rBAT-b^{0,+}AT se realizó una cinética de entrada. En ella se estudió la entrada de L-arginina radioactiva en presencia o ausencia, respectivamente, de L-leucina en el interior (figura 3):

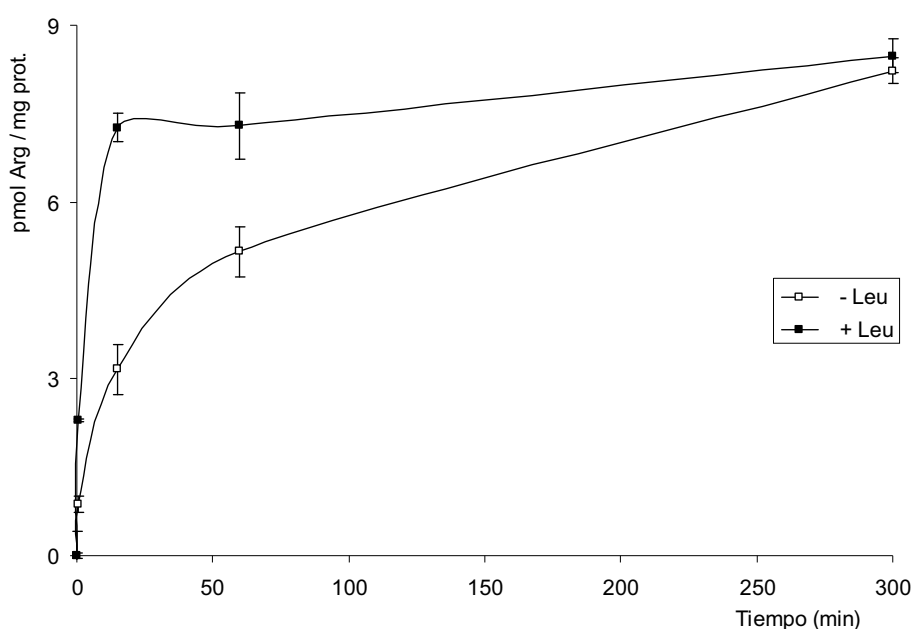
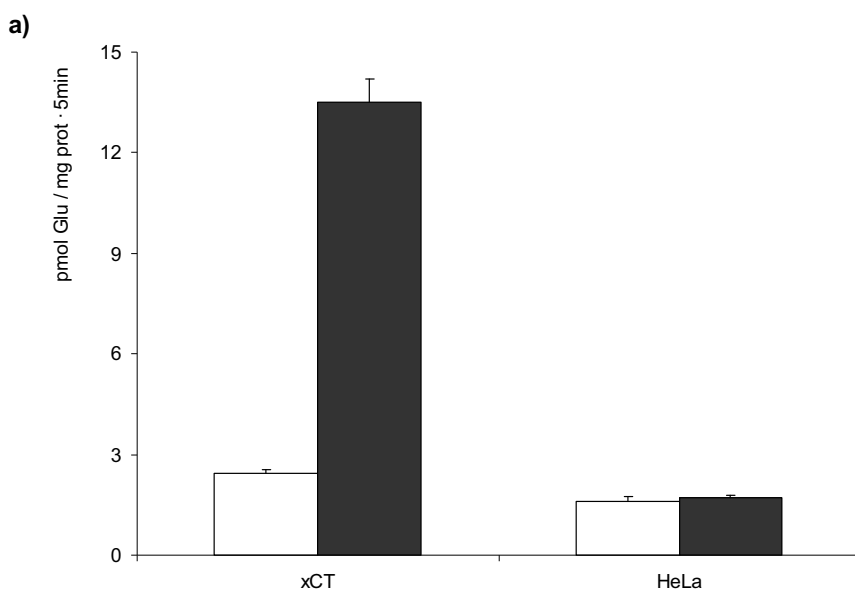


Figura 3. Cinética del transporte de L-arginina en PLs provenientes de células HeLa transfectadas con el concaténmero rBAT-b^{0,+}AT. Entrada (pmol/mg proteína) de 10 μM L-arginina marcada radiactivamente en PLs que contienen 2 mM L-leucina (cuadrados negros) o ningún aminoácido (cuadrados blancos). El transporte se midió durante 0, 15 segundos, 15 minutos, 1 y 5 horas. Los datos corresponden a un experimento representativo, realizado con 3 réplicas. Cuando no se aprecian las barras de EEM es porque son menores que los símbolos.

En la figura 3 se observa que en ningún momento tenemos una sensibilidad suficiente como para realizar estudios cinéticos (p. e. determinación de la K_M aparente). Debido a las dificultades para estudiar el concaténmero rBAT-b^{0,+}AT se decidió adaptar el protocolo para la reconstitución de xCT y su concaténmero con 4F2hc.

2. Reconstitución y caracterización funcional de xCT y del concaténmero 4F2hc-xCT:

Lo primero que se quiso determinar era si análogamente a b^{0,+}AT, xCT por si sólo era capaz de generar la actividad de transporte. En la figura 4 se puede apreciar que los PLs provenientes de células HeLa no transfectadas no generan transporte de glutamato, ni se detecta xCT por *Western blot* en ellos. Por el contrario, sí se detecta xCT en los PLs provenientes de células HeLa transfectadas con xCT, aunque sólo los que contienen L-glutamato en su interior son capaces de generar transporte. Esto confirma que xCT, al igual que b^{0,+}AT es un intercambiador obligatorio de aminoácidos.



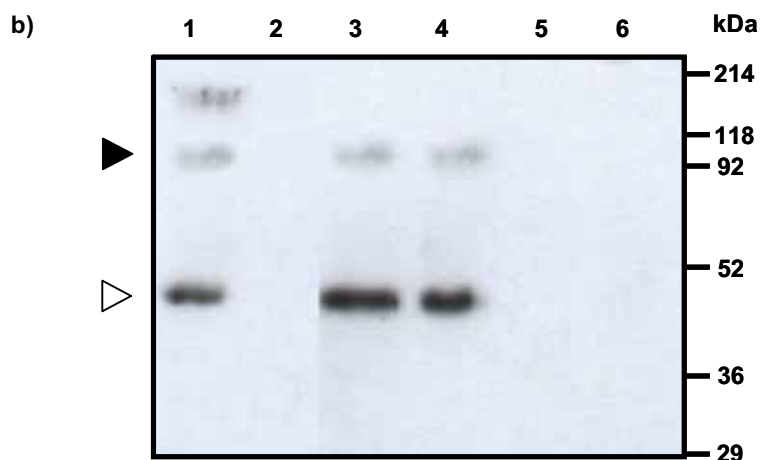


Figura 4. a) Ensayo de transporte en PLs provenientes de células HeLa transfectadas con xCT (xCT) o no transfectadas (HeLa). El transporte de $0.5 \mu\text{M}$ de L-glutamato marcado radiactivamente se midió durante 5 minutos en PLs que contenían 2 mM L-glutamato (barras negras) o ningún aminoácido (barras blancas). Se muestra un experimento representativo realizado con 3 réplicas. b) *Western blot* con $\alpha\text{Express}$ de extractos de las células HeLa transfectadas con xCT (1) o no transfectadas (2) y de los PLs obtenidos a partir de ellas: 3 y 4 de las transfectadas con xCT sin o con glutamato en su interior respectivamente y 5 y 6 de las no transfectadas sin y con leucina respectivamente. La cabeza de flecha vacía indica la posición de la banda correspondiente a xCT y la cabeza de flecha negra la correspondiente homodímero de xCT

Una vez validado el método para xCT, se realizó una cinética de entrada. En ella se estudió la entrada de L-glutamato radioactivo en presencia o ausencia, respectivamente, de L-glutamato en el interior (figura 5):

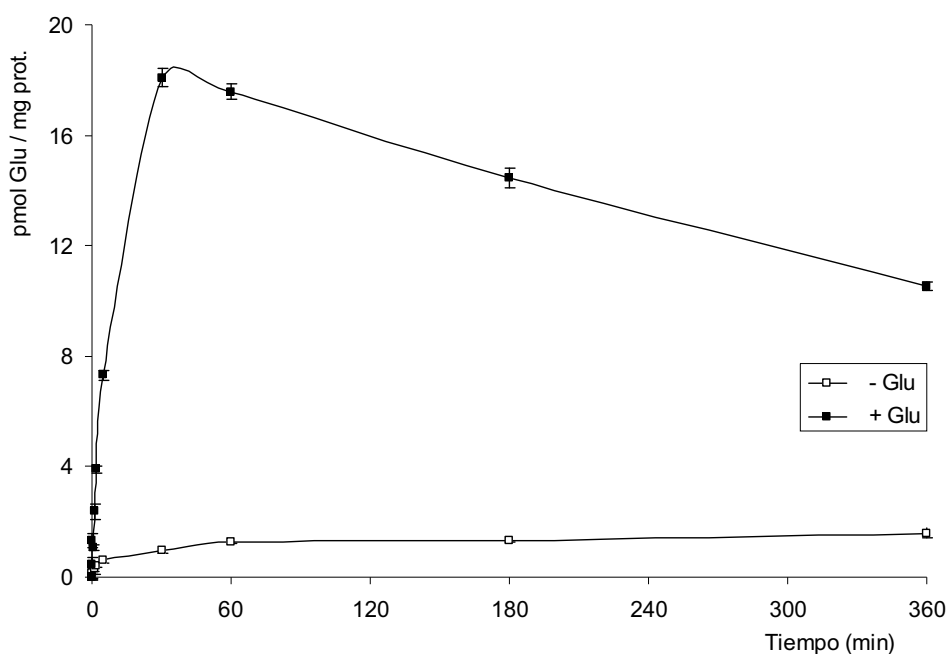


Figura 5. Cinética del transporte de L-glutamato en PLs provenientes de células HeLa transfectadas con xCT. Entrada (pmol/mg proteína) de $0.5 \mu\text{M}$ L-glutamato marcado radiactivamente en PLs que contienen 2

mM L-glutamato (cuadrados negros) o ningún aminoácido (cuadrados blancos). El transporte se midió durante 0, 5, 15 y 30 segundos, 1, 2, 5 y 30 minutos, y 1, 3 y 6 horas. Los datos corresponden a un experimento representativo, realizado con 3 réplicas. Cuando no se aprecian las barras de EEM es porque son menores que los símbolos.

Esta cinética demuestra que xCT es un intercambiador obligatorio, ya que cuando tiene sustrato en ambos lados se observa un *overshoot* que después tiende hacia el equilibrio, mientras que si no hay sustrato en uno de los lados se produce una entrada por difusión simple a través de los PLs.

El siguiente paso fue analizar la actividad del concaténmero 4F2hc-xCT, para lo que se reconstituyó análogamente a xCT (figura 6):

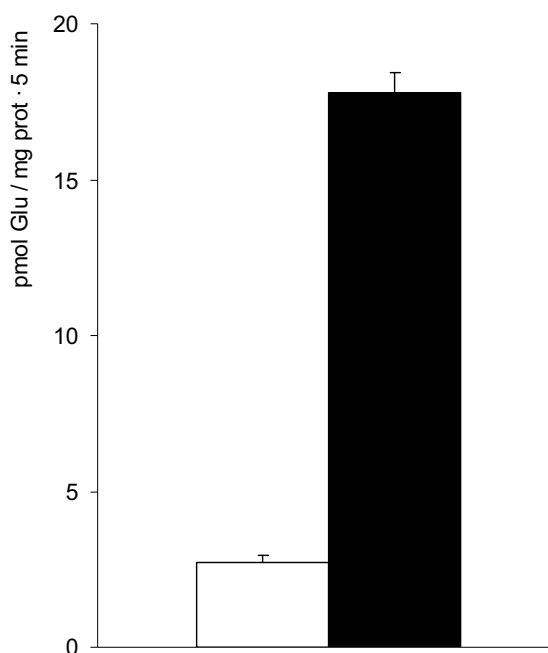


Figura 6. Ensayo de transporte en PLs provenientes de células HeLa transfectadas con el concaténmero 4F2hc-xCT. El transporte de 0.5 μ M de L-glutamato marcado radiactivamente se midió durante 5 minutos en PLs que contenían 2 mM L-glutamato (barra negra) o ningún aminoácido (barra blanca). Se muestra un experimento representativo.

A diferencia del concaténmero rBAT-b^{0,+}AT, el concaténmero 4F2hc-xCT genera una gran actividad de transporte por encima del basal, permitiendo trabajar con facilidad en estas condiciones.

Como en el caso de xCT se procedió a realizar la cinética de entrada. En ella se estudió la entrada de L-glutamato radioactivo en presencia o ausencia, respectivamente, de L-glutamato en el interior (figura 7).

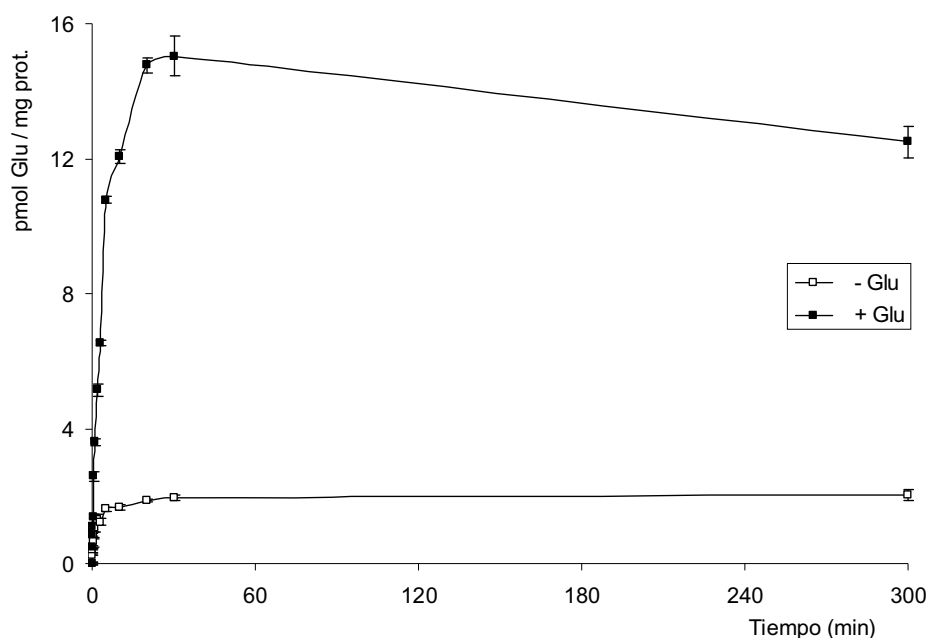


Figura 7. Cinética del transporte de L-glutamato en PLs provenientes de células HeLa transfectadas con el concatenámero 4F2hc-xCT. Entrada (pmol/mg proteína) de 0.5 μM L-glutamato marcado radiactivamente en PLs que contienen 2 mM L-glutamato (cuadrados negros) o ningún aminoácido (cuadrados blancos). El transporte se midió durante 0, 5, 10, 15, 20 y 40 segundos, 1, 2, 3, 5, 10, 20 y 30 minutos y 5 horas. Los datos corresponden a un experimento representativo, realizado con 3 réplicas. Cuando no se aprecian las barras de EEM es porque son menores que los símbolos.

En esta cinética se observa un *overshoot* muy similar al de la figura 5, por lo que se decidió analizar si había diferencias entre el transporte obtenido al transfectar células HeLa con xCT o con el concatenámero 4F2hc-xCT. Para ello se realizaron transportes en velocidad inicial, análogos a los mostrados en las figuras 4 y 6, pero con diferentes concentraciones externas de sustrato (0.5, 1, 2, 5, 10 y 20 μM). Con estos datos se estimó una K_M aparente externa idéntica de 8 μM para xCT y el concatenámero 4F2hc-xCT (tabla 1). Este valor es superior al determinado por la Dra. N. Reig para $b^{0,+}\text{AT}$ que es de 0.5 μM (Reig et al., 2002).

	xCT	4F2hc-xCT
K_M	8 ± 2	8 ± 3
$V_{\text{máx}}$	102 ± 11	195 ± 32

Tabla 1. El análisis *Non-parametric* (GraphPad; Sigma) estimó una K_M aparente externa de 8 ± 2 μM para xCT y de 8 ± 3 μM para el concatenámero 4F2hc-xCT. La $V_{\text{máx}}$ estimada fue de 102 ± 11 pmol / mg proteína \cdot min para xCT y de 195 ± 32 pmol / mg proteína \cdot min para el concatenámero 4F2hc-xCT. (media \pm EEM).

La $V_{\text{máx}}$ estimada para el concatenámero 4F2hc-xCT fue del doble que para xCT sólo. Esto puede explicarse por una mayor incorporación del concatenámero 4F2hc-xCT respecto xCT sólo, o bien por la influencia de 4F2hc sobre el transporte.

El *Western blot* de los PLs de los transportes utilizados para la determinación de los datos de la tabla 1 mostró una banda de ~120 kDa (figura 8a cabeza de flecha negra), que corresponde al heterodímero formado por xCT y 4F2hc, en los PLs provenientes de células HeLa que han sido transfectadas sólo con xCT. Esto indica que al menos parte del xCT sobreexpresado en las células HeLa es capaz de unirse al 4F2hc endógeno. Esta unión parece darse mediante la formación del puente disulfuro, ya que la unión se rompe al añadir DTT, detectándose entonces únicamente las bandas correspondientes al monómero (~40 kDa) y el dímero de xCT (~85 kDa) (figura 8b cabeza de flecha blanca y gris respectivamente). En el caso de los PLs obtenidos de células HeLa transfectadas con el concatenámero 4F2hc-xCT también se observa la banda a ~120 kDa, pero ésta no se ve afectada por el tratamiento con DTT ya que en este caso xCT y 4F2hc están unidas covalentemente mediante un espaciador.

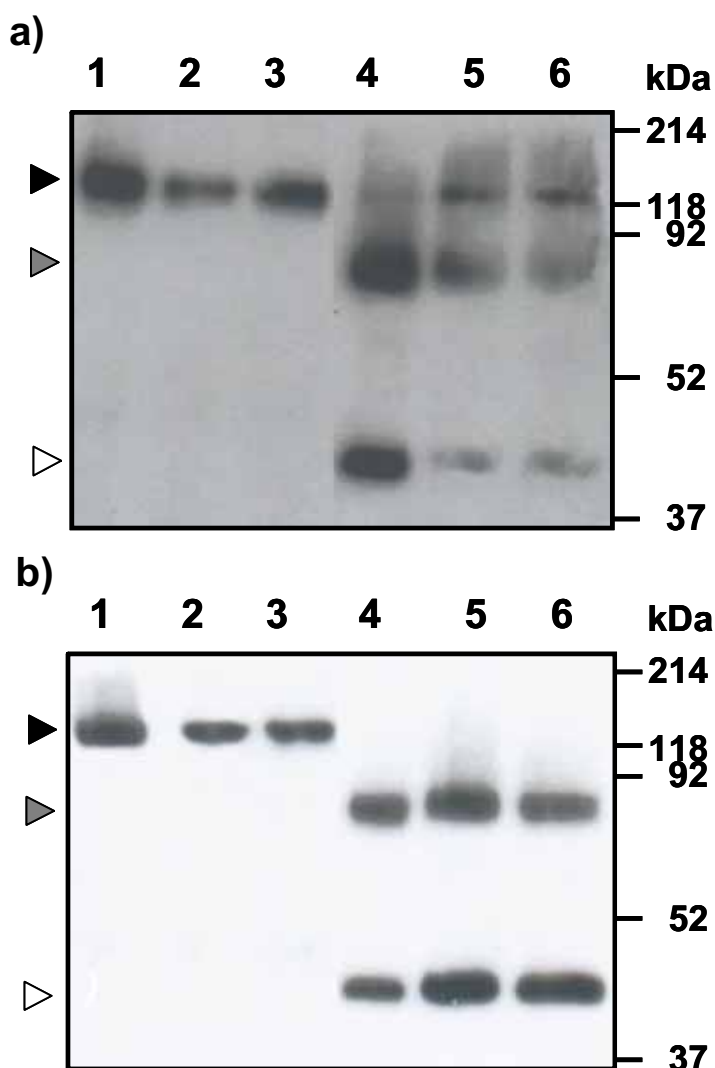


Figura 8. *Western blot* con α Express de extractos de las células HeLa transfectadas con el concatenámero 4F2hc-xCT (1) o con xCT (4) y de los PLs obtenidos a partir de ellas: 2 y 3 de las transfectadas con el concatenámero sin o con glutamato en su interior respectivamente y 5 y 6 de las transfectadas con xCT sin y con glutamato respectivamente. La cabeza de flecha negra indica la posición

de la banda correspondiente al heterodímero de xCT con 4F2hc, la cabeza de flecha gris indica la correspondiente al homodímero de xCT y la cabeza de flecha vacía indica la correspondiente al monómero de xCT.

Este hecho no nos permite concluir si xCT por sí sólo es capaz de realizar el transporte análogamente a $b^{0,+}AT$, ya que las células HeLa no expresan rBAT. Una solución sería expresar xCT en un sistema que no exprese 4F2hc, pero eso es muy difícil ya que es una proteína de expresión ubicua.

Está descrito que el sistema de transporte de aminoácidos x_c^- es Cl^- -dependiente (Waniewski et al., 1984; Gochenauer et al., 2001). Nuestro método de reconstitución incluye 154 mM Cl^- en el medio externo, principalmente debido al cloruro de colina (150 mM) y no incluye Cl^- en el medio interno.

Para intentar describir esta Cl^- -dependencia se decidió sustituir las sales del medio de transporte que contenían Cl^- por otras que no lo contuvieran. Para ello se comprobó que el cambio en el medio externo de cloruro de colina por cloruro de litio no afectaba al transporte (datos no mostrados). Posteriormente se comparó el transporte obtenido con cloruro de litio en el medio externo, con el obtenido sustituyéndolo por acetato o bromuro de litio (figura 9):

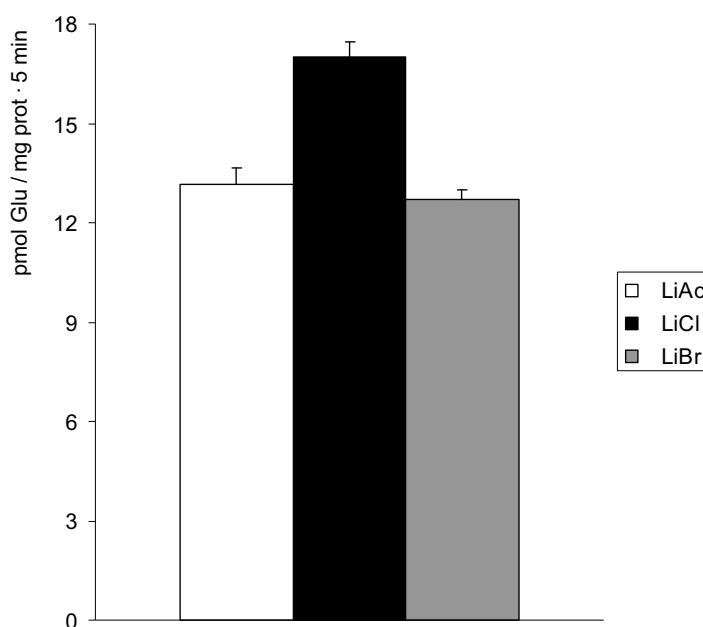


Figura 9. Ensayo de transporte en PLs provenientes de células HeLa transfectadas con xCT. En el medio externo el cloruro de colina se sustituyó por LiAc (barra blanca), LiCl (barra negra) o LiBr (barra gris). El transporte de 0.5 μM de L-glutamato marcado radiactivamente se midió durante 5 minutos en PLs que contenían 2 mM L-glutamato o ningún aminoácido. El transporte a través de xCT fue calculado sustrayendo al transporte obtenido en los PLs que contenían 2 mM de glutamato, el obtenido en los PLs que no contenían aminoácido. Se muestra un experimento representativo.

En la figura se observa que la eliminación total del Cl^- del medio de transporte no elimina totalmente el transporte, únicamente produce una disminución entre un 25 y un 40% según el experimento. Estos datos se repiten cuando el experimento se realiza con PLs provenientes de células HeLa transfectadas con el concatenámero 4F2hc-xCT. Esto hace que sea más adecuado hablar de estimulación del transporte por Cl^- que no de Cl^- -dependencia del transporte.

Para caracterizar este efecto se realizaron ensayos de transporte tanto con xCT como con el concatenámero 4F2hc-xCT, variando la concentración de Cl^- extracelular entre 0 y 150 mM (concentraciones superiores no tendrían sentido fisiológico) (figura 10):

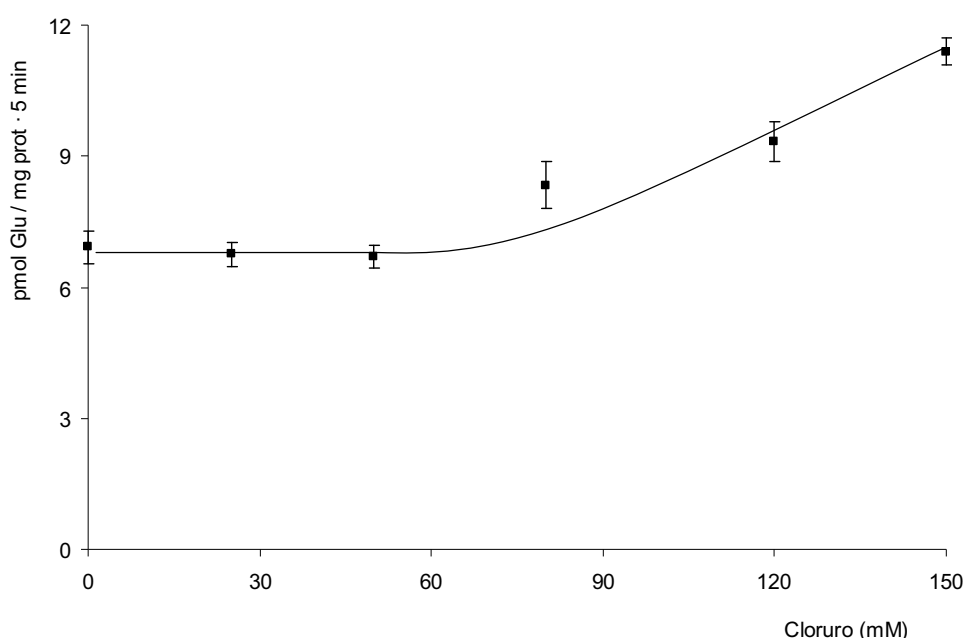


Figura 10. Ensayo de transporte en PLs provenientes de células HeLa transfectadas con el concatenámero 4F2hc-xCT. El transporte de $0.5 \mu\text{M}$ de L-glutamato marcado radiactivamente se midió durante 5 minutos en PLs que contenían 2 mM L-glutamato o ningún aminoácido. Se utilizaron medios de transporte con 0, 25, 50, 80, 120 y 150 mM de Cl^- , realizando combinaciones de LiCl y LiAc en el medio externo para alcanzar dichas concentraciones. El transporte a través del concatenámero 4F2hc-xCT fue calculado sustrayendo al transporte obtenido en los PLs que contenían 2 mM de glutamato, el obtenido en los PLs que no contenían aminoácido. Se muestra un experimento representativo.

En la figura se observa que la adición de Cl^- no produce ningún efecto hasta sobrepasar la concentración de 50 mM. Por encima de esta concentración se produce un aumento de la actividad de transporte. Esto no corresponde con lo descrito anteriormente (Gochenauer et al., 2001) y podría estar sugiriéndonos un efecto cooperativo.

El aumento de la concentración de glutamato en el medio de transporte en un rango entre 0.5 y 20 μM no produjo diferencias significativas con respecto al comportamiento observado en la figura 9, de manera que el porcentaje de estimulación que provoca el Cl^- sobre el transporte neto se mantiene constante (datos no mostrados). Esto indica que no existe un efecto del Cl^- diferente en función de la concentración de sustrato.

3. Purificar, reconstituir y caracterizar funcionalmente $\text{b}^{0,+}\text{AT}$ y xCT:

A pesar de que las células HeLa no son el medio óptimo para sobreexpresar una proteína con el fin de purificarla, se decidió hacer una serie de pruebas para ver si se obtenía suficiente sensibilidad. Para ello una vez transfectadas las células HeLa, se procedió a su lisis y se realizaron pruebas de solubilidad con diferentes detergentes: DDM, DM y digitonina. De todos ellos, el DDM demostró ser el mejor.

La proteína solubilizada con DDM (sin purificar) se incubó, antes de reconstituirla, diferentes tiempos con colato sódico (figura 11):

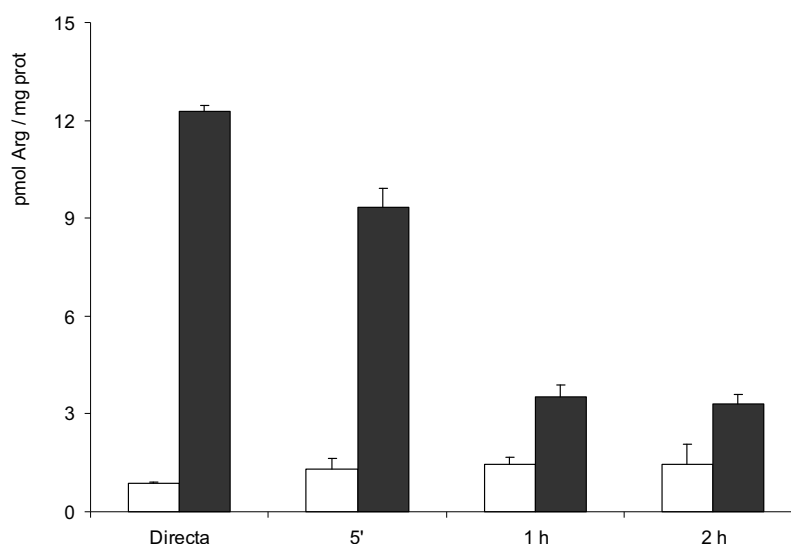


Figura 11. Ensayo de transporte en PLs provenientes de células HeLa transfectadas con $\text{b}^{0,+}\text{AT}$. El transporte de 0.5 μM de L-arginina marcada radiactivamente se midió en PLs que contenían 2 mM L-leucina (barras negras) o ningún aminoácido (barras blancas). El transporte se midió durante 1 minuto en los PLs de reconstitución directa (Directa) y durante 5 minutos en PLs con la proteína solubilizada durante 5 minutos (5'), 1 hora (1h) o dos horas (2h). Se muestra un experimento representativo.

Este experimento se realizó para determinar un tiempo adecuado de incubación que permitiera la formación de PLs pero sin inactivar fuertemente la proteína. El cambio de metodología producía que, con tan sólo 5 minutos de incubación con colato sódico, ya se inactivara la proteína más de un 80%. Las incubaciones de 1 y 2 horas apenas generaban transporte. Se decidió hacer los transportes con 5 minutos de incubación con colato sódico

porque sin su adición no se obtenía transporte alguno, probablemente debido a la no inserción de la proteína en los PLs (datos no mostrados).

Se optimizó la purificación de $b^{0,+}AT$ con una cola de 6 histidinas en el N-terminal con una resina de níquel para purificar la proteína en un único paso. Una vez optimizadas las condiciones se consiguió obtener una pequeña cantidad de $b^{0,+}AT$ (figura 12) con un grado de pureza suficiente para su posterior reconstitución en PLs.

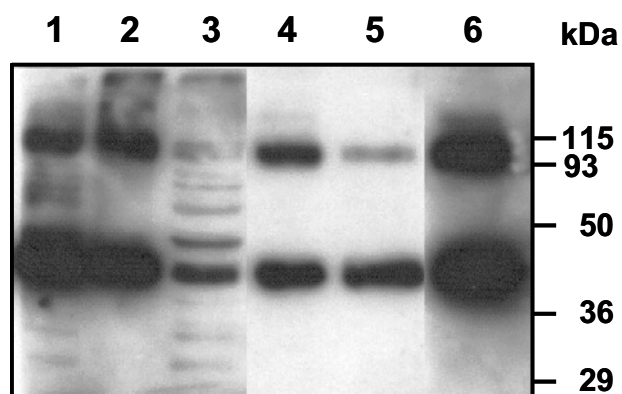


Figura 12. *Western blot* con $ab^{0,+}AT$ de los diferentes pasos de la purificación de extractos de las células HeLa transfectadas con $b^{0,+}AT$. La purificación de $b^{0,+}AT$ expresado con una cola de 6 histidinas se realizó mediante una cromatografía de afinidad de níquel: carril 1, sobrenadante después de solubilizar con 0.5% DDM y ultracentrifugar; carril 2, precipitado posterior a la ultracentrifugación; carril 3, fracción no unida a la columna de Ni^{2+} -NTA; carril 4, lavado con el tampón de lisis con 10 mM imidazol; carril 5, lavado con el tampón de lisis con 20 mM imidazol; carril 6, elución de la columna con el tampón de lisis con 100 mM imidazol.

Los ensayos de transporte con estos PLs no mostraron actividad alguna cuando se reconstituyó $b^{0,+}AT$ purificado en PLs de asolectina y lípidos de cerebro (ver apartado 5.1 de Material y Métodos), probablemente debido a la poca incorporación de proteína a los mismos, (figura 13). Tampoco mostró actividad de transporte cuando se reconstituyó en PLs de lípidos de *E. coli* (ver apartado 5.2 de Material y Métodos), probablemente debido a que la composición lipídica de *E. coli* no sea la adecuada para $b^{0,+}AT$ (datos no mostrados).

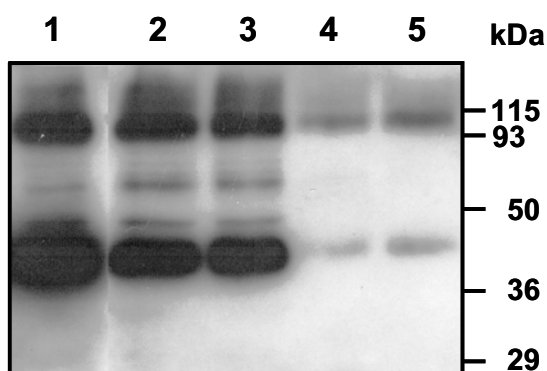


Figura 13. *Western blot* con $\alpha b^{0,+}AT$ de los extractos de célula HeLa transfectadas con $b^{0,+}AT$ y los liposomas que se obtuvieron de ellas por reconstitución directa o previa purificación de la proteína: carril 1, extracto de células HeLa transfectadas con $b^{0,+}AT$; carriles 2 y 3, PLs obtenidos por reconstitución directa con 2 mM L-leucina o sin ningún aminoácido en su interior respectivamente; carriles 4 y 5, PLs obtenidos por reconstitución previa purificación con 2 mM L-leucina o sin ningún aminoácido en su interior respectivamente.

CONCLUSIONES:

Las células HeLa son un buen método para sobreexpresar las LSHATs humanas a pequeña escala con el fin de obtener información de las proteínas humanas que de otro modo no seríamos capaces de obtener.

La baja expresión del concaténmero rBAT- $b^{0,+}AT$ nos impide determinar si rBAT ejerce algún efecto modulador sobre el transporte.

No podemos determinar si xCT, análogamente a $b^{0,+}AT$, es suficiente para generar la actividad x_c^- de transporte debido a que se une al 4F2hc endógeno de las células HeLa. Esto nos impide igualmente determinar si 4F2hc ejerce algún efecto modulador sobre el transporte.

La actividad de transporte de xCT presenta una estimulación por la presencia de aniones cloruro (Cl^-) en concentraciones superiores a 50 mM. Esta estimulación parece seguir una cinética cooperativa.

La sobreexpresión en células HeLa no es un método apropiado para trabajar a gran escala, lo cual no nos permite la purificación de las LSHATs humanas en cantidad suficiente para su posterior reconstitución.

ANEXO 2. EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y RECONSTITUCIÓN DE $b^{0,+}$ AT Y xCT EN *PICHIA PASTORIS*:

OBJETIVOS:

Debido a que la sobreexpresión en células HeLa no era suficiente para purificar las LSHATs antes de reconstituirlas se decidió intentar producirlas en *Pichia pastoris*. *Pichia pastoris* son unas levaduras ampliamente utilizadas para la sobreexpresión a gran escala de proteínas humanas, incluyendo proteínas de membrana (Fryxell et al., 1995; Weiss et al., 1995; Pagliuca et al., 2007). Además no existe en el genoma de *Pichia pastoris* ninguna secuencia homóloga a rBAT ni a 4F2hc, con lo cual evitaremos interferencias como en el caso de xCT y su concatenámero con 4F2hc expresados en HeLa.

1. Expresar $b^{0,+}$ AT, el concatenámero rBAT- $b^{0,+}$ AT y xCT en *Pichia pastoris*.

Queríamos expresar $b^{0,+}$ AT, el concatenámero rBAT- $b^{0,+}$ AT y xCT y ver si éramos capaces de hacerlo en cantidad suficiente como para posteriormente purificarlas y reconstituirlas para poder estudiar sus características funcionales.

2. Reconstituir directamente (sin purificar) y caracterizar funcionalmente $b^{0,+}$ AT, el concatenámero rBAT- $b^{0,+}$ AT y xCT producido en *Pichia pastoris*.

Queríamos estudiar si rBAT ejerce algún efecto sobre el transporte comparando las características del transporte en PLs obtenido por $b^{0,+}$ AT con las del obtenido por el concatenámero rBAT- $b^{0,+}$ AT. También queríamos estudiar si análogamente a $b^{0,+}$ AT, xCT por si sólo es suficiente para generar la actividad x_c^- de transporte, en un entorno libre de subunidades pesadas.

3. Purificar, reconstituir y caracterizar funcionalmente $b^{0,+}$ AT y xCT producidas en *Pichia pastoris*.

Si el apartado 2 daba resultados relevantes, queríamos estudiar si $b^{0,+}$ AT producido en *Pichia pastoris* es activo para usarlo como control positivo de reconstitución y estudiar si análogamente a $b^{0,+}$ AT, xCT por si sólo es suficiente para generar la actividad x_c^- de transporte.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

1. Clonación y expresión de $b^{0,+}$ AT, el concatenámero rBAT- $b^{0,+}$ AT y xCT en *Pichia pastoris*.

La clonación, tal y como se describe en el Apéndice B de Material y Métodos, mediante PCR de $b^{0,+}$ AT, del concatenámero rBAT- $b^{0,+}$ AT y de xCT modificando el primer aminoácido

posterior al ATG inicial y su posterior inclusión en el vector inducible pPICZ-B (Invitrogen) permitió su sobreexpresión en membrana mediante el uso de la cepa GS115 de *Pichia pastoris* (ver apartado 3.2 de Material y métodos). Una vez comprobados al menos 6 clones de cada uno se escogió el que mayor sobreexpresión producía en cada caso (figura 1):

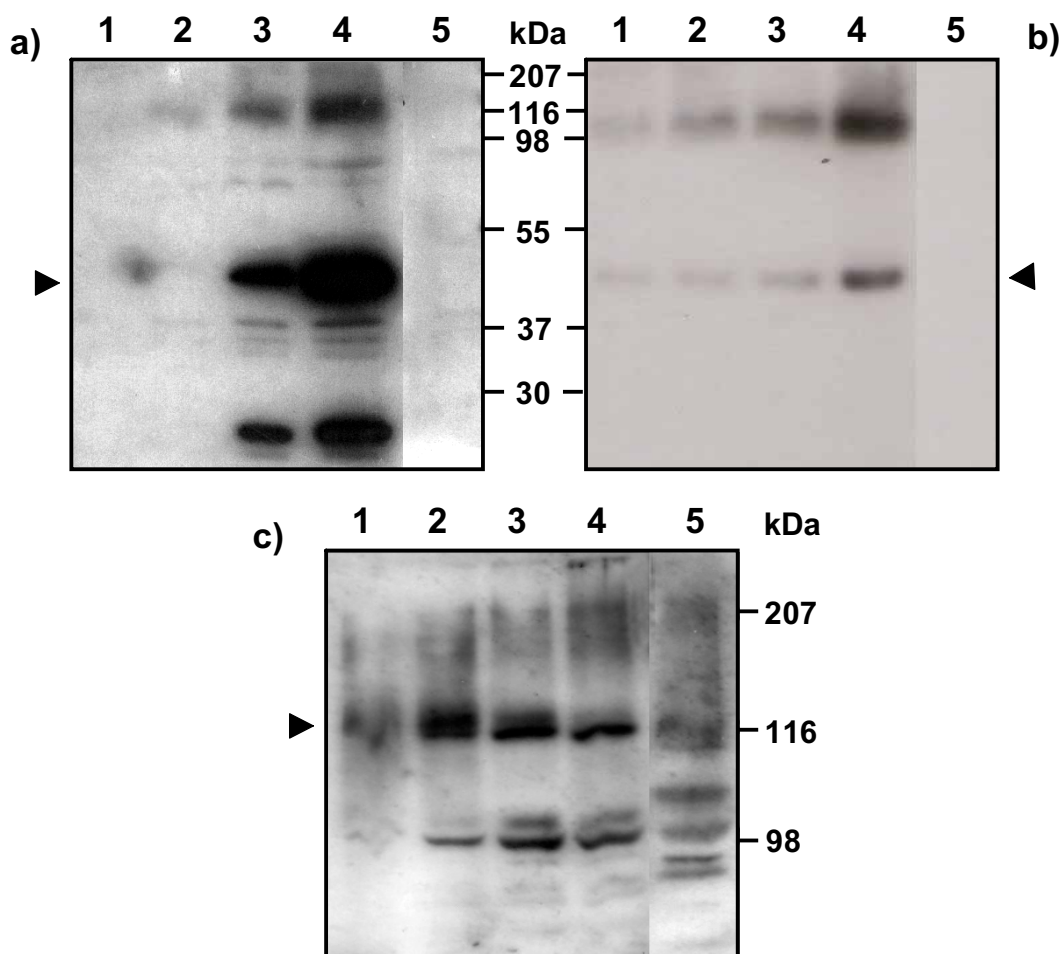


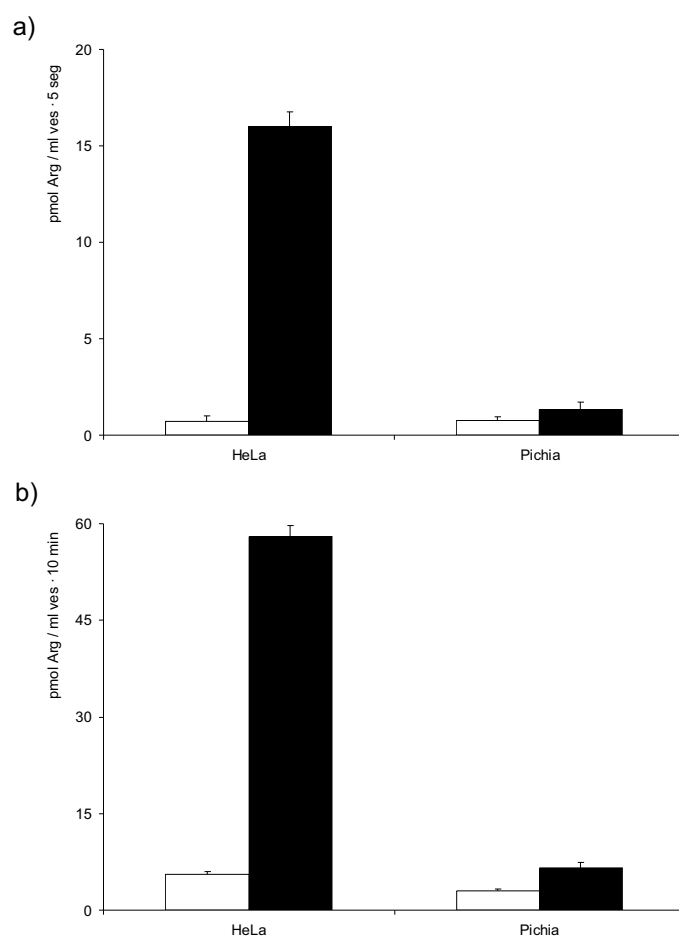
Figura 1. Expresión del mejor clon de *Pichia pastoris* para sobreexpresar $b^{0,+}AT$, el concatenámero rBAT- $b^{0,+}AT$ o xCT. a) *Western blot* con $\alpha b^{0,+}AT$ de la expresión del clón 6 transformado con $b^{0,+}AT$. Se muestra la expresión a las 6 horas (carril 1), 23 horas (carril 2), 47 horas (carril 3) y 79 horas (carril 4) de inducción. El carril 5 corresponde a la inducción durante 79 horas de un clon que sobreexpresa el plásmido vacío. b) *Western blot* con $\alpha Express$ de la expresión del clón 5 transformado con xCT. Se muestra la expresión a las 19 horas (carril 1), 44 horas (carril 2), 68 horas (carril 3) y 76 horas (carril 4) de inducción. El carril 5 corresponde a la inducción durante 76 horas de un clon que sobreexpresa el plásmido vacío. c) *Western blot* con $\alpha b^{0,+}AT$ de la expresión del clón 1 transformado con el concatenámero rBAT- $b^{0,+}AT$. Se muestra la expresión a las 24 horas (carril 1), 48 horas (carril 2), 72 horas (carril 3) y 93 horas (carril 4) de inducción. El carril 5 corresponde a la inducción durante 93 horas de un clon que sobreexpresa el plásmido vacío. La cabeza de flecha negra indica la posición de la banda correspondiente al monómero de $b^{0,+}AT$ (a), de xCT (b) o al concatenámero rBAT- $b^{0,+}AT$ (c).

En todos los casos se escogió un tiempo de inducción de ~70 horas, 8 horas después de la inducción con metanol, por ser el punto más álgido de la expresión. Las sobreexpresiones de $b^{0,+}$ AT y xCT son claramente superiores a la del concatenámero rBAT- $b^{0,+}$ AT, que en este sistema vuelve a mostrar la inherente inestabilidad de rBAT que también se observó en células HeLa (ver Anexo 1).

2. Reconstitución directa (sin purificar) y caracterización funcional de $b^{0,+}$ AT, el concatenámero rBAT- $b^{0,+}$ AT y xCT producido en *Pichia pastoris*.

Una vez escogidos los clones que mayor sobreexpresión de $b^{0,+}$ AT y xCT producían, se decidió intentar la reconstitución directa. Para ello se decidió empezar con $b^{0,+}$ AT, ya que está demostrado que $b^{0,+}$ AT por sí sólo es suficiente para generar actividad de transporte (Reig et al., 2002), aunque es muy posible que xCT también lo sea.

El ensayo de transporte en las mismas condiciones utilizadas para reconstituir $b^{0,+}$ AT producido en células HeLa reportó una actividad de transporte muy baja en los PLs obtenidos a partir de *Pichia pastoris* en comparación a la obtenida en el mismo experimento por los PLs obtenidos a partir de células HeLa (figura 2):



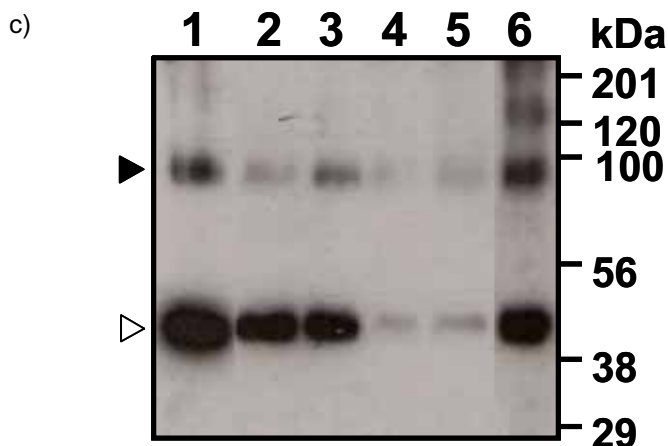


Figura 2. Ensayo de transporte en PLs provenientes de células HeLa transfectadas con $b^{0,+}AT$ (HeLa) o de *Pichia pastoris* transformadas con $b^{0,+}AT$ (*Pichia*). El transporte de $0.5 \mu M$ de L-arginina marcada radiactivamente se midió durante 5 segundos (a) o 10 minutos (b) en PLs que contenían 2 mM L-leucina (barras negras) o ningún aminoácido (barras blancas). Se muestra un experimento representativo. El transporte está expresado por ml de vesícula porque la proteína contenida en los PLs era indetectable. Se muestra un experimento representativo. c) *Western blot* con $\alpha Express$ de extractos de las células HeLa transfectadas con $b^{0,+}AT$ (1), los PLs obtenidos de ellas con 2 mM L-leucina (2) o sin ningún aminoácido (3) en su interior, de los PLs obtenidos a partir de *Pichia pastoris* con 2 mM L-leucina (4) o sin ningún aminoácido (5) en su interior y de extractos de *Pichia pastoris* de las que se obtuvieron (6). La cabeza de flecha blanca indica la posición de la banda correspondiente al monómero de $b^{0,+}AT$ y la cabeza negra la correspondiente al homodímero.

En vista de la poca sensibilidad en el transporte debido a la poca incorporación de $b^{0,+}AT$ en los PLs provenientes de *Pichia pastoris*, se repitió el experimento aumentando la concentración de arginina en el medio externo (figura 3):

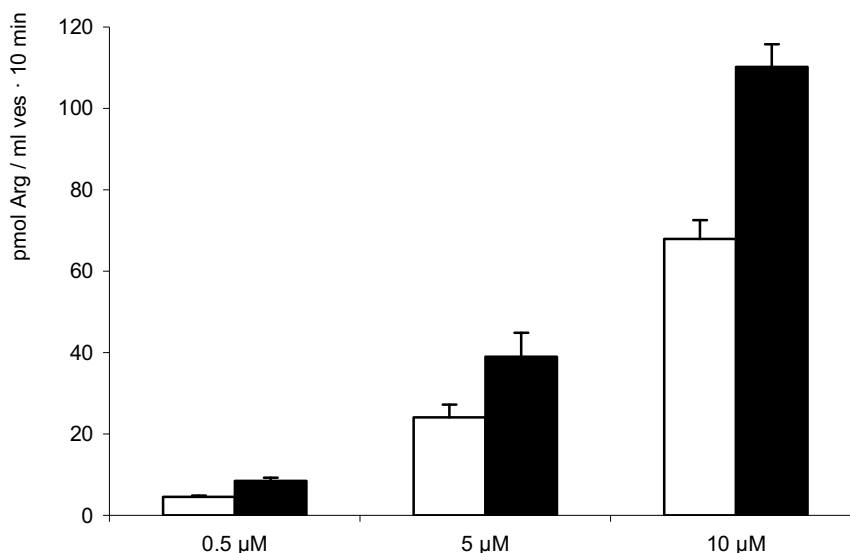


Figura 3. Ensayo de transporte en PLs provenientes de *Pichia pastoris* transformadas con $b^{0,+}$ AT. El transporte de 0.5, 5 ó 10 μ M de L-arginina marcada radiactivamente se midió durante 10 minutos en PLs que contenían 2 mM L-leucina (barras negras) o ningún aminoácido (barras blancas). El transporte está expresado por ml de vesícula porque la proteína contenida en los PLs era indetectable. Se muestra un experimento representativo.

A pesar del resultado negativo obtenido con $b^{0,+}$ AT, se decidió intentar la reconstitución directa del concatenámero rBAT- $b^{0,+}$ AT, pero ésta tampoco reportó una actividad de transporte (figura 4a), de nuevo debido a la baja incorporación de proteína en los PLs (figura 4b):

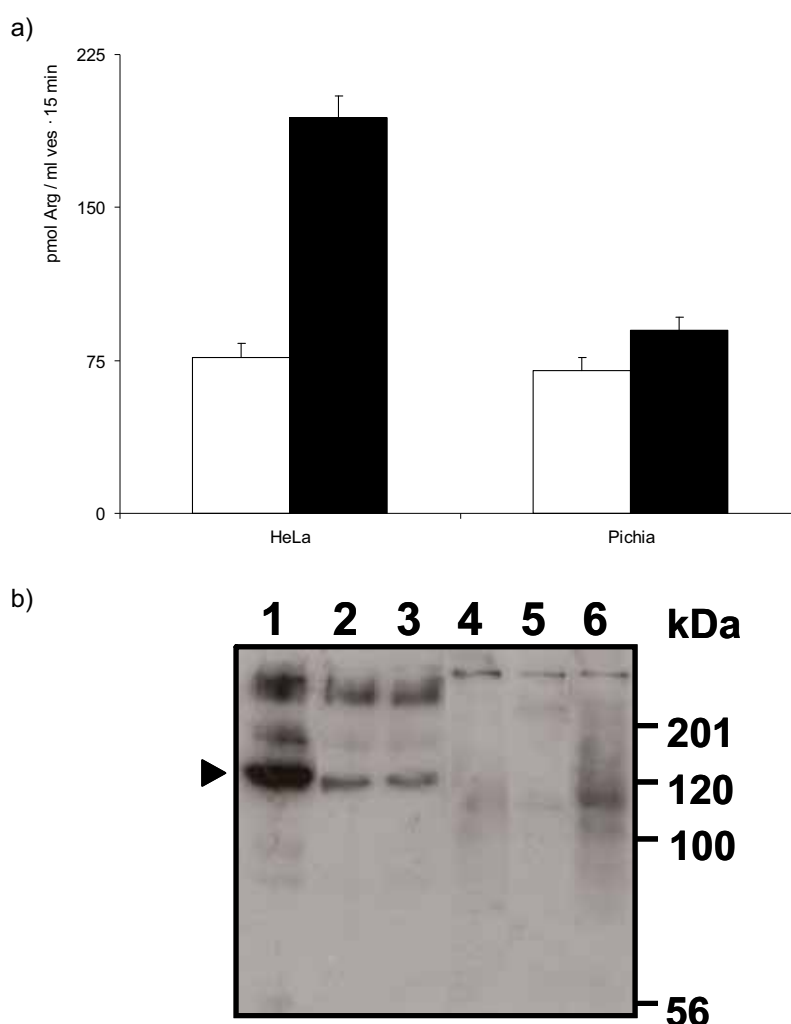


Figura 4. a) Ensayo de transporte en PLs provenientes de células HeLa transfectadas con el concatenámero rBAT- $b^{0,+}$ AT (HeLa) o de *Pichia pastoris* transformadas con el concatenámero rBAT- $b^{0,+}$ AT (Pichia). El transporte de 10 μ M de L-arginina marcada radiactivamente se midió durante 15 minutos en PLs que contenían 2 mM L-leucina (barras negras) o ningún aminoácido (barras blancas). Se muestra un experimento representativo. El transporte está expresado por ml de vesícula porque la proteína contenida en los PLs era indetectable. b) *Western blot* con α Express de extractos de las células HeLa transfectadas con el concatenámero rBAT- $b^{0,+}$ AT (1), los PLs obtenidos de ellas con 2 mM L-leucina (2) o sin ningún aminoácido (3) en su interior, de los PLs obtenidos a partir de *Pichia pastoris* con 2 mM L-

leucina (4) o sin ningún aminoácido (5) en su interior y de extractos de *Pichia pastoris* de las que se obtuvieron (6). La cabeza de flecha negra indica la posición de la banda correspondiente al concaténmero de rBAT-b^{0,+}AT.

A pesar de los resultados negativos obtenidos con b^{0,+}AT y el concaténmero rBAT-b^{0,+}AT se decidió intentar la reconstitución directa de xCT, pero de nuevo esta tampoco reportó una actividad de transporte (figura 5):

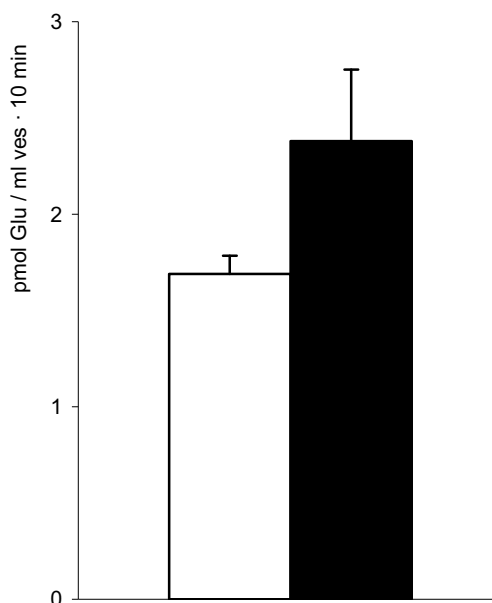


Figura 5. Ensayo de transporte en PLs provenientes de *Pichia pastoris* transformadas con xCT. El transporte de 0.5 μ M de L-glutamato marcado radiactivamente se midió durante 10 minutos en PLs que contenían 2 mM L-glutamato (barra negra) o ningún aminoácido (barra blanca). Se muestra un experimento representativo.

Todos estos resultados nos decidieron a purificar la proteína antes de reconstituirla para intentar aumentar la cantidad de nuestras proteínas en los PLs y eliminar las posibles interferencias debidas al resto de proteínas de membrana de *Pichia pastoris*.

3. Purificación, reconstitución y caracterización funcional de b^{0,+}AT y xCT producidas en *Pichia pastoris*.

La poca expresión del concaténmero rBAT-b^{0,+}AT lo descartó para este tipo de estudios, ya que no es suficiente para reconstituir una vez purificado.

Las pruebas de solubilización de b^{0,+}AT y xCT con diferentes detergentes (DDM, DM, DDM + DM y OG entre 0.1 y 4%) mostraron que el DDM era el mejor en ambos casos, al igual que pasaba con b^{0,+}AT producido en células HeLa. A pesar de ser el mejor, el DDM sólo

conseguía solubilizar entre un 40 y un 60% de $b^{0,+}$ AT según el experimento, en un rango entre el 0.5 y el 2% (figura 6). Por ello, se decidió utilizar 0.5% DDM, al ser la menor concentración de detergente que ya consigue la máxima solubilización.

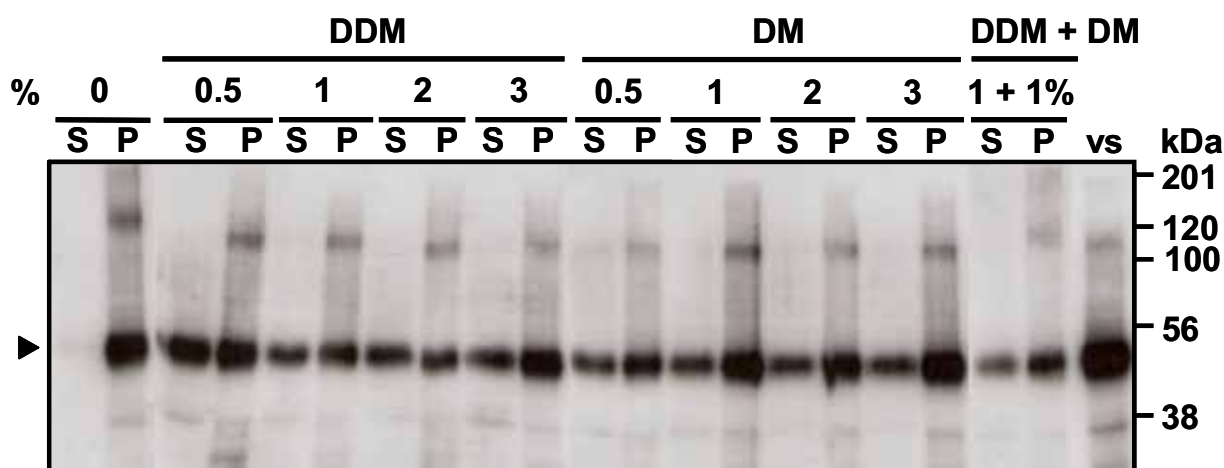


Figura 6. *Western blot* con la HisProbe del sobrenadante (S) y el precipitado (P) después de 1 hora de centrifugación a 100000 g y 4 °C de la solubilización con el detergente indicado de las membranas totales de *Pichia pastoris* sobreexpresando $b^{0,+}$ AT. La concentración de detergente se muestra en porcentaje. Se observa que sin detergente casi todo $b^{0,+}$ AT está en el precipitado mientras que un 0.5% de DDM ya es suficiente para que conseguir un 50% de solubilización de $b^{0,+}$ AT. El carril vs representa las membranas antes de la solubilización. La cabeza de flecha negra señala la altura de la banda correspondiente al monómero de $b^{0,+}$ AT.

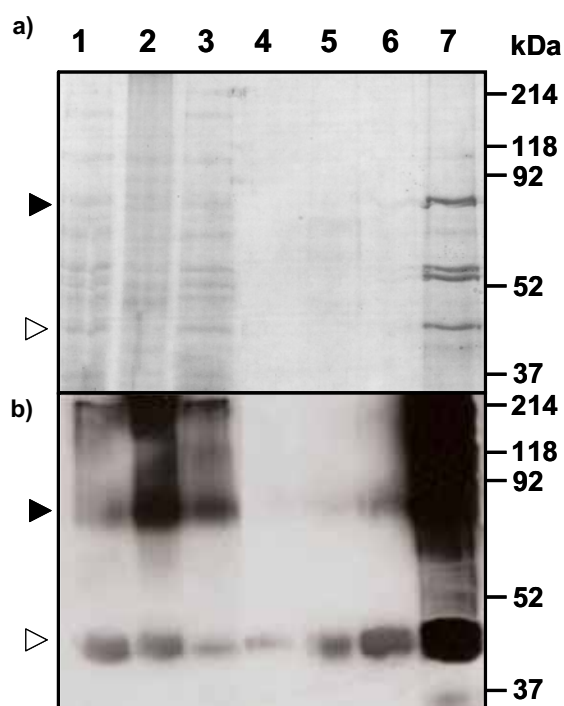


Figura 7. *Coomassie Brilliant Blue* (a) y *Western blot* con α Express (b) de la purificación de $b^{0,+}$ AT producido en *Pichia pastoris*. La purificación de $b^{0,+}$ AT expresado con una cola de 6 histidinas se realizó

mediante una cromatografía de afinidad de Níquel: carril 1, sobrenadante después de solubilizar con 0.5% DDM y ultracentrifugar; carril 2, precipitado posterior a la ultracentrifugación; carril 3, fracción no unida a la columna de Ni²⁺-NTA; carril 4, primer lavado con 10 mM imidazol; carril 5, segundo lavado con 20 mM imidazol; carril 6, tercer lavado con 20 mM imidazol; carril 7, elución con 200 mM imidazol. Se cargaron por carril: 4 µg (carriles 1-3) y 3 µg (carril 7). De los carriles 4-6 se cargó el volumen equivalente al carril 7 por no tener sensibilidad en la valoración de proteína. La cabeza de flecha vacía indica la posición de la banda correspondiente al monómero de b^{0,+}AT y la cabeza de flecha negra la correspondiente al homodímero de b^{0,+}AT.

La posterior optimización de las condiciones de purificación con una columna de afinidad de níquel de b^{0,+}AT con la cola de 6 histidinas en el N-terminal, permitió conseguir un rendimiento de 0.1 mg de b^{0,+}AT con una pureza aproximadamente del 50% por cada litro de cultivo de *Pichia pastoris* (figura 7).

La proteína purificada fue concentrada en un Amicon con un poro de 10 kDa antes de reconstituirla siguiendo el protocolo establecido en nuestro laboratorio por la Dra. N. Reig para SteT producido en *E. coli* (ver apartado 5.2 de Material y Métodos). El ensayo de transporte realizado con estos PLs no produjo ningún resultado positivo de transporte a pesar de la gran cantidad de b^{0,+}AT presente en los PLs (figura 8):

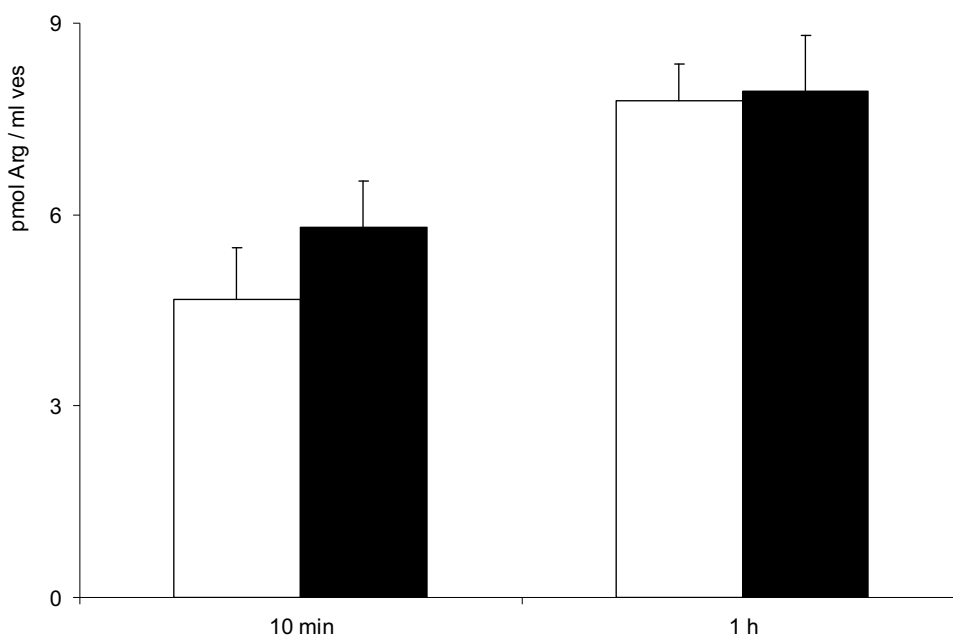


Figura 8. Ensayo de transporte en PLs provenientes de *Pichia pastoris* transformadas con b^{0,+}AT. El transporte de 0.5 µM de L-arginina marcada radiactivamente se midió durante 10 minutos (10 min) o 1 hora (1h) en PLs que contenían 2 mM L-leucina (barras negras) o ningún aminoácido (barras blancas). El transporte está expresado por ml de vesícula porque la proteína contenida en los PLs era indetectable. Se muestra un experimento representativo.

La repetición de este experimento variando la relación proteína:lípido entre 1:15 y 1:100 o cambiando los lípidos usados en la reconstitución previa purificación por los usados en la reconstitución directa tampoco alteró los resultados obtenidos.

Esto parece indicar que la proteína $b^{0,+}$ AT producida en *Pichia pastoris* no es funcional. Para comprobar el estado de $b^{0,+}$ AT producida en *Pichia pastoris* se realizó un BN-PAGE con la ayuda de la Dra. E. Fernández para compararla con la producida en células HeLa (figura 9):

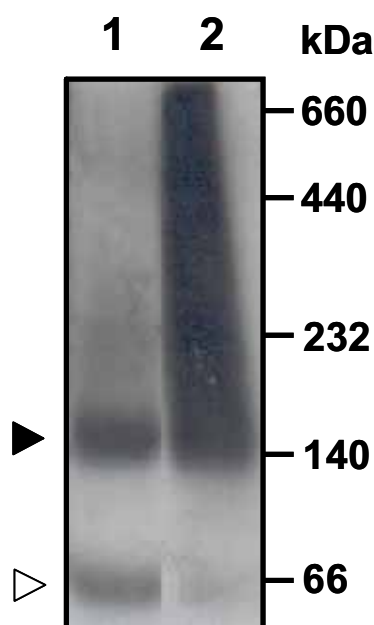


Figura 9. Comparación en condiciones nativas de la proteína $b^{0,+}$ AT producida en HeLa y en *Pichia pastoris*. *Western blot* con α Express de la BN-PAGE realizada con extractos de las células HeLa transfectadas con $b^{0,+}$ AT (carril 1) o de *Pichia pastoris* transformada con $b^{0,+}$ AT (carril 2). La cabeza de flecha vacía indica la posición de la banda correspondiente al monómero de $b^{0,+}$ AT y la cabeza de flecha negra la correspondiente al homodímero de $b^{0,+}$ AT. La banda continua entre 140 y 660 kDa corresponde a estados de agregación superiores al dímero.

$b^{0,+}$ AT producido en células HeLa presenta dos bandas principales, una banda de peso molecular aparente ~65 kDa que corresponde al monómero y otra de peso molecular aparente ~145 kDa que corresponde al dímero. Por su parte, $b^{0,+}$ AT producido en *Pichia pastoris* parece estar más agregada que la producida en células HeLa, ya que apenas muestra la banda del monómero y por el contrario presenta estados de agregación superiores.

También se realizó un ensayo de inmunolocalización siguiendo el artículo Redding et al., 1991 y con la ayuda de la Dra. M. Camps (datos no mostrados). Este ensayo mostró que las proteínas de $b^{0,+}$ AT se encuentran agrupadas mayoritariamente en el interior de las *Pichia*

pastoris, luego no son capaces de llegar a membrana, reforzando la idea de que están mal plegadas.

Para descartar que el problema fuera que el clon escogido para la producción de b^{0,+}AT produjera la proteína mal plegada debido a que la sobreexpresión era muy elevada, se decidió intentar la reconstitución directa a partir de otros clones y compararla con la del clon escogido inicialmente, el clon 6 (figura 10):

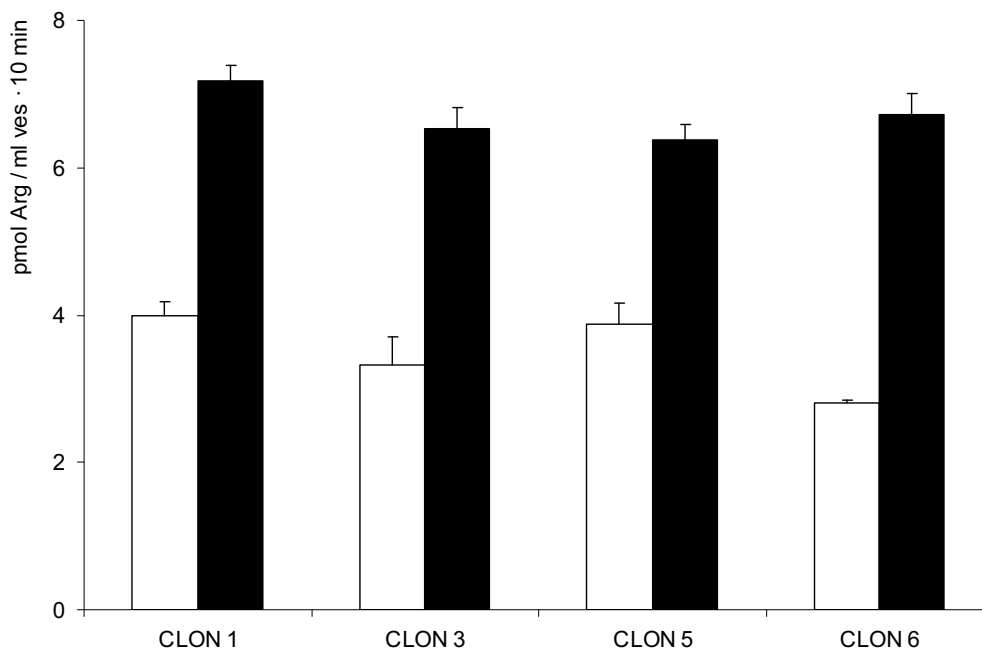


Figura 10. Ensayo de transporte en PLs provenientes de diferentes clones de *Pichia pastoris* transformadas con b^{0,+}AT. El transporte de 0.5 μ M de L-arginina marcada radiactivamente se midió durante 10 minutos en PLs que contenían 2 mM L-leucina (barras negras) o ningún aminoácido (barras blancas). El transporte está expresado por ml de vesícula porque la proteína contenida en los PLs era indetectable. Se muestra un experimento representativo.

Este experimento descartó que la inactividad de b^{0,+}AT se debiera al clon escogido y reforzó la idea de que la falta de actividad se debe a un mal plegamiento de b^{0,+}AT producido en *Pichia pastoris*.

Finalmente, la reconstitución de xCT purificado siguiendo el mismo protocolo utilizado para b^{0,+}AT tampoco reportó actividad (figura 11).

El hecho de que los PLs obtenidos a partir de proteína concentrada con el Amicon generen una actividad de transporte similar a la de los PLs obtenidos a partir de proteína sin concentrar indica que el xCT contenido en los PLs no es funcional, ya que una mayor cantidad

de xCT no redonda en un mayor transporte. Este dato junto con los anteriores de b^{0,+}AT nos hace descartar *Pichia pastoris* como vector de expresión de las LSHATs humanas.

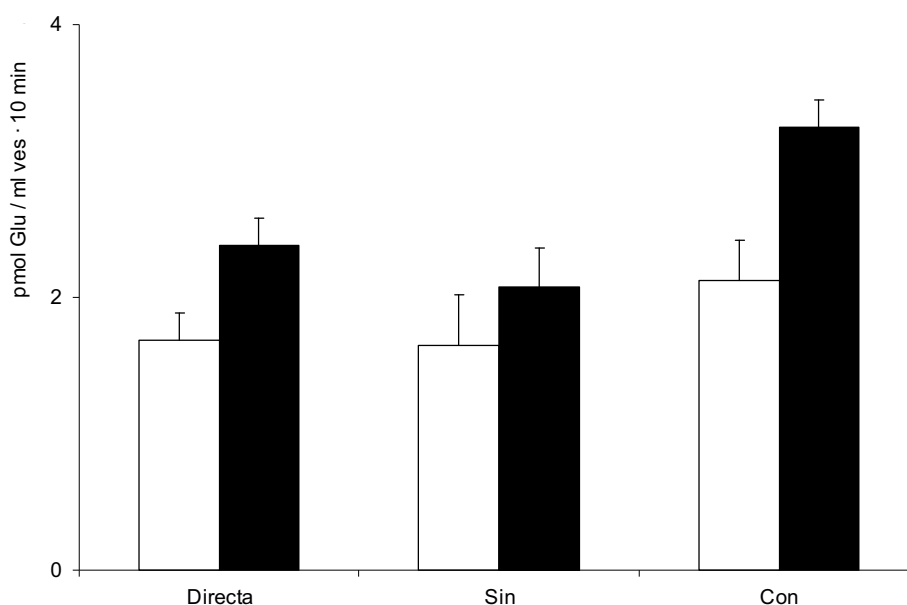


Figura 11. Ensayo de transporte en PLs provenientes de diferentes clones de *Pichia pastoris* transformadas con xCT. Se generaron liposomas por reconstitución directa (Directa) o previa purificación sin concentrar con el Amicon (Sin) o concentrando la proteína 2 veces (Con). El transporte de 0.5 μ M de L-glutamato marcado radiactivamente se midió durante 10 minutos en PLs que contenían 2 mM L-glutamato (barras negras) o ningún aminoácido (barras blancas). El transporte está expresado por ml de vesícula porque la proteína contenida en los PLs era indetectable. Se muestra un experimento representativo.

CONCLUSIONES:

Hemos conseguido sobreexpresar las LSHATs humanas b^{0,+}AT y xCT a gran escala en *Pichia pastoris*, pero no se ha conseguido una buena sobreexpresión del concatenámero rBAT-b^{0,+}AT.

La reconstitución directa de b^{0,+}AT, el concatenámero rBAT-b^{0,+}AT y xCT no ha generado actividades de transporte suficientes para realizar estudios funcionales.

Hemos purificado b^{0,+}AT y xCT con una columna de afinidad de níquel de b^{0,+}AT con la cola de 6 histidinas en el N-terminal, consiguiendo un rendimiento de 0.1 mg de b^{0,+}AT con una pureza aproximadamente del 50% por cada litro de cultivo de *Pichia pastoris*.

La reconstitución de $b^{0,+}$ AT y xCT previamente purificadas tampoco ha generado actividades de transporte suficientes para realizar estudios funcionales.

A pesar de que hemos conseguido expresar y purificar $b^{0,+}$ AT y xCT en gran cantidad parece ser que las proteínas obtenidas no son funcionales.

ANEXO 3. ENSAYOS DE FLUORESCENCIA:

OBJETIVOS:

La fluorescencia con reactivos de cisteínas es una técnica ampliamente utilizada en proteínas de membrana para intentar confirmar la existencia de cambios conformacionales o mirar la proximidad espacial de residuos. Los ensayos de fluorescencia descritos en este anexo fueron realizados en el laboratorio del Dr. J. Hernández-Borrell (U. de Barcelona, Farmacia).

1. Confirmar la existencia de cambios conformacionales en SteT.

Queríamos realizar ensayos de fluorescencia de Trp con SteT y también ensayos de fluorescencia de cisteínas con diferentes reactivos específicos de cisteínas (MIANS, IAEDANS y PM) en SteT. Para ello generamos un SteT *cys/ess*, sobre la base del cual introducir cisteínas únicas para ver si la adición del sustrato hacía variar la fluorescencia.

2. Estudiar si los residuos más importantes del segmento TM VIII están espacialmente próximos al residuo T80 (bucle 2-3) o al residuo C415 (TM XII).

Mediante la generación de excímeros con PM queríamos determinar la proximidad de los residuos más importantes de la hélice VIII (C291, G294 y K295) con el teórico bucle reentrante (descrito en xCT en Gasol et al., 2004) y con la C415, diana del MTSEA que en ausencia de la C291 estimula fuertemente el transporte.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

1. Confirmación de la existencia de cambios conformacionales en SteT.

SteT posee 7 Trp, que teóricamente se encuentran localizados en el medio del TM II, justo antes del TM III, al inicio del TM III, justo antes del TM IV, al final del TM V, al final del TM VI y al inicio del TM IX. Para intentar confirmar la existencia de cambios conformacionales en SteT se decidió empezar por estudiar los cambios en el espectro de emisión de Trp de SteT, ya que si alguno sufría cambios conformacionales podría modificar su espectro de emisión en presencia del sustrato.

Se generaron SteT-PLs con una relación proteína:lípido 1:40, más elevada que la 1:100 utilizada para el transporte para tener más sensibilidad en los experimentos de fluorescencia. Estos PLs se diluyeron en un tampón que contenía 150 mM cloruro de colina, 10 mM Tris-Hepes pH 7.4, 1 mM MgCl₂ y 1 mM CaCl₂ (la misma composición utilizada en el medio de transporte) y se introdujo en una cubeta de cuarzo en el espectrofluorímetro para que se

atemperara a 25 °C. Una vez atemperada, se excitó a 295 nm y se recogió la fluorescencia emitida a 325 nm. La posterior adición de sustrato (15 mM L-serina) o de un aminoácido que no es sustrato (15 mM L-arginina) no produzco ningún cambio en la intensidad de fluorescencia (figura 1):

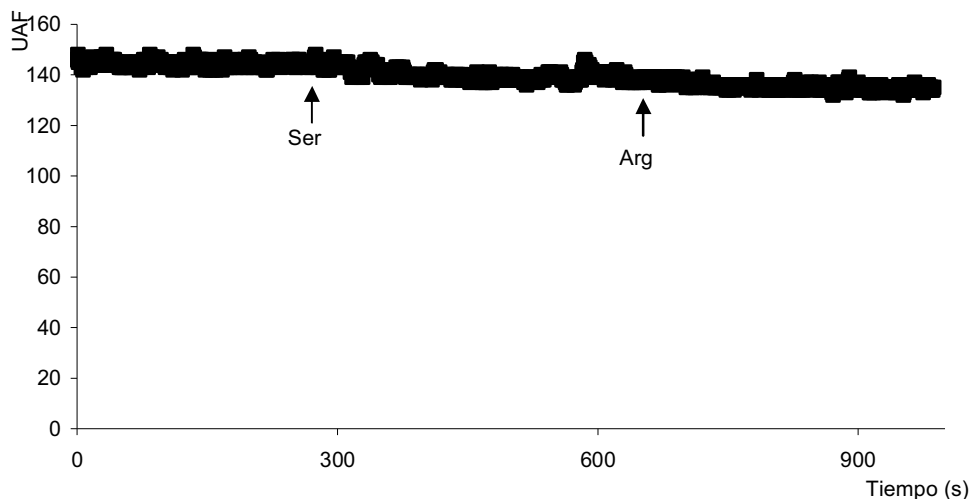


Figura 1. Cinética de emisión de fluorescencia de SteT-PLs. Los SteT-PLs atemperados a 25 °C fueron excitados a 295 nm y se recogió su emisión a 325 nm durante 20 minutos. La adición de 15 mM de L-serina o de L-arginina se produjo donde se señala en cada caso.

Los espectros de emisión de los SteT-PLs (figura 2) tampoco revelaron ningún desplazamiento de la $\lambda_{m\acute{a}x}$, manteniéndose alrededor de 325nm. Esto indica, que o bien no se ha producido ningún cambio en el entorno de ninguno de los Trp de SteT, o bien no tenemos sensibilidad suficiente para verlos.

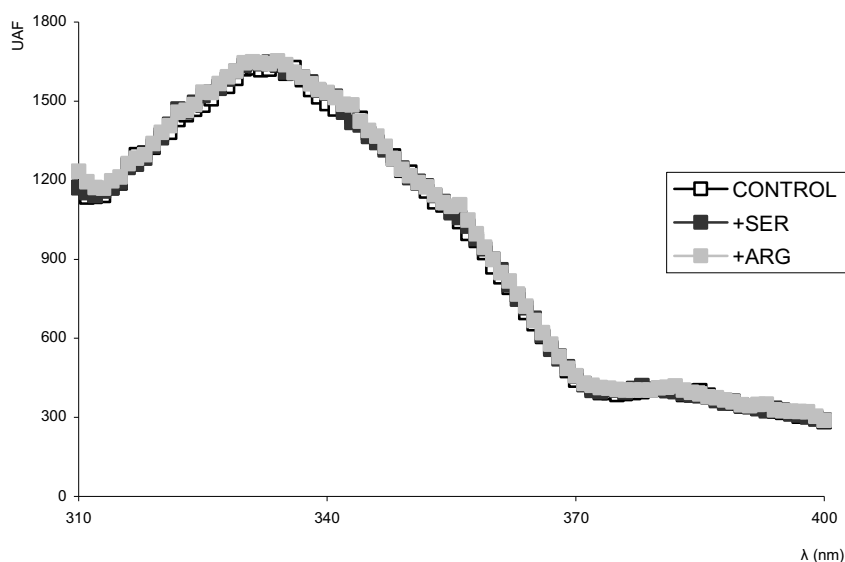
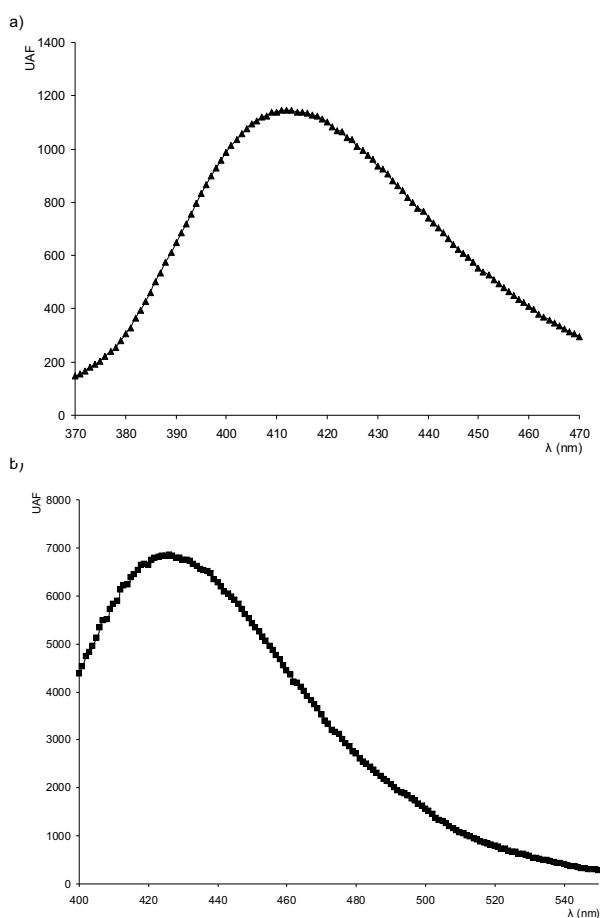


Figura 2. Espectro de emisión de fluorescencia de los SteT-PLs. Los SteT-PLs atemperados a 25 °C fueron excitados a 295 nm y se recogió su emisión entre 310 y 400 nm. No se observan diferencias entre los SteT-PLs (CONTROL), los SteT-PLs a los que se les adicionó 15 mM L-serina (+SER) o a los que se les adicionó 15 mM L-arginina (+ARG).

La repetición de estos experimentos de fluorescencia de Trp variando la relación proteína:lípido de los PLs a 1:100 ó a 1:10 no resultó en ningún cambio (datos no mostrados), por lo que se decidió probar la fluorescencia de cisteínas.

Para determinar las condiciones óptimas del ensayo, se realizaron espectros de emisión de SteT-PLs con los tres reactivos de cisteínas escogidos. Con estos datos se ajustaron las $\lambda_{\text{máx}}$ para los estudios cinéticos, pero en ninguno de los casos se apreció una variación significativa de la fluorescencia al añadir el sustrato con ninguno de los tres reactivos de cisteínas, MIANS, IAEDANS ni PM (datos no mostrados).

Debido a que trabajar con PLs es más complicado que con proteína purificada en solución, este mismo experimento se realizó también usando proteína purificada en lugar de PLs. Los espectros obtenidos con SteT purificado en solución (figura 3) fueron muy similares a los obtenidos con los SteT-PLs.



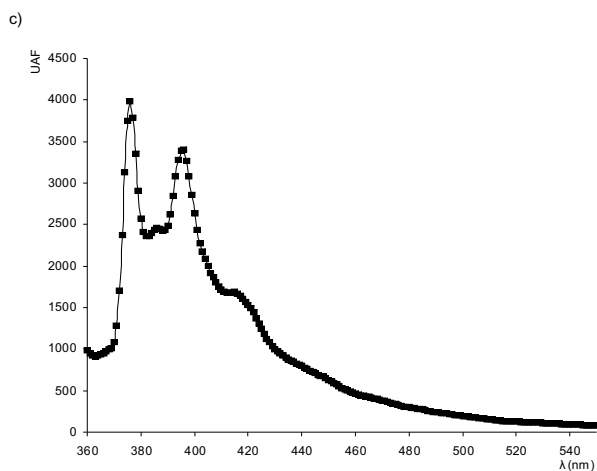


Figura 3. Espectro de emisión de fluorescencia de SteT purificado en solución atemperado a 25 °C. a) Espectro de emisión de fluorescencia de los SteT purificado en solución con MIANS: una vez excitados a 330 nm, se recogió su emisión entre 370 y 470 nm. b) Espectro de emisión de fluorescencia de los SteT purificado en solución con IAEDANS: una vez excitados a 336 nm, se recogió su emisión entre 400 y 550 nm. c) Espectro de emisión de fluorescencia de los SteT purificado en solución con PM: una vez excitados a 338 nm, se recogió su emisión entre 360 y 550 nm.

Con estos datos se ajustaron las $\lambda_{\text{máx}}$ para los estudios cinéticos, pero con ninguno de los tres reactivos se apreció una variación significativa de la fluorescencia al añadir el sustrato. En la figura 4 se muestra la cinética de SteT con MIANS a modo de ejemplo:

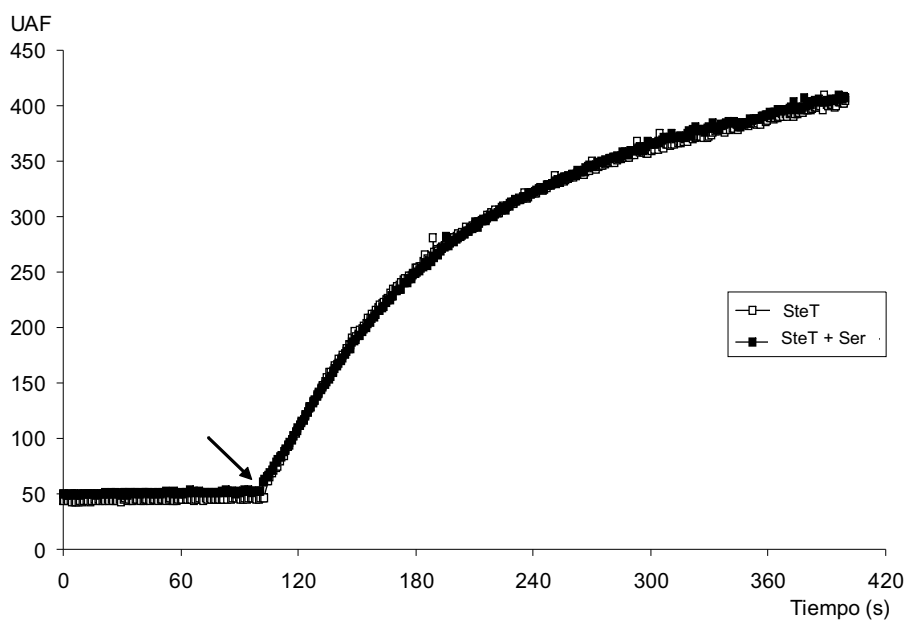


Figura 4. Cinética de emisión de fluorescencia de SteT purificado en solución con MIANS. SteT purificado en solución fue atemperado a 25 °C, excitado a 330 nm y se recogió su emisión a 410 nm durante 7 minutos. La adición de 15 mM de L-serina desde el inicio no produjo ningún cambio en la intensidad de fluorescencia observada. La adición de 5 μM MIANS se produjo cuando indica la flecha.

El hecho de que no se observaran cambios al añadir sustrato con ninguno de los tres reactivos de cisteínas puede deberse a falta de sensibilidad, ya que los cambios en una cisteína podrían verse apantallados por las otras cuatro cisteínas.

Para evitar esta falta de sensibilidad al trabajar con SteT se generó un SteT *cysless*, sobre el cual se introdujeron cisteínas únicas, usando SteT *cysless* como control negativo.

La cinética con MIANS reveló que tal y como se esperaba SteT *cysless* no se marcaba. También se vio que *cysless* S41C tampoco se marcaba, a pesar de estar en el bucle 1-2, que se supone está expuesto al medio externo. Por el contrario, *cysless* C291 (localizado en medio del TM VIII) y *cysless* K317C (situado en el bucle 8-9, teóricamente corresponde al ápice del segundo bucle reentrante) sí se marcaban claramente (figura 5):

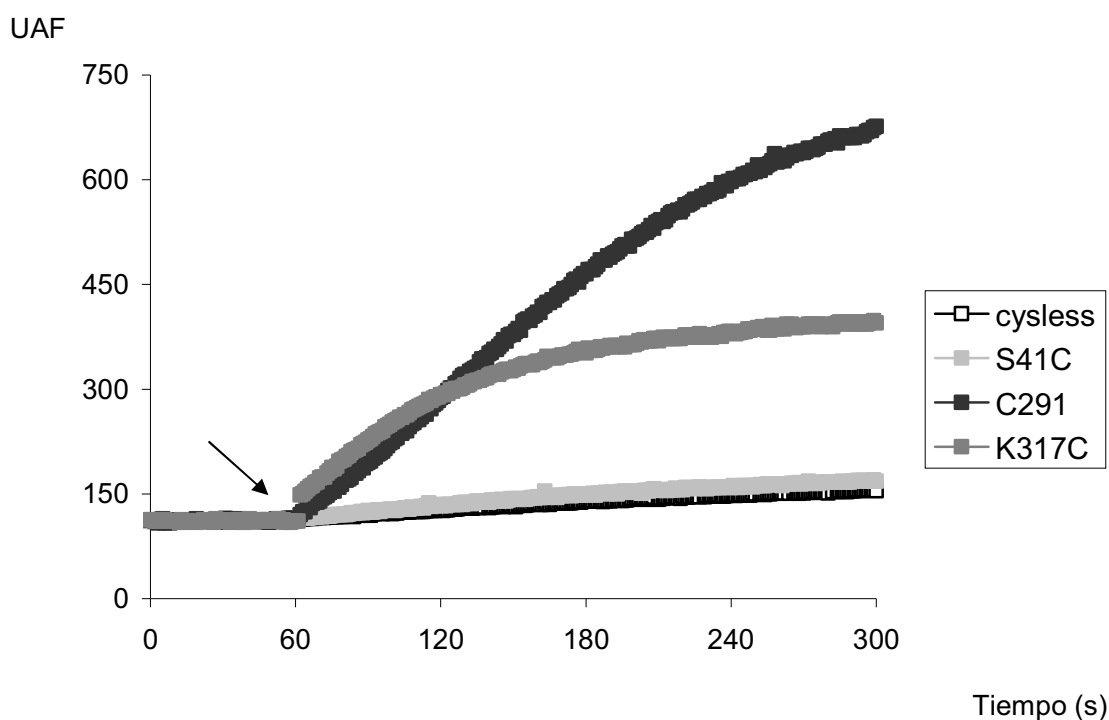


Figura 5. Cinética de emisión de fluorescencia de SteT *cysless*, *cysless* S41C, *cysless* C291 y *cysless* K317C purificados en solución con MIANS. Todos los mutantes purificados en solución fueron atemperados a 25 °C, excitados a 330 nm y se recogió su emisión a 410 nm durante 5 minutos. La adición de 5 µM MIANS se produjo cuando indica la flecha.

El mismo experimento realizado con PM confirmó que *cysless* no era capaz de marcarse y que *cysless* S41C se marcaba muy poco, a diferencia de *cysless* C291 y *cysless* K317C que se marcaban claramente (figura 6).

Las cinéticas y los espectros de estos mutantes, tanto con MIANS (datos no mostrados) como con PM (datos no mostrados) no mostraron ningún tipo de cambio con la

adición de un aminoácido sustrato (L-serina) como con la de otro que no es sustrato (L-arginina).

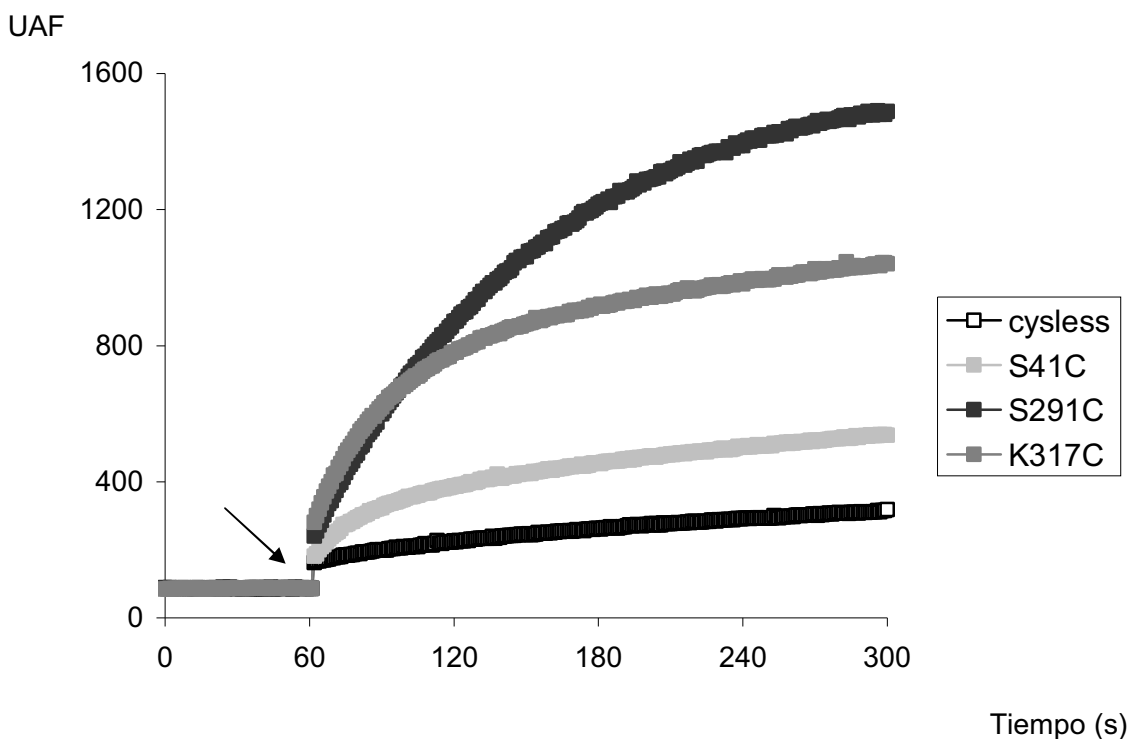


Figura 6. Cinética de emisión de fluorescencia de SteT *cysless*, *cysless* S41C, *cysless* C291 y *cysless* K317C purificados en solución con PM. Todos los mutantes purificados en solución fueron atemperados a 25 °C, excitados a 338 nm y se recogió su emisión a 375 nm durante 5 minutos. La adición de 5 μ M PM se produjo cuando indica la flecha.

Esto puede indicar dos cosas, o bien no tenemos suficiente sensibilidad para poder ver los cambios conformacionales de SteT, o bien SteT no posee cambios conformacionales significativos en los residuos estudiados.

2. Estudio de la proximidad espacial de los residuos más importantes del segmento TM VIII con el residuo T80 (bucle 2-3) y el residuo C415 (TM XII).

Aprovechando que el PM es un reactivo de cisteínas que sirve para estudiar la formación de dímeros de estado excitado (excímeros), se generaron los dobles mutantes de cisteína: *cysless* T80C C291, *cysless* T80C G294C, *cysless* T80C K295C y *cysless* C291 C415 para estudiar la proximidad del teórico ápice del primer bucle reentrante con el segmento TM VIII y la proximidad de las cisteínas endógenas C291 y C415, debido a que la primera es la diana del MTSET que inactiva el transporte (ver figuras 29, 30, 31 y 32 en Resultados) y la

segunda en ausencia de la primera es la diana del MTSEA que activa el transporte (ver figura 33 en Resultados).

Se realizó un espectro de absorción de todos los dobles mutantes de cisteína generados, previamente purificados e incubados O/N con PM, entre 310 y 370 nm y se vio que en todas las muestras el máximo se encontraba a 343 nm, con unas intensidades entre 0.176 y 0.330. Para realizar ensayos de fluorescencia este valor no debe ser superior a 0.01, por lo que se diluyó la proteína por debajo de este umbral y se realizaron espectros de emisión entre 360 y 550 nm con todos los dobles mutantes de cisteína, en ausencia o presencia del sustrato, pero en ninguno apareció el pico correspondiente al excímero (alrededor de 450-475 nm) (figura 7):

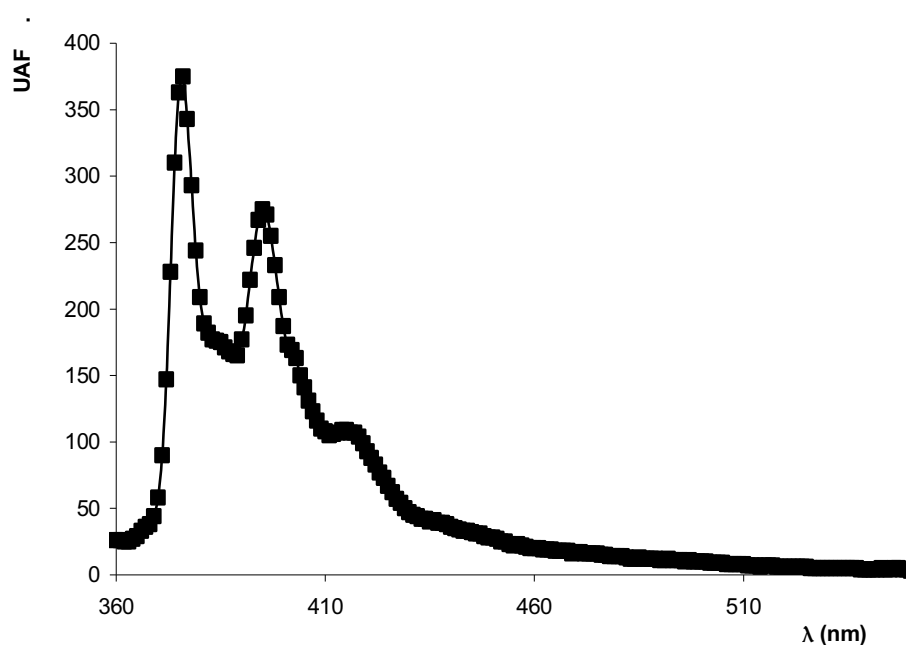


Figura 7. Espectro de fluorescencia del *cysless* T80CS291C con PM. El mutante *cysless* T80CS291C purificado se hizo reaccionar con PM protegido de la luz y después se bloqueó el exceso con DTT antes de ser eliminado con una columna de gel filtración. La proteína resultante se valoró por el método de BCA y se midió su A_{343} para que no fuera superior a 0.01 en la cubeta. Excitando a 338 nm se recogió el espectro de emisión entre 360 y 550 nm. A 375 nm se observa el pico de emisión principal del PM, mientras que el pico de emisión secundaria se observa a 395 nm. El pico correspondiente al excímero debería aparecer alrededor de 460 nm.

Esta técnica es muy sensible a la distancia, de manera que estos resultados no descartan que el segmento TM VIII esté próximo al primer bucle reentrante o al segmento TM XII. Se deberían realizar más mutantes similares a los aquí descritos para intentar ver la formación de excímeros antes de sacar conclusiones definitivas.

CONCLUSIONES:

No hemos conseguido ver cambios conformacionales en SteT, ni mediante fluorescencia de Trp en SteT, ni mediante fluorescencia de cisteínas en SteT ni en varios mutantes únicos de cisteínas.

No hemos sido capaces de demostrar la proximidad del segmento TM VIII con el primer bucle reentrante, ni con el segmento TM XII.

ANEXO 4. ARTÍCULO DE PRIMER AUTOR.