

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

Raúl Estévez Povedano

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

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

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

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

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

**RAÚL ESTÉVEZ POVEDANO**

Barcelona, desembre de 1999

## RESULTATS I DISCUSSIÓ

### 1. ANÀLISI DEL MUTANT DE rBAT MET467LYS EN OÒCITS DE *XENOPUS*. COMPARACIÓ AMB EL MUTANT MET467THR (TREBALL 1)

La mutació més comuna en el gen rBAT present en pacients cistinúrics és el canvi de la metionina 467 per la treonina. El doctor Josep Chillarón, del nostre grup, va construir per mutagènesi dirigida un cDNA d'rBAT humà (hrBAT) que presentava aquest canvi. En expressar-lo en oòcits va observar que hi havia un defecte en el transport induït en comparació amb la proteïna salvatge. En canvi, en comparar el transport induït dies després de la injecció, es va observar que el percentatge d'inhibició respecte a la proteïna salvatge anava disminuint. Aquest comportament de la proteïna mutada plantejava el dubte de si els malalts que tinguessin aquesta mutació tindrien el defecte o no.

Per intentar resoldre aquesta qüestió, vaig construir per mutagènesi dirigida un cDNA d'rBAT amb la mutació Met467Lys, canvi que pensàvem que seria més dràstic, ja que introduïa una càrrega positiva. Aquesta mutació s'havia trobat en un pacient cistinúric que era un heterozigot compost: en un dels al·lels tenia aquesta mutació i a l'altre la mutació Leu678Pro (Calonge *et al.*, 1994). En analitzar el transport induït per la proteïna mutada Met467Lys en oòcits, es va observar que presentava un defecte clar, però sense arribar mai a una recuperació com en el cas del mutant Met467Thr. Aquest fet reafirmava més fortament la implicació d'rBAT com a gen responsable de cistinúria.

Igual que el mutant Met467Thr, el percentatge d'inhibició també anava disminuint en analitzar el transport dies després de la injecció, però sense arribar als nivells de la proteïna salvatge. Es va observar també que aquest efecte de recuperació de la funció en les proteïnes mutades també era dependent de la dosi de cRNA injectada: amn més proteïna expressada la recuperació es produeix més ràpidament. (figura 1)

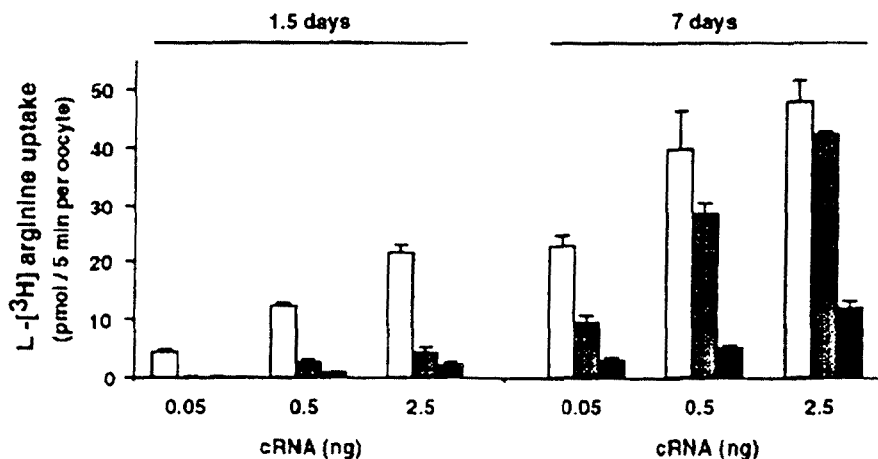


Figura 1. Dependència del transport induït per la proteïna salvatge (barres blanques) i els mutants M467T (barres grises) i M467K (barres negres) en oòcits, per la quantitat de cRNA injectat i els dies d'expressió.

Per tal d'estudiar quina era la causa d'aquest defecte en el mutant Met467Lys, es va fer una cinètica per determinar els paràmetres cinètics. Així, es va veure que no hi havia cap canvi en la constant  $K_m$  respecte a la proteïna salvatge, però sí que hi havia canvis en la velocitat màxima. Per intentar caracteritzar millor funcionalment aquest mutant, A. Busch, el nostre col·laborador a Tübingen, va intentar estudiar-ho mitjançant mesures elèctriques, però no hi havia suficient sensibilitat per tenir mesures significatives.

Una possible causa que expliqués aquest defecte seria una menor quantitat de proteïna present, ja sigui per una taxa de síntesi o per una estabilitat inferior a la proteïna salvatge. Per respondre a aquesta pregunta es va analitzar per transferència western emprant membranes totals d'oòcits i es va veure que no hi havia diferències quantitatives. En fer la transferència western es va veure un resultat sorprenent: els mutants Met467Thr i Met467Lys presentaven un aspecte qualitatiu diferent a la proteïna salvatge. Mentre que la proteïna salvatge presenta 2 bandes de mobilitat electroforètica de pesos 94 kD i 85 kD, les proteïnes mutades només presentaven una única banda de 85 kD. Es va hipotetitzar que la banda de 85 kD seria en realitat precursora de la banda de 94 kD, però sense haver sofert totes les modificacions posttraduccional.

Les proteïnes de membrana que són glicosilades en passar del reticle endoplasmàtic fins al complex de Golgi, sofreixen unes modificacions en la cadena de sucres que fa que adquireixin la propietat de ser resistents a la digestió amb endoglicosidasa H (Gennis *et al.*, 1989). Així, es van incubar membranes totals d'oòcits injectats amb la proteïna salvatge, les mutades i les membranes de ronyó amb la endoglicosidasa H. Es va observar que la mobilitat de la banda de 94 kD només es modificava lleugerament (igual que la proteïna de membranes de ronyó), mentre que totes les bandes de 85 kD passaven a tenir una mobilitat de 72 kD, (figura 2), fet que confirmava la hipòtesi que la banda de 94 kD representa la proteïna rBAT completament madurada i la banda de 85 kD una forma precursora d'aquesta.

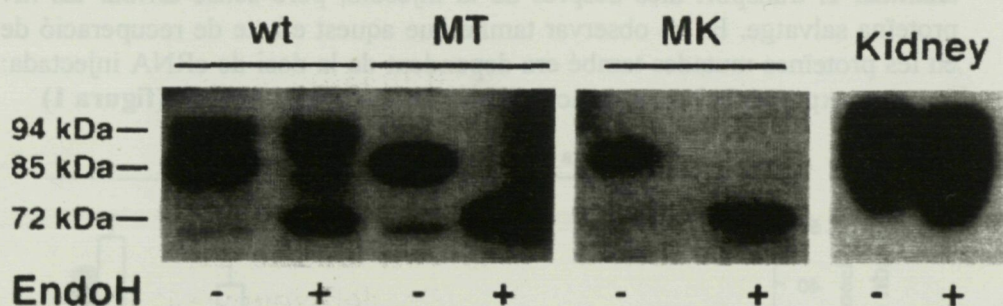


Figura 2. Sensibilitat de les proteïnes rBAT salvatge (WT), mutant Met467Thr (MT), mutant Met 467Lys (MK) expressades en oòcits i la proteïna de membranes de ronyó (Kidney) a l'endoglicosidasa H.

Així, tant el mutant M467Thr com el mutant Met467Lys presenten un defecte en les modificacions posttraduccional en el pas des del reticle endoplasmàtic fins al complex de Golgi, ja que no presenten la forma madura de la proteïna.

Ens vam preguntar llavors si aquesta proteïna precursora d'rBAT (85 kD) en les proteïnes mutades podria trobar-se en la membrana plasmàtica, o si, per contra,

presentava una localització intracel·lular. Per poder respondre a aquesta pregunta es van fer experiments de biotinilació per poder aïllar específicament les proteïnes presents en la membrana. Es va fer servir com a control intern la proteïna  $\beta_1$ -integrina d'oòcits que presenta dues formes: una de 115 kD, present únicament en la superfície, i una altra de 100 kD, present en membranes intracel·lulars (Müller *et al.*, 1993). Els resultats mostren, que 6 dies després de la injecció (és a dir, en condicions de saturació del transport) la forma de 85 kD no és present a la superfície en oòcits injectats amb la proteïna salvatge, però sí que és present i en menor quantitat en oòcits injectats amb les proteïnes mutades. A més s'observa una quantitat més gran de proteïna precursora (85 kD) en membranes intracel·lulars en oòcits injectats amb les proteïnes mutades. També es van obtenir resultats similars pel mutant Met467Lys.

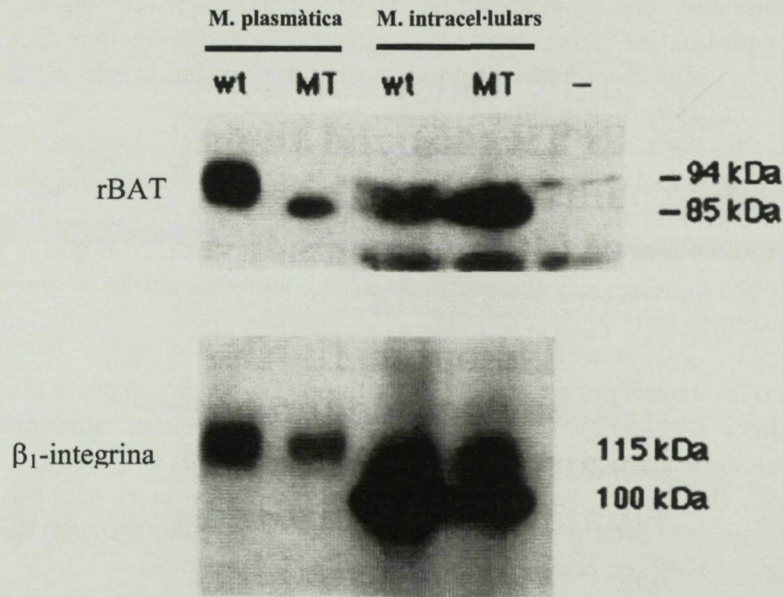


Figura 3. Detecció de la proteïna rBAT salvatge (wt), Met467Thr (MT) present en la membrana plasmàtica. El carril amb el símbol (-) correspon a oòcits no injectats i representa el senyal inespecífic. La part inferior de la figura mostra la detecció de la proteïna  $\beta_1$ -integrina d'oòcits com a control de que no tenim contaminació de membranes intracel·lulars.

Davant d'aquest resultat ens vam plantejar diverses preguntes. Una primera pregunta seria la següent: com podem explicar que tinguem proteïna no completament madura a la membrana plasmàtica?. Es poden plantejar dues hipòtesis: A) aquesta mutació provoca un canvi conformacional a la proteïna que impedeix l'acció dels enzims presents en el complex de Golgi. Aquest tipus de mecanisme s'ha descrit per a alguns mutants de l'enzim sacarosa-isomaltasa (Fransen *et al.*, 1991); B) hi ha un tràfic directe des del reticle endoplàsmic cap a la membrana plasmàtica. Encara que aquesta via no s'ha descrit, podríem suposar que es deu a un artefacte de la sobreexpressió en l'oòcit de *Xenopus*. Aquesta segona possibilitat estaria d'acord amb les dades de recuperació de la funció de la dosi de cRNA injectat i els dies d'expressió. Així, en expressar més proteïna estaríem sobresaturant el sistema de retenció de proteïnes anòmales de l'oòcit.

Per què aquestes proteïnes anòmales no es degraden? Una possible explicació seria que les vies de degradació estarien inhibides a temperatures baixes, temperatures a les quals

s'incuben els oòcits. Un exemple similar el tenim per la proteïna  $\Delta F508$  CFTR (transportador de clor implicat en la malaltia de la fibrosi quística); no es degrada en oòcits ni en línies cel·lulars cultivades a baixes temperatures però sí quan s'incuba a 37°C (Denning *et al.*, 1992).

Una altra observació que podem extreure d'aquest resultat (**figura 3**), és que aquestes modificacions en la glicosilació no són importants per a la funció, ja que 6 dies més tard s'observa que el mutant Met467Thr és completament normal. D'altra banda, observem també que no hi ha correlació entre la proteïna a la superfície i la funció, ja que per al mutant Met467Thr tenim menys proteïna en la membrana, però té la mateixa velocitat màxima que la proteïna salvatge. Per tant, hem de suposar que tenim, en el cas de la proteïna salvatge, una gran quantitat de proteïna rBAT que no és funcional en la membrana plasmàtica. Així, tenim una altra prova indirecta que rBAT per si sol no constitueix la unitat responsable del transportador  $b^{0,+}$ , sinó que ha de ser un activador o un constituent del veritable transportador.

Com podem extrapolar els resultats obtinguts a partir de l'oòcit a la situació natural que s'esdevindria en un pacient cistinúric? Podem pensar que en una cel·lula renal, aquestes proteïnes tindran problemes en el seu trànsit intracel·lular i, com que la temperatura a la qual es troben aquestes cel·lules seria de 37 °C, aquestes serien degradades pel sistema del proteosoma.

Quines són les causes per explicar les diferències de funció respecte als mutants d'rBAT Met467Thr i Met467Lys? Una possibilitat seria que les alteracions presents en l'estructura de la proteïna mutada Met467Lys serien més importants que en el mutant Met467Thr, atès que el canvi de la mutació introdueix una càrrega positiva. Era difícil poder dir amb més detall quina era la causa, ja que no sabíem encara quina era la funció de la proteïna rBAT en el context del transport d'aminoàcids.

Altres mutants que s'han trobat posteriorment per a altres grups (Saadi *et al.*, 1998) presenten el mateix fenotip de recuperació de la funció per dies i dosis de proteïna expressada. Això fa que el sistema d'expressió de l'oòcit de *Xenopus* no sigui l'ídoni per estudiar aquests tipus de mutacions.

## **2. ANÀLISI DE LES ACTIVITATS $b^{0,+}$ I $y^+$ L INDUÏDES PER rBAT I 4F2hc EN OÒCITS DE XENOPUS COM A BASE PER ENTENDRE LA REABSORCIÓ D'AMINOÀCIDS BÀSICS I CISTINA (TREBALL 2)**

Després del treball anterior i d'altres treballs fets per altres grups de recerca, quedava clara la implicació del gen rBAT en la reabsorció d'aminoàcids bàsics i cistina; així, les mutacions en rBAT causaven cistinúria, malaltia que té com a fenotip la hiperexcreció d'aquests aminoàcids.

Treballs posteriors del nostre grup fets per Conxi Mora reforçaven més aquesta idea. La doctora Mora va caracteritzar les activitats de transport que hi havia en una línia cel·lular de ronyó, les cel·lules OK (*Opossum Kidney*), provinents de túbul proximal. Va observar que aquestes cel·lules presentaven una activitat de transport de cistina d'alta afinitat independent de  $Na^+$  compartida amb aminoàcids bàsics de localització

apical. Posteriorment, fent servir una estratègia d'antisentit transfectant un fragment del cDNA d'rBAT clonat de manera inversa, van aconseguir reduir els nivells de missatger de rBAT de les cèl·lules en un 50%. En aquestes cèl·lules es va observar que hi havia una caiguda específica de l'activitat  $b^{0,+}$  d'un 60%. Això reafirmava la idea que rBAT és necessari per a l'activitat de transport (Mora *et al.*, 1996).

En aquest moment es plantejaven dues preguntes molt importants per entendre el paper fisiològic de l'activitat  $b^{0,+}$  en la reabsorció d'aminoàcids: 1) si aquest sistema de transport catalitza el transport d'aminoàcids bàsics i neutres, per que defectes en aquest sistema produeixen la hiperexcreció d'aminoàcids bàsics però no d'aminoàcids neutres?; 2) com una activitat de transport independent de  $Na^+$  pot funcionar per reabsorbir aminoàcids de forma activa? Els sistemes de transport típicament encarregats de reabsorbir aminoàcids són els transportadors  $Na^+$ -dependents, que acoblen el procés de translocació de l'aminoàcid al moviment de l'ió de sodi, moviment que està afavorit pel gradient electroquímic de sodi creat per la bomba  $Na^+,K^+$ -ATPasa (Christensen 1984).

La primera clau per resoldre aquests problemes va arribar amb els estudis del nostre col·laborador a la Universitat de Tübingen, Dr. Andreas Busch (Busch *et al.*, 1994). En aquests experiments, va mesurar els corrents elèctrics generats per la presència d'aminoàcids en el medi d'incubació d'oòcits injectats amb el cRNA d'rBAT. Va observar que l'L-arginina (aminoàcid bàsic) generava un corrent d'entrada, mentre que la L-leucina (aminoàcid neutre) generava un corrent de sortida. Es va pensar inicialment que hi hauria el moviment d'algun ió associat al transport de l'aminoàcid que expliqués aquests diferents corrents. Va observar que ni el sodi, ni el potassi, ni el clorur eren transportats, ja que canvis dramàtics en les seves concentracions no afectaven els corrents generats per aquests aminoàcids. Va plantejar la hipòtesi que el transportador funcionés com un intercanviador d'aminoàcids, i així els corrents d'entrada i sortida es deurién als intercanvis entrada d'aminoàcids bàsics i sortida d'aminoàcids neutres o viceversa (els intercanvis electroneutres no generen corrents). Per provar-ho va mesurar els corrents generats per L-arginina i L-leucina abans i després de superfondre amb L-leucina i L-arginina respectivament; la superfusió incrementaria la concentració d'aquests aminoàcids. Així, per exemple, va observar un increment en el corrent generat per L-arginina després de la superfusió amb L-leucina. Això es pot esperar si els intercanvis poden ser L-arginina amb aminoàcids bàsics (que no generaria corrents) o L-arginina amb aminoàcids neutres (que genera corrents d'entrada): un augment de la quantitat de leucina intracel·lular implica un augment dels intercanvis generadors de corrent.

Treballs posterior del grup de Jean-Yves Lapointe, a Canadà, van aportar noves peces d'informació (Coady *et al.*, 1994). Va caracteritzar la dependència de voltatge dels corrents induïts per aminoàcids neutres en oòcits injectats amb rBAT; els corrents d'entrada positius deguts a l'aminoàcid bàsic arginina incrementen quan és més negatiu el potencial transmembrana, mentre que els corrents de sortida deguts a l'aminoàcid neutre (alanina) incrementen en ser més positiu el potencial transmembrana. D'aquesta forma es dedueix que, a la membrana del ronyó, l'entrada d'aminoàcids bàsics estaria afavorida respecte a l'entrada d'aminoàcids neutres, ja que el potencial de membrana és negatiu (al voltant de  $-60$  mV). Com es pot explicar llavors el transport de cistina? Es plantejava que, a causa del potencial reductor de la cèl·lula, aquesta es reduiria just després de produir-se el transport, i així es mantindria el gradient de concentracions.

Dues peces molt importants d'informació van ser aportades pel mateix grup de Canadà. Fins ara he descrit que es produeixen intercanvis entre aminoàcids bàsics i aminoàcids neutres, intercanvis que es detecten per la presència de corrents. Hi ha intercanvis entre aminoàcids del mateix signe? Per respondre aquesta pregunta, van comparar l'entrada d'alanina fent servir mesures elèctriques i mesures radioisotòpiques, i van determinar que la quantitat calculada per les mesures elèctriques era un 40% de la calculada per mesures radioisotòpiques. Per tant, es pot concloure, que hi hauria intercanvis electroneutres, i que la magnitud dels corrents dependrà de les concentracions internes d'aminoàcids bàsics i neutres així com de les afinitats relatives que tingui el transportador per aquests. Llavors, tots els corrents es deuen als intercanvis entre aminoàcids carregats-no carregats? Fent servir el sistema *cut-open oocyte*, on es poden controlar les concentracions intracel·lulars i extracel·lulars d'aminoàcids, van observar que, en absència d'aminoàcids bàsics intracel·lulars, els aminoàcids neutres no indueixen cap corrent, i només quan hi ha aminoàcids bàsics es detecten corrents de sortida.

Aquest resultat experimental ens porta a tres conclusions:

- a) El transportador  $b^{0,+}$  és un intercanviador obligatori i no un transportador facilitat amb transestimulació. La diferència entre aquests dos mecanismes rau en el valor del quocient entre la velocitat de reorientació del complex substrat-transportador-substrat i la velocitat de reorientació del transportador amb un únic substrat. En un bescanviador obligatori aquest quocient tendeix a infinit. En el nostre cas no s'ha calculat el valor d'aquest quocient, però el criteri experimental que fem servir és que no detectem sortida d'aminoàcids en absència de substrat.
- b) No es requereix energia química (GTP, ATP, etc) per al transport, ja que en el sistema *cut-open oocyte* la concentració d'aquests metabòlits tendeix a zero.
- c) Cap ió és necessari per a l'activitat  $b^{0,+}$ , ja que ni sodi, ni potassi, ni clorur eren presents en el medi d'experimentació. Aquest resultat està en contra dels resultats publicats per Rennie (Ahmed *et al.*, 1995) que suggeria un intercanvi amb potassi. El seu equip va fer servir el clon de rata, però el resultat no s'ha reproduït fent servir el clon de conill ni l'humà.

Davant de tots aquests resultats, ens vam preguntar com aquest mecanisme de transport podria funcionar per acumular aminoàcids. Alguns autors (Coady *et al.*, 1994; Miyamoto *et al.*, 1996) opinaven que aquesta activitat no podria ser responsable de produir una entrada neta d'aquests aminoàcids. Fins i tot es deia: "És difícil comprendre la utilitat de tenir un transportador independent de sodi específic en la membrana apical del ronyó, on els transportadors estan involucrats en l'entrada neta de substrats". Així, el nostre grup va decidir caracteritzar en detall l'activitat d'intercanvi per entendre quin era el mecanisme que podria permetre l'acumulació d'aminoàcids i així explicar el fenotip cistinúric.

Com a primer pas vam voler caracteritzar més en detall l'activitat d'intercanvi. Així, vam comprovar que l'especificitat de substrate i els paràmetres cinètics eren igual en mesurar l'entrada d'aminoàcids o la sortida estimulada per substrats externs. Aquestes mesures es van obtenir a partir de mesures radioisotòpiques. El fet que els paràmetres cinètics fossin iguals era incompetent amb un mecanisme al·lostèric de transestimulació



de la sortida. Per a tots els substrats, en mesurar l'entrada o la sortida, el coeficient de Hill era igual a 1, fet que suggeria la interacció d'una molècula de substrat amb una unitat de transportador. Les velocitats màximes d'entrada dels diferents aminoàcids era la següent: aminoàcids bàsics > aminoàcids neutres > cistina. En comparar la potència dels diferents aminoàcids estimulant la sortida d'aminoàcids bàsics s'observava que el substrat més lent és el que limita l'activitat de transport. Això suggereix que la velocitat de reorientació del transportador depèn dels substrats que formen el complex ternari. La doctora Conxi Mora va demostrar que l'activitat de transport  $b^{0,+}$  en la línia cel·lular OK funcionava també com un intercanviador obligatori, i això confirmava la idea que aquesta activitat no era un artefacte del sistema experimental dels oòcits.

Un cop caracteritzat el nostre sistema experimental, el pas més important era comprovar que l'activitat  $b^{0,+}$  permetia acumular aminoàcids, mitjançant experiments de transport de substrat (concentració 50  $\mu$ M) fins a arribar a l'equilibri. El gradient d'aminoàcids acumulats es va calcular fent servir el valor del volum de distribució de l'aigua. En la taula següent mostro aquests valors, calculats per oòcits no injectats (control), oòcits injectats amb rBAT, amb 4F2hc i amb CAT1 (transportador d'aminoàcids bàsics, independent de sodi, responsable del sistema de transport  $y^+$ ) (Wang *et al.*, 1991)

Substrat	No injectats	rBAT	4F2hc	CAT1
L-Arginina	14 $\pm$ 1	55 $\pm$ 5	34,39	19 $\pm$ 2
L-Leucina	19 $\pm$ 3	48 $\pm$ 11	27,37	
L-Cistina	1.1 $\pm$ 0.6	40,42		

**Taula 1. Gradients d'acumulació de diferents aminoàcids a l'oòcit de *Xenopus* en l'equilibri.**

Així, vam observar que el gradient dels aminoàcids era molt superior en els oòcits injectats amb rBAT que en els no injectats, i, de manera molt important, l'acumulació d'arginina era també superior a la dels oòcits injectats amb MCAT-1, transportador que únicament fa servir el potencial de membrana com a força motriu (Kavanaugh *et al.*, 1993). És important destacar aquí que el transport de cistina es fa en presència de diamida. Aquest agent químic penetra a l'interior de la cèl·lula i impedeix la reducció de la cistina, fet que es va comprovar experimentalment. Per tant, aquesta acumulació de la cistina no es deu a la seva reducció a cisteïna. El fet que l'activitat  $y^+L$  induïda per 4F2hc en oòcits també permetés acumular aminoàcids va suggerir que aquest transportador també funcionaria com un intercanviador obligatori, fet que comentaré més endavant.

Per tant, el transportador  $b^{0,+}$  permet l'acumulació d'aminoàcids a través d'un mecanisme de transport actiu terciari: acumula substrates com a resultat de l'intercanvi amb aminoàcids de l'altre costat de la membrana. Si això és cert, el contingut total d'aminoàcids de l'oòcit limitarà aquesta acumulació. Es van fer corbes d'acumulació a diferents concentracions d'arginina, i es va observar un increment no lineal dels nivells d'acumulació (figura 4), que va arribar a un límit d'uns 1000 pmol. Aquest valor coincideix amb el contingut total de substrats en l'oòcit de *Xenopus* (Taylor *et al.*, 1987). Si es du a terme aquest experiments amb oòcits injectats amb CAT-1 no s'arriba a cap límit, ja que el nivell de transport únicament depèn del gradient electroquímic.

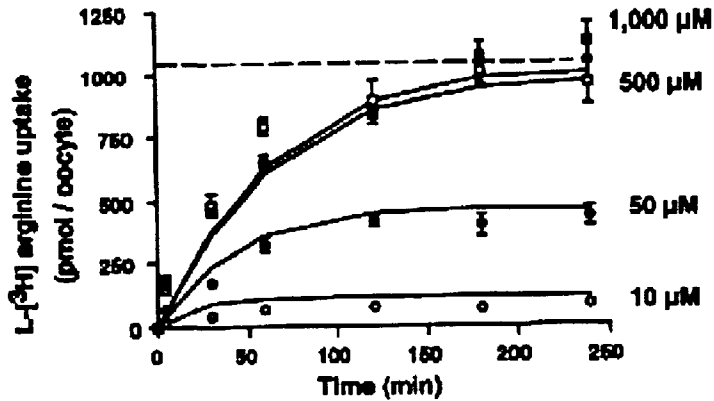


Figura 4. L'acumulació d'arginina depèn de la concentració d'una manera no lineal. Les línies contínues representen els valors obtinguts per un model matemàtic desenvolupat pel professor Josep Lluís Gelpí, i els punts representen els punts experimentals obtinguts. El contingut total de substrats interns està representat per la línia trencada horitzontal

El professor Josep Lluís Gelpí, del nostre Departament, va fer un model matemàtic considerant que el transportador era un intercanviador obligatori d'estequiometria 1:1. El seu model va reproduir les corbes d'acumulació obtingudes experimentalment, com es pot apreciar a la figura 4. Una conclusió interessant que es va extreure és que a la concentració més alta emprada (1 mM), en situació d'equilibri, un 98% dels substrats del sistema  $b^{0,+}$  han estat reemplaçats per arginina. En aquesta situació, l'activitat específica de l'aminoàcid radioactiu a l'interior de la cèl·lula (és a dir, aminoàcid marcat/aminoàcid fred) serà la mateixa que l'activitat específica en el medi de transport.

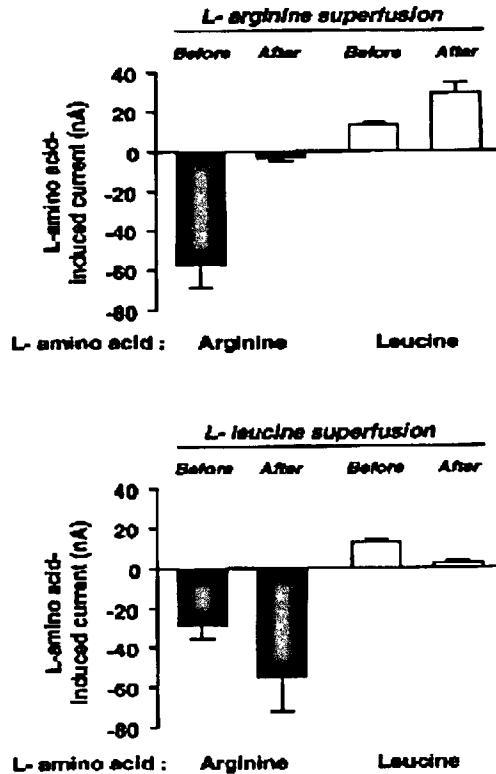


Figura 5. Efecte de la superfusió amb L-arginina i L-leucina en els corrents induïts per aminoàcids en oòcits injectats amb rBAT.

Com podem comprovar que això és cert? El doctorand va dissenyar l'experiment següent: si tots els substrats interiors han estat reemplaçats per arginina, hauríem de suposar llavors, que en aquesta situació, l'aplicació d'arginina no produiria cap corrent, ja que tots els intercanvis serien electroneutres. Aquesta hipòtesi va ser provada experimentalment pel nostre col·laborador Andreas Busch a Tübingen (figura 5); la superfusió amb arginina redueix els corrents d'entrada produïts per arginina i incrementa els corrents de sortida produïts per leucina. La situació reversa es produeix en superfondre-ho amb leucina.

D'aquest experiment podem treure tres conclusions:

- Tota l'activitat elèctrica deguda al transportador  $b^{0,+}$  es deu a l'intercanvi entre aminoàcids.
- L'estequiometria entre aminoàcids d'igual signe és  $n:n$ .
- La màxima intensitat de corrent possible amb arginina (quan s'ha preincubats amb leucina) és més gran que la màxima amb leucina (quan s'ha preincubats amb leucina), fet que indica que l'entrada d'aminoàcids bàsics en condicions normals (-50 mV) està afavorida respecte a la sortida.

Per tant, en l'equilibri, fent servir altes concentracions de substrat, l'activitat específica de l'interior de la cèl·lula serà igual a l'activitat específica del medi de transport. Això ens permetrà calcular l'estequiometria de l'intercanvi, ja que podrem calcular directament fluxos d'entrada i sortida d'aminoàcids. Es va fer aquest experiment, com mostro en la figura 6, mesurant els fluxos d'entrada i sortida d'arginina i leucina en oòcits prèviament incubats durant 4 hores amb leucina o arginina (1 mM) respectivament.

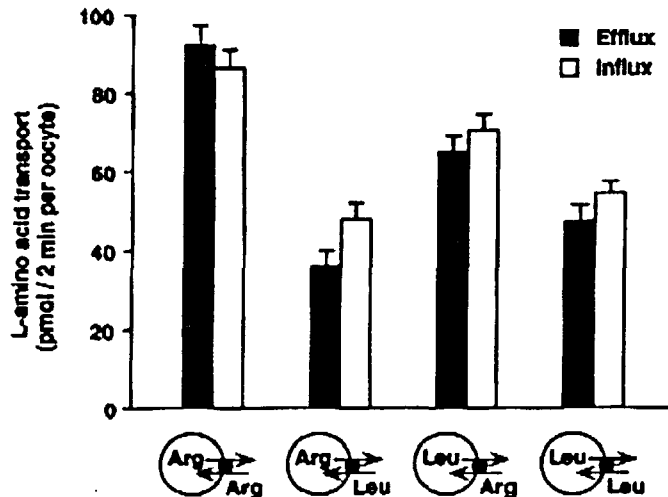
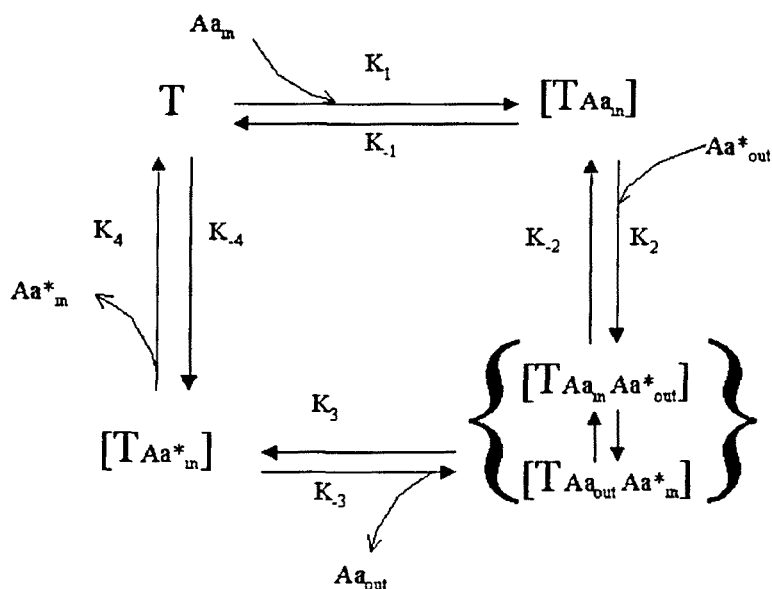


Figura 6. Fluxos d'entrada i sortida comparats d'arginina i leucina a través del sistema  $b^{0,+}$ .

Així, es va observar que per a qualsevol tipus d'intercanvi entre aquests dos aminoàcids l'estequiometria és  $n:n$ , molt probablement 1:1, ja que els estudis cinètics del coeficient de Hill així ho indicaven. També es pot apreciar en aquest experiment que els fluxos d'entrada d'arginina i sortida de leucina són superiors a la situació inversa, fet que indica una altra vegada l'efecte del potencial de membrana.

Val a dir que un altre grup experimental ha trobat una situació diferent per a un derivat d'un aminoàcid, l'àcid isoaminobutíric (AIB). Aquest grup va observar que encara que l'AIB no era un molt bon substrat, era capaç d'estimular la sortida d'aminoàcids bàsics a una velocitat superior al transport d'AIB. Aquest AIB no actua com un activador al·lostèric ja que, en el sistema *cut-open oocyte*, quan és present a molt altes concentracions (5 mM) estimula la sortida d'arginina des de l'exterior en presència d'arginina en els dos costats de la membrana (0.5 mM), ja que es detecten corrents de sortida: un activador al·lostèric convertiria el transportador en una permeasa o canal per a arginina, i amb això es detectarien corrents d'entrada. Així, aquests autors van proposar que l'estequiometria del transportador seria variable i que el transportador tindria dos llocs d'unió al substrat, un d'intern, i un altre, d'extern (Coady *et al.*, 1995). S'ha de dir que aquests resultats no s'han reproduït en vesícules que expressen activitat  $b^{0,+}$  i, per tant, serien necessaris més experiments per aclarir aquest punt (Torras-Llort, resultats no publicats).

Quin és el mecanisme de transport? De forma bàsica hi ha dos grans grups de mecanismes, *seqüencial* o *ping-pong*. El mecanisme seqüencial es caracteritza perquè abans que es produeixi la reacció de transport, han d'interaccionar els dos substrates, mentre que en el *ping-pong*, el transport d'un substrat permet que interaccionï amb un altre substrat. El grup de Fisiologia de Farmàcia del professor Miquel Moretó va fer uns experiments, estudiant vesícules d'intestí, on demostrava que el transportador  $b^{0,+}$  funcionava amb un mecanisme seqüencial (**figura 7**) (Torras-Llort, resultats no publicats)



**Figura 7.** Mecanisme seqüencial ordenat (nomenclatura de Cleland). L'aminoàcid intracel·lular és el substrat conductor.

Aquests dos mecanismes es diferencien de forma fàcil fent cinètiques variant les concentracions internes i externes de substrats, i fent una representació doble recíproca (és a dir,  $1/\text{velocitat}$  en funció de  $1/[S_{out}]$  per a diferents  $[S_{in}]$ ). En el cas d'un mecanisme seqüencial el pendent d'aquestes corbes depèn, de manera inversament proporcional, de  $[S_{in}]$ , amb la qual cosa s'obté una família de rectes no paral·leles. En el cas d'un

mecanisme de *ping-pong* el pendent és independent de la  $[S_{in}]$  (i igual a  $K_m(S_{out})/V_{m\acute{a}x}$ ), i s'obté així una sèrie de rectes paral·leles. Es desconeix encara si es tracta d'un mecanisme seqüencial ordenat o aleatori. Es podria dur a terme aquest estudi fent servir la tecnologia del *cut-open oocyte*.

Funciona també l'activitat  $y^+L$  (transport d'aminoàcids dibàsics independent de sodi i aminoàcids neutres dependent de sodi) com un intercanviador obligatori? Com he comentat anteriorment, la primera evidència que ens va fer pensar això va ser el fet que els oòcits injectats amb 4F2hc acumulaven arginina per sobre dels oòcits injectats amb MCAT-1 (transportador facilitat). Així, vam fer un experiment per mesurar la sortida d'arginina en presència o no de substrats. La sortida d'arginina en absència d'aminoàcids o aminoàcids que no eren substrats era nul·la, però s'estimulava en presència d'aminoàcids, conservant la dependència de sodi per a neutres. Això confirmava que l'activitat  $y^+L$  funcionava també com un intercanviador obligatori.

En mesurar la sortida de leucina, vam observar que cap aminoàcid estimulava la seva sortida. Ens trobem llavors que aquest transportador funciona com un intercanviador asimètric, on només pot funcionar traient aminoàcids bàsics i entrant-en de neutres amb sodi o bàsics. És molt probable que això es degui a les baixes concentracions de sodi intracel·lular. Hi ha altres evidències experimentals que done suport aquesta idea:

- En mesurar corrents induïts per aminoàcids, únicament els aminoàcids neutres en absència de sodi produeixen corrents de sortida (intercanvi amb aminoàcids bàsics).
- L'activitat  $y^+L$  és independent del potencial de membrana, com és d'esperar per una activitat de transport on tots els intercanvis són electroneutres (Eleno *et al.*, 1994).
- L'ió de sodi, produeix que la  $K_m$  del transportador disminueixi de l'ordre de 50 vegades i és transportat amb els aminoàcids neutres (Angelo *et al.*, 1994).
- Si fem una preincubació amb leucina 1 mM durant 4 hores buidem d'aminoàcids bàsics l'interior de la cèl·lula. Això produeix que el transportador sigui totalment inactiu.

Com podem explicar llavors la reabsorció d'aminoàcids bàsics i cistina? A la **figura 8** presento el model que vam hipotetitzar:

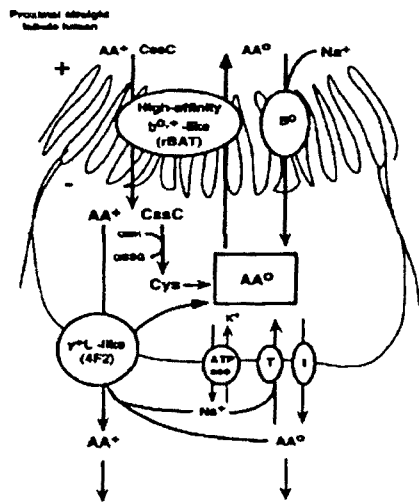


Figura 8. Model hipotètic per explicar la reabsorció d'aminoàcids bàsics i cistina en el túbul proximal del ronyó.

Aquest model es basa en la localització subcel·lular de les proteïnes rBAT i 4F2hc (Quackenbusch *et al.*, 1986) i en les dades que he estat comentant fins ara. La bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa mantindria la concentració de sodi intracel·lular i el potencial de membrana negatiu mitjançant consum d'ATP. Aquest gradient seria aprofitat per transportadors dependents de  $\text{Na}^+$  que serien presents en la membrana apical, i això provocaria que la concentració d'aminoàcids intracel·lular fos elevada. Aquest gradient seria aprofitat pel transportador  $\text{b}^{0,+}$  per transportar aminoàcids bàsics i cistina de forma activa terciària. El transport de cistina també es veuria afavorit per la seva reducció a cisteïna. El transport d'aminoàcids bàsics també es veuria afavorit pel flux d'aquests cap a la sang a través del transportador  $\text{y}^+\text{L}$ . L'asimetria d'aquest transportador asseguraria el flux d'aquests aminoàcids. Els aminoàcids neutres com ara la cisteïna podrien sortir a la sang a través de sistemes de transport presents en la membrana basolateral (Mircheff *et al.*, 1980).

Podem entendre així per què, encara que el sistema  $\text{b}^{0,+}$  transporti aminoàcids neutres, el fenotip de la cistinúria és la hiperexcreció d'aminoàcids bàsics i cistina. En aquells moments vam preveure que defectes en el transportador  $\text{y}^+\text{L}$  podrien ser responsables de la malaltia hereditària LPI (*lysinuric protein intolerance*), caracteritzada per un defecte en la sortida basolateral d'aminoàcids dibàsics (Simell *et al.*, 1995). Més endavant, en aquesta tesi, veurem que això és cert.

### 3. EL TRANSPORTADOR $\text{y}^+\text{L}$ ÉS HETEROMULTIMÈRIC (TREBALL 3)

Les proteïnes rBAT i 4F2hc van ser identificades com a membres d'una família de proteïnes relacionades amb el transport d'aminoàcids perquè induïen activitats de transport d'aminoàcids en oòcits de *Xenopus*. Com que aquestes dues proteïnes presenten un prognosi d'estructura d'un únic domini transmembrana, de seguida es va pensar que serien activadors o constituents d'una altra proteïna, que seria la que catalitzaria la reacció de transport. Quines evidències experimentals reforçaven aquesta idea?

a) L'antigen de superfície 4F2 és un heterodímer d'uns 125 kD, format per 4F2hc i una subunitat d'uns 40 kD no identificada. Aquestes dues proteïnes estan unides per ponts disulfur. El grup d'S. Tate ha identificat també complexos en membranes renals, intestinals i d'oòcits injectats amb rBAT, que serien equivalents als detectats amb 4F2hc (Wang *et al.*, 1995). Malauradament, a diferència del que passa amb 4F2hc, mai s'han pogut immunoprecipitar aquests complexos.

b) Tots els intents d'expressar la proteïna rBAT transfectant línies cel·lulars (COS, MDCK) han fracassat. Se suposava que aquestes cèl·lules, a diferència dels oòcits, no expressarien la subunitat de baix pes molecular (Palacín *et al.*, 1995).

c) Caracteritzant molt més en detall les activitats de transport induïdes per rBAT en oòcits, el grup de Taylor (Ahmed *et al.*, 1997; Peter *et al.*, 1996) va observar que eren dues les activitats expressades per rBAT:  $\text{b}^{0,+}$  i transport d'histidina de forma dependent de sodi. Més tard, van postular que aquestes dues activitats serien  $\text{b}^{0,+}$  i  $\text{y}^+\text{L}$  (Peter *et al.*, 1999). Similarment, el grup d'S. Broër va expressar activitat de transport L (transport d'aminoàcids neutres independent de sodi) al injectar mRNA

de cèl·lules de glioma, transport que s'inhibia en hibridar amb oligos antisentit de 4F2hc (Bröer *et al.*, 1994; Bröer *et al.*, 1995). A més, mesurant transport d'isoleucina va demostrar que 4F2hc també induïa activitat  $b^{0+}$  (Bröer *et al.*, 1998). Això indicaria que les dues proteïnes formarien part o activarien múltiples sistemes de transport.

d) Com s'ha comentat en el l'apartat 1 de "resultats i discussió", vam observar que no hi havia una correlació entre la quantitat de proteïna rBAT en superfície i la inducció de transport. Aquest fet plantejava la hipòtesi que hi hagués una quantitat limitada de subunitat lleugera present en l'oòcit.

e) El grup de Takeda va mostrar que en expressar una delecció en l'extrem C-terminal ( $\Delta 511-685$ ) d'rBAT en oòcits, s'indueix una activitat de transport molt semblant a l'induïda per 4F2hc ( $y^+L$ ) (Miyamoto *et al.*, 1996).

Davant de totes aquestes evidències experimentals, ens vam preguntar si les proteïnes rBAT i 4F2hc constituïrien per si soles un transportador d'aminoàcids en l'oòcit de *Xenopus*. Com que es pensava que algun residu de cisteïna estaria implicat en la formació de complexos heteromultimèrics, vam decidir construir mutants de cisteïnes. Ens vam decidir a estudiar en un primer moment la proteïna 4F2hc, a causa de la simplicitat de l'estudi (4F2hc té 2 cisteïnes mentre que rBAT en té 9).

En primer lloc vam voler demostrar si hi havia una correlació entre la quantitat de proteïna en la membrana plasmàtica i la funció. Vaig desenvolupar tres tipus de tècniques diferents per quantificar la proteïna en superfície (vegeu "Materials i mètodes"): immunocitoquímica en oòcits, *binding-assays* i criofractura. En l'article [treball 3](#) es mostra el resultat de les dues primeres tècniques. En la [figura 9](#) mostro el resultat de la criofractura.

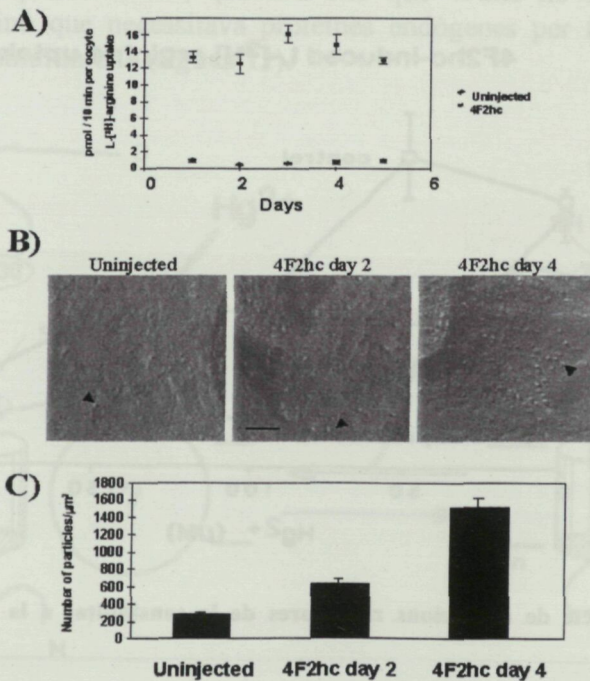


Figura 9. Comparació entre el transport induït per 4F2hc i la proteïna a superfície estimada pel mètode de criofractura.

Es pot veure en la figura 9A com el transport induït per 4F2hc se satura just un dia després de la injecció del cRNA. En canvi, si calculem el nombre de partícules en superfície (figura 9B, imatge; figura 9C, resultat del comptatge), veiem que segueix incrementant-se fins a arribar a més de 1500 partícules/ $\mu\text{m}^2$ . Per tant, podem concloure que no hi ha cap correlació entre la funció i la quantitat de proteïna en la membrana plasmàtica. Això suggereix que la unitat funcional del transportador no és 4F2hc, sinó que és necessari un altre polipèptid, que ja seria present en l'òocit, i del qual es tindria una quantitat limitada.

Com que volíem treballar amb mutants de cisteïnes de la proteïna 4F2hc, vam estudiar en primer lloc, si reactius químics específics d'aquests residus (reactius sulfhidrils) podrien inhibir l'activitat  $\text{y}^+\text{L}$  induïda per 4F2hc en oòcits. En concret, vam provar el clorur de mercuri, l'àcid p-clormercuribenzoic (pCMB) i l'àcid p-clormercurifenilsulfònic (pCMBS). Aquests dos últims reactius es diferencien entre ells per la solubilitat en aigua: el pCMBS és molt més soluble gràcies a la presència d'un grup sulfat, amb el qual no creua la membrana plasmàtica. Vam observar que aquests reactius inhibien de forma irreversible l'activitat  $\text{y}^+\text{L}$ , ja que en fer rentatges no revertien la inhibició. Aquesta inhibició es podia revertir en incubar, després de tractar-ho amb l'inhibidor, amb  $\beta$ -mercaptoetanol. Aquest compost actua aquí com a donador de grups sulfidril lliures, fet que indica que l'efecte inhibidor d'aquests compostos és específic de residus de cisteïna. Tant el pCMBS com el pCMB inhibeixen, fet que indica que hi ha residus de cisteïna extracel·lulars.

Com que pensàvem que hi havia un pont disulfur entre 4F2hc i una proteïna endògena de l'òocit, vam provar l'efecte que tindria una preincubació amb  $\beta$ -mercaptoetanol sobre la sensibilitat dels reactius sulfhidril (figura 10). En aquesta situació el  $\beta$ -mercaptoetanol actuaria com a agent reductor.

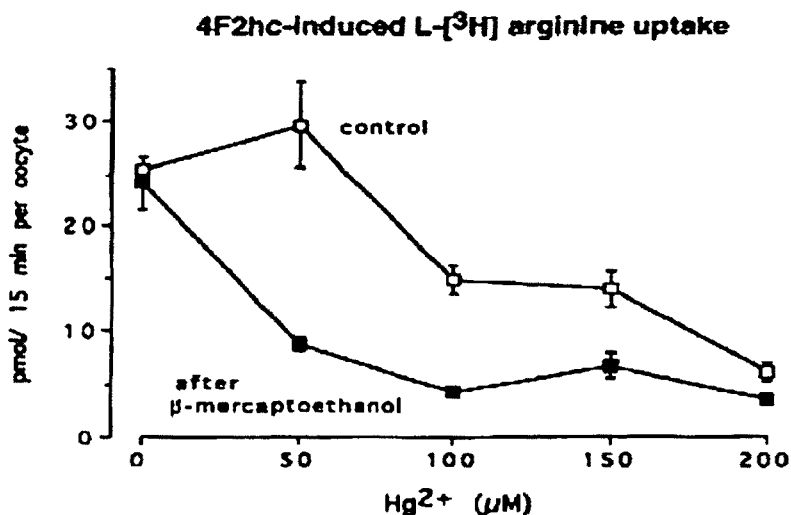


Figura 10. Efecte de condicions reductores de la sensibilitat a la inactivació per reactius sulfhidril.

Com es pot comprovar, les condicions reductores no afecten la funció en absolut, però tenen un efecte molt clar provocant una major sensibilitat en aquests reactius sulfhidril.



Podem pensar llavors que, en reduir un pont disulfur present en el transportador, estarem fent més accessible una cisteïna diana d'aquests reactius.

Vam mutagenitzar llavors les cisteïnes C109 i C330 de 4F2hc a l'aminoàcid isostèric serina (CS1 i CS2, respectivament) individualment o en combinació (*Cysless*). La cisteïna C109 està conservada en la proteïna rBAT. En primer lloc, vam analitzar com era la funció d'aquests dos mutants respecte a la proteïna salvatge. Mentre que el mutant CS2 no presenta cap defecte, el mutant CS1 i *Cysless* transporten a nivells inferiors. Aquest defecte es deu a una reducció en la velocitat màxima i no en la  $K_m$ , cosa que molt probablement indica una menor quantitat de transportador actiu a la membrana plasmàtica.

Quina és la cisteïna diana d'aquests reactius sulfhidril? Sorprenentment el mutant *Cysless* és encara sensible a aquests reactius. Per tant, això implica que ha d'haver-hi una altra proteïna que faci funcions de transport i que presenti cisteïnes diana.

Podem explicar l'increment de sensibilitat a compostos mercurials en pretractar amb agents reductors sobre la base d'aquests mutants? La proteïna salvatge i el mutant CS2 són igualment sensibles a reactius sulfhidril, mentre que el mutant CS1 o el *Cysless* són extremament sensibles.

Com es poden reconciliar tots aquests resultats? Una possible explicació seria que el residu C109 formaria un pont disulfur amb una cisteïna d'una proteïna associada amb 4F2hc, i que el trencament d'aquest pont disulfur deixaria accessible l'altra cisteïna per ser diana d'aquests reactius. D'altra banda, el trencament d'aquest pont disulfur podria fer més accessible una altra cisteïna que no formaria part del pont disulfur. També seria possible que hi hagués una situació múltiple, on hi haguessin diferents cisteïnes implicades. En qualsevol cas, quedava clar que 4F2hc no constituïa per si sol un transportador sinó que necessitava proteïnes endògenes per formar un transportador funcional heteromultimèric (figura 11).

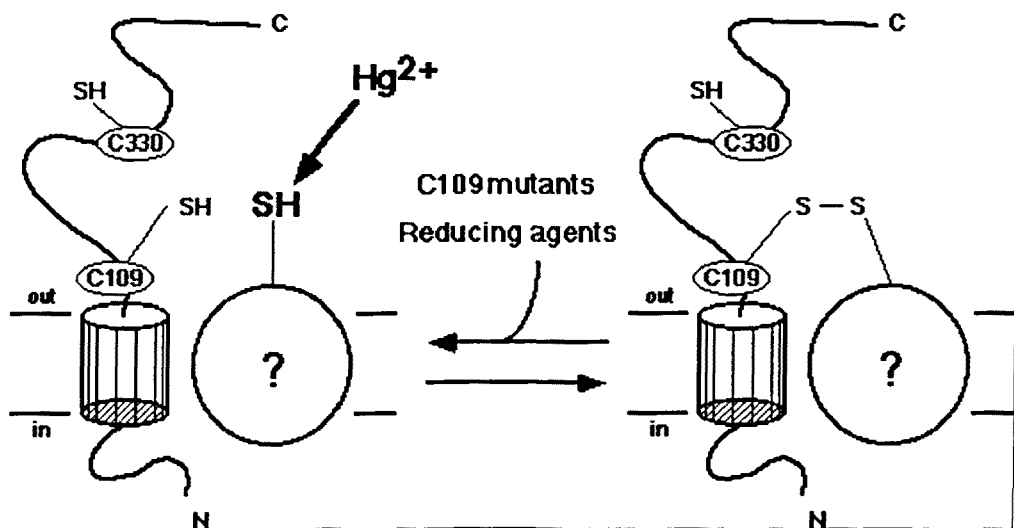


Figura 11. Model especulatiu per explicar l'efecte dels reactius sulfhidril sobre l'activitat y l' induïda en oòcits per la proteïna 4F2hc.

Podem visualitzar aquest complexos? Si marquem les proteïnes de l'òocit amb metionina radioactiva, immunoprecipitem les proteïnes marcades amb un anticòs dirigit contra 4F2hc i fem migrar aquest precipitat en un gel d'acrilamida, observem, després de 3 mesos d'exposició, dues bandes en el film que s'ha exposat: una banda d'uns 85 kD corresponent a 4F2hc i una banda de 125 kD que podria correspondre al transportador funcional (resultats no mostrats). Aquesta segona banda representa un 2% de la intensitat radioactiva total, fet que podria indicar que la quantitat de transportador present en l'òocit és realment ínfima. En reduir amb DTT únicament es detectava la banda corresponent a 4F2hc, fet que podria indicar que la subunitat es trobaria ja presintetitzada o bé que no vam tenir sensibilitat per detectar-la.

#### **4. UNA NOVA FAMÍLIA DE TRANSPORTADORS HETEROMULTIMÈRICS: DESCUBRIMENT, CARACTERITZACIÓ I IMPLICACIÓ EN MALALTIES HEREDITÀRIES (TREBALL 4, TREBALL DE COL·LABORACIÓ 1, TREBALL DE COL·LABORACIÓ 2, TREBALL DE COL·LABORACIÓ 3)**

##### **4.1 EN RECERCA DE LES SUBUNITATS ASSOCIADES A rBAT I 4F2hc**

Un cop quedava clar que el transportador era multimèric era molt important poder identificar la subunitat lleugera tant del transportador  $b^{0,+}$  com la del transportador  $y^+L$ . Vam decidir abordar dos tipus d'estratègia:

a) Purificació de la subunitat de rBAT: la idea era poder arribar a microseqüenciar la proteïna present en la membrana apical del ronyó, dissenyar oligonucleòtids degenerats i intentar trobar el cDNA. Es va intentar primer fer servir l'anticòs de què disposaven contra la proteïna rBAT, per tal d'immunoprecipitar el complex rBAT-subunitat. Els primers intents no funcionaren. Vam provar diverses estratègies: immunoprecipitació desnaturalitzant, unió de l'anticòs a boletes d'acrilamida, etc sense resultat. Davant d'això, el grup va decidir obtenir un nou anticòs. Josep Chillarón i David Torrents van intentar desenvolupar una proteïna de fusió contra la proteïna rBAT sense èxit. Vam decidir llavors una estratègia clàssica de purificació: solubilització de la proteïna i fraccionament en columnes cromatogràfiques, fent servir la detecció per transferència Western del complex.

Un dels primers problemes que ens vam trobar va ser que en obtenir les nostres membranes apicals fent servir un mètode de precipitació amb  $MgCl_2$ , en absència d'agents reductors, la quantitat de complex era molt variable, ja que probablement part es reduïa en el procés d'homogeneïtzació. Gràcies als treballs del grup de Tate (Wang *et al.*, 1995), vaig modificar el nostre mètode d'obtenció de membranes apicals i, com es veu en la figura 12a, vam obtenir preparacions que tenien un 100% de complex.

Un cop solucionat aquest problema vaig iniciar els estudis clàssics de prova i error per trobar les condicions de solubilització idònies. Vam observar que en unes condicions estàndards els detergents TX-100 i digitonina eren els que funcionaven millor (Figura 12b). Vam fer més estudis per tenir més grau de solubilització. Un problema adicional

que vèiem era que molta part del complex de 125 kD s'agregava en formes d'alt pes molecular, agregació que depenia molt de la temperatura.

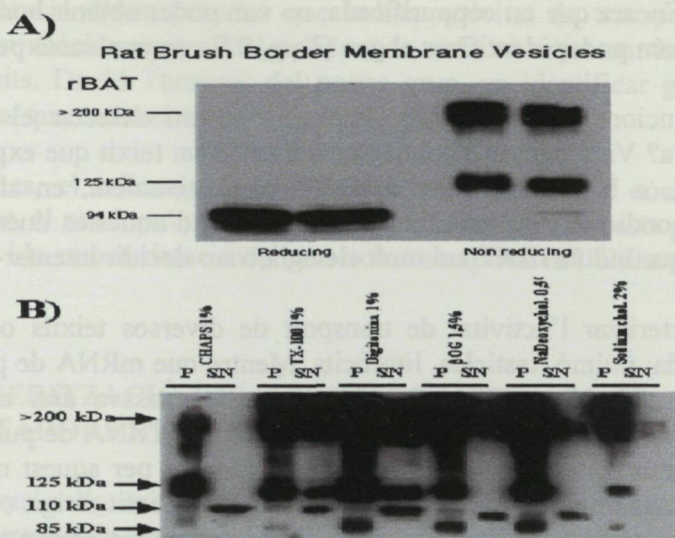


Figura 12. a) Obtenció de membranes apicals de ronyó en presència de  $\text{CaCl}_2$  i NEM. b) Primeres proves de solubilització amb diferents detergents.

Després vam voler obtenir més característiques fisicoquímiques sobre aquest complex: vaig fer proves en columnes HiTrap MonoQ per saber a quina força iònica havíem de treballar, vam comprovar que la proteïna s'unia en columnes de WGA, proves de precipitació amb sulfat amònic, fraccionament en gradients de sacarosa, tractament amb proteases, etc (vegeu "Materials i mètodes"). Vaig iniciar una prova pilot de purificació en una columna d'intercanvi iònic Resource, experiment que es mostra en la figura 13, on vam estimar que tenien 10 vegades més d'enriquiment.

### Purification of high molecular weight rBAT complexes

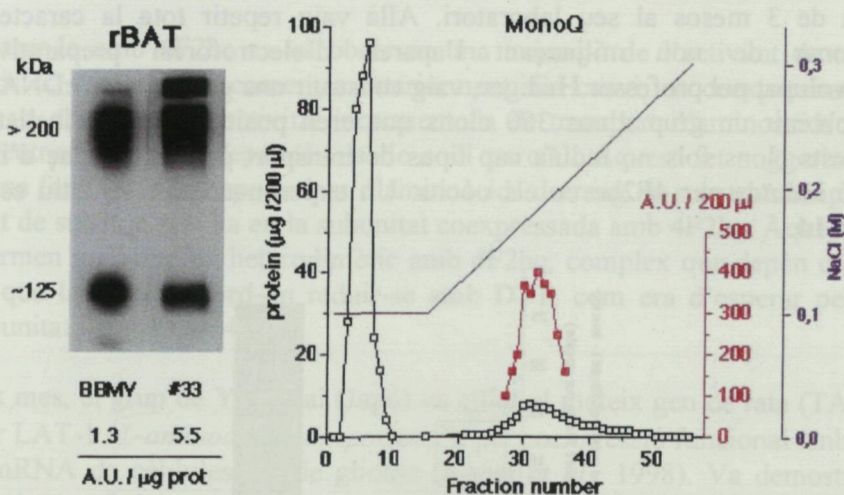


Figura 13. Prova pilot de purificació del complex en columnes d'intercanvi iònic Resource MonoQ. En vermell es mostren les unitats arbitràries (A.U.) de quantificació mitjançant densitometria.

Malauradament, vam aturar aquests estudis ja que vam saber que un dels nostres competidors, el grup del professor S. Tate, havia arribat a purificar la subunitat fins a l'homogeneïtat. Encara que un coppurificada, no van poder obtenir bones seqüències de la proteïna i no vam poder identificar el gen (Tate, S.S., comunicació personal).

b) Expressió funcional en oòcits de *Xenopus*: podem detectar el missatger de la subunitat lleugera? Vam pensar a coinjectar mRNA d'un teixit que expressés l'activitat de transport  $y^+L$  o  $b^{0,+}$  amb 4F2hc o rBAT, respectivament, en situacions en què estiguéssim en condicions de saturació de l'expressió d'aquestes dues proteïnes. Com que l'expressió que induïa rBAT era molt elevada, vam decidir intentar-ho amb 4F2hc.

Així, vaig caracteritzar l'activitat de transport de diversos teixits on l'expressió de 4F2hc era elevada: pulmó, testicles, limfòcits. Mentre que mRNA de pulmó i limfòcits induïen activitat  $y^+L$  en expressar-los en oòcits no passava així amb l'mRNA de testicles. Com que era més fàcil obtenir grans quantitats d'RNA de pulmó, vaig decidir que treballaria amb aquest teixit. L'activitat  $y^+L$  induïda per aquest mRNA de pulmó s'inhibia completament en hibridar-ho amb un oligo antisentit dirigit contra l'extrem 5' de 4F2hc però no amb un oligo amb sentit, fet que validava aquest teixit per intentar expressar la subunitat lleugera.

Vam coexpressar llavors mRNA amb 4F2hc en condicions saturants (5 ng, que era 10 vegades la dosi màxima de saturació), i vam observar que tenien un increment mitjà de 2 vegades respecte al transport induït per 4F2hc sol. Aquest increment d'activitat es devia a un increment en la velocitat màxima i no a un increment en l'afinitat, ja que també obtenien un increment en la funció a concentracions de substrat 10 vegades superiors a la  $K_m$ . Per trobar la mida del missatger responsable d'aquest efecte vaig fraccionar aquest mRNA en gradients de sacarosa i vaig coexpressar les diferents fraccions amb 4F2hc en els oòcits. La mida del missatger responsable estava al voltant de 2 Kb. El següent pas era construir una genoteca de cDNA i coexpressar els cRNA obtinguts a partir de grups de clons amb 4F2hc en oòcits. Com que el grup del professor Mathias Hediger, a Boston, tenia una gran experiència en aquestes tècniques, vaig fer una estada de 3 mesos al seu laboratori. Allà vaig repetir tota la caracterització, vaig fraccionar de nou mitjançant l'aparell d'electroforesi preparativa GenePrep desenvolupat pel professor Hediger, vaig construir una genoteca de cDNA fraccionada i vaig obtenir un grup d'uns 300 clons que eren positius en el cribellatge: el cRNA d'aquests clons sols no induïa cap tipus de transport però era capaç d'incrementar la funció induïda per 4F2hc en els oòcits. Un experiment representatiu es mostra en la figura 14.

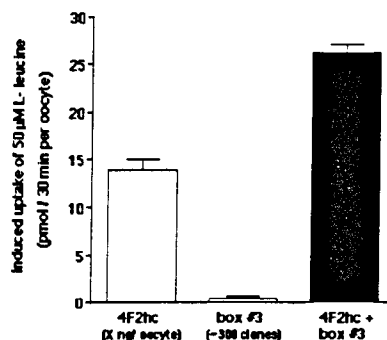


Figura 14. Experiment representatiu de coexpressió en la funció entre 4F2hc i un cRNA d'un conjunt d'uns 300 clons d'una llibreria de cDNA de pulmó de rata.

Quan estava subfraccionant més aquest conjunt de clons, el grup de F. Verrey de Zurich, amb la nostra ajuda, va publicar el setembre de 1998 a *Nature* (Mastroberardino *et al.*, 1998) la seqüència d'una proteïna que induïa activitat de transport d'aminoàcids L (transport d'aminoàcids neutres independent de sodi) en expressar-la conjuntament amb 4F2hc en oòcits. David Torrents, del nostre grup, va identificar gens homòlegs per ordinador, gens que van ser caracteritzats pel doctorand.

De totes formes, el cribratge funcional que havia iniciat en oòcits es va acabar i, sorprenentment, el resultat no va ser un membre homòleg a aquesta proteïna. El resultat del cribellatge i la caracterització del gen trobat s'explica en l'últim capítol de "resultats i discussió".

## 4.2 CARACTERITZACIÓ DELS PRIMERS MEMBRES DE LA FAMÍLIA DE TRANSPORTADORS HETEROMULTIMÈRICS

Buscant gens que estiguessin regulats de manera temprana per la hormona aldosterona en cèl·lules de ronyó de *Xenopus laevis*, el grup de François Verrey, a Zurich, va aïllar un gen anomenat ASUR4 (Spindler *et al.*, 1997), que presentava alta homologia amb permeases d'aminoàcids de llevat (MUP1) (Isnard *et al.*, 1996). Tres proteïnes més eren homòlogues, la proteïna del platelmint *Schistosoma mansoni* SPRM1 (Wolf *et al.*, 1996), i les proteïnes E16 (Gaugitsch *et al.*, 1992) i TA1 (Sang *et al.*, 1995), que corresponen a les proteïnes ortòlogues d'ASUR4 humanes i de rata, i que havien estat identificades com a gens expressats en l'activació cel·lular (desenvolupament de fetge, carcinogenesis, etc). El gen ASUR4 correspon també al gen IU12, que havia estat aïllat com un gen que incrementava la seva expressió en presència d'hormona T3 en l'intestí de *Xenopus laevis* (Liang *et al.*, 1997). Es va trobar també que hi havia transcrits homòlegs en *Caenorhabditis elegans*, cosa que feia hipotetitzar que es tractava d'una família de proteïnes implicada en el transport d'aminoàcids en tota l'escala evolutiva. El grup de Verrey havia intentat expressar la proteïna en oòcits sense resultat, fins que va decidir, gràcies a l'ajuda de Manuel Palacín, coexpressar-la amb la proteïna 4F2hc.

En coexpressar-la amb 4F2hc es va observar una inducció de l'activitat de transport d'aminoàcids L, com ja s'ha comentat anteriorment. En canvi, en coexpressar-la amb SPRM1, es va observar una activitat incrementada de transport d'aminoàcids bàsics i també de neutres amb una dependència de sodi parcial. Aquest fet suggeria que es tractava d'una família de transportadors d'aminoàcids de rang de substrats ampli, i que la especificitat de substrat residia en la subunitat coexpressada amb 4F2hc. Aquestes dues proteïnes formen un complex heterodimèric amb 4F2hc, complex que depèn d'un pont disulfur, ja que la unió es perd en reduir-se amb DTT, com era d'esperar per a una possible subunitat lleugera de 4F2hc.

En el mateix mes, el grup de Y. Kanai (Japó) va aïllar el mateix gen de rata (TA1), que va anomenar LAT-1 (*L-aminoacid transporter-1*), per coexpressió funcional amb 4F2hc fent servir mRNA de cèl·lules C6 de glioma (Kanai *et al.*, 1998). Va demostrar que l'activitat induïda funcionava com un intercanviador obligatori i transportava aminoàcids neutres amb cadena ramificada o aromàtica de forma independent de sodi. L'activitat es describia com a sistema L, ja que era inhibida per BCH. També mostrava que la proteïna no presentava cap residu de glicosilació al expressar-la en un sistema de microsomes. La distribució tissular era molt restringida a alguns teixits: cervell, melsa,

còlon, testicles i placenta. Atès que l'expressió de 4F2hc és ubiqua, aquest fet suggeria que hi haurien d'existir altres membres d'aquesta família expressats en altres teixits.

David Torrents, del nostre grup, va fer una recerca informàtica en bases de dades d'EST (*expressed-sequenced tags*) humanes i de ratolí, i va poder identificar altres homòlegs a aquest primer gen, dels quals alguns van ser caracteritzats inicialment en oòcits pel doctorand. Els resultats es van publicar tres mesos més tard que l'article de F. Verrey.

Totes aquestes proteïnes pertanyen a la superfamília de proteïnes coneguda com APC que inclou transportadors independents de sodi per aminoàcids, poliamines i colina (Reizer *et al.*, 1993). El pronòstic d'estructura preveu una proteïna altament hidrofòbica, sense residus de glicosilació, amb un pes molecular d'aproximadament uns 60 kD i amb 12 dominis transmembrana on els dominis N i C-terminal són citoplasmàtics. La proteïna es mou en un gel d'electroforesi amb un pes d'uns 40 kD: aquesta mobilitat anòmla probablement es deu al seu caràcter hidrofòbic. Totes les proteïnes tenen un residu de cisteïna conservat que estaria en una posició extracel·lular just després del tercer domini transmembrana, i que és el residu responsable de formar un pont disulfur amb la cisteïna C109 de 4F2hc (vegeu més endavant).

Vam iniciar la caracterització amb tres cDNA: IU12, obtingut del professor Yun Bo Shi (Bethesda, EUA), KIAA0245 (un altre gen homòleg obtingut de Takahiro Nagase del Kasuza DNA Research Institute) que després dels estudis de transport anomenaren  $\gamma^+$ LAT-2, i  $\gamma^+$ LAT-1 (que correspon al clon 727811 de IMAGE). Van produir cRNA de cadascun dels cDNA i els vam injectar sols o en combinació amb 4F2hc o rBAT. No vam observar cap inducció de transport en injectar-los sols o amb rBAT, però vam observar una inducció de diferents activitats en coexpressar-los amb 4F2hc, com es veu en la figura 15.

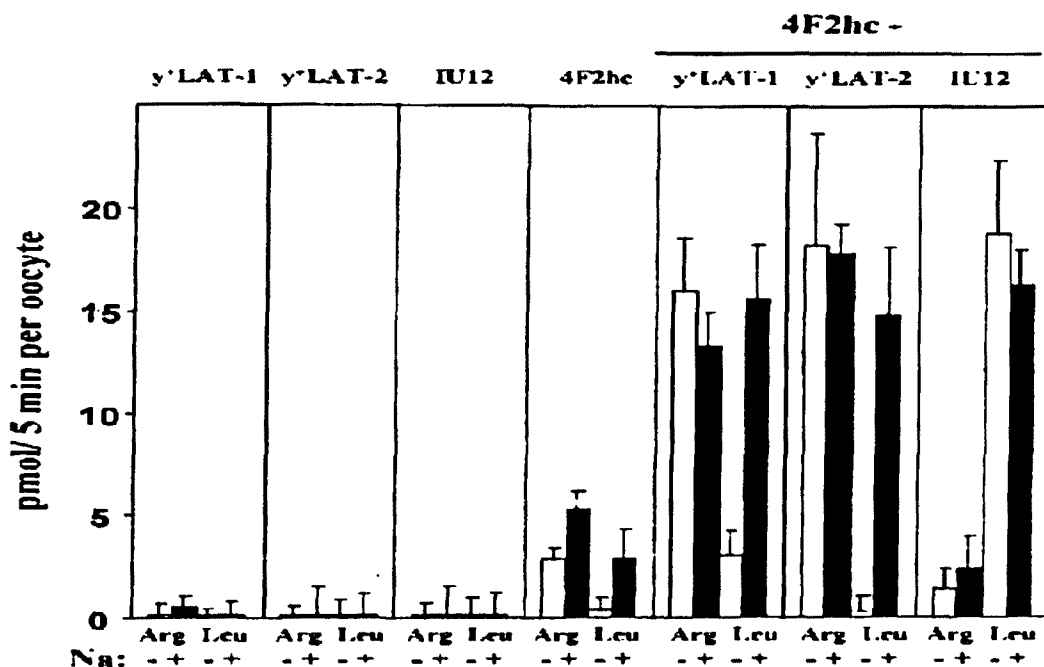
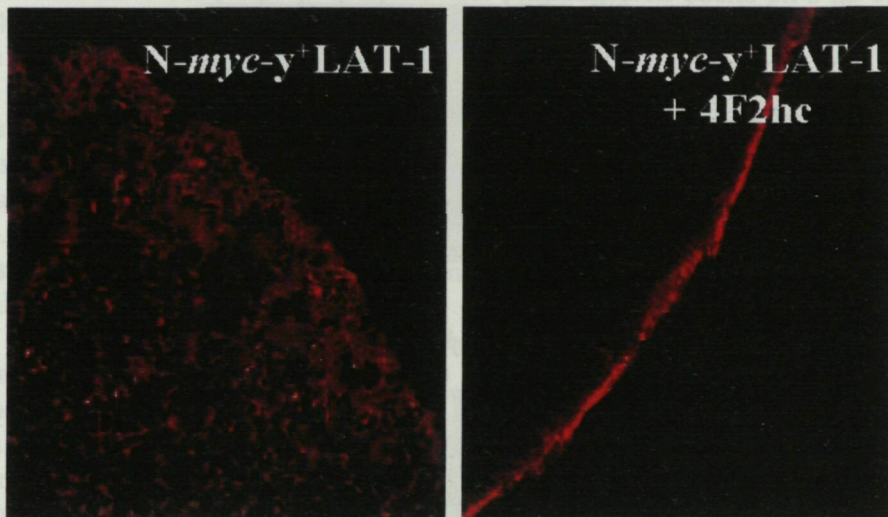


Figura 15. Diferents activitats de transport induïdes al coexpressar amb 4F2hc diferents membres d'aquesta nova família de subunitats lleugeres.

Així, per a IU12 observem una inducció de transport d'aminoàcids neutres independent de sodi (sistema L), i per  $y^+$ LAT-1 i  $y^+$ LAT-2 un increment sobre l'expressió basal induïda per 4F2hc sol, de transport d'aminoàcids bàsics independent de sodi i aminoàcids neutres dependent de sodi (sistema  $y^+$ L). Resultats similars han estat trobats per Pfeiffer *et al.*, (1999)

Perquè no indueix transport la subunitat lleugera en expressar-se sense 4F2hc en els oòcits? Per respondre aquesta pregunta vaig afegir un tag *myc* en la posició N-terminal del cDNA de  $y^+$ LAT-1, vaig comprovar que el constructe funcionava exactament com a la proteïna salvatge, i vaig visualitzar per immunocitoquímica en oòcits la proteïna en presència o no de 4F2hc, com es pot apreciar en la **figura 16**.



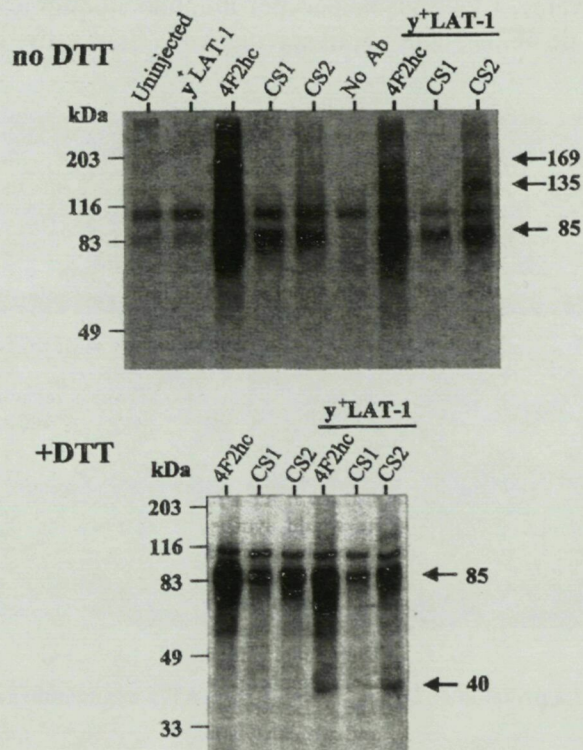
**Figura 16.** La proteïna 4F2hc porta N-myc- $y^+$ LAT-1 a la membrana plasmàtica.

Així teníem la resposta: la subunitat lleugera necessita 4F2hc per poder arribar a la membrana. Això mateix s'ha comprovat en 3 membres de la família: les proteïnes SPRM1 (Matrobernardino *et al.*, 1998), LAT-1 (expressada en cèl·lules COS) (Nakamura *et al.*, 1999) i LAT-2 (vegeu més endavant), cosa que indica que tots els membres de la família segueixen el mateix mecanisme. Necessiten 4F2hc i rBAT de la subunitat lleugera per arribar a la membrana? La situació aquí és diferent i depèn del tipus cel·lular: en oòcits de *Xenopus* ambdues proteïnes poden arribar a la membrana sense necessitat de la subunitat. Ara bé, en cèl·lules en cultiu (COS, MDCK), la proteïna rBAT no arriba sola a superfície (vegeu **figura 20**), mentre que 4F2hc sí que ho pot fer sola (Nakamura *et al.*, 1999).

Quina és la raó d'aquesta diferència? No ho sabem del cert però hi ha evidències que la proteïna 4F2hc tindria una funció dual: portar subunitats lleugeres a la superfície per formar transportadors d'aminoàcids funcionals i, d'altra banda, algunes funcions relacionades amb el control de la matriu extracel·lular. Així, s'ha vist que s'expressa en llocs d'adhesió i que col·localitza amb E-caderines i que regula l'afinitat de les integrines (Fenczik *et al.*, 1997). Cap d'aquestes funcions s'ha associat a la proteïna rBAT. A més, el *knockout* natural d'rBAT, la cistinúria, afecta específicament el transport d'aminoàcids.

Com interactuen aquestes dues proteïnes? Els experiments que he explicat en l'apartat 3 suggerien que la cisteïna C109 de 4F2hc seria la implicada per formar un punt disulfur amb la subunitat endògena de l'oòcit. Ens vam preguntar si tindríem la mateixa situació amb  $\gamma^+$ LAT-1. Vam expressar els dos mutants diferents que ja teníem fets (CS1 = C109S, CS2 = C330S) amb  $\gamma^+$ LAT-1 i els vam analitzar funcionalment. També en vam analitzar la formació de complexos multimèrics mitjançant marcatge metabòlic i immunoprecipitació (**figura 17**)

**IP: 4F2hc mAb**



**Figura 17.** 4F2hc forma una estructura heterodimèrica amb  $\gamma^+$ LAT-1 a través d'un pont disulfur on intervé la cisteïna 109.

A escala funcional el mutant CS2 és exactament igual que la proteïna salvatge, mentre que el mutant CS1 funciona entre un 40 i un 70%. Si observem la formació de complexos (**figura 17**) veiem el següent: en condicions no reductores 4F2hc es detecta com 2 bandes de  $\approx 85$  i  $\approx 169$  kD. (la banda de  $\approx 110$  kD és inespecífica ja que és immunoprecipitada per proteïna G-sefarosa sense l'anticòs de 4F2hc). La primera banda correspon a la proteïna 4F2hc i és també detectada en oòcits no injectats, fet que suggereix que els oòcits expressen una proteïna homòloga a 4F2hc (de fet, els oòcits presenten una activitat  $\gamma^+$ L endògena). La banda de 169 kD podria correspondre a homodímers de 4F2hc units a través de la cisteïna 109 (no apareix en els oòcits injectats amb CS1, però sí, amb CS2 i desapareix en tractar-los amb DTT). En expressar 4F2hc o CS2 amb  $\gamma^+$ LAT-1 apareix una nova banda d'uns  $\approx 135$  kD, que en condicions reductores desapareix per donar lloc a una banda d'uns  $\approx 40$  kD.

D'aquests dos experiments podem treure diferents conclusions. El residu C109 és important per a la formació del complex heterodimèric, però no per a la funció, ja que el transportador encara és actiu. S'ha demostrat que la subunitat lleugera arriba a



superfície en coexpressar-la amb CS1 tant en oòcits (Pfeiffer *et al.*, 1998, i vegeu figura 23) com en cèl·lules. Hi deuen haver altres interaccions de tipus no covalent, interaccions que es deuen perdre en solubilitzar amb detergent, ja que no detectem el complexe en oòcits que expressen CS1 i  $y^+$ LAT-1.

Si recordem les dades de l'apartat 3, observarem que el  $\beta$ -mercaptoetanol no afectava la funció, mentre que incrementava la sensibilitat a agents mercurials. Podem, llavors, suposar que la formació del pont disulfur entre les dues proteïnes ha de ser important per induir un canvi conformacional que permeti el plegament complet de la subunitat i provocar així la sortida del reticle endoplàsmic. En canvi, aquest pont disulfur no té cap paper en el mecanisme intrínsec del transport. No s'han comparat encara els nivells de presència de la subunitat en la membrana plasmàtica en oòcits on s'ha coexpressat amb 4F2hc *versus* CS1. Hipotetitzem que els nivells en superfície seran inferiors en els oòcits que expressin el mutant CS1.

El grup de F.Verrey, va demostrar que la cisteïna Cys164 de IU12, que està conservada en tots els membres de la família, i que és en una posició extracel·lular, era la cisteïna amb la qual es formava el pont disulfur amb la cisteïna 109 de 4F2hc (Pfeiffer *et al.*, 1998). El nostre grup ha obtingut resultats similars. Interactua  $y^+$ LAT-1 amb rBAT? La resposta és que sí, però detallaré amb més detall els experiments en l'apartat 5 de "Resultats i discussió".

No hem detectat cap diferència entre l'activitat o la formació de complexos heterodimèrics entre  $y^+$ LAT-1 i  $y^+$ LAT-2. L'única diferència és en la mida del transcrit ( $y^+$ LAT-2 té una cua 3' molt més llarga) i en el patró d'expressió tissular. El grup de F.Verrey va identificar també les seqüències dels gens de  $y^+$ LAT-1 de ratolí i humanes i va aportar la dada que el transportador funcionava com un intercanviador obligatori.

David Torrents va analitzar per transferència Northern l'expressió tissular de  $y^+$ LAT-1 i va observar que s'expressava amb alts nivells en ronyó i també en pulmó, leucòcits de sang perifèrica, pulmó i melsa. També va fer la localització cromosòmica i va comprovar que estava a 17 cR (374 kb) del marcador SHGC-13532, localitzat al cromosoma 14q11.2.

Precisament, el locus del gen de la malaltia hereditària intolerància a proteïnes amb lisinúria (LPI), havia estat mapat en aquesta zona pel grup de Pertti Aula (Lauteala *et al.*, 1997). La LPI és una malaltia genètica recessiva (OMIM 222700), molt rara, amb una freqüència més alta en la població de Finlàndia. Els símptomes més comuns són hepatoesplenomegàlia, crisi de hiperammonèmia, hipotonia muscular, retardament del creixement, etc. El defecte bioquímic que s'havia identificat era una sortida deficient d'aminoàcids dibàsics a la membrana basolateral de l'intestí prim.

Totes les evidències experimentals apuntaven a aquest gen com a candidat per a la malaltia LPI. El nostre grup es va posar en contacte amb el grup finès i David Torrents i Juha Mykkänen van identificar diverses mutacions en malalts de LPI, mutacions que es cosegaven amb la malaltia.

Una d'aquestes mutacions, leucina334arginina (L334R), que havia estat identificada en el primer pacient espanyol conegut, es va introduir en el cDNA de  $y^+$ LAT-1 per Marta Pineda, del nostre grup, i va ser analitzada en oòcits pel doctorand. (treball de

col·laboració 1) Com es mostra en la figura 18, la proteïna mutada presenta un gran defecte en l'activitat de transport, fet que confirmava que mutacions en  $\gamma^+$ LAT-1 causaven l'LPI.

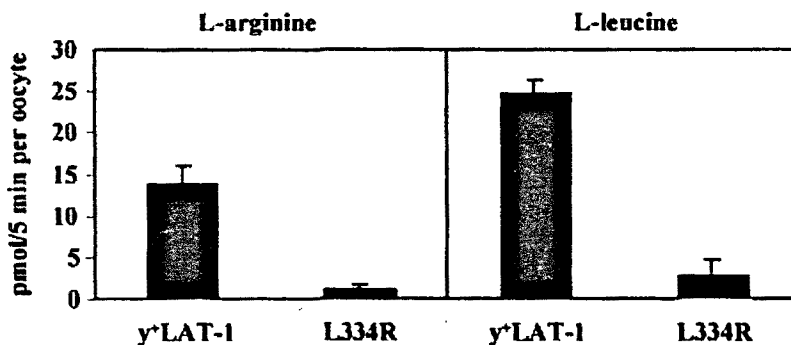


Figura 18. Anàlisi del mutant L334R- $\gamma^+$ LAT-1 trobat en un pacient amb LPI en oòcits de *Xenopus*.

#### 4.3 APARICIÓ DE NOVES SUBUNITATS. EL GEN DE CISTINÚRIA DE TIPUS NO-I

L'abril de 1999 apareix publicat a *Journal of Biological Chemistry* la identificació d'una nova subunitat que pertany a la mateixa família (Sato *et al.*, 1999). Fent servir mRNA de macròfags peritoneals que havien estat incubats amb dietil maleat i lipopolisacàrid (LPS), va expressar en oòcits nivells alts de l'activitat  $x_c^-$ . Aquest sistema de transport consisteix en una activitat independent de sodi que funciona com un intercanviador per cistina (transportada en la seva forma aniònica) i glutamat. Es va construir una genoteca de cDNA i es va obtenir un grup de 1000 clons que era positiu. En subfraccionar aquest conjunt es perdia el senyal, i per això es va hipotetitzar que el transportador seria heteromultimèric. Així, de forma brillant, van subdividir el grup en 11 parts i van expressar conjunts de 10 parts. D'aquesta forma van poder arribar a identificar dues proteïnes; una era 4F2hc i l'altra xCT (*system  $x_c^-$  transporter-related protein*).

Van estudiar l'especificitat de substrat veient que era molt específic per a cistina i glutamat, amb menys afinitat per a aspartat; van comprovar que funcionava com un intercanviador amb estequiometria 1:1. Aquesta subunitat és la primera d'aquesta família on l'aminoàcid transportat presenta càrrega negativa. Així, aquesta família representa un model molt interessant per comprendre en detall com es produeix l'especificitat de substrat en els aminoàcids. A més, aquest descobriment permetrà entendre la regulació adaptativa a l'estrès oxidatiu, ja que sembla que la cistina transportada es metabolitza per formar glutatió, que actuaria com a agent protector.

David Torrents i Esperanza Fernández, del nostre grup, van identificar tres clons més d'IMAGE (322502, 267204 i 249835) que presentaven alta homologia a membres d'aquesta família. Fent servir aquests 3 clons es va construir el cDNA complet d'un nou membre d'aquesta família. La proteïna era més homòloga a LAT-1 que a  $\gamma^+$ LAT-1 o  $\gamma^+$ LAT-2, fet que va fer hipotetitzar que induïen activitats similars. Marta Pineda, del nostre grup, va expressar la proteïna en oòcits sola o en combinació amb 4F2hc. Els primers experiments indicaven que l'activitat de transport que s'indueïa era d'aminoàcids

neutres de forma independent de sodi però no aminoàcids bàsics, igual que s'havia observat per a LAT-1.

Hi ha alguna diferència entre les dues proteïnes? El doctorand va col·laborar amb Marta Pineda per intentar respondre aquesta pregunta. (treball de col·laboració 2) Així vam analitzar com el transport de leucina era inhibït per diferents aminoàcids (Figura 19).

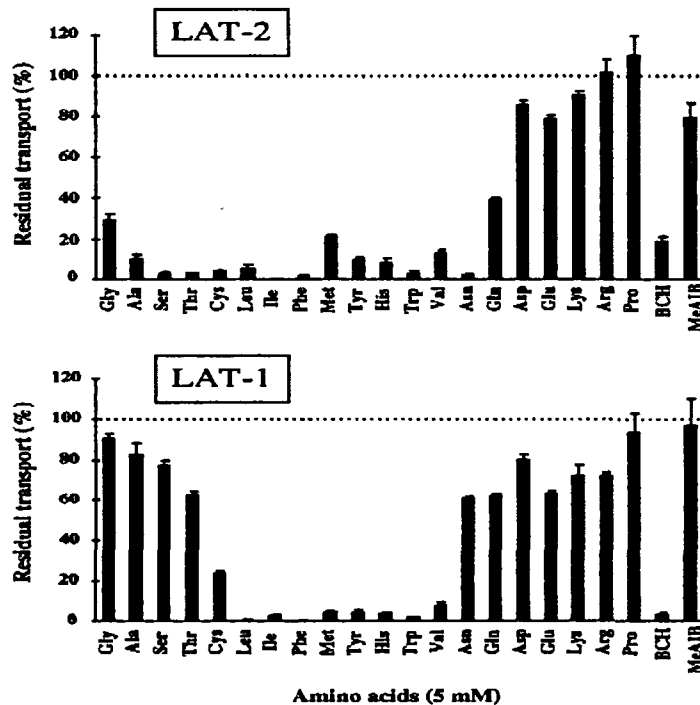


Figura 19. Patró d'inhibicions de l'activitat de transport d'aminoàcids induïda per la coexpressió de 4F2hc i LAT-2 en oòcits de *Xenopus*.

Com es pot observar, els aminoàcids de mida petita com ara alanina, glicina, serina, treonina i cisteïna inhibien el transport de leucina induït per 4F2hc i LAT-2 però no per 4F2hc i LAT-1. El BCH inhibia ambdues activitats, i això indicava que es tractava d'una altra isoforma del sistema L. Ens trobàvem llavors davant d'un transportador d'aminoàcids neutres amb una especificitat àmplia.

Vam voler comprovar després si l'activitat induïda funcionava com un intercanviador d'aminoàcids i vam veure que sí. Un detall interessant a comentar aquí és que el grup de Y. Kanai també va identificar el mateix gen de rata (Segawa *et al.*, 1999). En estudiar si LAT-2 de rata funcionava com un intercanviador, va observar que l'activitat induïda no funcionava intercambiant aminoàcids. En canvi, el grup de F. Verrey ha trobat que sí que funciona com un intercanviador amb estequiometria 1:1 (F. Verrey, comunicació personal). Seria interessant saber el mecanisme de transport i fer-lo servir com una eina per entendre quins residus de la proteïna estan implicats en determinar que la proteïna funcioni com un intercanviador. També vam comprovar que la proteïna necessitava 4F2hc per arribar a la membrana, fet característic de tots els membres de la família.

Esperanza Fernández, del nostre grup, va analitzar l'expressió del missatger per transferència Northern i hibridació *in situ*; l'expressió era elevada en ronyó (localitzant-se en el túbul proximal), placenta, cervell, fetge i múscul esquelètic. Ella també va

localitzar el gen en el cromosoma 14, molt a prop d'on és el gen  $y^+LAT-1$ . Aquesta situació també s'ha trobat en altres membres de la família, fet que probablement indica que provenen d'una duplicació ancestral en l'escala evolutiva.

Tots aquests resultats han fet postular que el transportador 4F2hc/LAT-2 tindria un paper actiu en la sortida d'aminoàcids neutres a través de la membrana basolateral en el ronyó. Especialment podria contribuir a la sortida de cisteïna, cosa que afavoriria encara més el transport de cistina a través del transportador  $b^{0,+}$  en la membrana apical. Seria necessari disposar de models animals per entendre la funció fisiològica d'aquest transportador.

Núria Reig amb David Torrents, del nostre grup, va analitzar exhaustivament totes les EST que tinguessin homologia amb aquesta nova família. Així, va identificar dues noves EST en ratolí que no corresponien a cap dels gens fins ara identificats. Esperanza Fernández va analitzar per transferència Northern quin era el patró d'expressió fent servir el clon d'IMAGE 126710 com a sonda, i va observar que s'expressava en ronyó, fetge, intestí prim i placenta. Aquest patró d'expressió era el mateix que el del mRNA de rBAT, fet que va fer hipotetitzar ràpidament que aquest clon podria correspondre a una part de la subunitat lleugera d'rBAT i, com no, que també fos un gen de cistinúria. Així, Núria Reig i Mariona Font van aïllar el cDNA complet de  $b^{0,+}AT$  (*amino acid transporter  $b^{0,+}$* ) en una genoteca de ronyó. La localització cromosòmica indicava que el gen es localitzava en el cromosoma 19q13.1, justament en el locus de la cistinúria tipus no-I (la no causada per mutacions en rBAT). El nostre grup a l'Institut de Recerca Oncològica, amb Lídia Feliubadaló i Mariona Font com a principals autors, el grup d'Elon Pras, el grup de Paolo Gasparini i el grup de Giuseppe Borsani, tots ells formant part del Consorci Internacional de Cistinúria, van iniciar la recerca de mutacions puntuals en el gen de malalts de cistinúria tipus no-I, i van trobar diferents alteracions.

El doctorand, juntament amb Núria Reig, vam iniciar els estudis per expressar la proteïna (treball de col·laboració 3). Inicialment vam intentar expressar la proteïna en oòcits de *Xenopus* en combinació amb rBAT però sense cap resultat. Creiem que això es deu al fet que els nivells de la subunitat endògena són tan elevats que no hi havia sensibilitat per detectar un increment de la funció. Vam decidir llavors buscar en un altre sistema d'expressió: les cèl·lules COS. Vam fer un primer experiment de cotransfecció transitòria i vam analitzar per immunocitoquímica la distribució subcel·lular de la proteïna rBAT en presència o no de  $b^{0,+}AT$ , experiment que es mostra en la figura 20.

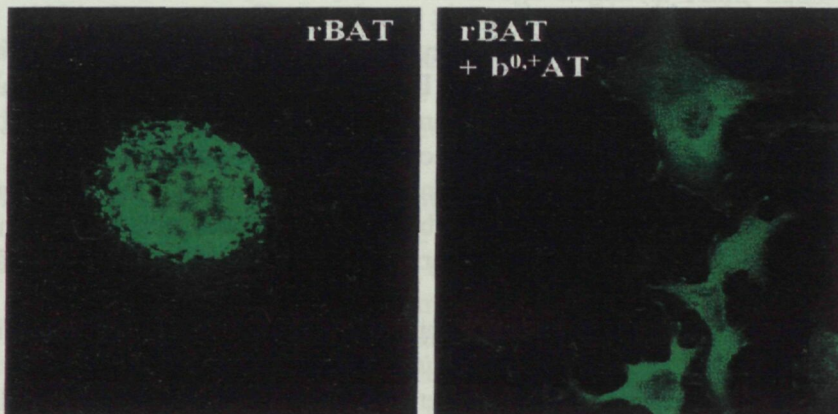


Figura 20. Localització de la proteïna rBAT en cèl·lules COS transfectades en presència o no de  $b^{0,+}AT$ .

Com es mostra en aquesta figura, el fet de coexpressar-se amb  $b^{0,+}$ AT canvia la distribució de la proteïna rBAT des d'una localització intracel·lular (lisosomes, reticle endoplàsmic) a una localització a la membrana plasmàtica, com era d'esperar que fes la subunitat d'rBAT. En analitzar funcionalment aquestes cèl·lules vam observar que mentre que rBAT no provocava cap inducció de transport, sí que s'observava en coexpressar-se amb  $b^{0,+}$ AT. En coexpressar-se amb la subunitat  $b^{0,+}$ AT on s'havia introduït la mutació valina170metionina, mutació puntual que s'havia trobat en malats cistinúrics d'origen jueu, no s'observava cap inducció de transport, fet que demostrava que  $b^{0,+}$ AT era el gen responsable de cistinúria tipus no-I.

Ens trobem llavors davant d'un cas en què una mateixa malaltia, la cistinúria, on s'han classificat els pacients en dos tipus (depenent de si els heterozigots són silenciosos (tipus I) o no (tipus no-I)), es deu a alteracions en dos gens que formen un mateix transportador: rBAT i  $b^{0,+}$ AT. A nivell clínic el nostre grup no ha trobat diferències entre els tipus II i III de cistinúria que havia explicat en els antecedents experimentals; per això parlem de tipus I i tipus no-I.

Com podem explicar aquest diferent fenotip com a base en mutacions en dos gens que formen part d'un mateix transportador? El grup de F. Verrey a Zurich (resultats no publicats) i Y. Kanai (Chairoungdua *et al.*, 1999) han aportat noves dades que permeten postular una hipòtesi. Va identificar el cDNA de  $b^{0,+}$ AT de ratolí i d'humans i va demostrar, en expressar en oòcits, que les dues proteïnes interaccionaven depenent d'un pont disulfur. Van obtenir un anticòs contra la proteïna  $b^{0,+}$ AT, i van comparar la distribució de l'mRNA i de la proteïna d'rBAT i  $b^{0,+}$ AT mitjançant hibridació *in situ* i transferència western respectivament. Van trobar que mentre que rBAT es trobava majoritàriament en els segments S3 i S2 del túbul proximal, com ja sabien,  $b^{0,+}$ AT es localitzava en els segments S1 i S2. És a dir, que no hi havia col·localització total, únicament en el segment S2. Per tant, encara hi hauria d'haver un altre gen homòleg a rBAT que funcionaria amb  $b^{0,+}$ AT, i una altra subunitat lleugera ( $b^{0,+}$ AT-2) que funcionaria amb rBAT en el segment S3. Aquest és un dels objectius actuals del nostre grup de recerca.

Així, la pregunta anterior no estava formulada adequadament. Hauríem de dir, Per què alteracions en aquestes dues proteïnes donen un fenotip tan semblant? Ara podem donar una explicació: en el túbul proximal la concentració d'aminoàcids segueix un gradient des de S1 a S3, i S1 és el lloc on la concentració és més alta. Per poder reabsorbir-los, els transportadors d'aminoàcids que hi ha a S1 són d'afinitat baixa i capacitat alta, mentre que a S3 són d'afinitat alta i capacitat baixa. Podem dir llavors que  $b^{0,+}$ AT correspondria a la subunitat lleugera del transportador  $b^{0,+}$  d'afinitat baixa. Per tant, mutacions que afectessin al transportador  $b^{0,+}$  de S1, provocarien que la càrrega d'aminoàcids que arribés a S3 fos massa elevada per al transportador  $b^{0,+}$  d'afinitat alta. Pensem llavors que en el pacient que és heterozigot el transportador  $b^{0,+}$ AT d'afinitat baixa funcionaria a nivells inferiors (es tractaria d'un fenotip parcialment dominant), i això provocaria una sobrecàrrega mínima d'aminoàcids per al transportador  $b^{0,+}$ AT-2 d'afinitat alta, amb la qual cosa el fenotip es manifesta mínimament sense arribar a la formació de càlculs de cistina.

També sorgeix aquí una pregunta: per què els heterozigots presenten defecte? Una possible resposta seria que el transportador funciona com un heteromultímer, on tindriem, per exemple, dues subunitats lleugeres formant part del transportador. En el

cas d'rBAT s'observen complexos en transferència Western de més de 200 kD de pes molecular. Podria ser que una mutació en una subunitat afectés tot el transportador. També podria ser que, ja que en el segment S1 es necessita una gran capacitat de transport, el nombre total de transportadors presents a la membrana sigui un factor molt important per dur a terme aquesta reabsorció. Així, variacions en aquest nombre també podrien provocar el defecte de reabsorció, es tractaria d'un defecte de dosi gènica.

Hi ha més subunitats? Evidentment que sí. El grup de Y. Kanai i el nostre (treballs encara no publicats) han identificat ja un altre membre de la família responsable del sistema de transport *asc*. És una activitat d'intercanvi d'aminoàcids neutres de mida petita independent de sodi. Així, tenim 3 variants de la mateixa família, LAT-1, *ascAT* i LAT-2, on les diferències són en la mida de l'aminoàcid neutre que es pot transportar (LAT-1: neutres ramificats i aromàtics; *asc*: mida petita com ara Ala, Ser, Cys; LAT-2: especificitat àmplia). En col·laboració amb el grup de G. Borsani el nostre grup ha identificat tres membres més de la família, dos dels quals s'expressen amb nivells alts al ronyó: la seva caracterització ajudarà a entendre molt millor com funciona la fisiologia del transport d'aminoàcids.

Per acabar aquest apartat he considerat interessant incloure una taula resum del que sabem sobre la família de transportadors heteromultimèrics, a més d'algunes dades obtingudes per ordinador sobre aquesta nova família de transportadors d'aminoàcids (figures 21 i 22).

Cadena pesada	Cadena lleugera	Sistema de transport coexpressat	Expressió tisular	Malaltia hereditària
4F2hc			Ubiqua	
	LAT-1 (507 aa)	L	Placenta, cervell, melsa, òrg. sexuals, còlon, tumors hepàtics	
	LAT-2 (535 aa)	L	Ronyó, placenta, cervell, fetge, melsa, múscul esquelètic, cor	
	<i>ascAT</i> (523 aa)	<i>asc</i>	Cor, fetge, ronyó, múscul esquelètic, placenta, intestí prim, còlon, timus, melsa	
	y <sup>+</sup> LAT-1 (511 aa)	y <sup>+</sup> L	Ronyó, leucòcits, pulmó, placenta, intestí, melsa, fetge	LPI
	y <sup>+</sup> LAT-2 (515 aa)	y <sup>+</sup> L	?	
	xCT (501 aa)	x <sub>c</sub> <sup>-</sup>	Macròfags estimulats, cervell	
rBAT			Ronyó, intestí prim, pàncrees, fetge	Cistinúria tipus I
	?	b <sup>0,+</sup> (afinitat alta)		
?				
	b <sup>0,+</sup> AT (487 aa)	b <sup>0,+</sup> (afinitat baixa)	Ronyó, fetge, intestí prim, placenta	Cistinúria tipus no-I

Taula 2. Resum sobre la família de transportadors d'aminoàcids heteromultimèrics.

ascAT	---MAGHTQQP-----SGRGNRPAPSPSPVPGTVF-GASERVA	KKEIGLLSACTII	49
LAT-2	MEEGARHRNN-----TEKKHPGGGESDASPEAGSG--GGG--VA	KKEIGLVSACGII	49
LAT-1	-MAGAGPKRRALAAPAAEEKEAREKMLAASKADGSAPAGEGEGVT	QRNITLLNGVAII	59
y+LAT-1	-MVDSTEYEVAS-----QPEVETSPLGDGASPGP---EQVK	KKEISLLNGVCLI	46
y+LAT-2	--MEAREPGRPTP----TYHLVPNTSQSQVEEDVSSPPQRSSETMQ	KKEISLLNGVSLV	54
Xct	---MVRKPVVST-----ISKGGYLQGNVGRPLPSLGNKEPPGQEVQ	KRKVTLLNGVSI	53
b0_+AT	-----MGDTGLRKRREDEKSIQSQEPKTS	QKELGLISGISII	39
<b>I</b>			
ascAT	IENIGSGGFVSIKGVSEHSGSVLALFVVLGCVTALSLCY	VA	109
LAT-2	VENIGSGGFVSIKGVSEHSGSVLALIVIVT	FITVVALCY	109
LAT-1	VETIIGSGGFVITGVKEAGSPLALVVAACVFSIV	ALCY	119
y+LAT-1	VENMGSGGFVSIKGVSIYSASFSLSLVI	AVGLFSVF	106
y+LAT-2	VENMGSGGFVSIKGVVHTASYMSLIV	AIGLFSVVALCY	114
Xct	IETIIGAGGFVSIKGVQNTGSM	SLTIITVCVLSLVALSY	113
b0_+AT	VETIIGSGGFVSIKSVSNTEAV	PCLIIAACVLAVALCF	99
<b>II</b>			
ascAT	VTEIFGLAGFLLLSAVLIMYPTSLAVISMT	SNVLQVFPNCIP	169
LAT-2	VKDIFGLAGFRLIAVLVIYPTNQAVIALT	SNVLQLFPPTCFP	169
LAT-1	MLEVYSLPAFLKLIELLIIRPSSQYIVALV	ATLLKLFPTCPV	179
y+LAT-1	I LEAFGLAFIRLITSLIIIEPTSQAIITAN	MVQLFPSCFA	166
y+LAT-2	I LEAFGLAFIRLIVSLLVVEPTGQAIITAN	IIQSFPSCDP	174
Xct	I LEVFLPLPAFVRVVELLIIRPAATAVISLA	GRILEFFIQCEI	173
b0_+AT	LMEAYEPIPAYLFSASLIVIKPSTFAIICLS	SEVCAFYVGKPIQIVVKLAAAAI	159
<b>III</b>			
ascAT	MLLTWVNCSSVRWATRIQDMFTGGKLLALSII	IGVGLQIFQ	229
LAT-2	LLLTWVNCSSVRWATRVQDIFTAGKLLALALI	IMGVQICK	229
LAT-1	LLLTAVNCYSVKAATRVQDAFAAKLLALALI	ILGFGVQIGK	238
y+LAT-1	CLLTFINCAYVKGWTLVQDIFTYAKVVALIA	IVMGLVKLCQ	223
y+LAT-2	CLLTFVNCAYVKGWTRQDFTYAKVVALIA	IVMGLVKLCQ	231
Xct	TVVMVLSMSVSWARIQFLTFCKLTAII	IVPGVMQLIK	230
b0_+AT	LFISTVNSLSVRLGSYVQNIFTAAKLVIVAI	IIISGLVLLAQ	216
<b>IV</b>			
ascAT	SVGHLAFLQGSFAFSGNF	YVTEEMVDARKNLR	289
LAT-2	DIGLVAFLQGSFAYGGNF	YVTEELVDPYKNLR	289
LAT-1	DVGNIVALYSGLFAYGGNF	FVTEEMINPYRNL	298
y+LAT-1	AVGDIAALYSALFSYSGDT	YVTEEIKNPERNL	283
y+LAT-2	DMGNLSALYSALFSYSGDT	FVTEEIKNPERNL	291
Xct	SITRLEAFYGYMAYAGFY	FVTEEEVENPEKTI	290
b0_+AT	SVGAISAFYNGLWAYDGNQ	YI TEELRNPYRNL	276
<b>V</b>			
ascAT	AMSPQEL	SNV	349
LAT-2	AMSPQEL	SNV	349
LAT-1	TLSTEQMS	SEV	358
y+LAT-1	VLDMRDIA	DV	343
y+LAT-2	VLNISDV	S	351
Xct	TINAEL	LN	350
b0_+AT	VMTATEL	Q	336
<b>VI</b>			
ascAT	LPSLLAMIHVRHCH	I	409
LAT-2	LPSVLAMIHVRC	I	409
LAT-1	LPSILSMIHQP	L	418
y+LAT-1	LPDAICMIHVERF	V	403
y+LAT-2	LPDLLSMIHIERF	I	411
Xct	LPEILSMIHVRKH	L	410
b0_+AT	MLKVLVSIYVRR	L	396
<b>VII</b>			
ascAT	WRRPALHRPI	VNLLI	468
LAT-2	WKKPDI	PRPI	468
LAT-1	HRKPELERPI	VNLAL	477
y+LAT-1	WKEPDRPRPL	LSVFF	462
y+LAT-2	WKEPKRPRPL	LSVFF	470
Xct	YKCPDMHRPF	VPLFI	469
b0_+AT	FTRKELERPI	VPVVI	456
<b>VIII</b>			
ascAT	WRS--KPKCVHRLTESM	HWG	513
LAT-2	WQH--KPKCFSDFI	ELL	522
LAT-1	WKN--KPKWLLQGF	FST	507
y+LAT-1	VPEHKRPLYLRRIVGSA	RYL	511
y+LAT-2	LPESRRELFIRNVLAAL	IRGT	515
Xct	WDK--KPRWFRIMSEKI	IRTL	501
b0_+AT	YKFG--WAQKISKPI	MHL	487
<b>IX</b>			
ascAT	PATDK--PSKPQ-		523
LAT-2	PTKDKDVAGQPQ		535
LAT-1	-----		
y+LAT-1	-----		
y+LAT-2	-----		
Xct	-----		
b0_+AT	-----		
<b>X</b>			
ascAT	WRRPALHRPI	VNLLI	468
LAT-2	WKKPDI	PRPI	468
LAT-1	HRKPELERPI	VNLAL	477
y+LAT-1	WKEPDRPRPL	LSVFF	462
y+LAT-2	WKEPKRPRPL	LSVFF	470
Xct	YKCPDMHRPF	VPLFI	469
b0_+AT	FTRKELERPI	VPVVI	456
<b>XI</b>			
ascAT	WRS--KPKCVHRLTESM	HWG	513
LAT-2	WQH--KPKCFSDFI	ELL	522
LAT-1	WKN--KPKWLLQGF	FST	507
y+LAT-1	VPEHKRPLYLRRIVGSA	RYL	511
y+LAT-2	LPESRRELFIRNVLAAL	IRGT	515
Xct	WDK--KPRWFRIMSEKI	IRTL	501
b0_+AT	YKFG--WAQKISKPI	MHL	487
<b>XII</b>			

Figura 21. Alineament dels membres humans coneguts de la família HAT. En gris presento els residus conservats en organismes superiors (*S. mansoni* inclòs); en verd en totes les proteïnes (llevat inclòs) i, en vermell, residus que s'han vist importants en estudis de mutagènesi.