

**Estructura tridimensional del domini
extracel·lular de 4F2hc (CD98) humana**

Joana Fort i Baixeras

TESI DOCTORAL
Barcelona, octubre de 2006

norai m. Pilar de ferro, a la riba del moll, on s'hi amarren
els calabrots de les naus.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**Departament de Bioquímica i Biologia molecular
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona**

**Programa de Doctorat en Biomedicina
Bienni 2000-2002**

Memòria presentada per
Joana Fort i Baixeras

Per a optar al grau de
Doctora
per la Universitat de Barcelona

Tesi realitzada als laboratoris del Parc Científic de Barcelona

Autora:

Joana Fort i Baixeras

Directors:

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

Dr. Ignasi Fita Rodríguez
Departament de biologia Estructural
IBMB
CSIC

A la Vida

***De tan a prop que miro,
oblido
una de les dues
belleses de les coses.***

***David Jou
(Joc d'ombres)***

AGRAÏMENTS

Aquest apartat és el més compromès i també el més llegit. He decidit centrar-me en els aspectes acadèmics de la meua vida, però moltes vegades és difícil de deslligar-los dels aspectes vivencials. Per això vull donar-vos les gràcies a tots els que m'heu fet créixer durant tots aquests anys.

En primer lloc, per importància, vull agrair al Manuel i a l'Ignasi que m'hagin fet de directors. Gràcies Manuel, per viure la ciència com la vius i transmetre-ho als que aprenem amb tu. Gràcies Ignasi, per fer de follet a les nits i caps de setmana i per intentar resoldre'm tots els dubtes (que han sigut i són molts) amb la teua paciència. Gràcies a tots dos per compartir amb mi aquesta complicitat i aixecar el projecte de 4F2hc. Crec que m'heu ensenyat realment la recerca des de tots els àmbits.

Ara anem per ordre.

En primer lloc volia mencionar el laboratori de la Dra. Rosa Maria Solà, de la Unitat de Recerca de Lípids i Arteriosclerosi, de la Facultat de Medicina de l'URV. Gràcies per deixar-me jugar amb un laboratori de veritat durant els estius del batxillerat. Segurament allò va ser el principi de tot. Així que molts records per la Rosa Maria, l'Agnes, la Merche, la Josefa, el Jimmy i el Pep.

Durant la carrera he conegut molta gent fantàstica que em seria molt difícil de citar. Com que Bioquímica és una llicenciatura de segon cicle els bioquímics ens emportem dos grups d'amics i companys diferents. Així que tinc dos grupets per destacar: la colla de biologia que són l'Íngrid, l'Eva, la Míriam, l'Eli, la Roser, el Gerard, el Sergi i l'Ivà; i els bioquímics que són el Jordi, el Dani, el Lluís, el Hans (tu hauries d'estar en tots els apartats, però em faria pesada) i l'Eva. Gràcies a tots vosaltres he gaudit de les classes pesades i de les llargues èpoques d'exàmens i de totes les experiències extraacadèmiques que ens han fet com som. Als *boys* també els vull agrair la passió per la ciència i la recerca, que encara ara compartim i omplen les nostres converses en els dinars i sopars.

Quan vaig acabar la carrera vaig anar a parar al laboratori del Dr. Jorge Ferrer, al Clínic. D'allà no en vaig sortir molt ben parada, però vaig aprendre moltes coses. La principal va ser que la ciència, moltes vegades, no ho és tot. Em van ensenyar com de dura pot ser la vida d'un científic.

Després d'allò el Manuel em va tornar la il·lusió i Insulina va ser per mi com un alè i una confirmació de que valia la pena formar part d'un grup de recerca. Quan vaig arribar, Insulina era com una família i la marassa de la Marta Pineda era l'eix central. Ella sempre estava organitzant les coses i els altres l'obeïem amb la tranquil·litat de que algú es preocupava per tots nosaltres. D'aquella època també recordo un Joan Bertran, una Ana Vi i una Nuri atabalats mentre jo els robava el temps amb les meves preguntes. Però això sí, tothom sempre estava disposat a atendre els meus problemes, com si no tinguessin res més a fer. Gràcies, a tots els que heu compartit la vostra experiència amb mi durant aquests sis anys: l'Antonio, l'Horacio, la Canici, la Marta Carrasco, l'Anna Abella, l'Anna Ros, el Dani, la Sara, el Franxesco, l'Espe, l'Emma, la Maite, l'Anna Gumà, l'Eleonora, el Raül, el Luc, el Chipi i la Perla.

Poc després de començar, el laboratori d'Insulina de Biologia ja estava molt saturat. Així que els que havíem arribat més tard, i gairebé no teníem lloc per treballar, ens en vam anar a l'aventura. Vam trobar un local enorme tot buit. Poc a poc arribaven les caixes i tot s'havia de muntar, provar i organitzar, fins que va acabar sent un laboratori. Aquesta època va ser fantàstica i la vaig compartir amb el David, la Judith el Jordi i el Hans. Gràcies per continuar amb la complicitat que ens va unir durant aquells mesos.

Als meus companys César, Cristina i Albert: em sap greu no haver sabut ensenyar-vos millor.

Amb la Sofia, la Manu, la Marta, l'Eva i l'Eleonora em compartit l'experiència de la maternitat, ja sabeu que ens uneix una cosa molt especial.

No em vull deixar els meus companys coetanis de tesi, que han compartit amb mi el procés d'aprenentatge d'això que en diem recerca, amb totes les angoixes i il·lusions: la Lorena, la Cielin bajoqueta (gràcies per la teva sensibilitat), la Paola (amb tu em compartit fins i tot el final), i la Susanna. I els que van arribar després: el Carles, el Jose, la Deborah, la Sílvia, l'Elena, l'Òscar, el Marc, la Mercè i la Laura (amb qui ha estat un plaer compartir el final del projecte), el Jonàs, el Víctor, la Sònia, l'Esther, i la Jèssica.

Finalment em queden les tècnics (la Míriam, la Susanna, la Ruth i tots els que han anat passant pel laboratori). Gràcies per fer funcionar mínimament el laboratori, és

una tasca difícil i pesada. També falta la Judith, que gràcies a les seves ungles ens arregla tots els papers!

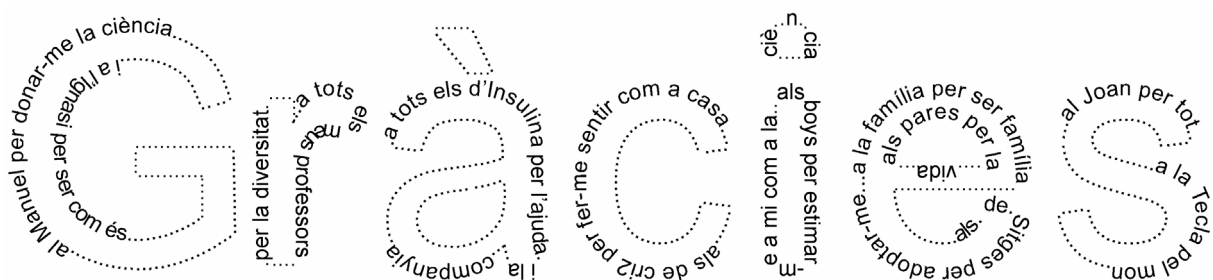
Sé que me'n deixo uns quants, però és que no sé ni tots els noms perquè molts heu arribat quan jo ja estava capficada en l'escriptura de la tesi. Però també us vull agrair que feu que Insulina sigui una família viva i que duri molts anys!

És el torn de la meva altra família, els de cri2. Per mi sou el laboratori exemplar, molt humà però amb normes de convivència. Amb vosaltres m'he sentit com a casa. Gràcies al Xavi, la Cristina, la Rosa, el Jordi, la Cristina Horcajada (moltes felicitats!), el Damià, l'Arnau, l'Oriol i la Bàrbara. Gràcies a tots per deixar el que estàveu fent per ajudar-me en qualsevol cosa, que ha estat molt sovint tenint en compte el que jo sabia de cristal·lografia quan vaig arribar (o sigui, res).

I ara la família de casa. Són molts els que s'engloven sota aquest nom. Tots, sense excepció, han fet de mi el que soc i vull recordar-los en aquestes línies. Però vull citar els que han fet que la meva vida acadèmica tirés endavant. L'àvia Anna i l'avi Josep Maria, per cuidar-nos sempre. La Isa, la tieta, gràcies per ajudar-me tant i en tot. L'Enric i la Nuri, que, entre moltes altres coses, han compartit amb mi la convivència al carrer Elisa durant la carrera. Els pares per donar-me sempre forces. Especialment he d'agrar als meus pares i als meus sogres que hagin fet d'avis durant aquests mesos. Sense ells no hagués acabat mai!

I, sobretot, a qui va dedicada aquesta tesi, la meva petita família, el Joan i la Tecla. Us estimo.

En resum:



CONTINGUT

CONTINGUT

AGRAÏMENTS	9
CONTINGUT	15
ACRÒNIMS I ABREVIACIONS.....	21
INTRODUCCIÓ	27
1. Sistemes de transport d'aminoàcids en mamífers.	29
2. Els transportadors heteromèrics d'aminoàcids (HATs).....	33
2.1. Les subunitats lleugeres	36
2.1.1 LAT-1 (<i>SLC7A5</i>)	38
2.1.2 LAT-2 (<i>SLC7A8</i>)	39
2.1.3 y ⁺ LAT-1 (<i>SLC7A7</i>)	40
2.1.4 y ⁺ LAT-2 (<i>SLC7A6</i>)	40
2.1.5 b ^{0,+} AT (<i>SLC7A9</i>)	41
2.1.6 xCT (<i>SLC7A11</i>).....	42
2.1.7 asc-1 (<i>SLC7A10</i>)	45
2.1.8 asc-2 (<i>SLC7A12</i>)	46
2.1.9 AGT-1 (<i>SLC7A13</i>).....	47
2.1.10 arpAT (<i>SLC7A14</i>).....	47
2.2. Les subunitats pesades: rBAT i 4F2hc	48
2.2.1 rBAT.....	51
2.2.2 4F2hc.....	52
2.3. Les aminoacidúries hereditàries	54
2.3.1 La Cistinúria	54
2.3.2 Lisinúria amb intolerància a proteïnes (LPI).....	55
3. Activitats relacionades amb 4F2hc	57
3.1. 4F2hc i càncer	57
3.2. Relació amb integrines	58
3.3. 4F2hc i galectina-3	60
3.4. 4F2hc i ICAM-1.....	61
3.5. 4F2hc i CD147.....	62
4. La família de les α -amilases (o família 13 de les glicosilhidrolases) i homologia amb els ectodomis de les HSHATs.....	65
4.1. Tipus i funció	65
4.2. Arquitectura dels dominis	66

4.3.	Estructures 3D	68
4.4.	Variació i conservació. Anàlisi de la seqüència d'rBAT i 4F2.	69
4.4.1	Domini A	71
4.4.2	Domini B	73
4.4.3	Domini C	74
OBJECTIUS		77
RESULTATS		81
Capítol 1. Producció i purificació dels ectodomini de 4F2hc i rBAT.....		83
1.1.	Estratègia de clonatge	83
1.2.	Proves d'expressió en <i>E. coli</i>	85
1.3.	Producció de l'ectodomini de 4F2hc en <i>E. coli</i>	87
1.4.	Purificació de l'ectodomini de 4F2hc	87
1.5.	Test del plegament d'ED4F2hc per dicroisme circular i fluorescència.....	88
1.6.	Producció i purificació de l'ectodomini de 4F2hc en cèl·lules HEK 293T.....	91
Capítol 2. Cristal·lització, difracció de raigs X i resolució de l'estructura tridimensional d'ED4F2hc		94
2.1.	Proves de cristal·lització	94
2.2.	Proves de cristal·lització de 4F2hc glicosilat.....	96
2.3.	Difracció dels cristalls i processament dades	97
2.4.	Resolució de l'estructura	99
Capítol 3. Característiques de l'estructura d'ED4F2hc.....		103
3.1.	Descripció estructura	103
3.2.	Detalls del cristall monoclínic.....	107
3.3.	Detalls del cristall ortoròmbic.....	111
Capítol 4. Modelatge d'EDrBAT a partir de l'estructura d'ED4F2hc.		115
Capítol 5. Estudis de la funció de l'ectodomini de 4F2hc.		119
5.1.	L'activitat α -glucosidasa	119
5.2.	Interacció amb glúcids	121
5.3.	Interacció amb proteïnes	122
5.4.	ELISA	124
5.5.	Biacore	125

DISCUSSIÓ	129
1. Producció i purificació dels ectodominis de 4F2hc i rBAT	131
2. L'estructura d'ED4F2hc. Relació amb les glucosidases i rBAT	132
3. El model d'rBAT. Relació amb les mutacions de la cistinúria de tipus A.....	137
4. L'homodímer de 4F2hc.....	143
4.1. L'homodímer de l'ectodomini en el cristall	143
4.2. Existeix un homodímer quan sobreexpressem 4F2hc en cèl·lules	145
4.3. Model de treball proposat per a l'homodímer de 4F2hc.....	150
5. Models d'interacció amb la membrana	153
6. Interacció de l'ectodomini de 4F2hc amb altres proteïnes.....	155
CONCLUSIONS	159
MATERIALS I MÈTODES	163
1. Biologia molecular	165
1.1 Tècniques estàndards.....	165
1.1.1 PCR	165
1.1.2 Clonatge.....	165
1.1.3 Transformació de cèl·lules competents.....	165
1.1.4 Obtenció de DNA plasmídic.....	166
1.1.5 Seqüenciació del DNA	166
1.1.6 Electroforesi de DNA	167
1.2 Construcció del vectors d'expressió.....	167
2. Tècniques d'expressió	169
2.1 Expressió pilot.....	169
2.2 Expressió a gran escala	170
2.3 Expressió a gran escala amb selenometionina	171
2.4 Expressió en cèl·lules HEK 293T	172
3. Tècniques de purificació	172
3.1 Cromatografia d'afinitat amb Ni ²⁺	173
3.2 Cromatografia d'intercanvi iònic.....	174
3.3 Cromatografia de filtració en gel	174
3.4 Cromatografia d'afinitat amb proteïna A.....	175
3.5 Concentradors de proteïna	175

4.	Tècniques d'electroforesi de proteïnes	176
4.1	Electroforesi en gel desnaturalitzant (SDS/PAGE).....	176
4.2	Electroforesi en gel no desnaturalitzant	176
4.3	Western blot.....	177
4.4	Tinció dels gels de poliacrilamida.....	177
5.	Tècniques de caracterització en solució	178
5.1	Dicroisme circular.....	178
5.2	Fluorescència.....	178
6.	Tècniques de cristal·lització	178
6.1	Gota suspesa	178
6.2	Criopreservació	179
7.	Recollida dels espectres de difracció.....	179
7.1	Radiació de sincrotó.....	179
7.2	Processament dels espectres de difracció	180
8.	Resolució de l'estructura	180
8.1	Reemplaçament molecular	180
8.2	Mitjanat entre cristalls	182
8.3	Construcció de màscares.....	182
8.4	Refinament de l'estructura	182
9.	Modelatge de proteïnes amb MODELLER	183
10.	Representacions de l'estructura i superposicions.....	183
11.	Activitat α -glucosidasa	183
11.1	Assaig <i>in situ</i>	183
11.2	Assaig en solució.....	184
12.	Interacció amb proteïnes	184
12.1	Glicoxip (Glycominds).....	184
12.2	Glicoxip del Consortium For Functional Glycomics	185
13.	Interacció amb proteïnes	185
13.1	Elisa.....	186
13.2	Biacore	186
	BIBLIOGRAFIA.....	189

ACRÒNIMS i ABREVIACIONS

ACRÒNIMS I ABREVIACIONS

4F2hc	cadena pesada de l'antigen de superfície 4F2
Ab	anticòs
AGT-1	<i>Aspartate and Glutamate Transporter-1</i>
AMP	adenilmonofosfat
APC	<i>Amino acid/Polyamine/organic Cation or Choline</i>
ArpAT	<i>Aromatic Preferring Amino acid Transporter</i>
asc-1	<i>system asc amino acid transporter-1</i>
asc-2	<i>system asc amino acid transporter-2</i>
ATP	adenosina 5'-trifosfat
b0,+AT	system b0,+ amino Acid Transporter
BLAST	basic local alignment search tool
bp	parells de bases nucleotídiques
BSA	albúmina de sèrum boví
CAT	cloramfenicol acetil transferasa
CD	<i>Circular Dichroism</i>
cDNA	àcid desoxiribonucleic complementari
CssC	L-cistina
CV	volums de columna
Da	dalton
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	dimetilsulfòxid
DNA	àcid desoxiribonucleic
Dntp	desoxinucleòtid-trifosfat
dNTP	desoxinucleòsid trifosfat (deoxynucleoside triphosphate)
DO	densitat òptica
DTT	ditiotreitòl
ED4F2hc	ectodomini de 4F2hc
ED4F2hc-Fc	proteïna de fusió de l'ectodomini de 4F2hc amb Fc C-terminal
EDrBAT	ectodomini d'rBAT
EDTA	àcid etilendiamintetraacètic
EK	<i>enterokinase</i>
EpCAM	<i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i>
ESRF	<i>European Synchrotron Radiation Facility</i>

EST	marcador de seqüència expressada (expressed sequence tag)
FBS	<i>foetal bovine serum</i>
FP	<i>French press</i>
FPLC	<i>fast performance liquid chromatography</i> , cromatografia líquida
FRU	<i>Fluorescence Relative Units</i>
GST	glutatió-S-transferasa
HAT	Heteromeric Amino acid Transporter
HEPES	àcid 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-etansulfònic
HisED4F2hc	ectodomini de 4F2hc amb cua d'histidines a N-terminal
HIV-1	<i>human immunodeficiency virus type 1</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HSBAT	Heavy Subunit Heteromeric Amino acid Transporter
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
ICC	Consorti Internacional de Cistinúria (Internacional Cystinuria Consortium)
Ig	immunoglobulina
IgG	Immunoglobulina G
IPTG	isopropil-D-tiogalactòsid
kb	kiloparells de bases nucleotídiques
kDa	kilodaltons
Km	constant de Michaelis Menten (K _{0,5})
ko	<i>knock-out</i>
LAT-1	system L Amino acid Transporter-1
LAT-2	system L Amino acid Transporter-2
LPI	Lisinuric Protein Intolerance
LSBAT	Light Subunit Heteromeric Amino Acid Transporter
MAD	difracció anòmala múltiple
MHC	complex major d'histocompatibilitat
mRNA	RNA missatger
NEM	N-etilmaleïmida
Ni-NTA	cromatografia de níquel-àcid nitrilotriacètic
OD	densitat òptica
ON	<i>over-night</i>
PBS	tampó fosfat salí
PCR	reacció en cadena de la polimerasa
PDB	<i>protein data bank</i>
PEG	polietilenglicol
PKA	proteïna quinasa dependent d'AMPc

PM	pes molecular
rBAT	related to b ⁰ ,+ Aminoacid Transporter
RMSD	<i>root mean square deviation</i>
RNA	àcid ribonuclèic
rpm	revolucions per minut
RT	temperatura ambient
RT-PCR	Retro-Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SAD	difracció anòmala simple
SDS	dodecilsulfat de sodi
SDS-PAGE	electroforesi en gel d'acrilamida amb SDS
SP	pèptid senyal
TBE	tris-borat-EDTA
Thr	trombina
TM	segment transmembrana
Tris	tris(hidroximetil)aminometà
UV	raigs ultravioleta
wt	<i>wild-type</i>
xCT	system xc
y+LAT-1	system y+L Amino acid Transporter-1
y+LAT-2	system y+L Amino acid Transporter-2

INTRODUCCIÓ

La memòria d'aquesta tesi recull els resultats obtinguts a partir de la producció del domini extracel·lular de 4F2hc, una de les cadenes pesades dels transportadors heteromèrics d'aminoàcids. El principal resultat és la resolució de l'estructura tridimensional d'aquest domini de la proteïna. Però la producció i purificació d'aquesta proteïna ens ha permès fer estudis de funció i interacció amb altres molècules. El treball intenta aportar informació per l'estudi d'estructura-funció dels transportadors heteromèrics d'aminoàcids, però també per l'estudi de les diverses funcions i processos en què 4F2hc ha estat vinculat en la literatura.

1. Sistemes de transport d'aminoàcids en mamífers.

Els aminoàcids són unes molècules cabdals per al funcionament cel·lular. Són la matèria primera per la síntesi de proteïnes, però també tenen funció energètica i intervien en processos com la regulació del metabolisme, el creixement cel·lular, la regulació del volum cel·lular o la transmissió nerviosa.

En l'alimentació les proteïnes que ingerim són digerides alliberant els aminoàcids que les componen. Aquests aminoàcids seran absorbits per les cèl·lules epitelials de l'intestí i després seran transportats, a través de la sang, cap a d'altres cèl·lules de l'organisme per fer la seva funció. Les proteïnes que s'encarreguen del pas dels aminoàcids a través de les membranes cel·lulars s'anomenen transportadors d'aminoàcids. Aquests transportadors reconeixen, uneixen i transporten cap a l'interior o l'exterior de la cèl·lula els aminoàcids.

El transport d'aminoàcids és molt important pel flux nutricional entre òrgans (Christensen, 1990). Quan els aminoàcids procedents de la dieta són captats i alliberats a la sang ho fan a través de l'epiteli intestinal. Des de la sang són reabsorbits per altres teixits i òrgans com el fetge o el múscul esquelètic. En el ronyó els aminoàcids són filtrats cap a l'orina i han de ser reabsorbits per les cèl·lules epitelials de la nefrona. En el sistema nerviós central aquestes molècules han de travessar la barrera hematoencefàlica i els transportadors també actuen en la recaptació de la sinapsi nerviosa on alguns aminoàcids són neurotransmissors. En la placenta els transportadors faciliten el pas de nutrients i tòxics entre la sang materna i la sang fetal.

A partir dels treballs de Christensen dels anys 60 (Christensen et al., 1994) es van identificar diferents sistemes de transport d'aminoàcids en mamífers amb especificitats de substrat àmplies (el mateix sistema transporta diferents aminoàcids) i solapades (un mateix aminoàcid és transportat per diferents sistemes de transport). La classificació d'aquests sistemes de transport es va fer en funció del tipus d'aminoàcid transportat i de la dependència de l'ió sodi. La nomenclatura adoptada utilitza acrònims indicatius del tipus de substrat i designa en majúscula els sistemes sodi-independents i en minúscula els sodi-dependents, a excepció del sistema L, que és sodi-independent i s'escriu en majúscula per raons històriques (Bannai, 1984; Oxender and Christensen, 1963).

A partir de la dècada dels 90, el desenvolupament de l'estratègia de l'expressió funcional (Romero et al., 1998), la seqüenciació d'ESTs i de genomes (com l'humà) van permetre fer cerques per homologia de seqüència i es van identificar un gran nombre de proteïnes transportadores d'aminoàcids. La seva caracterització funcional en sistemes heteròlegs va permetre associar-los als sistemes descrits prèviament intentant mantenir la nomenclatura adoptada pel sistema corresponent (Christensen et al., 1994). Nogensmenys, aquests nous avenços van modificar alguns dels conceptes desenvolupats anteriorment per Crane (Crane, 1965) i Christensen (Christensen, 1966): 1) en el transport d'aminoàcids predomina el mecanisme antiport (o d'intercanvi, que transporten un aminoàcid en un sentit i un altre en el sentit contrari) i és essencial per al transport vectorial a través de l'epiteli; 2) altres gradients electroquímics, a part del sodi, dirigeixen el transport o hi contribueixen; i 3) alguns transportadors travessen les fronteres de separació de classes de substrats, per exemple transportant aminoàcids neutres i catiónics a la vegada (Broer, 2002). A la taula 1 apareixen els diferents sistemes de transport descrits i les isoformes clonades associades a cadascun d'ells. També s'especifiquen els substrats i el mecanisme de transport. Les isoformes d'un mateix sistema presenten petites variacions en l'afinitat i l'especificitat de substrat per ajustar-se a la funció del teixit en què s'expressa el transportador. Cada tipus cel·lular conté una combinació determinada d'aquests sistemes de transport que depèn de la seva funció biològica i és el resultat de la presència dels sistemes de transport ubicus (per exemple els sistemes A, ASC, L, y^+ , X_{AG}^-) i dels sistemes de transport teixit específic (per exemple els sistemes $B^{0,+}$, Nm, $b^{0,+}$) (Palacin et al., 1998).

Sistema	Isoformes	Mecanisme	Substrats
A	ATA1 ATA2 ATA3	Cotransport 1Na ⁺ /AA	Gly, Ala, Ser, Cys, Gln, Asn, His, Met Gly, Pro, Ala, Ser, Cys, Gln, Asn, His, Met Gly, Pro, Ala, Ser, Cys, Asn, Met
asc	asc-1/4F2hc asc-2/(?)	Antiport	Gly, Ala, Ser, Cys, Thr (D y L) Gly, Ala, Ser, Thr
ASC	ASCT1 ASCT2	Antiport Na ⁺ -dependent	Ala, Ser, Cys Ala, Ser, Cys, Thr, Gln
b^{0,+}	b ^{0,+} AT/rBAT	Antiport	Lys, Arg, Ala, Ser, CSSC, Thr, Asn, Gln, His, Met, Ile, Val, Phe, Tyr, Trp, CSSC
B⁰	B ⁰ AT-1 B ⁰ AT-2	Cotransport 2Na ⁺ /AA	Leu, Ile, Gln, Phe, Ala, Pro, Cys, Val, Met, Ser, Asn, (His, Gly, Thr, Trp, Tyr)
B^{0,+}	ATB ^{0,+}	Cotransport 2Na ⁺ /1Cl ⁻ /AA	Ala, Ser, Cys, His, Met, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Trp, (Lys, Arg, Thr, Asn, Gln)
β (BETA)	GAT1 GAT2 GAT3 GAT4	Cotransport 2-3Na ⁺ /1Cl ⁻ /AA	GABA GABA, betaïna, Pro, β-Ala GABA, betaïna, taurina GABA, betaïna
Gly	GlyT1 GlyT2	Cotransport 2-3Na ⁺ /1Cl ⁻ /AA	Gly Gly
IMINO	PAT1 PAT2 PAT3(?)	Cotransport 1H ⁺ /AA	Pro, Gly, Ala, β-Ala, AIB, GABA Pro, Gly, Ala, MeAIB ?
L	LAT-1/4F2hc LAT-2/4F2hc LAT-3 LAT-4	Antiport Uniport	His, Met, Leu, Ile, Val, Phe, Tyr, Trp, (Gln) Ala, Ser, Cys, Thr, Asn, Gln, His, Met, Leu, Ile, Val Leu, Ile, Val, Phe, Met
N	SN1 SN2	Cotransport Na ⁺ /AA acoblat a H ⁺ -antiport	Gln, Asn, His Gln, Asn, His, Ser, Gly
T	TAT1	Uniport	Phe, Tyr, Trp,
X^{AG}	EAAT1 EAAT2 (GLT1) EAAT3 EAAT4 EAAT5	Cotransport 3Na ⁺ /1H ⁺ /AA acoblat a antiport de K ⁺	Glu, Asp Glu, Asp Glu, Asp, Cys Glu, Asp Glu, Asp
x_c⁻	xCT/4F2hc	Antiport	Glu, CSSC, (Asp)
y⁺	CAT-1 CAT-2A/B CAT-3 CAT-4 (?)	Uniport	Arg, Lys, His, O Arg, Lys, His, O Arg, Lys ?
y⁺L	y+LAT-1/4F2hc y+LAT-2/4F2hc	Antiport 1Na ⁺ , AA ⁰ /AA ⁺	Lys, Arg, Gln, His, Met, Leu Lys, Arg, Gln, His, Met, Leu, Ala, Cys

Taula 1. Sistemes de transport d'aminoàcids en mamífers. Els aminoàcids estàndards es presenten en el codi de 3 lletres (CSSC: cistina, O: ornitina, GABA: àcid γ-aminobutíric, AIB: àcid aminoisobutíric, MeAIB: àcid metil-aminoisobutíric). Els substrats de menor afinitat es mostren entre parèntesis. (?) No clarament assignat. Adaptada i actualitzada de (Broer, 2002).

Actualment, seguint els criteris de la funció biològica (Broer, 2002), podem agrupar els transportadors d'aminoàcids en:

a) Transportadors amb alta capacitat d'acumulació (EAAT i transportadors acoblats a Na^+ i Cl^-): inclou transportadors de neurotransmisors (sistemes X^{AG} , Gly y β), que capturen l'excés de neurotransmissor alliberat (Glu, Gly y GABA), no inactivable metabòlicament, per a evitar la seva excitotoxicitat; transportadors d'osmòlits (sistema β), que mantenen altes concentracions de gradient de substrats (betaïna, taurina) en el ronyó; i transportadors apicals que mitjancen la reabsorció d'aminoàcids en l'epiteli (sistema $B^{0,+}$).

b) Transportadors amb dèbil capacitat d'acumulació (família ATA/SN, CAT i TAT): són transportadors associats al cotransport de Na^+ o H^+ o bé de tipus uniport. L'abundància d'aquest tipus de transportadors (sistema y^+ , sistema T) és molt baixa, segurament perquè no protegeixen la cèl·lula de la pèrdua de metabòlits importants.

c) Tipus antiport o intercanviadors (sistemes asc, ASC, $b^{0,+}$, L, x_c^- i y^+L): constitueixen la gran majoria dels transportadors d'aminoàcids en mamífers. Preferentment, intercanvien aminoàcids no essencials per aminoàcids essencials sense causar una pèrdua neta o increment de la quantitat total d'aminoàcids. Permeten generar asimetries, clau per al flux vectorial d'aminoàcids. Un exemple és la reabsorció d'aminoàcids en el ronyó (sistema $b^{0,+}$, sistema L, sistema y^+L). Dins d'aquest grup hi ha els transportadors heteromèrics d'aminoàcids (HATs).

2. Els transportadors heteromèrics d'aminoàcids (HATs)

Entre els transportadors d'aminoàcids presents en mamífers trobem els transportadors heteromèrics d'aminoàcids, que són els únics formats per dos subunitats diferents: una subunitat lleugera (LSHAT) i una de pesada (HSHAT), unides per un pont disulfur conservat en tots els membres de la família (figura 1).

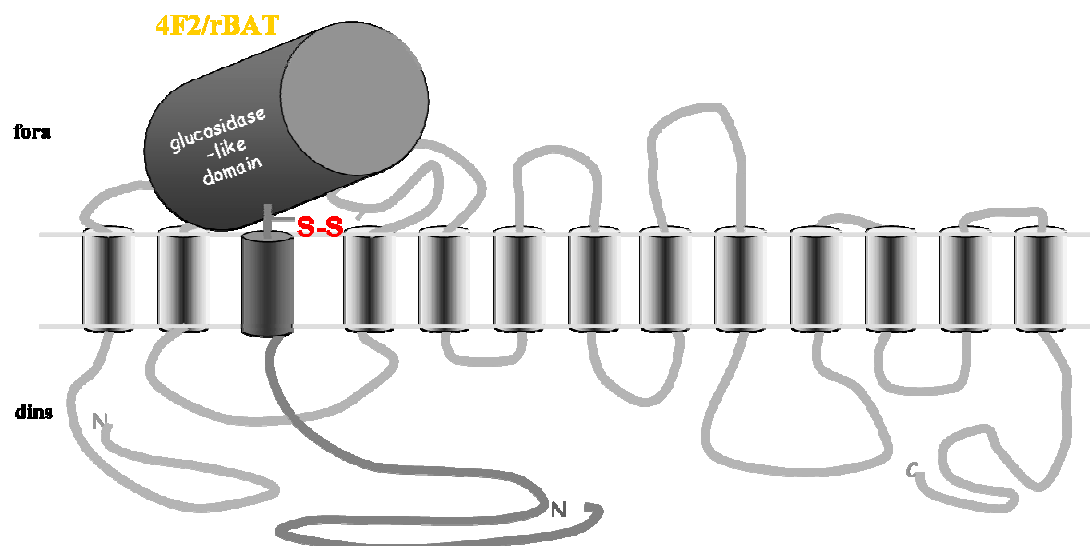


Figura 1. Esquema de l'heterodímer format per una LSHAT i una HSHAT en la membrana plasmàtica. En gris fosc es representa la HSHAT (rBAT o 4F2) i en gris clar la LSHAT ($b^{0+}AT$ en el cas d'rBAT o $y^{+}LAT-1$, $y^{+}LAT-2$, LAT-1, LAT-2, asc-1 o xCT en el cas de 4F2hc)

L'estructura heteromèrica d'aquesta família i el seu mecanisme de transport s'ha conservat al llarg de l'evolució dels metazous. En el genoma de *C. elegans* hi trobem gens que codifiquen proteïnes amb una homologia del 28-45% respecte els membres de la família de mamífers (Veljkovic et al., 2004). Les tres proteïnes (AAT-1, 2 y 3) més homòlogues a les subunitats lleugeres de mamífer (39-45% d'identitat) i les dues proteïnes (ATG-1 y 2) homòlogues a les subunitats pesades tenen conservada la cisteïna implicada en la formació del pont disulfur entre les dues subunitats de l'heterodímer. La caracterització funcional en oòcits de *X. laevis* mostra una activitat de transport semblant a la del sistema L induïda pels complexos heteromèrics AAT-1/ATG-2 y AAT-3/ATG-2 (Veljkovic et al., 2004). En aquest treball s'evidencia que les principals característiques de la família HAT s'han conservat evolutivament.

A la taula 2 hi podem veure els membres de la família HAT de mamífers identificats fins al moment. Podem veure el sistema de transport associat a cadascun d'ells, la seva localització cromosòmica i la seva relació amb malalties hereditàries. Seguint la nomenclatura HUGO (*HUMAN Genome Organization*), els gens codificants per a cada proteïna s'anomenen usant l'arrel SLC (de *SoLute Carrier*) com tots els transportadors, seguida d'un número corresponent a la família genètica a la qual pertany, la lletra A (que actua com a separador), i finalment el número del transportador (Hediger et al., 2004). Podem veure que les subunitats pesades pertanyen a la família SLC3 mentre que les subunitats lleugeres pertanyen a la família SLC7.

Subunitat pesada (HSHAT)	Subunitat lleugera (LSHAT)	Nomenclatura HUGO	Sistema de transport	Cromosoma humà	Malaltia associada
4F2hc (CD98hc)		SLC3A2		11q13	
	LAT-1	SLC7A5	L	16q24.3	
	LAT-2	SLC7A8	L	14q11.2	
	y ⁺ LAT-1	SLC7A7	y ⁺ L	14q11.2	LPI
	y ⁺ LAT-2	SLC7A6	y ⁺ L	16q22.1	
	asc-1	SLC7A10	asc	19q12-13	
	xCT	SLC7A11	x _c ⁻	4q28-q32	
rBAT		SLC3A1		2p16.3-21	Cistinúria Tipus A
	b ^{0,+} AT	SLC7A9	b ^{0,+}	19q12-13	Cistinúria Tipus B
?					
	AGT-1		nou	8q21.3	
	asc-2	SLC7A12	asc	-	
4F2hc/rBAT	arpAT	-	-	silenciat	

Taula 2. Transportadors heteromèrics d'aminoàcids (HATs). (LPI) lisinúria amb intolerància a proteïnes, (?) no identificat; (-) no descrit. Taula adaptada de (Palacin et al., 2005).

Actualment es coneixen dues subunitats pesades, rBAT i 4F2hc i 10 subunitats lleugeres. Se sap que rBAT heterodímeritza amb $b^{0,+}AT$ i 4F2hc ho fa amb 6 d'elles (LAT-1, LAT-2, y^+LAT-1 , y^+LAT-2 , asc-1 i xCT) i això dóna lloc a sistemes de transport diferents. AGT-1 i asc-2 són subunitats lleugeres òrfenes i arpAT pot heterodimeritzar amb 4F2hc i rBAT en epíteli de ronyó de ratolí.

Mutacions en *SLC3A1*, *SLC7A9* i *SLC7A7* causen cistinúria de tipus A, cistinúria de tipus B i lisinúria amb intolerància a proteïnes (LPI) respectivament (taula 2) (apartat 2.3). Com es pot veure, la cistinúria pot ser causada per mutacions en les dos proteïnes del complex.

Només trobem un altre cas de transportadors de membrana que requereixin l'heterodimerització, els transportadors de monocarboxilats (MCT-1, MCT-2, MCT-3, MCT-4), els quals heterodímeritzen amb CD147 (MCT-1, MCT-3 i MCT-4) (Kirk et al., 2000) i amb GP70 (MCT-2) (Wilson et al., 2005). Els transportadors de monocarboxilats són proteïnes de membrana no glicosilades amb 12 segments transmembrana predits i l'N i C-terminals citoplasmàtics. CD147 i GP70 són glicoproteïnes de membrana (d'una hèlix transmembrana) de tipus I (amb l'N-terminal extracel·lular i el C-terminal intracel·lular) de la família de les immunoglobulines. Se sap que CD147 és necessari per a l'expressió en superfície de MCT-1 i MCT-4 i, en cèl·lules epitelials del ronyó i de la retina, també dirigeix l'arribada del complex a la localització corresponent de la membrana polaritzada (MCT-1/CD147 a la membrana apical i MCT-3 i MCT-4/CD147 a la membrana basolateral) (Deora et al., 2005). La diferència principal de l'associació d'aquests heterodímers és que no estan units covalentment com en el cas dels HATs. Aquests transportadors sortiran més endavant en la introducció, ja que s'ha demostrat que CD147 interacciona directament amb 4F2hc.

Recentment, Fernández et al. en el nostre laboratori han demostrat que l'estat d'oligomerització del complex rBAT/ $b^{0,+}AT$ *in vivo* és, com a mínim, el d'heterotetràmer, o sigui un dímer d'heterodímers (Fernandez et al., 2006). L'estudi demostra mitjançant gels *Blue Native* que rBAT i $b^{0,+}AT$ es troben en una banda d'aproximadament 270 KDa que és resistent a urea, la qual cosa indica un caràcter d'alta estabilitat per aquest complex. L'estabilitat d'aquest complex no depèn que el

pont disulfur hi sigui present, ja que en absència d'SDS no es possible dissociar les subunitats amb DTT. L'heterotetràmer és l'estructura majoritària *in vivo* segons estudis d'entrecreuament químic (*crosslinking*).

En contrast amb b^{0,+}AT/rBAT, els resultats del treball suggereixen que els heterodímers xCT/4F2hc i LAT2/4F2hc no formen oligòmers o, si ho fan, aquests no són tan estables com els heterotetràmers de b^{0,+}AT/rBAT. A més, estudis amb el concatenàmer rBAT_xCT demostren que la presència de rBAT és suficient per formar l' heterotetràmer.

2.1. Les subunitats lleugeres

Les subunitats lleugeres dels transportadors heteromèrics d'aminoàcids o LSHATs (Light Subunit of Heteromeric Aminoacid Transporter) pertanyen a la superfamília de transportadors APC (Amino acid/Polyamine/Choline or organoCation family), que inclou més de 175 membres tant eucariotes com procariotes. Entre els membres d'aquesta superfamília trobem diferents mecanismes de transport amb diferents estequiometries i acoblaments a diferents ions, però també existeix una important relació filogenètica (Jack et al., 2000). Dins d'aquesta superfamília podem separar per relacions filogenètiques 10 famílies. Les LSHATs pertanyen a la família LAT, definida amb el nom del primer membre identificat (LAT-1).

Tot i que es coneixen 10 membres d'aquesta família (taula 2) només 7 han demostrat estar unides per pont disulfur a una subunitat pesada coneguda (4F2hc o rBAT). AGT-1 i asc2 són subunitats òrfenes, que no s'uneixen a les subunitats pesades conegudes i que potser s'uneixen a una subunitat pesada encara per descobrir. arpAT és una subunitat lleugera descrita fa poc temps i està silenciada en els genomes de primats però s'expressa en altres mamífers (com el ratolí) on podria estar unida a rBAT i probablement també a 4F2hc (Fernandez et al., 2005), com s'ha demostrat en sobreexpressió en cèl·lules en cultiu.

Les diferents LSHATs (excepte asc2 y AGT1, amb identitats del 23-29%) mantenen unes identitats de seqüència d'aminoàcids que oscil·len entre el 39 i el 70% entre paràlegs i entre el 85 i el 98% entre ortòlegs de mamífer (revisat en (Chillaron et al.,

2001; Verrey et al., 1999; Wagner et al., 2001).

Com ja hem vist 4F2hc s'uneix a diferents subunitats lleugeres per donar lloc a diferents sistemes de transport. D'aquesta manera la subunitat lleugera confereix activitat específica de transport d'aminoàcids al complex heterodimèric (LAT1 i LAT2 pel sistema L, y^+LAT1 i y^+LAT2 pel sistema y^+L , asc1 i asc2 pel sistema asc, xCT pel sistema x_c^- , $b^{0,+}AT$ pel sistema $b^{0,+}$, i AGT-1 per un sistema de transport d'aspartat i glutamat) (taula 2).

En un estudi del nostre laboratori (Reig et al., 2002) hem demostrat que la reconstitució de l'activitat del sistema de transport d'aminoàcids $b^{0,+}$ en proteoliposomes d'extractes cel·lulars és totalment dependent de la subunitat lleugera $b^{0,+}AT$. rBAT és essencial per a l'expressió en la superfície cel·lular d'aquesta subunitat, però no és necessari per al transport en proteoliposomes reconstituïts. Així doncs, sabem que les subunitats lleugeres (LSHATs), per si soles, poden transportar els aminoàcids si es troben disposades en una membrana amb els substrats corresponents.

Les subunitats lleugeres són proteïnes politòpiques d'uns 500 aminoàcids. Són altament hidrofòbiques i no estan glicosilades (demostrat per LAT-1 i $b^{0,+}AT$), fet que provoca una mobilitat electroforètica d'uns 40KDa (una mica menys que el seu pes molecular, que està al voltant de 50 KDa). Sobre la base de la seva homologia i d'algoritmes d'hidrofobicitat, presenten un predicció d'estructura secundària de 12 segments transmembrana, amb els extrems N i C-terminal intracel·lulars. Estudis de topologia amb xCT han corroborat aquesta predicció (figura 2) (Gasol et al., 2004).

Malgrat ser les subunitats catalítiques, les LSHATs necessiten la coexpressió amb la seva corresponent HSHAT per a assolir la membrana cel·lular i poder realitzar la seva funció de transport específica (Chillaron et al., 2001). La cisteïna que forma el pont disulfur entre les dues subunitats de l'heterodímer es troba en les LSHATs en el domini extracel·lular II, després de la tercera hèlix transmembrana. Aquest pont disulfur, però, no és necessari per al transport a la membrana de l'heterodímer, ja que mutants en aquesta cisteïna o en la cisteïna de la subunitat pesada disminueixen però no n'eliminen l'expressió en superfície, cosa que fa pensar que altres interaccions no covalents estan presents entre les dues subunitats (Pfeiffer et

al., 1998; Nakamura et al., 1999).

2.1.1 LAT-1 (SLC7A5)

LAT-1 va ser el primer membre de la família de les LSHAT clonat de manera independent i simultània per dos grups (Kanai et al., 1998; Mastroberardino et al., 1998), com a subunitat de 4F2hc. L'ortòleg de rata va ser clonat usant expressió funcional en oòcits (Kanai et al., 1998), mentre que LAT-1 de *Xenopus* ja havia estat clonat com a missatger induïble per aldosterona (Spindler et al., 1997) i la seva associació funcional amb 4F2hc va evidenciar-se per coexpressió (Mastroberardino et al. 1998). Per altra banda, altres grups identificaren LAT-1 com a subunitat de l'antigen de superfície CD98 (Mannion et al., 1998; Nakamura et al., 1999; Tsurudome et al., 1999).

LAT-1 s'expressa àmpliament en teixits com cervell, melsa, timus, pell, fetge, placenta, múscul esquelètic i estómac (Kanai et al., 1998; Nakamura et al., 1999; Prasad et al., 1999). En cervell, l'expressió de LAT-1 es concentra a les cèl·lules endotelials que formen la barrera hematoencefàlica (Boado et al., 1999).

Per altra banda, LAT-1 s'expressa en moltes línies cel·lulars tumorals, en cèl·lules en proliferació i en tumors primaris humans (Yanagida et al., 2001): S'ha observat un augment en l'expressió de LAT-1 i en el transport del sistema L en cèl·lules d'hepatoma de rata en resposta a l'escassetat d'arginina. L'expressió de LAT-1 es modula en funció de la disponibilitat de nutrients i s'ha proposat per aquesta proteïna una funció important en cèl·lules en creixement (Shultz et al., 1999; Campbell et al., 2000).

El 1996, dos anys abans de la clonació de LAT-1, es va publicar un treball que demostrava que TA1/E16, una seqüència parcial corresponent a LAT-1, tenia alts nivells d'expressió en línies cel·lulars transformades de rata i en fetge de rata fetal, mentre no es detectava en el fetge adult (Wolf et al., 1996).

Aquests i altres estudis semblen indicar que LAT-1 pot tenir un paper en la proliferació i el creixement tumoral (Gaugitsch et al. 1992; Wolf et al. 1996; Campbell and Thompson 2001; Yanagida et al. 2001). Actualment estan augmentant les publicacions que relacionen l'expressió de LAT-1 amb diferents tipus de tumors i

càncers com osteosarcoma (Kim et al., 2006), tumors astrocítics (Nawashiro et al., 2006), carcinoma d'esòfag (Kobayashi et al., 2005), carcinoma oral (Yoon et al., 2005), adenocarcinoma (Lin et al., 2004) o carcinoma de la vesícula (Kim et al., 2002). La majoria dels estudis, però, parlen del transportador LAT-1/4F2hc, perquè és tal com es troba en la membrana. 4F2hc també està relacionat amb càncer, com veurem més endavant (apartat 3.1), per tant és difícil deslligar els efectes en la proliferació cel·lular que té LAT-1 per si mateix de les que li pot conferir 4F2hc en l'heterodímer.

La coexpressió de 4F2hc/LAT-1 en oòcits de *Xenopus* indueix un transport d'aminoàcids neutres de cadena ramificada i aromàtica independent de Na⁺. La seva afinitat intracel·lular i extracel·lular per a diversos substrats és diferent, i presenta elevada afinitat per als substrats extracel·lulars (rang micromolar) (Kanai et al., 1998; Mastroberardino et al., 1998; Prasad et al., 1999), mentre que l'afinitat per als substrats intracel·lulars és molt menor. Per tant no media el flux net d'aminoàcids, però pot equilibrar la concentració relativa dels diferents aminoàcids dins la cèl·lula, com si fos un transportador terciari per a l'intercanvi d'aminoàcids (Meier et al., 2002). Es tracta de la variant L1 del sistema L prèviament descrita (Weissbach et al., 1982). Aquest transport és independent de Cl⁻ i Na⁺, és inhibït per l'àcid 2-amino-(2,2,1)-heptà-2-carboxílic (BCH) i té un mecanisme d'intercanvi obligatori amb estequiometria 1:1, almenys quan s'expressa en oòcits de *Xenopus* (Mastroberardino et al., 1998; Meier et al., 2002).

2.1.2 LAT-2 (SLC7A8)

LAT-2 va ser identificat en el nostre grup per homologia de seqüència i es va caracteritzar funcionalment en oòcits de *Xenopus* (Pineda et al., 1999). LAT-2, en associació amb 4F2hc, també mitjança un transport de tipus L, però amb un rang de selectivitat de substrats més gran que LAT-1, ja que inclou els aminoàcids neutres petits (Pineda et al., 1999; Rossier et al., 1999). S'expressa fonamentalment a la membrana basolateral del túbul proximal del ronyó (decreixent del segment S1 al S3) i a l'intestí prim (Rossier et al., 1999; Bauch et al., 2003). Funcionalment, LAT-2 intercanvia aminoàcids neutres a través de la membrana basolateral, equilibrant les seves concentracions. De manera similar a LAT-1, LAT-2 també presenta una afinitat aparent molt més baixa per als aminoàcids intracel·lulars que per als

extracel·lulars (a excepció de la glicina). En conjunt podem dir que LAT-2 participa de l'eflux basolateral unidireccional de determinats aminoàcids neutres. És un eficient exportador d'L-cisteïna (Fernandez et al., 2003; Meier et al., 2002), un aminoàcid que es reabsorbeix a les cèl·lules del túbul proximal renal com a L-cistina, majoritàriament via el transportador $b^{0,+}AT/rBAT$ (veure apartat 2.1.5) (defectiu en cistinúria). Això implica que LAT-2/4F2hc té una funció clau en el flux trans-epitelial de cistina i suggereix que SLC7A8 podria ser un gen modulador de la reabsorció renal de cistina. Estudis genètics de Mariona Font (Font, 2006) demostren que el gen de LAT-2 no és un gen de cistinúria, tot i que no es pot descartar la possibilitat que algunes variants poguessin ser responsables de la variabilitat individual que hi ha en la reabsorció de cistina tan en la població control com en els pacients cistinúrics i, per tant, podrien jugar un paper modulador del fenotip cistinúric.

2.1.3 y^+LAT-1 (SLC7A7)

El cDNA de y^+LAT-1 va ser identificat per homologia de seqüència amb LAT-1 (52%) i quan es va coexpressar amb 4F2hc en oòcits de *Xenopus* induïa una activitat de transport com la descrita pel sistema y^+L (Torrents et al., 1998b; Pfeiffer et al., 1999b). Els experiments de caracterització funcional van demostrar que l'heterodímer $y^+LAT-1/4F2hc$ és un intercanviador obligatori d'estequiometria 1:1 (Kanai et al., 2000) i que capta aminoàcids neutres junt amb l'ió sodi (Torrents et al., 1998b; Pfeiffer et al., 1999b; Kanai et al., 2000). Aquesta funció d'eflux d'aminoàcids catiónics juntament amb l'alta expressió de y^+LAT-1 en el ronyó i l'intestí prim, va suggerir que aquest podria ser el transportador defectiu en la malaltia hereditària de la Lisinúria amb Intolerància a Proteïnes (LPI) i es van trobar mutacions en el gen SLC7A7 (Torrents et al., 1999; Borsani et al., 1999). Posteriorment es va confirmar la localització basolateral del transportador en cèl·lules de l'intestí prim i del túbul proximal del ronyó seguint un gradient axial decreixent al llarg del túbul proximal (Bauch et al., 2003), de forma semblant a LAT-2 i a $b^{0,+}AT$ (Rossier et al., 1999; Pfeiffer et al., 1999b).

2.1.4 y^+LAT-2 (SLC7A6)

Seguint la mateixa estratègia es va trobar fent cerques per homologia en les bases de dades públiques, una altra subunitat lleugera amb un 50% d'homologia amb

y^+ LAT-1. y^+ LAT-2 s'expressa fonamentalment en cervell (tan en neurones com en astròcits), testicles i glàndules paròtida i de forma més dèbil en intestí prim, cor i ronyó de ratolí.

En associació amb 4F2hc indueix una activitat de transport y^+L en oòcits de *Xenopus*: transporta aminoàcids bàsics de forma sodi independent i neutres de forma sodi dependent, amb afinitats en el rang micromolar (Torrents et al., 1998b). Té una especificitat de substrat més àmplia que el seu homòleg y^+ LAT-1, en la qual s'inclouen els aminoàcids arginina, lisina, leucina, glutamina, histidina, metionina i, sorprenentment, glutamat (Broer et al., 2000). El transport té una estequiometria d'intercanvi d'1:1, igual que els altres membres de la família (revisat en (Chillaron et al., 2001; Verrey et al., 2004). Cal destacar que y^+ LAT-2 mitjança una entrada eficient de diversos aminoàcids neutres i catiónics (arginina, leucina, glutamina) mentre l'eflux o sortida d'aminoàcids catiónics (arginina) és molt més eficient que el dels neutres (leucina, glutamina).

Encara que el paper fisiològic d'aquest transportador no està clar podria estar implicat en la transferència d'arginina i glutamina en el cervell i altres teixits (Broer, 2002).

2.1.5 $b^{0,+}AT$ (SLC7A9)

Una vegada més per homologia de seqüència amb els altres membres de LSHATs clonats anteriorment es va identificar un nou transportador, $b^{0,+}AT$ (Chairoungdua et al., 1999; Feliubadalo et al., 1999; Pfeiffer et al., 1999b). L'mRNA de $b^{0,+}AT$ s'expressa en ronyó i intestí i en menor mesura, en cor, fetge, placenta i pulmó (Wagner et al., 2001). Per estudis d'immunolocalització en ronyó se sap que aquesta subunitat lleugera es troba en la membrana apical de les cèl·lules del túbul proximal però els seus nivells decreixen des del segment S1 al segment S3 (Rajan et al., 2000b; Chairoungdua et al., 1999; Pfeiffer et al., 1999b), de la mateixa manera que ho fan y^+ LAT-1 i LAT-2 (Bauch et al., 2003; Mizoguchi et al., 2001).

$b^{0,+}AT$ interacciona amb rBAT per constituir el transportador funcional $b^{0,+}AT/rBAT$, associat a un sistema de transport descrit anteriorment com $b^{0,+}$ -like: transport sodi independent d'alta afinitat (K_m aparent $<50\mu M$) per a aminoàcids bàsics i cistina i transport d'afinitat més baixa (K_m aparent $>300\mu M$) per a aminoàcids neutres, amb

un mecanisme d'intercanvi obligatori d'estequiometria 1:1 (Feliubadalo et al., 1999). En aquest cas també existeix una asimetria per a l'afinitat del substrat a ambdós costats de la membrana que, en condicions fisiològiques, afavoreix l'entrada a la cèl·lula de cistina (que ràpidament és reduïda a cisteïna) i aminoàcids dibàsics mentre promou la sortida d'aminoàcids neutres (Reig et al., 2002).

Mutacions en el gen SLC7A9 causen principalment cistinúria de tipus B (Palacin et al., 2005) que a diferència de la cistinúria de tipus A causada per mutacions en rBAT (apartat 2.2.1), té cert grau de dominància ja que els heterozigots poden tenir un fenotip semblant al dels homozigots (veure apartat 2.3.1).

Cal destacar que el patró d'expressió de $b^{0,+}AT$ és oposat al d'rBAT al llarg del túbul proximal del ronyó. Aquest fet ha suggerit la possibilitat que ambdues proteïnes *in vivo* puguin interaccionar amb altres subunitats, però un treball del nostre laboratori demostra mitjançant experiments d'immunoprecipitació, que $b^{0,+}AT$ heterodímeritza exclusivament amb rBAT en membranes de *brush border* (on es localitzen *in vivo*) (Fernandez et al., 2002).

2.1.6 xCT (SLC7A11)

El transportador xCT de ratolí s'identificà per expressió funcional, juntament amb 4F2hc, en oòcits de *Xenopus* a partir d'RNA de macròfags activats (Sato et al., 1999), mentre que l'ortòleg humà s'identificà per homologia amb altres membres clonats de la família LSHAT (Bassi et al., 2001). L'expressió de 4F2hc/xCT en oòcits de *Xenopus* indueix activitat x_c^- , caracteritzada per l'intercanvi obligatori i electroneutre d'aminoàcids aniònics independent de Na^+ i d'alta afinitat, amb una estequiometria d'intercanvi 1:1 (Sato et al., 1999; Bassi et al., 2001; Bridges et al., 2001). Aquesta activitat és responsable de l'entrada de cistina i sortida de glutamat, pel fet que la concentració intracel·lular és baixa per la cistina i elevada pel glutamat. L'entrada de cistina a la cèl·lula provoca la seva reducció a cisteïna, que s'incorpora a la síntesi de proteïnes i glutatió. L'activitat del sistema x_c^- té un paper fisiològic directe en la regulació de la concentració intracel·lular de glutatió reduït (Bannai and Tateishi, 1986). 4F2hc/xCT juga un paper important en la protecció contra l'estrès oxidatiu cel·lular, molt documentat en neurones, ajudant a la cèl·lula a combatre els radicals lliures (Sato et al., 2002). L'exposició de les cèl·lules a agents químics o

tractaments que disminueixen els nivells intracel·lulars de glutatió activen la transcripció de xCT. Així, els lipopolisacàrids, l'estrès químic o l'òxid nítric s'ha demostrat que indueixen l'expressió d'xCT en macròfags i cèl·lules pigmentades de la retina, efecte que és modulats per la concentració d'oxigen (Sato et al., 1999; Bridges et al., 2001; Sato et al., 2001).

El missatger d'xCT de ratolí s'expressa fonamentalment en macròfags activats, cervell (àrea hipotalàmica i meninges), medul·la espinal i pàncrees i amb menys intensitat en fetge, intestí, ovari, ronyó, pulmó, illots pancreàtics i les línies cel·lulars tumorals Caco-2 i HepG2 (Sato et al., 1999; Bassi et al., 2001) (Kim et al., 2001; Sato et al., 2002). També l'activitat del sistema x_c^- s'ha vist induïda per estrès químic o físic en macròfags, hepatòcits, fibroblasts, neurones i cèl·lules de la glia, ronyó i pàncrees (Ishii et al., 1992; Sato et al., 1998).

El model elegit pel nostre grup per a l'elucidació de la topologia a la membrana de les LSHAT ha estat la subunitat lleugera xCT, ja que el grau d'expressió de transport d'aminoàcids (glutamat i cistina en aquest cas) sobre l'activitat basal en sistemes d'expressió (oòcits o cèl·lules transfectades) d'xCT i 4F2hc és el major dels membres de la família de transportadors HAT. També s'ha utilitzat xCT per realitzar estudis per identificar els residus rellevants per l'activitat catalítica en les LSHAT.

En el nostre laboratori s'han fet estudis de mutagènesi per rastreig de cisteïnes (*cysteine scanning mutagenesis*) a partir del mutant sense cisteïnes d'xCT (figura 2). Aquests donen suport a la predicció de topologia amb 12 dominis transmembrana amb l'N i el C-terminal localitzats intracel·lularment i amb una estructura de bucle reentrant en el fragment intracel·lular IL2-3 (fragment que uneix les hèlixs transmembrana 2 i 3) (Gasol et al., 2004) (figura 2).

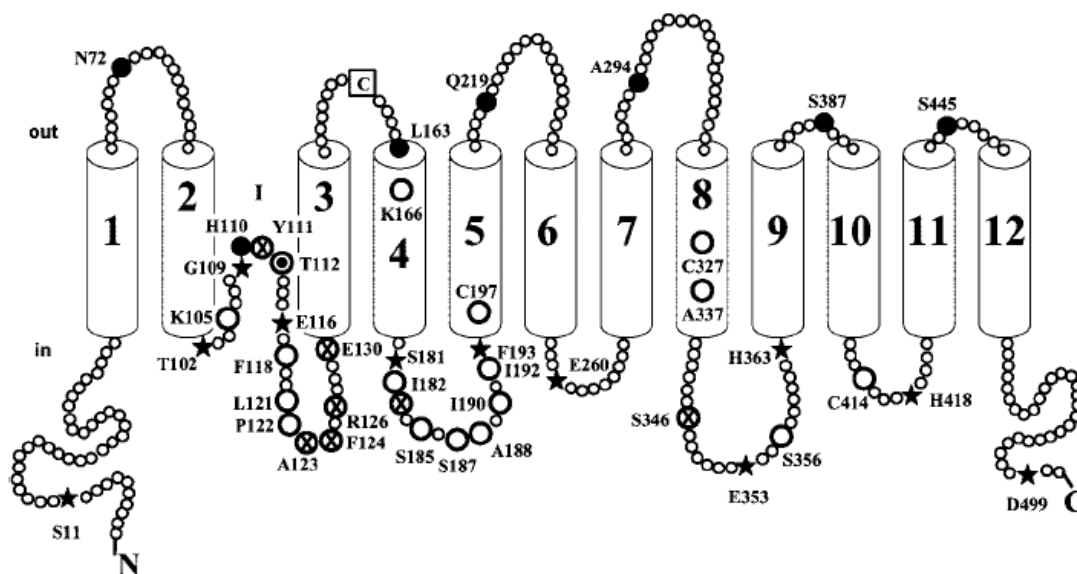


Figura 2. Topologia d'xCT. Figura dels estudis de topologia d'xCT de la publicació (Gasol et al., 2004). Els 12 segments transmembrana estan numerats i el bucle reentrant està dibuixat. Estan marcats tots els residus que han estat mutats individualment a cisteïna i han estat testats per reactius específics d'aquest aminoàcid. Els cercles negres indiquen els residus que es poden biotinilar des de l'exterior (són accessibles des de la part extracel·lular) i les estrelles els que es biotinilen des de l'interior (intracel·lulars). Els cercles blancs i grans indiquen no biotinilació. Els cercles amb una creu són els mutants de cisteïna que no tenien suficient activitat ($\leq 25\%$ de xCT Cysless (sense cisteïnes), proteïna sobre la qual estan fets tots els mutants individuals a cisteïna). El cercle negre envoltat d'un cercle blanc indica accessibilitat només per a alguns reactius. La cisteïna 158, encarregada de formar el pont disulfur amb la subunitat pesada 4F2hc, està enquadrada.

En l'apex d'aquest bucle reentrant s'hi troba la histidina 110, que malgrat estar en un bucle predit intracel·lular és accessible des de l'exterior. La histidina no forma part de la unió amb el substrat, ja que el mutant és actiu, però sí que s'hi troba a prop, perquè la seva accessibilitat queda disminuïda per la presència de substrat glutamat i cistina.

Recentment xCT ha estat identificat com al receptor de l'herpesvirus associat al sarcoma de Kaposi (Kaleeba and Berger, 2006). S'ha identificat mitjançant una llibreria de cDNAs provinent de cèl·lules que permeten l'entrada del virus transfectada en cèl·lules que no ho permeten. També demostren que anticossos anti-xCT bloquegen l'entrada del virus en cèl·lules permissives. En aquest treball, però, no es parla de 4F2hc i el paper de l'heterodímer 4F2hc/xCT però tenint en compte que les integrines $\alpha_3\beta_1$ ja estaven implicades en l'entrada d'aquest virus

(Akula et al., 2002) i que aquestes interaccionen amb 4F2hc (veure apartat 3.2), és molt possible que 4F2hc també sigui important en el procés de reconeixement i entrada del virus en les cèl·lules infectades.

2.1.7 asc-1 (SLC7A10)

Per homologia amb LAT-2 també es va identificar asc-1 a partir d'una llibreria de cDNA de cervell de ratolí (Fukasawa et al., 2000). Les seqüències de ratolí i humà codifiquen per a una proteïna de 530 i 523 aminoàcids respectivament amb un pes molecular aparent de ~53 kDa i una identitat del 91% entre les dues espècies. L'mRNA d'asc-1 es troba sobretot a ronyó i cervell, però també a placenta, cor, múscul esquelètic, pulmó, fetge i pàncrees humans (Nakauchi et al., 2000). L'expressió d'asc-1 i 4F2hc en oòcits de *X. laevis* indueix el transport d'alta afinitat i independent de Na⁺ d'L- i D-aminoàcids neutres de cadena curta, com la L-alanina, L-serina, L-cisteïna, L-glicina i L-treonina (sistema asc), i s'inhibeix per l'àcid α -aminoisobutíric (AIB) i la β -alanina, que també es transporten (Fukasawa et al., 2000). A diferència de la majoria d'LSHATs, asc-1/4F2hc, tot i actuar preferentment com a intercanviador, no és un intercanviador obligatori i pot transportar aminoàcids en una sola direcció (Fukasawa et al., 2000; Pineda et al., 2004a). Aquestes característiques de transport corresponen amb les descrites anteriorment per a un subtipus de transport asc en limfòcits de sang perifèrica (Albi et al., 1994).

Aquest doble comportament ja ha estat descrit pel transportador d'anions orgànics OAT1 (Sekine et al., 1997). Les característiques del transport són similars a un dels subtipus de l'activitat de transport asc ja descrit en eritròcits (Fincham et al., 1985). El transport de D-serina a concentració fisiològica podria jugar un paper important en el sistema nerviós central, ja que la serina actua com a modulador endogen dels receptors de glutamat de tipus NMDA. És possible que la mobilització de D-serina a través d'asc-1 a les zones glutamatèrgiques tingui un paper en la regulació de la transmissió sinàptica (Nakauchi et al., 2000).

El gen corresponent a asc-1, SLC7A10, mapa al cromosoma 19q13.1 humà (Nakauchi et al., 2000), dins el locus genètic de la cistinúria de tipus B. Aquest fet junt amb la seva expressió en ronyó i la capacitat per transportar cisteïna van fer hipotetitzar que SLC7A10 fos un gen de cistinúria. L'estudi genètic d'aquest gen en

pacients de cistinúria i l'evidència que asc-1 no s'expressa en el tub proximal on s'hi produeix la reabsorció d'aminoàcids (Pineda et al., 2004a), descarten aquesta possibilitat.

2.1.8 asc-2 (SLC7A12)

L'homologia d'asc-2 a la família de les LSHATs és baixa però suficient per poder-la identificar (Chairoungdua et al., 2001; Blondeau, 2002). Fins a l'actualitat només ha estat identificat el cDNA de ratolí. La proteïna asc-2 s'expressa en ronyó, placenta, pulmó, melsa i múscul esquelètic. Concretament en el ronyó, la proteïna es localitza tant a la membrana apical com basolateral de les cèl·lules epitelials del tub col·lector (Chairoungdua et al., 2001). asc-2 presenta totes les característiques de les LSHATs (inclosa la cisteïna conservada del pont disulfur) però no indueix transport d'aminoàcids quan es coexpressa amb rBAT o 4F2hc en sistemes heteròlegs. La caracterització funcional d'asc-2 s'ha fet utilitzant proteïnes de fusió d'asc-2 connectades a 4F2hc o rBAT. Aquestes proteïnes de fusió s'expressen a la membrana plasmàtica, induint activitat de transport de tipus asc (transport independent de Na⁺ d'aminoàcids neutres petits) (Chairoungdua et al., 2001). A diferència del transport induït per 4F2hc/asc-1, aquest transport és estereoselectiu i a penes transporta àcid α -aminoisobutíric, D-serina, D-alanina i β -alanina. Així, el subtipus de transport induït per asc-1 correspon a l'identificat en limfòcits de sang perifèrica i hepatòcits (Albi et al., 1994), i l'induït per asc-2, al descrit en eritròcits (Albi et al., 1994; Chairoungdua et al., 2001).

El mecanisme de transport proposat per asc-2 és d'intercanvi i difusió facilitada. S'ha suggerit que el transport d'alanina a les cèl·lules del tub col·lector, podria proporcionar el substrat necessari per a la síntesi d'osmòlits (Jans et al., 1988; Chairoungdua et al., 2001).

Per anàlisi de *Western blot* d'asc-2 en eritròcits i ronyó en condicions no reductores es detecten múltiples bandes d'elevada massa molecular mentre que en condicions reductores es detecta una única banda de mida menor (60 KDa). Això suggereix que asc-2 podria associar-se a altres proteïnes per mitjà de pont disulfur. Per tant, sembla que asc-2 s'uniria a una o més cadenes pesades encara no identificades (Chairoungdua et al., 2001).

2.1.9 AGT-1 (SLC7A13)

AGT-1 es va clonar a partir d'una llibreria de cDNA de ronyó de ratolí gràcies a la seva homologia amb b⁰⁺AT (Matsuo et al., 2002). Posteriorment es va clonar el seu ortòleg humà (Blondeau, 2002). Aquest transportador s'expressa en ronyó, concretament a la membrana basolateral de les cèl·lules del túbul proximal recte i del túbul distal (Blondeau, 2002; Matsuo et al., 2002). AGT-1 presenta elevada homologia amb asc-2 (48% d'identitat entre les proteïnes de ratolí). Com asc-2, AGT-1 no és funcional quan s'expressa amb 4F2hc o rBAT. Per anàlisi de *Western blot*, AGT-1 es detecta com una banda d'elevada massa molecular (250 KDa) en condicions no reductores i com a monòmer (40KDa) en condicions reductores, i això suggereix que aquesta subunitat lleugera s'uneix a una o més proteïnes, encara no identificades, per pont disulfur (Blondeau, 2002; Matsuo et al., 2002). Per estudiar l'activitat s'han analitzat proteïnes de fusió d'AGT-1 amb 4F2hc o rBAT, com en el cas d'asc-2. El transport induït en els oòcits de *Xenopus* és exclusiu d'aminoàcids àcids (glutamat i aspartat), independent de sodi, amb elevada afinitat i estereoselectiu. A diferència d'xCT, que no té gaire afinitat per l'aspartat, aquest transportador té preferència per les cadenes laterals curtes, i no accepta cistina (Matsuo et al., 2002). Aquesta activitat no es correspon amb cap sistema de transport descrit fins al moment, potser a causa de la seva limitada expressió en la membrana basolateral de les cèl·lules epitelials dels túbuls proximal recte i distal. En aquestes cèl·lules també s'expressa el transportador dependent de Na⁺ d'aminoàcids àcids EAAT3, que pot haver interferit en la identificació d'aquest sistema de transport. Es considera la possibilitat que AGT-1 proporcioni el camí de sortida basolateral als aminoàcids reabsorbits per EAAT3 (Matsuo et al., 2002).

2.1.10 arpAT (SLC7A14)

Estudis recents realitzats pels Drs. J. Chillarón i E. Fernández en el nostre laboratori han identificat en la genoma de ratolí una nova subunitat lleugera de la família LSHAT (Fernandez et al., 2005). L'han anomenat arpAT (aromatic prefering Amino acid Transporter) i presenta una identitat de seqüència amb la resta de membres de la família del 32-43%. La seva caracterització funcional mostra que indueix transport d'aminoàcids neutres, preferentment aromàtics, independent de sodi, transestimulable, estereoselectiu i de baixa afinitat. Podria representar una variant

del sistema de transport d'aminoàcids T, ja que es va clonar per RT-PCR a partir de ronyó de ratolí (Fernandez et al., 2005).

La seva activitat de transport s'indueix quan arpAT s'expressa amb rBAT o 4F2hc en cèl·lules HeLa. L'ortòleg humà d'arpAT sembla estar silenciada en els genomes de primats. Experiments de Northern blot presenten senyal d'arpAT en ronyó, intestí prim, cervell, fetge i cor però en augmentar l'astringència de rentat, només apareix expressió en cervell i intestí prim, i perd el senyal en ronyó. Experiments d'hibridació in situ semblen confirmar que arpAT no s'expressa en ronyó (Fernandez et al., 2005).

2.2. Les subunitats pesades: rBAT i 4F2hc

Les subunitats pesades (*Heavy Subunits of Heteromeric Amino acid Transporters* o HSHATs) componen la família SLC3 (*SoLute Carrier 3*) (Palacin and Kanai, 2004). Fins al moment aquesta família està formada per dues proteïnes que comparteixen propietats estructurals i funcionals: rBAT (també anomenada NBAT o D2 i codificada pel gen *SLC3A1*) i 4F2hc (també anomenada CD98hc o FRP1 i codificada pel gen *SLC3A2*). Les seqüències humanes de rBAT i 4F2hc codifiquen per glicoproteïnes de 685 i 529 aminoàcids respectivament, i presenten un 30% d'identitat entre elles. Les formes glicosilades d'aquestes proteïnes presenten una mobilitat en SDS-PAGE en condicions reductores de 94 i 85 kDa (Palacin et al., 1998), mentre que en condicions no reductores les subunitats pesades formen part d'un complex de 120-130 kDa (Chillaron et al., 2001). Aquesta observació evidencià que les glicoproteïnes rBAT i 4F2hc formen part de transportadors d'aminoàcids heteromèrics (revisat a (Chillaron et al., 2001).

4F2hc i rBAT estan mancades de seqüència líder que les dirigeixi a la membrana i són glicoproteïnes de membrana de tipus II (N-terminal citoplasmàtic). Totes dues tenen perfils d'hidrofobicitat semblants i els algorismes de predicció de topologia de membrana indiquen una sola hèlix transmembrana de 23 residus amb una cua N-terminal intracel·lular i un domini extracel·lular (ectodomini) amb homologia a les α -amilases d'insectes i α -glucosidases bacterianes (Bertran et al., 1992b; Wells et al., 1992).

El residu de cisteïna que participa en la formació del pont disulfur amb la subunitat lleugera es localitza extracel·lularment, a una distància de 4-5 aminoàcids del segment transmembrana, exactament en la posició 114 i 109 en rBAT i 4F2hc, respectivament. També es proposà un model d'rBAT amb 4 segments transmembrana i els extrems N i C-terminals intracel·lulars, suportat per experiments d'immunofluorescència amb anticossos específics de pèptids i per proteòlisi limitada (Mosckovitz et al., 1994). El grup de M.H. Ginsberg ha demostrat que l'extrem N-terminal de 4F2hc és intracel·lular i el C-terminal és extracel·lular (Fenczik et al., 2001), d'acord amb les primeres prediccions.

Un altre argument a favor de l'estructura d'un sol domini transmembrana és que el domini C-terminal extracel·lular de 4F2hc i rBAT presenta homologia significativa amb les α -amilases d'insectes i les α -glucosidases bacterianes (30-40% d'identitat) (Quackenbush et al., 1987; Teixeira et al., 1987; Bertran et al., 1992b; Tate et al., 1992; Wells and Hediger, 1992). L'homologia amb les α -amilases comença en 2 triptòfans (117 i 118) a 7 i 13 residus del segment TM a 4F2hc i rBAT, respectivament, i continua fins a l'extrem C-terminal del domini extracel·lular i de les glucosidases bacterianes (Chillarón *et al.* 2001). Aquests enzims pertanyen a la gran família de les glicosilhidrolases (Janecek, 1997), i presenten tots ells una estructura similar. En el punt 4 de la introducció és detalla aquesta relació entre els ectodomínis de les HSHATs i les α -amilases.

Quan es va identificar rBAT i 4F2hc com a proteïnes de transport, encara no es coneixia la participació en un heterodímer funcional d'aquestes proteïnes. Precisament el fet que les subunitats pesades tinguessin una estructura inusual com a proteïnes relacionades amb el transport d'aminoàcids va fer hipotetitzar que formaven part d'un holotransportador junt amb subunitats aleshores desconegudes (Palacin et al., 1998). La manca de correlació entre la quantitat de proteïna rBAT en la superfície de l'oòcit i el transport y+L induït (Chillarón et al., 1997) i uns estudis d'inactivació de l'activitat de transport y+L deguda a la modificació de residus de cisteïna (*cysless*) de 4F2hc (Estevez et al., 1998) confirmaren la hipòtesi.

Així, malgrat que cap d'aquestes dues proteïnes presenta la típica estructura d'un transportador, quan eren expressades mitjançant injecció del seu cRNA en oòcits de *Xenopus*, ambdues induïen transport d'aminoàcids. rBAT indueix una activitat molt

semblant a l'activitat $b^{0,+}$ (veure la taula 1), definida per Van Winkle en blastòcits de ratolí (Van Winkle et al., 1988), però que a més transporta cistina. També s'han descrit altres activitats associades a l'expressió d'rBAT, fins i tot una dependent de Na^+ (Peter et al., 1996; Ahmed et al., 1997). 4F2hc induïx una activitat molt semblant al sistema y^+L (Bertran et al., 1992a; Wells and Hediger, 1992), al sistema L (Broer et al., 1995; Broer et al., 1997) i al sistema $b^{0,+}$ (Broer et al., 1998).

El fet que ambdues proteïnes induïssin més d'una activitat de transport donà força a la hipòtesi, comprovada més endavant, que rBAT i 4F2hc són subunitats acompanyants de transportadors heteromèrics. Quan el cRNA de rBAT o el de 4F2hc són injectats a oòcits de *Xenopus* s'associen als transportadors silents endògens (subunitats lleugeres) i formen l'holotransportador actiu. En canvi, l'expressió de rBAT a cèl·lules COS-7, que no tenen una subunitat lleugera adient, no induïx el transport d'aminoàcids (Palacin, 1994).

Des del punt de vista funcional, el paper de la subunitats pesades 4F2hc i rBAT s'ha relacionat amb el trànsit de la subunitat lleugera a la membrana plasmàtica. L'eliminació del pont disulfur per mutació de les cisteïnes implicades disminueix, però no elimina, l'expressió de l'heterodímer a la membrana plasmàtica, fet que suggereix l'existència d'interaccions no covalents entre la subunitat pesada i la lleugera (Estevez et al., 1998; Mastroberardino et al., 1998; Pfeiffer et al., 1998). Per altra banda, diferents observacions han implicat a les subunitats pesades en la modulació de les propietats funcionals dels holotransportadors (Peter et al., 2000; Rajan et al., 2000a). El 2002, en experiments de reconstitució realitzats al nostre laboratori (Reig et al., 2002), es demostrà que la reconstitució en liposomes de membranes de cèl·lules transfectades amb $b^{0,+}AT$ sol, tenia el mateix transport que si la reconstitució era de cèl·lules transfectades amb les dues subunitats, rBAT i $b^{0,+}AT$, apuntant que la subunitat lleugera és la catalítica mentre que la pesada és important per al trànsit de l'holotransportador a la membrana.

En aquest sentit, totes les mutacions estudiades d'rBAT, que estan implicades en cistinúria, afecten el trànsit de l'holotransportador a la membrana plasmàtica (Chillaron et al., 1997; Saadi et al., 1998). Per altra banda, alguns estudis han suggerit que rBAT podia actuar alterant les propietats funcionals de l'heterodímer rBAT/ $b^{0,+}AT$. La mutació C664A a rBAT de rata (corresponent al residu C666 de

rBAT humà) altera la sensibilitat al NEM del transportador (Peter et al., 2000); les constants cinètiques són diferents segons si $b^{0,+}AT$ es coexpressa amb rBAT o amb 4F2hc en cèl·lules HRPE (Rajan et al., 2000a); i també sabem que els mutants C571S, C666S aboleixen gairebé totalment l'activitat de transport induïda per rBAT (Marta Pineda, tesi doctoral). A més, la mutació de cistinúria R365W, que produeix un defecte de trànsit sensible a temperatura en cèl·lules HeLa però no en oòcits, mostra un defecte de l'eflux d'arginina però no de l'influx (Pineda et al., 2004b).

2.2.1 rBAT

La proteïna rBAT (*related to $b^{0,+}$ Amino Acid Transporter*) fou la primera subunitat identificada de la família dels transportadors heteromèrics d'aminoàcids. Es va clonar l'any 1992 per expressió funcional en oòcits de *Xenopus* a partir de mRNA de ronyó de conill i rata de forma independent i simultània en tres laboratoris. Els cDNA induïen el transport, independent de Na^+ , d'aminoàcids bàsics, alguns de neutres i cistina. Aquests cDNA corresponien a les versions en conill (Bertran et al., 1992b) i rata (Tate et al., 1992; Wells and Hediger, 1992) de la mateixa proteïna que, segons el laboratori, rebé els noms de rBAT (*related to $B^{0,+}$ Amino acid Transport*), D2 i NBAT (*Neutral and Basic Amino acid Transporter*), respectivament. Poc després se'n clonà el cDNA humà (NM_000341) (Bertran et al., 1993; Lee et al., 1993). Les seves seqüències mostren entre el 80 i el 85% d'identitat d'aminoàcids amb les anteriorment clonades de rata i de ratolí.

L'mRNA d'rBAT s'expressa principalment al ronyó i a la mucosa de l'intestí prim, i en menor grau, al fetge i el pàncrees (Bertran et al., 1992b; Wells and Hediger, 1992; Lee et al., 1993; Yan et al., 1992). L'anàlisi de *Northern* en aquests teixits mostra un transcrit de 2,3 kb i un de 4 kb, corresponents a poliadenilacions alternatives del mateix gen (Bertran et al., 1992b; Markovich et al., 1993). Estudis d'hibridació *in situ* i d'immunolocalització han demostrat que l'expressió d'rBAT es localitza als microvil·li de la mucosa de l'intestí prim i de les cèl·lules epitelials del túbul proximal de la nefrona, amb una expressió creixent del segment S1 a l'S3 (Kanai et al., 1992; Furriols et al., 1993; Pickel et al., 1993).

D'altra banda, al cervell s'ha detectat un transcrit més llarg, d'unes 5 kb, que també és present a altres teixits humans (Yan et al., 1992; Bertran et al., 1993), i sembla

correspondre a un gen homòleg a rBAT (Yan et al., 1992; Pickel et al., 1993). L'expressió d'rBAT es regula durant el desenvolupament, de manera que el seu mRNA es comença a detectar al final de la vida fetal, i la proteïna a partir del cinquè dia de vida postnatal de la rata i incrementa després de l'alletament (Furriols et al., 1993).

L'activitat de transport associada a rBAT s'ha estudiat en oòcits de *Xenopus*. En aquest sistema rBAT indueix transport independent de Na⁺ de cistina i aminoàcids bàsics i neutres amb elevada afinitat (Bertran et al., 1992b; Wells and Hediger, 1992). Com ja s'ha esmentat anteriorment, aquesta activitat s'anomenà b^{0,+}-like. Posteriorment es demostrà que rBAT actua com a intercanviador obligatori (Coady et al., 1994; Ahmed et al., 1995) amb una estequiometria 1:1 (Chillaron et al., 1996), i que l'intercanvi entre aminoàcids bàsics i neutres és electrogènic, és a dir, la captació d'aminoàcids neutres va acompanyada per corrents de sortida generades per la sortida simultània d'aminoàcids bàsics, mentre que la captació d'aminoàcids catiónics va acompanyada de corrents d'entrada, a causa de l'antiport d'aminoàcids neutres (Busch et al., 1994). Per altra banda, el paper de rBAT en reabsorció d'aminoàcids catiónics i cistina va evidenciar-se pel fet que el *knock down* de rBAT en cèl·lules OK disminueix l'activitat b^{0,+} (Mora et al., 1996) i que mutacions a *SLC3A1* (gen que codifica rBAT) causen cistinúria, una aminoacidúria primària hereditària caracteritzada per hiperexcreció renal de cistina i aminoàcids bàsics i per la producció de litiasi de cistina (Calonge et al., 1994)

L'any 1999 es va identificar el transportador b^{0,+}AT (*SLC7A9*) com a responsable de la inducció de l'activitat b^{0,+} quan s'expressava juntament amb rBAT (Feliubadalo et al., 1999; Chairoungdua et al., 1999; Pfeiffer et al., 1999a). També es van trobar mutacions en aquesta subunitat en pacients de cistinúria principalment de tipus no I (apartat 2.3.1).

2.2.2 4F2hc

El cDNA de 4F2hc (4F2 *heavy chain*, també anomenada CD98 i FRP-1 de *Fusion Regulatory Protein-1*) es va clonar usant un anticòs monoclonal dissenyat contra un antigen de superfície de cèl·lules de limfoblastoma (Hemler and Strominger, 1982).

L'homologia de l'antigen de superfície de membrana 4F2hc amb rBAT (acabada de

clonar) (30% d'identitat de seqüència entre els gens humans) va promoure que es realitzessin estudis d'expressió en oòcits de *Xenopus*, i va permetre relacionar 4F2hc amb el sistema de transport d'aminoàcids y⁺L (Bertran et al., 1992a; Wells et al., 1992). Més tard, la seva expressió en oòcits també es va relacionar amb la inducció del sistema L (Broer et al., 1995).

A diferència d'rBAT, la proteïna 4F2hc s'expressa de forma ubiqua (a excepció de les plaquetes) i sembla estar present en totes les cèl·lules i línies cel·lulars tumorals (Nakamura et al., 1999; Parmacek et al., 1989). En ronyó i en intestí té alts nivells d'expressió. En el ronyó s'ha localitzat a la membrana basolateral de les cèl·lules epitelials del túbul proximal (Quackenbush et al., 1986; Rossier et al., 1999). En les cèl·lules polaritzades 4F2hc es troba unit a les seves subunitats lleugeres en la membrana basolateral.

La comparació entre l'expressió de 4F2hc en teixits neonatals i adults de ratolí no mostra un patró d'expressió clar durant el desenvolupament embrionari (Parmacek et al., 1989).

Actualment se sap que 4F2hc interacciona amb diferents membres de la família de les LSHATs, i indueix diferents sistemes de transport (taula 2). Així, els heterodímers formats per 4F2hc amb les subunitats lleugeres y⁺LAT-1, y⁺LAT-2, LAT-1, LAT-2, asc-1 i xCT indueixen activitat de transport de tipus y⁺L, L, asc y xc⁻ (revisat a (Chillaron et al., 2001). Estudis de deleccions de 4F2hc han demostrat que en la interacció amb aquestes subunitats lleugeres hi intervenen diferents dominis. Per exemple, el domini C-terminal sembla imprescindible per a l'arribada a la membrana de LAT-2 i y⁺LAT-2, però no de LAT-1 (Broer et al., 2001)

2.3. Les aminoacidúries hereditàries

La pèrdua de funció d'alguns membres dels HATS provoquen defectes en la reabsorció d'aminoàcids al ronyó i a l'intestí, i causen malalties conegudes amb els noms de cistinúria i lisinúria amb intolerància a proteïnes respectivament. La primera està genèticament associada a b^{0,+}AT i rBAT i la segona a y⁺LAT-1 (taula2).

2.3.1 La Cistinúria

La cistinúria és una malaltia autosòmica recessiva, amb una incidència mitjana de 1 cada 7000 naixements (Chillaron et al., 2001), encara que varia considerablement entre diferents poblacions. La malaltia està causada per un defecte en el transport de cistina i aminoàcids dibàsics a través de la membrana apical de les cèl·lules epitelials del túbul proximal del ronyó i de l'intestí prim. Aproximadament el 99% dels aminoàcids filtrats en els glomèruls es reabsorbeixen al llarg del túbul proximal mitjançant mecanismes de transport localitzats en les cèl·lules epitelials d'aquesta zona (Silbernagl, 1988). Els pacients cistinúrics excreten entre el 50 i el 200% del filtrat glomerular. Quan la cistina arriba al túbul col·lector, on la orina té un pH àcid, aquesta precipita a causa de la seva baixa solubilitat, i forma càlculs en el ronyó que produeixen obstrucció, infecció i, com a última conseqüència, insuficiència renal. La manifestació clínica de la malaltia és la urolitiasi de cistina (Palacin et al., 2001). La cistinúria representa entre l'1-2% de totes les litiasis renals i un 6-8% en els casos pediàtrics. El tractament de la malaltia està dirigit a afavorir la dissolució de la cistina i, per tant, dels càlculs: control dietètic minimitzant ingesta de metionina (precursor de la cisteïna) i entrada d'abundants líquids i alcalinitzants com el bicarbonat sòdic i el citrat de potassi (DENT and SENIOR, 1955). En el tractament farmacològic s'han usat compostos sulfhidril, com la D-penicilamina (CRAWHALL et al., 1963) o la α -mercaptopropionilglicina (King, Jr., 1968), que reaccionen amb la cistina, formen compostos més solubles i prevenen la seva cristal·lització, encara que presenten efectes secundaris com febre, erupcions cutànies i proteïnúria. Normalment es combinen diversos mètodes per a una prevenció efectiva (Joly et al., 1999).

S'han establert dos tipus de cistinúria, la de tipus I (MIM 220100) i la de tipus no-I (MIM600918) (revisat en (Chillaron et al., 2001; Palacin et al., 2000). Els heterozigots

de cistinúria tipus I no presenten manifestacions clíniques de la malaltia, mentre que els de tipus no-I presenten un fenotip variable amb diferents nivells d'hiperexcreció en orina de cistina i aminoàcids dibàsics.

La cistinúria de tipus I està associada a mutacions en el gen rBAT (SLC3A1) (taula 2). S'han identificat 103 mutacions diferents en el gen SLC3A1 que inclouen mutacions *nonsense*, *missence*, de lloc d'*splicing*, de canvi de pauta, grans delecions i reordenaments cromosòmics (revisat en (Palacin et al., 2005). La mutació més freqüent és M467T, associada a un defecte de trànsit (Chillaron et al., 1997).

La cistinúria de tipus no-I, està associada a mutacions en el gen de b^{0,+}AT (SLC7A9) i s'han identificat 66 mutacions diferents en aquest gen (revisat en (Palacin et al., 2005). La mutació més freqüent (25%) és G105R i està associada a un problema en l'estabilitat de la proteïna (Font et al., 2001). Un anàlisi recent del fenotip de pacients heterozigots portadors de mutacions en el gen SLC7A9, demostra que l'excreció d'aminoàcids és normal en un 14 % dels casos (Dello Strologo et al., 2002). Aquests resultats han obligat al ICC a establir una nova classificació per a la malaltia: cistinúria de tipus A, en la qual els pacients presenten mutacions en ambdós al·lells del gen SLC3A1 i els heterozigots presenten excreció d'aminoàcids normal; cistinúria de tipus B, en la què els pacients tenen mutacions en ambdós al·lells del gen SLC7A9 i els heterozigots mostren generalment hiperexcreció de cistina i aminoàcids bàsics (només en el 14% dels casos l'excreció és normal); i cistinúria de tipus AB, en la que els pacients presentarien una mutació del gen SLC3A1 i una altra en el gen SLC7A9, encara que no s'han trobat casos d'aquest tipus (Dello Strologo et al., 2002)

2.3.2 Lisinúria amb intolerància a proteïnes (LPI)

La LPI és una malaltia autosòmica recessiva poc freqüent (es coneixen al voltant de 200 casos), causada per un defecte en el transport d'aminoàcids dibàsics a través de la membrana basolateral de les cèl·lules epitelials del túbul renal i de l'intestí prim (Simell, 2001). La seva incidència més gran és en la població finlandesa (1/60000), amb un ~40% dels casos descrits (revisat en (Palacin and Kanai, 2004; Chillaron et al., 2001; Palacin et al., 2000; Palacin et al., 2004). La malaltia es caracteritza per una absorció intestinal reduïda, excreció renal augmentada, concentracions baixes

d'aminoàcids dibàsics en plasma, acidúria oròtica i disfunció del cicle de la urea per falta de substrats, resultant en hiperamonèmia (Simell, 2001). Altres manifestacions clíniques inclouen vòmits, diarrea, retardament del desenvolupament, (provocat per deficiència de l'aminoàcid essencial lisina), hepatomegàlia, episodis de coma hiperamonèmic i osteoporosi. També s'han descrit casos de proteïnosi alveolar (Simell, 2001; Santamaria et al., 1996), encara que es desconeix el mecanisme patogènic que el provoca (Palacin et al., 2004). El tractament de la LPI es dirigeix a la correcció del defecte funcional del cicle de la urea per evitar els episodis d'hiperamonèmia. Això pot aconseguir-se mitjançant l'administració de citrulina, un aminoàcid neutre que pot metabolitzar-se a arginina i ornitina, i aporta intermediaris al cicle de la urea (Carpenter et al., 1985). Per altra banda, la desnutrició provocada per la deficiència de l'aminoàcid essencial lisina es pot corregir amb administració d'acetillisina, un anàleg de la lisina que permet augmentar la concentració plasmàtica d'aquest aminoàcid, malgrat la seva poca disponibilitat i alt preu (Rajantie et al., 1983). La malaltia està causada per mutacions en el gen que codifica per γ^+ LAT-1 (SLC7A7), encara que s'hipotitza la implicació d'altres factors per a la gran varietat de manifestacions clíniques. S'han descrit 31 mutacions diferents en el gen (Palacin et al., 2005; Shoji et al., 2002; Kamada et al., 2001; Palacin et al., 2001), tot i que la població finlandesa afectada presenta una mutació fundadora (IVS6-2A>T) que altera un lloc d'*splicing* i crea una proteïna truncada.

3. Activitats relacionades amb 4F2hc

4F2hc és una proteïna multifuncional. Al llarg de la seva història se l'ha relacionat en diferents processos cel·lulars com l'activació de limfòcits T, la proliferació, l'adhesió, la fusió i la diferenciació cel·lular.

3.1. 4F2hc i càncer

Diversos estudis han implicat la inducció de l'expressió de 4F2hc en càncer, suggerint un paper en el creixement cel·lular i la malignitat (Chillaron et al., 2001; Deves and Boyd, 2000). De totes maneres, es desconeix si aquest efecte està relacionat amb la funció de 4F2hc com a transportador d'aminoàcids o amb una funció encara desconeguda. En aquest sentit, Shishido et al demostren que en cèl·lules BALB3T3 el pont disulfur entre l'heterodímer és necessari per a l'activitat transformant de CD98. (Shishido et al., 2000).

La sobreexpressió de 4F2hc en cèl·lules NIH3T3 (Hara et al., 1999) i CHO-K1 (Henderson et al., 2004) resulta en un augment de la proliferació cel·lular. En les cèl·lules NIH3T3 (derivades de fibroblastoma de ratolí) provoca l'aparència típica de cèl·lules transformades, tenen incrementat el creixement cel·lular independent d'adhesió (característica fonamental de les cèl·lules transformades), però aquest efecte es redueix en tractar les cèl·lules amb un anticòs anti-4F2hc (Hara et al., 1999). En les cèl·lules CHO-K1 (cèl·lules epitelials d'ovari d'hàmsster) l'activació de PI3K augmenta així com també la fosforilació d'Akt1 i de FAK. També augmenten el nombre i l'extensió de les adhesions focals entre cèl·lules (Henderson et al., 2004) Així doncs, quan es sobreexpressa 4F2hc en cèl·lules tenim un augment de la proliferació i de la morfologia cel·lular transformant i un augment d'adhesió.

Un estudi recent ens mostra que la deleció de 4F2hc en cèl·lules mare embrionàries bloqueja la seva capacitat tumorigènica *in vivo* i la capacitat de formació de teratocarcinomes d'aquestes cèl·lules en ratolí és rescatada per reexpressió de 4F2hc (Feral et al., 2005).

3.2. Relació amb integrines

4F2hc està implicat en l'associació i la regulació de la funció d'integrines (Fenczik et al., 1997).

Les integrines són heterodímers formats per glicoproteïnes transmembranoses de tipus I, constituïdes per dues subunitats: una cadena α de 120 a 180 kDa i una cadena β de 90 a 110 kDa, lligades de forma no-covalent, que poden dissociar-se mitjançant detergents iònics. Els dominis N-terminal extracel·lulars són globulars: superiors a 75 kDa per la subunitat β i a 100 kDa per a la α . Cada subunitat té una regió carboxiterminal citoplasmàtica curta, de 13 a 70 residus d'aminoàcids, amb excepció de la subunitat β_4 , que té un llarg domini citoplasmàtic d'uns 1.000 aminoàcids. La regió N-terminal extracel·lular és més llarga, d'uns 700 aminoàcids per les subunitats β i d'uns 1100 aminoàcids, per a les subunitats α . Els dominis transmembranosos són hidrofòbics i reduïts, aproximadament d'uns 20 aminoàcids.

La seva funció més coneguda és la de receptors per lligands de la matriu extracel·lular i regulen molts aspectes de la biologia cel·lular com la morfologia, l'adhesió, la migració, la proliferació i la diferenciació (Schwartz, 1997).

Molts càncers presenten anormalitats en la funció d'integrines degudes a la transformació per oncogens que afecta a les vies de senyalització d'integrines (Zou et al., 2002). A més, el creixement de molts tumors depèn de la funció d'integrines β_1 (Weaver et al., 1997).

4F2hc interacciona amb les integrines β_1 de manera constitutiva i específica (Fenczik et al., 1997; Zent et al., 2000; Merlin et al., 2001; Miyamoto et al., 2003; Rintoul et al., 2002). Les primeres dades són d'estudis que demostren que 4F2hc estimula l'agregació cel·lular dependent d'integrines (Ohta et al., 1994; Ohgimoto et al., 1995; Ohgimoto et al., 1996; Okamoto et al., 1997a; Okamoto et al., 1997b; Suga et al., 1997; Tabata et al., 1994), on 4F2hc es va identificar com a FRP-1. Per altra banda, 4F2hc sembla tenir un paper important en la fusió cel·lular induïda per infecció vírica (Tsurudome and Ito, 2000). Més tard 4F2hc va ser identificat en un cribratge de proteïnes que estimulen l'afinitat d'integrines (Fenczik et al., 1997). A més, l'entrecruament de 4F2hc amb anticossos anti-4F2hc estimulen l'adhesió

dependent d'integrines $\alpha_3\beta_1$ en cèl·lules de càncer de mama i càncer de cèl·lules petites de pulmó (Chandrasekaran et al., 1999a; Fenczik et al., 1997) i indueix l'activitat PI3-K de forma dependent de FAK i integrines (Rintoul et al., 2002).

Estudis de quimeres entre 4F2hc i una glicoproteïna no relacionada (CD69), demostren que la interacció entre 4F2hc i les integrines β_1 és mitjançant el domini transmembrana de 4F2hc (Henderson et al., 2004; Cai et al., 2005). No obstant això, tant aquest domini com la part de la cua intracel·lular més pròxima (seqüència WVRTR) tenen un paper important en modular l'adhesió cel·lular que depèn d'integrines i la migració (Fenczik et al., 2001) com també la morfogènesi de les cèl·lules epitelials polaritzades renals (Fenczik et al., 2001; Cai et al., 2005). Per altra banda els residus 82-86 (seqüència WALLL) del domini transmembrana de 4F2hc són necessaris per a l'associació a integrines, l'activació de PI3-K i el creixement independent d'adhesió però no per al transport d'aminoàcids en cèl·lules CHO, segons un treball de Henderson et al. (Henderson et al., 2004).

En el treball de (Feral et al., 2005) demostren que 4F2hc contribueix en l'*spreading* cel·lular dependent d'integrines, la migració i la protecció de l'apoptosi. A més 4F2hc és requerit per l'activació induïda per adhesió de Akt i Rac GTPasa, principals components per als senyals dependents d'integrines involucrats en supervivència i migració cel·lular. Amb una quimera, on el domini extracel·lular de 4F2hc ha estat substituït pel d'una glicoproteïna irrellevant (CD69), demostren que els dominis transmembrana i citoplasmàtics són necessaris i suficients per la reconstitució de l'activació de Rac dependent d'adhesió i per rescatar la capacitat de formar tumors de cèl·lules mare embrionàries on 4F2hc havia estat suprimit. Aquestes dades suggereixen que per la relació tumorigènica de 4F2hc només són necessaris aquells dominis que interaccionen i activen les β_1 integrines, però no ho seria el domini extracel·lular ni l'heterodímer unit per un pont disulfur.

El paper de l'heterodímer en l'associació amb les integrines té certa controvèrsia. Per una banda, les mutacions de les cisteïnes de 4F2hc causen pèrdua d'associació amb β_1 integrines en les fraccions de membrana de baixa densitat. Tot i això aquests mutants poden unir les cues citoplasmàtiques de les integrines β_{1A} in vitro. A més no està clar que sense el pont disulfur entre les dues subunitats l'heterodímer no es formi, ja que, com hem comentat en l'apartat 2.1.1, les subunitats lleugeres

s'expressen en superfície malgrat no tenir la cisteïna responsable d'aquest enllaç.

3.3. 4F2hc i galectina-3

La galectina-3 és una lectina que uneix β -galactòsids. Té 3 dominis diferenciats: un petit domini N-terminal de 12 residus que conté un lloc de fosforilació que regula el seu direccionament cel·lular; un domini ric en glicines, tirosines i prolines semblant al col·làgen, el qual serveix de substrat per metal·loproteïnases de la matriu extracel·lular (MMPs); i un domini C-terminal d'uns 130 aminoàcids que conté el domini d'unió i reconeixement de carbohidrats (figura 3).

És una proteïna majoritàriament citoplasmàtica, però pot traslocar al nucli o ser secretada a l'exterior de la cèl·lula. Sembla que per aquesta secreció galectina-3 interaccionaria directament amb els fosfolípids de la membrana i la travessaria (Lukyanov et al., 2005). En els diferents compartiments cel·lulars s'uneix a glicoproteïnes per fer diferents funcions. És expressada en gran quantitat en cèl·lules normals i tumorals i ha estat involucrada en creixement, adhesió i diferenciació cel·lular i en progressió tumoral i metàstasi majoritàriament a través de la seva unió a glicoproteïnes (revisat en (Nakahara et al., 2005).

Una de les glicoproteïnes substrat de la galectina-3 extracel·lular sembla ser 4F2hc de la superfície de cèl·lules T (Hughes, 2001). En aquest treball se suggereix que la interacció de galectina-3 amb 4F2hc podria modificar l'activació d'integrines. CD98 també podria regular el Ca^{2+} intracel·lular seguit del senyal cel·lular a través d'aquesta unió a galectina-3 en cèl·lules T Jurkat (Dong and Hughes, 1996).

Normalment la galectina-3 és monomèrica, però té la capacitat de formar grans complexos multivalents quan està en grans concentracions o quan s'adhereix a un substrat (Birdsall et al., 2001). Aquesta característica fa possible la hipòtesi de que galectina-3 sigui un entrecruador (*crosslinker*) endogen per 4F2hc, i que estigui involucrada en l'activació d'integrines a través d'aquesta proteïna. Aquests efectes podrien ser semblants als que es produeixen en tractar cèl·lules amb anticossos anti-4F2hc. Està demostrat que els anticossos anti-4F2hc poden induir la proliferació de cèl·lules T que és dependent d'integrines (Warren et al., 2000) i en línies cel·lulars de càncer humà provoca l'adhesió mitjançada per integrines a fibronectina o

laminina (Fenczik et al., 1997; Chandrasekaran et al., 1999b). En aquests experiments els anticossos monovalents són inactius, la qual cosa demostra que és necessària la dimerització de 4F2hc per a l'activació d'integrines.

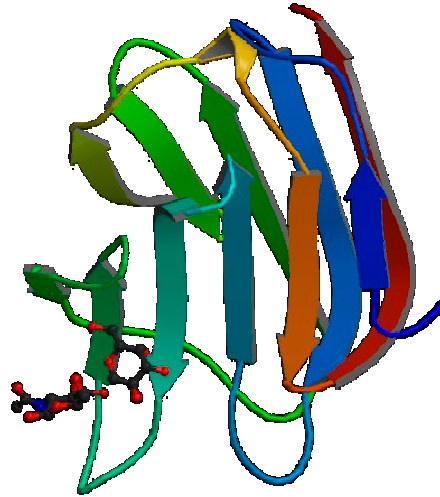


Figura 3. Domini de reconeixement de carbohidrats de galectina-3. Estructura del domini C-terminal de la galectina-3 humana amb N-acetil-D-gucosamina i D-galactosa resolta a 2,1 Å (PDBID 1A3K).

3.4. 4F2hc i ICAM-1

ICAM-1 (*IntraCellular Adhesion Molecule 1*, CD54) és una glicoproteïna de membrana de tipus I, amb cinc dominis extracel·lulars semblants a immunoglobulines (figura 4), un domini transmembrana i un C-terminal intracel·lular. És expressat en la majoria de cèl·lules importants en la resposta immune i inflamació i és induïble en altres tipus cel·lulars. Normalment està expressat a molt baix nivell, però és ràpidament induït per estimulació de citoquines augmentant l'adhesió dels leucòcits a les cèl·lules endotelials en llocs d'infecció o dany. Uneix dues integrines LFA-1 (Leukocyte Function-Associated Antigen 1, integrina $\alpha L\beta_2$, CD11a/CD18) i Mac-1 (Macrophage-1 antigen, CD11b/CD18) i fibrinogen, unió que produeix l'adhesió del leucòcit a l'endoteli vascular. A més, ICAM-1 és usat com a receptor per la majoria de rinovirus. La interacció d'LFA-1 amb ICAM-1 és crítica per l'adhesió, l'extravasació, la migració i la proliferació dels limfòcits (McMurray, 1996; Oppenheimer-Marks and Lipsky, 1996)

Per estudis d'immunoprecipitació s'ha demostrat que ICAM-1 interacciona amb

4F2hc monomèric i amb l'heterodímer 4F2hc/LAT-2 (Liu et al., 2003). Aquest treball també demostra que l'activitat de transport de LAT-2 és regulada per ICAM-1.

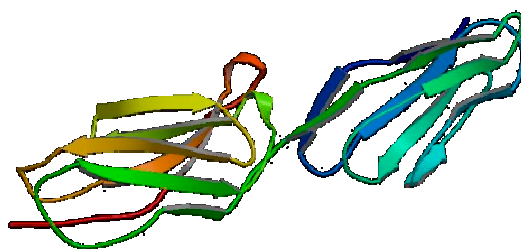


Figura 4. Estructura dels primers dos dominis d'ICAM-1. Representació de l'estructura dels dominis D1 i D2 semblants a immunoglobulines d'ICAM-1 (PDBID 1D3L).

L'entrecreuament de 4F2hc amb el fragment $F(ab')_2$ d'un anticòs monoclonal anti-4F2hc produeix una forta agregació cel·lular que és inhibida per anticossos monoclonals anti-LFA-1 i anti-ICAM-1 (Suga et al., 2001). Els autors d'aquest treball suggereixen que l'entrecreuament de 4F2hc augmenta l'afinitat de LFA-1 per ICAM-1, activa LFA-1 per la via de senyalització de PI3K i indueix acumulació de Rap1GTP (*Ras-related small GTPase*) de forma dependent d'LFA-1, el qual indueix el procés d'adhesió cel·lular dependent del citoesquelet.

3.5. 4F2hc i CD147

Recentment un article d'estudis de proteòmica demostrava la interacció entre 4F2hc i CD147 (Xu and Hemler, 2005).

CD147 (EMMPRIN o *extracellular matrix metalloproteinase inducer; basigin, neurothelin, TCSF o tumor cell-derived collagenase-stimulatory factor*) és una proteïna de superfície cel·lular amb moltes formes glicosilades. És expressada ubíquament a alts nivells en les cèl·lules metabòlicament actives com limfoblasts, cèl·lules inflammatòries, adipòcits marrons i tumors malignes. CD147 promou la producció de metal·loproteases (MMPs) i hialuronan i està involucrada en reproducció, funció neural, inflamació, invasió tumoral i infecció del VIH. Com ja hem comentat abans, actua com a xaperona per als MCT1 i MCT4, de manera semblant a com ho fan les HSHATS amb les LSHATs. CD147 també interacciona amb les integrines β_1 , la ciclofilina A i caveolina-1 (resumit en (Xu and Hemler, 2005).

Anteriorment ja s'havia descrit una interacció funcional entre CD147, 4F2hc i integrines $\alpha_3\beta_1$ (Cho et al., 2001), on un anticòs anti-CD147 inhibia fortament l'agregació cel·lular dependent d'integrines activada per un anticòs anti-4F2hc. En aquest treball es proposava un possible complex multimolecular que regulés l'agregació cel·lular on 4F2hc tindria un paper central (figura 5).

En el treball de Xu i Hemler demostren que CD147 i 4F2hc tenen un paper central en l'organització d'un supercomplex (figura 5). En aquest supercomplex 4F2hc i CD147 interaccionarien directament en CIS (ambdues molècules en la mateixa cèl·lula). CD147 interaccionaria directament amb MCT1 i MCT4 mentre que 4F2hc ho faria amb LAT-1 ASCT-2 i EpCAM (*Epithelial cell adhesion molecule*). Tant MCT1 i MCT4 com LAT-1 són proteïnes que ja se sabia que interaccionaven amb CD147 i 4F2hc respectivament. EpCAM és també una glicoproteïna de membrana altament expressada en cèl·lules epitelials malignes i està sent testada com a diana terapèutica en assajos clínics. ASCT2 és un transportador d'aminoàcids neutres que conté vuit dominis transmembrana. Tant EpCAM com ASCT2 demostren una associació preferent amb 4F2hc, tot i que podrien contactar amb CD147.

Aquest supercomplex seria crític per al metabolisme energètic cel·lular. En el treball també es demostra una correlació de l'expressió de 4F2hc i CD147. La disminució de CD147 o 4F2hc amb RNAi en cèl·lules HEK293 provoca la disminució de l'altra proteïna del complex de manera paral·lela. En canvi, els nivells d'AMP-quinasa (AMPK) demostren estar augmentats. L'activació d'aquest sensor d'energia cel·lular, la qual es dona per alta relació AMP/ATP, és indicativa d'un metabolisme energètic danyat. Per altra banda aquestes cèl·lules amb una disminució de l'expressió de CD147 i 4F2hc tenen una disminució de la proliferació. Segons Hemler, la disminució del supercomplex afectaria en l'entrada a la cèl·lula de nutrients com els aminoàcids, piruvat i lactat; aquesta disminució de substrat aturaria el metabolisme energètic, augmentaria relació AMP/ATP i això activaria la AMPK i aquesta, mitjançant mTOR, regularia la proliferació i el creixement cel·lular.

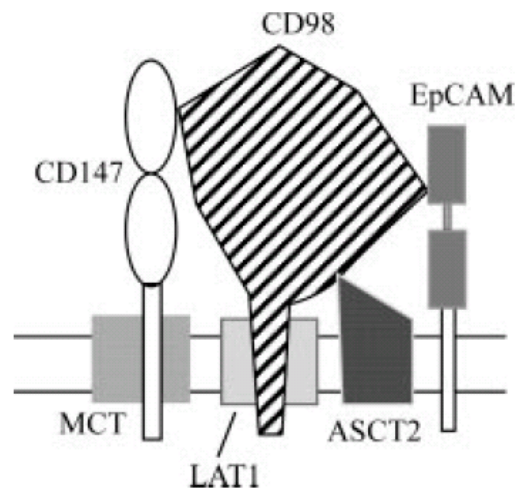


Figura 5. Esquema que proposa Xu et al. per al supercomplex CD147-4F2hc (CD98 en la figura).

4. La família de les α -amilases (o família 13 de les glicosilhidrolases) i homologia amb els ectodominis de les HSHATs

En aquest apartat s'intenta introduir informació sobre les glucosidases i la seva homologia amb els ectodominis de les HSHATs amb la informació que teníem abans de resoldre l'estructura de l'ectodomini de 4F2hc. Més endavant, en l'apartat de RESULTATS i DISCUSSIÓ es tractarà el mateix tema relacionant-lo amb els resultats de la tesi.

Comparacions entre les seqüències d'aminoàcids de les glicosilhidrolases i les transglicosilases han donat lloc a un esquema de classificació basat més en l'estructura que amb l'especificitat (Carbohydrate Active Enzymes database a l'URL <http://www.cazy.org/> de (Coutinho, 1999)). Les glicosilhidrolases engloben més de 80 famílies els membres de les quals tenen una estructura tridimensional i un mecanisme d'acció comú però similituds de seqüència variables (MacGregor et al., 2001). Les famílies 13, 70 i 77 contenen enzims relacionats estructuralment i funcionalment que catalitzen la hidròlisi o la transglicosilació de glucans units per enllaços α . Aquestes tres famílies formen un clan (GH-H), fenomen que es repeteix en algunes altres famílies dins la gran superfamília de les glicosilhidrolases.

4.1. Tipus i funció

La majoria d'aquests enzims actuen sobre el midó. L'enzim més important del grup d'enzims que degraden midó i també el membre més estudiat d'aquest clan és l' α -amilasa i, per això, dona nom al clan i a la família 13, a la qual pertany. La família de les α -amilases consisteix en un gran grup de proteïnes i conté més de 20 especificitats d'activitat glicosil hidrolasa. A més a més també hi podem trobar classificades proteïnes sense funció catalítica coneguda, com rBAT i 4F2hc (Coutinho, 1999).

Svensson i col·laboradors (MacGregor et al., 2001) van presentar una classificació basada en l'especificitat catalítica i l'estructura d'aquests enzims (taula 3). Per una

banda hi hauria els enzims que actuen específicament en els enllaços α -1,4 glicosídics, els específics dels enllaços α -1,6, els enzims que actuen sobre ambdós tipus d'enllaços, les α -glucosidases i els enzims de la sacarosa. En aquest treball no citaven les proteïnes sense funció coneguda com els ectodominis d'rBAT i 4F2hc, tot i que per similitud anirien entre els α -1,6 específics i les α -glucosidases, ja que, com després veurem, per anàlisi de seqüència, s'assemblen a les oligo-1,6-glucosidases procariotes i a les α -glucosidases d'insectes. De fet, si mirem la similitud de seqüència, les glucosidases de la família 13, com les α -glucosidases, les oligo-1,6-glucosidases o les dextran glucosidases, tenen alta similitud de seqüència, i poden ser considerades un subgrup de la família α -amilasa (MacGregor et al., 2001).

4.2. Arquitectura dels dominis

Tots els membres del clan tenen un domini barril $(\alpha/\beta)_8$ (figura 6), anomenat domini A, que conté els aminoàcids catalítics. Entre la tercera cadena β i la tercera hèlix α s'hi troba un domini protuberant anomenat domini B (o subdomini) (figura 6). En moltes α -amilases, però no en totes, el domini A està situat a l'extrem N-terminal de la proteïna. Hi ha subgrups, com les glicosiltransferases, que sembla que hagin tingut una permutació circular en els elements del barril, de manera que la primera hèlix α equival a la tercera d'una α -amilasa (MacGregor et al., 2001). Altres membres tenen un altre domini, el domini N, precedint el domini catalític. El paper d'aquest domini és desconegut tot i que en les amilases maltogèniques ha estat involucrat en l'especificitat (Kim et al., 1999). La majoria dels membres de la família tenen una altre domini seguint el barril $(\alpha/\beta)_8$, el domini C (figura 6). Aquest domini està format per un nombre variable de cadenes β . A més a més, un tipus de glucanotransferases (CGTases) i un tipus d'amilases maltogèniques tenen dominis de fulls β addicionals: dominis D i E (d'unió al midó granular), després del domini C.

Segons especificitat	Subtipus	Característiques funcionals	Característiques estructurals	Alguns membres
Enllaços α-1,4 glicosídics	α-amilases	endo-activitat o exo-activitat.	Hi ha diferències en el número de sublocs del centre actiu. Depèn del número de residus de glucosa que pot unir.	α -amilasa
	Ciclodextrin glucanotransferases (CGTases)	Ciclen els oligosacàrids de 6-8 residus provinents de l'extrem no reductor de la cadena	Tenen 5 dominis (A-E). El domini E serviria per guiar un llarg substrat fins al lloc actiu. El <i>bucle</i> 3 de l'(α/β) ₈ <i>barrel</i> és molt important per l'activitat cicladora	CGTasa
	4-α-glucanotransferases	Són transferases sense activitat ciclasa. Pertany a la fam. 77 de les glicosilhidrolases.	No conserven la His122 (TAA), però tenen residus que la podrien substituir	Maltosil transferasa
Enllaços α-1,6 glicosídics		Poden hidrolitzar enllaços α -1,6 d'un extrem no reductor de la molècula.	No s'ha obtingut l'estructura acomplexada amb oligosacàrids. Tenen grans residus seguint l'Asp206 (TAA)	Isoamilasa, oligo-1,6-glucosidasa
Enllaços α-1,4 i α-1,6 glicosídics	Enzims ramificants	Trenquen un enllaç α -1,4 i formen un enllaç α -1,6, creant branques en el glicogen o l'amilopectina	Hi ha dos grups (A i B) segons la grandària del domini N Glu230 (TAA) va seguit d'un altre àcid (Glu o Asp) que li dóna especificitat.	Enzims ramificants
	Enzims desramificants	Trenquen i formen enllaços α -1,4 i trenquen enllaços α -1,6, alliberant una β -glucosa	Dos llocs actius diferents. El primer és molt semblant al de les α -amilases, però el segon és molt diferent.	desramificants
	altres	Poden hidrolitzar i sintetitzar ambdós enllaços, α -1,4 i α -1,6	Un sol lloc actiu, que ha de ser més flexible, sobretot el subloc +1. En molts Asp, Asn o Gln estan en 209 i Asp o Glu en 210 (TAA)	Neopul-lulanases amil-lopul-lulanases tipus II, ciclodextrinases
α-glucosidases		Alliberen una D-glucosa unida per enllaç α -1,4 a un extrem no reductor No tenen especificitat per la part aglicona del substrat	Flexibilitat en el lloc +1 (figura 6) Enzims amb activitat no dual tenen Gly-Gly en posició 232 i 233 (TAA) (influència en l'especificitat)	α -glucosidases Problemes en classificar.
Enzims de la sacarosa		Transfereixen glucosa d'una molècula de sacarosa a una cadena de polisacàrid creixent.	barril (β/α) ₈ permutat (hi ha controvèrsia en aquest punt) En algunes His 122 (TAA) és reemplaçada per Gln.	Glucan sacarases

Taula 3 Classificació de les α -amilases segons l'especificitat catalítica (MacGregor et al., 2001)

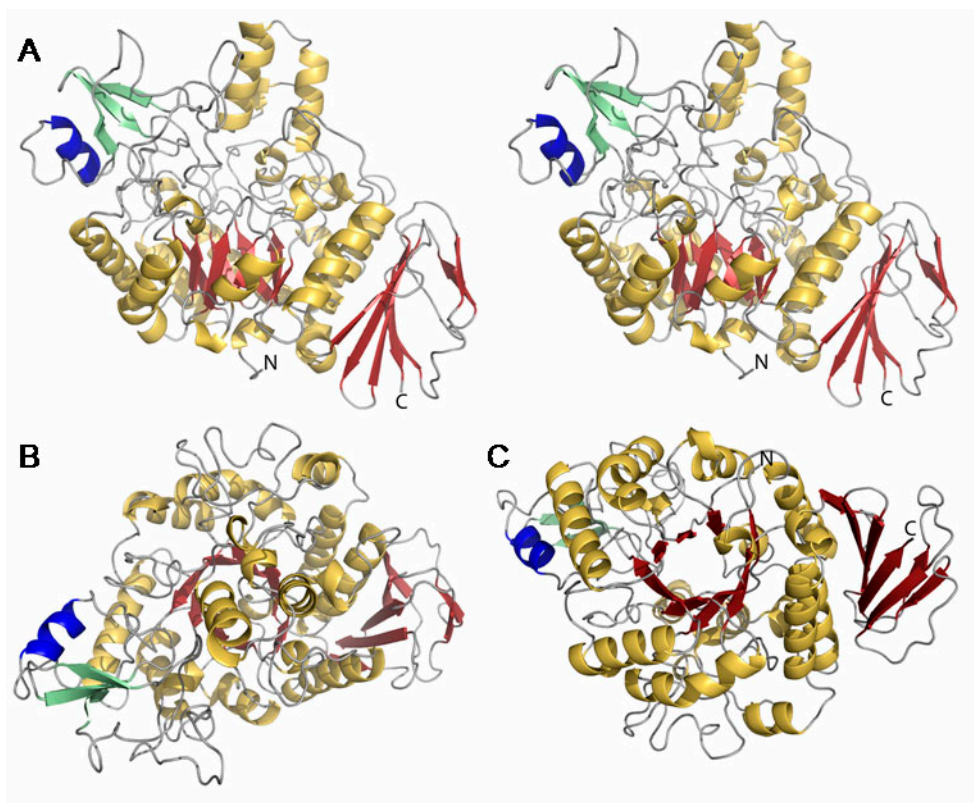


Figura 6. Estructura 3D de oligo 1,6 glucosidasa de *Bacillus cereus* (PDBID 1UOK). A) vista estèreo perpendicular a l'eix del barril $(\alpha/\beta)_8$; B i C) vista al llarg de l'eix del barril $(\alpha/\beta)_8$ des del C-terminal (B) i des de l'N-terminal dels fulls β . En groc i vermell es mostren les hèlixs α i cadenes β , respectivament, del domini A i C; en verd i blau una hèlix α i dos cadenes β , respectivament, del domini B.

4.3. Estructures 3D

Hi ha 41 membres de la família amb estructura tridimensional resoltes per cristal·lografia de raigs X (CAZY: www.cazy.org). Les estructures pertanyen a proteïnes amb diferents activitats com α -amilases, CGTases, oligo-1,6-glucosidases i maltotetrahidrolases. Tota la resta s'ha predit que tinguin un barril $(\alpha/\beta)_8$ catalític similar al de la Taka amilasa d'*Aspergillus oryzae* (TAA^{*}), que va ser el primer resultat (Matsuura et al., 1984), basant-se amb les similituds de seqüència. També s'han resolt bastants complexos dels enzims amb els seus substrats o amb inhibidors (alguns recollits en (Janecek, 1997)) la qual cosa ha permès tenir evidències del mecanisme d'acció comú de les α -amilases i les diferències entre les especificitats

^{*}Tota la numeració dels aminoàcids en aquest apartat estan basats en la seqüència de la TAA, si no s'especifica una altra proteïna.

individuals.

4.4. Variació i conservació. Anàlisi de la seqüència d'rBAT i 4F2.

Les seqüències aminoacídiques de la família de les α -amilases demostren un baix grau de similitud general. No obstant això contenen algunes regions ben definides que estan altament conservades. Janeček descriu set regions de seqüència conservada en els membres de la família de les α -amilases (Janecek, 1997) (figura 7) i les alinea. Les parts més conservades del barril $(\alpha/\beta)_8$ són les cadenes β_2 , β_3 , β_4 , β_5 , β_7 i β_8 , a més d'una seqüència localitzada al C-terminal del llarg bucle 3 (domini B). Els aminoàcids proposats com a residus catalítics es troben dins d'aquestes regions. En aquest treball rBAT i 4F2hc també estan alineats segons aquestes regions amb la resta de membres significatius de la família. En aquest alineament es pot observar que les dues proteïnes contenen alineament en les cadenes β_2 , β_3 , β_4 i β_8 , i rBAT, a més a més, en el bucle3. En un altre alineament (Chillaron et al., 2001) (figura 7) també si alineen les regions β_5 i β_7 en les dues proteïnes.

Per altra banda Janeček et al. van publicar una comparació entre els membres de la família de les α -amilases basant-se en el domini B (Janecek et al., 1997b). En aquest article hi apareix un alineament entre 4F2, rBAT (humanes) i l'oligo-1,6-glucosidasa de *B. cereus*. A més, Chillarón et al. van fer un alineament diferent que es pot observar en la figura 5 (Chillaron et al., 2001) amb les mateixes proteïnes. Aquests alineaments eren interessants perquè l'estructura 3D de l'oligo-1,6-glucosidasa estava resolta a una resolució de 2 Å (Watanabe et al., 1997) (figura 6) i ja ens donava una idea de quina estructura podien tenir els dominis extracel·lulars de les dues proteïnes HSHAT.

En general trobem elements conservats de tots els dominis en les dues proteïnes (excepte del domini B en 4F2hc), cosa que ens feia pensar en una estructura similar. Els últims 34 aminoàcids, la cua C-terminal, de la proteïna rBAT no s'alineen amb les α -amilases en cap dels alineaments publicats.

01,6G TBAT 4F2hc	MAEDSKRSDISEMKGQQTNNNGPVAHEDILLEGPT---DPSGS---TDNLIKHSRGLI- -----MSQDTEVDMEKEVELEINLEPEREKOPMNAASGAMSLAGAEKNGIYVLIKVADEEA -----	-----DPKYQPYAKMPEKVLFOFSQA---RRLRRLLEWLTV -----EAAAAKFTGLSKRELLKVAQSPGWVTRTWALLLEWLTG -----	94 92	
01,6G TBAT 4F2hc	-----MEKQWMEKSYVYQIYPRSPMDSNGDDGIDIRKGTISKLDYIKK- ASVIVLAAATIALIALSPKCL- LGMIA--GAVV-LIVRAPRCRELPAQKWHHTGALYRIG--DIQARQGHAGNLAGIKRRLDYLSSIKYVGLVIGPITKNQKDD- -----	-----Aa1----- -----Aa2----- -----	95 207 203	
01,6G TBAT 4F2hc	-----MADLVVNHTEDEHNWFIERSRKSCKMRYRDIYIWRPGR- LIDPILPWHHSQDKHITWFOISRRTGK-YTDYIYIWDCHTHENKGTIPNNW- LIDLEPNYRG-ENSGWF-STQV- -----	Aa3 * -Aa1-- -Aa1- -Aa2- -Aa3- motif -Aa3----- Aa4* -----EKGEPNNWGAARSGS-AMQYDEMTDEYLLHLFSKQPDILWMDNEKVRQDYYEMMKFWLEKIGIDGFRMLVINIISKEGL -----LSTYGGNSMHHND V NQCTPHQWKEQPDINFRNPDVQSEIKETIRFWLTQKVDGFSID -----DITAAKVKDALFEWLAQAVDGFQVR- -----	-----Aa3----- -----Aa4----- -----Aa5* -----	210 314 247
01,6G TBAT 4F2hc	PVYETEREGYVSGHKHPNNGPNIHKYIHEHNEEVLSHYDI- -----AV-KFLLEKHLRDE- -----DI-ENIKKASSFLAEMQNTITKGFSEDRLLIAGYVSSDL- -----	-----MTYGEWEPGVT- -----IQ-VNKTQILDIV-QYSEYHDFTTQVQGMHDIYRFRQTMQYSTE -----PGRYRFMGTEAYA -----	260 387 284	
01,6G TBAT 4F2hc	-----TEAKKLYTGERK-ELQ- ESIDRTVMTYGLPFTQEDPFPN-NYLSMIDIV- -----QOILSLESNKMDILLTSSYLSDSG- -----	-Aa6 -Aa6' -----AMEQFHEMDDLSGEGKWDVCKPDSL-LILKLENLTKWQALIEHTGM- SG-NSVYEVITISWMMNMPRQK- STGEHTSIVTQYL-NATGNRW- -----	Aa7 - ** Aa7'- -----NSLVMNNHDDOPRVVSRFGDGMRYIESAKMLATVLEMMKGLPPIYQ -----DNNWITGGSPDSSRILTSRIGN- -----QYVNVMMLEFTLPGIPIIYY -----OLIRLYQIMLEFTLPGIPIVSSY -----	366 480 367
01,6G TBAT 4F2hc	-----GHEIGMTNVRPESTIDEXRDLETLNMYK-EKVM- GHEIGMGNL- GPEIGLDA- -----	-----Aa8'----- -----ERGEDIEV- -----MOSYIYIKGRDARPTMOWDQNHAGFTTG- -----SSNAGFSE- -----ASNTWLPITNSDYHT- -----VNVQVOKTOPRSALKLYQDLSIL -----PMAIYVLMID- -----GAVSAN-MTVAGQSEDPGSLISIFRRLSDQ -----	-----Aa8'----- -----Aa8'----- -----Aa8'----- -----	470 558 428
01,6G TBAT 4F2hc	-----RKNNELVVVGSYDLELLENNPSTFAVYRKY- HANELLINRWGFCHLR- RSEKREILHGDHFHAFS- -----	-Cb1- -Cb2-- -Cb3----- -Cb4- -Cb5-- -----KILLVIANFALRE- -----IPIVILVIFGSEST- -----FLVIVINFGDVG- -----LSAGHQASDLPASASIPAKADLL- -----	-----NDDVENGP- -----INNTLRPYEAMVPEKIK -----DPAKLRIR- -----LSTNSA- -----DKGSKVDTSGLFIDKGRGLIEHN -----LSTQV- -----GREGGSPLEIERRIKLEPHRGLIRFP -----	558 651 526
RBAT 4F2hc	TKNLLHRQTAFRDRCFVSNRACYSSVLNLYTSC YAA-----	685 529		

AGPT Aminoàcids conservats
AGPT VII Regions més conservades en tota la família (Janecek, 1997).
AGPT IV Regions conservades importants per activitat catalítica (MacGregor et al, 2001).
H Residus His d'unió al substrat
DHP Residus catalítics, Asp206, Glu 230 I Asp 297 (TAA)
C Residus de Cys que podrien formar ponts disulfur

Figura 7 Multialineament de oligo-1,6-glucosidasa de *Bacillus cereus* i HSHAT. Els elements d'estructura secundària de l'oligo-1,6-glucosidasa de *Bacillus cereus* estan indicats sobre l'alineament. En la llegenda s'hi pot veure què està marcat. (Figura tretze de l'article de (Chillaron et al, 2001

4.4.1 Domini A

Gairebé tots els membres de la família de les α -amilases tenen un element barril $(\alpha/\beta)_8$ determinat per estructura de raigs X o per similituds de seqüència amb els membres d'estructura coneguda. El barril $(\alpha/\beta)_8$ amb el domini B és la part de l'estructura de l'enzim que és comú en tots els membres de la família. En la majoria d'enzims, el domini A consisteix en els 350-400 aminoàcids de l'N-terminal. Les cadenes β estan millor conservades que les hèlixs α corresponents del barril $(\alpha/\beta)_8$, les quals són variables en llargada i seqüència. Aquest fet junt amb les diferències en els bucles permet que es donin gran nombre d'especificitats enzimàtiques en aquesta família.

El domini A conté els residus d'aminoàcids que formen part del lloc actiu: un Glu (E230^{*}) i dos Asp (D206 i D297). La majoria de la família també conté dos His (H122 i H296), que semblen crítiques per a l'estabilització de l'estat de transició (Janecek, 1997) (figura 7).

El lloc actiu de l'enzim es pot considerar format per un grup de sublocs, en què cadascun és capaç d'interactuar amb un dels residus de glucosa del substrat (figura 8). Aquests sublocs consten dels residus d'aminoàcids situats en els bucles en l'estructura de l'enzim que connecta el C-terminal d'una cadena β amb l'N-terminal de l'hèlix adjacent del barril $(\beta/\alpha)_8$ (en la cara C-terminal del barril $(\beta/\alpha)_8$) (MacGregor et al., 2001). L'arquitectura, el nombre i la naturalesa dels sublocs és variable i característic de cada enzim. L'única característica que comparteixen els diferents substrats és una glucosa unida per un enllaç α que ha de posicionar-se al subloc -1. La hidròlisi es realitza entre el subloc -1 i el subloc +1. L'especificitat ve donada pels sublocs que uneixen les aglicones (residus que estan units a la glucosa mínima necessària per a l'activitat, la que se situa en el subloc -1).

* Tota la numeració dels aminoàcids en aquest apartat està basada en la seqüència de la TAA, si no s'especifica una altra proteïna.

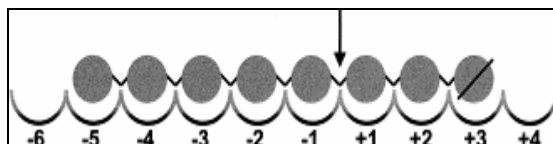


Figura 8. Esquema del lloc actiu de les α -amilases. En aquest esquema l'oligosacàrid ocupa des del lloc -5 fins al +3. El tall passa entre el subloc -1 i +1, com indica la fletxa. El cap reductor de l'oligosacàrid està unit en el lloc +3. (MacGregor et al., 2001).

MacGregor et al. (MacGregor et al., 2001) defineixen quatre seqüències conservades a través de la família que impliquen els aminoàcids catalítics i es troben al final de les cadenes β 3, β 4, β 5 i β 7, i al principi dels bucles corresponents del barril $(\beta/\alpha)_8$ (figura 7 regions subratllades en groc).

En general, els enzims de la família de les α -amilases, tenen un mecanisme de catàlisi àcida. En la TAKA amilasa els aminoàcids catalítics, són: Glu230 (donador de protons), Asp206 (nucleòfil catalític) (Matsuura et al., 1984). A més Asp297, His122 i His296 són importants en el lloc -1, d'unió al substrat. Això s'ha demostrat per estudis de mutagènesi, tot i que les dues histidines no són invariables. Aquests 5 residus estan situats al final de les cadenes β 3, β 4, β 5 i β 7 del barril $(\alpha/\beta)_8$.

En els alineaments publicats ja es podia veure que el domini A està conservat en les HSHAT. Gairebé tots els elements de l'estructura secundària característics del barril $(\beta/\alpha)_8$ es poden identificar en les dues proteïnes (figura 7) i les zones amb més homologia són les cadenes β 2, β 3, β 4 i β 8. En canvi la regió que es troba entre α 4 i α 7 estaria menys conservada. Malgrat això, ja s'apuntava que realment l'estructura que adoptaria el domini extracel·lular de les HSHAT és de barril $(\beta/\alpha)_8$.

Els alineaments publicats fins ara no es posaven d'acord a reconèixer els llocs catalítics. En l'oligo-1,6-glucosidasa de *B. cereus* els aminoàcids catalítics han estat identificats prèviament (Watanabe et al., 1997) i són:

El Glu 255 (O-1,6-G) podria estar conservat en rBAT (E384) segons l'alineament però en 4F2hc, no.

L'Asp 199 (O-1,6-G) el podem trobar en tots tres alineaments publicats en la proteïna rBAT (D314). En 4F2hc es troba el D248 que queda desplaçat un lloc en tots els alineaments, de manera que podria estar conservat.

L'Asp 329 i la His 103 (O-1,6-G) es troben en rBAT (D104 i H215), però no en 4F2hc, en cap cas. La His328 (O-1,6-G) no es troba conservada en cap dels casos ni en rBAT ni en 4F2hc.

En resum, rBAT contindria, gairebé segur, l'Asp 206*, l'Asp 297, la His 122 i potser el Glu 230. En canvi 4F2hc només conservaria l'Asp 206.

Així, seria lògic pensar que rBAT i 4F2hc, encara amb més raó, no tenen activitat glucosidasa. D'acord amb això, Wells et al. no van observar activitat catalítica per a rBAT en expressar-la en oòcits de *Xenopus* (Wells et al., 1992).

4.4.2 Domini B

El bucle que sobresurt de l'estructura catalítica del barril (β/α)₈ entre la cadena β 3 i l'hèlix α 3 (figura 6 i 7) és una estructura irregular que varia d'enzim a enzim en llargada i seqüència i conté un número variable de fulls β i una o dues hèlixs α . En alguns enzims ni tan sols està considerat un domini independent. Tot i això s'han trobat algunes semblances entre els dominis B de membres dels subgrups de la família de les α -amilases. (per exemple diverses glucosidases tenen un domini B semblant entre elles) (Janecek et al., 1997b).

Així, per anàlisi de seqüència i estudi d'unes quantes estructures 3D, s'ha suggerit que l'estructura secundària del domini B canvia amb l'especificitat. Aquest domini es troba menys conservat que els bucles que porten els aminoàcids catalítics. De la mateixa manera que les conservacions estan relacionades amb el manteniment de l'estructura, les variacions en aquesta zona poden ser característiques de certes especificitats enzimàtiques. D'acord amb la funció d'especificitat que es suggereix hi ha estudis de mutacions d'aminoàcids específics en CGTases de *Bacillus* (resumides en (Janecek, 1997) que en demostren l'especificitat de producte.

En els alineaments publicats podem veure que rBAT conté un domini B, però 4F2 l'ha perdut. L'homologia d'aquest domini entre rBAT i l'O-1,6-G és molt alta (al voltant del 50 %) i ja es podia apuntar que en rBAT contindria una hèlix α seguida de tres fulls β . Un element important d'aquest domini és una seqüència característica a l'extrem C-terminal que és el motiu més conservat entre els diferents enzims (Janecek, 1997). Dins aquest motiu s'hi troba un aspàrtic involucrat en la unió a

Ca^{2+} , i el podem observar també en rBAT. (D175 en TAA, D169 en O-1,6-G de *B. cereus*, D285 en rBAT humà) (figura 7) .

També és interessant ressaltar que en alguns casos hi ha un pont disulfur intern que estableix el domini B (es troba, per exemple, en TAA, maltotetrahidrolasa i α -amilasa pancreàtica de porc) (Janecek, 1997). Si mirem la seqüència d'aminoàcids d'rBAT s'hi poden observar dues Cys (C242 i C273) dins el domini B que podrien formar un pont disulfur. Aquestes dues Cys es conserven en totes les seqüències d'rBAT de mamífers. Aquesta conservació donaria consistència al paper d'aquests dos aminoàcids en l'estructura de la proteïna. D'acord amb això Palacín i col·laboradors van publicar una electroforesi de dos dimensions (SDS -PAGE en condicions reductores i no reductores) (Palacin et al., 1996) en què es veu que el monòmer d'rBAT, quan és reduït amb DTT, presenta diferents mobilitats en un gel de poliacrilamida. Això ens podria indicar la presència d'un pont disulfur intracatenari que faria canviar la mobilitat de la proteïna parcialment reduïda.

En el fons, es coneix molt poc sobre la funció d'aquest domini. El que està clar és que intervé d'alguna manera en la catàlisi d'aquests enzims. Estructuralment cobreix la fenedura que es forma en el lloc catalític (figura 6). Hi ha un estudi de Svensson que tracta de fer un constructe d'isozims híbrid i revela per al domini B propietats funcionals i d'estabilitat. Hi ha altres estudis semblants de Terashima et al. que demostren el mateix (recollits en (Janecek, 1997)). Segons un d'aquests estudis aquesta regió seria responsable, en un tipus d'amilasa, de mantenir l'estructura requerida per a una màxima eficiència en la hidròlisi del midó soluble.

4.4.3 Domini C

La majoria dels enzims tenen el domini C seguint el barril $(\beta/\alpha)_8$ (figura6). Aquest domini està format de cadenes β , disposades en un motiu bàsic de clau-grega (*Greek-key*), tot i que pot diferir una mica en enzims de diferent especificitat (Janecek, 1997).

La funció d'aquest domini és desconeguda però s'ha suggerit que estableixaria el domini A protegint els aminoàcids hidrofòbics del solvent (MacGregor et al., 2001). També sembla que podria ajudar en la unió de substrat (Dauter et al., 1999; Lawson et al., 1994). Però en alguns casos (algunes amilomaltases) aquest domini no és

present, o sigui que no en tots els casos tindrà aquesta funció. S'han fet estudis de mutacions i truncacions que fan perdre l'activitat de l' α -amilasa de *B. Stearothermophilus* (MacGregor et al., 2001).

Estructuralment queda lluny de la fenedura catalítica i del domini B, com es pot observar en les estructures 3D (figura 6). Però mutacions i truncacions del domini C provoquen inactivació de l' α -amilasa de *B. stearothermophilus* (recollit en (Janecek, 1997)).

Tate i col·laboradors han estudiat l'activitat de sèries de delecions del carboxi terminal de rBAT de rata en oòcits (recollits en (Chillaron et al., 2001)). Truncacions de pocs aminoàcids ($\Delta 658-683$ i $\Delta 615-683$, les quals delecionen la cua C-terminal i les quatre últimes cadenes β del domini C predites per l'alineament, respectivament) produeixen activitat de transport nul·la. Sorprenentment una deleció una mica més gran ($\Delta 588-683$ que deleciona les últimes sis cadenes β del domini C) manté la mateixa activitat de transport d'aminoàcids que rBAT sencer. Finalment, delecions més grans, ($\Delta 508-683$, que aboleix el domini C fins a la última hèlix del domini A) no produeixen activitat de transport. Aquest resultats ens confirmen la importància del domini C i del domini extracel·lular de les HSHAT, en l'activitat de transport d'aminoàcids del HAT.

