



Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona

“Transportadores Heteroméricos de Aminoácidos:
Análisis Mutacional de rBAT en Cistinuria, y Estudios
de Relación Estructura-Función”

Maite Jiménez Vidal
Barcelona, Enero 2005

Memoria de tesis realizada en el “Centre de Genètica Mèdica i Molecular” del “Institut de Recerca Oncològica” y en el “Departament de Bioquímica i Biologia Molecular” para optar al grado de

DOCTORA EN BIOQUÍMICA

PROGRAMA DE BIOMEDICINA

“DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR”

“UNIVERSITAT DE BARCELONA”

BIENIO 1999-2001

Presentada por:

MAITE JIMÉNEZ VIDAL

Directores:

Autora:

Manuel Palacín Prieto

Maite Jiménez Vidal

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Universitat de Barcelona

Virginia Nunes Martínez

Centre de Genètica Mèdica i Molecular

Institut de Recerca Oncològica

Hola lector. Si no formes part del tribunal, vol dir que hem estat junts d'alguna manera o altre, durant la realització d'aquesta tesi. I llavors et vull agrair la teva ajuda.

Durant els anys de realització d'aquesta tesi he tingut la oportunitat de conèixer a moltes persones, i fer bones amistats. També he pogut realitzar el meu somni de quan estudiava la carrera a la facultat: investigar, posar el meu gra de sorra en el coneixement de les proteïnes i dels gens. I ho he pogut fer amb un grans mestres que m'han dirigit la tesi, y amb uns altres grans mestres, que han estat molt a prop meu, al mateix grup, o be al departament, i que m'han ensenyat moltes coses, des de com injectar oòcits a com fer una mouse de xocolata! . Ha estat per mi una gran sort poder realitzar la tesi en tres ambients diferents. El meu primer any i mig, a l'IRO. I la resta de la tesi, a la facultat i per últim al PCB.

Muchas gracias Virginia, por darme la oportunidad de formar parte de tu grupo de investigación. Por tu labor en el IRO. Por ser agradable hablar contigo, de ciencia o no. Y por haberme dejado hacer estudios funcionales en la facultad.

Gracias Manuel, por confiar en mi y darme la oportunidad de trabajar con la proteína, además del gen. Tu pasión por la ciencia se contagia día a día, y ha sido clave en mi tesis, inyectándome ilusión y ganas de averiguar hasta el último secreto de los HATs.

Gracias Antonio, por formar tan buen equipo con Manuel, y por tus ideas en los seminarios.

El meu primer any de tesi a l'IRO vaig estar al lab Z. Moltes gràcies!:

A la Mariona, la meva companya de tesi "number one". Amb tu he compartit moltes coses, fins i tot llit a algun congrés!. Y el millor regal, la nostra amistat. A la Nònia, no oblidaré mai les converses amb tu (la teva lògica em fa pensar que la meva lògica és il·lògica) i els soparets que has preparat a casa teva!. A la Montse, sort que tu posaves una mica d'ordre al caos del lab!. Benja, recent doctor mitocondri!, sempre disposat a ajudar, y a posar un toc d'humor. Aina, tu caracter tan alegre nos hacía olvidar la estrechez del lab... A l'Enric, molta sort amb la teva tesi!. Al Jesús, encara recordo les teves cançons. I a tots els nous del lab Z, o amb els que no he coincidit tant...molta sort!!.

A tota la gent del departament de Genètica Mèdica i Molecular de l'IRO, becaris, jefes, tècnics, secretaries...(prefereixo no escriure els noms per que segur m'oblido d'algú): Moltes gràcies per fer un ambient de treball tant agradable.

A la facultat, vaig tenir la sort de tenir com a companys els insulin@s. Moltes gràcies!,

Josep, per la teva direcció i ajuda. Amb tu he après a ser més crítica davant d'un resultat experimental, y a exigir-me qualitat i no "quantitat" científica. Marta Camps, per la teva alegria i els carbassons de la Floresta (el tamaño importa?). Perla, por nuestras charlas más allá de la ciencia. Joan, per el teu humor. Em fan riure els noms que ens poses a tots, t'ho diu la techua!. Anna Gumà, per posar ordre al lab, i per les teves preguntes als seminaris. Luc, por tus risas y tu imaginación. AnaVi, por la energía que irradias, que envidia tus músculos!. Raúl, un altre apassionat per la ciència, incansable, sempre al dia de temes científics y disposat a...obrir granota!.

I ara...tota la "troupe"!,

Manu i Anna Ros, gràcies per que al compartir amb vosaltres aconseguixo una mica més de pau i calma, i a veure les coses amb més serenitat. Ana Abella, per la teva decisió i empenya. A altres que ja no hi son: Judith Canici, Marta Carrasco, Dani, Horacio, el temps que vam estar junts al lab ha estat un privilegi tenir-vos com a companys.

Marta Pi, que hagués fent sense tu!! M'has ajudat sempre, la meva mestre amb les granotes i els transports. Quines aventures a l'estabulari, o a la sala de l'injector, quin cau més fosc!. I fora del lab, una gran amiga. Espe, gracias por tu ayuda, y sobretodo por compartir "vida propia" conmigo. Nuri, com t'ho fas per tenir tanta energia i estar sempre de bon humor?. Emma, vam poder anar juntes a Suïssa, ten recordes amb les bicis?. Vam ser valentes d'anar "without crystals". Sara, que t'haig de dir! you are the best!! Encara tenim pendent anar en bici, ara ja no hi haurà excusa.

Les "beautifuls", Paola, siempre encuentras un momento para escucharme y charlar de nuestras cosas. Lorena, no olvidaré les nostres "performans" els divendres per la tarda. Ara ho heu substituït per pa amb Nocilla oi?. Mericiel, poetessa, admiro la teva imaginació quan arriba l'amic invisible, i el teu esperit treballador. Susanna, gràcies pel teu suport durant la escriptura d'aquesta tesi!.

I ara, més nois, que encara que al començament no hi havia gaires, últimament hi ha més fitxatge d'insulinos: Franchesco, el nostre "chico Martini", per fi s'ha acabat el patiment de la tesi!. Carles, el tresor dels insulinos, poc a poc hem destapat les teves qualitats, que van més enllà de la ciència. José Carlos, ole ese salero!. Hans, m'has ensenyat a prendre les coses amb calma i a viure el present.

I els que heu arribat quan jo quasi estava acabant la tesi: Joana, Mercé, Cèsar, Jordi, Deborah, Sílvia, Oscar, Elena, Meritxell, Reini, Laura... gràcies atots per la vostra ajuda. Al laboratori, o fora: de escalada a Montjuic, o en bicicleta.

Al "cuerpo técnico" tant alegre que tenim, Miriam, Noemi, Sussanna, Ruth, y a les tècniques que ja no hi son: Judith Garcia y Ana Pérez.

Al David Verde, Judith y Maite, gracias por la ayuda con todos los papeleos, y por vuestro caracter alegre, a pesar del caos.

I a tota la gent nova que ha arribat al lab: molta sort!!

També vull agrair per al seva ajuda, a la resta de grups i personal del departament de bioquímica de la facultat de biologia,

i a tots els que m'hagi oblidat d'anomenar, que espero em perdonin!!!

Finalment, agraeixo de tot cor l'ajut i comprensió que he rebut de la meva família (mama, Silvi, Cris, no t'imagines com m'has ajudat amb l'ordinador i altres coses) i els que m'estimen,

A tots vosaltres va dirigida aquesta tesi.

De tot cor,

Maite.

Sacudimiento extraño
que agita las ideas,
como huracán que empuja
las olas en tropel;

murmullo que en el alma
se eleva y va creciendo,
como volcán que sordo
anuncia que va a arder;

deformes siluetas
de seres imposibles;
paisajes que aparecen
como a través de un tul;

colores que fundiéndose
remedan en el aire
los átomos del iris
que nadan en la luz;

ideas sin palabras,
palabras sin sentido;
cadencias que no tienen
ni ritmo ni compás;

memorias y deseos
de cosas que no existen;
accesos de alegría;
impulsos de llorar;

actividad nerviosa
que no halla en que emplearse,
sin rienda que lo guíe
caballo volador;

locura que el espíritu
exalta y enardece;
embriaguez divina
del genio creador...

¡Tal es la inspiración!

Gustavo Adolfo Bécquer

ABREVIATURAS**3D:** tridimensional**4F2hc:** Cadena pesada del antígeno de superficie 4F2**AGT-1:** Aspartate and Glutamate Transporter-1**APAT:** Aromatic Preferring Amino acid Transporter**APC:** Amino acid/Polyamine/organic Cation or Choline**asc-1:** system asc amino acid transporter-1**asc-2:** system asc amino acid transporter-2**b⁰⁺AT:** system b⁰⁺ amino Acid Transporter**BM:** 3-(N-maleimidilpropionil)biocitina**BN PAGE:** Blue Native PolyAmide Gel Electrophoresis**CAC:** Carnitine Carrier**CAR:** Consensus Amphipatic Region**CreaT:** Creatine Transporter**CssC:** L-cistina**CTP:** Transportador de citrato mitocondrial (*S. cerevisiae*)**DEM:** Dietilmaleato**DMSO:** dimetilsulfóxido**DTT:** ditrioteitol**ELx-y:** loop extracelular entre los dominios transmembrana x e y**EmrE:** Transportador de drogas (multidrug transporter) de *E.coli***EST:** Expressed Sequence Tag**GabP:** γ -aminobutiric acid permease (*E.coli*)**GlpT:** glycerol 3-phosphosphate transporter (*E.coli*)**GLUT1:** Transportador de Glucosa de eritrocitos**gpaATs:** glycoprotein-associated Amino acid Transporters**GSH:** glutatión**HAT:** Heteromeric Amino acid Transporter**HSAT:** Heavy Subunit Heteromeric Amino acid Transporter**hxCT:** human xCT**ICC:** International Cystinuria Consortium

ILx-y: loop intracelular entre los dominios transmembrana x e y

kDa: kilo Dalton

K_m: constante de Michaelis Menten ($K_{0.5}$)

LacY: Lactose permease (*E.coli*)

LacS: Lactose permease (*Streptococcus thermophilus*)

LAT-1: system L Amino acid Transporter-1

LAT-2: system L Amino acid Transporter-2

LPI: Lisinuric Protein Intolerance

LSB: Laemmli Suple Buffer

LSHAT: Light Subunit Heteromeric Amino Acid Transporter

MTS: reactivos metanotiosulfonados

MTSEA: (2-aminoetil)metanotiosulfonato

MTSBn: bencil metanotiosulfonato

MTSES: [sodio(2-sulfonatoetil)metanotiosulfonato]

MTSET: (2-trimetilamoniometil)metanotiosulfonato

NaDC-1: Sodium-dicarboxylate transporter

NEM: N-etilmaleimida

PA: fosfatasa alcalina

PAGE: PolyAmide Gel Electrophoresis

PBS: Phosphate Buffer Saline

pCMB: p-cloromercuribenzoato

pCMBS: p-cloromercuribenzenosulfonato

PCR: Polymerase Chain Reaction

P_i/H⁺: Transportador de fosfato mitocondrial

rENT2: Transportador de nucleósidos

RT: Room Temperature

RT-PCR: Retro-Transcriptase Polymerase Chain Reaction

S-4-CPG: (S)-4-carboxifenilglicina

SERT: Transportador de Serotonina

SLO: Streptolisina O

TM: dominio transmembrana

xCT: system x_c⁻ amino acid Transporter

UhpT: hexose phosphate transport protein

y⁺LAT-1: system y⁺L Amino acid Transporter-1

y⁺LAT-2: system y⁺L Amino acid Transporter

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN 1

1. SISTEMAS DE TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS EN MAMÍFEROS 3

- 1.1. Sistema $b^{0,+}$ 5
- 1.2. Sistema γ^+L 6
- 1.3. Sistema x_c^- 7

2. AMINOACIDURIAS RENALES 8

- 2.1. Lisinuria con Intolerancia a Proteínas 9
- 2.2. Enfermedad de Hartnup 11

3. CISTINURIA 12

- 3.1. Aspectos clínicos 12
- 3.2. Defecto en el transporte de aminoácidos 14
- 3.3. Heterogeneidad fenotípica: subtipos 15
- 3.4. Heterogeneidad genética 16
- 3.5. Genética molecular de la cistinuria de tipo I 17
- 3.6. Genética molecular de la cistinuria de tipo no-I 18
- 3.7. Modelos animales 20

4. TRANSPORTADORES HETEROMÉRICOS DE AMINOÁCIDOS 21

- 4.1. Subunidades pesadas 22
 - 4.1.1. rBAT 24
 - 4.1.2. 4F2hc 26
- 4.2. Subunidades ligeras 28
 - 4.2.1. LAT-1 30
 - 4.2.2. LAT-2 31
 - 4.2.3. γ^+LAT1 32
 - 4.2.4. γ^+LAT-2 32
 - 4.2.5. $b^{0,+}AT$ 34
 - 4.2.6. xCT 34

Índice

4.2.7. asc-1	35
4.2.8. asc-2	36
4.2.9. AGT-1	36
5. ESTRUCTURA-FUNCIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE MEMBRANA	37
5.1. Oligomerización	38
5.1.1. Transportador de drogas EmrR	40
5.1.2. Transportador de lactosa LacS	41
5.1.3. Transportador de serotonina SERT	42
5.1.4. Transportador de glucosa GLUT1	43
5.1.5. Transportador de Na ⁺ /H ⁺ NhaA	44
5.1.6. Transportadores de glutamato	45
5.2. Evidencias de la oligomerización de los HATs	46
5.3. Localización de residuos clave	47
5.3.1. Transportador de serotonina SERT	49
5.3.2. Transportador de GABA GabP	50
5.4. Localización de residuos clave en los HATs	51
5.4.1. Subunidades pesadas	51
5.4.2. Subunidades ligeras	54
OBJETIVOS	57
RESULTADOS	61
1. ANÁLISIS MUTACIONAL EN CISTINURIA	63
1.1. Análisis mutacional en <i>SLC3A1</i>	65
1.2. Nueva clasificación de la cistinuria	66
1.3. Correlación genotipo-fenotipo	67
1.4. La herencia digénica causa fenotipo parcial	68
Artículo 1	71
Artículo 2	81
Artículo 3	91
Anexo 1: Frecuencia de mutaciones en <i>SLC3A1</i>	107
Anexo 2: Mutaciones descritas en <i>SLC3A1</i>	108
Anexo 3: Análisis funcional de mutaciones	110

2. ESTUDIOS DE RELACIÓN ESTRUCTURA FUNCIÓN EN LOS HATS	113
2.1. Oligomerización de los HATs	115
2.1.1. Estudios funcionales de oligomerización en el sistema y^+L	117
2.1.2. Estudios funcionales de oligomerización en el sistema x_c^-	120
2.1.3. Estudios funcionales de oligomerización en el sistema $b^{0,+}$	125
2.2. Caracterización funcional de la C327 de xCT	130
2.2.1. Inactivación de 4F2hc/xCT con reactivos sulfhidrilo	130
2.2.2. La C327 es la diana de pCMB y pCMBS	131
2.2.3. La C327 se encuentra en un entorno restringido	132
2.2.4. Los substratos de xCT protegen de la inactivación	136
2.2.5. Análisis de C327S, C327A, C327T y C327L	138
Artículo 4	141
Artículo 5	169
Artículo 6	179
DISCUSIÓN	191
1. HACIA UNA MEJOR COMPRENSIÓN DE LA CISTINURIA	193
1.1. Nuevas mutaciones en cistinuria	193
1.2. Necesidad de una nueva clasificación genética	195
1.3. Implicación de la digenia en cistinuria	197
1.4. ¿Quedan nuevos genes de cistinuria por identificar?	199
2. RELACIÓN ESTRUCTURA-FUNCIÓN EN LOS HATS	202
2.1. Determinación de la mínima unidad funcional	202
2.2. Modelo de oligomerización de los HATs	205
2.3. Oligomerización de rBAT/ $b^{0,+}$ AT y cistinuria	209
2.4. Oligomerización de rBAT/ $b^{0,+}$ AT y transporte	210
2.5. Implicación de C327 en la estructura y función de XCT	212
CONCLUSIONES	221

MATERIALES Y METODOS 225

1. CLASIFICACIÓN DE LOS PACIENTES	227
1.1. Clasificación fenotípica	227
1.2. Clasificación genética	228
2. ANÁLISIS MUTACIONAL	228
2.1. Extracción de DNA genómico a partir de sangre	229
2.2. Extracción de RNA total a partir de sangre	230
2.3. Detección de mutaciones mediante SSCP-HD	231
2.4. RT-PCR	231
3. TÉCNICAS BÁSICAS DE MANIPULACIÓN DE DNA Y RNA	232
3.1. Obtención de bacterias competentes y transformación.	232
3.2. Obtención de DNA plasmídico	232
3.3. Análisis de DNA con enzimas de restricción	233
3.4. Extracción del DNA	233
3.5. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.	233
3.6. Purificación de fragmentos de DNA en agarosa	233
3.7. Otros enzimas utilizados en DNA	234
3.8. Secuenciación	234
3.9. PCR	234
3.10. Mutagénesis dirigida	235
3.11. Síntesis de cRNA	235
3.12. Electroforesis de RNA en geles de agarosa-formaldehido	236
4. OBTENCIÓN Y MICROINYECCIÓN DE OOCITOS DE XENOPUS	237
4.1. Adquisición y mantenimiento de ranas <i>Xenopus laevis</i>	237
4.2. Extracción de oocitos, digestión y microinyección	239
5. CULTIVOS CELULARES Y TRANSFECCIÓN	241
5.1. Condiciones de cultivo de células HeLa	241
5.2. Transfección celular transitoria	243

6. ENSAYOS DE TRANSPORTE	244
6.1. Ensayos de transporte en oocitos	244
6.2. Ensayos de transporte en células HeLa	245
6.3. Ensayos con reactivos sulfhidrilo	246
6.4. Análisis de los datos	247
7. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN Y DETECCIÓN DE PROTEÍNAS	247
7.1. Obtención de proteínas totales de oocitos	247
7.2. Determinación de la concentración de proteínas	248
7.3. Electroforesis SDS-PAGE	248
7.4. Análisis de Western blot o inmunodetección	250
7.5. Estudios de inmunolocalización en secciones de oocito	251
8. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS	252
Apéndice A. Oligonucleótidos : análisis mutacional de <i>SLC3A1</i>	255
Apéndice B. Constructos de DNA	256
Apéndice C. Soluciones generales	261
REFERENCIAS	263

En esta memoria se recogen los resultados obtenidos del análisis mutacional de rBAT en cistinuria, y de estudios de relación estructura-función en los transportadores heteroméricos de aminoácidos rBAT/b⁰⁺AT, 4F2hc/y+LAT-1 y 4F2hc/xCT, que forman los sistemas de transporte b⁰⁺, y⁺L y x_c⁻ respectivamente.

En la introducción se describen los tres sistemas de transporte, las aminoacidurias renales asociadas a defectos en el transporte de aminoácidos, las características estructurales y funcionales de la familia de transportadores heteroméricos de aminoácidos, y relaciones de estructura-función en los transportadores de membrana, con especial énfasis en la oligomerización y la identificación de residuos clave.

1. SISTEMAS DE TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS EN MAMÍFEROS

Los aminoácidos juegan un papel fundamental en una multitud de procesos, incluyendo la síntesis proteica, la regulación del metabolismo, el crecimiento celular, la regulación del volumen celular, la producción de energía metabólica y la transmisión nerviosa. Los transportadores de aminoácidos, situados en las membranas celulares, son proteínas de membrana responsables del transporte de estos aminoácidos al interior o exterior de la célula. Recientemente, la identificación de la mayoría de los transportadores de aminoácidos previamente caracterizados fisiológicamente, ha facilitado su análisis funcional.

A partir de los trabajos del grupo de Christensen a principios de los años sesenta (revisado en (Christensen, 1990) se identificaron diferentes sistemas de transporte de aminoácidos en mamíferos con especificidades de sustrato amplias (diferentes aminoácidos comparten el mismo sistema de transporte) y solapadas (un mismo aminoácido es transportado por varios sistemas). La clasificación de los diferentes sistemas de transporte se hizo en función del tipo de aminoácido transportado y de la dependencia del ión sodio. La nomenclatura adoptada utiliza acrónimos indicativos de la especificidad de sustrato y designa con mayúsculas los sistemas sodio-dependientes y con minúsculas los sodio-independientes. La excepción es el sistema L, que es sodio-independiente y por razones históricas se designa con mayúsculas (Bannai, 1984b; OXENDER and Christensen, 1963).

A partir de la década de los noventa, el desarrollo de la estrategia de la expresión funcional (Romero et al., 1998) y posteriormente, la secuenciación de ESTs (*Expressed Sequence Tag*) y de múltiples genomas (como el humano), han llevado a la identificación de un gran número de transportadores de aminoácidos por homología de secuencia. Su caracterización funcional en sistemas de expresión heterólogos ha permitido asociarlos a los sistemas de transporte descritos previamente, intentando mantener la nomenclatura adoptada para el sistema correspondiente (Christensen et al., 1994). Estos nuevos avances han modificado algunos conceptos anteriormente desarrollados por Crane (Crane, 1965) y Christensen (Christensen, 1966): i) en el transporte de aminoácidos predomina el mecanismo "antiporter" y es esencial para el transporte vectorial a través del epitelio; ii) otros gradientes

Introducción

electroquímicos, a parte del sodio, dirigen el transporte o contribuyen en el; y iii) algunos transportadores cruzan las fronteras de separación de clases de sustratos, p. ej. transportando aminoácidos neutros y catiónicos a la vez (Broer, 2002).

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

Tabla 1 Sistemas de transporte de aminoácidos en mamíferos. Los aminoácidos estándar se presentan en código de tres letras (Cys: cistina, O: ornitina, GABA: ácido γ-aminobutírico, AIB: ácido aminoisobutírico, MeAIB: ácido metil-aminoisobutírico). Los sustratos de menor afinidad se muestran entre paréntesis. (?) No claramente asignado. Adaptada y actualizada de (Broer, 2002).

En la Tabla 1 se muestran los distintos sistemas de transporte descritos, las isoformas clonadas asociadas, sus sustratos y el mecanismo de transporte. Las isoformas de un mismo sistema presentan pequeñas variaciones en la afinidad y especificidad de sustrato para ajustarse a la función del tejido en el que se expresa el transportador. Cada tipo celular contiene una combinación determinada de estos sistemas de transporte que depende de su función biológica y es resultado de la presencia de los sistemas de transporte ubicuos (p. ej. sistemas A, ASC, L, γ^+ , X_{AG}^-) y de los sistemas de transporte tejido-específicos (p. e. sistemas $B^{0,+}$, N^m , $b^{0,+}$) (Palacín et al., 1998). Actualmente, siguiendo criterios de función fisiológica (Broer, 2002), podemos agrupar los transportadores de aminoácidos en:

a) Transportadores con alta capacidad de acumulación (EAAT, acoplados a Na^+ y Cl^-): incluye transportadores de neurotransmisores (sistemas X_{AG}^- , Gly y β), que capturan el exceso de neurotransmisor liberado (Glu, Gly y GABA), no inactivable metabólicamente, para evitar su excitotoxicidad; transportadores de osmolitos (sistema β), que mantienen altas concentraciones de gradiente de sustratos (betaina, taurina) en el riñón; y transportadores apicales que median la reabsorción de aminoácidos en el epitelio (sistema $B^{0,+}$).

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

c) "Antiporters" o intercambiadores (sistemas asc, ASC, $b^{0,+}$, L, x_c^- , γ^+L): constituyen la gran mayoría de los transportadores de aminoácidos en mamíferos. Preferentemente, intercambian aminoácidos no esenciales por aminoácidos esenciales sin causar una pérdida neta o incremento de la cantidad total de aminoácidos. Permiten generar asimetrías, clave para el flujo vectorial de aminoácidos. Un ejemplo es la reabsorción de aminoácidos en el riñón (sistema $b^{0,+}$, sistema L, sistema γ^+L). Dentro de este grupo se encuentran los transportadores heteroméricos de aminoácidos (HATs).

1.1. Sistema $b^{0,+}$

El sistema $b^{0,+}$ fue descrito por primera vez en blastocistos de ratón (Van Winkle et al., 1988). Se caracteriza por el transporte de aminoácidos neutros y básicos, y a diferencia del sistema $B^{0,+}$, es independiente de sodio y tiene una especificidad de sustrato más limitada. Transporta preferentemente aminoácidos voluminosos no ramificados en el carbono β (p.ej., la valina inhibe el transporte de leucina o lisina con una $K_i \sim 5$ mM, mientras que la K_i de leucina es ~ 125 μ M). Su afinidad por el sustrato se encuentra en el rango micromolar y su actividad de transporte no se ve afectada significativamente por cambios en el pH (Van Winkle et al., 1988).

En 1972 se describió un transporte compartido de aminoácidos básicos y cistina en la membrana apical del túbulo proximal de riñón de rata (Silbernagl and Deetjen, 1972). Este transporte se caracterizó posteriormente en vesículas de membrana apical de túbulo proximal de rata, como una actividad independiente de sodio, trans-estimulable, que transporta cistina, aminoácidos básicos y neutros con alta afinidad (McNamara et al., 1981). En 1992 se clonó por expresión funcional la proteína rBAT (*related to b^{0,+} amino acid transporter*; también denominada D2, NAAT y NBAT) que en oocitos de *X. laevis* induce una actividad de transporte similar a la anteriormente descrita en vesículas de membrana apical de riñón de rata (Bertran et al., 1992b; Tate et al., 1992; Wells and Hediger, 1992). Esta actividad se denominó b^{0,+}-like por su homología con el sistema de transporte b^{0,+} y a diferencia de éste, también transporta cistina. En 1999 se clonó la proteína b^{0,+}AT que se une a rBAT y media la actividad de transporte b^{0,+}-like (Chairoungdua et al., 1999; Feliubadalo et al., 1999; Pfeiffer et al., 1999a).

1.2. Sistema y⁺L

El sistema y⁺L es responsable del transporte de aminoácidos básicos independiente de sodio y de aminoácidos neutros dependiente de sodio. Esta actividad se describió inicialmente en eritrocitos humanos (Deves et al., 1992) y se ha detectado también en linfocitos humanos (Boyd and Crawford, 1992) en la membrana basal (Novak et al., 1997), y en vesículas de membrana apical (Eleno et al., 1994; Furesz et al., 1995) de placenta de rata y humana, respectivamente.

La afinidad de este sistema de transporte depende del tipo de aminoácido neutro: en eritrocitos humanos, la K_m aparente para leucina en presencia de sodio es comparable a las K_{ms} aparentes para lisina y ornitina (~10 μM), mientras que las K_{ms} aparentes para glicina y valina en presencia de sodio tienen un valor de ~1.6 y ~2.5 mM, respectivamente. La afinidad por los aminoácidos neutros también se modifica en función del catión que hay en el medio. La sustitución del sodio por potasio reduce la afinidad por los aminoácidos neutros, sobre todo de aquellos que son sustratos más afines, y la sustitución por litio potencia la interacción de los aminoácidos neutros y en general, aumenta su afinidad aparente (K_{i Leu}=11 μM, K_{i Leu}= 770 μM, K_{i Leu}= 4.5 μM para un transporte de lisina 1 μM en presencia de sodio, potasio y litio respectivamente). El ión guanidinio tiene un efecto similar al descrito para potasio (Angelo et al., 1996). Esta modulación de la afinidad por diferentes cationes monovalentes puede ser debida a que los cationes estabilicen diferentes conformaciones del transportador (Deves and Boyd, 1998).

Experimentos de transestimulación realizados en eritrocitos han demostrado que la salida de lisina radiactiva intracelular se estimula en presencia de aminoácidos neutros extracelulares más sodio, con la excepción de triptófano (Deves and Angelo, 1996). La presencia de los iones en el medio extracelular (cara *trans*) causa las mismas variaciones en los valores de K_m que los obtenidos en los experimentos realizados en la cara *cis*.

El sistema y^+ (Tabla 1) transporta aminoácidos básicos con alta afinidad. Este transporte es inhibible en presencia de sodio por elevadas concentraciones de aminoácidos neutros (Christensen and Antonioli, 1969). Para diferenciar el sistema y^+L del sistema y^+ cuando se expresan en un mismo tejido, se suele utilizar NEM (N-etilmaleimida) como inhibidor específico de la actividad y^+ (Deves and Angelo, 1996).

En 1992 se caracterizó la proteína 4F2hc, que induce el sistema de transporte y^+L cuando se expresa en oocitos de *X. laevis* (Bertran et al., 1992a; Wells et al., 1992). 4F2hc ya había sido descrita anteriormente como la cadena pesada de un antígeno de superficie implicado en procesos de activación celular (Parmacek et al., 1989). Este antígeno se relacionó con el transporte de aminoácidos por la identidad que presenta con la proteína rBAT (~30%), responsable del sistema de transporte $b^{0,+}$ -like. En 1998 se clonaron dos subunidades ligeras (y^+LAT-1 y y^+LAT-2) que se unen a 4F2hc responsables del sistema y^+L .

1.3. Sistema x_c^-

El sistema x_c^- fue descrito por primera vez en el año 1980 por S. Bannai (Bannai and Kitamura, 1980). A partir del estudio de la captación de cistina en fibroblastos diploides humanos (IMR-90) en cultivo, se demostró la existencia de un sistema de transporte común para L-cistina y L-glutamato independiente de sodio, con las siguientes características: i) la captación de ambos sustratos es mutuamente competitiva; ii) la K_m de captación para L-cistina es similar a la K_i para la inhibición de la captación de L-glutamato provocada por L-cistina, y a la inversa; y iii) los aminoácidos que inhiben la captación de L-cistina también lo hacen en la misma medida para el L-glutamato. Este nuevo sistema de transporte, altamente específico para cistina y glutamato, se designó inicialmente sistema CG pero, según los criterios de nomenclatura, pasó a conocerse como sistema x_c^- (Makowske and Christensen, 1982). Trabajos posteriores han demostrado que la cistina es transportada de forma aniónica y que el sistema x_c^- no depende del potencial de membrana (Bannai, 1984b). Estas observaciones, junto con el hecho que la entrada de cistina depende de la concentración intracelular de glutamato, llevó a concluir que el sistema x_c^- es un intercambiador no electrogénico (Bannai, 1986).

Teniendo en cuenta el bajo contenido en cistina en el interior de las células, la dirección fisiológica de este intercambio consiste en la salida de glutamato para favorecer la entrada de cistina, que es rápidamente reducida a cisteína (Bannai, 1986). La cisteína es el precursor limitante en la síntesis del glutatión en muchas líneas celulares en cultivo (Bannai and Tateishi, 1986). Este hecho ha relacionado el sistema x_c^- con la regulación de la síntesis de glutatión y el estrés oxidativo. Existen numerosos trabajos que demuestran que la actividad x_c^- es inducida por agentes que reducen el glutatión intracelular, como el oxígeno (Bannai et al., 1989), agentes electrofílicos (Bannai, 1984a; Bannai et al., 1986), y lipopolisacárido (LPS) (Sato et al., 1995b; Sato et al., 1995a), en distintos tipos celulares (fibroblastos, células neuronales y de la glía, macrófagos, células pancreáticas y hepatocitos).

En el año 1999, siguiendo la estrategia de expresión funcional, el grupo de Bannai clonó la proteína xCT que, en asociación con 4F2hc (Tabla 1), es responsable del sistema x_c^- (Sato et al., 1999). La clonación de la proteína ha aportado el elemento molecular necesario para poder estudiar la regulación de la actividad x_c^- y su papel en la síntesis del glutatión (revisado en (Chillaron et al., 2001)).

2. AMINOACIDURIAS RENALES

Existen diversas enfermedades hereditarias que se caracterizan por presentar un defecto en el transporte de aminoácidos. Todas ellas son aminoacidurias ya que el defecto en el transporte afecta la reabsorción tubular de aminoácidos, y según el transportador afectado, se da una hiperexcreción de diferentes tipos de aminoácidos. Para algunas de ellas se conoce el gen causante que codifica el transportador afectado, pero para otras todavía no se dispone de esta información.

La reabsorción epitelial de aminoácidos a través de la membrana apical en el riñón e intestino es llevada a cabo por distintos sistemas de transporte (BARON et al., 1956). Existe un modelo que ilustra cuáles son los sistemas de transporte implicados en el proceso (Figura 1). En este modelo, la contribución de los sistemas $b^{0,+}$ y y^+L en la membrana apical y basolateral, respectivamente, permiten el paso de los aminoácidos básicos desde el lumen tubular hacia la sangre. En la membrana apical, el sistema $b^{0,+}$ permite la entrada de cistina y aminoácidos básicos hacia el interior de la célula. Una vez dentro, la cistina es reducida a cisteína de forma acoplada con la oxidación de glutatión, y ésta cisteína abandona la célula a través del sistema L, que intercambia aminoácidos neutros, se localiza en la membrana basolateral, y está formado por el heterodímero 4F2hc/LAT-2 (Pineda et al., 1999). Se ha demostrado en células OK que la dirección de este intercambio favorece la salida neta de cisteína y la entrada neta de alanina, serina o treonina (Fernandez et al., 2003). Para asegurar un flujo neto de aminoácidos neutros hacia la sangre, es necesario un transportador equilibrativo (T) que permita la salida de estos aminoácidos a favor de gradiente. El potencial de membrana y el gradiente electroquímico de Na^+ es mantenido por la bomba Na^+/K^+ ATPasa, localizada también en la membrana basolateral. En esta membrana el sistema y^+L permite la salida de aminoácidos básicos en intercambio con aminoácidos neutros y Na^+ , superando así, con un transporte electroneuro, la barrera que supone el potencial de membrana, contrario a la salida de cargas positivas.

Los aminoácidos neutros que salen hacia el lumen y los ya presentes en el, son recaptados por la célula epitelial a través del sistema B^0 , recientemente identificado en ratón (m^0AT-1) y humano (B^0AT-1), que pertenece a la familia de neurotransmisores dependientes de Na^+ y Cl^- , y se expresa principalmente en riñón e intestino (Broer et al., 2004). La salida de aminoácidos neutros hacia el lumen es la fuerza conductora de la acumulación de aminoácidos catiónicos, y de acuerdo con esto, la leucina es el sustrato de salida preferido por el sistema por $rBAT/b^{0,+}AT$ (Reig et al., 2002) y es además el sustrato preferido por mB^0AT1 (Broer et al., 2004).

Si uno de estos sistemas de transporte es defectuoso, el flujo trans-epitelial de aminoácidos se ve afectado, y por lo tanto la reabsorción de aminoácidos en el riñón es defectuosa, dando lugar a una patología asociada a la hiperexcreción de aminoácidos. El sistema $b^{0,+}$ está afectado en Cistinuria, el sistema γ^+L está afectado en Lisinuria con Intolerancia Proteica (LPI), y el sistema B^0 está afectado en la enfermedad de Hartnup. En los siguientes apartados se describen la LPI y la enfermedad de Hartnup, y se ha reservado el próximo capítulo para describir en detalle la cistinuria.

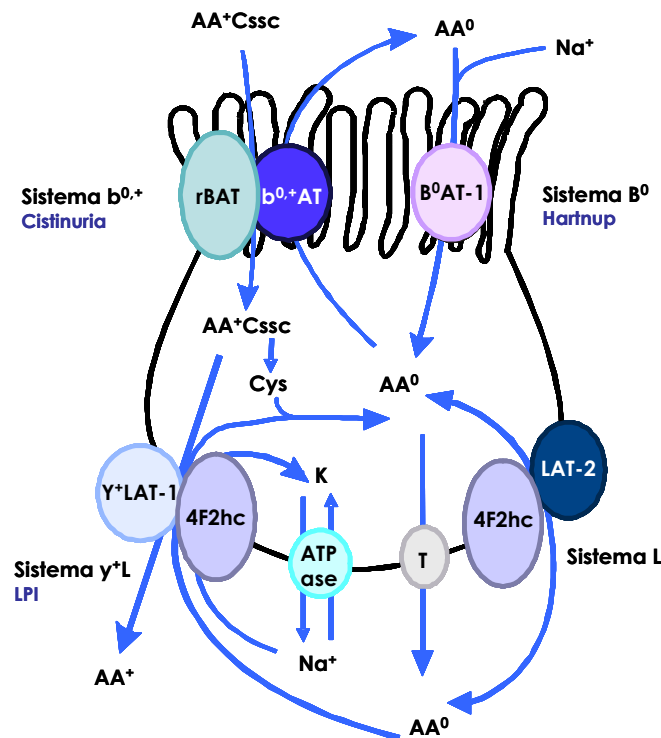


Figura 1 Modelo de reabsorción de cistina y aminoácidos neutros y básicos. El heterodímero rBAT/ $b^{0,+}$ AT se expresa en la membrana apical de células epiteliales renales y media el transporte de aminoácidos básicos y cistina acoplado a un intercambio con aminoácidos neutros (sistema $b^{0,+}$ -like). La cistina se reduce a cisteína en una reacción asociada a la oxidación de glutatión. Los aminoácidos básicos son transportados al exterior celular a través de la membrana basolateral por 4F2hc/ γ^+ LAT-1, acoplados a la entrada de aminoácidos neutros y sodio (sistema γ^+L). Los aminoácidos neutros entran junto con sodio al interior celular a través de un transportador (B^0 AT-1) situado en la membrana apical. La dirección del intercambio favorece la salida neta de cisteína y la entrada neta de alanina y serina. Un transportador T en la membrana basolateral de estas células, todavía no identificado, debe ser responsable de la salida neta de aminoácidos neutros.

2.1. Lisinuria con Intolerancia a Proteínas

La LPI (o hiperaminoaciduria dibásica de tipo 2, o también intolerancia a proteínas familiar), es una enfermedad autosómica recesiva muy rara, de la que sólo se conocen 200 pacientes, la mitad de los cuales proceden de Finlandia, donde la prevalencia es de uno por cada 60.000 nacimientos (revisado en (Simell, 2001)).

Estos pacientes sufren una hiperexcreción urinaria de aminoácidos básicos, acompañada de una absorción intestinal reducida. Esto hace que las concentraciones de estos aminoácidos en sangre sean más bajas, y como que la lisina es un aminoácido esencial, las manifestaciones clínicas son como las de un caso de malnutrición. A la vez, el hecho de sufrir una depleción de aminoácidos básicos provoca una disfunción del ciclo de la urea por falta de sustratos, con los consiguientes episodios de hiperamonemia.

Los principales síntomas clínicos aparecen con el destete, en forma de vómitos y diarrea. Los pacientes rechazan alimentos ricos en proteínas, tienen un desarrollo físico retardado,

Introducción

hepatoesplenomegalia, hipotonía muscular, cabello escaso y otros síntomas de malnutrición. Sufren episodios de hiperamonemia que les pueden conducir al estado de coma. También es muy común la osteoporosis y en algunos casos pueden sufrir un retraso mental moderado. Algunos pacientes sufren insuficiencia respiratoria, proteinosis alveolar y otras disfunciones multiorgánicas, como insuficiencia renal.

Estudios en muestras obtenidas de pacientes de LPI demuestran un defecto en el transporte de aminoácidos básicos en la membrana basolateral de las células epiteliales de los túbulos renales y del intestino (Desjeux et al., 1980; Rajantie et al., 1980; Rajantie et al., 1981). El defecto en el sistema γ^+L explica el bloqueo en la absorción intestinal y reabsorción renal de aminoácidos básicos, ya que no permite que estos pasen a la sangre a través de la membrana basolateral, bloqueando entonces la absorción por la membrana apical. Esto explica la causa de la baja concentración de aminoácidos básicos en sangre y las manifestaciones clínicas que de este hecho se derivan, como la malnutrición y la hiperamonemia, pero no está clara la causa de la proteinosis alveolar y otras manifestaciones que implican células del sistema inmunitario.

El tratamiento se ha enfocado hacia la corrección del defecto funcional del ciclo de la urea, para evitar los episodios de hiperamonemia, con el suministro de citrulina en la dieta. Los pacientes de LPI absorben correctamente este aminoácido neutro, que puede convertirse en arginina y ornitina proporcionando así intermediarios al ciclo de la urea.

Análisis de ligamiento en familias que sufrían LPI finlandesas y no finlandesas, localizaron el gen responsable en el cromosoma 14q11-13 (Lauteala et al., 1997) entre los marcadores *D14S72* y *MYH7*. El 1999, nuestro grupo, paralelamente con el grupo de Borsani, encontró mutaciones en el gen *SLC7A7* en pacientes de LPI (Borsani et al., 1999; Torrents et al., 1999). El gen *SLC7A7* codifica la proteína γ^+LAT-1 (Torrents et al., 1999), que juntamente con la proteína 4F2hc funciona como transportador de aminoácidos con actividad de sistema γ^+L , y se expresa en la membrana basolateral de riñón e intestino. Todos los pacientes finlandeses tienen una misma mutación fundadora en una secuencia consenso de *splicing* (IVS6-2AT), que provoca un cambio en la pauta de lectura dando lugar a una proteína truncada no funcional.

Hasta el momento se han descrito un total de 30 mutaciones en *SLC7A7* en pacientes con LPI (217 alelos explicados de un total de 218 alelos estudiados). La mayoría de estas mutaciones causan cambios en la pauta de lectura de la proteína (Borsani et al., 1999; Koizumi et al., 2000; Koizumi et al., 2003; Mykkanen et al., 2000; Noguchi et al., 2000; Palacin et al., 2001; Shoji et al., 2002; Sperandio et al., 2000; Torrents et al., 1999). Estudios funcionales en oocitos y células transfectadas demuestran que mutaciones que provocan desplazamiento de la pauta de lectura (c.1291delCTTT, c.1548delC, y c.1181-2A>T) producen un defecto de tráfico severo, ya que las proteínas mutadas no alcanzan la membrana plasmática cuando se coexpresan con 4F2hc (Mykkanen et al., 2000; Toivonen et al., 2002). En cambio, las mutaciones de cambio de sentido G54V (localizada en el primer segmento trans-membrana) y L334R (localizada en el cuarto dominio intracelular) inactivan el transportador y además alcanzan la membrana plasmática cuando se coexpresan junto con 4F2hc (Mykkanen et al., 2000; Toivonen et al., 2002).

Hasta el momento, no se ha podido establecer ninguna correlación entre el fenotipo y el genotipo en LPI. Pacientes con la misma mutación sufren manifestaciones clínicas muy variables (Simell, 2001). La única manifestación clínica evidente es la aminoaciduria dibásica pero se desconoce la etiología del resto de los síntomas de la enfermedad. Por lo tanto, cabe esperar que existan otros factores genéticos y ambientales todavía no determinados que tengan un papel importante en la patogénesis de la LPI.

2.2. Enfermedad de Hartnup

La enfermedad de Hartnup se describió por primera vez en 1956 (BARON et al., 1956). Es una enfermedad autosómica recesiva, y se caracteriza por un problema en el transporte de aminoácidos neutros en el riñón e intestino delgado. Los pacientes presentan una importante hiperexcreción de aminoácidos neutros, y esta característica bioquímica es la base para el diagnóstico de la enfermedad. Algunos pacientes, sin embargo, presentan además unas características clínicas parecidas a las relacionadas con la pelagra, que es un síntoma de malnutrición relacionado con la falta de niacina, necesaria para la síntesis de nicotinamida y otros derivados. El cuadro clínico incluye erupciones cutáneas fotosensibles, ataxia intermitente de origen cerebelar, comportamiento psicótico, inestabilidad emocional, y en algunos casos también retardo mental (revisado en Levy, 2001).

La hiperexcreción de aminoácidos neutros y derivados en orina y heces indica que el defecto básico en la enfermedad de Hartnup se encuentra en la absorción intestinal y renal de estos aminoácidos. El defecto en la reabsorción renal es muy claro, ya que todos los pacientes presentan hiperaminoaciduria de aminoácidos neutros grandes y pequeños, excepto prolina. El defecto intestinal se ha estudiado con más detalle. Estudios de captación de aminoácidos en biopsias de yeyuno han demostrado que el transporte de aminoácidos neutros está afectado en las muestras procedentes de los enfermos de Hartnup (Shih et al., 1971; Tarlow et al., 1970), y que este defecto no implica problemas en la absorción de péptidos (Leonard et al., 1976; Navab and Asatoor, 1970), sugiriendo que el defecto en el transporte se localiza en la membrana apical, lo que explica el hecho que los pacientes de Hartnup presenten niveles plasmáticos de aminoácidos neutros normales.

Aunque existe un defecto claro en el transporte de aminoácidos neutros en los enfermos de Hartnup, la mayoría son asintomáticos, y las características clínicas asociadas al defecto de niacina se presentan sólo en algunos casos. La explicación de estos casos podría estar relacionada con los problemas de absorción de triptófano y su pérdida excesiva en orina, que podrían hacer disminuir los niveles de este aminoácido, y uno de sus productos del metabolismo, el ácido nicotínico o niacina. De todas formas, la mayoría de ácido nicotínico proviene de la dieta, y sólo una pequeña parte del triptófano, de forma que sólo en los casos donde la dieta fuese insuficiente, se podría manifestar este defecto. Por lo tanto, parece que la patología asociada a esta enfermedad es multifactorial, tal y como sugirieron Scriver y colaboradores (Scriver et al., 1987), postulando que otros genes que controlan la homeostasis plasmática podrían influir en las manifestaciones clínicas del defecto de transporte asociado a la enfermedad de Hartnup.

Respecto a la base molecular de esta enfermedad, por las características del transporte afectado, se pensó que podría tratarse de un transportador de sistema B⁰, principal sistema mediador de la captación de aminoácidos neutros en células epiteliales. Recientemente se ha caracterizado en riñón de ratón un transportador de aminoácidos neutros que pertenece a la familia de neurotransmisores dependientes de Na⁺ y Cl⁻, y que tiene las características funcionales del sistema B⁰ (mB⁰AT1). Su homólogo humano se encuentra en el cromosoma 5p15 (Broer et al., 2004). Se han identificado mutaciones en el gen *SLC6A19*, que codifica la proteína humana B⁰AT1, que cosegregan con la enfermedad de forma recesiva (Kleta et al., 2004). Estas mutaciones reducen la actividad de transporte de aminoácidos neutros *in vitro*, indicando que *SLC6A19* es el gen responsable de la enfermedad de Hartnup.

3. CISTINURIA

La cistinuria es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva, caracterizada por un defecto en el transporte trans-epitelial de aminoácidos básicos y cistina, con una prevalencia de uno por cada 7000 nacimientos (revisado en (Palacin et al., 2001)). La única manifestación clínica de la cistinuria es la urolitiasis recurrente de cistina, debida a la baja solubilidad de este aminoácido en orina, que es hiperexcretado en los enfermos juntamente con lisina, arginina y ornitina. Según el nivel de excreción urinaria de cistina y aminoácidos básicos en los heterocigotos, se han diferenciado dos tipos de cistinuria: cistinuria de tipo I, que es la forma recesiva, en la que los heterocigotos presentan niveles normales de estos aminoácidos en orina; y cistinuria de tipo no-I (tipos II y III), que son formas incompletas recesivas, y en este caso los heterocigotos presentan un grado variable de hiperexcreción de cistina y aminoácidos básicos, pero inferior a los homocigotos.

3.1. Aspectos clínicos

La hiperexcreción de cistina, lisina, arginina y ornitina es la base del diagnóstico de la cistinuria. La única consecuencia clínica de esta enfermedad son los cálculos de cistina que se forman de manera recurrente en los riñones de los enfermos. El problema en el transporte trans-epitelial de cistina y aminoácidos básicos que sufren estos enfermos impide la reabsorción de cistina, que se va concentrando en el lumen del túbulo renal durante su paso por la nefrona. Cuando llega al tubo colector, donde se acidifica la orina, se excede el límite de solubilidad de la cistina, de manera que ésta precipita formando unos cristales hexagonales característicos, de color amarillo-marrón.

La nefrolitiasis puede estar influenciada por diversos factores ambientales y genéticos, aunque entre el 30 y el 50% de los pacientes presentan el primer cálculo en la primera década de la vida (Goodyer et al., 1998; Stephens, 1989). Los cálculos de cistina constituyen tan sólo un 1-3% de las urolitiasis en adultos y representan alrededor de un 6-8% de las que se dan en la infancia, pero el principal problema es que la formación de estos cálculos es

recurrente. Sólo un 44% de los pacientes se mantienen libres de cálculos 3 meses después de su extracción quirúrgica o por litotricia (Martin et al., 1991). A las molestias físicas que padecen los pacientes, hay que sumar el riesgo de infección, obstrucción y hasta incluso insuficiencia renal debida a la continua formación de cálculos.

El objetivo del tratamiento de la cistinuria es solubilizar la cistina que se hiperexcreta en orina. Este objetivo se puede alcanzar mediante tres aproximaciones: i) control dietético para minimizar la producción de cistina (a través de una ingesta mínima de metionina) y controlar la concentración de la orina (a través de una dieta pobre en Na⁺); ii) medidas preventivas para evitar la concentración de cistina en la orina, mediante hiperdiuresis, y para aumentar la solubilidad de la cistina, mediante alcalinización de la orina; y iii) tratamiento con agentes quelantes que convierten la cistina en un disulfuro más soluble. Estas medidas normalmente se combinan para conseguir una prevención efectiva de la formación de cálculos de cistina (revisado en (Joly et al., 1999)).

Respecto al control dietético, existen dietas pensadas para reducir la ingesta de metionina y minimizar la síntesis de cistina, aunque este tipo de tratamiento no es aconsejable en niños, ya que la metionina es un aminoácido esencial. Se ha observado que las dietas pobres en Na⁺ consiguen una disminución importante de la concentración de cistina en orina (Peces et al., 1991), aunque no hay estudios a largo término que demuestren que esta aproximación reduzca efectivamente el riesgo de formación de cálculos.

Otras medidas preventivas más efectivas son las encaminadas a evitar la precipitación de la cistina en la orina por hiperdiuresis o alcalinización. El tratamiento más inmediato para la cistinuria sería la dilución de la orina a base de una ingesta de líquido continuada para conseguir mantener la concentración de cistina por debajo de su límite de solubilidad. El problema de este tipo de tratamiento es que durante la noche, cuando la ingesta de agua es más discontinua, el riesgo de formación de cálculos se incrementa. Siguiendo este tratamiento hiperdiurético, se redujo la frecuencia de formación de cálculos en 12 de 18 pacientes en un seguimiento de 10 años (DENT and SENIOR, 1955). Por otro lado, la solubilidad de la cistina incrementa al aumentar el pH por encima de 7.5. La alcalinización de la orina con ingesta de bicarbonato sódico en varias dosis permite mantener el pH de la orina alrededor de este valor. Dent y Senior observaron que con esta aproximación conseguían disolver cálculos en algunos pacientes (DENT and SENIOR, 1955). Este tratamiento suele ir acompañado de una ingesta de sal reducida, puesto que el bicarbonato sódico ya aporta suficiente Na⁺. Se ha visto que el citrato potásico es un agente alcalinizante mejor que el bicarbonato sódico, ya que así se evita la carga de sodio que podría ser contraproducente (Sakhaee et al., 1983). La combinación de una dieta controlada, dilución de la orina con una ingesta continuada de líquido y alcalinización de la orina ha permitido prevenir la formación de cálculos de cistina en un elevado número de pacientes, de manera que éstas aproximaciones se aplican como tratamiento de mantenimiento en la mayoría de casos.

Respecto al tratamiento farmacológico, se han utilizado agentes quelantes que suelen ser compuestos sulfhidrilo que pueden reaccionar con la cistina formando disulfuros mixtos más solubles. El fármaco más extensamente utilizado, la D-penicilamina, se ha administrado oralmente en adultos desde el 1963 y se ha demostrado que efectivamente reduce la concentración de cistina en orina, que incluso contribuye en la disolución de los cálculos, pero que presenta muchos efectos secundarios (CRAWHALL et al., 1963). Otro fármaco parecido, la α -mercaptopropionilglicina, también llamado tiopronina o thiola (King, Jr., 1968) también se ha utilizado con éxito para la solubilización de los cálculos de cistina, con menos efectos secundarios que la D-penicilamina (Harbar et al., 1986). Otros agentes, como el captopril (Sloand and Izzo, Jr., 1987), o la bucilamina (Koide et al., 1992), se han utilizado para reducir la excreción de cistina o disolver los cálculos, pero su utilización no es tan extensa. A pesar de que son fármacos efectivos, estos agentes tienen múltiples efectos secundarios que generalmente causan interrupciones en el tratamiento (CRAWHALL and WATTS, 1968; Dahlberg et al., 1977).

Recientemente, el desarrollo de modelos murinos de los dos tipos de cistinuria (Feliubadalo et al., 2003; Peters et al., 2003), permite probar nuevas drogas terapéuticas y protocolos de tratamiento que eliminen o eviten la mayoría de los efectos secundarios y complicaciones en el tratamiento de la cistinuria.

3.2. Defecto en el transporte de aminoácidos en la cistinuria

Debido a que los enfermos de cistinuria presentan hiperexcreción de cistina y aminoácidos básicos Dent y Rose postularon que existe un mecanismo común de reabsorción renal de estos aminoácidos, defectuoso en los pacientes cistinúricos (DENT and ROSE, 1951). También había evidencias de problemas de transporte en el intestino, ya que no se observaba ningún incremento en la excreción de cistina después de una dosis oral de este aminoácido en pacientes cistinúricos. En cambio, si se administraba metionina, sí que había un incremento substancial de cistina en orina (Brand and Cahill, 1934). Otras evidencias apuntaban a un defecto intestinal, como la presencia de putresceina y cadaverina en orina, que son productos de metabolización de los aminoácidos básicos por la flora bacteriana del cólon (Milne et al., 1961). Finalmente, el grupo de Rosenberg demostró un defecto de transporte de cistina, arginina y lisina en biopsias de yeyuno de pacientes cistinúricos (Rosenberg et al., 1966; THIER et al., 1964; Thier et al., 1965). De todos modos, estos datos no eran del todo claros, ya que no se observaba este defecto en todos los pacientes, tampoco había síntomas de mal absorción, y las concentraciones sanguíneas de estos aminoácidos eran normales. Con la demostración que la absorción de péptidos no estaba afectada, se explicó el porqué las concentraciones de los aminoácidos en plasma eran normales, sugiriendo que el defecto de transporte en intestino se encontraba en la membrana apical (revisado en (Palacin et al., 2001)).

Respecto al defecto renal, no se disponen de estudios de transporte *in vitro* con muestras de pacientes cistinúricos, como se tienen de intestino. El grupo de Segal estudió la acumulación de arginina, lisina y cistina en secciones de corteza renal de un paciente cistinúrico. La acumulación de aminoácidos básicos era inferior a la normal, pero no se observaba ningún defecto en la acumulación de cistina (FOX et al., 1964), hecho que era muy difícil de entender, a no ser que el estudio en las muestras de corteza correspondiese al transporte presente en las membranas basolaterales en lugar de las apicales. Aún así, los datos del defecto de transporte en los pacientes de cistinuria sugerían que el sistema de transporte afectado era el sistema $b^{0,+}$.

3.3. Heterogeneidad fenotípica: subtipos de cistinuria

El que no todos los pacientes de cistinuria presenten defecto intestinal, y que los valores de excreción de aminoácidos básicos y cistina en orina sean tan variables en los heterocigotos, ha llevado a distintos grupos a hacer una clasificación de los enfermos de cistinuria basada en estas características. En 1966, Rosenberg propuso la existencia de tres tipos de cistinuria, según el fenotipo urinario de los heterocigotos obligados, y según el defecto de transporte intestinal en los pacientes (Rosenberg et al., 1966). La clasificación según estos parámetros se encuentra detallada en la tabla 2.

		DEFECTO EN RIÑÓN	DEFECTO EN INTESTINO
		excreción urinaria	absorción intestinal
TIPO I	Homocigoto (I/I)	Elevada C _{ssC} , Lys, Arg y Orn	No absorción de C _{ssC}
	Heterocigoto (I/N)	Normal	
TIPO II	Homocigoto (II/II)	Elevada C _{ssC} , Lys, Arg y Orn	No absorción de C _{ssC}
	Heterocigoto (II/N)	Elevada C _{ssC} , Lys, Arg y Orn	
TIPO III	Homocigoto (III/III)	Elevada C _{ssC} , Lys, Arg y Orn	No defecto intestinal
	Heterocigoto (III/N)	Elevada C _{ssC} , Lys, Arg y Orn	

Tabla 2 Clasificación de los diferentes tipos de cistinuria en función del fenotipo renal e intestinal. (No absorción de c_{ssC}: no hay respuesta en plasma después de una carga oral, ni acumulación de cistina y aminoácidos básicos en biopsias de yeyuno; No defecto intestinal: respuesta en plasma después de una carga oral y transporte detectable en biopsias de yeyuno).

Siguiendo la clasificación de Rosenberg, y centrándose en el fenotipo renal, también se distinguen claramente los tres tipos de cistinuria: la forma totalmente recesiva (Tipo I), la forma incompleta recesiva (Tipo III), y la forma dominante, donde los heterocigotos excretan cistina en el rango de formación de cálculos (Tipo II). Los rangos de excreción de aminoácidos siguiendo esta clasificación se muestran en la tabla 3 (Palacin et al., 2001).

Inicialmente se creía que los subtipos de cistinuria eran reflejo de heterogeneidad alélica, a causa de distintas mutaciones en un mismo locus genético de cistinuria, que podrían dar un fenotipo suave, moderado o severo. Pero Goodyer y colaboradores observaron que los hijos de familias mixtas (un padre heterocigoto silente y el otro parcialmente dominante, tipo I/III), tenían niveles de excreción inferiores a los homocigotos de los otros tipos, y postularon

que una complementación parcial entre dos o más genes de cistinuria podría explicar este hecho (Goodyer et al., 1993).

Tipo (n° individuos)	Cistina	Ornitina	Arginina	Lisina	Total
Normales (9)	43 ± 7	22 ± 3	17 ± 5	238 ± 68	323 ± 75
I/N (8)	87 ± 14	40 ± 1	26 ± 3	237 ± 26	390 ± 33
II/N (6)	1035 ± 110	519 ± 82	376 ± 132	3814 ± 655	6369 ± 726
III/N (31)	343 ± 33	126 ± 20	104 ± 20	1488 ± 140	2045 ± 171
I/I (7)	1716 ± 772	2056 ± 534	2610 ± 1171	7380 ± 1390	14000 ± 2922
II/II (4)	1808 ± 566	2290 ± 580	4422 ± 502	9900 ± 1807	18413 ± 3212
III/III (20)	1816 ± 648	1899 ± 402	3833 ± 1401	6963 ± 2039	14511 ± 3286
I/III (6)	1245 ± 517	1382 ± 350	1702 ± 483	5164 ± 800	9489 ± 1964

Tabla 3 Rangos de excreción urinaria en los distintos tipos de cistinuria. Media ± error estándar de la excreción urinaria ($\mu\text{mol/g}$ creatinina) de los aminoácidos indicados y de la suma de todos ellos (Total) en individuos adultos.

Hasta la identificación de los genes responsables de la cistinuria, la subclasificación de esta enfermedad tenía sólo base fenotípica. A partir del clonaje de estos genes y de los estudios de ligamiento y de búsqueda de mutaciones se ha establecido que los tipos II y III deben considerarse conjuntamente y se clasifica la cistinuria en dos subtipos: cistinuria de tipo I, en la que los heterocigotos muestran aminoaciduria normal, y cistinuria de tipo no-I (que engloba los tipos II y III), en la que los heterocigotos obligados muestran un grado variable de hiperexcreción urinaria de cistina y aminoácidos básicos. Posteriormente, la identificación de más mutaciones, el estudio funcional y la correlación con el fenotipo han proporcionado una nueva perspectiva y se ha hecho necesario el establecer una nueva clasificación basada en la información genética. Esta nueva clasificación se presentará en detalle en las secciones de resultados y discusión.

3.4. Heterogeneidad genética

En 1994 se localizó el locus responsable de la cistinuria en el cromosoma 2p mediante análisis de ligamiento (Pras et al., 1994). Justamente en esa zona se encontraba el gen *SLC3A1*, que codifica la proteína rBAT, que forma parte del sistema de transporte $b^{0,+}$ y que se localiza en intestino y en riñón. Por las características del transporte inducido por rBAT en oocitos de *Xenopus*, y por su distribución tisular, *SLC3A1* parecía un buen gen candidato a ser responsable de la cistinuria. Efectivamente, el análisis de mutaciones del gen *SLC3A1* en pacientes cistinúricos confirmó que mutaciones en este gen son causantes de cistinuria (Calonge et al., 1994).

Aún así, todavía quedaban aspectos por resolver, ya que sólo se encontraron mutaciones en rBAT en pacientes con cistinuria de tipo I, pero nunca en pacientes con la forma incompleta recesiva de la cistinuria (Gasparini et al., 1995). Además, el análisis de ligamiento con 22 familias italianas y españolas demostraba que sólo las familias con cistinuria de tipo I ligaban con el locus del cromosoma 2, mientras que las familias de tipo no-I (II y III) no

ligaban con este locus (Calonge et al., 1995). Esto demostraba que existía heterogeneidad genética en la cistinuria. Más tarde se mapó el locus de cistinuria de tipo III en el cromosoma 19q13.1 (Bisceglia et al., 1997;Wartenfeld et al., 1997). En el primer estudio se utilizaron las familias italianas y españolas que no habían dado ligamiento con el locus del cromosoma 2, algunas de las cuales habían sido clasificadas como tipo II. Por lo tanto, parecía que este nuevo locus del cromosoma 19 podría explicar la cistinuria de tipo II y III. Entonces, el fenotipo distinto entre estos tipos posiblemente sería debido a diferencias alélicas de este mismo locus.

La identificación de dos locus genéticos responsables de los distintos tipos de cistinuria permitía explicar las causas de la heterogeneidad fenotípica de esta enfermedad, pero faltaba conocer cuál era esa otra proteína, y cuál era su función en la reabsorción de aminoácidos básicos y cistina. No fue hasta el 1999 cuando el Consorcio Internacional de Cistinuria (ICC) clonó la subunidad $b^{0,+}AT$, que coexpresa junto con rBAT la actividad de transporte $b^{0,+}$ en sistemas heterólogos y se expresa principalmente en riñón e intestino (Feliubadalo et al., 1999). Mutaciones en el gen *SLC7A9*, que codifica la subunidad $b^{0,+}AT$, son causantes de cistinuria de tipo no-I, demostrándose así la heterogeneidad de locus en la cistinuria (Feliubadalo et al., 1999).

3.5. Genética molecular de la cistinuria de tipo I: Mutaciones en *SLC3A1*

Hasta el inicio de esta tesis se habían caracterizado 56 mutaciones y 8 polimorfismos en el gen *SLC3A1* en familias italianas, españolas, judías, japonesas, americanas y canadienses (Albers et al., 1999;Bisceglia et al., 1996;Calonge et al., 1994;Egoshi et al., 2000;Endsley et al., 1997;Gasparini et al., 1995;Gitomer et al., 1998a;Gitomer et al., 1998b;Gitomer et al., 2000;Horsford et al., 1996;Miyamoto et al., 1995;Pras et al., 1995;Pras et al., 1998;Purroy et al., 2000). Entre las mutaciones encontradas había 31 mutaciones puntuales que provocan cambio de aminoácido, dos mutaciones de *stop*, 10 inserciones y deleciones que producen cambio en la pauta de lectura, 3 mutaciones de *splicing* y 10 grandes reordenamientos. La mutación M467T era la más común, encontrándose en 38 cromosomas diferentes en familias procedentes de todo el mundo.

Con las mutaciones de rBAT encontradas en pacientes cistinúricos de tipo I se han hecho estudios de correlación genotipo-fenotipo, y se ha visto que las familias con mutaciones que provocan que la proteína quede truncada (mutaciones de desplazamiento de la pauta de lectura o de pérdida de sentido), presentan mayor número de cálculos de cistina, con más intervenciones médicas por año ((Dello Strologo L. et al., 1997). Por lo tanto, parece que este tipo de mutaciones en rBAT están relacionadas con una mayor severidad de síntomas. De todos modos, la severidad entre miembros de una misma familia con la misma mutación varía sustancialmente, sugiriendo que otros determinantes de la urolitiasis ejercen una poderosa influencia en el impacto clínico de las mutaciones en el gen *SLC3A1*.

Algunas mutaciones de rBAT se han estudiado funcionalmente, inyectando el cRNA en oocitos de *Xenopus* y analizando su actividad de transporte y/o expresión en la membrana plasmática (Chillaron et al., 1997; Miyamoto et al., 1995; Pineda et al., 2004b; Saadi et al., 1998). Estudios con la mutación M467T han demostrado que este mutante conserva un 20% de actividad si se analiza la función dos días después de la inyección de cRNA (Calonge et al., 1994). Este mutante es capaz de recuperar el 100% de actividad de transporte al inyectar más cantidad de cRNA o al determinar la actividad de transporte unos días más tarde (Chillaron et al., 1997). Un resultado parecido se obtiene al analizar otra mutación de cistinuria menos común, la M467K. En este mutante se recupera parcialmente la actividad, aproximadamente el 20%. La recuperación de la actividad es un indicativo de que las mutaciones afectan al tráfico de la proteína hacia la membrana plasmática. Estudios funcionales con otros mutantes de rBAT de pacientes cistinúricos (T216M y S217R) también sugieren defectos de tráfico (Saadi et al., 1998). Todas las mutaciones puntuales de rBAT de las que se ha estudiado la función tienen defectos en el tráfico hacia la membrana plasmática, y una vez la proteína está en la membrana tienen la misma actividad con las mismas características cinéticas que la proteína salvaje. Recientemente, sin embargo, se ha demostrado que una mutación de tráfico en rBAT (R365W), encontrada en pacientes cistinúricos, puede modificar las características cinéticas de transporte del sistema b^{0,+} (Pineda et al., 2004b).

A pesar del gran número de mutaciones identificadas en el gen *SLC3A1*, el porcentaje de alelos de tipo I explicados era bajo. Estudios de identificación de mutaciones en alelos de tipo I a partir de pacientes cistinúricos cuidadosamente clasificados como tipo I y mixtos, sólo alcanzaban un porcentaje de explicación que oscilaba entre el 40 y 60% (Bisceglia et al., 1996; Gasparini et al., 1995; Horsford et al., 1996). Esta falta de mutaciones por identificar en *SLC3A1* en la cistinuria de tipo I podría ser debida a: i) mutaciones presentes en regiones del gen que no se hubiesen analizado, como la región 3' no codificante, región promotora e intrones, ii) clasificación incorrecta de algunos alelos debido al solapamiento existente en la excreción de cistina entre los heterocigotos de tipo I y III (Rosenberg et al., 1966), clasificándose alelos como tipo I cuando en realidad eran de tipo III, y iii) que el fenotipo de tipo I estuviese causado por mutaciones en otro gen en lugar de *SLC3A1*. Los estudios que tratan de resolver estas cuestiones en la cistinuria de tipo I se han abordado en esta tesis y aparecen en los capítulos de resultados y discusión.

3.6. Genética molecular de la cistinuria de tipo no-I: Mutaciones en *SLC7A9*

Cuando se encontró que *SLC7A9* podría ser un gen candidato para la cistinuria de tipo no-I, se buscaron mutaciones en pacientes judíos libios, italianos y españoles de tipo no-I, y en pacientes norteamericanos no clasificados, en los cuales no se había encontrado ninguna mutación en *SLC3A1*. También se analizaron pacientes cistinúricos de tipo mixto italianos y españoles. Se encontró que los pacientes judíos líbios eran homocigotos para una mutación de cambio de sentido en b^{0,+}AT (V170M) que elimina la actividad de transporte de aminoácidos cuando se cotrasfecta junto con rBAT en células COS. Además se identificaron

cuatro mutaciones más de cambio de sentido (G105R, A182T, G195R, G295R) y dos desplazamientos de la pauta de lectura debidos a una pequeña inserción y a una pequeña delección de una y dos bases respectivamente (520insT y 596delTG). alguna de estas mutaciones en *SLC7A9* (por ejemplo A182T) resultaba en un fenotipo muy suave, similar al de tipo I o un fenotipo III suave, mientras que otras mutaciones (por ejemplo, G105R y G195R) resultaban en un fenotipo III en algunos pacientes de tipo mixto (Feliubadalo et al., 1999). Estos resultados sugerían que los tipos II y III, y en algunos casos el tipo I, representaban diferencias alélicas en *SLC7A9*, y que otros factores, genéticos o ambientales probablemente estaban también implicados. También se encontró un paciente con una mutación en *SLC7A9* (G105R), y otra mutación en *SLC3A1* (M467T) con lo que surgía la posibilidad que la cistinuria fuese una enfermedad digénica en algunos de los pacientes mixtos (tipo I/tipo no-I) que confirmaría la hipótesis de complementación genética parcial (Goodyer et al., 1993).

Posteriormente, y paralelamente al inicio de esta tesis, se encontraron 28 nuevas mutaciones en *SLC7A9* en un total de 175 pacientes de cistinuria de tipo no-I o sin clasificar (Font et al., 2001): 13 de cambio de sentido, 1 de pérdida de sentido, 3 de *splicing* y 11 pequeñas delecciones y/o inserciones de entre 1 y 5 pares de bases. Algunos de los pacientes de este estudio solo presentaban una mutación en *SLC7A9*, pero se diferenciaban fenotípicamente del heterocigoto obligado por la elevada excreción de arginina y ornitina en orina, y por la presencia de cálculos de cistina.

Del total de mutaciones identificadas en *SLC7A9*, se seleccionaron cuatro muy frecuentes, G105R (25.4%), V170M (14.7%), R333W (8.6%), A182T (4.3%) y dos poco comunes A70V y A354T, para estudiar su actividad en células HeLa (Font et al., 2001). Las mutaciones V170M y A354T no inducen transporte de cistina, en consonancia con la severidad del fenotipo de los pacientes, mientras que las mutaciones G105R y R333W inducen ~10% de la actividad del salvaje, y las mutaciones A70V y A182T muestran una actividad ~78% y ~60%, respectivamente. La cantidad de proteína expresada del mutante G105R es ~10% respecto a la salvaje. Esto sugería que esta mutación afecta principalmente la traducción o estabilidad de la proteína. El resto de proteínas mutadas tiene una expresión similar al salvaje con lo que deben afectar a la actividad de transporte o al tráfico de la proteína (Stevens et al., 1984), y no a su estabilidad (Font et al., 2001). Recientemente, mediante estudios de reconstitución en proteoliposomas, se ha demostrado que cuando se reconstituye la mutación A182T, induce un transporte de L-arginina *trans*-estimulado por L-leucina similar al inducido por la proteína salvaje mientras que la mutación A354T no induce transporte (Reig et al., 2002). La cantidad de proteína expresada en los dos mutantes es similar al salvaje. Estos resultados indican un defecto de tráfico en el caso de la mutación A182T y la inactivación del transportador por la mutación A354T (aunque los experimentos realizados no descartan un defecto de tráfico en esta última mutación) (Reig et al., 2002).

A pesar de la variabilidad individual, se encontró correlación entre la actividad de transporte de $b^{0,+}AT$ y el fenotipo urinario de los heterocigotos obligados: la mutación A182T (~60% de actividad residual de transporte) se asocia con un fenotipo urinario medio mientras que las mutaciones V170M, R333W, A354T y G105R, de actividad mínima, se asocian con un

fenotipo urinario más severo (Font et al., 2001). La fiabilidad de esta correlación se apoya en que mutaciones puntuales que afectan a residuos de aminoácidos altamente conservados en la familia de transportadores heteroméricos de aminoácidos parecen asociadas a un fenotipo muy severo en heterocigotos. Por el contrario, mutaciones asociadas a un fenotipo moderado afectan residuos más variables entre los miembros de esta familia (Font et al., 2001).

A pesar del gran número de pacientes analizados en este estudio, no incluía pacientes con cistinuria de tipo mixto. En este sentido, se hacía necesaria una búsqueda de mutaciones en ambos genes en los pacientes de tipo mixto. También era interesante comprobar si los pacientes heterocigotos de tipo no-I presentaban además una mutación en *SLC3A1*, siendo en realidad de tipo mixto. La caracterización de mutaciones en *SLC3A1* en estos pacientes, y la correlación fenotipo-genotipo se ha abordado en esta tesis y aparece en los capítulos de resultados y discusión.

3.7. Modelos animales

Se han descrito modelos naturales de cistinuria en gato (DiBartola et al., 1991), en distintas razas caninas (Hoppe et al., 1993) y en lobos (Bovee et al., 1981). Los perros *Newfoundland* forman un grupo con los parámetros bioquímicos más homogéneos y etiología conocida. Todos los perros *Newfoundland* analizados tienen una mutación de cambio de sentido en *SLC3A1* (Henthorn et al., 2000).

Recientemente se han desarrollado dos modelos murinos para la cistinuria de tipo I y tipo no-I respectivamente. El modelo murino de la cistinuria de tipo I se ha generado a partir de la inducción de una mutación (D140G) en *SLC3A1* mediante el agente mutagénico N-ethyl-N-nitrosourea (Peters et al., 2003). Este modelo murino mimetiza la etiología y manifestaciones clínicas la cistinuria de tipo I humana. El modelo murino de la cistinuria de tipo no-I, *Stones mice*, se ha generado en nuestro grupo de investigación mediante recombinación homóloga y disrupción del gen *SLC7A9* en un background genético mixto (Feliubadalo et al., 2003). La expresión de la proteína b⁰⁺AT está completamente eliminada en el riñón del ratón *SLC7A9* *-/-* (*Stones*). En cambio, *Stones* expresa cantidades significativas de la proteína rBAT, que está unida covalentemente a otra subunidad todavía por identificar. En este modelo, todos los ratones homocigotos mutantes muestran hiperexcreción masiva de cistina y aminoácidos dibásicos, mientras que los heterocigotos muestran valores más bajos aunque con una clara hiperexcreción de estos aminoácidos (fenotipo no-I). Alrededor del 40% de los mutantes homocigotos presentan cálculos de cistina en el sistema urinario. El hecho que algunos ratones *Stones*, generados en un *background* genético mixto, desarrollen cálculos de cistina a una edad temprana mientras que otros no los desarrollan en el primer año de vida, sugiere la implicación de genes modificadores en el fenotipo litiasico.

4. TRANSPORTADORES HETEROMÉRICOS DE AMINOÁCIDOS

La familia de transportadores heteroméricos de aminoácidos (*Heteromeric Amino acid Transporter*) se caracteriza por ser la única que posee una estructura heteromérica, la unidad funcional de la cual está constituida al menos por una subunidad ligera (*Light Subunit Heteromeric Amino acid Transporter*) y una subunidad pesada (*High Subunit Heteromeric Amino acid Transporter*) unidas entre ellas mediante un puente disulfuro conservado en todos los miembros de la familia (Chillaron et al., 2001; Verrey et al., 1999; Wagner et al., 2001) (Figura 2).

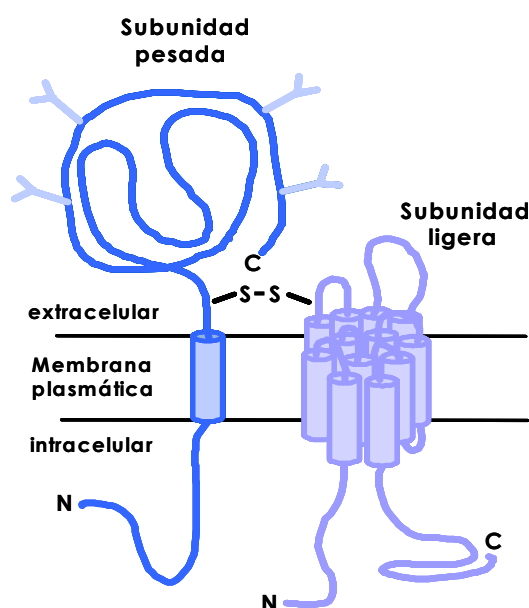


Figura 2 Representación esquemática de los transportadores heteroméricos de aminoácidos (HAT).

La subunidad pesada (HSHAT) está unida por un puente disulfuro (S-S) a la correspondiente subunidad ligera (LSHAT). Las cisteínas implicadas en este puente disulfuro se localizan extracelularmente, después del segmento *trans*-membrana de la HSHAT y en el segundo dominio extracelular putativo (EL2) de la LSHAT. Existen otras interacciones no covalentes entre las dos subunidades, todavía por determinar. El dominio extracelular de la HSHAT es homólogo a glucosidasas. La disposición de los 12 segmentos *trans*-membrana putativos de la LSHAT es figurativa. Los dominios *trans*-membrana, citosólicos y extracelulares no están dibujados a escala. Y, indica punto de glicosilación.

La estructura heteromérica y el mecanismo de transporte de esta familia de transportadores se ha conservado a lo largo de la evolución en metazoos. Búsquedas por homología de secuencia en el genoma del nematodo *C. elegans* evidencian la presencia de genes codificantes para proteínas con valores altos de identidad (28-45%) respecto a las de mamífero (Veljkovic et al., 2004). Se ha comprobado en *C.elegans* que tanto las tres proteínas homólogas a las subunidades ligeras de mamífero (AAT-1, 2 y 3) como las dos homólogas a las subunidades pesadas (ATG-1 y 2) contienen la cisteína conservada implicada en la formación del puente disulfuro. Su caracterización funcional en oocitos de *X. laevis* muestra para los complejos AAT-1/ATG-2 y AAT-3/ATG-2 una inducción de actividad de transporte parecida a la del sistema L (Veljkovic et al., 2004).

En la tabla 4 se presentan los miembros de mamíferos identificados hasta el momento que pertenecen a la familia HAT. Además del sistema de transporte asociado, se indica su localización cromosómica y su relación con enfermedades hereditarias. Siguiendo la nomenclatura HUGO (*HUMAN Genome Organization*), los genes codificantes para cada proteína utilizan la raíz SLC (de *SoLute Carrier*), seguido de un número correspondiente a la familia "genética" a la que pertenece, la letra A, que actúa de separador, y finalmente el número del transportador (Hediger et al., 2004). Las subunidades pesadas pertenecen a la familia SLC3 mientras que las subunidades ligeras pertenecen a la familia SLC7.

4.1. Subunidades pesadas

Esta familia, también denominada SLC3 (*SoLute Carrier 3*), está constituida, hasta el momento, por dos proteínas que comparten una serie de propiedades funcionales y estructurales: rBAT (*SLC3A1*) (*related to b⁰⁺ Amino acid Transporter*; también denominado NBAT, D2) y 4F2hc (*SLC3A2*) (cadena pesada del antígeno de superficie 4F2 o CD98) (Tabla 4). Las secuencias humanas de rBAT y 4F2hc codifican glicoproteínas de 685 y 529 aminoácidos respectivamente, con ~30% de identidad. En SDS PAGE en condiciones reductoras, las formas glicosiladas de rBAT y 4F2hc tienen una movilidad de 94 y 85 kDa, mientras que las formas sin glicosilar tienen una movilidad de 75 y 60 kDa respectivamente (Palacin et al., 1998). En condiciones no reductoras, ambas proteínas forman parte de un complejo con otra proteína. El tamaño de este complejo depende de la especie de la proteína asociada pero generalmente oscila entre 120 y 130 kDa (Chillaron et al., 2001).

Los algoritmos de hidrofobicidad para ambas proteínas predicen una glicoproteína de tipo II, con un extremo N-terminal intracelular, un único dominio trans-membrana y un extremo C-terminal extracelular (Palacin et al., 1998). El residuo de cisteína que participa en el puente disulfuro con la subunidad ligera se encuentra a una distancia de cuatro o cinco aminoácidos del segmento trans-membrana hacia el extremo C-terminal. En cambio, un estudio realizado con anticuerpos dirigidos contra determinados epítomos de la proteína rBAT sugirió la existencia de cuatro segmentos trans-membrana y la localización intracelular de los extremos N- y C-terminales (Mosckovitz et al., 1994). Sin embargo, el grupo de M.H. Ginsberg ha demostrado que el extremo N-terminal de 4F2hc es intracelular y el C-terminal es extracelular, de acuerdo con la primera predicción (Fenczik et al., 2001). Otro argumento a favor de la estructura de un único dominio trans-membrana y un dominio C-terminal extracelular es la homología de este dominio C-terminal de las proteínas HSHAT con α -amilasas (Bertran et al., 1992c; Quackenbush et al., 1987; Tate et al., 1992; Teixeira et al., 1987; Wells and Hediger, 1992). Este dominio es homólogo a la maltasa de insectos (α -glucosidasa) y sus precursores (35-40% de identidad), y a las α -glucosidasas de bacterias (~30% de identidad).

La familia de las α -amilasas consiste en un gran grupo de hidrolasas de almidón y enzimas relacionados que comprende alrededor de 20 especificidades enzimáticas diferentes. Actualmente se conoce con el nombre de Familia 13 de las glicosil-hidrolasas (Janecek et al., 1997). Todos sus miembros tienen una estructura similar: i) un dominio A catalítico con

estructura de *TIM-barrel* (8 cadenas β y α alternadas); ii) un pequeño subdominio o dominio B de unión a calcio que interrumpe el *TIM-barrel* sobresaliendo entre la tercera cadena β y la tercera hélice α ; y iii) un dominio C para el extremo C-terminal en estructura de láminas β antiparalelas. Existen algunas diferencias entre los miembros de la familia en la secuencia de aminoácidos correspondiente al dominio B (Janecek et al., 1997). Por este motivo se han dividido en cinco grupos, en el que el definido por la oligo 1,6-glucosidasa de *Bacillus cereus* (O1,6G) contiene las HSHATs.

En la Figura 3 se muestra el alineamiento de O1,6G con las proteínas humanas rBAT y 4F2hc. La homología de este alineamiento empieza con dos residuos de triptófano contiguos, situados unos pocos residuos más allá de la cisteína implicada en el puente disulfuro con la subunidad ligera. Se observa que:

i) El dominio A está altamente conservado, manteniendo probablemente la estructura secundaria de *TIM-barrel* para rBAT y 4F2hc aunque en la zona entre las hélices α_4 y α_7 el alineamiento es pobre.

ii) Existen tres residuos catalíticos y dos residuos de unión al sustrato en la zona del *TIM-barrel* que junto al dominio B constituyen el centro activo de la familia 13 de las glucosilhidrolasas. Tres de estos residuos (D199, D329 y H105 en O1,6G) pueden localizarse en rBAT (en las versiones de mamífero) pero no en el caso de 4F2hc. De acuerdo con esto, Wells y colaboradores (Wells et al., 1992) no han observado actividad α -glucosidasa para 4F2hc expresada en oocitos de *X. laevis*.

iii) El dominio B, incluyendo el motivo QPDLN (residuos 167-171 en O1,6G), se conserva en rBAT pero no se encuentra en 4F2hc. Esto sugiere que para rBAT se mantienen las características estructurales de este dominio, en forma de *sándwich* con dos capas α - β .

iv) El dominio C, correspondiente al extremo C-terminal, con su estructura de β -*barrel* con 8 láminas β antiparalelas, se conserva en todas las HSHATs. Sin embargo, se encuentra lejos del centro activo y su función es desconocida.

v) Los últimos 30 aminoácidos de rBAT no se alinean con las α -amilasas.

Desde el punto de vista funcional, el papel de la subunidad pesada parece relacionado con el reconocimiento de la subunidad ligera y su direccionamiento a la membrana plasmática (Nakamura et al., 1999). La interacción entre ambas subunidades está mediada por el puente disulfuro, aunque la sustitución de una de las cisteínas que intervienen en este puente por serina no altera la expresión del heterodímero en la membrana plasmática. Esto indica la importancia de interacciones no covalentes entre ambas subunidades (Estevez et al., 1998; Pfeiffer et al., 1998). El mutante C103S de 4F2hc, que no forma ningún puente disulfuro con la subunidad ligera, conduce a LAT-1 a la superficie plasmática de las células HeLa tan eficientemente como la proteína salvaje. Se ha demostrado que 4F2hc se puede localizar como monómero en la superficie de células COS, mientras que la subunidad ligera LAT-1, en ausencia de la subunidad pesada, parece que permanece en un compartimento perinuclear. Esto sugiere que necesita la subunidad pesada para alcanzar la superficie celular (Nakamura et al., 1999).

sugieren que rBAT no se expresa en cerebro y que el mensajero que se detecta puede ser el de un homólogo a rBAT (Yan et al., 1992). En riñón de rata, la expresión del mRNA de rBAT se inicia en la última parte de la vida fetal, se mantiene con niveles de expresión muy bajos en el comienzo de la vida postnatal, y se incrementa después de la lactancia hasta alcanzar el doble de expresión en el adulto respecto a la expresión en el comienzo de la vida postnatal (Furriols et al., 1993). Estudios de inmunocitoquímica han demostrado que rBAT se localiza en membranas “brush border” de células epiteliales de intestino y de túbulo proximal de riñón. A lo largo del túbulo, la expresión de rBAT se incrementa desde el segmento S1 hasta el segmento S3 (Furriols et al., 1993; Kanai et al., 1992; Pickel et al., 1993).

La actividad de transporte de aminoácidos asociada a rBAT ha sido estudiada en oocitos de *X. laevis*. rBAT induce el transporte independiente de sodio de cistina, aminoácidos básicos y neutros. Los aminoácidos L-cistina, L-arginina, L-lisina, L-ornitina, L-histidina y L-leucina son transportados con una K_m en el rango micromolar, mientras que otros aminoácidos como la L-alanina, tienen una K_m aparente en el rango milimolar (Bertran et al., 1992b; Wells and Hediger, 1992). Esta actividad es similar a la actividad $b^{0,+}$ descrita previamente en blastocistos de ratón como un sistema de transporte de alta afinidad independiente de sodio para aminoácidos básicos y neutros (Van Winkle et al., 1988). La única diferencia entre la actividad de rBAT (denominada $b^{0,+}$ -like) y la actividad $b^{0,+}$ es que rBAT también transporta L-cistina. Además, la salida de aminoácidos mediada por rBAT a través de la membrana plasmática es dependiente de la presencia de aminoácidos en el medio extracelular (Ahmed et al., 1995; Coady et al., 1994).

Posteriormente, se ha demostrado que rBAT se comporta como un intercambiador obligatorio con una estequiometría 1:1 (Chillaron et al., 1996) ya que: (i) la salida de aminoácidos del oocito mediada por rBAT es dependiente de la presencia de aminoácidos en el exterior del oocito; (ii) debido al mecanismo de intercambio, los oocitos que expresan rBAT son capaces de acumular hasta ~50 veces la concentración extracelular de los aminoácidos radiactivos L-arginina, L-leucina y L-cistina (50 μ M); (iii) la acumulación intracelular de aminoácidos transportados al interior tiene un límite que coincide con la concentración de aminoácidos intracelulares que son sustrato de rBAT (~2500 μ M); (iv) el heterointercambio de sustratos mediado por rBAT en oocitos es electrogénico (Busch et al., 1994) y en ausencia de aminoácidos en el medio externo, no se observa ninguna actividad eléctrica; y (v) tanto en el heterointercambio como en el homointercambio, la entrada de sustrato es similar a la de salida. La estimación del coeficiente de Hill indica una estequiometría de intercambio de 1:1.

Una caracterización más exhaustiva de la actividad de rBAT ha demostrado que el transporte es independiente de la presencia externa de los iones cloro y potasio (Busch et al., 1994; Coady et al., 1994) de la sustitución de sodio por litio o colina, y de cambios en el pH y en la concentración de ATP (Coady et al., 1994). El hecho de que un *knock down* de rBAT en células OK tenga una actividad de transporte $b^{0,+}$ -like disminuida (Mora et al., 1996) y que mutaciones en rBAT causen cistinuria de tipo I (Calonge et al., 1994) demuestran el papel de esta proteína en el sistema de reabsorción de cistina de alta afinidad.

Introducción

En 1999, tres laboratorios identificaron independientemente el transportador *SLC7A9* responsable de la actividad de transporte b^0+ cuando se expresa con rBAT en células en cultivo u oocitos de *X. laevis* (Chairoungdua et al., 1999; Feliubadalo et al., 1999; Pfeiffer et al., 1999a) (Tabla 4). Estudios posteriores han demostrado que ambas proteínas forman parte de un mismo complejo proteico en membranas “brush border” de riñón de ratón y humano (Fernandez et al., 2002). Estos resultados sugieren la existencia del ortólogo de b^0+ AT en oocitos de *X. laevis*, capaz de interactuar con rBAT, lo que permitió la caracterización inicial de su actividad.

4.1.2. 4F2hc

El cDNA de 4F2hc fue clonado usando un anticuerpo monoclonal diseñado contra un antígeno de superficie de células de linfoblastoma (Hemler and Strominger, 1982). Su alta identidad de secuencia con rBAT hizo sospechar que pudieran ser miembros de la misma familia, lo que llevó a analizar si 4F2hc inducía alguna actividad de transporte en oocitos de *Xenopus*. Se comprobó que la inyección de cRNA de 4F2hc en oocitos induce transporte de tipo y^+L : transporte de aminoácidos básicos independiente de sodio y de aminoácidos neutros dependiente de sodio con elevada afinidad (Bertran et al., 1992a; Wells et al., 1992). Esta actividad se caracterizó como un intercambio obligatorio y asimétrico, es decir, favorece la salida de aminoácidos básicos intercambiados por aminoácidos neutros y sodio (Chillaron et al., 1996). Además, la expresión de 4F2hc en oocitos también se relacionó con la inducción de sistema L (Broer et al., 1995).

A diferencia de rBAT, la proteína 4F2hc se expresa de forma ubicua y parece estar presente en todas las células y líneas celulares tumorales (Nakamura et al., 1999; Parmacek et al., 1989). En riñón, se ha localizado en la membrana basolateral del túbulo proximal (Quackenbush et al., 1986; Rossier et al., 1999). La comparación de la expresión en tejidos neonatales y adultos de ratón no muestra un patrón de regulación claro durante el desarrollo (Parmacek et al., 1989).

Actualmente se sabe que 4F2hc interacciona con distintos miembros de la familia de subunidades ligeras de transportadores heteroméricos de aminoácidos, induciendo distintos sistemas de transporte (tabla 4). Así, los heterodímeros formados por 4F2hc con las subunidades ligeras y^+LAT-1 , y^+LAT-2 , LAT-1, LAT-2, asc-1 y xCT inducen actividad de transporte de tipo y^+L , L, asc y x_c^- (revisado en (Chillaron et al., 2001)). Se ha demostrado que en la interacción con estas subunidades intervienen distintos dominios de su secuencia. Estudios de mutantes de 4F2hc con deleciones sugieren que el dominio C-terminal es imprescindible para la unión a LAT-2 y y^+LAT-2 , pero no para la unión a LAT-1 (Broer et al., 2001).

Además de su implicación en el transporte de aminoácidos, se han descrito otras funciones asociadas al complejo 4F2hc, como la activación, la proliferación, la adhesión, la fusión y la diferenciación celular. Así, diversos estudios han demostrado inducción de la expresión de 4F2hc en células linfocíticas y cánceres, sugiriendo para 4F2hc un papel en crecimiento celular y malignidad (Chillaron et al., 2001; Deves and Boyd, 2000). Sin embargo,

se desconoce si este efecto tiene que ver con la función de 4F2hc como transportador de aminoácidos o con una función todavía desconocida. También se ha implicado 4F2hc en la señalización intracelular por integrinas (Fenczik et al., 1997). En este sentido, un trabajo sugiere que el dominio N-terminal de 4F2hc está asociado intracelularmente con el dominio C-terminal de las subunidades β de las integrinas (Fenczik et al., 2001). Por otro lado, 4F2hc parece jugar un papel importante en la fusión celular inducida por infección vírica (Tsurudome and Ito, 2000).

Las distintas evidencias que revelaron que rBAT y 4F2hc son componentes de un transportador heteromérico se resumen a continuación:

i) Eran proteínas poco hidrofóbicas para poder constituir un poro de paso de sustratos a través de la membrana. Además, con una predicción de estructura con un único dominio trans-membrana era poco probable que pudiesen constituir por sí mismas un transportador funcional, sino que más bien serían subunidades reguladoras de un transportador formado por diferentes cadenas polipeptídicas.

ii) El antígeno 4F2 formaba parte de un heterodímero constituido por una proteína glicosilada de 85 kDa (4F2hc) unida por un puente disulfuro a una proteína de unos 40 kDa, altamente hidrofóbica y no glicosilada (Haynes et al., 1981; Hemler and Strominger, 1982). El grupo de Tate también había visto complejos de este tamaño para rBAT con otra subunidad, en preparaciones de membranas de riñón e intestino. Estudios de *Western blot* para rBAT en condiciones no reductoras revelaban un complejo de alto peso molecular (250 kDa y 125 kDa) que pasaba a ser de 90 kDa en condiciones reductoras (Wang and Tate, 1995).

iii) La expresión transitoria de rBAT en células COS no permitía obtener ninguna actividad de transporte, rBAT no llegaba a la membrana y además no se conseguía observar el complejo de ~125 kDa característico de riñón e intestino, indicando que en estas células probablemente no se expresaba la subunidad que forma el complejo con rBAT, a diferencia de lo que pasa en oocitos (Palacin et al., 1996).

iv) Se observaban distintas actividades de transporte asociadas con la expresión de rBAT y 4F2hc en oocitos a parte de $b^{o,+}$ y y^+L , respectivamente. El grupo de Taylor observó que rBAT inducía dos actividades: $b^{o,+}$ y y^+L (Peter et al., 1996; Peter et al., 1999). El grupo de Bröer atribuyó inducción de sistema L a la expresión de 4F2hc en oocitos (Broer et al., 1995) y más adelante detectaron actividad $b^{o,+}$ asociada a la expresión de 4F2hc (Broer et al., 1998). La observación de diferentes actividades de transporte asociadas con la expresión de estas proteínas en oocitos podría estar indicando que rBAT y 4F2hc podían formar parte de distintos sistemas de transporte, en función de la subunidad con la que se asocian en el oocito. Además, estudios de estructura-función con deleciones C-terminales y mutantes de cisteínas conservadas en el extremo C-terminal de la proteína rBAT en oocitos de *Xenopus*, sugerían que el extremo C-terminal podría ser importante para la interacción con la subunidad que le permite un tipo de transporte y no otro (Miyamoto et al., 1996; Peter et al., 2000).

v) Mediante los estudios funcionales de mutaciones en rBAT encontradas en pacientes de cistinuria de tipo I, se vio que no existía correlación entre la cantidad de proteína rBAT presente en la membrana del oocito y la actividad de transporte inducida (Chillaron et al., 1997). Todas las mutaciones que se encontraron afectaban al tráfico de rBAT hacia la membrana, probablemente porque estaban interfiriendo en su interacción con la subunidad ligera presente en el oocito. Pero incluso después de largos tiempos de expresión, cuando la actividad se había recuperado totalmente, sólo un 10% de proteína mutada se encontraba en la membrana en comparación con la cantidad de proteína salvaje, mientras que la actividad era la misma. Esta falta de correlación sugería que existía un factor endógeno (la subunidad ligera presente en el oocito), que limitaba la expresión de actividad de transporte.

vi) Estudios realizados por el Dr. Raúl Estévez de nuestro grupo finalmente demostraron que 4F2hc se asociaba con una subunidad endógena para dar actividad de transporte γ^+L en oocitos de *Xenopus* (Estevez et al., 1998). En primer lugar, el transporte inducido por 4F2hc en oocitos de *Xenopus* se saturaba mientras que la cantidad de 4F2hc en superficie aumentaba con los días de expresión, como ya se había visto para rBAT; Además, la incubación con reactivos mercuriales impermeables a la membrana plasmática de oocitos inyectados con 4F2hc prácticamente inactivaban la actividad de transporte γ^+L que induce 4F2hc. Este efecto podía revertirse con β -mercaptoetanol, indicando que la diana de inactivación se trataba de una/s cisteína/s extracelular/es. Por estudios de mutantes de cisteínas de 4F2hc, se presentaron evidencias de una posible interacción por puente disulfuro entre 4F2hc y otra proteína endógena del oocito, constituyendo un transportador de estructura heteromultimérica (Estevez et al., 1998).

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

4.2. Subunidades ligeras

Las subunidades ligeras de la familia HAT pertenecen a una gran superfamilia conocida con el nombre de transportadores APC (*Amino acid/Polyamine/Choline or organoCation family*), que incluye más de 175 miembros tanto eucariotas como procariotas (Jack et al., 2000). La superfamilia APC es una de las mayores familias de transportadores. Sólo las superfamilias ABC (*ATP Binding Cassette*) y MFS (*Major Facilitator Superfamily*) tienen mayor número de miembros identificados. Aunque incluye miembros que presentan mecanismos de transporte diferentes, estequiometrías variadas y acoplamiento a diferentes iones, existe una importante relación filogenética entre ellos (Jack et al., 2000). El árbol filogenético de la figura 4, en el que se muestran algunos miembros representativos, evidencia estas relaciones evolutivas y muestra la segregación en 10 *clusters* que definen 10 familias. Cada una de las familias presenta una "marca" única en su secuencia pero, sin embargo, todas tienen características topológicas uniformes (o casi uniformes) que le dan la entidad de

superfamilia (Jack et al., 2000). Los transportadores heteroméricos de aminoácidos pertenecen a la familia LAT (familia 8 en la Figura 4), definida con el nombre del primer miembro identificado.

Hasta el momento se han identificado 9 subunidades ligeras, la mayoría por homología de secuencia: 6 de ellas se unen a 4F2hc para dar lugar al transportador funcional (LAT-1, LAT-2, γ LAT-1, γ LAT-2, asc-1, xCT), una de ellas se une a rBAT ($b^{0,+}$ AT) y existen dos miembros "huérfanos" (asc-2, AGT-1), que no interaccionan con las subunidades pesadas descritas y que quizás se unen a una posible subunidad pesada todavía por identificar (Tabla 4). Por trabajos en nuestro grupo, en breve se conocerá un nuevo miembro de la familia (ArpAT, E. Fernández y J. Chillarón, manuscrito en preparación, ver tabla 4). La asociación de estas proteínas con las cadenas pesadas o glicoproteínas de membrana de tipo II (HSHATs) hace que también se las conozca con el nombre gpaATs (*glycoprotein-associated Amino acid Transporters*).

Las diferentes LSHAT (excepto asc2 y AGT1, con identidades del 23-29%) mantienen identidades de secuencia aminoacídica que oscilan entre el 39 y 70% entre parálogos y entre el 85 y 98% entre ortólogos de mamífero (revisado en(Chillaron et al., 2001;Verrey et al., 1999;Wagner et al., 2001). Presentan las siguientes características estructurales y funcionales comunes:

i) Son proteínas altamente hidrofóbicas que no se glicosilan (demostrado para LAT-1 y $b^{0,+}$ AT), lo que provoca un aumento de su movilidad electroforética alrededor de los 40 kDa cuando su peso molecular corresponde a ~50 kDa.

ii) Sobre la base de su homología y de los algoritmos de hidrofobicidad, presentan una predicción de estructura de 12 segmentos trans-membrana, con extremos N y C-terminal intracelulares, acorde con su función de transportador. Estudios recientes de la Dra. Emma Gasol en nuestro grupo han demostrado experimentalmente esta topología para la subunidad ligera xCT, que presenta además un *reentrant-loop* entre los segmentos trans-membrana 2 y 3, con evidencias funcionales de su proximidad a la vía de translocación de sustrato (Gasol et al., 2004).

iii) Se unen con la correspondiente HSHAT mediante un puente disulfuro en el que interviene el residuo de cisteína conservado que se encuentra localizado en el dominio extracelular putativo II (y el residuo ya descrito en las HSHATs).

iv) Necesitan la coexpresión de su correspondiente HSHAT para alcanzar la membrana plasmática en un sistema de expresión heterólogo (Chillaron et al., 2001), aunque no es necesario que ambas se mantengan unidas por el puente disulfuro ya que otras interacciones no covalentes son suficientes para localizar el heterodímero en la membrana (Nakamura et al., 1999;Pfeiffer et al., 1998);

v) Confieren la especificidad de transporte al complejo heteromérico, representando una gran diversidad de sustratos y acoplamiento a iones: aminoácidos neutros de tamaño grande (LAT-1, LAT-2)(Pineda et al., 1999;Rajan et al., 2000b;Rossier et al., 1999;Segawa et al., 1999), pequeño (asc-1, LAT-2) (Fukasawa et al., 2000), cargados negativamente (xCT) y

Introducción

aminoácidos básicos y neutros (y^+ LAT-1, y^+ LAT-2 y $b^{0,+}$ AT)(Chairoungdua et al., 1999;Feliubadalo et al., 1999;Kanai et al., 2000;Pfeiffer et al., 1999b;Torrents et al., 1998).

vi) Los transportadores heteroméricos se comportan como intercambiadores obligatorios con una estequiometría 1:1 y con una afinidad intracelular aparente por el sustrato mucho menor que la extracelular (Meier et al., 2002;Reig et al., 2002), excepto para el caso asc-1/4F2hc, y quizás asc-2, que se comporta como un intercambiador no obligatorio(Nakauchi et al., 2000;Pineda et al., 2004a).

vii) La subunidad ligera es capaz de mediar el transporte en ausencia de la subunidad pesada cuando se consigue expresarla en superficie, como ocurre en un sistema reconstituido (Reig et al., 2002).

Subunidad pesada (HSHAT)	Subunidad ligera (LSHAT)	Nomenclatura HUGO	Sistema de transporte	Cromosoma humano	Enfermedad asociada
4F2hc (CD98hc)		<i>SLC3A2</i>		11q13	
	LAT-1	<i>SLC7A5</i>	L	16q24.3	
	LAT-2	<i>SLC7A8</i>	L	14q11.2	
	y^+ LAT-1	<i>SLC7A7</i>	y^+ L	14q11.2	LPI
	y^+ LAT-2	<i>SLC7A6</i>	y^+ L	16q22.1	
	Asc-1	<i>SLC7A10</i>	asc	19q12-13	
	xCT	<i>SLC7A11</i>	x_c^-	4q28-q32	
rBAT		<i>SLC3A1</i>		2p16.3-21	Cistinuria tipo I
	$b^{0,+}$ AT	<i>SLC7A9</i>	$b^{0,+}$	19q12-13	Cistinuria tipo no-I
?	AGT-1	<i>SLC7A13</i>	-	8q21.3	
	Asc-2	<i>Slc7a12</i>	asc	-	
	arpAT ^(a)	<i>Slc7a14</i>	-	-	

Tabla 4 Transportadores Heteroméricos de Aminoácidos (HATs). (?) no-Identificado; (-) no descrito; (a) la subunidad ligera arpAT todavía no ha sido publicada (E. Fernández, J. Chillarón y M. Palacín, manuscrito en preparación). Adaptada de (Chillarón et al., 2001).

4.2.1. LAT-1

LAT-1 fue el primer miembro identificado de la familia de subunidades ligeras, e inicialmente se denominó ASUR4. Se clonó a partir de una librería de cDNAs obtenida de células A6 de riñón, después de un tratamiento con aldosterona (Mastroberardino et al., 1998). Su co-expresión con 4F2hc dio lugar a inducción de intercambio de aminoácidos neutros por sistema L. Paralelamente, el grupo de Kanai aisló un cDNA de una librería de células de glioma C6 de rata por expresión funcional con co-expresión con 4F2hc, al que denominó LAT-1 (L-type Amino acid Transporter-1) (Kanai et al., 1998). En ambos casos, la nueva proteína identificada presentaba la capacidad de transportar aminoácidos neutros grandes en oocitos de *Xenopus laevis* cuando se co-expresaba con 4F2hc (Kanai et al., 1998;Mastroberardino et al., 1998).

Su actividad es cloro y sodio-independiente e inhibible por el ácido 2-(-)endoamino-bicicloheptano-2-carboxílico (BCH), como se esperaba para una proteína asociada al sistema de transporte de tipo L (Christensen, 1990;OXENDER and Christensen, 1963). Sin embargo, no es inhibible por N-etylmaleimida (NEM). Esto sitúa al transportador LAT-1 dentro del subsistema L1 (Novak et al., 1994;Weissbach et al., 1982). Su espectro de selectividad de sustratos es relativamente amplio: aminoácidos neutros de cadena ramificada y aromática, con constantes de afinidad aparentes bastante altas, en el rango micromolar (Kanai et al., 1998;Mastroberardino et al., 1998;Meier et al., 2002).

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

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

4.2.2. LAT-2

LAT-2 fue identificada en nuestro grupo por homología de secuencia a LAT1 y se caracterizó funcionalmente en oocitos de *Xenopus* (Pineda et al., 1999). En asociación con 4F2hc, también media un transporte de tipo L pero incluso con un rango de selectividad de sustratos todavía mayor que LAT-1 ya que incluye los aminoácidos neutros pequeños(Pineda et al., 1999;Rossier et al., 1999). Se expresa fundamentalmente en la membrana basolateral

Introducción

del túbulo proximal renal (decreciendo de S1 a S3) e intestino delgado (Bauch et al., 2003; Rossier et al., 1999).

LAT-2 intercambia aminoácidos neutros a través de la membrana basolateral equilibrando sus concentraciones relativas. De manera similar a LAT-1, también presenta una afinidad aparente mucho menor por los aminoácidos intracelulares que por los extracelulares (a excepción de la glicina). En conjunto, se puede decir que LAT-2 participa en una ruta de eflujo basolateral unidireccional de determinados aminoácidos neutros. Es un eficiente exportador de L-cisteína (Fernandez et al., 2003; Meier et al., 2002), aminoácido que se importa a las células del túbulo proximal renal como L-cistina, mayoritariamente vía el transportador $b^{0,+}AT/rBAT$. El papel de LAT-2 /4F2hc en el eflujo basolateral de L-cisteína ha sido demostrado por un trabajo en nuestro grupo en un modelo de células renales polarizadas (OK, *Opossum Kidney cells*) (Fernandez et al., 2003). LAT2-4F2hc, al mediar el eflujo de L-cisteína proveniente de la reducción de L-cistina intracelular, tiene una función clave en el flujo *trans*-epitelial de cistina y sugiere que el gen *SLC7A8*, que codifica la proteína LAT-2, podría ser un gen modulador de la reabsorción renal de cistina (Fernandez et al., 2003).

4.2.3. y^+LAT1

y^+LAT1 fue identificada por homología de secuencia a LAT-1 (52%) y cuando se co-expresa con 4F2hc en oocitos de *X. laevis* induce una actividad de transporte como la descrita para el sistema y^+L (Pfeiffer et al., 1999b; Torrents et al., 1998). Los experimentos de caracterización funcional mostraron que el heterómero $y^+LAT1/4F2hc$ es un intercambiador obligatorio de estequiometría 1:1 (Kanai et al., 2000) y que media la captación de aminoácidos neutros juntamente al ión sodio con una afinidad aparente alta, preferentemente intercambiando estos aminoácidos neutros por aminoácidos catiónicos intracelulares, sin acompañamiento del ión sodio (Kanai et al., 2000; Pfeiffer et al., 1999b; Torrents et al., 1998). Esta función de eflujo de aminoácidos catiónicos junto con la alta expresión de y^+LAT1 en riñón e intestino delgado, sugirió que podía ser el transportador defectivo en la Lisinuria con Intolerancia a Proteínas, y mutaciones en el gen *SLC7A7* causan esta enfermedad (Borsani et al., 1999; Torrents et al., 1999). Experimentos posteriores han confirmado su localización basolateral en células del túbulo proximal renal y del intestino delgado siguiendo un gradiente axial decreciente a lo largo del túbulo proximal (Bauch et al., 2003), de forma parecida a LAT-2 y $b^{0,+}AT$ (Pfeiffer et al., 1999a; Rossier et al., 1999).

4.2.4. y^+LAT2

y^+LAT2 fue identificada en las bases de datos públicas por homología de secuencia a LAT-1 (50%). El cDNA se clonó a partir de mieloblastos humanos KG-1 (Nagase et al., 1996), con el nombre KIAA0245 (GenBank ac. nº D87432). Se expresa fundamentalmente en cerebro (tanto en neuronas como en astrocitos), testículos y glándula parótida y de forma más débil en intestino delgado, corazón y riñón de ratón. En asociación con 4F2hc, induce la

4.2.5. b^{0,+}AT

b^{0,+}AT fue identificada por homología de secuencia con el resto de miembros de la familia LSHAT clonados anteriormente (Chairoungdua et al., 1999; Feliubadalo et al., 1999; Pfeiffer et al., 1999a). Su mRNA se expresa en riñón e intestino delgado y en menor medida, en corazón, hígado, placenta y pulmón (revisado en (Wagner et al., 2001). Por estudios de inmunolocalización en riñón se sabe que b^{0,+}AT se encuentra en la membrana apical de las células del túbulo proximal pero que sus niveles de expresión decrecen desde el segmento S1 al segmento S3 (Chairoungdua et al., 1999; Pfeiffer et al., 1999a; Rajan et al., 2000a), del mismo modo que y⁺LAT-1 y LAT-2 (Bauch et al., 2003; Mizoguchi et al., 2001).

b^{0,+}AT interacciona con rBAT para constituir el transportador funcional b^{0,+}AT/rBAT, asociado al sistema de transporte descrito anteriormente como b^{0,+}-like: transporte sodio-independiente de alta afinidad (K_m aparente $<50 \mu\text{M}$) para aminoácidos básicos y cistina, y transporte de menor afinidad (K_m aparente $>300 \mu\text{M}$) para aminoácidos neutros, mediado por un mecanismo de intercambio obligatorio 1:1 (Feliubadalo et al., 1999). Existe una asimetría en la afinidad del sustrato a ambos lados de la membrana que, en condiciones fisiológicas, favorece la entrada de cistina (rápidamente reducida a cisteína) y aminoácidos dibásicos mientras promueve la salida de aminoácidos neutros (Reig et al., 2002). Los patrones de expresión opuestos a lo largo del túbulo proximal de b^{0,+}AT y rBAT sugieren la posibilidad de que ambas proteínas, *in vivo*, puedan interactuar con otras subunidades (Chairoungdua et al., 1999; Pfeiffer et al., 1999a). Sin embargo, un trabajo realizado en nuestro grupo demuestra, por experimentos de co-precipitación, que b^{0,+}AT heterodimeriza exclusivamente con rBAT en membranas de "brush border" (donde se localizan *in vivo*) (Fernandez et al., 2002). Por otro lado, por inmunoprecipitaciones cuantitativas, se ha demostrado que la expresión de rBAT supera ampliamente la de b^{0,+}AT, apoyando la hipótesis de la existencia de otra subunidad ligera que pueda heterodimerizar con rBAT y que tenga un patrón de expresión similar (Fernandez et al., 2002).

4.2.6. xCT

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

La expresión de xCT y 4F2hc en oocitos de *X. laevis* induce la actividad de transporte x_c^- . Esta actividad se caracteriza por el intercambio de cistina y glutamato independiente de sodio con una estequiometría 1:1 (Bannai and Kitamura, 1980; Bassi et al., 2001; Sato et al., 1999). Esta actividad es responsable de la entrada de cistina y la salida de glutamato, debido a la baja concentración intracelular de cistina y a la elevada concentración de glutamato. La cistina, una vez que entra en la célula se reduce a cisteína y se incorpora a la síntesis de proteínas y glutatión. La actividad x_c^- tiene un papel fisiológico directo en la regulación de la concentración intracelular de glutatión reducido (GSH) (Bannai and Tateishi, 1986). La activación de macrófagos por lipopolisacáridos u otros agentes provoca un aumento en los niveles de expresión de xCT. Este incremento está modulado por la concentración de oxígeno: la hipoxia disminuye la expresión de xCT y también disminuye el contenido de glutatión (Bridges et al., 2001; Sato et al., 2001). Los autores sugieren que el transporte de cistina vía xCT es el paso limitante en la generación de glutatión, de manera que podría servir como una defensa antioxidante para los macrófagos, especialmente en las regiones de inflamación (Sato et al., 2001). Por otro lado, en la región promotora del gen se ha encontrado una región de unión de un elemento de respuesta a electrófilos (EpRE)-like que media el incremento de la transcripción de xCT en respuesta a electrófilos como el dietil maleato o cadmio (Sasaki et al., 2002). La expresión de xCT en cerebro puede contribuir al mantenimiento de los niveles de glutatión protegiendo a las células del estrés oxidativo (Sato et al., 2002).

4.2.7. asc-1

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

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

Introducción

aminoácidos, implicando a *asc-1* en la regulación y adaptación osmótica (Pineda et al., 2004a). En esta dirección, el análisis del gen de *asc-1* revela la presencia de motivos TonE (*Tonicity response Enhancers*), relacionados con el aumento de la transcripción en respuesta a situaciones de hipertonicidad (Handler and Kwon, 2001).

4.2.8. *asc-2*

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

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

4.2.9. AGT-1

AGT-1 se ha clonado a partir de una librería de cDNA de riñón de ratón por su homología con $b^{0,+}AT$ de rata. El cDNA codifica una proteína de 478 aminoácidos con un peso molecular aparente de 51 kDa, cuya secuencia es un 35-37% idéntica al resto de LSHAT y un 48% idéntica a *asc-2*. Presenta una estructura similar a las subunidades de LSHATs y conserva el residuo de cisteína (residuo 129) responsable de la interacción en otros miembros de la familia con la subunidad pesada. Se expresa en riñón y se localiza en la membrana basolateral del túbulo proximal recto, (segmento S3) y del túbulo distal. En un análisis *Western*

blot en condiciones reductoras de membranas totales de riñón de ratón, AGT-1 tiene una movilidad de 40 kDa, y en condiciones no reductoras forma parte de un complejo de 250 kDa. Esto indica que AGT-1 se une a otra/s proteína/s a través del residuo de cisteína conservado o a través de otros residuos de cisteína (Matsuo et al., 2002).

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

5. ESTRUCTURA-FUNCIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE MEMBRANA

De los genomas secuenciados hasta ahora, más del 20% de los productos génicos son o se predice que son proteínas integrales de membrana (Fleming, 2000). Los transportadores son la principal clase de proteínas integrales de membrana, y al igual que los canales, están altamente relacionados con la fisiología y con enfermedades humanas como la fibrosis quística, diabetes, resistencia a antibióticos etc., por lo que su importancia en la industria farmacéutica es enorme, constituyendo ~70% de las dianas terapéuticas (Wu and Yates, III, 2003). Sin embargo, las proteínas de membrana en general -y los transportadores de membrana en particular- son muy resistentes a la determinación de su estructura a elevada resolución debido a su hidrofobicidad. Menos del 1% de las proteínas de estructura conocida hasta ahora son proteínas integrales de membrana (Wu and Yates, III, 2003). Las estructuras de alta resolución conocidas de transportadores y canales corresponden a organismos bacterianos, fundamentalmente *E.coli* (revisado en (Dahl et al., 2004; Doyle, 2004). De estas estructuras se confirma la estructura hélice- α de los dominios transmembrana (Dahl et al., 2004), y su flexibilidad conformacional, llevando a cabo movimientos sustanciales durante el proceso de translocación (Jiang et al., 2003).

La dificultad de obtener cristales de proteínas integrales de membrana ha obligado a desarrollar estrategias bioquímicas y moleculares que dan información sobre la relación estructura-función (Kaback et al., 2001; le Coutre and Kaback, 2000; Sorgen et al., 2002). Diferentes aproximaciones bioquímicas aportan información muy valiosa a la espera de la

obtención de cristales: estudios de oligomerización, topología, interacción entre hélices, identificación y función de residuos clave, etc. La combinación de todas estas aproximaciones permite obtener una visión global de la organización estructural y funcionamiento de la proteína, y ha permitido en algunos casos crear modelos tridimensionales, como en el caso del transportador de glucosa de eritrocitos humanos GLUT1 (Hruz and Mueckler, 2001; Zuniga et al., 2001) y la lactosa permeasa de *E.coli* Lac Y (Frillingos et al., 1998; Green et al., 2000). En esta tesis se ha abordado la determinación a nivel funcional de la oligomerización de los transportadores heteroméricos de aminoácidos 4F2hc/y⁺LAT1, 4F2hc/xCT y rBAT/b⁰⁺AT, así como la identificación y caracterización de un residuo de cisteína importante en xCT, que se presenta en los capítulos de resultados y discusión.

5.1. Oligomerización de los transportadores de membrana

Las proteínas integrales de membrana, además de su papel en el transporte y transducción de señales y energía, son importantes para mantener la arquitectura de membrana, y su oligomerización es un mecanismo posible para estabilizar esta arquitectura. Desde el punto de vista estructural la mayoría de proteínas de membrana pueden formar oligómeros ya que la disposición de las proteínas en el espacio bidimensional de la membrana aumenta la probabilidad de auto-asociación.

Además del mantenimiento de la arquitectura de membrana, existen evidencias de que la oligomerización es importante en la función del propio transportador, como ocurre en la mayoría de canales iónicos. También hay evidencias que relacionan la oligomerización con el direccionamiento de la proteína desde el retículo endoplasmático hacia la membrana celular (Sitte and Freissmuth, 2003). Actualmente, aunque se ha estudiado la oligomerización de algunos transportadores, hay muy pocos de los que se conoce con exactitud la relación que existe entre la oligomerización y la función.

Con la información estructural que se tiene hasta ahora de cristales 2D de proteínas de membrana, se pueden considerar dos estados de oligomerización: El estado oligomérico primario se define como el número de monómeros que se requieren para formar un lugar de unión de sustrato y vía de translocación de sustrato a través de la membrana, pero no tiene porque ser la unidad funcional *in vivo*. El estado oligomérico secundario se define como el orden oligomérico que se encuentra *in vivo*, que podría implicar una mayor oligomerización tanto por razones de estabilidad o porque es un requerimiento obligatorio para la función. La importancia de estas distinciones del estado oligomérico se ve apoyada por evidencias que sugieren que muchos transportadores, de los cuales el primer estado oligomérico es un monómero, funcionan como transportadores activos únicamente cuando han formado dímeros o tetrámeros en la membrana (Gerchman et al., 2001; Schroers et al., 1998; Veenhoff et al., 2001; Zottola et al., 1995). Sin embargo, hay que tener en cuenta también, que la unidad estructural de una proteína de membrana no tiene que ser necesariamente la unidad funcional, ya que la auto-asociación puede ser promovida por efectos como la

exclusión por volumen y una elevada concentración de proteína en la membrana (Grasberger et al., 1986).

Recientemente, se han resuelto las estructuras cristalográficas de varios transportadores bacterianos formados por 12 hélices α TM: la lactosa permeasa LacY (Abramson et al., 2003b), el transportador de glicerol-3-fosfato GlpT (Huang et al., 2003), el transportador de drogas AcrB (Murakami et al., 2002), y el transportador de oxalato OxIT (Hirai et al., 2002). En la estructura de la lactosa permeasa y del transportador de glicerol-3-fosfato las seis primeras hélices y las seis hélices del extremo C-terminal están dispuestas en dos lóbulos seudo simétricos alrededor del poro central (Abramson et al., 2003b; Huang et al., 2003). Estos transportadores comparten un punto de simetría dentro del monómero, con el segmento TM1 opuesto al TM7, el TM2 opuesto al TM8, y el TM6 opuesto al TM12. Sin embargo, AcrB es un trímero, mientras que la lactosa permeasa y el transportador de glicerol-3-fosfato son monómeros. A partir de estas estructuras es razonable predecir que los transportadores se disponen en forma de estructura en anillo alrededor de un poro central formado por seis hélices- α TM, aunque la topología del centro hidrofóbico diferirá sustancialmente entre un transportador y otro debido a las diferencias existentes en la secuencia de aminoácidos y en la longitud de los *loops* que conectan las hélices trans-membrana.

Además del interés estructural y funcional, se ha demostrado la importancia del estado oligomérico en el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos responsables de algunas enfermedades hereditarias causadas por mutaciones en transportadores y canales. Así, en algunas de estas enfermedades se ha relacionado el estado oligomérico de la proteína con la severidad del fenotipo, como en el síndrome de Gitelman ((de Jong et al., 2003), en la diabetes insípida nefrogénica (NDI) autosómica (Kamsteeg et al., 1999), y en el síndrome *Long QT* (Demolombe et al., 1998; Kagan et al., 2000). Estas enfermedades se caracterizan por tener formas dominantes y formas recesivas. En todas ellas se ha demostrado que las proteínas responsables oligomerizan, se han encontrado mutaciones dominantes y otras recesivas, y para algunas mutaciones se ha podido correlacionar el grado de dominancia con el estado oligomérico de la proteína, su localización subcelular, y el fenotipo observado en los afectos.

Si queremos comprender como funciona una proteína de membrana es importante definir su estado oligomérico, aunque es extremadamente difícil de determinar a nivel experimental y deben tenerse en cuenta las limitaciones de los diferentes métodos utilizados. Por un lado, las técnicas que solubilizan las proteínas son muy precisas pero tienen el inconveniente de que si la estructura cuaternaria no es suficientemente estable en una solución de detergente, puede verse alterada por el ambiente no nativo (Heuberger et al., 2002). Por otro lado, los estudios funcionales no indican con exactitud la estructura oligomérica del complejo (revisado en (Veenhoff et al., 2002). En todo caso, para determinar el estado oligomérico de un transportador deben combinarse técnicas funcionales y estructurales.

A continuación se describen algunos ejemplos de transportadores de membrana en los que se ha estudiado la implicación de la oligomerización en la función del transportador, mediante aproximaciones biofísicas y funcionales.

5.1.1. Transportador de drogas EmrR:

El transportador de drogas EmrR de *E.coli*, es un transportador pequeño, de 4 hélices- α TM, que expulsa de la célula varias drogas mediante intercambio de protones, haciendo a la bacteria resistente a estas drogas (Schuldiner et al., 2001). Distintas líneas experimentales, biofísicas y bioquímicas, muestran que el estado oligomérico primario de EmrE es el dímero. En primer lugar, la unidad estructural repetitiva de la proteína nativa en cristales 2D es un dímero asimétrico (Tate et al., 2001). La comparación entre cristales 2D de unidades estructurales con o sin sustrato unido es consistente con una molécula de sustrato unida en medio del dímero asimétrico (Tate et al., 2003). Este resultado se ha corroborado a partir de la estructura 3D de EmrE con sustrato unido, obtenida recientemente mediante criomicroscopía electrónica (Ubarretxena-Belandia et al., 2003). En la estructura 3D, la cámara que une el sustrato está formada por seis hélices, y es accesible tanto desde la fase acuosa como desde la bicapa lipídica. En solubilización con detergente, el sustrato es capaz de unirse con alta afinidad, con una fracción molar de 1 molécula de sustrato por cada 2 de EmrE (Tate et al., 2001;Ubarretxena-Belandia et al., 2003). Mediante ultracentrifugación analítica y cromatografía de exclusión por tamaño de elevada resolución a partir de proteína funcional purificada en detergente, se ha demostrado que la unidad estructural es un dímero, tanto en presencia como en ausencia de sustrato. Todas estas evidencias biofísicas se apoyan con datos bioquímicos como experimentos de *cross-linking* (Soskine et al., 2002) y estudios funcionales de complementación y de inactivación de hetero-oligómeros mediante la acción de reactivos sulfhidrilo (Rotem et al., 2001;Ubarretxena-Belandia et al., 2003), que indican la presencia de dímeros de la proteína solubilizada en detergente.

El estado oligomérico secundario de EmrE *in vivo* es menos claro. Estudios de dominancia *in vitro* e *in vivo* mediante co-reconstitución en proteoliposomas de proteína salvaje en combinación con distintas proporciones de mutante inactivo, resulta en una reducción de la resistencia a drogas de manera dosis dependiente. Esta inhibición es debida a la formación de hetero-oligómeros en los que la presencia de una subunidad no funcional causa la total inactivación. El análisis binomial de estos resultados sugiere que el oligómero está compuesto por tres subunidades (Yerushalmi et al., 1996). Pero dado que el estado oligomérico primario de EmrE es un dímero, el estado más plausible *in vivo* sería entonces un tetrámero, e incluso estados oligoméricos mayores no se podrían descartar del todo. En este sentido, se han propuesto modelos de tetrámeros sobre la base de los análisis de los cristales 2D (Ubarretxena-Belandia and Tate, 2004). De hecho, en los cristales 2D analizados, EmrE siempre se empaqueta en forma de tetrámero, aunque no está claro si este tetrámero existe *in vivo* o si es una consecuencia de la cristalización (Tate et al., 2003;Ubarretxena-Belandia et al., 2003;Ubarretxena-Belandia and Tate, 2004). Recientemente, se ha conseguido la síntesis *in vitro* de EmrE completamente funcional, capaz de unir sustrato con elevada afinidad, y de transportar sustrato mediante intercambio de H⁺ después de su reconstitución en proteoliposomas. Con este sistema se ha demostrado la complementación funcional mediante la coexpresión de dos plásmidos, y con experimentos de *pull-down* se ha confirmado que la unidad funcional es el dímero (Elbaz et al., 2004). En el mismo trabajo,

experimentos de *cross-linking* entre residuos de cisteína únicos demuestran interacción adicional entre dímeros, implicando la existencia de un dímero de dímeros. Aún así, todavía queda por ver si hay un papel funcional para el tetrámero *in vivo*, o si el dímero es enteramente capaz de catalizar el eflujo de drogas.

5.1.2. Transportador de lactosa LacS:

El transporte de lactosa en *Streptococcus thermophilus* está catalizado por el transportador de membrana LacS (Poolman et al., 1989). Esta proteína, formada por 12 hélices- α trans-membrana (Pourcher et al., 1996), cataliza el transporte de galactosa y otros galactósidos en dos distintos mecanismos de transporte. El primero, mediante simporte de lactosa con protones. El segundo, mediante intercambio de galactósido con otros azúcares (galactosa/ lactosa) (Poolman et al., 1995; Veenhoff and Poolman, 1999). LacS es un miembro de la familia de transportadores de azúcares secundarios, designados como familia de transportadores galactósido-pentósido-hexurónido (GPH), y junto con el transportador de melibiosa de *E.coli* MelB, es el miembro mejor estudiado de esta familia. La subfamilia LacS difiere de los otros miembros de la familia GPH por la presencia de un dominio C-terminal que regula la actividad de transporte del dominio transportador.

La oligomerización de LacS se ha determinado en solución y en estado reconstituido usando una variedad de técnicas biofísicas y funcionales. Tanto la ultracentrifugación analítica (Friesen et al., 2000) como BN-PAGE (Heuberger et al., 2002) demuestran que la proteína solubilizada en detergente se auto-asocia de forma reversible de monómero a dímero. Además, ambos métodos demuestran que el estado oligomérico en solución puede ser manipulado mediante variación de la concentración de detergente. Estudios de microscopía electrónica (Friesen et al., 2000), y de resonancia de *spin* electrónica (ST-ESR) (Spooner et al., 2000) demuestran que la proteína está en la membrana como dímero, aunque los resultados también son consistentes con un estado trimérico. El transportador de xilosidos de *Lactobacillus pentosus* XylP, un miembro de la familia GPH que no tiene el dominio C-terminal regulador, ha sido observado como especie dimérica, sugiriendo que esta estructura cuaternaria es característica del dominio transportador (Heuberger et al., 2002). Sin embargo, el mapa de proyección de MelB no cumple con un estado dimérico, ya que la superficie de interacción entre subunidades adyacentes es relativamente pequeña, y están orientadas en conformación opuesta. Todavía queda por determinar qué estado oligomérico que se da *in vivo* en MelB.

Experimentos de dominancia mediante co-reconstitución en proteoliposomas de subunidades activas en combinación con subunidades inactivas o inactivables mediante modificación química, indican que dentro del dímero de LacS, las subunidades funcionan de manera independiente en el mecanismo de transporte mediante intercambio galactosa/ lactosa. Esto indica que cada subunidad está equipada con un lugar de unión de sustrato y una vía de translocación funcional. Sin embargo, en el mecanismo de simporte lactosa/H⁺, que comprende un paso cinético adicional (la reorientación del sitio vacío de unión de sustrato desde dentro hacia fuera), se observa cooperación entre las subunidades del

Introducción

dímero (Poolman et al., 1995). El simporte mediado por el dímero requiere que ambas subunidades del transportador se encuentren acopladas, de modo que la reorientación del sitio de unión de sustrato desde la cara externa a la cara interna de la membrana está acoplada a la reorientación opuesta del sitio de unión de sustrato en la otra subunidad. Esto implica que las dos subunidades del dímero se encuentran a la vez en una conformación opuesta (Veenhoff et al., 2001).

Estudios de accesibilidad de cisteínas y de *crosslinking* intra-molecular en LacS y en MelB, han dado lugar a un modelo de empaquetamiento de las hélices para el dominio transportador. Básicamente, este modelo consiste en un centro catalítico formado por seis segmentos trans-membrana (TMI, TMII, TMIV, TMVII, TMX y TMXI) y un anillo secundario con el resto de segmentos trans-membrana, alrededor del centro catalítico (Ding and Wilson, 2001; Veenhoff et al., 2000). También han permitido la identificación de cuatro zonas que comprenden partes de la interfaz del dímero de LacS, en la proximidad de segmentos trans-membrana (Geertsma et al., 2003). Estas cuatro regiones corresponden a los finales extracelulares de los segmentos TMV y TMVIII y a los finales intracelulares de los segmentos TMVI y TMVII.

5.1.3. Transportador de serotonina SERT:

El transportador de serotonina SERT es responsable de la acumulación de serotonina en las neuronas y células periféricas. Forma parte de la superfamilia de transportadores de neurotransmisores dependientes de Na^+ y Cl^- , que incluye los transportadores de dopamina (DAT), glicina (GLYT), ácido γ -aminobutírico (GABA), prolina, monoaminas y varios transportadores "huerfanos" entre otros (revisado en (Amara, 1996)). Los transportadores de esta superfamilia están formados por 12 hélices α TM. Las evidencias de oligomerización de SERT provienen de estudios de estimación del tamaño de la proteína mediante inactivación por radiación (Mellerup et al., 1984; Plenge et al., 1990), estudios de *cross-linking* (Jess et al., 1996), estudios funcionales de dominancia (Chang et al., 1998), estudios de co-inmunoprecipitación (Kilic and Rudnick, 2000), y estudios *in vivo* de FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) (Schmid et al., 2001).

Los estudios de *cross-linking* demuestran que SERT puede formar dímeros y tetrámeros después del tratamiento de membranas de células transfectadas con tres reactivos distintos (Jess et al., 1996). Los estudios funcionales analizan la inhibición o estimulación de la actividad tras la coexpresión de SERT con un mutante defectivo y de proteínas de fusión unidas en tándem (Chang et al., 1998). Aunque el análisis funcional indica un estado oligomérico, no se ha examinado la expresión de la proteína en la superficie celular, con lo que es difícil determinar si las diferencias de actividad son debidas o no a la oligomerización. Los estudios de co-inmunoprecipitación utilizan dos mutantes de SERT activos distintos, marcados con epítopos diferentes, uno de los cuales es sensible a inactivación en presencia de un reactivo sulfhidrilo. La co-inmunoprecipitación de ambas subunidades y los estudios funcionales en presencia y en ausencia de reactivo sulfhidrilo indican que la unidad funcional es el dímero (Kilic and Rudnick, 2000). Finalmente, los estudios *in vivo* mediante FRET

demuestran que tanto SERT como el transportador de GABA forman oligómeros *in vivo*. La oligomerización no se ve afectada significativamente por la co-incubación con sustratos o bloqueadores del transportador, por lo que la formación del oligómero no debe ser esencial en la función fisiológica de la proteína (Schmid et al., 2001). Los autores concluyen que la formación constitutiva de oligómeros debe ser una propiedad general de los neurotransmisores dependientes de Na^+ y Cl^- .

En este sentido, otros estudios mediante FRET indican que el transportador de dopamina DAT, al igual que SERT, también forma dímeros (Sorkina et al., 2003). Estudios de *cross-linking* indican que DAT es un homo-dímero, pero que puede formar trímeros y tetrámeros (Hastrup et al., 2001; Hastrup et al., 2003). Sin embargo, estudios de cromatografía de exclusión por tamaño y de sedimentación por velocidad, evidencian que GLYT2, transportador de aminoácidos de la misma familia, existe como monómero (Lopez-Corcuera et al., 1993). Asimismo, mediante BN PAGE se ha evidenciado que GLYT1 y GLYT2 localizan en la superficie celular de forma monomérica (Horiuchi et al., 2001). Aunque no se descarta la expresión de SERT en forma de monómero (no se han detectado oligómeros de SERT en tejido de cerebro nativo (Qian et al., 1995), tampoco se descarta la existencia de homodímeros de GLYT (Horiuchi et al., 2001). Es posible que, *in vivo*, existan estados transitorios de oligomerización, quizá no necesarios para la función básica de transporte, pero que sean importantes en la regulación de éste.

El hecho de que transportadores de una misma familia con estructura y función similares presenten una estructura oligomérica diferente, sugiere que la oligomerización puede estar implicada en la regulación propia de cada transportador (Torres et al., 2003). En este sentido, estudios recientes relacionan la oligomerización de SERT con el direccionamiento de la proteína desde el retículo endoplasmático a la membrana plasmática (Scholze et al., 2002; Sitte and Freissmuth, 2003).

Otras aproximaciones que apoyan la oligomerización de los neurotransmisores dependientes de Na^+ y Cl^- son los estudios de identificación de lugares de contacto entre las subunidades del oligómero. Estos han identificado una repetición de 7 leucinas en el segmento TM2 (Scholze et al., 2002; Torres et al., 2003) y un motivo de tipo glicoporfina A en el segmento TM6 (Hastrup et al., 2001). También se ha visto que los segmentos TM4 forman una interfaz simétrica en DAT (Hastrup et al., 2003). Recientemente, estudios mediante FRET han proporcionado más lugares de contacto en la mitad C-terminal, entre los TM11 y TM12, y en el extremo N-terminal entre los TM1 y TM2 que sugieren que SERT se ensambla en forma de estructura en *array* en la membrana, conteniendo multímeros de dímeros (Just et al., 2004).

5.1.4. Transportador de glucosa GLUT1:

La difusión facilitada de azúcares a través de las membranas celulares está mediada por una familia de proteínas integrales de membrana, los transportadores de glucosa. De todos ellos, el transportador de eritrocitos GLUT1 (Mueckler et al., 1985) ha sido el más extensamente estudiado con respecto a la estructura y función, mediante estudios de mutagénesis y accesibilidad de cisteínas, marcaje con reactivos sulfhidrilo, digestión con

proteasas, uso de inhibidores, anticuerpos, etc. (Hruz and Mueckler, 2001). Con esta información y el conocimiento reciente de las estructuras 3D de las proteínas de membrana OxlT (Hirai et al., 2002), GltT (Huang et al., 2003) y LacY (Abramson et al., 2003b), se ha propuesto un modelo de estructura 3D para GLUT1 (Salas-Burgos et al., 2004).

Los análisis de la oligomerización de GLUT1 (Hebert and Carruthers, 1991; Hebert and Carruthers, 1992; Zottola et al., 1995) demuestran que el transportador es un tetrámero. La reducción de GLUT1 causa la disociación del transportador en dímeros en los que cada monómero funciona independientemente a su subunidad vecina como un simple transportador y con menor velocidad catalítica (Hebert and Carruthers, 1991; Hebert and Carruthers, 1992; Zottola et al., 1995). La reducción de GLUT1 resulta en la pérdida de un puente disulfuro intramolecular entre los residuos de cisteína 347 y 421, que estabiliza la estructura oligomérica (Zottola et al., 1995). Sin embargo, estudios funcionales de GLUT1 en oocitos de *Xenopus*, indican que el mutante *cyss-less* es completamente funcional (Wellner et al., 1995), y que la proteína salvaje forma un estado insensible a la reducción, posiblemente dímérico y no tetramérico (Zottola et al., 1995). Estas observaciones establecen que la función fundamental de GLUT1 (translocación del azúcar) no requiere la oligomerización en homotetrámero, aunque interacciones cooperativas mediante los monómeros podrían modular la función. Estos resultados se ven apoyados por un estudio que sugiere que cada monómero contiene un sitio de unión de sustrato, y que la estructura oligomérica y el ATP intracelular modulan las propiedades de unión del azúcar a GLUT1 (Heard et al., 2000).

Recientemente se ha propuesto un esquema para los estados oligoméricos de GLUT1, en eritrocitos o en vesículas tratadas con o sin reductor, que combina los estados observados previamente de monómeros y oligómeros (Zuo et al., 2003): el estado nativo de GLUT1 debe ser una mezcla de monómeros, tetrámeros, y la posibilidad de estados oligoméricos mayores, en las cuales el monómero constituye aproximadamente el 40% de la cantidad total de GLUT1. Los autores proponen que los múltiples estados oligoméricos de GLUT1 deben estar relacionados con la edad del complejo proteico, y/o que deben proporcionar mecanismos para ajustar la actividad de transporte de glucosa.

5.1.5. Transportador de Na^+/H^+ NhaA:

El transportador NhaA es un intercambiador de Na^+/H^+ esencial para la homeostasis del Na^+ y H^+ en *E. coli*, que presenta una topología de 12 hélices α TM (Rothman et al., 1996). Su actividad es altamente dependiente de pH, y se conocen los residuos implicados en esta sensibilidad al pH, así como los *loops* implicados en el cambio conformacional que se requiere en esta regulación (revisado en (Padan et al., 2004)).

Existen evidencias de oligomerización con relevancia funcional en NhaA. Experimentos de gel filtración (Padan et al., 1998) y la estructura a 8Å de resolución, extraída a partir de un cristal bidimensional (el primero obtenido para un transportador de membrana) (Williams et al., 1999; Williams, 2000), indican que NhaA existe como dímero. Además, la estructura revela que la vía de translocación está contenida dentro del monómero (Williams, 2000). Estudios

funcionales bioquímicos y genéticos han tratado de resolver si la dimerización ocurre *in vivo* y de si es esencial para la función o su regulación. En estos estudios se ha analizado la complementación funcional tras co-expresión de mutantes que presentan diferentes dependencias de pH, o de mutantes letales. Los resultados pueden ser interpretados de dos formas distintas: i) la unidad funcional de NhaA es el oligómero, ii) para la función de los monómeros no se requiere interacción entre subunidades, pero es importante en su regulación por el pH. Esta segunda posibilidad está apoyada por experimentos de *crosslinking*, que además han proporcionado información inicial estructural de los lugares en los cuales la oligomerización puede regular la actividad. Estos experimentos sugieren que el *loop* VIII-IX en la cara citoplasmática de la hélice VIII está en la interfaz entre los monómeros de NhaA que forman el oligómero (Gerchman et al., 2001). Al igual que para el transportador de serotonina SERT, los resultados son compatibles con una estructura de NhaA de tipo *array* (Gerchman et al., 2001; Williams, 2000). Sin embargo, la estequiometría de NhaA en la membrana nativa no se ha podido determinar.

5.1.6. Transportadores de glutamato:

Los transportadores de glutamato son miembros de la familia de transportadores responsables del simporte dicarboxilato/aminoácido: catión (Na^+ ó H^+) (familia DAACS) (Saier, Jr., 2000). Estos transportadores acoplan el movimiento de glutamato, aspartato, algunos aminoácidos neutros, o dicarboxilatos al cotransporte de iones de sodio o de protones y al antiporte de potasio (Saier, Jr., 2000). En eucariotas, miembros de la familia DAACS juegan un papel crucial en la función del sistema nervioso central, eliminando el glutamato y aspartato de la hendidura sináptica, y son así conocidos como transportadores de aminoácidos excitatorios (EAAT) (Danbolt, 2001). Las cinco isoformas clonadas (EAAT1-5) se expresan en la membrana plasmática de neuronas y/o glía en el SNC (Arriza et al., 1994; Arriza et al., 1997; Fairman et al., 1995). Además, los transportadores de glutamato eucarióticos también presentan una actividad de canal de Cl^- que se activa con el transporte, pero está desacoplado termodinámicamente del transportador (Wadiche et al., 1995). Tanto los miembros procariontes como eucariotas de la familia DAACS comparten homología de secuencia significativa y propiedades funcionales, incluyendo el mecanismo de transporte y especificidades de sustrato. Residuos en la mitad C-terminal son cruciales para la unión, transporte del sustrato y acoplamiento de iones, mientras que residuos en la mitad N-terminal de los transportadores eucarióticos están implicados en el flujo de cloro.

Los primeros estudios para determinar la oligomerización de estos transportadores se realizaron mediante *cross-linking* en membranas de cerebro y en proteoliposomas, e indicaron que EAAT2 y EAAT1 podían formar dímeros y trímeros respectivamente (Haugeto et al., 1996). En cambio, estudios posteriores de criofractura y microscopía electrónica demostraron que el transportador EAAT3 tiene una estructura pentamérica simétrica cuando se expresa en oocitos de *X. laevis* (Eskandari et al., 2000). Aunque los datos obtenidos en este estudio no son suficientes para relacionar la estructura oligomérica con la función del transportador, los autores sugieren que cada monómero de EAAT3 es suficiente para mediar el transporte de glutamato, basándose en el comportamiento del transportador de

Na⁺/glucosa de *E. coli*, cuya unidad funcional es monomérica (Sahin-Toth et al., 1994). Asimismo sugieren que la actividad como canal de Cl⁻ podría ser una consecuencia de la oligomerización (Eskandari et al., 2000).

Posteriormente, se han realizado estudios biofísicos con los transportadores procarióticos. Estudios de *crosslinking* y de espectroscopia de masas por un lado, y de SEC-LS/UV-RI por otro, evidencian que los transportadores de glutamato GlT_{Bc} de *B. caldotenax*, y GlT_{Bs} de *B. stearothermophilus*, forman trímeros (Yernool et al., 2003). Actualmente se ha resuelto la estructura cristalográfica de un transportador de glutamato homólogo a eucariotas de *Pyrococcus horikoshii* (GlT_{Ph}), que comparte un 37% de identidad aminoacídica con el transportador de aminoácidos excitatorio humano 2 (hEAAT2). La estructura revela que el transportador es un trímero, con tres sitios de unión independientes por subunidad, sostenidos por dos *hairpins* helicoidales, que alcanzan ambos lados de la membrana. Los autores proponen que el transporte de glutamato se consigue mediante movimientos de los *hairpins*, que permiten el acceso alternado a cada lado de la membrana (Yernool et al., 2004). Estos *hairpins* corresponden a los *reentrant-loops* identificados en los estudios de topología (Grunewald et al., 1998; Grunewald et al., 2002).

5.2. Evidencias de la oligomerización de los HATs

El análisis de la oligomerización de los transportadores heteroméricos de aminoácidos surge a raíz de los estudios que analizan el mecanismo de transporte de rBAT/b⁰⁺AT. El transportador rBAT/b⁰⁺AT media el intercambio electrogénico de aminoácidos neutros y básicos con una estequiometría 1:1 (Chillaron et al., 1996). Estudios de la actividad de transporte b⁰⁺ presente en vesículas de membrana apical de intestino de pollo, donde se pueden controlar las concentraciones de sustrato dentro y fuera de la vesícula, han demostrado que el mecanismo de este transporte corresponde a un mecanismo de intercambio de aminoácidos secuencial, que implica la existencia de un complejo ternario del transportador y una molécula de sustrato a cada lado de la membrana, que se intercambian con una estequiometría de 1:1, y se ajusta a los datos predichos para un modelo matemático que simula este mecanismo (Torras-Llort et al., 2001). En este trabajo se ha determinado que la afinidad del transportador por un mismo sustrato es distinta según si éste se une por dentro o por fuera de la membrana. Así, la K_m para arginina desde fuera es de 8,5±0,3 μM, mientras que si ésta se une por dentro lo hace con una k_m de 177±10 μM. Resultados de reconstitución de la actividad b⁰⁺ en proteoliposomas indican también que las constantes de afinidad para el aminoácido extracelular (rango μM) son mucho mayores que para el sustrato intracelular (rango mM) (Reig et al., 2002). Esta asimetría permite sugerir que el mecanismo secuencial puede ser además ordenado: primero se une el sustrato por el lado exterior, después se une el de dentro, y una vez formado el complejo ternario, se da la translocación de los sustratos. Un modelo similar ha sido propuesto para el transportador mitocondrial aspartato/glutamato (Dierks and Kramer, 1988). De todas formas, la afinidad de dentro no es lo suficientemente baja como para descartar un mecanismo secuencial aleatorio con un modo preferente.

El hecho que el transportador funcione por un mecanismo que implica la formación de un complejo ternario indica que tiene que haber dos lugares distintos de unión de sustrato, uno a cada lado de la membrana, y permite sugerir que en la unidad funcional del transportador existen dos vías de translocación por donde pasan los sustratos en ambas direcciones. Este mecanismo sugiere que la unidad funcional de rBAT/b^{0,+}AT puede ser un dímero de heterodímeros (rBAT/b^{0,+}AT)₂, en el que cada heterodímero contiene una vía de translocación. Evidencias biofísicas y bioquímicas indirectas apoyan esta hipótesis: i) los análisis de Western blot realizados en condiciones no reductoras de muestras provenientes de células transfectadas o membranas “brush border”, siempre detectan rBAT y b^{0,+}AT como dos complejos de 130 y 250 kDa (Fernandez et al., 2002); ii) en condiciones reductoras, b^{0,+}AT se detecta como una banda de 38 kDa y como otra banda de 82 kDa, que podría ser un dímero de la anterior (Fernandez et al., 2002); iii) cuando rBAT se sobreexpresa en oocitos de *X. laevis* (Wang and Tate, 1995), los análisis de Western blot realizados en condiciones no reductoras detectan, además del complejo de 130 kDa formado junto a b^{0,+}AT endógeno, complejos de 180-200 kDa. Los autores sugieren que debido a la sobreexpresión de rBAT, estos complejos pueden ser homodímeros de rBAT que no se detectan en membranas “brush border” (Wang and Tate, 1995); iv) existe un dominio de cremallera de leucina en el extremo C-terminal de rBAT, que no se conserva en 4F2hc, que podría estar implicado en la interacción con otra proteína, bien con otra molécula de rBAT, bien con otra proteína extracelular (Bertran et al., 1992a; Wells and Hediger, 1992), v) el análogo aminoisobutirato (AIB) induce un intercambio desigual con otros sustratos a través del sistema b^{0,+} en oocitos inyectados con rBAT (con subunidad b^{0,+}AT endógena (Coady et al., 1996); y vi) el análisis funcional del mutante R365W en rBAT muestra un defecto en el eflujo de arginina pero no en su influjo (Pineda et al., 2004b).

El estudio de la oligomerización de los HATs se inicia en la tesis de la Dra. Esperanza Fernández mediante la aplicación de técnicas biofísicas. En esta tesis se aborda la relación existente entre la oligomerización y la función del transportador, y se apoya en los resultados obtenidos por aproximación biofísica. En conjunto, se trata del primer trabajo que proporciona información sobre la oligomerización de los transportadores heteroméricos de aminoácidos. La relación entre esta estructura y la función de transporte se presentan en los capítulos de resultados y discusión de esta tesis.

5.3. Localización de residuos clave en los transportadores de membrana

En ausencia de una estructura tridimensional, identificar los residuos clave en los transportadores de membrana, como los que forman parte del sitio de unión o vía de translocación de sustrato se ha convertido en un reto particularmente acuciante. La vía de translocación de sustrato se define como el conjunto de residuos que son accesibles desde ambos lados de la membrana ya que el sitio de unión de sustrato está alternativamente expuesto en cada cara de la membrana durante el transcurso de un ciclo completo de transporte (Yan and Maloney, 1993). En los transportadores de membrana, el sitio de unión de sustrato es intrínscico a la vía de translocación, en lugar de ser un dominio separado, como

Introducción

ocurre en los canales. La vía de translocación se localiza dentro del manojito de segmentos trans-membrana tal y como se ha descrito para la lactosa permeasa *LacY* de *E.coli* (Abramson et al., 2003a; Kaback et al., 2001). Así pues, los residuos que forman parte de la vía de translocación en un transportador de membrana incluyen aquellos directamente implicados en el reconocimiento del sustrato. En presencia de sustrato, estos residuos se encuentran en íntimo contacto con el sustrato, y son así protegidos de modificación química. Sin embargo, la unión de sustrato no debería proteger al resto de residuos, a no ser que sean sensibles a cambios conformacionales ocasionados por la translocación del sustrato. Además estos residuos deberán ser determinantes de las características cinéticas y de la especificidad de sustrato de los transportadores.

Existen distintas estrategias para determinar residuos o zonas catalíticas importantes, que implican mutagénesis del transportador, como la construcción de quimeras, las deleciones de dominios, o los mutantes de residuos individuales. Estas estrategias tienen el riesgo de que un mutante inactivo corresponda a una proteína no correctamente plegada. Una alternativa es utilizar reactivos específicos de cisteínas y analizar la función del transportador antes y después de su modificación.

Muchos transportadores de membrana contienen cisteínas con grupos SH reactivos. Examinando las reactividades a distintos reactivos sulfhidrilo permeables o impermeables, y analizando el efecto en la función de la proteína, se puede obtener información acerca de la localización de residuos importantes de cisteína en la proteína, para la función y estructura. En ciertos casos, se puede obtener información acerca del lugar de unión de sustrato o del papel que juega la cisteína en el mecanismo de transporte. Otra estrategia muy útil es introducir cisteínas individuales en distintas posiciones de la proteína de estudio y testar la accesibilidad de estas cisteínas utilizando los reactivos sulfhidrilo (Seal et al., 1998). Esta aproximación, aplicada a los segmentos trans-membrana de los canales iónicos y de las proteínas de transporte, es conocida como SCAM (*Substituted Cysteines Accessibility Method*), y fue desarrollada inicialmente por Akabas (revisado en (Karlin and Akabas, 1998)). Esta técnica es quizás la más ampliamente utilizada y ha sido aplicada por la Dra. Emma Gasol en nuestro grupo para el estudio de la topología de la subunidad ligera xCT (Gasol et al., 2004). Se encuentran numerosos ejemplos de su aplicación en receptores, como el de la acetilcolina (Akabas et al., 1992); canales, como el de potasio (Pascual et al., 1995); y transportadores, como el de glutamato GLT-1 (Grunewald et al., 1998).

En las proteínas, la reactividad de los grupos SH de las cisteínas (que en la mayoría de reacciones actúan como iones RS^-) depende de su valor de pK_a , que puede variar ampliamente según su localización en la estructura de la proteína. Cisteínas que están enterradas o enmascaradas dentro de la proteína en un entorno hidrofóbico y que no tienen contacto con el solvente tienen valores de pK_a más elevados que cisteínas en la superficie exterior acuosa de la proteína. Otro factor importante es la influencia electrostática de los grupos vecinos cargados eléctricamente. Un grupo cargado positivamente en las proximidades de una cisteína disminuye su pK_a , mientras que un grupo cargado negativamente aumenta su pK_a (van Iwaarden et al., 1992).

Existen distintos grupos de reactivos sulfhidrilo en función de su mecanismo de reacción con el grupo SH de las cisteínas (maleimidadas, organomercuriales, metanotiosulfonatos (MTS), etc). De entre todos ellos, los MTS son absolutamente específicos, es decir, no reaccionan con ningún otro grupo más que cisteínas en las proteínas. Los componentes organomercuriales, tienen gran especificidad, mientras que otros tienen sólo especificidad relativa, ya que también reaccionan con otros grupos funcionales en las proteínas. Sin embargo, si se escogen las condiciones apropiadas de reacción se puede conseguir casi siempre la modificación selectiva de cisteínas. Además, los reactivos sulfhidrilo han sido ampliamente utilizados como bloqueadores, marcadores, y en técnicas de *cross-linking* en la modificación química de proteínas.

Según si los residuos de cisteína son accesibles a reactivos sulfhidrilo impermeables (polares), o permeables (apolares), se pueden clasificar en accesibles desde fuera, accesibles desde dentro, o accesibles desde las dos caras de la membrana (Yan and Maloney, 1993; Yan and Maloney, 1995). Y según el efecto del reactivo sulfhidrilo sobre la función de la proteína se distinguen cisteínas insensibles, y cisteínas sensibles, siendo estas últimas protegibles o no por la unión directa del sustrato o por los cambios conformacionales ocasionados en la translocación del sustrato. Según sus características cinéticas se les ha podido asociar diversas funciones, como formar parte del sitio de unión o de la vía de translocación de sustrato.

En la tabla 5 se listan distintos transportadores de membrana en los que se ha estudiado el papel de residuos endógenos de cisteína. Se han encontrado cisteínas clave en la función y estructura del transportador en todas las localizaciones, tanto extracelulares, como transmembrana como citoplasmáticas. A continuación se detallan dos ejemplos, en el transportador de Serotonina SERT, y en el transportador de GABA de *E.coli* GabP.

5.3.1. Transportador de serotonina SERT:

Varios trabajos con transportadores de la superfamilia de transportadores de neurotransmisores dependientes de Na^+ y Cl^- , que como se ha dicho anteriormente incluye los transportadores de serotonina (SERT), dopamina (DAT), y glicina (GLYT), entre otros, han identificado cisteínas endógenas de predicción intracelular como determinantes de la sensibilidad a reactivos sulfhidrilo. En DAT, C135, situada en el primer *loop* intracelular (IL1), y C342 situada en el tercer *loop* intracelular (IL3), confieren sensibilidad a reactivos de cisteína (Ferrer and Javitch, 1998). En SERT, C357 (equivalente a C342 en DAT) presenta accesibilidad limitada a reactivos sulfhidrilo, que varía con la conformación del transportador y presencia de iones (como el K^+ , que aumenta la reactividad de C357) (Androutsellis-Theotokis et al., 2001). La protección de la modificación de C357 por sustrato, requiere Na^+ y se bloquea a baja temperatura. Una vez inactivado el transportador mediante la acción del reactivo sulfhidrilo, no es reactivable, sugiriendo que o bien el reactivo bloquea una vía de acceso a C357, o bien que la modificación induce un cambio conformacional que esconde la C357. Así, C357, y por extensión, el tercer *loop* intracelular, están localizados en una parte flexible del transportador, sensible a cambios conformacionales que siguen a la unión de ligando e

Introducción

iones. Los cambios conformacionales son pasos clave en el ciclo de transporte (Androutsellis-Theotokis et al., 2001; Androutsellis-Theotokis and Rudnick, 2002; Chen and Rudnick, 2000; Stephan et al., 1997) y la accesibilidad variable de residuos como C357 sugiere su participación en esos cambios.

Otra cisteína endógena de SERT, C109, la única localizada en la cara extracelular de SERT, es accesible a reactivos MTS en presencia de Li^+ pero no en presencia de Na^+ (Chen et al., 1997). Esto sugiere que la unión de Li^+ cambia la estructura de SERT de forma que C109 queda expuesta al ambiente acuoso. Algunas mutaciones el segmento TM7 de SERT tienen un efecto similar al Li^+ en la reactividad de C109, estimulando o disminuyendo su reactividad en presencia o no de Li^+ Na^+ y NMDG (Kamdar et al., 2001). Así pues, el segmento TM7 parece mediar algunos de los cambios conformacionales que ocurren cuando el Na^+ o Li^+ se unen al transportador.

Transportador	Localización	Función asociada	Referencia
LacY	C148 (TM5)	Unión/vía transloc	(Jung et al., 1994; Mitaku et al., 1984)
P_i/H^+	C42	Lys-41 y Arg-43 ↑reactividad NEM	(Ligeti and Fonyo, 1989)
UhpT	C265 (TM7)	vía transloc	(Yan and Maloney, 1993; Yan and Maloney, 1995)
GLUT1	C421 (TM8)	Estabiliza estruc. (unión inhibidor)	(Wellner et al., 1992)
EmrE	C41 (TM2), C95 (TM4)	Unión /vía transloc	(Lebendiker and Schuldiner, 1996)
GabP	C300 (TM8) (cysteine signature, CAR)	Unión/vía transloc	(Hu and King, 1998b)
NaDC-1	C227 (TM5), C476 (TM9)	vía transloc	(Pajor et al., 1999)
CTP	C192 (TM4)	Unión/vía transloc	(Xu et al., 2000)
CreaT	C144 (TM3)	Unión/vía transloc	(Dodd and Christie, 2001)
rENT2	C140 (TM4)	Unión/vía transloc	(Yao et al., 2001)
SERT	C357(IL3)	Sensible conform (unión iones y ligando)	(Androutsellis-Theotokis et al., 2001)
	C109(EL1)	Sensible conform (unión Li^+)	(Kamdar et al., 2001)
CAC	C136(IL2)	unión/vía transloc	(Indiveri et al., 2002)
GlpT	C176 (TM5)	vía transloc	(Fann et al., 2003)

Tabla 5 Ejemplos de la implicación de grupos SH de cisteínas endógenas en varios transportadores de membrana. El nombre de cada transportador se encuentra en la lista de abreviaturas.

5.3.2. Transportador de GABA GabP:

En el transportador de GABA de *E.coli* GabP, se ha identificado una cisteína endógena (C300), situada en el segmento TM 8, como diana de inactivación del transportador por reactivos sulfhidrilo. La reactividad del residuo ante estos agentes depende de su estructura: reactivos cargados o voluminosos, que no se parecen a los sustratos transportados, no producen modificaciones en el transportador (Hu and King, 1999).

La hélice 8 (donde se predice que se localiza C300) y el *loop* citoplasmático contiguo de GabP contiene la región CAR (*Consensus Amphipatic Region*), descrita en una multitud de transportadores y que incluye los numerosos homólogos de GabP (Hu and King, 1998a) y los transportadores catiónicos de ratón (MCAT) (Closs et al., 1993), que forman parte de la superfamilia APC, igual que los HATs. En GabP, se ha sugerido que la región CAR podría estar implicada en la translocación del sustrato, debido a que contiene un conjunto de cisteínas, entre las que se encuentra C300, que afectan la velocidad de los cambios conformacionales asociados a dicha translocación (Hu and King, 1998b). Se ha demostrado que la mutación de residuos en la cara polar de un total de 20 aminoácidos del CAR (exactamente el número necesario para atravesar la membrana) es altamente deletéreo para la función del transportador. Estos residuos definen una zona llamada SPS (*Sensitive Polar Surface*), de característica anfipática (Hu and King, 1998a). Dado que los segmentos anfipáticos parecen capaces de hacer movimientos transitorios dentro y fuera de la membrana (Qiu et al., 1994; Slatin et al., 1994), la región CAR podría estar implicada en un mecanismo de catálisis de "barrera móvil" (Henderson, 1991). Los estudios en GabP sitúan el conjunto de cisteínas en el segmento TM 8 (Hu and King, 1998b) y la zona SPS en el espacio citosólico. Esta disposición es diferente a la propuesta por los alineamientos múltiples o a la asumida para las proteínas MCAT, donde se incluye en el *loop* que conecta los TMs 8 y 9 (Closs et al., 1993; Closs et al., 1997).

5.4. Localización de residuos clave en los HATs

5.4.1. Subunidades pesadas

Tres estudios analizan el efecto de deleciones C-terminales en rBAT y 4F2hc (Broer et al., 2001; Deora et al., 1998; Miyamoto et al., 1996). Los dos primeros se realizaron antes de la identificación de las LSHATs mediante la expresión de la subunidad rBAT en oocitos, que junto a la subunidad ligera endógena, induce transporte de aminoácidos. La deleción ($\Delta 511-685$) en rBAT humano, que elimina la última hélice- α putativa del *TIM-barrel*, el dominio C, y el extremo C-terminal (figuras 3 y 5), provoca una disminución de la actividad de transporte. Las características del transporte son parecidas a la del sistema y^+L inducida por 4F2hc. Deleciones C-terminales mayores en rBAT no inducen actividad de transporte en oocitos (Miyamoto et al., 1996). Esto sugiere que el dominio C-terminal de rBAT es relevante para la interacción con LSHATs endógenas, tanto del tipo $b^0,+AT$ como del tipo y^+LAT .

Deleciones pequeñas en rBAT de rata ($\Delta 658-683$, cola C-terminal, y $\Delta 615-683$, últimas cuatro láminas β putativas del dominio C y cola C-terminal, figura 5) y deleciones más grandes, ($\Delta 566-683$, dominio C, y $\Delta 508-683$, desde la última hélice- α putativa del *TIM-barrel*) eliminan la actividad de transporte. En cambio, una deleción de tamaño intermedio ($\Delta 588-683$, seis últimas láminas β putativas del dominio B) induce la misma actividad de transporte que rBAT salvaje. No hay ninguna razón obvia para la discrepancia entre la inducción de transporte de los mutantes $\Delta 508-683$ en rBAT de rata (Deora et al., 1998) y $\Delta 511-685$ en rBAT de humano (Miyamoto et al., 1996).

Introducción

Deora y colaboradores estudiaron más en profundidad el mutante $\Delta 508-683$. El residuo de cisteína 111 (numeración rBAT de rata), forma parte del puente disulfuro con la subunidad ligera correspondiente. Cuando se muta este residuo a serina (C111S), la proteína conserva un 70% de actividad respecto a la proteína salvaje. En cambio, cuando se introduce el cambio C111S en el mutante $\Delta 508-683$ se pierde completamente la actividad. Estos resultados sugieren: i) la formación del puente disulfuro no es necesario para la función; ii) cuando falta C111 el mutante $\Delta 508-683/C111S$ no puede formar un complejo estable con la subunidad ligera endógena. Así, en ausencia del puente disulfuro, la integridad del dominio C y la cola C-terminal es necesaria para un complejo de transporte funcional; y iii) el extremo C-terminal mantiene a rBAT en una conformación activa, proporcionando tal vez los lugares de interacción con otras regiones de rBAT o con la subunidad ligera.

Estos experimentos con versiones delecionadas de rBAT también se pueden interpretar como resultado de las interacciones con distintas subunidades ligeras endógenas del oocito, dependiendo de la deleción C-terminal. En este sentido, Peter y colaboradores (Peter et al., 2000) han analizado las mutaciones de las tres cisteínas conservadas del extremo C-terminal de rBAT de rata (C664, C671 y C683): la sustitución de C664 por alanina elimina la interacción funcional de rBAT con la subunidad endógena $b^{0+}AT$, y causa la interacción funcional con una subunidad endógena $\gamma+LAT1$.

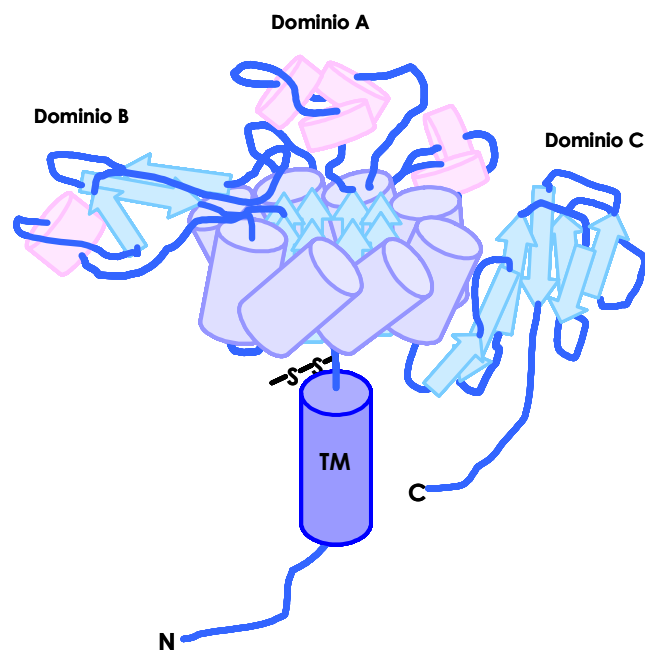


Figura 5 Representación del dominio extracelular con homología a glucosidasas de rBAT. El dominio A está compuesto por 8 cadenas α y β alternadas, formando un TIM-barrel. El dominio B es más pequeño y sobresale entre la tercera lámina β y hélice α del dominio A. El dominio C constituye el extremo C-terminal y presenta una estructura en 8 láminas β antiparalelas. El esquema está basado en los resultados del modelaje molecular obtenidos a partir de los alineamientos de secuencia (R. Roca, estudios computacionales)(Chillaron et al., 2001). Actualmente se ha resuelto la estructura cristalográfica del dominio extracelular de 4F2hc, que es compatible, en general, con este modelo (J. Fort, I. Fita y M. Palacín, en preparación). S-S representa el puente disulfuro con la subunidad ligera.

Los estudios de deleciones C-terminales con 4F2hc (Broer et al., 2001) sugieren que 4F2hc tiene distintos lugares de interacción para asociarse con las cadenas ligeras LAT-1, LAT-2 o $\gamma+LAT-2$. La asociación de estas subunidades ligeras requiere distintos dominios. El reconocimiento funcional de LAT-2 y $\gamma+LAT-2$ requiere el dominio extracelular completo de 4F2hc. En cambio, la inducción de sistema L por LAT-1 y su tráfico hacia la membrana

únicamente requiere la cola N-terminal, el dominio TM de 4F2hc, y 30 residuos de aminoácidos extracelulares, incluyendo la cisteína responsable del puente disulfuro y la primera lámina β del dominio A. Los defectos más severos en el reconocimiento de LAT-1 ocurren cuando se eliminan los últimos 70 aminoácidos (la delección más corta estudiada, que elimina las últimas 6 láminas β del dominio C y la cola C-terminal. En estos estudios, todas las formas truncadas de 4F2hc retrasan el tráfico de LAT-1 a la membrana plasmática, que se ve más severamente afectado con delecciones que implican parte del dominio extracelular *glucosidase-like* que cuando se elimina éste completamente. Algunas delecciones cortas del extremo C-terminal resultan en grandes agregados que deben ser los responsables de este defecto de tráfico tan severo. Esto recuerda el estudio con las versiones truncadas de rBAT: la actividad que se pierde cuando se eliminan pequeñas partes del dominio C-terminal de la cadena pesada puede ser recuperada por delecciones C-terminales mayores. Esto sugiere que el extremo C-terminal de las subunidades pesadas juega un papel en el plegamiento correcto y/o en su interacción con la correspondiente subunidad ligera.

Además de la función de transporte, 4F2hc se ha relacionado con la función de regulación de integrinas. Fenczik y colaboradores (Fenczik et al., 2001) han examinado qué dominios juegan un papel en la actividad de transporte y en la regulación de la función de integrinas. Mediante quimeras de 4F2hc y la proteína trans-membrana de tipo II CD69, muestran que el extremo N-terminal y el dominio TM de 4F2hc se requieren para sus efectos en la función integrina, mientras que el dominio extracelular *glucosidase-like* se requiere para la estimulación de la actividad de transporte de LAT-1. Este estudio, junto con el de Bröer y colaboradores, apunta hacia varias interacciones entre 4F2hc y LAT-1 en el dominio N-terminal, en el dominio TM, y en el dominio extracelular *glucosidase-like*. Así, la cola N-terminal y el dominio TM son suficientes para la interacción funcional entre 4F2hc y LAT-1, pero la sustitución del dominio extracelular por otro impide esta interacción funcional. Actualmente, se ha cristalizado y resuelto el dominio extracelular (soluble) de 4F2hc (J. Fort, I. Fita y M. Palacín, en preparación).

La función más evidente para la subunidad pesada en el transporte de aminoácidos es ayudar a la subunidad ligera a llegar a la membrana (Chillaron et al., 2001). De acuerdo con esta idea, el análisis de mutaciones en rBAT que causan cistinuria demuestran (M467T, M467K, (Chillaron et al., 1997) y R365W (Pineda et al., 2004b)) o sugieren (T216M, S217R, (Saadi et al., 1998)) un defecto de tráfico. Sin embargo, como se ha explicado anteriormente, una de estas mutaciones puede modificar las características de transporte del sistema $b^{0,+}$ (R365W, (Pineda et al., 2004b)). Hasta el momento, todas las mutaciones de cambio de sentido encontradas en rBAT en pacientes cistinúricos localizan en el dominio extracelular *glucosidase-like*, de acuerdo con su papel propuesto en el transporte de aminoácidos.

5.4.2. Subunidades ligeras

Puesto que los estudios de reconstitución con la subunidad ligera $b^{0,+}AT$ han demostrado que la subunidad pesada rBAT no es necesaria para la función de transporte básica (Reig et al., 2002), los determinantes funcionales más relevantes deben encontrarse en las subunidades ligeras. Los estudios de estructura-función de las subunidades ligeras son escasos y están basados fundamentalmente en el estudio de mutaciones causantes de cistinuria, en $b^{0,+}AT$, y de lisinuria con intolerancia proteica, en $y^{+}LAT-1$.

Hasta el momento, las mutaciones puntuales de cistinuria descritas en $b^{0,+}AT$ implican residuos localizados en segmentos trans-membrana putativos o en *loops* intracelulares putativos (Chillaron et al., 2001). ninguna de las mutaciones se encuentra en un *loop* extracelular putativo. Lo mismo ocurre con las mutaciones de cambio de sentido de LPI. Del mismo modo en otros transportadores de la superfamilia APC, como PotE (Kashiwagi et al., 1997;Kashiwagi et al., 2000) o de otras familias, como el transportador de la lactosa (Kaback, 1987;Poolman et al., 1992) o el de la tetraciclina (Yamaguchi et al., 1992), los aminoácidos más relevantes funcionalmente se encuentran en los dominios citosólicos de la proteína. Esta asimetría ha sido interpretada por Kashiwagi y colaboradores (Kashiwagi et al., 2000) como la base estructural para proporcionar una respuesta rápida del transportador a cualquier cambio en las concentraciones celulares de los sustratos.

Como se ha explicado anteriormente en esta introducción, mutaciones de cambio de sentido descritas en $b^{0,+}AT$ y $y^{+}LAT1$, han sido analizadas funcionalmente en células HeLa en (Font et al., 2001) o reconstituidas en proteoliposomas (Reig et al., 2002) en el caso de $b^{0,+}AT$, o en oocitos de *Xenopus* (Mykkanen et al., 2000) o en líneas celulares humanas (Toivonen et al., 2002), en el caso de $y^{+}LAT-1$. En $b^{0,+}AT$ Los efectos sobre la inducción de transporte varían según la mutación, desde una caída total de la actividad (V170M, A354T, G105R, R333W) a caídas parciales ~50% (A70V, A182T). Excepto A354T, que se ha demostrado que es una mutación que inactiva el transportador, y A182T, que provoca un defecto de tráfico (Reig et al., 2002), todavía está por determinar si el resto de mutaciones provocan un defecto de tráfico o una inactivación del transportador. De las mutaciones puntuales descritas en LPI, G54V (en el segmento TM1 putativo) y L334R (en el cuarto *loop* intracelular putativo), llegan a la membrana de oocitos inyectados con su cRNA, pero no inducen actividad de transporte (Mykkanen et al., 2000). El mismo efecto se ha observado en dos líneas celulares humanas diferentes (Toivonen et al., 2002). Estas dos mutaciones, por tanto, inactivan la función del transportador $y^{+}LAT-1$.

Del análisis de la correlación genotipo-fenotipo con las mutaciones en $b^{0,+}AT$, y $y^{+}LAT-1$ se pueden extraer algunas conclusiones (Font et al., 2001): i) las mutaciones de $b^{0,+}AT$ y $y^{+}LAT-1$ que afectan a residuos conservados dentro de la familia de las LSHATs, resultan en defectos severos en el transporte de aminoácidos o en fenotipos de excreción urinaria severos en los heterocigotos; mientras mutaciones en residuos no conservados están asociados con fenotipos leves; ii) cuatro mutaciones asociadas a fenotipos severos descritas en $b^{0,+}AT$ o $y^{+}LAT-1$ se encuentran en segmentos trans-membrana putativos y corresponden a aminoácidos con cadenas laterales pequeñas (glicina, alanina o serina) en todos los

miembros LSHAT; mientras otras mutaciones también situadas en TMs putativos pero con aminoácidos de cadenas laterales de tamaño variable, están asociadas a fenotipos leves. Además de estas mutaciones en $b^{0,+}AT$ y $y^{+}LAT-1$, Boado y colaboradores han publicado recientemente un cambio natural interespecífico (W234L) en LAT-1, que modifica ligeramente la K_m (Boado et al., 2003).

Se ha señalado la relevancia del tamaño pequeño en las cadenas laterales (glicina, alanina o serina) en las regiones de contacto entre hélices- α . Residuos altamente conservados con cadenas laterales pequeñas (glicina o alanina) están presentes en las zonas de contacto de las hélices- α de los segmentos TM de la proteína aquaporina-I (AQP-1) (Murata et al., 2000). Además, se ha descrito el motivo GlyxxxGly (donde x corresponde a cualquier residuo y Gly puede sustituirse por Ser) como dominio de auto-asociación entre hélices- α TM (Russ and Engelman, 2000). En este sentido, las hélices 3 y 6 de la proteína AQP-1 contienen este motivo (donde Gly puede sustituirse por Ala). Del mismo modo, se han encontrado motivos SmxxxSm (donde Sm corresponde a residuos de cadena lateral pequeña, ya sea Gly, Ala o Ser) en los TMs 1, 6, 7 y 8 de los miembros de la familia LSHAT (Chillaron et al., 2001). Las mutaciones G259R en $b^{0,+}AT$ y G54V en $y^{+}LAT-1$ implican estos motivos SmxxxSm de asociación hélice-hélice en los TM7 y TM1, respectivamente. La mutación G259R está asociada a un fenotipo urinario severo en heterocigotos; y G54V, como se ha comentado anteriormente, está asociada a un fenotipo con pérdida de actividad severa (Mykkanen et al., 2000). Esto sugiere que los residuos con cadenas laterales pequeñas, que están conservados en los TMs de los transportadores LSHATs, pueden estar implicados en las asociaciones hélice-hélice.

Se ha propuesto un modelo para los lugares de unión de sustrato de las subunidades ligeras (Kanai and Endou, 2001) (Figura 6). Basándose en comparaciones de varios compuestos relacionados con la fenilalanina, como la tirosina, la L-dopa y el 3-O-metildopa, se sugiere que la hidrofobicidad de las cadenas laterales de los aminoácidos sustratos es un determinante importante de la interacción al lugar de unión del transportador LAT-1. El reconocimiento del sustrato por parte de LAT-1 parece recaer en la interacción hidrofóbica entre la cadena lateral del aminoácido sustrato y el punto de unión del transportador y, además, en el reconocimiento de las cargas positivas y negativas alrededor del carbono α (grupos α -amino y α -carboxi) (Kanai and Endou, 2001).

Existen muchas variaciones posibles para las cadenas laterales que cumplen estos requerimientos, lo que explicaría por qué LAT-1, y los relacionados estructuralmente LAT-2 y asc-1, exhiben un amplio espectro de selectividad de sustratos. Para el transportador $y^{+}LAT-1$, se ha propuesto que para el reconocimiento del sustrato de cadena lateral neutra se requiere una carga positiva aportada por la cadena lateral de los sustratos básicos o bien por un catión inorgánico monovalente, como el Na^{+} o el H^{+} (Kanai et al., 2000).

En la Figura 6 el lugar de unión de $y^{+}LAT-1$ es compatible básicamente con aminoácidos cargados positivamente. Con la ayuda de cationes inorgánicos (H^{+} , Na^{+} o Li^{+}) puede aceptar aminoácidos neutros (Kanai et al., 2000). Para xCT, se propone un reconocimiento por carga negativa, con un lugar de unión formado posiblemente por aminoácidos cargados positivamente para interactuar con las cargas negativas de las cadenas

laterales de sus sustratos. La longitud de la cadena lateral del sustrato, es decir, la distancia del carbono α y la carga negativa en la cadena lateral, constituiría un determinante importante en la aceptación del sustrato por xCT, ya que los residuos del punto de reconocimiento estarían situados a una distancia determinada. Esto explicaría que el glutamato y el homocisteato sean buenos sustratos de xCT, mientras el aspartato no lo sea. En cuanto a la cistina (con carga negativa neta), la distancia entre los dos grupos carboxilo debe ser la adecuada para ser reconocida como un anión y transportada por xCT. Precisamente la distancia entre el carbono- α y la carga positiva en el caso de γ^+ LAT-1 también sería el limitador principal de su espectro de sustratos. Sin embargo, el lugar de reconocimiento de rBAT-b⁰.+AT parece basarse en un principio diferente, ya que presenta un espectro relativamente amplio de aminoácidos neutros transportados, además de los básicos, sin requerir la presencia de cationes inorgánicos.

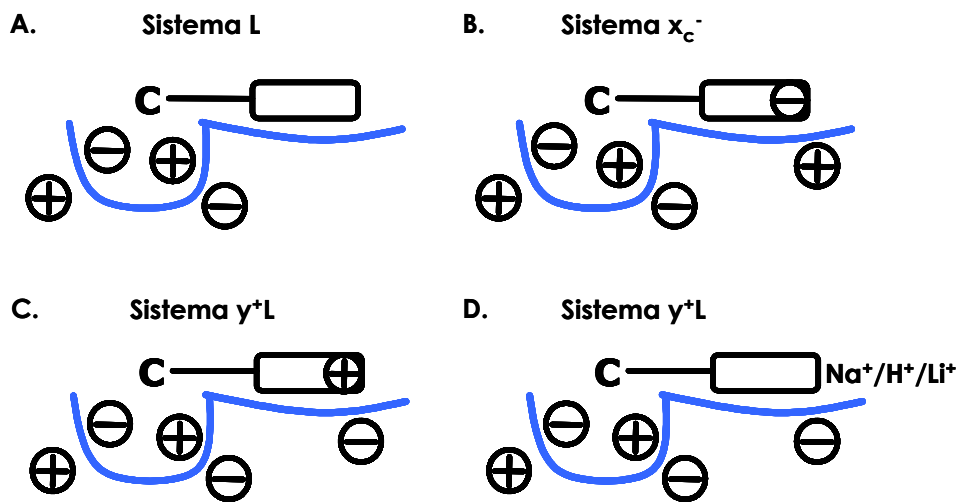


Figura 6 Modelos propuestos para el lugar de unión del sustrato. El reconocimiento del sustrato propuesto por los transportadores de la familia HAT responsables del sistema L (A), sistema x_c^- (B) y sistema y^+L (C para aminoácidos básicos, D para aminoácidos neutros) está compuesto por dos lugares de unión: uno para el grupo cargado α -amino o α -carboxilo (indicado con los símbolos + y - cercanos al carbono- α "C"), y otro para la unión de la cadena lateral del aminoácido sustrato (indicado por el rectángulo unido por una línea). La interacción hidrofóbica entre la cadena lateral y el lugar de reconocimiento son importantes para la especificidad de LAT-1 (A). Se propone que el lugar de unión de xCT con la cadena lateral está equipado para aceptar cargas negativas. El de y^+LAT1 , equipado para aceptar cargas positivas. Los residuos presuntamente implicados en la unión al sustrato están indicados con símbolos + y -. Adaptado de (Kanai and Endou, 2001).

I. Análisis Mutacional en Cistinuria

11. Identificar nuevas mutaciones en el gen *SLC3A1* en las familias cistinúricas de la base de datos del "Internacional Cystinuria Consortium".
12. Esclarecer la correlación genotipo-fenotipo, con especial atención en las familias con cistinuria de tipo mixto.

II. Estudios de Relación Estructura-Función en los HATS

13. Determinar la unidad funcional mínima en el estado oligomérico de los HATS
14. Caracterizar funcionalmente la cisteína 327 de xCT

1. ANÁLISIS MUTACIONAL EN CISTINURIA

Hasta el inicio de esta tesis, todos los estudios publicados de mutaciones en el gen *SLC3A1* (rBAT) constaban de un número pequeño de muestras. Datos previos sobre la frecuencia de 21 mutaciones distintas en *SLC3A1* en nuestra población de cistinuria (base de datos del "Internacional Cystinuria Consortium", ICC) indicaban que aproximadamente el 57,4% del total de cromosomas de tipo I se explicaban por mutaciones en *SLC3A1* (Bisceglia et al., 1996). En cuanto a los pacientes cistinúricos no tipados (por falta de los valores de excreción fenotípica urinaria de sus familiares o por datos dudosos, ver clasificación de los pacientes en Materiales y Métodos) todavía era menor el porcentaje de alelos explicados. El número de alelos que quedaban por explicar, dejaba abierta la posibilidad de la existencia de otro u otros genes responsables de esta enfermedad. También quedaban por resolver los casos de pacientes con cistinuria de tipo mixto, que heredan un alelo de tipo I y otro alelo de tipo no-I, y que podrían significar casos de digenia.

Para resolver estas cuestiones primero colaboré con los Drs. Jesús Purroy y Luigi Bisceglia en el análisis de mutaciones en *SLC3A1* en una muestra de 20 pacientes de cistinuria, que resultó en la caracterización del 73,9% del total de cromosomas de tipo I, representado un aumento considerable en la proporción de alelos de tipo I explicados, en comparación con estudios previos en la cohorte de pacientes del ICC. Estos resultados se encuentran en el artículo 1. Posteriormente, y junto con Mariona Font y Luigi Bisceglia, realizamos un análisis exhaustivo de mutaciones en *SLC3A1* y *SLC7A9* mediante distintas técnicas de detección de mutaciones, y la correlación genotipo-fenotipo en un total de 164 pacientes de la base de datos del ICC. En concreto me dediqué al análisis de mutaciones en *SLC3A1* mediante SSCP-HD, PCR y secuenciación, y realicé conjuntamente con Mariona Font la correlación genotipo-fenotipo de las muestras de la base de datos del ICC recogidas en el IRO (familias españolas y algunas italianas). Los resultados han dado lugar a la publicación de los artículos 2 y 3. El artículo 2 presenta resultados clínicos y una nueva clasificación genética de la cistinuria. El artículo 3 desarrolla "in extenso" los resultados genéticos. En el anexo 3 se presentan estudios preliminares de la función en oocitos de *Xenopus* o células Hela de algunas mutaciones nuevas identificadas en rBAT o b^{0,+}AT.

1.1. Identificación de mutaciones en *SLC3A1*:

En esta tesis se presentan un total de 32 mutaciones nuevas en *SLC3A1* (tabla 6, anexo 1). Junto con las 16 mutaciones nuevas en *SLC7A9* caracterizadas por Mariona Font y Luigi Bisceglia (artículo 3), suman un total de 48 mutaciones nuevas en cistinuria. Las mutaciones en *SLC3A1* incluyen 20 cambios de sentido, una delección en pauta de un residuo, 3 desplazamientos de la pauta de lectura que producen codones de terminación prematuros debidos a pequeñas delecciones i/o inserciones, 3 mutaciones de pérdida de sentido, 3 mutaciones de *splicing*, 1 mutación exónica silente, y un gran reordenamiento.

Resultados

Las 3 mutaciones de *splicing* incluyen un cambio en la secuencia consenso donadora de *splicing* del exón 3 (c.765+1G>T), un cambio en una secuencia consenso aceptora de *splicing* del exón 4 (c.766-2A>G), y una mutación intrónica (c.1012-23C>G). En la figura 7 se muestra el resultado de RT-PCR de la mutación c.1012-23C>G, localizada en el intrón 5. La mutación produce el *skipping* del exón 6 (r.1012_1136del) provocando un desplazamiento de la pauta de lectura desde la posición D338 en la proteína, que resultará en un codón de terminación al cabo de 12 bases (p.D338_Y378delfsX5).

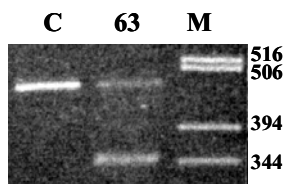


Figura 7 RT PCR sobre RNA extraído de linfocitos extraídos de sangre del paciente con la mutación 1012-23C>G en SLC3A1. Utilizando los oligos C3D-P12RC (secuencia en apéndice A de materiales y métodos) se espera un fragmento de cDNA para la secuencia salvaje que comprende los exones 4-7 de SLC3A1, de tamaño 467pb. En el caso del mutante se obtiene, además del fragmento salvaje, un fragmento más pequeño, de ~342pb. La secuenciación del fragmento pequeño demuestra que se produce el *skipping* del exón 6 (de tamaño 125pb).

La mutación silente (c.1035G>A) está situada en el exón 6, y no provoca cambio de aminoácido en rBAT. Según un programa informático de predicción de secuencias *enhancer* de *splicing* exónicas (ESE, *exonic splicing enhancer* (Cartegni et al., 2003)), c.1035G localiza en un ESE putativo de reconocimiento por el complejo proteico SF2/ASF con un valor de predicción de 2.36. La mutación c.1035G>A reduce este valor a 0.44 (por debajo del límite, que es de 1.96), sugiriendo defectos de *splicing* (Cartegni et al., 2003).

Las mutaciones más frecuentes en SLC3A1 de la base de datos del ICC son: M467T (26.4%), T216M (6.4%), dupE5-E9 (4%), c.163delC (4%), R270X (4%), y c.765+1G>T (3.2%). Estas mutaciones representan un 48.0% del total de alelos con mutaciones en SLC3A1. El resto de mutaciones en SLC3A1 se han identificado en tres o menos alelos independientes (tabla 6, anexo 1, pág. 81). Las mutaciones nuevas, junto con las previamente publicadas por el ICC y otros grupos, hacen un total de 103 mutaciones identificadas en SLC3A1 (tabla 7, anexo 2).

1.2. Nueva clasificación de la cistinuria con base genética

En conjunto, se han caracterizado 282 alelos de un total de 325 alelos independientes de cistinuria (86.8%) con mutaciones en SLC3A1 o SLC7A9, de la cohorte de pacientes del ICC. El análisis fenotípico y genotípico de los heterocigotos obligados SLC3A1/+ y SLC7A9/+ ha revelado que mientras la mayoría de heterocigotos SLC3A1/+ presenta unos valores de excreción urinaria de cistina y aminoácidos dibásicos dentro del rango de los controles (fenotipo I), los heterocigotos SLC7A9/+, además de presentar valores significativamente mayores que los controles (fenotipo no-I), presentan valores dentro del rango de los controles en un 14% de los casos (figura 8).

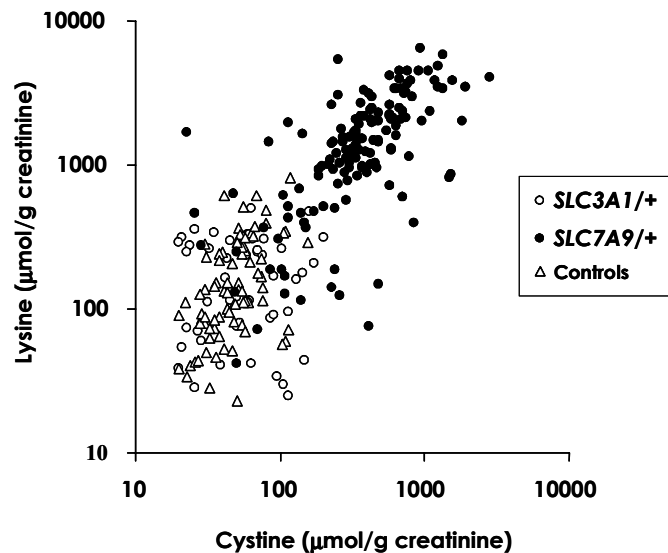


Figura 8 Distribución de los heterocigotos *SLC3A1/+* y *SLC7A9/+* en función de los valores de lisina y cistina en orina (en $\mu\text{mol/g}$ creatinina). El 14% de los heterocigotos *SLC7A9/+* presenta valores dentro del rango de los controles. Figura extraída del artículo 2 (Dello et al., 2002).

En la clasificación basada en el fenotipo, este 14% provocaría que los afectados se clasificasen de manera incorrecta, es decir, clasificando alelos de tipo I cuando en realidad son no-I. Para clasificar los pacientes de forma más precisa, hemos establecido una nueva clasificación genética de la cistinuria (artículo 2). Esta nueva clasificación se basa en los datos genéticos y divide la cistinuria en tres tipos: **tipo A**, debida a dos mutaciones en *SLC3A1*, **tipo B**, debida a dos mutaciones en *SLC7A9* y un posible **tipo AB**, con una mutación en cada gen, y que podría significar herencia digénica de la enfermedad (figura 9).

Además de una nueva clasificación de cistinuria, se ha aumentado el conocimiento de los síntomas clínicos que presentan los afectados de cistinuria, detallados en el artículo 2, y que en general, son prácticamente los mismos considerando tanto la clasificación clínica como la genética.

1.3. Correlación genotipo-fenotipo

En la base de datos del ICC la mayoría de alelos de tipo A segregan con cistinuria de tipo I, menos uno, que explica el fenotipo no-I en heterocigotos obligados de tres familias de cistinuria de tipo mixto. Esta mutación fue descrita inicialmente por Schmidt y colaboradores (Schmidt et al., 2003) y consiste en la duplicación de los exones 5 a 9 (c.(891+1524_1618-1600)dup o dupE5-E9)). Este reordenamiento del gen resulta en la duplicación en pauta de los residuos E298-D539 de rBAT. La duplicación en pauta se ha confirmado mediante estudios de RNA (tesis doctoral Mariona Font, y (Schmidt et al., 2003)). Mariona Font detectó que cinco probandos de la base de datos del ICC son portadores de esta mutación. El análisis de los valores de excreción de aminoácidos en orina en un total de seis heterocigotos obligados portadores de esta mutación muestra que cuatro de ellos presentan excreción en el rango de los heterocigotos de fenotipo no-I (tabla 6, artículo 3). Se trata de la primera mutación en *SLC3A1* que presenta fenotipo no-I en heterocigotos. Tanto las mutaciones de tipo A como las de tipo B contribuyen en las familias de tipo mixto, aunque el genotipo más frecuente en estas familias es el tipo BB.

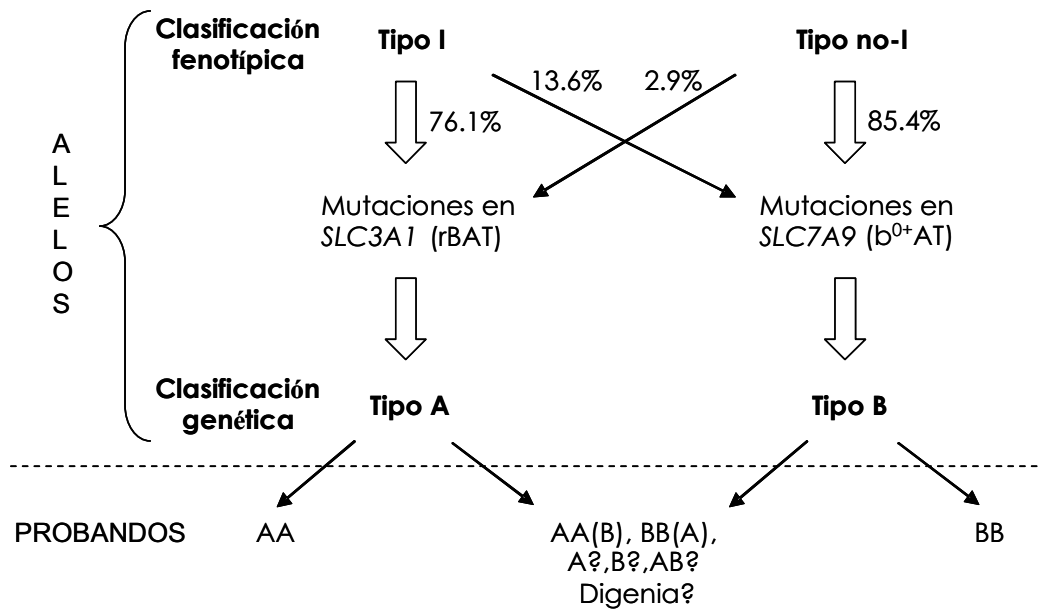


Figura 9 Correlación fenotipo-genotipo. Los porcentajes expresados representan el número de alelos explicados en nuestra base de datos del ICC (ver tablas 1 y 4, artículo 3). Un 76.1% de alelos de tipo I presentan mutaciones en *SLC3A1* (tipo A) mientras que un 13.6% presenta mutaciones en *SLC7A9* (tipo B). Los alelos de tipo no-I presentan mutaciones en *SLC7A9* en su mayoría (85.4%) menos en un 2.9%. Mutaciones en ambos genes en los pacientes de tipo mixto podría significar herencia digénica de la enfermedad (tipos AA(B), BB(A), A?, B?).

1.4. La herencia digénica causa fenotipo parcial en dos familias cistinúricas

Del total de 164 pacientes analizados, sólo dos presentan genotipo BB(A) o AA(B) respectivamente, y pertenecen a familias clasificadas como tipo mixto. El primero procede de una familia española (familia 35), y el segundo de una italiana (familia 77). Hemos analizado cuidadosamente el fenotipo de los portadores de estas dos familias para determinar si la digenia tiene un papel en cistinuria, sobretudo en los portadores de tipo AB.

En la figura 10 se muestra el pedigrí de la familia española con el paciente BB(A). El paciente es un heterocigoto compuesto por 2 mutaciones en *SLC7A9* y una mutación en *SLC3A1* (Y232C/G105R y M467T/+). En los heterocigotos obligados de esta familia, las mutaciones Y232C y M467T muestran fenotipo I, mientras que G105R muestra fenotipo no-I. En consecuencia, el paciente BB(A) se ha clasificado como tipo mixto. Dos miembros de esta familia son dobles portadores (AB) (G105R/+ y M467T/+). Estos dobles portadores presentan valores de excreción de aminoácidos en orina más elevados que el resto de heterocigotos simples (G105R/+ o M467T/+) dentro de la familia, sugiriendo que la herencia digénica provoca mayor excreción de aminoácidos en orina pero sin desarrollo de urolitiasis en esta familia.

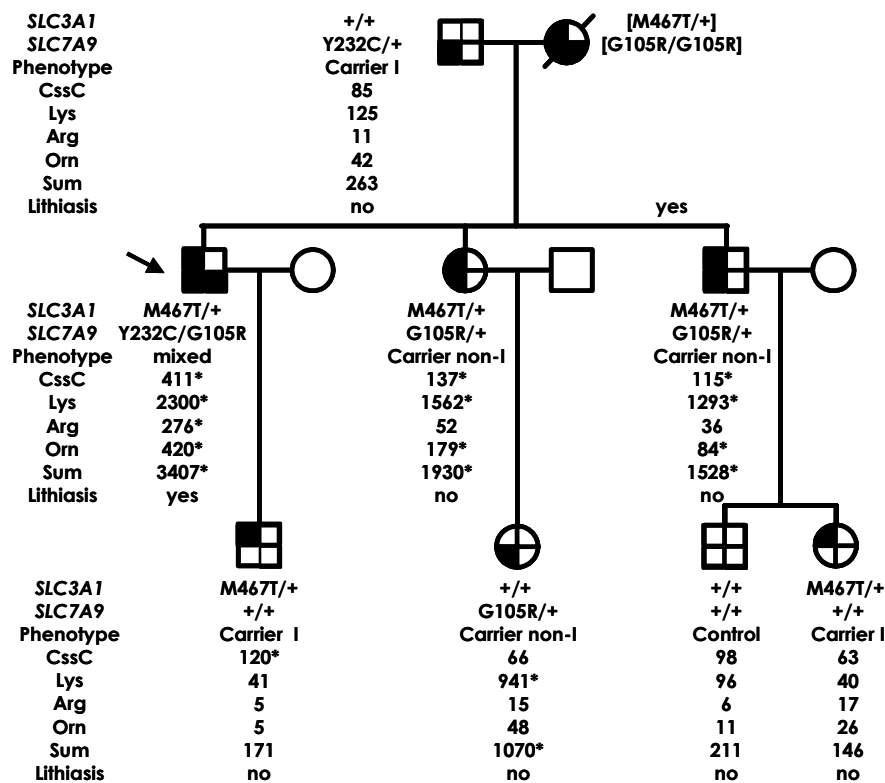


Figura 10 Pedigrí de una familia española de la base de datos del ICC con un paciente con genotipo BB(A) (familia 35). El probando, señalado con una flecha, tiene dos alelos mutados en *SLC7A9* (G105R/Y232C) (mutaciones de tipo B), y uno en *SLC3A1* (M467T/+) (mutación de tipo A), y presenta cálculos de cistina. Los dobles heterocigotos portadores G105R/+ y M467T/+ presentan mayor excreción de aminoácidos en orina que los heterocigotos simples G105R/+ o M467T/+, indicando una contribución de la herencia digénica en el fenotipo urinario. Los valores se expresan en $\mu\text{mol/g}$ creatinina. Los símbolos están divididos en sectores. Los sectores de la parte superior e inferior indican alelos *SLC3A1* y *SLC7A9* respectivamente. Cuando presentan mutaciones están en negro. * Valores por encima del 95 percentil respecto a controles. Figura extraída del artículo 3 (Font *et al.*, 2005)

En la familia italiana, el paciente AA(B) (familia 77; figura 2B, artículo 3), presenta una elevada concentración de aminoácidos en orina. De hecho tiene una hermana que esta en diálisis por la pérdida significativa de su función renal. Ambos son heterocigotos compuestos por 2 mutaciones en *SLC3A1* y una mutación en *SLC7A9* (dupE5-E9/M467T y c.789+2T>C/+). En los heterocigotos de esta familia, la mutación c.789+2T>C muestra fenotipo I, mientras que la dupE5-E9 muestra fenotipo no-I. En consecuencia, el paciente AA(B) se ha clasificado como tipo mixto. El paciente AA(B) excreta mayores cantidades de aminoácidos que un paciente AA de tipo mixto portador de las mismas mutaciones de tipo A (dupE5-E9/M467T) de otra familia de la base de datos del ICC (familia 79). Esto sugiere que la mutación de tipo B (c.789+2T>C) contribuye al fenotipo severo del paciente AA(B).

Cystinuria type I: Identification of eight new mutations in *SLC3A1*

LUIGI BISCEGLIA,¹ JESÚS PURROY,¹ MAITE JIMÉNEZ-VIDAL, ADAMO P. D'ADAMO, FERRAN ROUSAUD, ERCOLE BECCIA, ROSA PENZA, GIANFRANCO RIZZONI, MICHELE GALLUCCI, MANUEL PALACÍN, PAOLO GASPARINI, VIRGINIA NUNES, and LEOPOLDO ZELANTE

Servizio di Genetica Medica, IRCCS-Ospedale "Casa Sollievo della Sofferenza" San Giovanni Rotondo (Foggia), Italy; Departament de Genètica Molecular, Institut de Recerca Oncològica, L'Hospitalet de Llobregat, Departament de Bioquímica i Fisiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, and Servicio de Nefrologia IUNA, Fundacion Puigvert, Barcelona, Spain; and Divisione di Urologia, IRCCS-Ospedale "Casa Sollievo della Sofferenza" San Giovanni Rotondo, Dipartimento di Biomedicina dell'Età Evolutiva, Università di Bari, Divisione di Nefrologia e Dialisi, Ospedale Pediatrico "Bambino Gesù"-IRCCS, and Divisione di Urologia, Ospedale "Cristo Re," Roma, Italy

Cystinuria type I: Identification of eight new mutations in *SLC3A1*.

Background. Cystinuria is a heritable disorder of amino acid transport characterized by the defective transport of cystine and the dibasic amino acids through the brush border epithelial cells of the renal tubule and intestine tract. Three types of cystinuria (I, II, and III) have been described based on the urinary excretion of cystine and dibasic amino acids in obligate heterozygotes. The *SLC3A1* gene coding for an amino acid transporter named rBAT is responsible for type I cystinuria, whereas the *SLC7A9* gene coding for a subunit (b⁰⁺AT) of rBAT is involved in determining non-type I (types II and III) cystinuria.

Methods. The *SLC3A1* gene sequence was investigated in a sample of seven type I/type I, three type I/non-type I, six type I/untyped, and four untyped unrelated cystinuric patients by RNA single-strand conformation polymorphism (RNA-SSCP).

Results. Eight new point mutations (S168X, 765+1G>T, 766-2A>G, R452Q, Y461X, S547W, L564F, and C673W) and seven previously reported mutations were detected. These new mutations increase the number of mutated alleles so far characterized in *SLC3A1* to 62.

Conclusions. We have found *SLC3A1* mutations in 0.739 of the type I chromosomes studied. The relatively high proportion of uncharacterized type I chromosomes suggests either that there may be mutations not yet found in *SLC3A1* or that many of the assigned type I chromosomes in mixed type I/non-type I patients may have mutations in *SLC7A9*. If the hypothesis is excluded in the future, we believe that a third gene may be involved in cystinuria.

¹Dr. Bisceglia and Dr. Purroy contributed equally to this work.

Key words: *SLC3A1* gene mutation, *SLC7A9* gene mutation, chromosomes, rBAT mutation, inheritance, urinary cystine, amino acid transport, nephron defect, urolithiasis.

Received for publication January 24, 2000
and in revised form October 31, 2000
Accepted for publication November 6, 2000

© 2001 by the International Society of Nephrology

Cystinuria (MIM 220100) is the most common heritable disorder of amino acid transport, and is transmitted as an autosomal recessive trait with an overall prevalence of 1 in 7000 [1]. The disease is characterized by a nephron and intestinal defect in the reabsorption of cystine and the dibasic amino acids, arginine, lysine, and ornithine through the brush border epithelial cells of the renal tubule and intestinal tract [2]. Because of the low solubility of cystine in urine, the increased urinary excretion results in the formation of cystine stones that represent 1 to 2% of all urinary lithiasis.

Three types of classic cystinuria (I, II, and III) have been described based on the urinary excretion of cystine and dibasic amino acids in obligate heterozygotes [3] and on intestinal absorption in homozygotes [1]. Type I heterozygotes show normal aminoaciduria, whereas type II and III heterozygotes show high or moderate hyperexcretion of cystine and dibasic amino acids. Type I and II homozygotes show a minimal increase in blood cystine levels after oral loading, whereas type III homozygotes exhibit a near normal response. Despite these differences, the distinction between types II and III is very unclear. Therefore, we distinguish two clinical types: (a) type I heterozygotes, which present normal aminoaciduria, and (b) non-type I heterozygotes, which show a variable degree of urinary hyperexcretion of cystine and dibasic amino acids [4]. In addition, our linkage data emphasize the hypothesis that types II and III must be considered together [5].

All pathological consequences of cystinuria are related to urolithiasis, that is, urinary tract infection, pyelonephritis, obstructive uropathy, and renal insufficiency. The intestinal defect in the absorption of cystine and dibasic amino acids does not have any practical consequences.

Table 1. Urine amino acid levels in *SLC3A1* obligate heterozygotes and controls

	Cys	Lys	Arg	Orn	Sum
Obligate heterozygotes (<i>N</i> = 22)	79 ± 13	146 ± 19	18 ± 4	41 ± 9	282 ± 34
Maximum–minimum values	20–241	28–333	0–88	5–163	69–567
5–95 percentile	(25–159)	(40–311)	(0–40)	(10–144)	(105–484)
Controls (<i>N</i> = 34)	40 ± 3	118 ± 10	18 ± 6	21 ± 4	197 ± 18
Maximum–minimum values	15–70	23–311	0–171	0–97	71–635
5–95 percentile	(18–61)	(50–227)	(0–72)	(1–72)	(94–350)

Urinary excretion of cystine, lysine, arginine and ornithine, and the sum of these four amino acids in obligate heterozygotes of type I cystinuria families and in controls, expressed in $\mu\text{mol/g}$ of creatinine. Controls are relatives of cystinuria patients with no identified mutations in *SLC3A1* or *SLC7A9*, and non-transmitting cystinuria. These heterozygotes and controls were identified prior to the present study. Data (mean \pm SEM) are expressed in $\mu\text{mol/g}$ of creatinine in 24-hour urine samples. The 5–95 percentile of each value is given in parenthesis. 'N' denotes the number of individuals.

In 1994, the cystinuria type I gene (*SLC3A1*) was identified [6]. In 1997, non-type I cystinuria (types II and III) was linked to a locus on 19q13 [5, 7]. In 1999, *SLC7A9*, the gene causing non-type I cystinuria, was identified [4].

To date 54 mutations (44 point mutations, 9 large deletions, and 1 complex mutation) have been described [6, 8–21]. (abstract; Boutros et al, *Am J Hum Genet* 65:491, 1999) in the *SLC3A1* sequence.

This study describes eight new mutations resulting from a mutational search on a series of seven type I/type I, three type I/non-type I, six type I/untyped, and four untyped patients obtained analyzing the whole *SLC3A1* coding region, intron/exon boundaries, and 323 nucleotides of promoter sequence directly on genomic DNA. The methods of choice were the RNA single-strand conformation polymorphism (RNA-SSCP) technique [22, 23].

Previous data on the frequency of 21 different mutations in our population indicated that approximately 0.574 of the overall type I chromosomes were characterized by mutations in *SLC3A1* [11]. In the current study, we report the characterization of 17 out of 23 type I chromosomes that account for a proportion of 0.739, and also describe the overall number of *SLC3A1* mutations detected so far in our cystinuric population.

METHODS

Patients

Twenty unrelated Italian and Spanish patients were analyzed. Sixteen of them were classified in cystinuria subtypes on the basis of urinary excretion values of cystine and dibasic amino acids in 24-hour urine specimens of their relatives. Four patients who were included in this study remained unclassified because of the impossibility to recruit their relatives or because the urine analysis was not exhaustive. The criteria for classification were based on the excretion levels of known heterozygotes for mutations in *SLC3A1* (Table 1). It is worth mentioning that the range of the urinary excretion of cystine and the three dibasic amino acids in these *SLC3A1* heterozygotes was similar to that of controls, but had a tendency for a higher range in the urine levels of cystine

and ornithine (Table 1). When at least two parameters (cystine, lysine, or the sum of cystine and dibasic amino acids) were higher than the maximum value of heterozygotes for mutations in *SLC3A1*, the proband's relatives were classified as non-type I heterozygotes. Otherwise, they were classified as type I heterozygotes. Seven patients were classified as type I/type I, three as mixed type I/non-type I, and six as type I/untyped. A summary of the phenotypes of patients included in this study is reported in Table 2. We do not have any information about the stone formation in the patients D3 and B96; all the remaining but two formed stones in the first one third decade of life. In addition, the patients P.G., IM93, and PR84 underwent the nephrotomy, whereas patient B48 had a cystinuric brother affected by renal failure. When 24-hour urine samples of the proband's parents were not available, we considered urine samples of the proband's children. Urinary amino acid content measurements, determined by high-pressure liquid chromatography (HPLC), were corrected per gram of creatinine.

Mutational search

Genomic DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes according to standard protocols. DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR) was carried out incorporating the T7 phage promoter sequence in the 5'-end of one PCR primer. In this manner, the amplified product can be processed by the RNA-SSCP technique [22, 23]. The primer pairs and the PCR protocol conditions used to amplify the *SLC3A1* exons were those previously described [11].

The promoter region was amplified using the primer pairs Dir/5'-CTGGGATTACAGGTGCACAC-3' (–343; –324) and Rev/5'-TATCTTCAGCCATGTCTCAC-3' (13; –7) under the following conditions: 95°C for 5 minutes, followed by 35 cycles at 94°C for 30 seconds, 57°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds. To the 5'-end of the forward primer was added a T7 tail, as described previously in this article. The amplification reaction was performed using 100 ng of genomic DNA in a total volume of –25 μL , with 5 pmol of each primer and 200 $\mu\text{mol/L}$ of each dNTP, in PCR buffer containing 1.5 mmol/L

Table 2. Summary of phenotypes and mutations in cystinuric patients

Proband and relatives	Phenotype	SLC3A1 mutations	Age	Age at first stone	Number of calculi	Chronic renal insufficiency	Urinary cystine excretion		Urinary lysine excretion $\mu\text{mol/g creatinine}$	Urinary excretion sum of cys, lys, orn, arg
							excretion	excretion		
D3	I/I	T216M/T216M	—	—	—	—	1273	8691	16923	
Mother							59	120	195	
Father							50	236	324	
NL104	I/I	M467T/R452W	26	20	4	not	1200	722	7353	
Mother							71	15	120	
Father							52	18	174	
B96	I/I	163delC/163delC	—	—	—	—	5689	8616	17417	
Mother							91	91	220	
Father							201	313	567	
P.G.	I/I	765+1G>T ^a /765+1G>T ^a	51	5	11	mild	651	6483	10725	
Mother							26	359	490	
Father							23	250	343	
BG98	I/I	S547W ^a ? ^b	24	2	17	not	588	4055	10093	
Mother							91	166	325	
Father							39	40	115	
BA96	I/I	M467T? ^b	6	2	35	mild	1722	4296	9500	
Mother							62	333	429	
Father							45	113	271	
PM90	I/I	?/? ^b	35	18	13	mild	651	2232	5182	
Mother							99	399	561	
Father							49	84	166	
A147	I/not I	M467T? ^b	38	22	10	not	1148	4322	7890	
Mother							41	178	245	
Father							63	1595	1801	
B.E.	I/not I	?/? ^b	20	15	5	not	700	859	2135	
Mother							130	373	677	
Father							120	60	231	
LGM92	I/not I	?/? ^b	13	2	3	not	2450	16000	30250	
Mother							900	2590	4348	
Father							80	384	559	
B78	I/untyped	S168X ^a /Del 5 ^c	67	25	5	mild	2042	2117	5452	
Child							109	125	186	
IM93	I/untyped	M467T/Y461X ^a	69	25	4	mild	985	3885	7515	
Child							37	67	148	
PR84	I/untyped	M467T/L564F ^a	45	12	4	not	1400	3460	8580	
Child							79	102	242	
GG82	I/untyped	R452Q ^a ? ^b	52	22	3	mild	1153	6470	6230	
Mother							97	343	540	
Child							45	87	201	
B74	I/untyped	R365W/? ^b	45	19	3	not	1328	15803	24885	
Child							73	83	226	
B48	I/untyped	765+1G>T ^a ? ^b	43	38 ^d	0	not	2475	8840	16358	
Mother							104	69	232	
Child							66	401	533	
PL100	Untyped	M467T/M467K	53	21	41	not	1419	4558	9430	
A23	Untyped	C673W ^a /766-2A>G ^a	5	1	1	not	3209	6286	18478	
Mother							28	—	—	
Father							159	—	—	
BG85	Untyped	R362C/? ^b	24	15	5	not	2120	—	—	
DGV103	Untyped	?/? ^b	7	4 ^d	0	not	981	—	—	
Mother							460	—	—	
Father							163	—	—	

^a Mutation described in this paper^b Unknown mutation (?)^c Mutation under characterization^d Age at diagnosis

MgCl₂ (final concentration) and 0.7 U of Taq polymerase (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany).

The RNA-SSCP protocol has been performed as previously described [9]. Bands showing an electrophoretically altered mobility were then sequenced on a DNA Automatic Sequencer (Applied Biosystems 373A) using the ABI PRISM Dye primer Cycle Sequencing kit according to manufacturer's protocols.

New mutations were also checked by restriction analysis with the enzymes *TaqI*, *MspI*, *MboI* (Promega, Madison, WI, USA), *HincII*, *NcoI* (New England BioLabs Inc., Boston, MA, USA), *AluI*, *MaeI*, and *RsaI* (Boehringer Mannheim GmbH), according to manufacturer's instructions. Whenever necessary, a modified primer was designed to construct a restriction site during the PCR (Table 3).

RESULTS

The whole *SLC3A1* coding region, all intron/exon boundaries, some intron sequences (on average 50 bp on each side of the exons), and 323 bp of promoter region were investigated in a sample of 20 Italian and Spanish cystinuric patients. Eight novel mutations were identified: four missense mutations, two nonsense mutations, and two involving a splicing site. We also detected seven previously reported mutations. A summary of the *SLC3A1* mutations identified in each cystinuria family is reported in Table 2, and the novel mutations are listed in Table 3.

Description of new mutations

Missense mutations. A C to G substitution at nucleotide position 2019 of the gene (exon 10), which changed a cysteine codon (TGC) to a tryptophan (TGG) at position 673 (C673W), was found in a type I/type I Spanish patient carrying on the other chromosome the 766-2A>G mutation (discussed later in this article). The C673W mutation could be detected by the restriction site generating-polymerase chain reaction (RG-PCR) method by creating a *NcoI* restriction site.

The second mutation was a G to A substitution at nucleotide position 1355 (exon 8). The normal codon (CGG), corresponding to arginine residue at position 452, changed to a CAG glutamine codon (R452Q). It was found in one Italian affected chromosome. The mutation could be analyzed by PCR since it created an *AluI* restriction site.

The third identified mutation was a C to G substitution at nucleotide position 1640 (exon 10). It changes a serine codon (TCG) to a tryptophan (TGG) at position 547 (S547W). It was found in one Italian affected chromosome. Since this substitution created a *MboI* restriction site, restriction digestion of the PCR fragment was used to confirm the sequence change in the patient.

The fourth mutation identified was a C to T substitution at nucleotide position 1690 (exon 10) that changed a

Table 3. Description of new mutations identified in cystinuria patients, primers for amplification and strategies for mutations detection

Mutation	Effect on coding region	Nucleotide change	Exon	Restriction site		Primers	Location
				Created	Destroyed		
S168X	Ser>>Stop	C to A at 503	2		<i>TaqI</i>	5'-GGGTTTATTCATGACTTTGACT-3' 5'-CATATCTGAAATCTTAAAGGG(T)C-3' ^a	(431-36; 431-12) (526; 504)
765+1G>T	Splicing site	G to T at 765+1	3	<i>HincII</i>		5'-TTAGCCATTACTGTGCCCTGG-3' 5'-GTCAGACACAGTTGATA(G)TTA-3' ^a	(611-82; 611-63) (765+21; 765+2)
766-2 A>G	Splicing site	A to G at 766-2	4	<i>MspI</i>		5'-ATAGGTCACCTGATGTGT-3' 5'-AAACCTGCCAGTAATGGAGAG-3'	(766-36; 766-17) (891+47; 891+26)
R452Q	Arg>Gln	G to A at 1355	8	<i>AluI</i>		5'-CTGTGTATACAGCTGTGTTTC-3' 5'-ATAGCTGTGATGAATGTC-3'	(1333-40; 1333-21) (1500+38; 1500+20)
Y461X	Tyr>>Stop	T to G at 1383	8	<i>MaeI</i>		5'-TTCGCCGTTTGGGAATCA(C)TA-3' ^a 5'-ATAGCTGTGATGAATGTC-3'	(1366; 1382) (1500+38; 1500+20)
S547W	Ser>>Trp	C to G at 1640	10		<i>MboI</i>	5'-GGATCGAGTGTGGTAAAT-3' 5'-CTCCAAAATTCAGAACCCACG-3'	(1618-103; 1618-82) (1801; 1782)
L564F	Leu>>Phe	C to T at 1690	10		<i>RsaI</i>	5'-CTACTTCATGCCAATGAG(G)TA-3' ^a 5'-CTCCAAAATTCAGAACCCACG-3'	(1669; 1689) (1801; 1782)
C673W	Cys>>Trp	C to G at 2019	10	<i>NcoI</i>		5'-TGCCTTGTTCCTCAATCGA(C)CATG-3' ^a 5'-GCCAGTGTCTTCACTCTTC-3'	(1996; 2018) (2055+33; 2055+15)

^a Mutagenesis primers. The nucleotides in parentheses have been mutated to generate restriction sites.

leucine codon (CTC) to a phenylalanine (TTC) at position 564 (L564F). It was found in one Italian patient carrying another chromosome, the M467T mutation. The mutation could be analyzed by RG-PCR protocol by destroying a *RsaI* restriction site.

All missense mutations identified affected residues that were highly conserved in rat, rabbit, and humans [24–26].

Nonsense mutations. A C to A substitution at nucleotide 503 (exon 2) was detected in one Spanish-affected chromosome. This point mutation led to a stop signal (TAG) at position 168 (S168X), and it could be analyzed by the RG-PCR protocol since it destroys a *TaqI* restriction site. Moreover, subject B78 appeared to be homozygous for the observed mutation S168X (data not shown), but further analysis of his relatives allowed us to confirm his hemizygous status. The characterization of this deletion is in progress.

The second mutation was a T to G substitution at nucleotide position 1383 (exon 8) that changed a TAT to a TAG codon, resulting in a nonsense mutation at position 461 (Y461X). It was found in one Italian patient carrying on the other chromosome, the M467T mutation. The mutation could be analyzed by the RG-PCR protocol by creating a *MaeI* restriction site.

Splicing site mutation. A G to T substitution at nucleotide 765+1 (splice site exon 3/intron 3) was found in two Spanish patients. One of them was heterozygous, and the other one was homozygous for this point mutation; it was possible to confirm the heterozygous state in his parents. The substitution destroyed the consensus sequence of splicing site and could be analyzed by the RG-PCR method by creating a *HincII* restriction site.

An A to G substitution at nucleotide 766-2 (splice site intron 3/exon 4) was found in a Spanish patient who carried the C673W mutation on the other chromosome. The substitution destroyed the consensus site of splicing site and could be analyzed by PCR since it created a *MspI* restriction site.

None of the described mutations were detected on 86 normal control chromosomes. A summary of the eight mutations and primers for the PCR amplification is in Table 3.

Previously reported mutations

In addition to the identification of new alleles, we have detected seven previously described mutations that characterize 14 chromosomes in our sample. A Spanish patient was found to be homozygous for the mutation 163delC [16], and it was possible to confirm the heterozygous state in his parents. A patient of Balkan origin was found to be homozygous for a T216M mutation first reported in homozygosity in an Italian gypsy [11] and very frequently appearing in Greek patients [18]. A patient from Southern Italy was found to carry the mutation R362C, previously reported in an individual of the same

origin [11]. Also, the mutation M467K described before in an Italian patient from Southern Italy [6] in our study was detected in a patient from the same geographic area. A Northern Italian patient was found to carry the mutation R452W previously described in one American patient [13]. A Spanish patient has been found to carry the mutation R365W previously reported in an Italian patient [9]. Altogether, six subjects were found to be heterozygous for the M467T mutation.

A summary of all mutations identified is reported in Table 2.

Survey of the frequency and the occurrence of mutations in our cystinuric population

In this study, we identified both mutated alleles in four out of seven type I/type I patients, in three out of six type I/untyped patients, and in two out of four untyped patients; one mutated allele in two out of seven type I/type I patients, in three out of six type I/untyped patients, in one out of three type I/non-type I patients, and in one out of four untyped patients. Thus, we have characterized 25 out of 40 total chromosomes for *SLC3A1* mutations. Ten out of 14 positive chromosomes were found in type I/type I patients accounting for a proportion of 0.714, 1 out of 6 in type I/non-type I patients, 9 out of 12 in type I/untyped, and 5 out of 8 in untyped patients. If we consider all of the type I chromosomes from type I/I, type I/non-type I, and type I/untyped patients (17 out of 23), this figure is 0.739. In our cystinuric population, mutation M467T is the most common allele, while mutations 163delC, T216M, 765+ 1G>T, R362C, R365W, M467K, and E483X were detected at least twice (Table 4) [6, 9, 11, 12, 16].

DISCUSSION

In this study of 20 cystinuric patients, seven patients were classified as type I/type I, three as mixed type I/non-type I, and six as type I/untyped; four patients remained unclassified because of the impossibility to recruit their relatives or because the urine analysis was not exhaustive. The levels of cystine excretion in our patients ranged from 588 to 5689 $\mu\text{mol/g}$ creatinine, and the sum of cystine and dibasic amino acids ranged from 2135 to 30250 $\mu\text{mol/g}$ creatinine. Five patients formed stones at age one to five years. Eleven formed stones in the second to third decade of life, whereas the patients B48 and DGV103, 43 and 7 years old, respectively, did not form stones. The cystinuria in these patients was diagnosed because B48 had a cystinuric brother affected by renal failure and DGV103 had recurrent episodes of microematuria. In addition, the patients P.G., IM93, and PR84 underwent the nephrotomy. No information about the stone formation in patients D3 and B96 was available. The mutational analysis carried out in this group of pa-

Table 4. *SLC3A1* mutations detected in our cystinuric population

Mutation	Number of positive alleles	Reference
M467T	22	[6]
T216M	4	[11]
765+1G>T	3	this study
R365W	2	[9]
163delC	2	[16]
R362C	2	[11]
M467K	2	[6]
E483X	2	[12]
Y151N	1	[11]
S168X	1	this study
R181Q	1	[6]
R270X	1	[8]
R452W	1	[13]
R452Q	1	this study
Y461X	1	this study
S547W	1	this study
L564F	1	this study
Y582H	1	[9]
P615T	1	[6]
F648S	1	[9]
T652R	1	[6]
C673W	1	this study
L678P	1	[6]
766-2A>G	1	this study
1749delA	1	[9]
766-2055 del (ex 4-10)	1	[11]
del (ex 2-10)	1	[19]
del (ex 10)	1	[19]
G(-265)A	0	abs ^a
G(-194)C	0	abs ^a
P122S	0	[21]
P128Q	0	[8]
S217R	0	[15]
E268K	0	[10]
R270L	0	[15]
T341A	0	[10]
L346P	0	[20]
R365L	0	[18]
S420C	0	[16]
I445T	0	[20]
G458E	0	[16]
Y461H	0	[13]
V536G	0	[16]
G645A	0	[16]
C673R	0	[20]
891+4 A>G	0	[17]
782-804del	0	[16]
974delGA	0	[12]
1011G>A	0	[15]
1306insG	0	[8]
1500+1 G>T	0	[12]
1601delAC	0	[21]
1810delTG	0	[15]
1820delIT	0	[20]
1898insTA	0	[20]
2022insT	0	[16]
114-1306 del (ex 1-7)	0	[8]
198-1575 del (ex 1-9)	0	[12]
430-765 del (ex 1-3)	0	[14]
del (ex 2-10)	0	[15]
del (ex 1-7)	0	[15]
431-3C to 463T del and duplication ins T468-A474	0	[16]
Total	59	

^aThe abstract that describes this mutation is Boutros et al, *Am J Hum Genet* 65:491, 1999

tients allowed us to identify eight novel *SLC3A1* mutations that together with the 54 previously reported increase to 62 (63 if we consider the large deletion of B78 patient under characterization) the number of different mutated alleles identified so far in the *SLC3A1* gene. Among these new mutations, two are nonsense (S168X, Y461X) leading to a truncated protein, two involve a splicing site (765+1G>T, 766-2A>G), and the remaining four are missense mutations (R452Q, S547W, L564F, C673W) that affect residues highly conserved in rat, rabbit, and human rBAT [24-26].

Comparing our data with those arising from other populations [8, 10, 12-18, 20-21], the mutation M467T is the most common allele, and 10 out of 62 mutated alleles (163delC, T216M, 765 + 1G>T, R270X, R362C, R365W, R452W, M467T, M467K, and E483X) were detected more than once. This finding combined with the evidence of identification of the same mutations in individuals from identical geographic areas suggests that the majority of the mutations in *SLC3A1* should be private mutations or/and population specific.

In our study, the overall proportion of type I chromosomes analyzed in this cystinuric population that were positive for point mutations in the *SLC3A1* gene is 0.739. The remaining uncharacterized chromosomes may be explained partially by some mutations escaping detection by the RNA-SSCP method or by the presence of mutations in the 5'-UTR region beyond the 323 bases analyzed in this study. The data available concerning the promoter of *SLC3A1* are not sufficient to determine any regions particularly susceptible of carrying mutations in cystinuria patients. The proportion of type I-positive chromosomes in the present study (0.739) is higher as compared with that reported in our previous studies. This finding is probably due to the more stringent criteria for classification that is currently used, which now allowed us to classify as non-type I some patients previously considered in a different way, and to exclude some still biochemically unclassified cases. In addition, there is evidence that in some patients the type I cystinuria can be due to mutations in *SLC7A9*, the gene involved in determining non-type I cystinuria. Actually, the Spanish patient B.E., classified as mixed type I/non-type I, did not present any mutation in *SLC3A1* (Table 2), while he carried the A182T mutation in *SLC7A9* [4] segregating with the type I phenotype of his father (data not shown). This evidence opens the possibility that other patients phenotypically characterized as mixed type I/non-type I may have one particular point mutation in *SLC7A9* producing a type I cystinuria phenotype. This would explain why in some populations the detection rate is very high among type I/type I patients (0.94), while it is only 0.11 in mixed type I/non-type I patients [15]. At this point, it would be useful to screen for *SLC7A9* mutations in all patients with type I cystinuria

phenotype who have no *SLC3A1* mutations. Finally, we cannot exclude an additional, as yet unidentified gene to be involved in cystinuria.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by Italian Telethon Foundation grants (E.556) to L.Z.; Dirección General de Investigación Científica y Técnica grant PM96/0060 from Spain; the support of the Generalitat de Catalunya to M.P.; BIOMED2 CT98-BMH4-3514 EC grant to V.N., M.P., and P.G.; Fundació La Marató-TV3 research grant 981930 to V.N. and M.P.; and Generalitat de Catalunya grants SGR 121 and SGR 85. J.P. is a recipient of a predoctoral fellowship from the Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica from the Generalitat of Catalonia. M.J.-V. is a recipient of a fellowship from the BIOMED2 CT98-BMH4-3514 EC grant. We thank the families who collaborated in this work and Mr. Pietro Stanziale for his technical assistance.

Reprint requests to Dr. Luigi Bisceglia, Servizio di Genetica Medica, IRCCS-Ospedale "CSS," I-71013 San Giovanni Rotondo (Fg), Italy. E-mail: genetcss@fg.nettuno.it

REFERENCES

- SEGAL S, THIER SO: Cystinuria, in *The Molecular and Metabolic Basis of Inherited Disease*, edited by SCRIVER CR, BEAUDET AL, SLY WS, et al, New York, McGraw Hill, 1995, pp 3581–3601
- ROSENBERG L, DURANT J, HOLLAND M: Intestinal absorption and renal extraction of cystine and cysteine in cystinuria. *N Engl J Med* 273:1239–1345, 1965
- ROSENBERG L, DOWNING S, DURANT J, et al: Cystinuria: Biochemical evidence of three genetically distinct diseases. *J Clin Invest* 45:365–371, 1966
- INTERNATIONAL CYSTINURIA CONSORTIUM: Non-type I cystinuria caused by mutations in *SLC7A9*, encoding a subunit (b^{0+} AT) of rBAT. *Nat Genet* 23:52–57, 1999
- BISCEGLIA L, CALONGE MJ, TOTARO A, et al: Localization by linkage analysis of the cystinuria type III gene to chromosome 19q13.1. *Am J Hum Genet* 60:611–616, 1997
- CALONGE MJ, GASPARINI P, CHILDREN J, et al: Cystinuria caused by mutations in rBAT, a gene involved in the transport of cystine. *Nat Genet* 6:420–426, 1994
- WARTENFELD R, GOLOMB E, KATZ G, et al: Molecular analysis of cystinuria in Libyan Jews: Exclusion of the *SLC3A1* gene and mapping of a new locus on 19q. *Am J Hum Genet* 60:617–624, 1997
- PRAS E, RABEN N, GOLOMB E, et al: Mutations in the *SLC3A1* transporter gene in cystinuria. *Am J Hum Genet* 56:1297–1303, 1995
- GASPARINI P, CALONGE MJ, BISCEGLIA L, et al: Molecular genetics of cystinuria: Identification of four new mutations and seven polymorphisms, and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 57:781–788, 1995
- MIYAMOTO K, KATAI K, TATSUMI S, et al: Mutations in the basic amino acid transporter gene associated with cystinuria. *Biochem J* 310:951–955, 1995
- BISCEGLIA L, CALONGE MJ, DELLO STROGOLO L, et al: Molecular analysis of the cystinuria disease gene: Identification of four new mutations, one large deletion, and one polymorphism. *Hum Genet* 98:447–451, 1996
- HORSFORD J, SAADI I, REALSON J, et al: Molecular genetics of cystinuria in French Canadians: Identification of four novel mutations in type I patients. *Kidney Int* 49:1401–1406, 1996
- ENDSLEY JK, PHILLIPS JA, HRUSKAA KA, et al: Genomic organization of a human cystine transporter gene (*SCL3A1*) and identification of novel mutations causing cystinuria. *Kidney Int* 51:1893–1897, 1997
- GITOMER WL, REED BY, RUMML LA, et al: A 335 base deletion in the mRNA coding for a dibasic amino acid transporter-like protein (*SLC3A1*) isolated from a patient with cystinuria. *Hum Mutat* 1 (Suppl 6):S69–S71, 1998
- SAADI I, CHEN XZ, HEDIGER M, et al: Molecular genetics of cystinuria: Mutations analysis of *SLC3A1* and evidence for another gene in the type I (silent) phenotype. *Kidney Int* 54:48–55, 1998
- GITOMER WL, REED BY, RUMML LA, et al: Mutations in the genomic deoxyribonucleic acid for *SLC3A1* in patients with cystinuria. *J Clin Endocrinol Metab* 83:3688–3694, 1998
- PRAS E, GOLOMB E, DRAKE C, et al: A splicing mutation (891 + 4A>G) in *SLC3A1* leads to exon 4 skipping and causes cystinuria in a Moslem Arab family. *Hum Mutat* 1(Suppl 6):S28–S30, 1998
- ALBERS A, LAHME S, WAGNER C, et al: Mutations in the *SLC3A1* gene in cystinuric patients: Frequencies and identification of a novel mutation. *Genet Test* 3:227–231, 1999
- PURROY J, BISCEGLIA L, JEAKEN J, et al: Detection of two novel large deletions in *SLC3A1* by semi-quantitative fluorescent multiplex PCR. *Hum Mutat* 15:373–379, 2000
- EGOSHI KI, AKAKURA K, KODAMA T, et al: Identification of five novel *SLC3A1* (rBAT) gene mutations in Japanese cystinuria. *Kidney Int* 57:25–32, 2000
- GITOMER WL, REED BY, PACK CY: Identification of two novel mutations [P122S (364C>T) and 1601 del AC] in the *SLC3A1* gene in type I cystinurics. *Hum Mutat* 15:2000, 1601
- SARKAR G, YOON HS, SOMMER S: Screening for mutations by RNA single strand conformation polymorphism (rSSCP): Comparison with DNA-SSCP. *Nucleic Acids Res* 20:871–878, 1992
- BISCEGLIA L, GRIFA A, ZELANTE L, et al: Development of RNA-SSCP protocols for the identification and screening of CFTR mutations: Identification of two new mutations. *Hum Mutat* 4:136–140, 1994
- BERTRAN J, WERNER A, MOORE ML, et al: Expression cloning of a cDNA from rabbit kidney cortex that induces a single transport system for cystine and dibasic and neutral amino acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5601–5605, 1992
- TATE SS, YAN N, UDENFRIEND S: Expression cloning of a Na^+ -independent neutral amino acid transporter from rat kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1–5, 1992
- WELLS RG, HEDIGER MA: Cloning of a rat kidney cDNA that stimulates dibasic and neutral amino acid transport and has sequence similarity to glucosidases. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5596–5600, 1992

Comparison between *SLC3A1* and *SLC7A9* Cystinuria Patients and Carriers: A Need for a New Classification

LUCA DELLO STROLOGO,* ELON PRAS,[†] CLAUDIA PONTESILLI,*
 ERCOLE BECCIA,[‡] VITTORINO RICCI-BARBINI,[‡] LUISA DE SANCTIS,[§]
 ALBERTO PONZONE,[§] MICHELE GALLUCCI,^{||} LUIGI BISCEGLIA,^{||}
 LEOPOLDO ZELANTE,^{||} MAITE JIMENEZ-VIDAL,[#] MARIONA FONT,[#]
 ANTONIO ZORZANO,** FERRAN ROUSAUD,^{††} VIRGINIA NUNES,[#]
 PAOLO GASPARINI,^{‡‡} MANUEL PALACÍN,** and GIANFRANCO RIZZONI*

*Division of Nephrology and Dialysis, Bambino Gesù Children's Hospital and Research Institute, Rome, Italy;
[†]Danek Gartner Institute, Sheba Medical Center, Israel; [‡]Urology Department, IRCCS CSS, S. Giovanni Rotondo Hospital, Italy; [§]Pediatrics Department, Turin University, Turin, Italy; ^{||}Urology Department, Campus Biomedico University, Rome Italy; ^{||}Medical Genetics Service, IRCCS CSS, S. Giovanni Rotondo Hospital, Italy; [#]Medical and Molecular Genetics, Duran y Reinalds Hospital, Barcelona, Spain; **Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain; ^{††}Nephrology Service, Fundació Puigvert, Barcelona, Spain; and ^{‡‡}Tigem Medical Genetic, Second University of Naples, Naples, Italy.

Abstract. Recent developments in the genetics and physiology of cystinuria do not support the traditional classification, which is based on the excretion of cystine and dibasic amino acids in obligate heterozygotes. Mutations of only two genes (*SLC3A1* and *SLC7A9*), identified by the International Cystinuria Consortium (ICC), have been found to be responsible for all three types of the disease. The ICC set up a multinational database and collected genetic and clinical data from 224 patients affected by cystinuria, 125 with full genotype definition. Amino acid urinary excretion patterns of 189 heterozygotes with genetic definition and of 83 healthy controls were also included. All *SLC3A1* carriers and 14% of *SLC7A9* carriers showed a normal amino acid urinary pattern (*i.e.*, type I phenotype). The

rest of the *SLC7A9* carriers showed phenotype non-I (type III, 80.5%; type II, 5.5%). This makes the traditional classification imprecise. A new classification is needed: type A, due to two mutations of *SLC3A1* (rBAT) on chromosome 2 (45.2% in our database); type B, due to two mutations of *SLC7A9* on chromosome 19 (53.2% in this series); and a possible third type, AB (1.6%), with one mutation on each of the above-mentioned genes. Clinical data show that cystinuria is more severe in males than in females. The two types of cystinuria (A and B) had a similar outcome in this retrospective study, but the effect of the treatment could not be analyzed. Stone events do not correlate with amino acid urinary excretion. Renal function was clearly impaired in 17% of the patients.

Cystinuria is an autosomal recessive disorder that is characterized by an impaired transport of cystine, lysine, ornithine, and arginine in the proximal renal tubule and in the epithelial cells of the gastrointestinal tract. High cystine concentration in the urinary tract most often causes the formation of recurring renal stones that are resistant to medical treatment. Urine acidification and concentration facilitate stone formation (1).

Traditionally, cystinuria has been divided into three subtypes: types I, II, and III (2). Type I heterozygotes show a normal amino acid urinary pattern, whereas type II and III are characterized by an increase of cystine, lysine, ornithine, and

arginine urinary excretion. Type II has been described as having a more severe impairment of intestinal transport than type III, as demonstrated by a lack of increase in plasma level after an oral load of cystine or lysine (2,3). Subtype non-I grouped previous subtypes II and III (4).

In 1994 a first gene, *SLC3A1* in chromosome 2 (5,6) encoding rBAT, the mutations of which are responsible for type I cystinuria, was identified (7–9). Thereafter, the defect associated with the most common cystinuria-specific *SLC3A1* mutation was described (10) and over 50 mutations in *SLC3A1* were reported (11). A second locus gene that is responsible for type non-I cystinuria was mapped on chromosome 19 (12–15). In 1999, the gene responsible for type non-I cystinuria, *SLC7A9* encoding for bo,+AT, was identified (15,16). This second gene encodes a subunit that associates with rBAT to form the active transporter (17,18). This gene appears to cause both type II and III cystinuria (13), supporting the grouping of these subtypes in type non-I (16,19). Over 30 mutations in *SLC7A9* have been described so far (19).

Despite the increasing knowledge of the genetic and physi-

Received March 14, 2002. Accepted June 23, 2002.

Correspondence to Dr. Luca Dello Strologo, Nephrology and Dialysis Dept., Bambino Gesù Children's Hospital and Research Institute, Piazza S. Onofrio 4, 00165 Rome, Italy. Phone: 39-06-68592393; Fax: +39-06-68592602; E-mail: dellostrologo@opbg.net

1046-6673/1310-2547

Journal of the American Society of Nephrology
 Copyright © 2002 by the American Society of Nephrology

DOI: 10.1097/01.ASN.0000029586.17680.E5

ologic characteristics of the carriers involved in cystinuria, clinical data in homozygotes are very scanty. Large series are not available in the literature. In this study, we present clinical data combined with mutation analysis of 224 patients and the amino acid urinary patterns of 47 and 142 *SLC3A1* and *SLC7A9* heterozygotes, respectively, compared with those of 83 healthy control relatives of the affected subjects in whom the mutation identified in the proband was not detected. Excretion patterns in heterozygotes with known mutations do not fully correspond to the classification used up to now. We propose a new cystinuria classification based on molecular analysis and not on urinary cystine and dibasic amino acid excretion patterns.

Material and Methods

The Institutional Review Board at each of the participating centers approved the study and participants gave informed consent.

All subjects meeting the following criteria were reported to the database:

- Cystine urinary excretion higher than 1040 $\mu\text{mol/g}$ creatinine in a single urine sample or in a 24-h collection and at least one identified cystine stone (emitted or surgically removed).
- Siblings of cystinuric patients defined as above in whom the same genetic mutations were identified or with an amino acid urinary pattern compatible with the diagnosis of cystinuria, even in the absence of stone identification.

Two classifications were attempted:

1. On the basis of parents' amino acid urinary excretion, as previously published (19). Patients were classified as type I when both parents showed a normal urine amino acid pattern, type non-I when urinary excretion of both parents was above normal, and mixed type when urinary excretion was above normal in one of the parents and normal in the other. If urinary excretion in one or both parents was not available, they were defined as unclassified.

Type non-I patients were classified as type II or III according to Kelly (20). Patients were therefore classified as type II when obligate heterozygotes in their families had urine excretion of cystine over 750 $\mu\text{mol/g}$ of creatinine, lysine over 4000 $\mu\text{mol/g}$ of creatinine, and the sum of cystine and the three dibasic amino acids over 4500 $\mu\text{mol/g}$ of creatinine. Patients were classified as type III when obligate heterozygotes in their families had urine excretion of amino acids above normal but below the above-mentioned limits.

2. On the basis of genetic findings. Patients with two mutations in *SLC3A1* (one on each allele) were defined as type A, whereas patients with two mutations in *SLC7A9* were defined as type B. Patients with one mutation on *SLC3A1* and one on *SLC7A9* were defined as type AB. The remaining patients with only one or zero mutations detected were not considered for this classification.

The database includes the following entries: personal data (gender, age, and presence of siblings), anamnestic data (age at first stone emission, number of emitted stones, type and number of surgical interventions [extracorporeal shock wave lithotripsy being excluded due to its low efficacy in treating the stones]), laboratory data (including creatinine plasma levels and amino acid urinary excretion), and genetic data (screening for mutations in *SLC3A1* and *SLC7A9*). To compare patients of different ages, number of emitted stones and surgical interventions were considered as events *per year* of life.

Heterozygotes

The urinary levels of cystine and dibasic amino acids of the parents of the patients (obligated heterozygotes) and of siblings whose carrier status was genetically proven were also introduced when available in the database.

Controls

Amino acid urinary excretions were measured in 83 healthy subjects, relatives of the affected patients, who agreed to undergo genetic analysis and who were found not to carry the mutations of the probands and/or the affected chromosome.

Genetic Analysis

All patients included in the database agreed to undergo genetic analysis. So far, 210 patients have been analyzed by means of single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and/or direct sequencing, as described previously (16,19).

Statistical Analyses

Comparisons between proportion of males and females have been performed through the binomial test. Comparison between groups was performed by means of Mann-Whitney or with *t* test as appropriate. ANOVA for multiple comparisons (Bonferroni test) was used when needed. Correlation between amino acid urinary excretion and stone events was evaluated with Spearman rank correlation coefficient. Each test was considered significant if $P < 0.05$.

Results

Database

Data on 224 patients from 150 families were collected in the database; 125 were male patients, and 99 were female patients. Most were from Italy (69.6%); 16.5% were from Spain, and 13.9% were from Israel.

According to the parents' urinary amino acids, classification was as follows: 31% of the patients were type I, 30% were type non-I, 10% were mixed type, and the remaining 29% were unclassified. In 125 patients, a complete genetic classification was possible: 45.2% were type A, 53.2% were type B, and only 1.6% were type AB (*i.e.*, two patients from one family).

Clinical symptoms were almost identically represented in the groups when either the clinical or genetic classification was considered; to provide data from a larger series, the figures concerning clinical aspects of the disease refer to the urinary amino acid-based classification. Clinical manifestations of cystinuria were early events in all patients. Average age at detection of first renal stone was 13.1 yr (median, 15; SD, \pm 9.3) for type I and 11.7 yr (median, 14; SD, \pm 8) for type non-I ($P = \text{NS}$). Male and female patients had a similar average age at onset (13.6 yr for type I in male patients [median, 15] and 12.4 yr for type I in female patients [median, 12]; 12.1 yr for type non-I in male patients [median, 14] and 11.08 yr for type non-I in female patients [median, 10.5]), but if we look at the gender distribution in the first 3 yr of life, 35 male patients and only 14 female patients reported having had disease-related symptoms ($P = 0.003$). All patients except one had their first renal stone detected before the age of 40 (Figure 1). Twelve siblings of affected patients with increased urinary excretion of cystine and dibasic amino acids who did not develop renal

stones were also included in the database. Two of them are over 40 yr of age (one is 43 and the other is 65). In 10 of the 12 patients, full genetic confirmation of the disease was obtained (*i.e.*, two mutations were identified in *SLC3A1* or *SLC7A9*). In two patients, a single mutation was identified in *SLC3A1* in one and in *SLC7A9* in the other.

On average, renal stone emissions occurred one every 4 yr, with no difference between type I and non-I. Male patients had on average one emitted stone every 3 yr, and female patients had one every 5 yr ($P = 0.02$; Figure 2). Total stone events (spontaneously emitted stones plus those surgically removed) resulted as follows: male patients had on average 0.42 episodes per year (type I, 0.47/yr; type non-I 0.44/yr; $P = NS$), and female patients averaged 0.21 episodes per year (type I, 0.17/yr; type non-I, 0.27/yr; $P = NS$). Disease figures are similar if we only consider fully genotyped patients with a full report of data (Table 1).

Urinary amino acid excretion in the patients was very similar in the two types of cystinuria. Excretion patterns in patients with genetic confirmation of the disease are reported in Table 2; no significant difference was evident between type A and B patients in the urinary excretion of cystine and dibasic amino acids. Type A male and female patients had similar amino acid urinary excretion, whereas type B female patients in this set of patients excreted a higher amount of cystine than male patients. The sum of cystine and dibasic amino acids was also significantly higher. No significant correlation was found between the level of amino acid urinary excretion and the incidence of stone events.

Seventeen percent of the patients had mild renal insufficiency, but only one of them reached end-stage renal failure: 146 patients (out of 176 with reported data) had a plasma creatinine below 120 $\mu\text{mol/L}$ and in 6 it was higher than 200 $\mu\text{mol/L}$. In Fig 3 plasma creatinine for all patients older than 15 is reported.

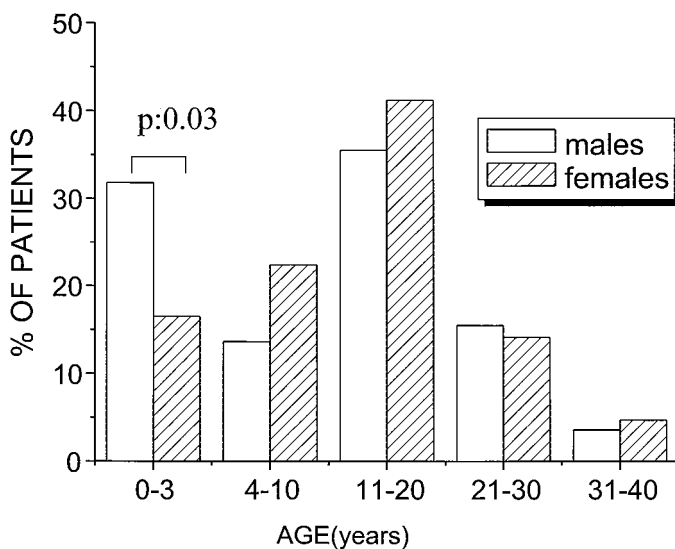


Figure 1. Age at fist stone discovery.

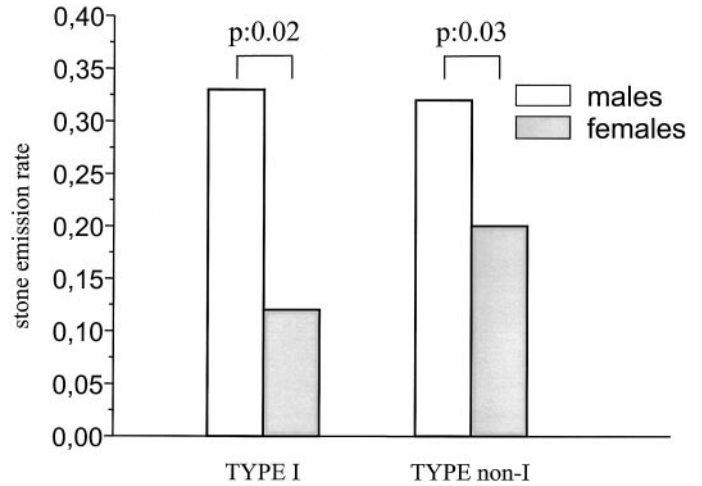


Figure 2. Stone emission rates in male and female patients: cystinuria types classified according to parents urinary excretion.

Genetic Analysis

Genetic analysis has so far been completed in 188 out of 224 patients: in 125 patients (67%) two mutations have been identified, in 52 one mutation has been detected and in 11, from 6 families, no mutations have yet been detected. This means that 84.5%, 83.7%, and 74.0% of type I, type non-I, and unclassified cystinuria independent alleles have been explained. Stratifying the genotyped patients according to amino acid urinary excretion reveals that 34.6% were type I, 33.5% were type non-I, 12.2% were mixed type (I/non-I), and 19.7% remained unclassified. The mixed-type group was composed of 23 patients from 14 families. In two of these families, we detected mutations in both *SLC3A1* and *SLC7A9*: one mutation in each gene in one family and one mutation in *SLC3A1* and two mutations in *SLC7A9* in each allele in the other family. Two and one *SLC7A9* mutations were identified in four and six families, respectively. In the remaining two families one *SLC3A1* mutation was identified.

Unexplained alleles in the 188 studied patients could be due to mutations outside the coding region or mutations that escape SSCP analysis. Linkage studies of the families with an incomplete genotype do not exclude the *SLC3A1* and *SLC7A9* loci (data not shown). Therefore, additional cystinuria loci for these families is unlikely. A manuscript with a complete report of the newly identified mutations is in preparation.

Controls

Amino acid urinary excretion of the controls is reported in Table 3.

Heterozygotes with Genetic Classification

Table 3 provides a report of the cystine and dibasic amino acid urine levels of 47 type A and 142 type B carriers. The attribution of these subjects to each group was genetically confirmed. The difference in urinary excretion between the two sets is obviously very significant, but it is worth noting that, although the sums of cystine and dibasic amino acids in type A

Table 1. Disease figure for types A and B

	<i>n</i>	Age at First Stone Average (\pm SD)	Spontaneous Emissions Average (\pm SD)	Total Stone Events Average (\pm SD)
Type A	48	12.2 (\pm 8.9)	0.31 (\pm 0.72)	0.35 (\pm 0.73)
Type B	59	12.8 (\pm 10.8)	0.34 (\pm 0.6)	0.39 (\pm 0.63)

Table 2. Excretion patterns

	Type A $\mu\text{mol/g}$ Creatinine				Type B $\mu\text{mol/g}$ Creatinine			
	M (\pm SD) (<i>n</i> = 33)	F (\pm SD) (<i>n</i> = 22)	<i>P</i>	Overall (\pm SD) (<i>n</i> = 55)	M (\pm SD) (<i>n</i> = 43)	F (\pm SD) (<i>n</i> = 29)	<i>P</i>	Overall (\pm SD) (<i>n</i> = 72)
Cystine	1812 (1176)	2295 (1693)	NS	2013 (1418)	1540 (1012)	1934 (959)	0.05	1704 (1003)
Lysine	7259 (3911)	8495 (5057)	NS	7753 (4403)	5715 (3352)	7025 (3438)	NS	6269 (3427)
Ornithine	2928 (2835)	2197 (1899)	NS	2644 (2518)	1818 (1202)	2415 (1663)	NS	2068 (1434)
Arginine	2780 (2341)	2988 (1975)	NS	2863 (2185)	2776 (1755)	3251 (1912)	NS	2976 (1825)
Sum	15156 (8422)	15980 (9088)	NS	15489 (8618)	11442 (5057)	14627 (5945)	0.01	12781 (5633)

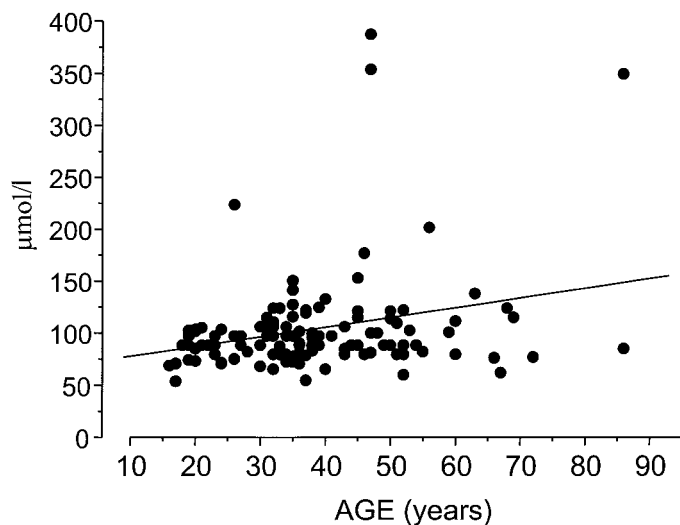


Figure 3. Plasma creatinine in patients over 15 yr of age. One patient, in renal replacement therapy, is not reported in the figure.

heterozygotes were within the range of the controls, these values were within the 95th percentile of the controls in 14% of those of type B (Figure 4). If the classification were based solely on urinary excretion patterns, these findings would lead to an erroneous classification of the offspring. The overlapping was also confirmed when we log plotted cystine and lysine according to Rosenberg (21) (Figure 5). It is important to note that 5.5% (*i.e.*, eight individuals) and 80.5% of type B heterozygotes had amino acid urine levels within the range of type

II and type III heterozygotes, respectively, in accordance with the classification of Kelly (20). Therefore, according to the old classification system, mutations in *SLC7A9* were associated with the three phenotypic types of cystinuria.

Discussion

Cystinuria prevalence has been estimated to vary from 1:2500 in a Libyan-Jewish population to 1:100,000 in Sweden (1). Screening tests for cystinuria in Japan identified six patients out of 110,000 students. None of these showed stone formation in a 7-yr follow-up (22). In Quebec, 17 patients were diagnosed through a neonatal screening program (23). These patients were followed, and four of eight patients with type I cystinuria developed cystine stone in their first decade (24).

The relative rarity of this condition accounts for the absence of large series reports in the literature. Most of the available clinical data concerning cystinuria deal with specific problems: surgical techniques, the effect of medical or surgical treatment on the occurrence of stone relapses, and the effect of diet (25–30). Our multinational database presently collects data on 224 patients, most of whom have been screened for genetic mutations, allowing a complete genetic definition of the two alleles in 60%. This represents the largest series reported so far. It is not a Registry, as we are not collecting all possible cases; therefore, it cannot provide a disease prevalence. Moreover, it is possible that subjects exist with mutations on both alleles of either chromosome 2 or 19 but without renal stone formation or detection. These patients would not be reported to the database, as it has not been set up as a screening program. Twelve such

Table 3. Amino acid urinary excretion

	Controls <i>n</i> = 83 μmol/g creatinine			Type A <i>n</i> = 47 μmol/g creatinine			Type B <i>n</i> = 142 μmol/g creatinine		
	Mean	5 th to 95 th	SD	Mean	5 th to 95 th	SD	Mean	5 th to 95 th	SD
Cystine	52	23 to 109	26	70	21 to 160	46	475	59 to 1298	413
Lysine	181	35 to 499	151	171	28 to 359	123	1692	144 to 4311	1309
Ornithine	28	7 to 70	23	26	5 to 62	26	172	11 to 509	216
Arginine	17	0 to 48	24	24	0 to 51	27	85	0 to 296	142
Total	277	93 to 620	172	300	100 to 555	153	2435	338 to 5923	1798

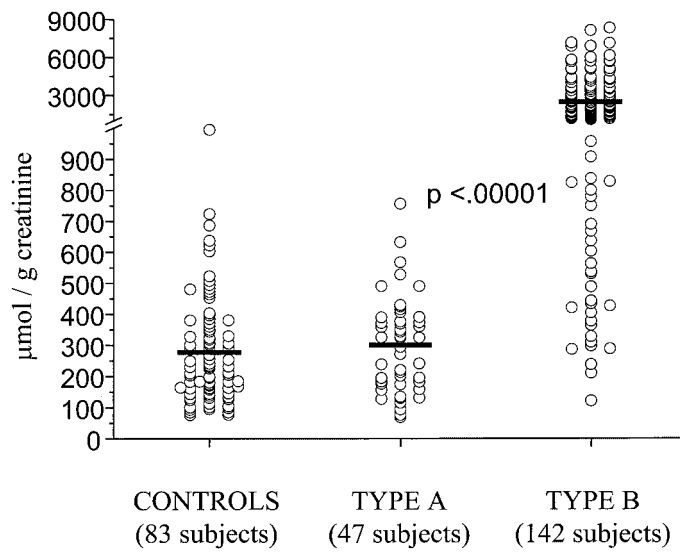


Figure 4. Sum of cystine, lysine, ornithine, arginine in parents of probands (obligated heterozygotes), with a precise genetic characterization and in controls (relatives of the affected, without the mutation of the probands).

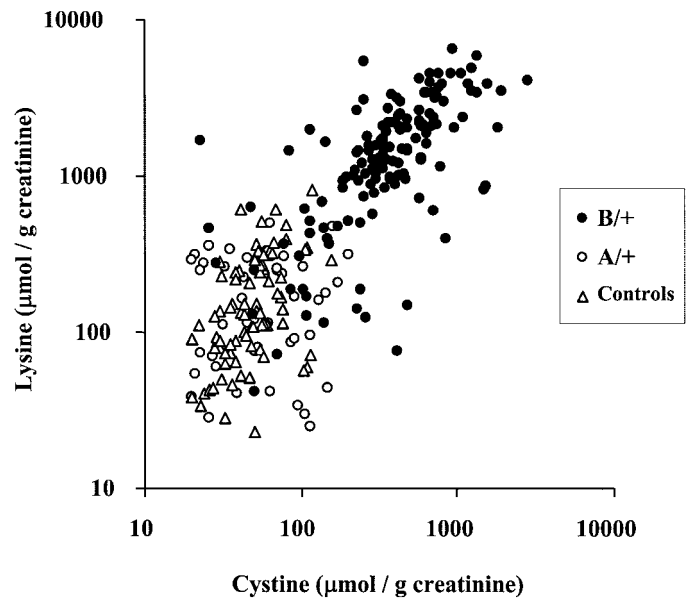


Figure 5. Distribution of genetically confirmed heterozygotes according to log plotting of cystinuria and lysinuria.

patients were indeed detected when the siblings of symptomatic patients were being studied.

Our data show that renal stones occur early in life when cystinuria is symptomatic; the great majority of the patients had their first stone identified before the age of 30 yr (82.9% in the first two decades). Only one patient was diagnosed after the age of 40; however, two other patients included in the database with a negative history for renal stones are older than that. The proportion of the two subtypes of cystinuria (I and non-I) is almost identically represented in the database. The age at onset, the clinical outcome and the severity of the disease do not differ in the two subtypes. Indeed, no difference in stone emissions or number of interventions per year is evident between the two subtypes. We may not, however, exclude that the treatment received by the patients might have influenced the outcome, blunting differences between patients. Severe cases may indeed have received a stronger treatment.

No differences in the age of onset could be detected between male and female patients, but an early appearance of the stones was more likely to occur in male patients than in female

patients. Male patients are more severely affected than female patients. In fact, male patients produce significantly more renal stones. The differences in severity between the genders, in addition to marked intrafamilial differences between siblings sharing the same mutations (31) suggest that other lithogenic factors, both genetic and environmental, play a role in determining the final phenotype.

Amino acid urine excretion was also similar for patients with mutations in *SLC3A1* and those with mutations in *SLC7A9*. Stone event frequency did not correlate with urinary excretion of any of the considered amino acids or with the sum of urinary dibasic amino acid and cystinuria. As urinary excretion of cystine is always well above the solubility threshold, mild differences in urinary excretion of cystine and/or dibasic amino acid might not induce significant differences in stone formation and, again, other factors and/or treatment, may play a determinant role.

Type B female patients (*i.e.*, bearing two mutated *SLC7A9* alleles) excreted a higher amount of cystine than did the male patients. We have no explanation for this finding.

Renal insufficiency, defined as plasma creatinine higher than 120 $\mu\text{mol/L}$, was identified in 17% of our patients. It is important to note that renal function was only studied by measuring plasma creatinine, which is a rather imprecise method, but it is reliable enough to obtain a picture of the occurrence of chronic renal failure in this disease. Renal function was previously studied in 40 patients (19 female and 21 male) (32) by means of a gamma camera renography (indicators were $^{51}\text{Cr-EDTA}$ in 29 cases, $^{99\text{m}}\text{Tc-DTPA}$ in 5, and iothexol in 1). The conclusion of the authors was that renal function was impaired in 70% of the patients after a mean follow-up of 25.9 yr (range, 1 to 52 yr).

In previous studies, mutations in *SLC3A1* have been associated with type I disease, and type II and III disease (type no-I) have been attributed to mutations in *SLC7A9*. However, in this study an analysis of the urinary amino acid excretion patterns in heterozygotes demonstrated that a *SLC7A9* carrier status was compatible with a normal amino acid urinary pattern in 14% of the cases. This makes the classification of cystinuria used so far imprecise. Genetic classification would, therefore, be a more appropriate way to classify patients with cystinuria. The classification we propose is therefore as follows:

TYPE A: Cystinuria caused by mutations in both alleles of *SLC3A1* (chromosome 2). In this type, heterozygotes show a normal amino acid urinary pattern.

TYPE B: Cystinuria caused by mutations in both alleles of *SLC7A9* (chromosome 19). In this type heterozygotes usually (but not always) show an increase of cystine and dibasic amino acid urinary excretion but may also have a normal pattern as demonstrated in 14% of our cases.

TYPE AB: Cystinuria caused by one mutation in *SLC3A1* and one mutation in *SLC7A9*. This type would involve the offspring of one parent carrier of a mutation on chromosome 2 and of another parent with a mutation on chromosome 19. Interestingly, the observed prevalence of AB patients was much lower than expected. Considering a similar frequency of mutations in *SLC7A9* and *SLC3A1*, we would expect one third of the patients to suffer from type A disease, one third from B disease, and one third from AB disease. Indeed, the prevalence of type A disease is similar to that of type B disease; however, type AB is extremely rare (only two patients from one family in our database). Two explanations could account for this low prevalence. The first, type AB patients may suffer from a mild phenotype and therefore, in most cases, escape detection. Alternatively, these patients may actually represent type B disease (two mutations in *SLC7A9*, one of which was detected, the other yet to be defined) and a coincidental carrier state for an *SLC3A1* mutation. Indeed, one patient from our database has three mutations, M467T in *SLC3A1* and two missense mutations in *SLC7A9*, one in each allele.

In conclusion, no clinical differences were evident in this retrospective study between cystinuria type A (due to *SLC3A1* mutations) and B (due to *SLC7A9* mutations). Male patients are more severely affected than female patients. Renal function is clearly impaired in 17% of patients. Renal stone formation cannot be directly correlated with amino acid urinary excretion, suggesting the importance of cofactors of lithogenesis. A

type B carrier status was compatible with a normal amino acid urinary pattern in 14% of cases. A reliable classification of cystinuria requires the identification of the mutations in both alleles. The existence of type AB cystinuria is possible but needs to be confirmed.

Acknowledgments

Part of these data were presented at the 2001 Congress of the International Society of Nephrology, San Francisco, October 10 to 17, 2001. We thank Lidia Feliubadaló for her critical reading of the article and Vincenzo Maria Di Ciommo for his help with statistical procedure. This research was supported in part by BIOMED BMH4 CT 98–3514 to V Nunes, M Palacín, and G Rizzoni, by La Marató de TV3 Grant N° 981932 to F Rousaud, V Nunes, and M Palacín, and by the support of the Comissionat per a Universitats i Recerca de la Generalitat de Catalunya (Spain) to M Palacín. M Font is the recipient of a fellowship from the Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica, Catalonia, Spain.

References

1. Segal S, Thier SO: Cystinuria, In: *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 6th edition, edited by Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, New York, McGraw-Hill Book Co, 1989, pp 2479–2496
2. Rosenberg LE, Downing S, Durant JL, Segal S: Cystinuria: Biochemical evidence for three genetically distinct diseases. *J Clin Invest* 45: 365–371, 1966
3. Rosenberg LE, Crawhall JC, Segal S: Intestinal transport of cystine and cysteine in man: Evidence for separate mechanisms. *J Clin Invest* 46: 30–34, 1967
4. Palacín M, Goodyer P, Nunes V, Gasparini P. Cystinuria, In: *The Molecular and Metabolic Bases of Inherited Disease*, 8th edition, Edited by Scriver CR, Beaudet AL, Sly SW, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, McGraw-Hill. New York, 2001, pp 4909–4932
5. Calonge MJ, Nadal M, Calvano S, Testar X, Zelante L, Zorzano A, Estivill X, Gasparini P, Palacin M, Nunes V: Assignment of the gene responsible for cystinuria (rBAT) and of markers D2S119 and D2S177 to 2p16 by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 95: 633–636, 1995
6. Zhang XX, Rozen R, Hediger MA, Goodyer P, Eydoux P: Assignment of the gene for cystinuria (*SLC3A1*) to human chromosome 2p21 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 24: 413–414, 1994
7. Calonge MJ, Gasparini P, Chillaron J, Chillon M, Gallucci M, Rousaud F, Zelante L, Testar X, Dallapiccola B, Di Silverio F: Cystinuria caused by mutations in rBAT, a gene involved in the transport of cystine. *Nat Genet* 6: 420–425, 1994
8. Calonge MJ, Volpini V, Bisceglia L, Rousaud F, de Sanctis L, Beccia E, Zelante L, Testar X, Zorzano A, Estivill X: Genetic heterogeneity in cystinuria: The *SLC3A1* gene is linked to type I but not to type III cystinuria. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9667–9671, 1995
9. Gasparini P, Calonge MJ, Bisceglia L, Purroy J, Dianzani I, Notarangelo A, Rousaud F, Gallucci M, Testar X, Ponzzone A: Molecular genetics of cystinuria: Identification of four new mutations and seven polymorphisms, and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 57: 781–788, 1995
10. Chillaron J, Estevez R, Samarzija I, Waldegger S, Testar X, Lang F, Zorzano A, Busch A, Palacin M: An intracellular trafficking

- defect in type I cystinuria rBAT mutants M467T and M467K. *J Biol Chem* 272: 9543–9549, 1997
11. Palacin M, Borsani G, Sebastio G: The molecular bases of cystinuria and lysinuric protein intolerance. *Curr Opin Genet Dev* 11: 328–335, 2001
 12. Feliubadalo L, Bisceglia L, Font M, Dello Strologo L, Beccia E, Arslan-Kirchner M, Steinmann B, Zelante L, Estivill X, Zorzano A, Palacin M, Gasparini P, Nunes V: Recombinant families locate the gene for non-type I cystinuria between markers C13 and D19S587 on chromosome 19q13.1. *Genomics* 60: 362–365, 1999
 13. Bisceglia L, Calonge MJ, Totaro A, Feliubadalo L, Melchionda S, Garcia J, Testar X, Gallucci M, Ponzzone A, Zelante L, Zorzano A, Estivill X, Gasparini P, Nunes V, Palacin M: Localization, by linkage analysis, of the cystinuria type III gene to chromosome 19q13.1. *Am J Hum Genet* 60: 611–616, 1997
 14. Wartenfeld R, Golomb E, Katz G, Bale SJ, Goldman B, Pras M, Kastner DL, Pras E: Molecular analysis of cystinuria in Libyan Jews: Exclusion of the SLC3A1 gene and mapping of a new locus on 19q. *Am J Hum Genet* 60: 617–624, 1997
 15. Pras E, Kreiss Y, Frishberg Y, Prosen L, Aksentijevich I, Kastner DL: Refined mapping of the CSNU3 gene to a 1.8-Mb region on chromosome 19q13.1 using historical recombinants in Libyan Jewish cystinuria patients. *Genomics* 60: 248–250, 1999
 16. Feliubadalo L, Font M, Purroy J, Rousaud F, Estivill X, Nunes V, Golomb E, Centola M, Aksentijevich I, Kreiss Y, Goldman B, Pras M, Kastner DL, Pras E, Gasparini P, Bisceglia L, Beccia E, Gallucci M, de Sanctis L, Ponzzone A, Rizzoni GF, Zelante L, Bassi MT, George AL Jr, Palacin M: Non-type I cystinuria caused by mutations in SLC7A9, encoding a subunit (bo,+AT) of rBAT. International Cystinuria Consortium. *Nat Genet* 23: 52–57, 1999
 17. Chillaron J, Roca R, Valencia A, Zorzano A, Palacin M: Heteromeric amino acid transporters: Biochemistry, genetics, and physiology. *Am J Physiol Renal Physiol* 281: F995–F1018, 2001
 18. Fernández E, Carrascal M, Rousaud F, Abián J, Zorzano A, Palacín M, Chillarón J: The rBAT-bo,+AT heterodimer is the main apical reabsorption system for cystine in kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* DOI 10.1152/ajprenal.00071.2002 (online ahead of publication), 2002
 19. Font MA, Feliubadalo L, Estivill X, Nunes V, Golomb E, Kreiss Y, Pras E, Bisceglia L, d'Adamo AP, Zelante L, Gasparini P, Bassi MT, George AL Jr, Manzoni M, Riboni M, Ballabio A, Borsani G, Reig N, Fernandez E, Zorzano A, Bertran J, Palacin M: Functional analysis of mutations in SLC7A9, and genotype-phenotype correlation in non-Type I cystinuria. *Hum Mol Genet* 10: 305–316, 2001
 20. Kelly S: Cystinuria genotypes predicted from excretion patterns. *Am J Med Genet* 2: 175–190, 1978
 21. Rosenberg LE: Cystinuria: Genetic heterogeneity and allelism. *Science* 154: 1341–1343, 1966
 22. Ito H, Murakami M, Miyauchi T, Mori I, Yamaguchi K, Usui T, Shimazaki J: The incidence of cystinuria in Japan. *J Urol* 129: 1012–1014, 1983
 23. Goodyer PR, Clow C, Reade T, Girardin C: Prospective analysis and classification of patients with cystinuria identified in a newborn screening program. *J Pediatr* 122: 568–572, 1993
 24. Goodyer P, Saadi I, Ong P, Elkas G, Rozen R: Cystinuria subtype and the risk of nephrolithiasis [see comments]. *Kidney Int* 54: 56–61, 1998
 25. Salas SM, Martin X, Gelet A, Sanseverino R, Marechal JM, Michel DJ: [Long-term results of endourological treatment with and without ESWL in cystine lithiasis]. *Arch Esp Urol* 44: 273–280, 1991
 26. Singer A, Das S: Therapeutic dilemmas in management of cystine calculi. *Urology* 37: 322–326, 1991
 27. Perazella MA, Buller GK: Successful treatment of cystinuria with captopril [see comments]. *Am J Kidney Dis* 21: 504–507, 1993
 28. Norman RW, Manette WA: Dietary restriction of sodium as a means of reducing urinary cystine. *J Urol* 143: 1193–1195, 1990
 29. Chow GK, Strem SB: Contemporary urological intervention for cystinuric patients: immediate and long-term impact and implications. *J Urol* 160: 341–344, 1998
 30. Joly D, Rieu P, Mejean A, Gagnadoux MF, Daudon M, Jungers P: Treatment of cystinuria. *Pediatr Nephrol* 13: 945–950, 1999
 31. Dello Strologo L, Carbonari D, Gallucci M, Gasparini P, Bisceglia L, Zelante L, Rosaud F, Nunes V, Palacin M, Rizzoni G: Inter and intrafamilial clinical variability in patients with cystinuria type I and identified mutation. *J Am Soc Nephrol* 8: 388A, 1997
 32. Lindell A, Denneberg T, Granerus G: Studies on renal function in patients with cystinuria. *Nephron* 77: 76–85, 1997

**Access to UpToDate on-line is available for additional clinical information
at <http://www.jasn.org/>**

MEDICAL GENETICS IN PRACTICE

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

M Font-Llitjós*, M Jiménez-Vidal*, L Bisceglia*, M Di Perna, L de Sanctis, F Rousaud, L Zelante, M Palacín, V Nunes

J Med Genet 2004;000:1–11. doi: 10.1136/jmg.2004.022244

See end of article for authors' affiliations

Correspondence to:
Dr Virginia Nunes, Centre de Genètica Mèdica i Molecular (IRO), Hospital Duran i Reynals, Gran Via Km 2.7, s/n, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona E-08907, Spain; vnunes@iro.es

Received in revised form 3 September 2004
Accepted for publication 8 September 2004

Objective: To clarify the genotype–phenotype correlation and elucidate the role of digenic inheritance in cystinuria.

Methods: 164 probands from the International Cystinuria Consortium were screened for mutations in *SLC3A1* (type A) and *SLC7A9* (type B) and classified on the basis of urine excretion of cystine and dibasic amino acids by obligate heterozygotes into 37 type I (silent heterozygotes), 46 type non-I (hyperexcretor heterozygotes), 14 mixed, and 67 untyped probands.

Results: Mutations were identified in 97% of the probands, representing 282 alleles (86.8%). Forty new mutations were identified: 24 in *SLC3A1* and 16 in *SLC7A9*. Type A heterozygotes showed phenotype I, but mutation DupE5-E9 showed phenotype non-I in some heterozygotes. Type B heterozygotes showed phenotype non-I, with the exception of 10 type B mutations which showed phenotype I in some heterozygotes. Thus most type I probands carried type A mutations and all type non-I probands carried type B mutations. Types B and A mutations contributed to mixed type, BB being the most representative genotype. Two mixed cystinuria families transmitted mutations in both genes: double compound heterozygotes (type AB) had greater aminoaciduria than single heterozygotes in their family.

Conclusions: Digenic inheritance is an exception (two of 164 families), with a limited contribution to the aminoaciduria values (partial phenotype) in cystinuria. Further mutational analysis could focus on one of the two genes (*SLC3A1* preferentially for type I and *SLC7A9* for type non-I probands), while for mixed probands analysis of both genes might be required, with priority given to *SLC7A9*.

Cystinuria is an autosomal inherited metabolic disorder characterised by impaired transport of cystine and dibasic amino acids in the proximal renal tubule and the gastrointestinal tract. A high cystine concentration in the urinary tract most often causes the formation of recurring renal cystine stones because of the low solubility of this amino acid. The overall estimated prevalence of the disease is 1/7000 neonates, ranging from 1/2500 neonates in Libyan Jews to 1/100 000 in the Swedish population.¹

Cystinuria is classified into three types according to the urine phenotype in heterozygotes: type I (MIM220100), type non-I (MIM600918), and mixed. In type I cystinuria, heterozygotes have a normal pattern of amino acid excretion in the urine (phenotype I), which implies that the disease is transmitted by an autosomal recessive trait. In non-type I cystinuria, heterozygotes have a variable degree of hyperexcretion of cystine and dibasic amino acids (phenotype non-I), indicating that the disease is transmitted in a dominant mode with incomplete penetrance.² Patients with mixed type cystinuria, who inherit phenotype I and non-I alleles from either parent, have also been described.³

Two genes responsible for cystinuria have been identified. Mutations in *SLC3A1*, located on chromosome 2p16.3–21 and encoding the b⁰⁺ transporter related protein rBAT, have up to now been shown to cause only type I cystinuria,^{4–7} and not type non-I.^{8–9} The gene causing type non-I cystinuria was assigned by linkage analysis to 19q12–13.1,^{9–10} confined to a 1.3 Mb region¹¹ and identified as *SLC7A9*,² the protein product of which (b⁰⁺AT) heterodimerises with rBAT (*SLC3A1*) in kidney brush border membranes.¹² The rBAT/b⁰⁺AT heteromeric complex is responsible for the b⁰⁺ amino acid transport

system. This transporter belongs to the heteromeric amino acid transporter (HAT) family, which is formed by a heavy subunit (rBAT or 4F2hc) linked by a disulphide bridge to a range of light subunits (b⁰⁺AT in the case of rBAT).¹³ At present, 79 *SLC3A1* and 50 *SLC7A9* mutations—including nonsense, missense, splice site, and frameshift mutations and large rearrangements in both genes—have been described.^{1 2 6 8 14–27}

Despite the classification of the disease described above, we found that some *SLC7A9* heterozygotes presented a urinary excretion phenotype near the control range, resembling *SLC3A1* heterozygotes that are phenotypically silent.²¹ Since then, phenotype I heterozygotes carrying *SLC7A9* mutations have been reported, and two *SLC7A9* mutations (I44T and P261L) have been associated with this phenotype.^{24–28} These findings make the existing cystinuria classification imprecise because type I cystinuria could be caused by mutations in *SLC7A9* instead of *SLC3A1*. Consequently, a new scheme based only on genetic aspects has recently been proposed²⁸: type A, caused by two mutations in *SLC3A1* (rBAT); type B, caused by two mutations in *SLC7A9* (b⁰⁺AT); and the possibility of type AB, with one mutation on each of the above genes (that is, cystinuria with digenic inheritance). However, it remains unclear whether type AB implies a digenic inheritance of the disease. Given a similar frequency of mutations in *SLC7A9* and *SLC3A1*,^{24–28} we would expect half to be from AB disease. The prevalence of type A disease is

Abbreviations: DHPLC, denaturing high performance liquid chromatography; HAT, heteromeric amino acid transporter; RT-PCR, reverse transcriptase polymerase chain reaction; SSCP, single strand conformation polymorphism

similar to that of type B disease, but type AB is extremely rare.^{24–28} Two explanations could account for this low prevalence. Type AB patients may have a mild phenotype and escape detection. Alternatively, these individuals may represent type B or type A disease with a coincidental mutation in the other subunit gene. In this case, type AB carriers might be obligate heterozygotes with the possibility of digenic inheritance causing some effects at the phenotypic level.

We focused our study on an exhaustive mutational analysis of a large cohort of patients with extensive genotype–phenotype correlations in order to clarify the cystinuria classification from a genetic point of view. Special emphasis was placed on *SLC7A9* alleles that segregate as a silent phenotype in obligate heterozygotes, on mixed cystinuria families, and on possible digenic cases. Here we report the following: 40 new cystinuria specific mutations (24 in *SLC3A1* and 16 in *SLC7A9*); 10 *SLC7A9* mutations that associate with phenotype I in heterozygotes; the first *SLC3A1* mutation (dupE5-E9) that associates with phenotype non-I in heterozygotes; and two families with mixed cystinuria which carry mutations in both genes and whose amino acid excretion phenotype in urine indicates a contribution of digenic inheritance, described for the first time in cystinuria.

METHODS

Patients: phenotypic and genetic classification

The institutional review board of the participating centres approved the study and participants gave their informed consent.

Amino acid excretion was determined using morning urine samples or in a 24 hour collection, as described,²⁹ and corrected per gram of creatinine excreted. All subjects who fulfilled the following criteria were included in the study:

- urine cystine excretion more than 1040 $\mu\text{mol/g}$ creatinine in a single urine sample or in a 24 hour collection, and at least one identified cystine stone (emitted or surgically removed);
- siblings of cystinuria patients, defined above, with the same genetic mutations, even in the absence of stone identification.

We studied 164 independent patients and their relatives of the International Cystinuria Consortium (ICC) database. These probands were from Italy (91), Spain (50), Israel (12), Belgium (4), Portugal (3), Switzerland (2), England (1),

and Germany (1). Information on genotype or phenotype for some of these patients is available elsewhere.^{2 14 15 20–22 28}

For phenotype–genotype correlation studies two classifications were established, one based on urinary amino acid excretion and the other on the genetic findings.

Classification based on urinary amino acid excretion

Patients were classified as type I, type non-I, mixed, and untyped on the basis of the urinary excretion values of cystine and dibasic amino acids (lysine, arginine, and ornithine) by the obligate heterozygotes. Thus heterozygotes were considered *phenotype non-I* when at least two of the indices (cystine, lysine, arginine, ornithine, or the sum of cystine and the three dibasic amino acids in the urine) were above the 95th centile in controls; they were considered *phenotype I* when these indices were within the control range.

Type I

Both parents showed a normal urine amino acid pattern (heterozygotes with excretion values within the control range—that is, phenotype I).

Type non-I

Urinary excretion of both parents was above controls (that is, phenotype non-I heterozygotes). In a few cases, the probands had a urinary amino acid profile similar to the parent transmitting the disease and within the upper range of the non-I heterozygote phenotype. In these cases, when the other parent showed a normal urinary excretion phenotype, the probands were considered to be heterozygotes with non-I cystinuria.

Mixed

Urinary excretion was above the control values in one of the parents (phenotype non-I) and normal in the other (phenotype I).

Untyped

Urinary excretion values for one or both parents were not available or were of doubtful classification (that is, inconsistent classification of members of the same family).²¹

Using these criteria, the 164 studied probands were classified as 37 type I, 46 type non-I, 14 mixed, and 67 untyped (table 1).

Table 1 Cystinuria type and genetic frequencies of the probands

Genotype	Cystinuria type					Total probands (%)
	I	Non-I	Non-I carriers*	Mixed	Untyped	
AA	29†			2	25†	56 (34.1)
AA(B)				1		1 (0.6)
BB	1	34‡		7	23†	65 (39.6)
B+			3			3 (1.8)
BB(A)				1		1 (0.6)
A?	5			1	5	11 (6.7)
B?	2	7		2§	11	22 (13.3)
??		2			3	5 (3.0)
Total probands (%)	37 (22.6)	43 (26.2)	3 (1.8)	14 (8.5)	67 (40.9)	164 (100)
Total alleles	74	89	28	134		
Explained alleles (%)	67 (90.5)	78 (87.6)	25 (89.3)	112 (83.6)		

*Heterozygote probands with cystine lithiasis.

†Includes one family with two mutations in the same chromosome in addition to the mutation found in the other chromosome.

‡Includes two families with two mutations in the same chromosome in addition to the mutation found in the other chromosome.

§Includes two families with two mutations found in one chromosome and no mutation found in the other chromosome.

For patients AA(B) and BB(A), two alleles causing the disease and two explained alleles in each case have been taking into account in the calculations. A, allele *SLC3A1* mutated; B, allele *SLC7A9* mutated; +, normal allele; ?, unknown allele.

Table 2 New *SLC3A1* and *SLC7A9* mutations

Type	Nucleotide change	Amino acid change/predicted consequence	Exon or intron	Detection method	
<i>SLC3A1</i> new mutations					
Missense	c.266T→C	L89P	Exon 1	SSCP	
	c.368T→G	M123R	Exon 1	DHPLC	
	c.371A→G	Y124C	Exon 1	DHPLC	
	c.388T→C	S130P	Exon 1	DHPLC/SSCP	
	c.410A→G	D137G	Exon 1	DHPLC	
	c.446T→A	L149Q	Exon 2	DHPLC	
	c.566C→T	T189M	Exon 2	SSCP	
	c.1043A→C	H348P	Exon 6	DHPLC	
	c.1230C→A	N410K	Exon 7	DHPLC	
	c.1322C→G	P441R	Exon 7	SSCP	
	c.1364C→T	S455L	Exon 8	DHPLC	
	c.1366C→T	R456C	Exon 8	DHPLC/SSCP	
	c.1367G→A	R456H	Exon 8	SSCP	
	c.1520C→T*	S507L	Exon 9	SSCP	
	c.1702G→A	G568S	Exon 10	DHPLC	
	c.1998C→G	C666W	Exon 10	DHPLC	
	Nonsense	c.1865T→G*	L622X	Exon 10	SSCP
c.1035G→A		Aberrant splicing†	Exon 6	SSCP	
Silent	c.1012-23C→G	D338_Y378delfsX5	Intron 5	SSCP and RT-PCR	
Splice	c.664delT	W222fsX3	Exon 3	SSCP	
Frameshift	c.1221dupT	P408fsX18	Exon 7	SSCP	
	c.1699_1700delAG	R567fsX8	Exon 10	SSCP	
In frame deletion	c.1966_1968delCTT	L656del	Exon 10	SSCP	
Large rearrangements	c.892_1332del	E298_M444del	Intron 4-7	PCR	
<i>SLC7A9</i> new mutations					
Missense	c.184G→A	V62M	Exon 3	DHPLC	
	c.562G→A	V188M	Exon 5	DHPLC	
	c.695A→G	Y232C	Exon 6	SSCP	
	c.847C→T	L283F	Exon 8	DHPLC	
	c.947C→T	A316V	Exon 9	DHPLC	
	Silent	c.171C→T	Aberrant splicing‡	Exon 3	SSCP
		c.235+3_c.235+293del	L30fsX10	Intron 3	RT-PCR
	Splice	c.586C→T	L196_G202delfsX5	Exon 5	SSCP and RT-PCR
		c.604+2T→C	L160X	Intron 5	SSCP
	Frameshift	c.605-3C→A	I203fsX27	Intron5	DHPLC, SSCP
c.1399+1G→T		K447fsX22§	Intron12	DHPLC	
c.1400-3C→G		K447fsX22§	Intron12	DHPLC	
c.151delT		S51fsX38	Exon 3	DHPLC	
c.1265_1266delTG		L424fsX62	Exon 12	DHPLC	
Large rearrangements	c.1224+4166_c.1399+119dup(4972)	K386fsX78	Exon 12	Multiplex	
	c.1224+4166_c.1399+119del(4972)	V409fsX9	Exon 12	Multiplex	

In addition to the 40 listed new mutations, a deletion of the 3' end of *SLC3A1* has been identified in one chromosome of one patient, but the limits of this deletion have not been studied.

When RT-PCR is indicated in the detection method, the effect of the mutation has been determined at the mRNA.

*These two mutations are located in the same chromosome.

†Mutation eliminates an SF2/ASF exonic splicing enhancer motif.

‡Mutation may create an alternative donor splice site 64 bp upstream of the consensus donor site, resulting in the deletion of 22 amino acid residues (N58_G79del22).

§The same protein product prediction but different genomic change.

bp, base pair; RT-PCR, reverse transcriptase polymerase chain reaction.

Classification based on the genetic findings

Patients were classified as type A, type B, type AB, and type ?? on the basis of the genetic findings.

Type A

Probands have mutations in *SLC3A1* (A? for one mutated allele identified and AA for two mutated alleles identified).

Type B

Probands have mutations in *SLC7A9* (B? for one mutated allele identified and, BB and B+ for two mutated alleles identified).

Type AB

Individuals have one mutation in *SLC3A1* and one in *SLC7A9*. Proband with more than two mutated alleles were classified as AA(B) or BB(A), depending on the distribution of mutations in the two genes.²⁸

Type ??

No mutations are found in the probands.

Mutational analysis

Probands and their relatives have been analysed for mutations in *SLC3A1*, *SLC7A9*, or in both genes. Mutations in this cohort of patients have been reported previously^{2 6 8 14 20 22}. Genomic DNA or total RNA was isolated from peripheral blood lymphocytes following standard protocols. Patients with type I or type non-I cystinuria were initially screened for mutations in *SLC3A1* and *SLC7A9*, respectively. Patients not fully genotyped were also analysed for the other cystinuria gene. Untyped patients were analysed for both genes as well. Mutational screening of the whole coding region, all intron/exon boundaries, and some intron sequences (on average 50 base pairs (bp) on each side of the exons) was carried out by polymerase chain reaction (PCR), reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) (when RNA samples were available), single strand conformation polymorphism (SSCP), or Southern blot as described elsewhere,^{14 21} and by

Table 3 Type of mutations distributed by allele in families with mixed cystinuria

Genotype	Families	Alleles	
		Phenotype I	Phenotype non-I
		Explained	Explained
AA	2	2	2
AA(B)*	1	1	1
BB	7	7	7
BB(A)†	1	1	1
A?	1	1	0
B?	2	0	2
Total	14	12	13

The urine phenotype of the obligate heterozygotes was used to classify the phenotype associated to each allele.
 *The proband carries three mutations, two mutations A (one in each *SLC3A1* allele) and one mutation B in one of the *SLC7A9* alleles (see fig 2B).
 †The proband carries three mutations, two mutations B (one in each *SLC7A9* allele) and one mutation A in one of the *SLC3A1* alleles (see fig 2A).

denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) or semiquantitative multiplex PCR as described below. Direct sequencing was also carried out in all the individuals analysed to confirm the results obtained, to identify the mutated position in the gene, and to screen for mutations not detectable by these techniques. Southern blotting or semiquantitative multiplex PCR was used in patients with no mutations or only one mutation found with the other techniques, including direct sequencing. All the mutations described were checked on 100 control chromosomes to discard polymorphisms. Mutations listed or newly described here follow the nomenclature of the Human Genome Variation Society (www.genomic.unimelb.edu.au/mdi/mutnomen/). All new mutations have been introduced in the HGMD database (www.hgmd.org/).

DHPLC analysis

Samples for DHPLC analysis were amplified in a final reaction volume of 50 µl, using 100 ng genomic DNA, 10× PCR buffer with 15 mM MgCl₂ (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), 200 µM dNTPs, 0.30 µM primer, and 1.5 units AmpliTaq Gold™ (Applied Biosystems). PCR cycling conditions consisted of an initial denaturation step at 95°C for 12 minutes followed by 35 cycles at 94°C for 30 seconds; the annealing temperature range was 55–57°C for 30 seconds, followed by 72°C for 30 seconds, and ending with a final elongation step at 72°C for eight minutes. DHPLC analysis was carried out on an automated DHPLC instrument (Transgenomic Inc, Santa Clara, California, USA).

Heteroduplex formation was induced by mixing an aliquot of unpurified PCR amplicon from patients and wild type sample in a 1:1 ratio. The mixed samples were heated to 95°C for five minutes and cooled slowly over 25 minutes to 35°C. Usually, 7–10 µl of reannealed DNA duplexes were injected onto the column and then run at predetermined temperatures on the WAVE® system. The resolution temperature (Tr) for each of the 12 PCR amplicons of genomic DNA from

SLC3A1 and 13 from *SLC7A9* analysed was predicted by using

Table 5 Distribution of alleles per genotype

Probands	Alleles	
	Type A	Type B
AA	112	–
AA(B)*	2	–
BB	–	130
B+	–	3
BB(A)*	–	2
A?	11	–
B?	–	22
Total	125	157
% of total alleles	38.5	48.3
% of identified alleles	44.3	55.7

*In probands with mutations in both genes only the two mutated allele in the same gene have been used for calculations.

WaveMaker software (Transgenomic). The primers used for PCR amplification and DHPLC conditions are reported in table 1s in Supplementary Material, available online at the JMG website (www.jmg.com/supplemental). Fragments that showed variation in retention time or chromatogram shape from that of an unaffected control amplicon were then sequenced following the Big Dye Terminator protocol (PE-ABI, Foster City, California, USA) and analysed on an ABI 3100 DNA sequencer (Applied Biosystems).

Semiquantitative multiplex PCR analysis in *SLC7A9*

We undertook multiplex analysis for *SLC7A9* in 13 patients from independent families in which no mutations or only one mutation had been found with the other techniques. This method was used previously for the analysis of large rearrangements in *SLC3A1*.²⁰ Primer pairs for each of the 13 exons of *SLC7A9* were used (table 2s in Supplementary

Table 4 Distribution of alleles per phenotype

Probands	Alleles					
	Phenotype I			Phenotype non-I		
	Explained	Total	%	Explained	Total	%
I	67	74	90.5	–	–	–
non-I	–	–	–	78	89	87.6
Mixed	12	14	85.7	13	14	92.9
Total	79	88	89.7	91	103	88.3

Table 6 Urine excretion of cystine and dibasic amino acids in heterozygotes bearing the *SLC3A1* mutation dupE5-E9

dupE5-E9 heterozygote	Phenotype	Urine amino acid concentrations (μmol/g creatinine)				
		Cystine	Lysine	Arginine	Ornithine	Sum
F14-C119	non-I	57	481	318*	94*	950*
F77-SR	non-I	218*	1090*	33	30	1371*
F79-A145	non-I	167*	1595*	43	100*	1905*
F79-A148	non-I	998*	1762*	12	133*	2905*
F106-D18	I	53	150	<1	<1	253
F106-D20	untyped	NA	345	<1	35	-
Type A heterozygote (n)†	I (47)	70 (7)	171 (18)	24 (4)	26 (4)	300 (23)
[5th, 95th centile]		[21, 160]	[28, 359]	[0, 51]	[5, 62]	[100, 555]
(+/-) (n)†	Control (83)	52 (3)	181 (16)	17 (3)	28 (3)	277 (19)
[5th, 95th centile]		[23, 109]	[35, 499]	[0, 48]	[7, 70]	[93, 620]

Type A heterozygotes are those carrying mutations in *SLC3A1* other than dupE5-E9. Controls are members of the fully genotyped ICC cystinuria families not carrying the identified type A or type B mutations.

*Values above the 95th centile in controls.

†These values (mean (SEM)) have been reported previously.²⁹

F, family; n, number of individuals; NA, not analysed; <1, below the level of detection.

Material). One primer of each pair was labelled with FAM fluorescence (Invitrogen, San Diego, California, USA). As an external double dose control, a primer pair amplifying exon 5 from *DSCR1* (Down syndrome critical region gene 1) in chromosome 21 was added, together with the other set of 13 primer pairs. In a final volume of 20 μl, we mixed 100 ng DNA, 0.2 mM dNTPs, 1.5 U Taq (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), 0.01% gelatine, PCR buffer with 1.5 mM MgCl₂, and a mix of primers. The reaction started with an initial denaturation of five minutes at 94°C, followed by 23 cycles of 94°C for 25 seconds, 58°C for 25 seconds, and 72°C 25 seconds. A final extension of seven minutes at 72°C was used. The PCR products were loaded on a 48-well acrylamide gel together with an external fluorescent size standard (TAMRA-Gs500) and run in an ABI PRISM 377 DNA sequencer (Applied Biosystems). The results were processed by GENESCAN™ software (fig 1s in Supplementary Material). To confirm the duplication of exon 12 in family 73, we amplified a 518 bp fragment (only in the carriers) with 5 pmol of primers F11 (5'-ATGATTGAAATTGGAGGAGGG-3') and R10d (5'-CCTAATAAGCAGTCTACAAGA-3'), following standard methods, for 36 cycles of 94°C 30 seconds, 58°C 30 seconds, 74°C 30 seconds, plus five minutes at 74°C. To confirm the deletion in family 94, we amplified a 251 bp fragment using 5 pmol of primer F13 (5'-CAGACCATACTGTAAAGGACC -3') and R13 (5'-CGTGGGCATGTGTCCTCT -3'), following standard methods, for 36 cycles, 10 cycles of 94°C 30 seconds, 60°C 30 seconds, 74°C 30 seconds, 26 cycles of 90°C 30 seconds, 59°C 30 seconds, 74°C 30 seconds, plus seven minutes at 74°C.

RESULTS

Identification of 40 new cystinuria specific mutations in *SLC3A1* and *SLC7A9*

Mutational analysis was carried out exhaustively in 164 families that transmit cystinuria and which are included in the ICC database. We identified 24 new mutations in *SLC3A1* and 16 in *SLC7A9* (table 2). None of these mutations was identified in 100 control chromosomes tested (data not shown). They included five frameshift mutations (three in *SLC3A1* and two in *SLC7A9*) and one nonsense mutation in *SLC3A1* which produce early stop codons; seven splice mutations (one in *SLC3A1* and six in *SLC7A9*); 22 changes that affect single amino acid residues (16 and five missense mutations in *SLC3A1* and *SLC7A9*, respectively, and one deletion of a single amino acid residue in *SLC3A1*); two silent changes affecting the coding region of the gene (one in

SLC3A1 and one in *SLC7A9*); and three large rearrangements (one in *SLC3A1* and two in *SLC7A9*).

The two large *SLC7A9* rearrangements were detected in two patients by semiquantitative multiplex PCR analysis: a 5 kb deletion (c.1224+4166_c.1399+119del) and a 5 kb duplication (c.1224+4166_c.1399+119dup), both affecting exon 12, originated by the crossing over of two 195 bp sequences which differ by one nucleotide and are separated by 4778 bp (fig 2s in Supplementary Material). The abnormal multiplex exon pattern in these two patients is shown in fig 3s in Supplementary Material. These two mutations were confirmed by PCR primers which specifically amplify the mutated allele in both cases (fig 2s in Supplementary Material). The protein product expected from the 5 kb duplication would have a frameshift from residue K386 with the addition of 78 missense residues before the first stop codon (p.K386fsX78). The 5 kb deletion affects intron 11 and the first 100 bp of the 175 bp of exon 12, and most probably results in the skipping of exon 12, because the donor splice site is deleted and there are no potential donor sites around. The protein product of this deletion would have a frameshift from residue V409, adding nine missense residues before the first stop codon (p.V409fsX9), and lacking the last transmembrane domains XI and XII. However, RNA was not available from these patients to confirm the predicted changes.

Two of the splice mutations were localised outside the splice consensus sequences, and were checked to produce aberrant splicing by RT-PCR:

- 586C→T in *SLC7A9* is a silent exonic mutation that creates alternative donor site 20 bp upstream of the consensus donor site. The resultant RNA (r.585_604del) is expected to produce a frameshift from residue L196 of b⁰⁺AT (p.L196_G202delfsX5) (data not shown);
- c.1012-23C→G in *SLC3A1* localises in intron 5 and produces the skipping of exon 6 (r.1012_1136del), which is expected to result in a frameshift from residue D338 of rBAT (p.D338_Y378delfsX5) (data not shown).

The rest of the new splice mutations affect the consensus donor or acceptor splice site sequences, thereby indicating aberrant splicing.

The two silent mutations located in exonic regions (that is, no amino acid change) are predicted to create splicing defects, but it was not possible to check this by RT-PCR:

- c.171C→T in *SLC7A9* may create an alternative donor splice site 64 bp upstream of the consensus donor site;

Table 7 Urine excretion of cystine and dibasic amino acids in heterozygotes carrying the type B mutations (*SLC7A9*) associated with phenotype I

	Phenotype	n	Urine amino acid concentrations (μmol/g creatinine)				
			Cystine	Lysine	Arginine	Ornithine	Sum
<i>Common mutations</i>							
A182T/+†	I	6	82 (16)	151 (52)	31 (7)	21 (6)	285 (57)
	Non-I	5	373 (135)*	1865 (1022)*	151 (60)*	138 (50)*	2527 (1090)*
T123M/+	I	2	29, 229*	271, 140	8, 25	19, 10	327, 404
	Non-I	2	NA	2596*, 734*	42, 17	176*, 53	NA
V170M/+	I	4	112 (16)*	254 (54)	6 (2)	18 (5)	391 (64)
	Non-I	12	441 (87)*	1471 (391)*	46 (14)	129 (28)*	2087 (475)*
c.614dupA/+‡	I	1	260*	122	19	25	426
	Non-I	18	607 (95)*	2249 (260)*	90 (14)*	220 (31)*	3165 (342)*
G105R/+	I	1	26	456	35	13	530
	Non-I	31	524 (75)*	1685 (181)*	69 (13)*	184 (32)*	2461 (249)*
R333W/+	Non-I	19	634 (139)*	2371 (330)*	137 (74)*	163 (28)*	3304 (482)*
<i>Uncommon mutations</i>							
G63R/+	I	2	60, 59	330, 322	11, 14	41, 38	442, 433
	Non-I	1	202*	504*	25	19	750*
A126T/+	I	1	140*	455	ND	8	603
	Non-I	2	308*, 338*	1144*, 1373*	ND, 102*	0, 237*	1452*, 2050*
G195R/+	I	1	116*	428	ND	19	563
	Non-I	1	439*	1948*	63*	247*	2697*
Y232C/+	I	1	108	125	11	42	286
W69X/+	I	1	51	249	55*	22	377
Heterozygotes B+ [5th, 95th centile]	Non-I	127	534 (37) [138, 1348]	1930 (113) [498, 4492]	76 (13) [0, 337]	198 (20) [21, 522]	2758 (154) [807, 6081]

Values are mean (SEM) μmol/g creatinine or individual values.

R333W is a common mutation with phenotype non-I in all the heterozygotes studied. Urine excretion of amino acids for heterozygotes with one mutated *SLC7A9* allele (B+) with phenotype non-I is also shown. Urine amino acid levels in controls are shown in table 6.

*Individual or mean values greater than 95th centile in controls (see table 6).

†A182T is not associated with mutation A354T in these alleles.

‡c.614dupA is the present nomenclature for mutation c.800–801insA.

NA, not analysed; ND, not detectable.

- c.1035G→A in *SLC3A1* localizes in a putative exonic splicing enhancer (ESE) for SF2/ASF with a score prediction of 2.36, while the mutation reduces the ESE prediction to 0.44 (that is, below threshold = 1.96), suggesting aberrant splicing.³⁰

In the ICC cohort of patients M467T is the most common *SLC3A1* mutation, accounting for 26.4% of the total type A alleles, and together with T216M (6.4%), DupE5-E9 (4.0%), c.163delC (4.0%), R270X (4.0%), and c.765+1G→T (3.2%) represents 48.0% of total type A alleles (table 3s in Supplementary Material). For *SLC7A9* the most common alleles are: G105R (27.4%), R333W (12.1%), V170M (11.5%)

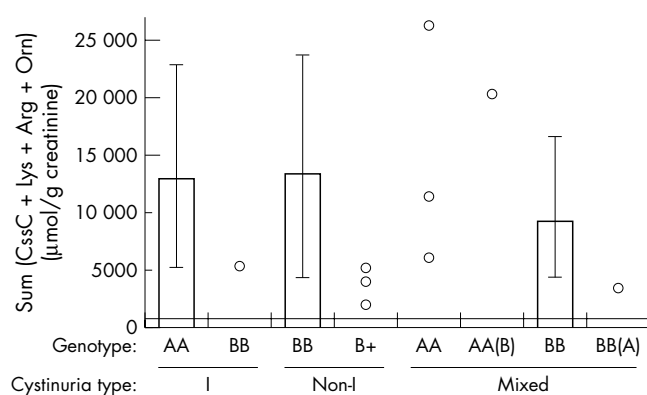


Figure 1 Sum of the urine of cystine and dibasic amino acids in patients with cystinuria classified by genotype and phenotype. Average (histograms) or individual data (dots), expressed as μmol/g creatinine, correspond to the sum of the urine levels of cystine and dibasic amino acids shown in table 8. Vertical lines represent the 5th and 95th centile of the values of the corresponding group. Horizontal line = 95th centile in the control group (detailed in table 6).

(17 alleles in the Libyan-Jewish population and one in the Italian population), c.614dupA (the Human Genome Variation Society nomenclature for mutation c.800–801insA) (7.0%) (eight alleles from Spain, two from Italy, and one from England), A182T (5.1%), T123M (3.8%) and c.605–3C→A (2.5%), which account for 69.4% of total type B alleles. Other *SLC3A1* or *SLC7A9* mutations were identified in three or fewer independent alleles.

The new mutations, together with those previously reported by the ICC (table 3s in Supplementary Material) and by others,^{15–19 23–27} make a total of 103 and 66 mutations identified in *SLC3A1* and *SLC7A9*, respectively: 28 frameshift (14 in *SLC3A1* and 14 in *SLC7A9*), seven nonsense (five in *SLC3A1* and two in *SLC7A9*), 18 splice (seven in *SLC3A1* and 11 in *SLC7A9*), 89 missense (59 in *SLC3A1* and 30 in *SLC7A9*), two silent (one in *SLC3A1* and one in *SLC7A9*), five deletions or insertions of a single amino acid residue (one in *SLC3A1* and four in *SLC7A9*), 18 large rearrangements (14 in *SLC3A1* and four in *SLC7A9*), and two cystinuria specific sequence variants in the promoter region of *SLC3A1*.

Distribution of cystinuria alleles per phenotype and genotype

The 164 cystinuria probands studied were classified on the basis of the urinary excretion of cystine and dibasic amino acids in obligate heterozygotes (urine phenotype) (see Methods) and also following the genetic classification proposed by Dello Strologo *et al*^{24 28} (type A, mutations in *SLC3A1*; type B, mutations in *SLC7A9*) (table 1). Potentially, these probands represent 325 cystinuria independent alleles (three probands were classified as non-I cystinuria heterozygotes, see below). In all, 282 alleles were characterised (that is, 86.8%). Thus 13.2% of the potential alleles were not identified. The alleles explained were 90.5% in type I probands, 87.6% in non-I, 89.3% in mixed, and 83.6% in

Table 8 Urine amino acid levels in patients classified by genotype and type of cystinuria

Genotype	Cystinuria type	n	Urine amino acid concentrations (μmol/g creatinine)			
			Cystine	Lysine	Arginine	Ornithine
AA	I	34	1655 [647, 3404]	6577 [2651, 11635]	3144 [226, 8373]	1743 [587, 3441]
AA	Mixed	3	782, 2117, 5556	3308, 5715, 11418	1234, 2817, 7025	718, 1636, 1918
AA(B)	Mixed	1†	2569	9836	2952	5172
BB	I	1	2692	2280	111	304
BB	Non-I	37	1623 [498, 3304]	6510 [1717, 14670]	3447 [499, 6151]	2198 [295, 4766]
B+	Non-I carriers	3	257*, 441*, 801	1638*, 2450, 3873	23*, 123*, 145*	43*, 274*, 285*
BB	Mixed	11	1824 [431, 3181]	4581 [1573, 8723]	1540 [211, 3506]	1329 [470, 2449]
BB(A)	Mixed	1	425	3270	489	603

The mean of the amino acid levels for each group is indicated, with the exception of categories with less than four patients, where individual data are shown. When applicable, the 5th and 95th centile limits are shown in square brackets.

*Data below the 5th centile of values in individuals BB with type non-I cystinuria.

†A sister of this patient has the same genotype and she is in dialysis, and therefore urine amino acid levels are not available. Genotypes are as described in the legend to table 1.

n, number of patients.

untyped. In 126 probands (76.8%) we identified two mutations, in 33 (20.1%) one mutation, and in five (3.0%) no mutations. Of the fully explained probands, 56 (34.1%) and 68 (41.5%) carry two mutations in *SLC3A1* (probands AA) and *SLC7A9* (probands BB and B+) respectively.

Table 3 describes the type of mutation identified in each allele of the 14 mixed cystinuria probands, which potentially represent 14 phenotype I and 14 phenotype non-I alleles. This table shows that all the possible genotypes in cystinuria are found in mixed families, BB being the most representative genotype.

Data in tables 1 and 3 allow calculation of the number of explained alleles classified by phenotype and genotype (tables 4 and 5): 89.7% and 88.3% of the phenotype I and non-I alleles have been explained, respectively. Alleles identified as type A and type B were 125 and 157, respectively. This represents 44.3% (type A) and 55.7% (type B) of the alleles identified.

Genotype-phenotype correlation

Most type A alleles segregate with cystinuria type I, but type A mutations explained phenotype non-I in obligate heterozygotes in three mixed cystinuria families (tables 1 and 3). To

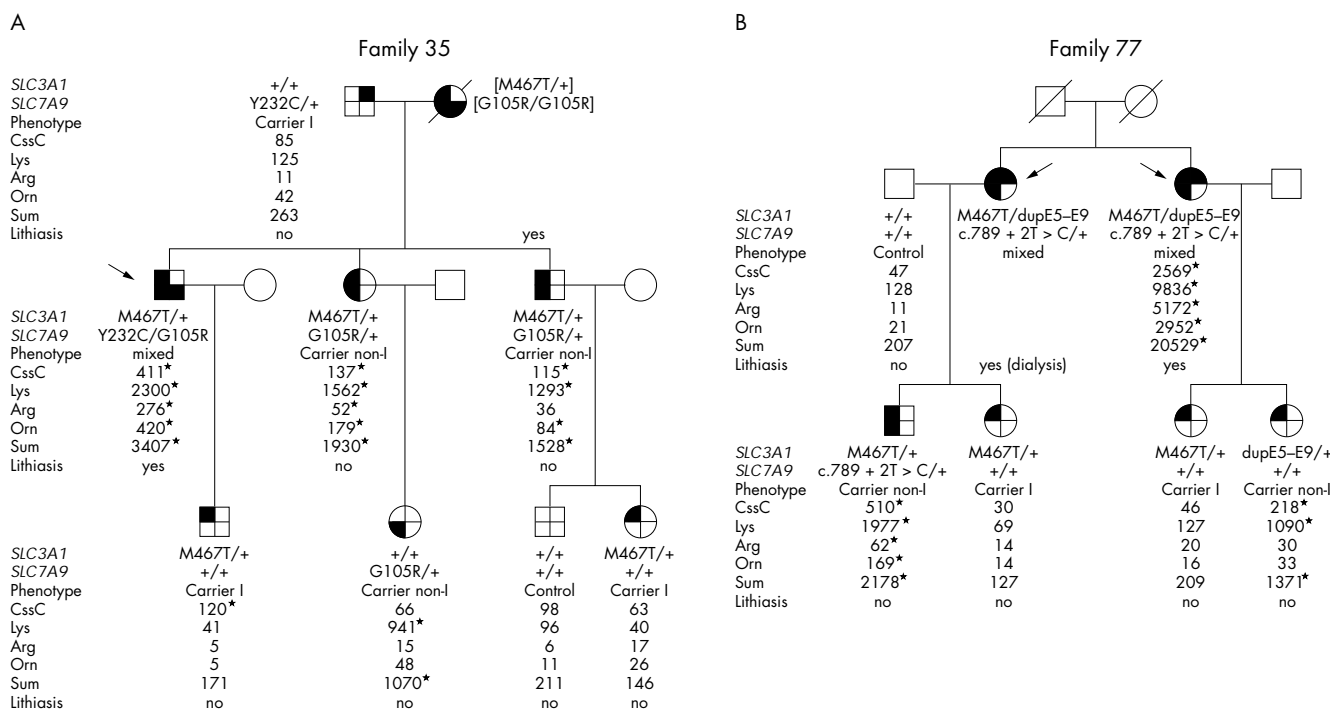


Figure 2 Pedigrees of families with patients that carry mutations in *SLC3A1* and *SLC7A9*. (A) Pedigree of patient BB(A) (family 35). The probands (arrow) have two mutated alleles in *SLC7A9* (G105R/Y232C) (type B mutations) and one in *SLC3A1* (M467T/+) (type A mutation), and present cystine calculi (lithiasis). Double heterozygotes carrying G105R/+ and M467T/+ had greater amino acid excretion in the urine than single carriers (G105R/+ or M467T/+), indicating an impact of digenic inheritance on the urine phenotype. (B) Pedigree of patients AA(B) (family 77). The two patients (arrows) within the family carry two mutated alleles in *SLC3A1* (M467T/dupE5-E9) (type A mutations) and one mutation in *SLC7A9* (c.789+2T>C) (type B mutation) and have cystine calculi (lithiasis). One of the patients is on dialysis as indicated. The other had amino acid excretion values in urine that were above the 89th centile values in patients AA. Again, this indicates that digenic inheritance contributes to the urine phenotype. None of the double carriers in either family had lithiasis. Urine amino acid excretion values for cystine (CsC), lysine (Lys), arginine (Arg), ornithine (Orn), and the sum of the four amino acids are expressed in μmol/g creatinine. To facilitate interpretation, symbols are divided in four sectors. The upper and lower ones represent *SLC3A1* and *SLC7A9* alleles respectively. When mutated the sectors are black.*Values above the 95th centile of corresponding amino acid urine values in controls (table 6).

our knowledge this is the first description of *SLC3A1* mutations with phenotype non-I in heterozygotes. Type B alleles segregated mainly with phenotype non-I (tables 1 and 3). However, in agreement with previous reports,^{24, 28} *SLC7A9* mutations also segregated with phenotype I in heterozygotes. Thus one type I proband carries two type B mutations (BB), and two other type I probands carry one type B mutation (B?) (table 1). Moreover, the phenotype I allele in eight mixed cystinuria probands was explained by type B mutations (seven BB and one BB(A) probands; table 3).

SLC3A1 dupE5-E9 show phenotype non-I in most of the heterozygotes

Recently, Schmidt *et al*²⁷ described a cystinuria specific *SLC3A1* rearrangement (c.(891+1524_1618–1600)dup; that is, duplication of exons 5 to 9; dupE5-E9) that results in the in frame duplication of amino acid residues E298 to D539 of the rBAT protein (p.E298_D539dup) as demonstrated by our own RNA studies (not shown) and by Schmidt *et al*.²⁷ Five probands of the ICC database carry this duplication. Four are compound heterozygotes with *SLC3A1* mutations (M467T, Spanish family 79; R452W, Spanish family 14; c.765+1G→T; Spanish family 92); c.1749delA, Belgian family 106). Two patients in the fifth family (Italian family 77) are compound heterozygotes with *SLC3A1* mutations dupE5-E9 and M467T, and also carry the *SLC7A9* mutation c.789+2T→C in one allele (fig 2B). Amino acid levels in urine for six single dupE5-E9 carriers of families were available (table 6). Interestingly, four of these carriers (F14-C119, F77-SR, F79-A145, and F79-A148) showed excretion of cystine and dibasic amino acids within the range of phenotype non-I heterozygotes. In contrast, carrier F106-D18 showed amino acid levels in urine within the control range like most of *SLC3A1* heterozygotes. Cystine in urine was not analysed in the other carrier in this family but the urine excretion of the other amino acids was within the control range, indicating phenotype I. To our knowledge dupE5-E9 is the first *SLC3A1* mutation that shows phenotype non-I in heterozygotes.

SLC7A9 mutations that show phenotype I in heterozygotes

SLC7A9 mutations with phenotype I in heterozygotes are shown in table 7. A182T, G105R, V170M, and c.614dupA are common *SLC7A9* mutations (table 3s in Supplementary Material). Six of the 11 A182T carriers showed phenotype I as the average urine levels of cystine, lysine, and the sum of the four amino acids were below the fifth centile of values in heterozygotes B+ with phenotype non-I (table 7). In contrast, the other five A182T carriers had amino acid levels in the urine above the 95th centile in controls (phenotype non-I) and within the range of values for B+ heterozygotes with phenotype non-I. The proportion of heterozygotes with phenotype I carrying the other common *SLC7A9* mutations was variable: T123M (two of four), V170M (four of 16), c.614dupA (one of 19), and G105R (one of 32). In contrast, carriers of the common and severe mutation R333W²¹ showed phenotype non-I in all cases. Moreover we describe carriers of six uncommon *SLC7A9* mutations that also show phenotype I (G63R, A126T, G195R, Y232C, and W69X) (table 7). Interestingly, in some of the *SLC7A9* heterozygotes with phenotype I, urine levels of cystine but not of dibasic amino acids were above than 95th centile of control values and within the lower range of values of B+ heterozygotes (phenotype non-I). All phenotype I alleles with common or uncommon *SLC7A9* mutations belong to mixed (and untyped) families except for family F112, which transmit type I cystinuria (the proband is a G105R/T123M compound heterozygote).

Urine amino acid excretion in patients with cystinuria classified by genotype and phenotype

Table 8 shows the excretion of cystine and dibasic amino acids in urine of patients in relation to their allele genotype (A or B) and their cystinuria type. Three groups of patients were numerous enough for statistical comparisons: patients AA with type I (n = 34), patients BB with type non-I (n = 37), and patients BB with mixed type (n = 11). The average urine levels of cystine and the three dibasic amino acids, as well as the 5th and 95th centile of these values, were very similar for patients AA with type I and BB with type non-I. This is shown graphically for the sum of the urine excretion of the four amino acids in fig 1. The average and the 95th centile of urine excretion of lysine, arginine, and ornithine, and the sum of the four amino acids were lower in patients BB with mixed type than in patients AA with type I and patients BB with type non-I. Similarly, patients BB with type I cystinuria showed urine excretion values for dibasic amino acids within the lower limit of excretion values in patients BB with type non-I and AA with type I. In contrast, urine cystine levels were very similar in all these groups. This probably reflects the fact that most of the cystinuria patients reached the limit of solubility of cystine in urine (300 mg/l or 1.2 mM),³¹ and this resulted in an underestimation of this amino acid in the urine when the sample was not previously diluted to dissolve cystine microcrystals. Indeed, the 95th centile of cystine levels in urine in these four groups of patients (up to ~3400 µmol/g creatinine) represents 3.4 mM, assuming 1 g creatinine/litre of urine.

Three patients with cystine urolithiasis were classified as heterozygotes for *SLC7A9* mutations (B+) on the basis of their urine amino acid concentrations (table 8, fig 1), which were similar to that of the parent transmitting the mutation (data not shown) and within the range of excretion of heterozygotes B+ with phenotype non-I (table 7). Moreover, these three patients excreted less arginine and ornithine than the fifth centile of patients BB with mixed cystinuria (table 8).

Only three AA patients with mixed cystinuria were identified in the ICC database (table 8, fig 1). The two patients with higher amino acid excretion values are siblings (family 14) and compound heterozygotes (dupE5-E9/R452W), and one of them had very substantial aminoaciduria. The expected severe defect of mutations R452W (that is, a non-conservative amino acid substitution) and dupE5-E9 (the only *SLC3A1* mutation that associated with phenotype non-I in heterozygotes) might contribute to the severe urine phenotype in this patient. The third patient (family 79), who had the lowest amino acid excretion values in urine (within the lower range of patients AA (type I)), is a compound heterozygote (dupE5-E9/M467T). Patient homozygotes for M467T or compound heterozygotes carrying M467T showed lower amino acid excretion values in urine (mean (SEM), µmol/g creatinine, n = 20: 1414 (136) for cystine, 5753 (669) for lysine, 1718 (404) for arginine, 1227 (160) for ornithine, and 9859 (1222) for the sum of the four amino acids) than AA patients without this mutation (n = 33: 2376 (291) for cystine, 9173 (835) for lysine, 3655 (378) for arginine, 3526 (505) for ornithine, and 18 730 (1517) for the sum of the four amino acids). Indeed, three patients homozygous for M467T had amino acid concentrations in urine (sum of the four amino acids: 5613, 6433, and 8113 µmol/g creatinine⁶) that were among the lowest in patients AA. Thus the mild phenotype of M467T might contribute to the low amino acid excretion values in the compound heterozygote dupE5-E9/M467T.

Digenic inheritance causing a partial phenotype in two cystinuria families

Patient BB(A) (family 35; fig 2A) is a compound heterozygote of *SLC7A9* mutations (Y232C/G105R) that also carries the *SLC3A1* mutation M467T. Mutations Y232C and M467T showed phenotype I, whereas G105R showed phenotype non-I in the heterozygotes of this family. Patient BB(A) was then classified as presenting mixed cystinuria. This patient had very low urine amino acid levels, which were similar to the fifth centile of these values in patients BB (type non-I). Two members of this family are double carriers (AB) (G105R/+ for *SLC7A9* and M467T/+ for *SLC3A1*). Digenic cystinuria without urolithiasis is suggested in these two double carriers, as they had higher urinary excretion values than the single *SLC7A9* heterozygotes (G105R/+ or M467T/+) within the family. Patient AA(B) (family 77; figs 1 and 2B) had very high amino acid concentrations in the urine and at the time of this study her sister was on dialysis. Both carry *SLC3A1* mutations dupE5-E9 and M467T and the *SLC7A9* mutation c.789+2T→C. M467T showed phenotype I, whereas dupE5-E9 showed phenotype non-I in the heterozygotes identified in this family. Patients AA(B) were then classified as having mixed cystinuria. The type B mutation seems to contribute to the severe phenotype in these patients. Thus one of these patients (M467T/dupE5-E9; c.789+2T→C/+) excreted larger amounts of amino acids than patient M467T/dupE5-E9 (family 79) (compare patient AA(B) and patient AA (mixed) with the lowest aminoaciduria in table 8 and fig 1). In contrast, the mild mutation M467T did not seem to aggravate the urine phenotype of the double carrier in family 77 (M467T/+ and c.2789+2T→C/+). Thus the aminoaciduria in this double carrier was lower than that of two single c.782+2T→C heterozygotes (family 58), which had the greatest aminoaciduria (the sum of the urine levels of the four amino acids was 8112 and 8307 mmol/g creatinine) among the heterozygotes B+ in our database.

DISCUSSION

We describe 40 new cystinuria mutations (24 in *SLC3A1* and 16 in *SLC7A9*) which bring the total number of cystinuria specific mutations identified to 103 in *SLC3A1* and 66 in *SLC7A9*. The mutations include missense, nonsense, splicing defects, frameshift, deletions and insertions of a single amino acid residue, and large rearrangements. To our knowledge, the present study represents the largest percentage of cystinuria alleles explained in any large cohort of patients reported (86.8%; 282 of 325 alleles). In a recent study,²⁷ only 64.7% of the alleles were explained (75 of 116 alleles). In the ICC database, the coverage of identified alleles is similar for probands with different cystinuria types (on average 89.3%). The percentage of explained alleles in untyped patients was lower (83.6%), which might be attributed to the presence of *SLC7A9* carriers with cystine urolithiasis.

The greater number of characterised alleles allows a general summary of the cystinuria mutations in the ICC database, which includes patients of mainly Italian, Spanish, or Libyan-Jewish origin. Type A (*SLC3A1*) and type B (*SLC7A9*) mutations accounted for 44.3% and 55.7% of the explained alleles, respectively. To our knowledge, these are the first relative frequencies of type A and type B alleles to be reported, but they must be viewed with caution. The ICC database is not a registry, as we did not collect all possible cases.²⁸ The ICC was very active in collecting phenotype non-I cystinuria cases in order to identify the *SLC7A9* gene,^{2 10 11} and the prevalence of type B mutations might be overestimated. M467T and G105R were the most common type A and type B mutations (26.4% and 27.4% of each type of alleles, respectively). This is consistent with reports on other smaller cohorts of patients with cystinuria.^{16 23 25} The five most

common type A and type B mutations accounted for 44.8% and 63.1% of the identified alleles of each type (A or B), respectively. Moreover, 55 *SLC3A1* and 45 *SLC7A9* mutations covered the 125 type A and the 157 type B explained alleles, respectively, showing that *SLC3A1* has greater genetic heterogeneity than *SLC7A9* in the ICC database.

The present search for mutations was very careful (SSCP, DHPLC, direct sequencing, and specific search for large rearrangements of *SLC3A1* and *SLC7A9*) and covered the whole coding region and all intron/exon boundaries. The unexplained cystinuria alleles (13.2%) may be the result of mutations in intronic or promoter regions not yet identified in the two known cystinuria genes or they may reflect unidentified genes. Also, *SLC3A1* or *SLC7A9* polymorphisms in combination with cystinuria specific mutations might result in full blown cystinuria, for the following reasons.

First, the promoter region of these genes was not analysed in this study, but a small contribution of mutations in these regions is expected. Indeed, two cystinuria specific sequence variants in the promoter region of *SLC3A1* have been reported,¹⁹ but functional studies should be done to confirm these mutations.

Second, intronic mutations affecting sequences other than the splice-site consensus ones could explain these alleles, but RNA studies would be necessary to assess this.

Third, a third cystinuria gene cannot be discounted but it would be relegated to a very small proportion of patients (no mutations were found in any of the two cystinuria genes in only 3% of the probands), and seems improbable. Co-immunoprecipitation studies and the *SLC7A9* KO model showed that the protein products of *SLC3A1* (rBAT) and *SLC7A9* (b⁰⁺AT) heterodimerise in mouse kidney brush border membranes, but a significant part of rBAT heterodimerises with an unknown light subunit (X).^{12 32} This may also be true in human kidney brush borders.¹² Therefore, the gene coding for X could be a candidate for cystinuria. However, the similar hyperexcretion of amino acids detected in urine of patients AA and BB does not support this hypothesis. If X were coded by a cystinuria gene one would expect a greater degree of aminoaciduria in patients AA than in patients BB—b⁰⁺AT mutations would affect system b⁰⁺ only, whereas rBAT mutations would affect system b⁰⁺ and the transport activity of the rBAT/X heteromeric complex.

Finally, *SLC3A1* or *SLC7A9* polymorphisms in combination with cystinuria specific mutations might result in full blown cystinuria, as has been suggested.³³ Cystinuria association and functional analysis of these polymorphisms are required to demonstrate their contribution to the disease.

Some heterozygotes for the *SLC3A1* mutation dupE5-E9—which results in the duplication of the rBAT fragment E298-D539—presented with phenotype non-I (table 6). All other *SLC3A1* mutations, including very severe ones (for example, c.163delC which produces a frameshift with an early stop codon, eliminating the transmembrane and the extracellular domains of rBAT (p.Q55fsX51); or c.431_2055del, which eliminates 80% of the rBAT residues towards the C-terminus (p.G144-C685del)) showed phenotype I.^{6 18 22 25 34} This indicates that mutation dupE5-E9 has a dominant negative effect on the rBAT/b⁰⁺AT heteromeric complex.

Because 14% of *SLC7A9* heterozygotes showed phenotype I we proposed a classification of cystinuria on the basis of genotype rather than phenotype.²⁸ Rozen and coworkers identified two type I heterozygotes carrying the *SLC7A9* mutations I44T and P261L, respectively.²⁴ Here we report 10 more of these *SLC7A9* mutations. Four showed phenotype I in several carriers (A182T, T123M, G63R, and V170M). Mutations A182T and T123M affect non-conserved amino acid residues in the family of the light subunits of HATs. Moreover, A182T is a mild mutation with aberrant trafficking

to the plasma membrane³⁵ and substantial residual transport activity (60%).²¹ Similarly, A126T and P261L, with a single type I carrier identified, also involve non-conserved amino acid residues. Interestingly, patients BB with mixed or type I cystinuria (that is, with type B heterozygotes with phenotype I in their families) also presented with a mild urine phenotype (table 8 and fig 1). This agrees with the mild urine phenotype reported for patients with mixed cystinuria.³⁶ Seven of the 11 patients BB (mixed) and the patient BB (type I) carry A182T or T123M. The mild amino acid transport defect of these mutations could be the underlying cause of the mild urine phenotype of these patients. In contrast, other mutations with phenotype I in heterozygotes (I44T, G63R, G105R, V170M, G195R, and Y232C) involved fully conserved amino acid residues or resulted in large protein changes (W69X, with b⁰⁺AT truncated after the first transmembrane domain; c.614dupA, a mutation shown by mRNA studies to result in skipping of exons 5 and 6 (r.479_709del), producing a frameshift at residue 160 (p.L160fsX1); data not shown). Moreover, G105R and V170M have little amino acid transport function.²¹ Interestingly, a very small proportion of heterozygotes who carry severe and common mutations like c.614dupA (one of 19 carriers) and G105R (one of 32 carriers) had phenotype I, but one quarter of the V170M heterozygotes manifested phenotype I (all from a Libyan Jewish origin). This indicates that, in addition to the residual functional activity of b⁰⁺AT mutants, other factors (environmental or genetic) contribute to the urine phenotype of carriers of *SLC7A9* mutations.

Only three patients in the ICC database are double compound heterozygotes with mutations in both genes (two patients with mutations M467T and dupE5-E9 (AA), and c.789+2T→C (B), and one patient with mutations Y232C and G105R (BB), and M467T (A)). One patient AA(B) has previously been reported but with no description of the associated urine phenotype.³⁷ The degree of aminoaciduria of these type of patient and their relatives in the ICC database indicates that digenic inheritance in cystinuria has only a partial effect on the phenotype, restricted to a variable impact on the aminoaciduria, for the following reasons.

First, in family 77, the severe aminoaciduria in one of the patients AA(B) indicates that the type B mutation c.789+2T→C, associated with high aminoaciduria in heterozygotes, contributes to the urine phenotype; no information is available from the other patient AA(B) as she is on dialysis.

Second, in family 35, the mild aminoaciduria of patient BB(A) indicates that M467T, associated with mild aminoaciduria in homozygotes and compound heterozygotes, does not contribute to the urine phenotype in the patient, but two double compound heterozygotes in this family (M467T/+, G105R/+; that is, AB) showed greater aminoaciduria than the single heterozygotes within the family, suggesting a contribution of both mutations to the urine phenotype.

Third, none of the individuals AB had cystine urolithiasis. Given that almost 90% of the alleles of the ICC cohort of patients have been identified, and that the frequency of type A and B alleles is similar in this cohort, if digenic inheritance was the rule in cystinuria, we would expect 25% AA patients, 25% BB patients, and 50% AB patients. Furthermore, the few AB individuals identified did not have cystine urolithiasis. This indicates that digenic inheritance, affecting the phenotype, is an exception in cystinuria. However, we cannot discard the possibility that some combinations of mutations A and B produce enough cystine hyperexcretion to cause urolithiasis. In this regard, the urolithiasis activity of individuals B/+, with a low penetrance for cystine urolithiasis (three of 192 genotyped patients; 1.7%), might be aggravated by the addition of the effect of one type A allele.

A working hypothesis on the biogenesis of the rBAT/b⁰⁺AT heterodimer and the urine phenotypes in cystinuria may explain the apparent lack of full digenic inheritance in cystinuria. In the first place, the rBAT protein is produced in excess in the kidney, and therefore an rBAT mutation in heterozygosis (for example, the mouse cystinuria model with the *SLC3A1* mutation D140G³⁸ and all human cystinuria rBAT mutations with the exception of dupE5-E9) does not lead to hyperexcretion of amino acids (phenotype I). Secondly; b⁰⁺AT controls the expression of the functional rBAT/b⁰⁺AT heterodimeric complex—interaction with b⁰⁺AT stabilises rBAT and the excess of rBAT is degraded, as shown in transfected cells.^{35–39} As a result, a half dose of b⁰⁺AT (heterozygotes of severe human *SLC7A9* mutations or of the *SLC7A9* knockout mice³²) results in a significant decrease in the expression of rBAT/b⁰⁺AT heterodimer complex (system b⁰⁺), which causes hyperexcretion of cystine and dibasic amino acids. In this scenario, the lack of a full phenotype because of digenic inheritance indicates that in double heterozygotes (AB), the mutated rBAT, with trafficking defects,^{18–40–41} does not interact with, or does not compromise, the heterodimerisation and trafficking to the plasma membrane of the half dose of wild type b⁰⁺AT with the half dose of wild type rBAT. Thus AB individuals behave as B heterozygotes with a variable degree of aminoaciduria, which could be greater than that of the single heterozygotes within the family, depending on the particular combination of mutations. We are currently studying the hypothesis that the phenotype non-I associated to the *SLC3A1* mutation dupE5-E9 reflects heterodimerisation with b⁰⁺AT, which results in a non-active heteromeric complex.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the families who participated in this study. We also thank L Sánchez for technical help and Tanya Yates for editorial help. This work was supported in part by the Spanish Ministry of Science and Technology (PM99-0172-CO-01/02 and SAF2003-08940-01/02), BIOMED (BMH4 CT98-3514), the Spanish Institut de Salut Carlos III (networks G03/054, C03/07, and C03/08), the Generalitat de Catalunya (2001 SGR00399; 2001 SGR00118), and the Marató de TV3 (98130) to VN and MP, by the Comissionat per a Universitats i Recerca to MP, and by the Ministero Italiano della Salute (Ricerca Corrente 2001) to LZ. MF was a recipient of a predoctoral fellowship from the Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica from the Generalitat de Catalunya. MJ-V was supported by the BIOMED BMH4 CT98-3514.

Authors' affiliations

M Font-Llitjós, M Jiménez-Vidal, V Nunes, Centre of Medical and Molecular Genetics (IRO), Hospital Duran i Reynals, Barcelona, Spain
M Jiménez-Vidal, M Palacín, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona
L Bisceglia, M D Perna, L Zelante, Medical Genetics Service, IRCCS-Hospital "CSS", San Giovanni Rotondo, Italy
L de Sanctis, Department of Paediatrics, Regina Margherita Children's Hospital, University of Torino, Italy
F Rousaud, Urology Service Fundació Puigvert, Barcelona

Conflicts of interest: none declared

*These authors contributed equally to this work

Supplementary material: Supplementary figures and tables can be accessed at the JMG website (www.jmg.com/supplemental)

REFERENCES

- 1 **Palacín M**, Goodyer P, Nunes V, Gasparini P. Cystinuria. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al. In: *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th ed, vol III. New York: McGraw-Hill, 2001:4909–32.
- 2 **Feliubadalo L**, Font M, Purroy J, Rousaud F, Estivill X, Nunes V, Golomb E, Centola M, Akseptijevich I, Kreiss Y, Goldman B, Pras M, Kastner DL, Pras E, Gasparini P, Bisceglia L, Beccia E, Gallucci M, de Sanctis L, Ponzoni A, Rizzoni GF, Zelante L, Bassi MT, George AL, Palacín M, et al. Non-type I cystinuria caused by mutations in *SLC7A9*, encoding a subunit (b⁰⁺AT) of rBAT. International Cystinuria Consortium. *Nat Genet* 1999;**23**:52–7.

- 3 **Goodyer PR**, Clow C, Reade T, Girardin C. Prospective analysis and classification of patients with cystinuria identified in a newborn screening program. *J Pediatr* 1993;**122**:568–72.
- 4 **Bertran J**, Werner A, Moore ML, Stange G, Markovich D, Biber J, Testar X, Zorzano A, Palacin M, Murer H. Expression cloning of a cDNA from rabbit kidney cortex that induces a single transport system for cystine and dibasic and neutral amino acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;**89**:5601–5.
- 5 **Lee WS**, Wells RG, Sabbag RV, Mohandas TK, Hediger MA. Cloning and chromosomal localization of a human kidney cDNA involved in cystine, dibasic, and neutral amino acid transport. *J Clin Invest* 1993;**91**:1959–63.
- 6 **Calonge MJ**, Gasparini P, Chillaron J, Chillon M, Gallucci M, Rousaud F, Zelante L, Testar X, Dallapiccola B, Di Silverio F, Barcelo P, Estivill X, Zorzano A, Nunes V, Palacin M. Cystinuria caused by mutations in rBAT, a gene involved in the transport of cystine. *Nat Genet* 1994;**6**:420–5.
- 7 **Calonge MJ**, Nadal M, Calvano S, Testar X, Zelante L, Zorzano A, Estivill X, Gasparini P, Palacin M, Nunes V. Assignment of the gene responsible for cystinuria (rBAT) and of markers D2S119 and D2S177 to 2p16 by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 1995;**95**:633–6.
- 8 **Gasparini P**, Calonge MJ, Bisceglia L, Purroy J, Dianzani I, Notarangelo A, Rousaud F, Gallucci M, Testar X, Ponzone A, et al. Molecular genetics of cystinuria: identification of four new mutations and seven polymorphisms, and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 1995;**57**:781–8.
- 9 **Wartenfeld R**, Golomb E, Katz G, Bale SJ, Goldman B, Pras M, Kastner DL, Pras E. Molecular analysis of cystinuria in Libyan Jews: exclusion of the SLC3A1 gene and mapping of a new locus on 19q. *Am J Hum Genet* 1997;**60**:617–24.
- 10 **Bisceglia L**, Calonge MJ, Totaro A, Feliubadalo L, Melchionda S, Garcia J, Testar X, Gallucci M, Ponzone A, Zelante L, Zorzano A, Estivill X, Gasparini P, Nunes V, Palacin M. Localization, by linkage analysis, of the cystinuria type III gene to chromosome 19q13.1. *Am J Hum Genet* 1997;**60**:611–16.
- 11 **Feliubadalo L**, Bisceglia L, Font M, Dello Strologo L, Beccia E, Arslan-Kirchner M, Steinmann B, Zelante L, Estivill X, Zorzano A, Palacin M, Gasparini P, Nunes V. Recombinant families locate the gene for non-type I cystinuria between markers C13 and D19S587 on chromosome 19q13.1. *Genomics* 1999;**60**:362–5.
- 12 **Fernandez E**, Carrascal M, Rousaud F, Abian J, Zorzano A, Palacin M, Chillaron J. rBAT-b(0,+)-AT heterodimer is the main apical reabsorption system for cystine in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;**283**:F540–8.
- 13 **Chillaron J**, Roca R, Valencia A, Zorzano A, Palacin M. Heteromeric amino acid transporters: biochemistry, genetics, and physiology. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;**281**(6):F995–1018.
- 14 **Bisceglia L**, Calonge MJ, Dello Strologo L, Rizzoni G, de Sanctis L, Gallucci M, Beccia E, Testar X, Zorzano A, Estivill X, Zelante L, Palacin M, Gasparini P, Nunes V. Molecular analysis of the cystinuria disease gene: identification of four new mutations, one large deletion, and one polymorphism. *Hum Genet* 1996;**98**:447–51.
- 15 **Pras E**, Golomb E, Drake C, Aksentijevich I, Katz G, Kastner DL. A splicing mutation (891+4A→G) in SLC3A1 leads to exon 4 skipping and causes cystinuria in a Moslem Arab family. *Hum Mutat* 1998;(suppl 1):S28–30.
- 16 **Gitomer WL**, Reed BY, Ruml LA, Sakhaee K, Pak CY. Mutations in the genomic deoxyribonucleic acid for SLC3A1 in patients with cystinuria. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;**83**:3688–94.
- 17 **Gitomer WL**, Reed BY, Ruml LA, Pak CY. 335-base deletion in the mRNA coding for a dibasic amino acid transporter-like protein (SLC3A1) isolated from a patient with cystinuria. *Hum Mutat* 1998;(suppl 1):S69–71.
- 18 **Saadi I**, Chen XZ, Hediger M, Ong P, Pereira P, Goodyer P, Rozen R. Molecular genetics of cystinuria: mutation analysis of SLC3A1 and evidence for another gene in type I (silent) phenotype. *Kidney Int* 1998;**54**:48–55.
- 19 **Boutros M**, Ong P, Saadi I, Hiou-Tim F, Vicaneck C, Rozen R, Goodyer P. The human rBAT promoter mutations in cystinuria [abstract]. *Am J Hum Genet* 1999;**65**(suppl):A94.
- 20 **Purroy J**, Bisceglia L, Jaeken J, Gasparini P, Palacin M, Nunes V. Detection of two novel large deletions in SLC3A1 by semi-quantitative fluorescent multiplex PCR. *Hum Mutat* 2000;**15**:373–9.
- 21 **Font M**, Feliubadalo L, Estivill X, Nunes V, Golomb E, Kreiss Y, Pras E, Bisceglia L, d'Adamo AP, Zelante L, Gasparini P, Bassi MT, George AL, Manzoni M, Riboni M, Ballabio A, Borsani G, Reig N, Fernandez E, Zorzano A, Bertran J, Palacin M. Functional analysis of mutations in SLC7A9, and genotype-phenotype correlation in non-Type I cystinuria. *Hum Mol Genet* 2001;**10**:305–16.
- 22 **Bisceglia L**, Purroy J, Jimenez-Vidal M, d'Adamo AP, Rousaud F, Beccia E, Penza R, Rizzoni G, Gallucci M, Palacin M, Gasparini P, Nunes V, Zelante L. Cystinuria type I: identification of eight new mutations in SLC3A1. *Kidney Int* 2001;**59**:1250–6.
- 23 **Harnevik L**, Fjellstedt E, Molbaek A, Tiselius HG, Denneberg T, Soderkvist P. Identification of 12 novel mutations in the SLC3A1 gene in Swedish cystinuria patients. *Hum Mutat* 2001;**18**:516–25.
- 24 **Leclerc D**, Boutros M, Suh D, Wu Q, Palacin M, Ellis JR, Goodyer P, Rozen R. SLC7A9 mutations in all three cystinuria subtypes. *Kidney Int* 2002;**62**:1550–9.
- 25 **Botzenhart E**, Vester U, Schmidt C, Hesse A, Halber M, Wagner C, Lang F, Hoyer P, Zerres K, Eggermann T. Cystinuria in children: distribution and frequencies of mutations in the SLC3A1 and SLC7A9 genes. *Kidney Int* 2002;**62**:1136–42.
- 26 **Schmidt C**, Albers A, Tomiuk J, Eggermann K, Wagner C, Capasso G, Lahme S, Hesse A, Lang F, Zerres K, Eggermann T. Analysis of the genes SLC7A9 and SLC3A1 in unclassified cystinurics: mutation detection rates and association between variants in SLC7A9 and the disease. *Clin Nephrol* 2002;**57**:342–8.
- 27 **Schmidt C**, Vester U, Wagner CA, Lahme S, Hesse A, Hoyer P, Lang F, Hoyer P, Zerres K, Eggermann T. Significant contribution of genomic rearrangements in SLC3A1 and SLC7A9 to the etiology of cystinuria. *Kidney Int* 2003;**64**:1564–72.
- 28 **Dello Strologo L**, Pras E, Pontesilli C, Beccia E, Ricci-Barbini V, de Sanctis L, Ponzone A, Gallucci M, Bisceglia L, Zelante L, Jimenez-Vidal M, Font M, Zorzano A, Rousaud F, Nunes V, Gasparini P, Palacin M, Rizzoni G. Comparison between SLC3A1 and SLC7A9 cystinuria patients and carriers: a need for a new classification. *J Am Soc Nephrol* 2002;**13**:2547–53.
- 29 **Turnell DC**, Cooper JD. Rapid assay for amino acids in serum or urine by pre-column derivatization and reversed-phase liquid chromatography. *Clin Chem* 1982;**28**:527–31.
- 30 **Cartegni L**, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR. ESEfinder: a web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res* 2003;**31**:3568–71.
- 31 **Dahlberg PJ**, van den B, Kurtz SB, Wilson DM, Smith LH. Clinical features and management of cystinuria. *Mayo Clin Proc* 1977;**52**:533–42.
- 32 **Feliubadalo L**, Arbones ML, Manas S, Chillaron J, Visa J, Rodes M, Rousaud F, Zorzano A, Palacin M, Nunes V. Slc7a9-deficient mice develop cystinuria non-1 and cystine urolithiasis. *Hum Mol Genet* 2003;**12**:2097–108.
- 33 **Schmidt C**, Tomiuk J, Botzenhart E, Vester U, Halber M, Hesse A, Wagner C, Lahme S, Lang F, Zerres K, Eggermann T, Bachmann H, Bokenkamp A, Fischbach M, Frund S, Pistor KG, Zappel HF. Genetic variations of the SLC7A9 gene: allele distribution of 13 polymorphic sites in German cystinuria patients and controls. *Clin Nephrol* 2003;**59**:353–9.
- 34 **Horsford J**, Saadi I, Raelson J, Goodyer PR, Rozen R. Molecular genetics of cystinuria in French Canadians: identification of four novel mutations in type I patients. *Kidney Int* 1996;**49**:1401–6.
- 35 **Reig N**, Chillaron J, Bartoccioni P, Fernandez E, Bendahan A, Zorzano A, Kanner B, Palacin M, Bertran J. The light subunit of system b(0,+)-AT is fully functional in the absence of the heavy subunit. *Embo J* 2002;**21**:4906–14.
- 36 **Goodyer P**, Saadi I, Ong P, Elkas G, Rozen R. Cystinuria subtype and the risk of nephrolithiasis. *Kidney Int* 1998;**54**:56–61.
- 37 **Harnevik L**, Fjellstedt E, Molbaek A, Denneberg T, Soderkvist P. Mutation analysis of SLC7A9 in cystinuria patients in Sweden. *Genet Test* 2003;**7**:13–20.
- 38 **Peters T**, Thaete C, Wolf S, Popp A, Sedlmeier R, Grosse J, Nehls MC, Russ A, Schlueter V. A mouse model for cystinuria type I. *Hum Mol Genet* 2003;**12**:2109–20.
- 39 **Bauch C**, Verrey F. Apical heterodimeric cystine and cationic amino acid transporter expressed in MDCK cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;**283**:F181–9.
- 40 **Chillaron J**, Estevez R, Samarzija I, Waldegger S, Testar X, Lang F, Zorzano A, Busch A, Palacin M. An intracellular trafficking defect in type I cystinuria rBAT mutants M467T and M467K. *J Biol Chem* 1997;**272**:9543–9.
- 41 **Pineda M**, Fernandez E, Torrents D, Estevez R, Lopez C, Camps M, Lloberas J, Zorzano A, Palacin M. Identification of a membrane protein, LAT-2, that co-expresses with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transport activity with broad specificity for small and large zwitterionic amino acids. *J Biol Chem* 1999;**274**:19738–44.

o Anexo 1: Frecuencia de mutaciones en SLC3A.

Nucleótido	Aminoácido	(n)	F
c.410A>G	D137G	1	0,008
c.1699_1700delAG	R567fsX8	1	0,008
c.664delT	W222fsX3	1	0,008
c.542G>A	R181Q	1	0,008
c.1702G>A	G568L	1	0,008
c.1998C>G	C666W	1	0,008
c.1364C>T	S455L	1	0,008
c.1035G>A	D338fsX4	1	0,008
c.1043A>C	H348P	1	0,008
c.446T>A	L149Q	1	0,008
c.368T>G	M123R	1	0,008
c.1690C>T	L564F	1	0,008
c.1230C>A	N410K	1	0,008
c.1865T>C, c.1520C>T	L622X, S507L*	1	0,008
c.566C>T	T189M	1	0,008
c.1367G>A	R456H	1	0,008
c.1966_1968delCTT	L656del	1	0,008
c.2019C>G	C673W	1	0,008
c.2033T>C	L678P	1	0,008
c.1355G>A	R452Q	1	0,008
c.1943T>C	F648S	1	0,008
c.1618_2055del	V540_C685del	1	0,008
c.431_2055 del	G144_C685del	1	0,008
c.766-2A>G	L256_K297del	1	0,008
c.1093C>T, c.1955C>G	R365W, T652R*	1	0,008
c.371A>G	Y124C	1	0,008
c.1383T>G	Y461X	1	0,008
c.1744T>C	Y582H	1	0,008
c.1012-23C>G	D338_Y378delfsX5	1	0,008
c.1221dupT	P408fsX18	1	0,008
c.503C>A	S168X	1	0,008
Del 3'	Limits to be defined&	1	0,008
Del 5'	Limits to be defined&	2	0,016
c.1749delA	T583fsX14	2	0,016
c.388T>C	S130P	2	0,016
c.1447G>T	E483X	2	0,016
c.1366C>T	R456C	2	0,016
c.892-1332del	E298_M444del	2	0,016
c.266T>C	L89P	2	0,016
c.1084C>T	R362C	2	0,016
c.891+4A>G	L256_K297del	2	0,016
c.1640C>G	S547W	2	0,016
c.451T>A	Y151N	2	0,016
c.1093C>T	R365W	2	0,016
c.1322C>G	P441R	3	0,024
c.1353C>T	R452W	3	0,024
c.1400T>A	M467K	3	0,024
c.765+1G>T	L256_K297del	4	0,032
c.808C>T	R270X	5	0,040
c.163delC	Q55fsX51	5	0,040
DupE5-I9	E298_D539dup	5	0,040
c.647C>T	T216M	8	0,064
c.1400T>C	M467T	33	0,264
Total		125	1

Tabla 6 Frecuencia de mutaciones en SLC3A1 identificadas en los 164 probandos de la base de datos del ICC. No se incluye un alelo M467T adicional porque se trata del tercer alelo mutado en el paciente BB(A).*) Dos mutaciones en el mismo cromosoma. &) Deleciones con limites por definir. (n), número de alelos independientes. F, frecuencia.

Resultados

o Anexo 2: Mutaciones descritas en *SLC3A1*

Nucleótido	Proteína o mRNA	Exón/ Intrón	Referencia
Cambio de sentido			
c.266T>C	L89P	E1	
c.364C>T	P122S	E1	(Gitomer et al., 2000)
c.368T>G	M123R	E1	
c.371^a>G	Y124C	E1	
c.383C>A	P128Q	E1	(Pras et al., 1995)
c.388T>C	S130P	E1	
c.410^a>G	D137G	E1	
c.446T>A	L149Q	E2	
c.451T>A	Y151N	E2	(Bisceglia et al., 1996)
c.452A>G	Y151C	E2	(Harnevik et al., 2001)
c.542G>A	R181Q	E2	(Calonge et al., 1994)
c.566C>T	T189M	E2	
c.647C>T	T216M	E3	(Bisceglia et al., 1996)
c.649>C	S217R	E3	(Saadi et al., 1998)
c.759C>G	N253K	E3	(Harnevik et al., 2001)
c.802G>A	E268K	E4	(Miyamoto et al., 1995)
c.809G>T	R270L	E4	(Saadi et al., 1998)
c.1021A>G	T341A	E6	(Miyamoto et al., 1995)
c.1043A>C	H348P	E6	
c.1037T>C	L346P	E6	(Egoshi et al., 2000)
c.1084C>T	R362C	E6	(Bisceglia et al., 1996)
c.1085G>A	R362H	E6	(Harnevik et al., 2001)
c.1093C>T	R365W	E6	(Gasparini et al., 1995)
c.1094G>T	R365L	E6	(Albers et al., 1999)
c.1094G>A	R365Q	E6	(Schmidt et al., 2004)
c.1192G>C	G398R	E7	(Harnevik et al., 2001)
c.1230C>A	N410K	E7	
c.1259C>G	S420C	E7	(Gitomer and Pak, 1996)
c.1322C>G	P441R	E7	
c.1334T>C	I445T	E8	(Egoshi et al., 2000)
c.1353C>T	R452W	E8	(Endsley et al., 1997)
c.1355G>A	R452Q	E8	
c.1364C>T	S455L	E8	
c.1366C>T	R456C	E8	
c.1367G>A	R456H	E8	
c.1373G>A	G458E	E8	(Gitomer and Pak, 1996)
c.1381T>C	Y461H	E8	(Endsley et al., 1997)
c.1400T>C	M467T	E8	(Calonge et al., 1994)
c.1400T>A	M467K	E8	(Calonge et al., 1994)
c.1442G>T	G481V	E8	(Harnevik et al., 2001)
c.1444G>A	E482K	E8	(Harnevik et al., 2001)
c.1520C>T	S507L	E9	
c.1523C>G	P508A	E9	(Botzenhart et al., 2002)
c.1529A>G	Q510R	E9	(Harnevik et al., 2001)
c.1607T>G	V536G	E9	(Gitomer and Pak, 1996)
c.1640C>G	S547W	E10	
c.1690C>T	L564F	E10	
c.1691G>C	R584T	E10	(Harnevik et al., 2001)
c.1702G>A	G568S	E10	
c.1744T>C	Y582H	E10	(Gasparini et al., 1995)
c.1796T>C	F599S	E10	(Harnevik et al., 2001)
c.1799G>A	G600E	E10	(Harnevik et al., 2001)
c.1843C>A	P615T	E10	(Calonge et al., 1994)
c.1934G>C	G645A	E10	(Gitomer and Pak, 1996)
c.1943T>C	F648S	E10	(Gasparini et al., 1995)
c.1955C>G	T652R	E10	(Calonge et al., 1994)

Nucleótido	Proteína o mRNA	Exón/ Intrón	Referencia
Cambio de sentido (cont.)			
c.1998C>G c.2017T>C	C666W C673R	E10 E10	(Egoshi et al., 2000)
c.2019C>G c.2033T>C	C673W L678P	E10 E10	(Calonge et al., 1994)
Pérdida de sentido			
c.503C>A c.808C>T	S168X R270X	E2 E4	(Pras et al., 1995)
c.1383T>G c.1447G>T	Y461X E483X	E8 E8	(Bisceglia et al., 1996)
c.1865T>G	L622X	E10	
Silente			
c.1035G>A	p.D338fsX4	E6	
Promotor			
c.1-194G>C		Prom	(Boutros et al., 1999)
c.1-265G>A	60% prom activity	Prom	(Boutros et al., 1999)
Splicing			
c.765+1G>T c.766-2A>G c.891+4A>G c.1011G>A	W255fsX? L256_K297del L256_K297del P337fsX	I3 I3 I4 E5	(Pras et al., 1998) (Saadi et al., 1998)
c.1012-23C>G c.1136+2T>C c.1500+1G>T	D338_Y378delfsX5 Y378fsX? I500fsX3	I5 I6 I8	(Harnevik et al., 2001) (Horsford et al., 1996)
Pequeñas in/del			
c.163delC c.664delT c.782_804del c.979_980delGA	Q55fsX50 W222fsX3 N261fsX15 L325fsX2	E1 E3 E4 E5	(Gitomer et al., 1998b) (Gitomer et al., 1998b) (Horsford et al., 1996)
c.1221dupT c.1306insC c.1601_1602delAC	P408fsX18 P336fsX6 H534fsX4	E7 E7 E9	(Pras et al., 1995) (Gitomer et al., 2000)
c.1699_1700delAG c.1749delA c.1749_1751del c.1811_1812delTG c.1820delT c.1898_1899insTA c.1999-2000delTT c.2021insT*	R567fsX8 T583fsX14 L604fsX4 L607fsX3 V633fsX? F667fsX25 Y674fsX20	E10 E10 E10 E10 E10 E10 E10 E10 E10	(Gasparini et al., 1995) (Botzenhart et al., 2002) (Saadi et al., 1998) (Egoshi et al., 2000) (Egoshi et al., 2000) (Harnevik et al., 2001) (Gitomer et al., 1998b)
Pequeñas in/del en pauta			
c.1966_1968delCTT	L656del	E10	
Reordenamientos			
c.1_1332del c.114_1306del c.198_1575del c.431_765del c.431_2055 del c.431_2055 del c.431-3_463del+468_474 dup/ins c.(891+1524_1618-1600)dup c.892_1332del c.892-2055del (del 3') c.1618-2055del c.1332_2055del 179,311bpdel (chr.2p16)	M1_Q460delfsX3 G38_M435delfsX6 A66_T525fsX10 G144_W255delfsX12 G144_C685del G144_C685del I145_K203del p.E298_D539dup E298_M444del E298_C685del V540_C685del Q460_C685del M1_C685del	E1-7 E1-7 E1-9 E2-3 E2-10 E2-10 E2 E5-9 I4-7 E5-10 E10 E7-10 E1-10	(Saadi et al., 1998) (Pras et al., 1995) (Gitomer et al., 1998a) (Purroy et al., 2000) (Saadi et al., 1998) (Gitomer et al., 2000) (Schmidt et al., 2003) (Bisceglia et al., 1996) (Purroy et al., 2000) (Horsford et al., 1996) (Parvari et al., 2001)

Tabla 7 Total de mutaciones identificadas en SLC3A1. Mutaciones identificadas hasta el mes de Noviembre de 2004. En azul se resaltan las mutaciones nuevas que se presentan en esta tesis (publicadas en los artículos 1 y 3).

o **Anexo 3: Análisis funcional preliminar de algunas mutaciones detectadas en *SLC3A1* y *SLC7A9* en pacientes de cistinuria:**

Se han estudiado funcionalmente algunas de las mutaciones encontradas en *SLC3A1* y *SLC7A9* que presentan alguna particularidad interesante para esta enfermedad o del funcionamiento y/o estructura de los HATs. Los resultados son preliminares y faltaría hacer más estudios bioquímicos y/o genéticos para determinar exactamente que defecto causan estas mutaciones en la función del transportador y su correlación genotipo-fenotipo en cistinuria.

En *SLC3A1* hemos analizado las mutaciones c.266T>C y c.797T>C que dan lugar a los cambios L89P y F266S en rBAT respectivamente. L89P es la primera mutación descrita hasta el momento que se localiza en el único segmento trans-membrana de rBAT según las predicciones de hidrofobicidad. Se nos planteó la duda de como afecta una mutación en este dominio en la función de la proteína. A partir de proteínas totales de oocitos inyectados con el cRNA y mediante *Western blot* (figura 11) se comprobó que el mutante L89P presenta una única banda de 85kD, que corresponde a la forma precursora de la proteína (Endo sensible), mientras que los oocitos inyectados con el cRNA de la proteína salvaje presentan, además de la forma precursora, la forma completamente madura de la proteína (Endo resistente), que ha sufrido todas las modificaciones postraduccionales, y de tamaño 94kDa (Chillaron et al., 1997;Pineda et al., 2004;Reig et al., 2002).

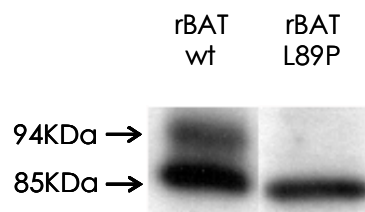


Figura 11 Análisis de la expresión del mutante L89P en rBAT. Los oocitos se inyectaron con 10 ng de cRNA de rBAT wt o L89P. Después de 3 días de expresión se prepararon proteínas totales y se separaron por SDS-PAGE. La proteína rBAT se detectó por Western blot. Se detectan las bandas correspondientes a rBAT con glicosilación madura de 94kDa en la proteína wt y con glicosilación no madura, de 85 kDa en la proteína wt y L89P.

También se ha analizado el transporte en oocitos de *Xenopus* y en células Hela. La mutación L89P produce una disminución parcial en la actividad de transporte de L-arginina, L-leucina y L-cistina en oocitos de *Xenopus* (figura 12A). Este defecto en el transporte también se observa en células Hela, y se recupera significativamente incubando las células a 33°C (figura 12B). Se ha descrito que la disminución de la temperatura de crecimiento de las células permite la expresión de mutantes de tráfico de algunos canales, como el canal de cloro CFTR responsable de la fibrosis quística (Denning et al., 1992;Zhou et al., 1999). La Dra. Marta Pineda en nuestro grupo ha demostrado esto mismo para el mutante de rBAT R365W. El efecto de la temperatura en el tráfico del mutante R365W se observa tanto

mediante el análisis de la inducción de actividad de transporte en células Hela transfectadas como por *Western blot* (Pineda et al., 2004).

Los resultados con el mutante L89P sugieren un defecto de tráfico de la proteína a la membrana plasmática, como el descrito para los mutantes de rBAT M467T y M467K (Chillaron et al., 1997). Esto explicaría que en algunos experimentos casi no se detecte defecto en la función de transporte, por una mayor cantidad de proteína que ha llegado a la membrana en ese experimento en particular. De todas formas, se tendría que medir directamente la expresión del mutante en superficie para comprobar el defecto de tráfico. Los dos únicos alelos L89P encontrados en la base de datos del ICC, se encuentran en un paciente en homocigosis, y representan una frecuencia del 1.6% en nuestra base de datos (anexo 1).

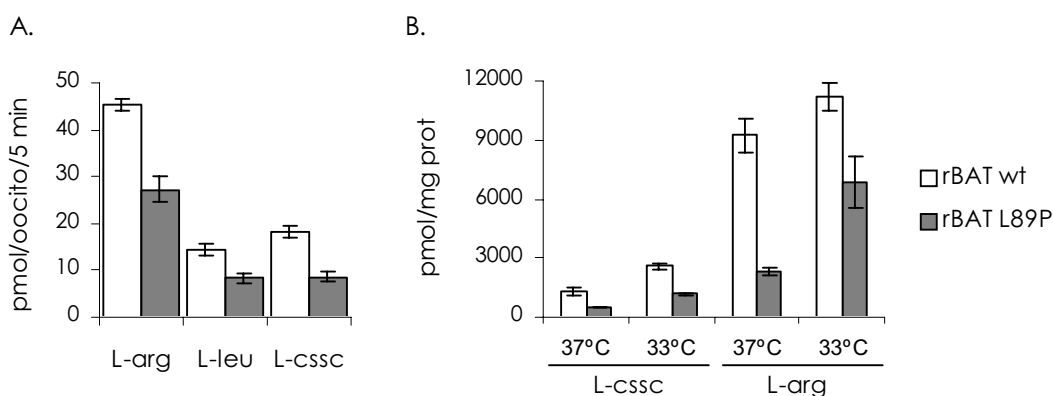


Figura 12 Análisis de la actividad de transporte inducido por el mutante de rBAT L89P en oocitos de *Xenopus* y células Hela. En A) los oocitos se inyectaron con 10 ng de cRNA de rBAT wt o L89P. Tres días después de la inyección se midió el transporte inducido en 5 minutos de 50 μ M L-[³H]arginina, 50 μ M L-[³H]leucina y 20 μ M L-[³⁵S]Cistina. La velocidad de captación (pmol/5min/oocito) se ha calculado restando el transporte en oocitos no inyectados. Los datos (media \pm SEM) son de un experimento representativo con 7 oocitos por grupo (n=2 experimentos independientes). En B) las células se transfectaron con rBAT wt o L89P junto con b^{0,+}AT. Después de 48 horas de incubación a 37 o 33°C se midió la captación de 20 μ M L-[³⁵S]cistina (L-cssc) y 50 μ M L-[³H]arginina durante 1 minuto. Los datos (media \pm SEM) provienen de un experimento representativo realizado en cuadruplicados (n=3 experimentos independientes).

F266S es un cambio que afecta un residuo altamente conservado en rBAT en las diferentes especies de mamífero. Mediante SSCP-HD se ha detectado este cambio de sentido en 5 alelos cistinúricos de un total de 94 alelos analizados en nuestra muestra de pacientes. Parecía que podría tratarse de una mutación nueva, pero al analizar los individuos control se encontró 1 alelo positivo en un total de 108 alelos examinados, pudiéndose tratar entonces de un nuevo polimorfismo en rBAT. Mediante análisis funcional en oocitos de *Xenopus* o en células Hela se ha comprobado que el mutante F266S no modifica significativamente la actividad de transporte (figura 13), tratándose muy probablemente de un nuevo polimorfismo en rBAT.

En SLC7A9 se ha analizado la mutación c.847C>T que da lugar al cambio L283F en b⁰⁺AT. Este cambio es el primero que se localiza en un loop extracelular putativo (IL7) de b⁰⁺AT, ya que todas las mutaciones de cambio de sentido y pequeñas deleciones i/o inserciones en pauta identificadas hasta el momento en b⁰⁺AT localizan en segmentos trans-membrana o en loops intracelulares, de acuerdo con la topología de la subunidad ligera xCT homóloga a b⁰⁺AT (Gasol et al., 2004). Como se muestra en la figura 13, el mutante L283F en b⁰⁺AT presenta una disminución de la inducción de la actividad de transporte de cistina en células Hela transfectadas con rBAT salvaje junto con b⁰⁺AT L283F, que no se recupera incubando las células a 33°C. Faltaría comprobar si este mutante, a pesar de ser inactivo, y no recuperarse a 33°C, alcanza la membrana plasmática de manera similar que la proteína salvaje, confirmando que no se trata un mutante de tráfico, y realizar estudios cinéticos para determinar si es un residuo clave en la función del transportador. En la base de datos del ICC, la mutación L283F sólo se ha encontrado en un alelo (lo que supone una frecuencia del 6%), y está asociada con fenotipo no-I en heterocigotos.

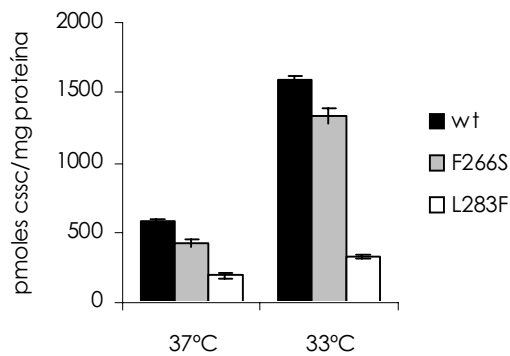


Figura 13 Análisis de la actividad de transporte inducido por los mutante F266S de rBAT y L283F de b⁰⁺AT en células Hela. Las células se transfectaron con rBAT wt o F266S, junto con b⁰⁺AT L283F o salvaje respectivamente. Después de 48 horas de incubación a 37 o a 33°C se midió la captación de 20 μM L-[³⁵S]cistina durante 1 minuto. Los datos (media±SEM) provienen de un experimento representativo realizado en cuadruplicados (n=3 experimentos independientes).

2. ESTUDIOS DE RELACIÓN ESTRUCTURA FUNCIÓN EN LOS HATS

Los estudios de relación estructura-función de los HATs realizados en esta tesis se han dirigido a la oligomerización y caracterización de residuos clave. Los resultados de estos estudios aparecen en los artículos 4-6 y en los siguientes apartados.

2.1. Oligomerización de los HATs

Decidimos dilucidar la oligomerización de los HATs mediante dos estrategias diferentes: i) la primera, desarrollada por la Dra. Esperanza Fernández en nuestro grupo, consiste en la aplicación de técnicas estructurales: coimmunoprecipitación, electroforesis nativa (BN-PAGE), *cross-linking* en membranas, cromatografía de exclusión molecular, y análisis FRET, utilizando células de mamífero transfectadas y/o tejido renal humano. ii) la segunda estrategia, que se presenta en esta tesis, se basa en la relación que existe entre la estructura oligomérica y la función del transportador *in vivo*, mediante expresión en oocitos de *Xenopus* o en células Hela. Así se determina cual es la mínima unidad funcional del oligómero, que puede coincidir o no con la estequiometría estructural observada. Como modelo hemos utilizado los sistemas x_c^- (4F2hc/xCT) y $b^{0,+}$ (rBAT/b^{0,+}AT). Además, la estrategia funcional se ha aplicado también al sistema γ^+L (4F2hc/ γ^+ LAT-1) y la estrategia estructural al sistema L (4F2hc/LAT-2). Al final de este apartado se encuentran de forma conjunta los resultados estructurales y funcionales, en un artículo que ha sido enviado para publicación (artículo 4).

Para determinar la unidad funcional mínima de los HATs se ha analizado la actividad de transporte tras la coexpresión de alelos mutantes inactivos combinados con el alelo salvaje, mediante coinyección de cRNA en oocitos de *Xenopus* o mediante cotransfección de cDNA en células Hela. La presencia de mutante inactivo no afectará la actividad del transportador si éste es enteramente funcional como monómero¹. Sin embargo, si dos o más monómeros forman el transportador, la presencia de monómero inactivo disminuirá la actividad si éste tiene efecto dominante negativo, o por el contrario, la presencia de monómero activo aumentará la actividad si éste tiene efecto dominante positivo mediante complementación de subunidades.

¹ Como aclaración consideraremos a partir de ahora que un monómero es el heterodímero formado por la cadena ligera más la cadena pesada, mientras que un dímero es un heterotetrámero formado por dos cadenas ligeras más dos cadenas pesadas (dímero de heterodímeros).

Resultados

La unidad funcional del transportador se puede determinar coexpresando distintas fracciones de alelo salvaje respecto al alelo mutante y determinando la relación existente entre la actividad observada y la fracción de mutante dominante presente. La actividad observada se compara con la actividad teórica que se espera si las subunidades se asocian al azar siguiendo un modelo matemático binomial de asociación de subunidades, con las siguientes ecuaciones (Kohler et al., 2000):

- $\% A_r = 100 \cdot [F_{act}]^n$ (para dominancia negativa)
- $\% A_r = 100 \cdot [1 - F_{act}]^n$ (para dominancia positiva)

A_r = actividad residual; F_{act} = fracción de alelo activo expresado; y n = estequiometría estructural o número de subunidades del transportador.

En los experimentos de coexpresión mediante coinyección de diferentes fracciones de cRNA, se asume que la cantidad de proteína que llega a la membrana es directamente proporcional a la cantidad de cRNA inyectado, de manera que al aplicar la fórmula binomial, se considera la fracción de alelo activo expresado como la fracción de cRNA inyectado. Para ello, se trabaja en condiciones de linealidad (la cantidad de cRNA inyectado es directamente proporcional a la inducción de la actividad de transporte que se observa). Una alternativa para superar esta dificultad es expresar las proteínas fusionadas en tándem mediante un conector (concatenámeros). De esta manera se tiene la certeza de que la mitad de los alelos expresados en la membrana es mutante y la otra mitad es salvaje.

En este tipo de experimentos es esencial que el mutante se pliegue correctamente y que la formación de hetero-oligómeros entre subunidades salvaje y mutante se produzca al azar, hecho que depende del equilibrio entre los monómeros y oligómeros de ambas especies. Cuando se trabaja con mutantes inactivos es difícil saber si se pliegan correctamente. Una solución a este problema es utilizar mutantes activos que sean insensibles a reactivos que inactiven la proteína o al revés. Por ejemplo, reactivos específicos de cisteínas que inactiven la proteína, y mutantes de cisteína que pierdan la sensibilidad al reactivo. En este caso, el hecho de que el mutante sea activo garantiza que la proteína se pliega correctamente, y la actividad se puede determinar antes y después de la modificación con el reactivo.

Miyamoto y colaboradores identificaron dos mutaciones en rBAT en pacientes cistinúricos, que coinyectadas en oocitos de *Xenopus* tenían un efecto dominante negativo (Miyamoto et al., 1995). Estas mutaciones son la E268K y la T341A. Decidimos empezar el estudio construyendo estos mutantes de rBAT y coinyectándolos en oocitos. No conseguimos reproducir los resultados obtenidos por Miyamoto y colaboradores (resultados no mostrados). Escogimos posteriormente mutaciones de lisinuria en y^+LAT1 y más adelante mutantes de cisteína a serina en xCT y en $b^{0,+}AT$. Los estudios funcionales con los sistemas y^+L y x_c^- se han realizados en oocitos de *Xenopus*, y con el sistema $b^{0,+}$ en células Hela.

2.1.1. Estudios funcionales de oligomerización en el sistema γ L (4F2hc/ γ LAT-1):

De las siete mutaciones de cambio de sentido de LPI descritas en γ LAT-1 (Palacin et al., 2000; Torrents et al., 1999), dos de ellas han sido analizadas funcionalmente en oocitos de *Xenopus*: G54V (en el segmento putativo TM1) y L334R (en el cuarto *loop* intracelular putativo). Ambas llegan a la membrana de los oocitos, pero no inducen actividad de transporte (Mykkanen et al., 2000), sugiriendo que estos residuos tienen un papel crucial en la función de estos transportadores. El mismo efecto se ha observado en dos líneas celulares humanas diferentes (Toivonen et al., 2002). Por tanto, estas dos mutaciones inactivan la función del transportador.

Normalmente, el plegamiento correcto es prerequisite para la llegada de la proteína a la membrana plasmática. Como estos mutantes alcanzan la membrana plasmática se asume que no tienen grandes defectos de plegamiento, pero sí en el transporte. Por este motivo hemos escogido estas mutaciones para los estudios funcionales de oligomerización. Además, estos residuos están muy conservados en el resto de miembros de la familia de subunidades ligeras, lo que permitiría el estudio de estas mutaciones en otros sistemas.

2.1.1.1. Correlación entre la cantidad de cRNA de γ LAT-1 inyectado y la actividad de transporte inducida

En primer lugar, determinamos las condiciones de linealidad de 4F2hc/ γ LAT-1 wt inyectando diferentes cantidades de cRNA y determinando la actividad de transporte. A más cantidad de cRNA inyectado se observa más actividad de transporte de arginina, pero la máxima inducción se observa con un total de 10 ng (2 ng cRNA 4F2hc en combinación con 8 ng cRNA γ LAT1) (figura 14).

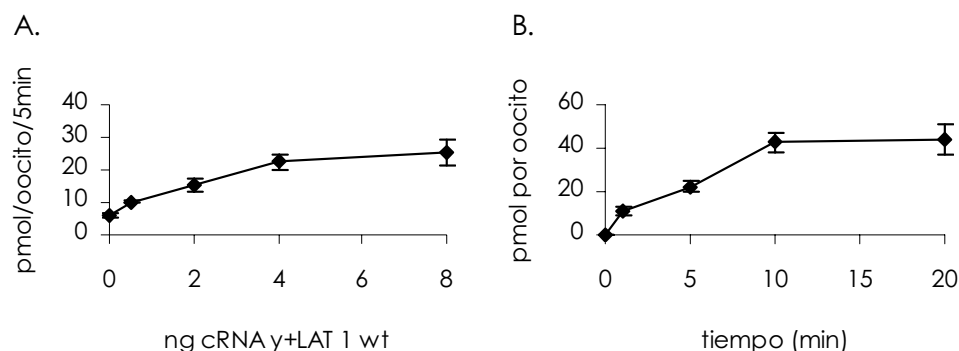


Figura 14 Actividad de transporte de 4F2hc/ γ LAT 1 wt en oocitos de *Xenopus* en función de: A) cantidad de cRNA inyectado, y B) tiempo de transporte. Se inyectaron los oocitos con 2 ng de cRNA de 4F2hc sólo o en combinación de distintas cantidades de cRNA de γ LAT-1 en A), y con 4 ng en B). Tres días después de la inyección se analizó el transporte de 50 μ M L-[3 H]arginina en 5 minutos en A), y a distintos tiempos en B). La velocidad de captación de arginina (pmoles/5 min por oocito) ó (pmol/ oocito) se ha calculado restando el transporte inducido en oocitos no inyectados. Los datos (media \pm SEM) provienen de un experimento representativo con 7 oocitos por grupo (n=2 experimentos independientes).

Resultados

La saturación es una característica típica de la expresión de transportadores y canales en oocitos, que normalmente se alcanza a 50 ng cRNA (Steinmeyer et al., 1994), pero que debe determinarse para cada proteína que se expresa. Decidimos trabajar con un total de 6 ng de cRNA inyectado (2 ng 4F2hc en combinación de 4 ng cRNA y⁺LAT-1) ya que en estas condiciones la actividad de transporte de arginina aumenta linealmente. Seguidamente, determinamos el tiempo de transporte en el que la actividad aumenta de forma lineal cuando se inyecta el total de 6 ng de cRNA. En 5 minutos de ensayo la actividad aumenta de forma lineal, llegando a su saturación a los 10 minutos de transporte (figura 14).

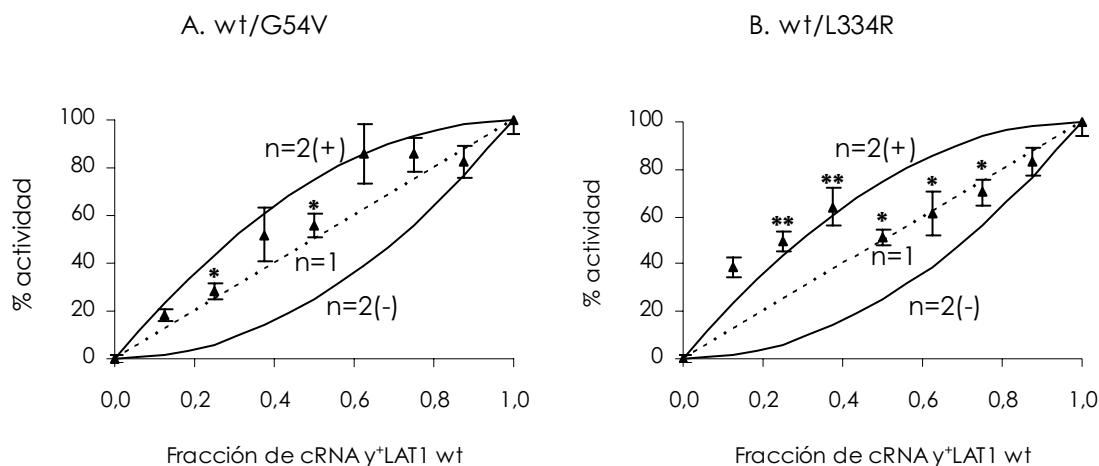
2.1.1.2. Coinyección de distintas fracciones wt/G54V y wt/L334R de y⁺LAT-1

Los experimentos de coexpresión se han realizado mediante coinyección de un total de 6 ng de cRNA, y determinando el transporte de arginina en 5 minutos. Se han asumido las mismas condiciones para los mutantes G54V y L334R. Se han coinyectado diferentes fracciones de cRNA de y⁺LAT-1 wt respecto al cRNA de y⁺LAT-1 G54V o y⁺LAT-1 L334R, siempre con el cRNA de 4F2hc, y se han comparado con las curvas teóricas de actividad según la ecuación binomial para n=1 (monómero funcional) y n=2 (dímero funcional).

Como se observa en la figura 15, en la coinyección del alelo salvaje con el alelo G54V, la actividad de transporte de arginina corresponde a la de un monómero en la mayoría de las fracciones. En cambio, la coinyección de alelo salvaje con alelo L334R es compatible tanto con monómero como con dímero: a fracciones pequeñas de alelo salvaje los valores son compatibles con un dímero con dominancia positiva, mientras que a mayor proporción de alelo salvaje los resultados son compatibles con monómero. Esta desviación observada a mayores cantidades de cRNA de alelo salvaje sugiere que la correlación entre cantidad de cRNA inyectado y expresión en membrana no es lineal en todas las fracciones. La dominancia positiva observada nos estaría indicando que si el dímero fuese la unidad funcional, una subunidad salvaje sería capaz de complementar la falta de actividad de la subunidad inactiva.

La fracción de salvaje o mutante 0.5 es donde teóricamente se espera más diferencia de actividad entre dímero y monómero (para monómero se espera una actividad del 50% y para el dímero del 25% o 75% si hay dominancia negativa o positiva respectivamente). Así pues realizamos más experimentos usando únicamente la fracción 0.5, tratando de distinguir en esta fracción si los mutantes tienen o no dominancia. Los resultados de la fracción 0.5 indican que se trata de un monómero funcional, tanto para G54V ($55.9 \pm 4.8 \%$, N=40 oocitos) como para L334R ($51 \pm 3.37 \%$, N=44 oocitos) (figura 15).

Los resultados con el sistema y⁺L son compatibles con un monómero funcional, aunque no descartan la presencia de dímero.



F(wt)				A) wt/G54		B) wt/L334R	
	n=1	n=2(-)	n=2(+)	actividad (%)	N	actividad (%)	N
0	0	0	0	0 ± 1.8	43	0 ± 1.46	43
0,125	12,5	1,6	23,4	18,6 ± 2,6	8	38,4 ± 4,25	21
0,25	25	6,3	43,7	28,2 ± 3,2	19	49,6 ± 4,02	22
0,375	37,5	14,1	60,9	52 ± 11,1	8	64,1 ± 8,02	8
0,5	50	25	75	55,9 ± 4,8	40	51 ± 3,37	44
0,625	62,5	39,1	85,9	85,9 ± 12,3	8	61,3 ± 9,52	20
0,75	75	56,3	93,7	85,4 ± 7,5	21	70,5 ± 5,51	29
0,875	87,5	76,6	98,4	82,5 ± 6,5	7	83,2 ± 5,84	14
1	100	100	100	100 ± 6	40	100 ± 5,61	40

Figura 15 Actividad de transporte y coexpresión de diferentes fracciones de y+LAT-1. A) wt/G54V y B) wt/L334R. Se inyectaron oocitos con 2 ng de cRNA de 4F2hc en combinación de un máximo de 4 ng de cRNA de y+LAT-1 wt/G54V y wt/L334R, en distintas proporciones. Dos días después de la inyección se analizó el transporte de 50 μ M L-[³H]arginina en 5 minutos. La velocidad de captación de arginina (pmol/5 min/oocito) se ha calculado restando el transporte en oocitos no inyectados. Cada dato (media \pm SEM) representa los porcentajes de transporte. Se representan las curvas teóricas para n=1 (línea discontinua) y n=2 (líneas continuas, valores de dominancia positiva o negativa, asumiendo que una única subunidad wt o mutante es suficiente para que el transportador sea activo o inactivo, respectivamente). n, número de subunidades por transportador. F(wt), fracción de cRNA y+LAT-1wt. N, número de oocitos por punto (entre 7 y 44 oocitos incluidos en cada punto). Los experimentos han sido normalizados considerando 0% de actividad cuando la mezcla de cRNA de y+LAT-1 contiene sólo mutante inactivo. *, valor que no es distinto al teórico para n=1 pero sí es significativamente distinto a los valores teóricos de n=2 (dominancia positiva y negativa) ($p < 0.05$) **, valor que no es distinto al teórico para n=2 con dominancia positiva pero sí es significativamente distinto a los valores teóricos de n=1 y n=2 con dominancia negativa. La estadística ("One sample t-test") se ha realizado con el programa GraphPad. En cada fracción sólo aparecen con asterisco los valores experimentales que son distintos significativamente de dos de los tres valores teóricos.

Resultados

2.1.2. Estudios funcionales de oligomerización en el sistema x_c^- (4F2hc/xCT):

Paralelamente al desarrollo de los experimentos con los mutantes G54V y L334R en y^+ LAT1, la Dra. Emma Gasol en nuestro grupo estaba empezando el estudio de la topología de la subunidad ligera xCT. Para ello, realizó mutagénesis a serina de las cisteínas endógenas de xCT, con la finalidad de construir un mutante de xCT *cysless* que le permitiese realizar estudios de topología mediante SCAM (*Substituted Cysteines Accessibility Method*).

Estudiar el transporte de L-cistina o L-glutamato mediado por 4F2hc/xCT en oocitos de *Xenopus* presenta más ventajas que el estudio del transporte de L-arginina por 4F2hc/ y^+ LAT-1, por los siguientes motivos: i) la inducción de la actividad de transporte de L-glutamato o L-cistina de 4F2hc-xCT (~50-100 veces) es mucho mayor que la inducción de transporte de L-arginina mediado por 4F2hc- y^+ LAT-1 (~3-6 veces), respecto a la que se obtiene con oocitos inyectados sólo con 4F2hc y ii) el transporte basal de L-cistina o L-glutamato en oocitos inyectados sólo con 4F2hc es prácticamente el mismo que el de los no inyectados, a diferencia del transporte de L-arginina, que puede llegar a ser 10 veces mayor, hecho que disminuye la sensibilidad de las medidas del transporte mediado por 4F2hc/ y^+ LAT-1 y dificulta los cálculos.

2.1.2.1. La cisteína C327 de xCT es la diana de la inactivación del transporte por pCMB y pCMBS.

Se determinó el efecto de distintos reactivos sulfhidrilo en la inducción de la actividad de 4F2hc/xCT en oocitos de *Xenopus*. Tanto el pCMB (p-cloromercuribenzoato) como el pCMBS (p-cloromercuribenzenosulfonato) inactivan el transporte cuando se preincuban los oocitos durante 5 minutos con 1mM de reactivo. La C327 de xCT es responsable de la inactivación, ya que el mutante C327S es insensible a estos reactivos. En el siguiente capítulo de resultados, se presentan detalladamente estos resultados. Por los estudios de topología de xCT llevados a cabo por la Dra. Emma Gasol, sabemos que la C327 se encuentra en el segmento trans-membrana 8 de xCT (figura 9 artículo 6). En el resto de subunidades ligeras puede ser tanto cisteína como treonina (fig. 5A, artículo 5). Continuamos pues, con los estudios funcionales de oligomerización, utilizando el mutante xCT C327S.

2.1.2.2. Correlación entre la cantidad de cRNA de xCT inyectado y la actividad de transporte inducida

Determinamos las condiciones de linealidad de 4F2hc/xCT wt y 4F2hc/xCT C327S. Experimentos preliminares realizados por E. Gasol en la caracterización de xCT (tesis doctoral de la Dra. Emma Gasol, 2004 y (Bassi et al., 2001)), indicaban que el transporte inducido por 4F2hc/xCT en oocitos de *Xenopus* inyectados con 10ng de cRNA es lineal en 10 minutos de ensayo. Se comprobó si ocurría lo mismo para el mutante C327S con la inyección de 5ng de cRNA de 4F2hc en combinación con un total de 5ng de cRNA de xCT: la actividad de transporte de 100 μ M L-glutamato en 10 minutos de ensayo es lineal en función de la cantidad de cRNA de xCT inyectado (figura 16). En estas condiciones, el mutante C327S presenta una actividad comparable a la de la proteína salvaje (~75-100%). Debido a que

algunas veces este mutante presenta el 75% de actividad, también se ha utilizado un mutante (C435S) que presenta una actividad parecida al C327S (~75-100% respecto a la proteína salvaje) y es sensible a los reactivos pCMB y pCMBs. Con 5ng de cRNA inyectado la actividad observada es lineal, de manera que los alelos C327S y C435S son totalmente comparables desde un punto de vista funcional (figura 16).

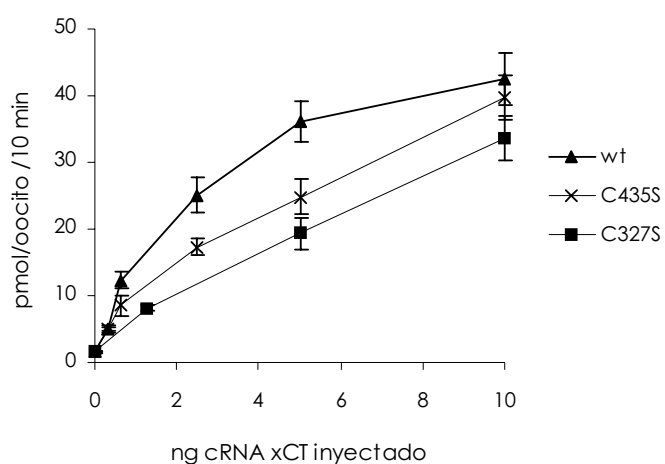
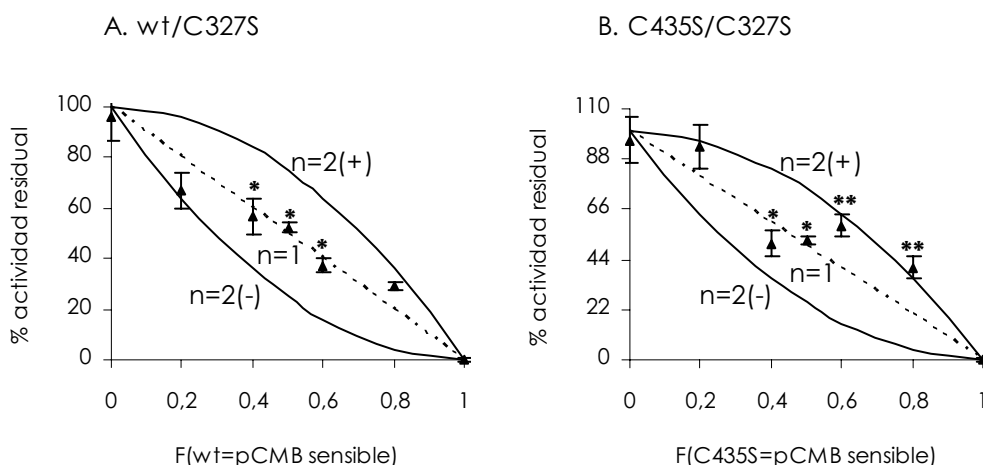


Figura 16 Actividad de transporte de 4F2hc/xCT wt, C327S y C435S en oocitos de Xenopus en función de la cantidad de cRNA inyectado. Se inyectaron los oocitos con 5ng de cRNA de 4F2hc sólo o en combinación de distintas cantidades de cRNA de xCT wt, C327S, o C435S. Tres días después se analizó el transporte de 100µM L-[³H]glutamato en 10 minutos. Los valores corresponden a la media ± SEM de un experimento representativo con 7 oocitos por grupo (n=3 experimentos independientes).

2.1.2.3. Coinyección de distintas fracciones wt/C327S y C435S/C327S de xCT

Se han coinyectado diferentes fracciones de cRNA de xCT C327S respecto al cRNA de xCT wt o de xCT C435S (junto con el cRNA de 4F2hc), y se ha determinado la inducción de la actividad de transporte de L-glutamato o de L-cistina antes y después del tratamiento con pCMB, a las concentraciones en las que hay inhibición total del transporte, y siempre en condiciones de linealidad. La actividad de transporte observada se ha comparado con las curvas de actividad teóricas según la ecuación binomial para n=1 (monómero funcional) y n=2 (dímero funcional).

Como se observa en la figura 17, los resultados de coexpresión de distintas fracciones de cRNA de alelo salvaje con alelo C327S son compatibles con valores de monómero funcional para la mayoría de fracciones ensayadas. En cambio, en el caso de la coexpresión de mutante C435S con mutante C327S los resultados corresponden tanto a monómero como dímero con dominancia positiva. En la coinyección C435S/C327S es muy difícil distinguir entre monómero y dímero. Al igual que en el caso de 4F2hc/y⁺LAT-1, el tipo de dominancia que se observa es positiva. Se han realizado más experimentos en la fracción 0.5 para tratar de distinguir entre monómero y dímero. Los resultados de esta fracción en el transporte de L-cistina apuntan a que se trata de un monómero funcional tanto para la coinyección wt/C327S (52 ± 1.8 %, N=66 oocitos) como para la coinyección C435S/C327S (52.6 ± 1.8 %, N=57 oocitos).



F(pCMB sen)	n=1	n=2(-)	n=2(+)	A) wt/C327S		B) C435S/C327S	
				actividad (%)	N	actividad (%)	N
0	100	100	100	96.42 ± 10.04	15	96.42 ± 10.04	15
0.2	80	64	96	67.03 ± 6.83	15	93.61 ± 9.81	16
0.4	60	36	84	56.95 ± 7.18	15	50.71 ± 5.71	14
0.5	50	25	50	52.13 ± 1.81	66	52.64 ± 1.76	57
0.6	40	16	64	37.32 ± 2.85	16	58.68 ± 4.73	14
0.8	20	4	36	28.94 ± 1.64	15	40.51 ± 5	15
1	0	0	0	0 ± 0.74	15	0 ± 0.6	16

Figura 17 Inactivación con pCMB y coexpresión de xCT wt/C327S y C435S/C327S. Se inyectaron oocitos con 5 ng de cRNA de 4F2hc como máximo, en combinación con un máximo de 5 ng de cRNA de xCT wt/C327S A) y xCT C435S/C327S B), en distintas proporciones. 2-4 días después se analizó el transporte inducido de 50 μ M L-[³⁵S]cistina en 10 minutos antes y después de tratamiento con 5 min 1 mM pCMB. La velocidad de transporte (pmol/10min/oocito) se ha calculado restando el transporte inducido en oocitos no inyectados. Los valores (media \pm SEM) representan los porcentajes de transporte después de tratar con pCMB. Se representan las curvas teóricas para n=1 (línea discontinua) y n=2 (líneas continuas, valores de dominancia positiva o negativa, asumiendo que una única subunidad activa o inactiva es suficiente para que el transportador sea activo o inactivo, respectivamente). n, número de subunidades por transportador. N, número de oocitos por punto. F(wt o C435S), fracción de cRNA inyectado sensible al pCMB. Los experimentos han sido normalizados considerando 0% de actividad la fracción inactivada con pCMB que sólo contiene xCT wt o C435S. *, valor que no es distinto al teórico para n=1 pero sí es significativamente distinto a los valores teóricos de n=2 (dominancia positiva y negativa) (p<0.05). **, valor que no es distinto al teórico para n=2 con dominancia positiva pero sí es significativamente distinto a los valores teóricos de n=1 y n=2 con dominancia negativa. La estadística ("One sample t-test") se ha realizado con el programa Graph Pad. En cada fracción sólo aparecen con asterisco los valores experimentales que son distintos significativamente de dos de los tres valores teóricos..

2.1.2.4. Expresión de concatenámeros xCT-xCT en oocitos

Debido a la dificultad de distinguir entre monómero y dímero en los experimentos de coinyección anteriores, se han construido concatenámeros formados por dos subunidades de xCT unidas mediante un conector formado por 12 residuos aminoacídicos (SLGAAPDAAPGS). En total se han construido cuatro concatenámeros: wt-wt, C327S-C327S, C327S-wt, y wt-C327S. Con los concatenámeros mixtos (combinaciones wt y mutante C327S) se tiene la certeza que un 50% de la proteína expresada es salvaje, y el otro 50% es mutante.

En primer lugar se ha determinado la inducción de la actividad de transporte de los concatenámeros junto con 4F2hc, encontrando que presentan ~10-35% de actividad respecto de 4F2hc/xCT wt (figura 18). Esta actividad es suficiente para realizar los experimentos de inactivación mediante pCMB gracias a la fuerte inducción de actividad de transporte del sistema x_c^- en oocitos. También se ha comprobado que esta actividad no varía significativamente al construir unos concatenámeros con un conector de mayor tamaño (20 residuos aminoacídicos QQQQQQSLGAAPDAAPGS) (figura 18).

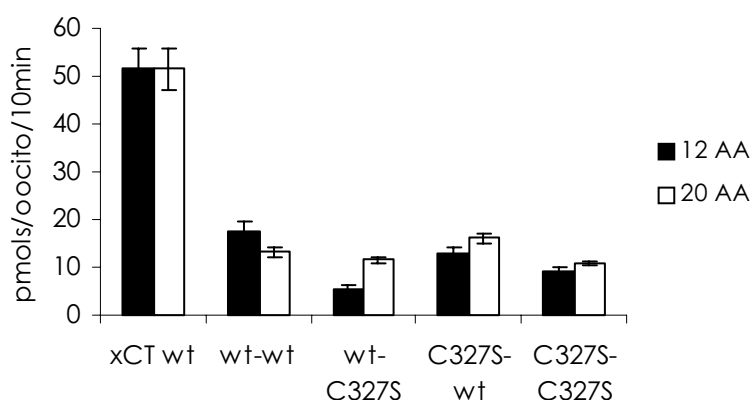


Figura 18 Actividad de transporte de los concatenámeros xCT-xCT. Se inyectaron oocitos de *Xenopus* con 5 ng cRNA de 4F2hc junto con 5 ng xCT wt (WT) o 25 ng cRNA de los concatenámeros indicados ((WT)₂, WT-CS, CS-WT, (CS)₂). 3-4 días después se ensayó el transporte de 100 μ M L-[³H]glutamato. El transporte inducido (pmol/oocito/10min) se ha calculado restando el transporte presente en oocitos no inyectados. CS, C327S. Resultados correspondientes a los concatenámeros con conector de 12 residuos (12 AA, en negro) y 20 residuos (20 AA, en blanco). Se muestra un experimento representativo (7-8 oocitos por grupo) de un total de n=3.

2.1.2.5. Efecto del pCMB en los concatenámeros xCT-xCT

Se ha analizado la actividad de transporte de L-glutamato de los concatenámeros antes y después del tratamiento con pCMB en oocitos. Como se observa en la figura 19, después de la incubación con pCMB, los concatenámeros control wt-wt y C327S-C327S, se comportan de la misma manera que los oocitos que expresan las mismas proteínas sin fusionar. Es decir, el concatenámtero C327S-C327S no presenta inhibición por pCMB (92.94 ± 0.61 %, N=55 oocitos), mientras que el wt-wt se inactiva completamente (3.66 ± 0.61 %, N=51 oocitos). Esto confirma que la sensibilidad al reactivo no se ve alterada por el procedimiento de fusión de las dos proteínas. En cambio, tanto el concatenámtero wt-C327S como el

Resultados

C327S-wt retienen alrededor del 50% de la actividad de transporte después de tratar con pCMB: i) concatenámero C327S-wt = 44.84 % \pm 3.01%, N=52 oocitos, y ii) concatenámero C327S-wt = 49.03 \pm 3.19%, N=55 oocitos. Los resultados corresponden a los concatenámeros de conector de mayor longitud. Se han obtenido valores parecidos con el otro conector (no se muestra). Una actividad alrededor del 50% significa que cada subunidad actúa de manera independiente, tratándose de monómeros funcionales. En cambio, si existiese dominancia negativa se esperaría una actividad de transporte del 0% después de tratar con el reactivo sulfhidrilo, y en el caso de dominancia positiva se esperaría una actividad de alrededor del 100%.

De todos los resultados funcionales obtenidos con el sistema x_c^- se infiere que el monómero 4F2hc/xCT es la unidad funcional del transportador, resultado consistente con la estequiometría de subunidades observada estructuralmente mediante las técnicas de BN-PAGE, FRET, *cross-linking* y cromatografía de exclusión (ver resumen en apartado 2.1.2.6. y artículo 4).

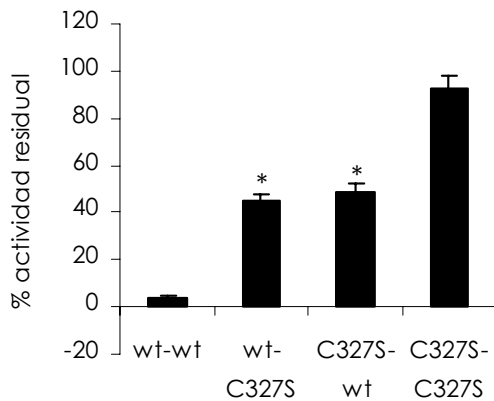


Figura 19 Actividad residual de los concatenámeros xCT-xCT tras incubación con pCMB. Porcentaje de actividad de transporte de 100 μ M L-[3 H] glutamato que se observa después de 5 minutos de incubación con 1 mM pCMB. La velocidad de captación de glutamato (pmol/10 min/oocito) se ha calculado restando el transporte inducido en oocitos inyectados con cRNA de 4F2hc. Los datos corresponden a la media \pm S.E.M, de N=51 (wt-wt), 52 (wt-C327S), 55 (C327S-wt) y 55 (C327S-C327S) oocitos. Los valores provienen de mínimo 2 experimentos independientes con distinta síntesis de cRNA, con 6-8 oocitos por punto. La comparación de los concatenámeros mixtos (wt-C327S y C327S-wt) con los concatenámeros control (wt-wt y C327S-C327S) se ha realizado mediante el test t de student (paired t-test, $p < 0.05$) con el programa GraphPad.

2.1.2.6. Resumen de los resultados obtenidos para el sistema x_c^- con técnicas biofísicas *in vitro* e *in vivo*

Estos resultados se muestran en el artículo 4 (sometido). La estructura oligomérica de los complejos 4F2hc/xCT y 4F2hc/LAT-2 analizada mediante BN PAGE a partir de membranas totales de células Hela transfectadas es monomérica. La movilidad de los complejos 4F2hc/ his xCT y 4F2hc/ myc LAT-2 corresponde a un monómero de \sim 250 kDa. Si se tiene en cuenta que las proteínas politópicas de membrana, tienen una movilidad en BN PAGE que les proporciona un tamaño de 1.8 veces su peso molecular (Heuberger et al., 2002), este complejo de \sim 250 kDa puede corresponder a un tamaño de \sim 139 kDa sin detergente. En ambos casos el heterodímero tiene la misma movilidad cuando se solubiliza con digitonina que cuando se desnaturaliza con SDS. Esto sugiere que se observa el monómero y no existen otras especies de menor tamaño. En presencia de un agente reductor, myc LAT-2 e his xCT tienen una movilidad de \sim 90 kDa y no se observan bandas de menor tamaño. En estas condiciones his xCT y myc LAT-2 aparecen como una única especie. Esta estructura oligomérica es similar a la observada para el heterodímero 4F2hc/LAT-2 en membranas totales de riñón

de ratón. El tratamiento con DTT evidencia la aparición de una banda de ~90 kDa, similar a la observada en células transfectadas y que muy probablemente representa LAT-2 en forma de monómero. Mediante esta técnica, también se han estudiado dos concatenámeros de xCT distintos: $hisxCT-4F2hc$, que presenta la misma movilidad que cuando las dos subunidades se coexpresan en plásmidos separados, que no es modificada ni por SDS ni DTT; y $hisxCT-xCT$, que presenta una movilidad de 540kDa, alrededor de dos veces la movilidad de $4F2hc/hisxCT$ (transfectados en plásmidos separados o unidos covalentemente en concatenámeros), y que tampoco se modifica en presencia de SDS. Una banda de este mismo tamaño, aunque muy débil, se observa en el concatenámero $hisxCT-4F2hc$ tras una larga exposición (también en el caso de $4F2hc/LAT2$).

Los resultados de cromatografía de exclusión molecular a partir de membranas totales de riñón muestran un tamaño de 295 kDa para $4F2hc/LAT2$, consistente con una estructura heterodimérica. Este tamaño refleja su estado en la membrana plasmática, donde se encuentran principalmente *in vivo*. Resultados similares se han obtenido con $4F2hc/xCT$. Experimentos de *crosslinking* con DMS (dimetil suberimidato) en membranas totales de células Hela transfectadas con $hisxCT$ no indican oligomerización: bajo condiciones reductoras, la banda de 125kDa representa la mayoría del total del heterodímero $4F2hc/xCT$, mientras que la banda de 240kDa no se detecta apenas y no aumenta significativamente después de la adición del DMS.

Para estudiar la oligomerización *in vivo* se ha puesto a punto la metodología FRET (*Fluorescence resonance energy transfer*) en células Hela transfectadas con el concatenámero $xCT-4F2hc$, que lleva además el marcador YFP o CFP fusionado en el extremo N-terminal. No se detectan señales de FRET positivas en la membrana plasmática cuando se coexpresan CFP- y YFP- $xCT-4F2hc$, sugiriendo que los heterodímeros $4F2hc/xCT$ no se asocian para formar oligómeros o que las condiciones experimentales imposibilitan la detección de estos complejos.

2.1.3. Estudios funcionales de oligomerización en el sistema $b^{0,+}$ (rBAT/ $b^{0,+}AT$):

Posteriormente a los estudios con $4F2hc/xCT$, realizamos los estudios funcionales del sistema $b^{0,+}$ (rBAT/ $b^{0,+}AT$) en células Hela, ya que los oocitos de *Xenopus* tienen una subunidad $b^{0,+}AT$ endógena. Se siguieron tres estrategias distintas para encontrar unos mutantes que presentasen o no sensibilidad a algún reactivo sulfhidrilo:

1) Experimentos preliminares tanto en oocitos de *Xenopus* como en células Hela, confirmaron que el transporte inducido por rBAT en oocitos y por rBAT/ $b^{0,+}AT$ en células, es insensible a pCMB. La C327, diana del pCMB en xCT, corresponde a la T313 en $b^{0,+}AT$ (figura 5 del artículo 5). Debido a la elevada homología entre las subunidades ligeras, se construyó el mutante $b^{0,+}AT$ T313C con la finalidad de obtener sensibilidad a pCMB. Sin embargo, a pesar de ser completamente activo, el mutante T313C no presenta sensibilidad a pCMB. Se testó entonces la sensibilidad al reactivo pCMBS. Tanto $b^{0,+}AT$ wt como T313C son sensibles a la acción del pCMBS, aunque el mutante T313C aumenta considerablemente la sensibilidad de la acción del pCMBS sobre la proteína salvaje. A pesar de la diferencia de reactividad al

Resultados

pCMBS entre la proteína salvaje y T313C, y analizando distintas concentraciones y tiempo de acción del pCMBS (figura 20), no encontramos unas condiciones de trabajo en las que la proteína salvaje no se inactive y el mutante sí, con lo que no se pudieron realizar los estudios funcionales de oligomerización con este mutante.

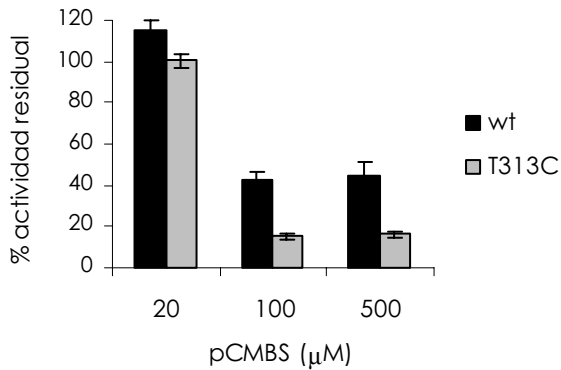


Figura 20 Efecto del pCMBS en b^{0+} AT wt y T313C. Células Hela transfectadas con rBAT/ b^{0+} AT wt o T313C, crecidas a 33°C, se trataron en presencia o no de las concentraciones indicadas de pCMBS durante 5 minutos. Tras tres lavados se determinó el transporte de 20 μM L-[³⁵S] cistina. Los valores (media ± S.E.M.; n=4) representan el porcentaje de la inducción de la actividad de transporte (pmol/mg de proteína) respecto a la actividad observada sin tratar con pCMBS.

2) Paralelamente, la Dra. Emma Gasol, en el estudio de la topología de xCT, encontró que el mutante H110C, localizado en el *loop* intracelular (IL2) entre los dominios TM2 y TM3 es sensible a los reactivos MTSES y MTSEA (figura 6 del artículo 6). Esta histidina corresponde al glutámico 96 en b^{0+} AT, y quizás esta posición podría ser accesible a estos reactivos en b^{0+} AT. Aunque comprobamos que rBAT/ b^{0+} AT es insensible a MTSET y MTSES, el mutante b^{0+} AT E96C es totalmente inactivo (figura 21).

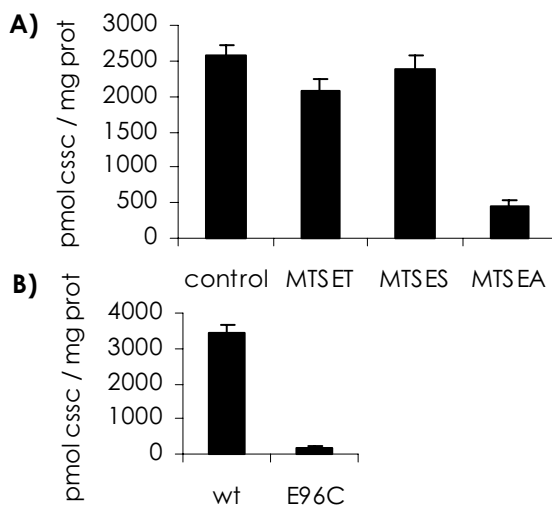


Figura 21 Efecto de reactivos MTS en rBAT/ b^{0+} AT. A) Células Hela transfectadas con rBAT/ b^{0+} AT se trataron con 1mM MTSET, 10 mM MTSES, o 2.5 mM MTSEA durante 5 minutos. Tras tres lavados se determinó el transporte de 20 μM L-[³⁵S] cistina. B) b^{0+} AT E96C no induce actividad de transporte en células Hela. Se determinó el transporte de 20 μM L-[³⁵S] cistina en células Hela transfectadas con rBAT b^{0+} AT wt y rBAT/ b^{0+} AT E96C. Los valores (media ± S.E.M.; n=4) representan la inducción de la actividad de transporte en pmol/mg de proteína después del tratamiento o no (control) con el reactivo MTS (n=2 experimentos independientes).

3) Finalmente, al encontrar que rBAT/ b^{0+} AT es sensible a MTSEA (figura 21), decidimos identificar la cisteína responsable de esta inactivación mediante la construcción de mutantes Cys>Ser. b^{0+} AT contiene 10 cisteínas endógenas (figura 22). Sobre los resultados de la topología de xCT, y de la información que disponíamos hasta el momento de la accesibilidad de cisteínas a reactivos sulfhidrilo en las subunidades ligeras, escogimos aquellas cisteínas que podrían estar expuestas al MTSEA. En total analizamos 5 mutantes:

C65S, C82S, C266S, C321S y C440S, escogidos según: i) que no fuesen cisteínas muy conservadas, o ii) que estuviesen cercanas a las posiciones accesibles a reactivos sulfhidrilo conocidas en otras LSHATS.

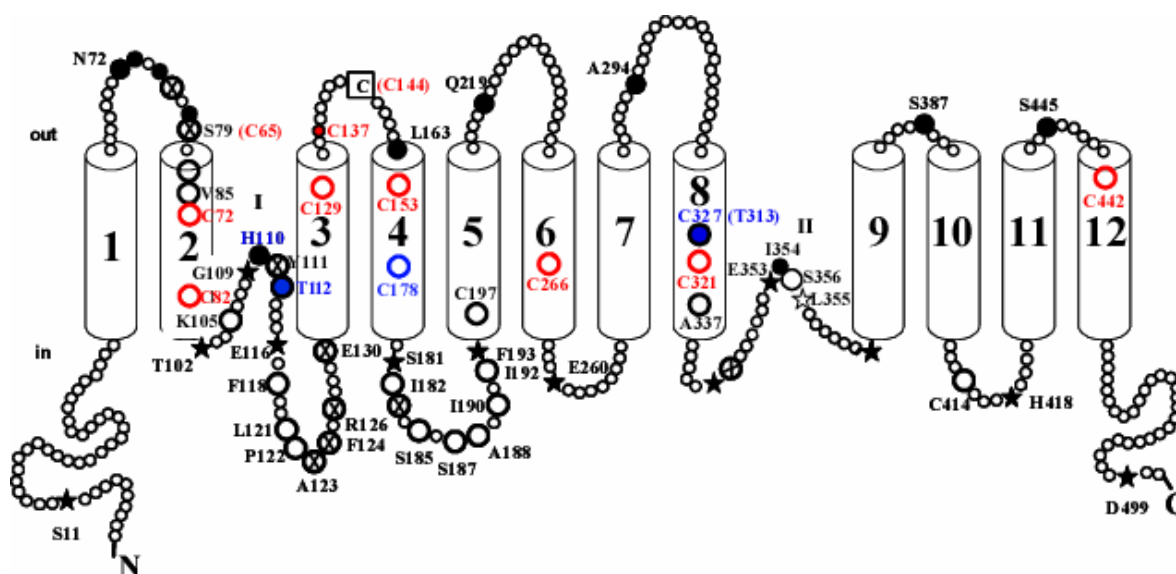


Figura 22 Representación de la topología de xCT como modelo de topología de las LSHATS. Los 12 dominios transmembrana están numerados. En rojo, situación putativa de las 10 cisteínas endógenas de $b^{0,+}AT$. En azul, posiciones accesibles a reactivos sulfhidrilo en distintas LSHATS: en xCT (C327 (pCMB, pCMBs), H110 (MTSES, MTSEA), T112 (MTSES, MTSET, MTSEA)); en $b^{0,+}AT$ T313 (pCMBs); y en LAT-1 C178 (pCMBs, tesis doctoral de R. Estévez, 1998). En paréntesis aparecen las posiciones de $b^{0,+}AT$ que corresponden a la misma posición del residuo señalado en xCT. C158, señalado con un cuadrado, es el residuo implicado en la formación del puente disulfuro con 4F2hc. Aparecen dos *reentrant loop* (I, (Gasol et al., 2004) y II, (E. Gasol, R. Brauner, L. Rodríguez, M. Palacín, resultados en progreso) en los que se localizan residuos clave: H110 y T112 (*reentrant loop* I), y I354 y L355 (*reentrant loop* II). Figura extraída y adaptada de (Gasol et al., 2004).

Los resultados de actividad y sensibilidad a MTSEA de estos mutantes aparecen en la figura 23. La C321 es responsable de la inactivación por MTSEA. El mutante C321S presenta entre un $50 \pm 5\%$ y un $71 \pm 8\%$ de actividad de transporte de L-cistina respecto a la proteína salvaje e 3 experimentos independientes. Escogimos este mutante para los estudios funcionales de oligomerización del sistema $b^{0,+}$. La C321 se localiza en la cara citoplasmática del dominio TM8, según las predicciones de hidrofobicidad y el modelo de topología de xCT (figura 22).

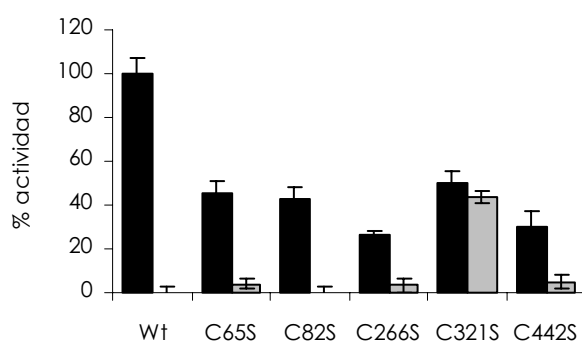


Figura 23 Actividad de transporte y efecto de MTSEA en mutantes de cisteína de $b^{0,+}AT$. Células Hela que expresan rBAT / $b^{0,+}AT$ wt y los mutantes de $b^{0,+}AT$ indicados, se trataron o no con 2.5 mM MTSEA durante 5 minutos. Tras tres lavados se determinó el transporte de 20 μM L-[^{35}S]cistina en pmol csc/mg de proteína. Los valores (media \pm S.E.M; n=4) representan los porcentajes relativos al transporte inducido por rBAT/ $b^{0,+}AT$ wt sin tratar.

Resultados

2.1.3.1. Expresión de concatenámeros $b^{0,+}AT$ - $b^{0,+}AT$ en células Hela

Debido a la dificultad de realizar experimentos de coexpresión de diferentes fracciones de proteína salvaje y mutante en células Hela, decidimos construir concatenámeros y realizar los experimentos funcionales directamente con ellos. Se construyeron los concatenámeros wt-wt, C321S-C321S, C321S-wt, y wt-C321S, con el conector de 12 aminoácidos. La actividad de transporte de L-cistina que se obtiene con los concatenámeros es ~15%-30% de la actividad de la expresión de rBAT/ $b^{0,+}AT$ (figura 24).

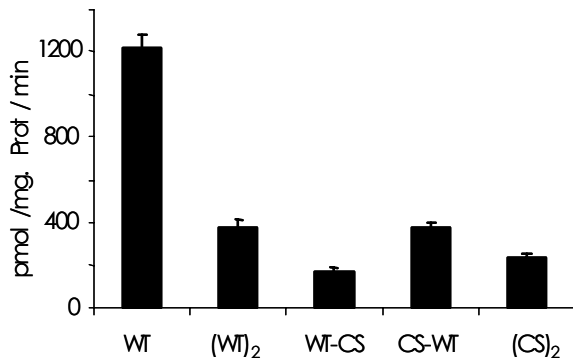
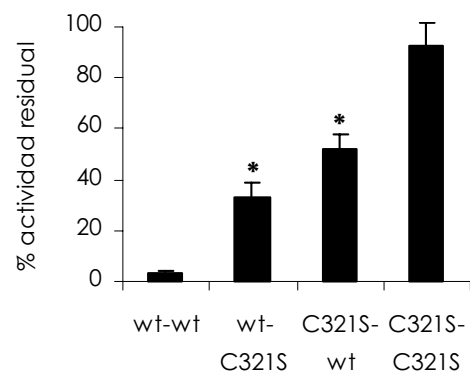


Figura 24 Actividad de transporte de los concatenámeros $b^{0,+}AT$ - $b^{0,+}AT$. Se transfectaron células Hela con el cDNA de rBAT junto con $b^{0,+}AT$ wt (WT) o con los concatenámeros indicados ((WT)₂, WT-CS, CS-WT, (CS)₂). Tras 48h de incubación a 33°C se ensayó la actividad de transporte de 20 μ M L-[³⁵S] cistina. Los valores (media \pm S.E.M; n=4) representan la inducción de la actividad de transporte en pmol/mg de proteína. CS, C321S

2.1.3.2. Efecto del MTSEA en los concatenámeros $b^{0,+}AT$ - $b^{0,+}AT$

Como se muestra en la figura 25, las células que expresan los concatenámeros wt-wt y C327S-C327S se comportan de la misma manera que las células que expresan estas proteínas sin fusionar. Es decir, el concatenámere C321S-C321S no presenta inhibición por MTSEA (92.9 ± 8.7 %, n=11 pocillos), mientras que el wt-wt se inactiva completamente (2.91 ± 1.55 %, n=21 pocillos). Esto confirma que la sensibilidad al reactivo no se ve alterada por el procedimiento de fusión de las dos proteínas. En cambio, tanto el concatenámere C321S-wt como el wt-C321S retienen alrededor del 50 % de la actividad de transporte después de tratar con MTSEA (32.81 ± 5.77 %, n=20, C321S-wt; y 51.88 ± 5.94 %, n=20, wt-C321S).

Figura 25 Actividad residual de los concatenámeros $b^{0,+}AT$ - $b^{0,+}AT$ tras incubación con MTSEA. Porcentaje de la actividad de transporte de 20 μ M L-[³⁵S] cistina, que se obtiene después de 5 minutos de incubación con 2.5 mM MTSEA, en células Hela transfectadas con los concatenámeros $b^{0,+}AT$ - $b^{0,+}AT$ wt-wt, wt-C321S, C321S-wt, y C321S-C321S, respecto a la actividad de transporte que se obtiene en las células sin tratar. Cada barra corresponde a la media \pm S.E.M, de n=21 (wt-wt), n=20 (wt-C321S), n=20 (C321S-wt) y n=11 (C321S-C321S) datos, extraídos de 5 experimentos independientes. La comparación de los concatenámeros mixtos (wt-C321S y C321S-wt) con los concatenámeros control (wt-wt y C321S-C321S) se ha realizado mediante el test t de student (paired t-test, $p < 0.05$) con el programa GraphPad.



Según estos resultados, la mínima unidad funcional del sistema $b^{0,+}$ es el monómero formado por rBAT/ $b^{0,+}$ AT. Esto difiere de los resultados estructurales obtenidos por la Dra. Esperanza Fernández, en los que se observa la formación de un dímero de heterodímeros $2x(rBAT/b^{0,+}AT)$ (ver resumen en apartado 2.1.3.3. y artículo 4).

2.1.3.3. Resumen de los resultados obtenidos para el sistema $b^{0,+}$ con las técnicas biofísicas *in vitro* e *in vivo*

Las figuras de estos resultados se muestran en el artículo 4 (sometido). El complejo rBAT/ $b^{0,+}$ AT en células transfectadas y membranas “*brush border*” de riñón de ratón tiene un tamaño de ~500 kDa en BN PAGE, consistente con una estructura heterotetramérica. El concatenámero $_{his}b^{0,+}AT/rBAT$ expresado en células HeLa, también tiene el mismo tamaño que el supercomplejo rBAT/ $b^{0,+}$ AT en BN PAGE. El SDS disgrega parcialmente el supercomplejo de ~550 kDa en un complejo de ~250 kDa que correspondería a un complejo de ~139 kDa (las proteínas politépicas de membrana tienen una movilidad en BN PAGE de 1.8 veces su peso molecular (Heuberger et al., 2002)), que es un peso molecular similar al observado para rBAT/ $b^{0,+}$ AT en SDS PAGE (sin DTT).

La adición de 5 M urea no afecta la estabilidad del supercomplejo de ~550 kDa en BN PAGE. Esto sugiere que si el supercomplejo formado por rBAT/ $b^{0,+}$ AT es un dímero de heterodímeros, la K_d del supercomplejo es muy baja. El tratamiento con SDS en condiciones reductoras muestra el estado oligomérico de cada subunidad por separado. $b^{0,+}$ AT muestra dos estados de oligomerización, indicando la presencia de dos moléculas en el supercomplejo. En el caso de rBAT, en estas condiciones sólo se observa un monómero, tanto en las membranas “*brush border*” como cuando rBAT/ $b^{0,+}$ AT se expresan en células HeLa. Las diferentes especies del complejo son similares en células y membranas “*brush border*”.

Los resultados de cromatografía de exclusión molecular a partir de membranas “*brush border*” de riñón muestran un tamaño de 502 kDa para rBAT/ $b^{0,+}$ AT, consistente con una estructura heterotetramérica. Este tamaño refleja su estado en la membrana plasmática, donde se encuentran principalmente *in vivo*. Experimentos de *crosslinking* con DMS en membranas totales de células HeLa transfectadas con rBAT y $b^{0,+}$ AT desplazan la movilidad del heterodímero rBAT/ $b^{0,+}$ AT de la banda de 130 a la de 250 kDa, de forma dosis dependiente, indicando que los dos heterodímeros están en contacto muy cercano. El *crosslinking* ocurre en la subunidad ligera, como se deduce del resultado en condiciones reductoras: el tamaño de rBAT no se ve modificado por la presencia del DMS, mientras que se observa un incremento dosis dependiente de la forma dimerica de $b^{0,+}$ AT.

Para estudiar la oligomerización *in vivo* del sistema $b^{0,+}$ se ha puesto a punto la metodología FRET en células HeLa transfectadas con el concatenámero $b^{0,+}AT-rBAT$, que lleva además el marcador YFP o CFP fusionado en el extremo N-terminal de $b^{0,+}AT$. Se han detectado señales de FRET positivas en la membrana plasmática cuando se coexpresan CFP- y YFP- $b^{0,+}AT-rBAT$, sugiriendo que los extremos N-terminales entre subunidades $b^{0,+}AT$ están próximos, y que $b^{0,+}AT-rBAT$ forma oligómeros en la superficie celular.

2.2. Caracterización funcional de la C327 de xCT

Cuando encontramos que la C327 de xCT era la diana de la inactivación por pCMB y pCMBS, iniciamos una serie de experimentos dirigidos a determinar el papel de esta cisteína en la función y estructura del transportador. El hecho que hizo interesante el estudio de esta cisteína era que a pesar de localizarse en medio de un segmento trans-membrana, ésta era accesible al pCMBS, reactivo impermeable a la membrana. Esto indicaba que el residuo C327, a pesar de su localización, era accesible desde el exterior y podría formar parte del sitio de unión o de la vía de translocación del sustrato.

Realizamos una serie de experimentos que incluyen la caracterización de la inactivación, protección de la inactivación por sustrato y estudios cinéticos, que proporcionaron evidencia de que este residuo está próximo al lugar de unión o vía de translocación de sustrato. Paralelamente a los estudios de C327, la Dra. Emma Gasol resolvió la topología de xCT mediante la estrategia SCAM, y encontró otro residuo relevante para la función y estructural de xCT, H110, localizado en un *reentrant loop*. En estos estudios de topología realicé los análisis de dixon plot y eflujo con el inhibidor de xCT carboxifenil glicina (4-S-CPG). Este inhibidor es de tipo competitivo y no es transportado (Patel et al., 2004). Su estructura es muy parecida al pCMB y pCMBS (figura 28).

2.2.1. Caracterización de la inactivación de 4F2hc/xCT mediante reactivos sulfhidrilo

Tanto el pCMB como el pCMBS inhiben el transporte de L-glutamato y L-cistina mediado por 4F2hc/xCT de forma dosis dependiente (a 1 minuto de incubación, IC_{50} (pCMB) = $76 \pm 11 \mu\text{M}$ e IC_{50} (pCMBS) = $300 \pm 89 \mu\text{M}$; figura 3C artículo 5). Esta inhibición es reversible por tratamiento durante 5 minutos con el agente reductor β -mercaptoetanol (figura 26), verificando que uno o mas residuos de cisteína son la diana de los reactivos mercuriales y que la proteína no ha sufrido cambios conformacionales que impidan el acceso a esta posición después de la incubación con el pCMB y el pCMBS.

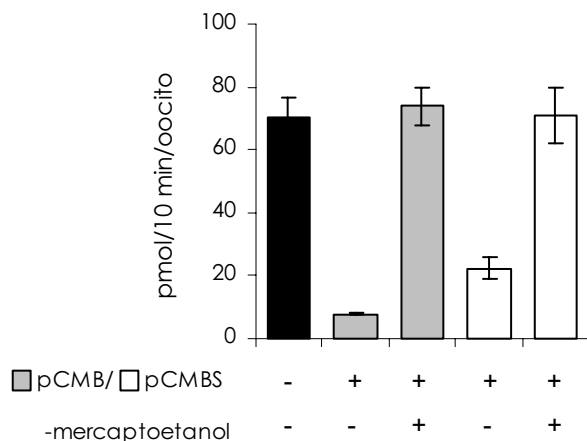


Figura 26 La inactivación de 4F2hc/xCT wt por pCMB y pCMBS es reversible mediante β -mercaptoetanol. Tres días después de la inyección de 10 ng cRNA de 4F2hc/xCT wt, grupos de 7-8 oocitos se incubaron con 1 mM pCMB o pCMBS durante 5 minutos. Tras tres lavados se incubaron durante 5 minutos con o sin 5 mM β -mercaptoetanol. Después se determinó la actividad de transporte de 100 μM L-[^3H]glutamato en 10 minutos (pmol/10min/oocito). Se muestra un experimento representativo (7-8 oocitos por grupo) (n=3).

Cuando se aplica externamente 10 mM de cisteína libre, también se revierte la inhibición, en presencia o no de sustrato, cosa que no ocurre si la cisteína se aplica desde el interior de los oocitos mediante inyección (figura 27). Estos resultados indican que la cisteína diana de la acción de los reactivos mercuriales es accesible desde el medio extracelular.

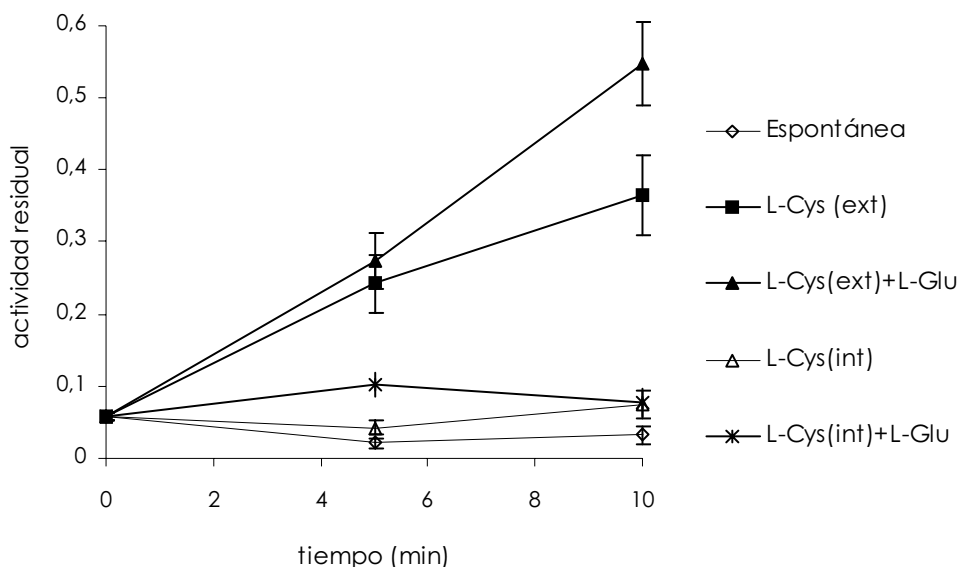


Figura 27 La inactivación de 4F2hc/xCT wt por pCMB y pCMBS es reversible mediante cisteína extracelular. Tres días después de la inyección de 10 ng cRNA de 4F2hc/xCT wt, grupos de 7-8 oocitos se incubaron con 1 mM pCMB o pCMBS durante 5 minutos. Tras tres lavados se incubaron durante 0, 5 y 10 minutos con o sin 10 mM cisteína en el medio de incubación (en presencia o no de 10 mM L-glutamato) o inyectada dentro del oocito. Después se determinó la actividad de transporte de 100 μ M L-[3 H]glutamato en 10 minutos (pool / 10min / oocito). La reactivación espontánea es aquella en la que no se ha aplicado cisteína externa ni internamente antes de la determinación de la actividad de transporte. La fracción de actividad residual se ha calculado respecto a la actividad de 4F2hc/xCT sin tratar con pCMB, y representa la media \pm S.E.M. Se muestra un experimento representativo (7-8 oocitos por grupo) (n=3).

2.2.2. La cisteína 327 de xCT es responsable de la inactivación por pCMB y pCMBS

Seguidamente examinamos cuál de las subunidades contenía la/s cisteína/s diana. Para ello utilizamos un mutante de 4F2hc *cysless*, que por estudios previos sabíamos que es enteramente funcional (Estevez et al., 1998; Pfeiffer et al., 1998). En este mutante, las dos cisteínas endógenas de 4F2hc (C109 y C330, la primera de las cuales forma el puente disulfuro con xCT) se han mutado a serina (figura 1, artículo 5). Se analizó la actividad de transporte de L-glutámico y L-cistina tras la coexpresión de 4F2hc *cysless*/xCT wt antes y después del tratamiento con pCMB y pCMBS. Los dos reactivos mercuriales son capaces de inactivar el transporte, indicando que la o las cisteínas responsables se encuentran en la subunidad ligera xCT (figura 1, artículo 5).

xCT contiene siete cisteínas endógenas (figura 2A artículo 5). Se analizó el transporte de L-cistina y L-glutamato de los distintos mutantes de xCT C>S construidos por la Dra. Emma Gasol al estudiar de la topología de xCT, antes y después del tratamiento con pCMB y

pCMBS. Todos los mutantes son activos, indicando que ninguno de ellos es indispensable para el funcionamiento de la proteína. De todos ellos, únicamente C327S pierde la sensibilidad al pCMB y pCMBS sugiriendo que esta cisteína es la responsable de la inactivación (figura 2B artículo 5). Este resultado ha sido confirmado reintroduciendo la cisteína 327 en un mutante de xCT *cysless* (xCT *cysless*+C327) y analizando la actividad de transporte 4F2hc/xCT *cysless* y 4F2hc/xCT *cysless*+C327 antes y después del tratamiento con pCMB y pCMBS. Como se esperaba, 4F2hc/xCT *cysless*+C327 es sensible tanto a pCMB como a pCMBS, a diferencia de 4F2hc/xCT *cysless* que es totalmente insensible (figura 2C artículo 5). Con estos resultados concluimos que la C327 de xCT es la diana responsable de la inactivación del transporte por pCMB y pCMBS.

De los resultados de la topología de xCT realizados por la Dra. Emma Gasol, sabemos que la C327 se localiza en medio del segmento trans-membrana 8 por las siguientes evidencias: la posición 294, que corresponde a una alanina (A294) localizada en el *loop* extracelular 4, se biotinila con el reactivo BM (3-(N-maleimidilpropionil)biocitin) desde el exterior celular, mientras que la posición 353, que corresponde a un glutámico (E353), se biotinila con BM desde el interior celular (accesible sólo cuando se permeabilizan las células), indicando que entre ellos se encuentra un segmento trans-membrana en el que se localiza la C327 (TM8) (figuras 4 y 9, artículo 6). Además, intentos de biotinilación de la C327 con BM han resultado negativos, como es de esperar para un residuo que se encuentra en un segmento trans-membrana (tesis doctoral Emma Gasol, 2004). A pesar de esto, es accesible a moléculas impermeables como el pCMBS y la cisteína aplicadas desde el exterior, indicando que la C327 es accesible al entorno acuoso extracelular.

2.2.3. La cisteína 327 de xCT se encuentra en un entorno restringido estructuralmente

Se ha analizado el efecto de otros reactivos sulfhidrilo en el transporte de 4F2hc/xCT wt: reactivos MTS (MTSES, MTSEA, MBTA y MTSBn), NEM, iodoacetamida, ácido mersalilo y cloruro de mercurio (figura 28). Ninguno de estos reactivos, menos el MTSBn y el HgCl₂, inactivan el transporte de L-glutamato incluso cuando este sustrato está presente junto con el reactivo durante el tiempo de preincubación. Esto significa que o bien los reactivos no interaccionan con ninguna cisteína (en ausencia o en presencia de sustrato), o bien, aunque interaccionen, no afectan el transporte. Para diferenciar entre estas dos opciones, después de lavar los oocitos preincubados con los distintos reactivos, se incubaron nuevamente con pCMB en condiciones en las que normalmente se inhibe el transporte. Como se observa en la figura 28B, la preincubación no modifica la inhibición por pCMB, indicando que ninguno de los reactivos tiene acceso a la C327.

En la figura 29 se muestran las estructuras de los distintos reactivos sulfhidrilo utilizados. El pCMB, pCMBS y MTSBn presentan una similitud estructural aparente ya que los tres contienen un anillo aromático.

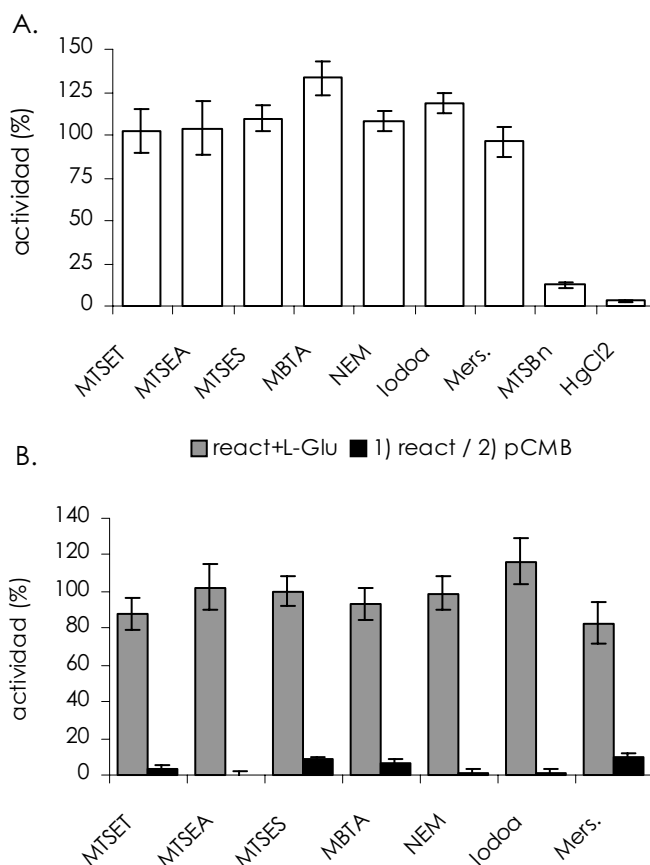


Figura 28 Efecto de distintos reactivos sulfhidriilo en la actividad de 4F2hc/xCT. Oocitos inyectados con 10 ng cRNA 4F2hc/xCT, se trataron o no con 1mM MTSET, 2.5mM MTSEA, 10mM MTSES, 1mM MBTA, 5mM NEM, 1mM iodoacetamida, 1mM mersalilo, 1mM MTSBn y 200 μ M HgCl₂, durante 5 minutos, en ausencia (A) o presencia (B) de 2mM L-Glu, 2-3 días después de la inyección. Después, se lavaron tres veces en medio colina-Cl, y se determinó la actividad de transporte en (A) o se volvieron a incubar con o sin 1mM pCMB durante 5 minutos en (B) antes de determinar la actividad de transporte. La actividad de transporte corresponde a la captación de 100 μ M L-[³H]glutamato en 10 minutos (pmol/10 min por oocito). Los valores (media \pm S.E.M) representan el porcentaje de actividad obtenida respecto al transporte de 4F2hc/xCT en condiciones normales, de un experimento representativo (n=2), con 7-8 oocitos por condición. Iodoa=iodoacetamida, Mers=ácido mersalilo.

En la figura 30 se muestran más resultados de experimentos realizados con el reactivo MTSBn, que al igual que el HgCl₂, el pCMB, y el pCMBS, es capaz de inhibir el transporte (figura 28). Pensamos que, como el MTSBn tiene una estructura muy similar al pCMB y al pCMBS (figura 29), la inhibición podría ser debida también a la C327 de xCT. Sin embargo, realizando el ensayo con el mutante C327S, observamos que el MTSBn también es capaz de inhibir el transporte en ausencia de esta cisteína. Repetimos varias veces el ensayo, utilizando además los mutantes 4F2hc cysless y xCT cysless. Sorprendentemente, el reactivo es capaz de inhibir el transportador incluso cuando está completamente desprovisto de cisteínas, sugiriendo que el MTSBn reacciona con otro(s) residuo(s) del transportador distinto(s) a cisteína. Aún así, se observa una contribución de la cisteína 327 en el efecto del MTSBn, ya que la inhibición siempre es más fuerte cuando el transportador contiene esta cisteína. Como término medio, observamos un 20% menos de inhibición en el mutante C327S. Resultados similares al MTSBn se obtuvieron con el reactivo HgCl₂ (no se muestra).

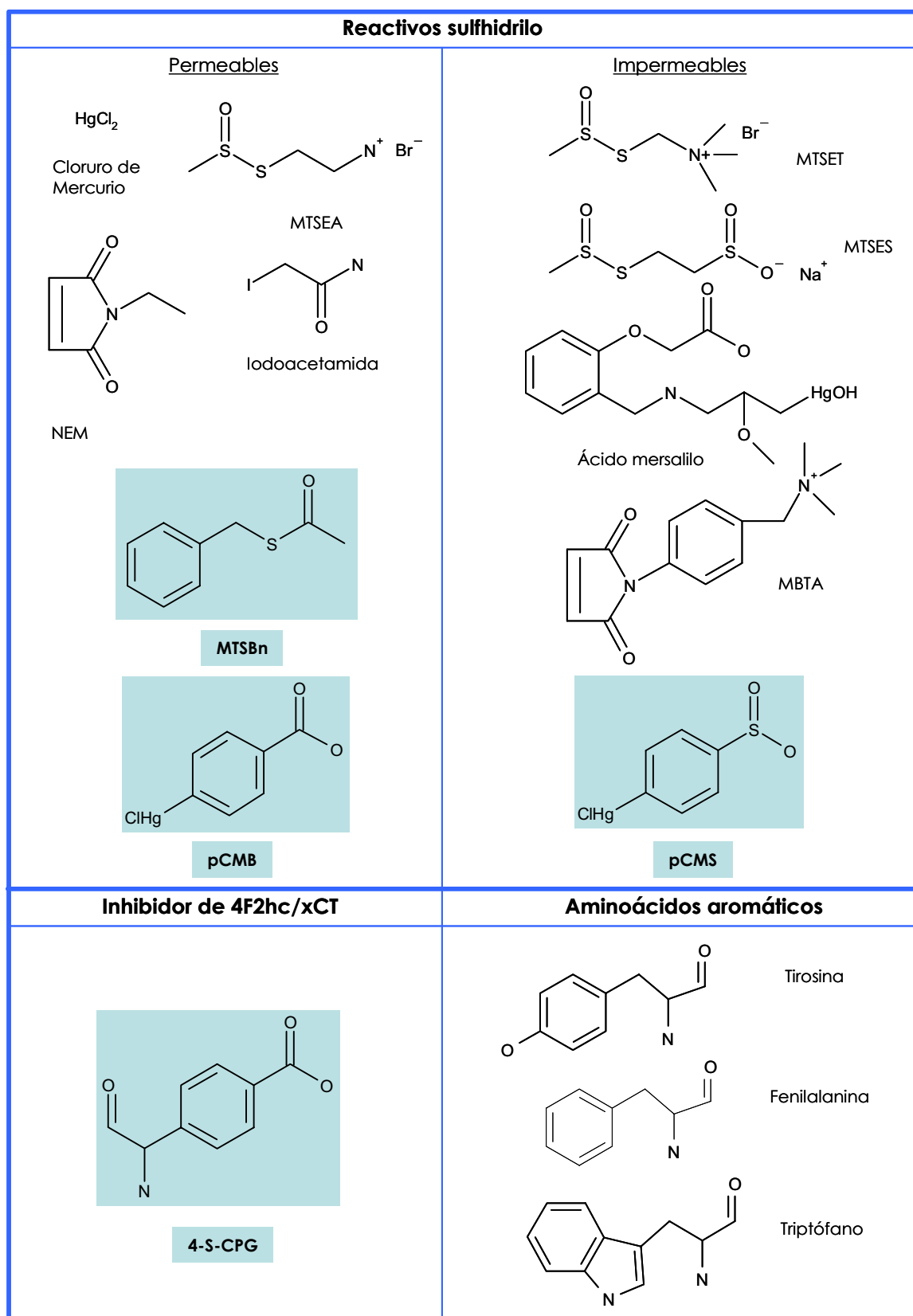


Figura 29 Estructuras de los distintos reactivos utilizados. Reactivos sulfhidrilo permeables e impermeables: MTS (metanotiosulfonatos): MTSET (2-(trimetilamonio)etil metanotiosulfonato), MTSES (2-sulfonatoetil metanotiosulfonato), MTSEA (2-aminoetil metanotiosulfonato), MBTA ((4-(N-maleimido) benzil) trimetilamonio), MTSBn (benzyl metanotiosulfonato); NEM (N-etilmaleimida); cloruro de mercurio, iodoacetamida; y ácido mersalilo. 4-S-CPG, inhibidor del sistema x_c^- ((S)-4-carboxifenil glicina). Las moléculas sombreadas en azul indican interacción con el transportador. Creadas con el programa ISISDraw.

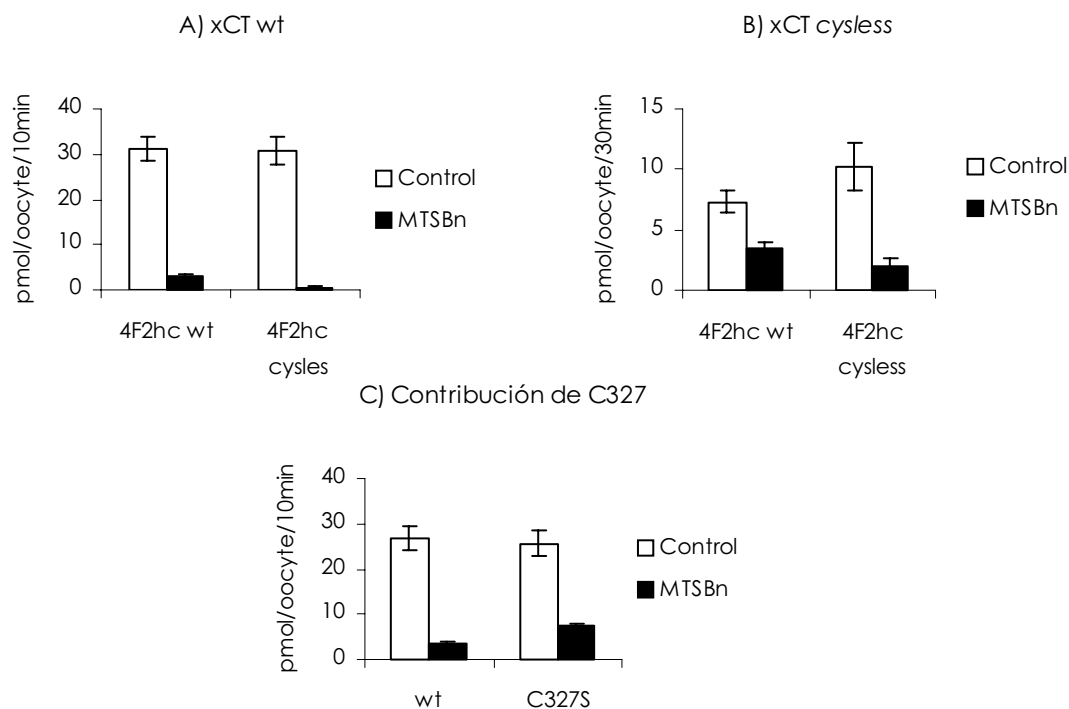


Figura 30 El relativo MTSBn inhibe el transporte inducido por 4F2hc/xCT. Oocitos inyectados con 10 ng cRNA de xCT wt o xCTcysless (en combinación con 4F2hc wt o cysless) Figuras A y B), y con xCT wt o C327S (junto con 4F2hc wt) (figura C), se trataron, tres días después de la inyección, con 1 mM MTSBn durante 5 minutos. Tras tres lavados se ensayó el transporte de 100 μ M L-[3 H]glutamato en el tiempo indicado. Los valores (media \pm S.E.M) son de un experimento, con 7-8 oocitos por condición (n=3 experimentos independientes).

Dada la similitud estructural aparente entre el pCMB y el pCMBS con los aminoácidos aromáticos L-Phe, L-Trp y L-Tyr (figura 29), decidimos analizar también el efecto de estos aminoácidos en el transporte: a pesar del parecido estructural, no se observa inhibición del transporte en presencia de estos aminoácidos (figura 31). Dada la diversidad de los reactivos usados (en tamaño, estructura, mecanismo de reacción, permeabilidad a la membrana y carga neta), se deduce que tanto el pCMB como el pCMBS tienen acceso a la cisteína 327 a través de una vía restringida estructuralmente

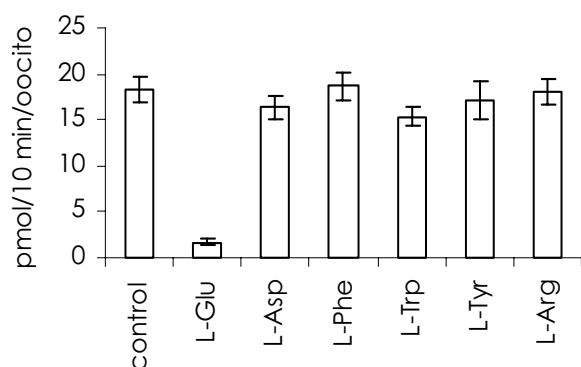


Figura 31 Los aminoácidos aromáticos no inhiben el transporte inducido por 4F2hc/xCT. Dos días tras la inyección de 10 ng de cRNA de 4F2hc/xCT en oocitos, se determinó la inducción de transporte de 25 μ M L-[3 H]glutamato en 15 minutos, en presencia o no de 2mM de los aminoácidos indicados. Cada punto representa la media \pm S.E.M de 7-8 oocitos, expresada en pmol/10min por oocito.

2.2.4. Los sustratos de xCT protegen de la inactivación de transporte

Todos los resultados obtenidos hasta el momento indican que la C327 es accesible al menos desde el medio extracelular durante el ciclo de transporte. Esto plantea la posibilidad que este residuo forme parte de la vía de unión o translocación de sustrato. Si esto fuese así, los sustratos deberían dificultar o impedir la reacción del pCMB y pCMBS. Este efecto se puede evaluar mediante la estimación del parámetro $t_{1/2}$, que indica el tiempo al que se produce el 50% de la inhibición total, tanto en presencia como en ausencia de sustrato. Los resultados de la estimación del $t_{1/2}$ indican que tanto el L-glutamato como la L-cistina, protegen la actividad de transporte de 4F2hc/xCT de la inactivación por pCMB y pCMBS. La L-arginina, que no es sustrato de xCT, no afecta este parámetro. Los valores $t_{1/2}$ obtenidos para el pCMB son: 83.5 ± 7 s (en ausencia de aminoácido), 1475 ± 690 s (en presencia de L-glutamato), y 72.5 ± 21.7 s (en presencia de L-arginina). Y para el pCMBS son: 230.7 ± 51.4 s (en ausencia de aminoácido), 3081 ± 959 s (en presencia de L-glutamato), y 319.4 ± 39 s (en presencia de L-arginina). Se han obtenido resultados similares con 4F2hc/xCT *cysless*+C327 (figuras 3A y 3C artículo 5).

Seguidamente se determinó las concentraciones de sustrato a las que se obtiene el 50% de protección (IC_{50}), parámetro que puede dar luz acerca del mecanismo de protección. Los resultados indican que las IC_{50} para el L-glutamato y la L-cistina son similares a sus K_m s de transporte: en presencia de pCMB la IC_{50} es de 138 ± 16 μ M para el L-glutamato ($K_m = 174 \pm 15$ μ M en este estudio (tabla 1 artículo 5) y 92 ± 14 μ M en (Bassi et al., 2001)), y de 99 ± 9 μ M para la L-cistina ($K_m = 43 \pm 2$ μ M, (Bassi et al., 2001)1). Esta coincidencia entre la IC_{50} y K_m sugiere que la protección de la C327 por sustrato ocurre durante el ciclo de transporte.

Dos mecanismos distintos pueden explicar la protección observada: (i) que los sustratos compitan directamente con el pCMB y el pCMBS para unirse al lugar de unión/vía de translocación de sustrato, o (ii) que un cambio conformacional inducido por la unión del sustrato impida el acceso de los reactivos mercuriales a la C327, aunque esté situada fuera del sitio de unión/vía de translocación de sustrato. Para distinguir entre las dos posibilidades, se han llevado a cabo los experimentos de protección a 4°C. Se acepta generalmente que los cambios conformacionales en las proteínas de membrana son mucho más sensibles a variaciones en la temperatura que la unión de sustrato (Chen and Rudnick, 2000; Seal and Amara, 1998). Así, a 4°C se estarían impidiendo grandes cambios conformacionales, pero no la unión de sustrato, pudiéndose aprovechar esta propiedad para distinguir entre un mecanismo u otro de protección. Esta estrategia ha sido utilizada para otros transportadores como el de serotonina (Androutsellis-Theotokis et al., 2001) y el de glicina (Lopez-Corcua et al., 2001). Los resultados con 4F2hc/xCT muestran que el pCMB inhibe el transporte completamente a ambas temperaturas (más lentamente a 4°C) ($t_{1/2} = 63.9 \pm 9$ s a 25°C y 436 ± 110 s a 4°C), y que el L-glutamato protege de la inactivación tanto a 25°C como a 4°C ($t_{1/2} = 1272 \pm 455$ s a 25°C y 6932 ± 4852 s a 4°C (figura 4A artículo 5). Entonces, el L-glutamato protege la C327 en algún momento de la unión/translocación de sustrato, y no debido a grandes cambios conformacionales sensibles a la temperatura.

Otra forma de distinguir entre los dos mecanismos de protección, es utilizar un inhibidor competitivo. Estos inhibidores se unen al sitio de unión de sustrato, pero no inducen el ciclo completo de transporte. Así, si el inhibidor tiene la capacidad de proteger la inactivación a una IC_{50} similar a su K_i , la protección observada tendrá lugar en el sitio de unión del sustrato (Seal and Amara, 1998). Durante el transcurso del estudio de la C327 y de la H110 de xCT, se publicó que el reactivo 4-S-CPG es un inhibidor competitivo del sistema x_c^- , que no se transporta, y que presenta una k_i en el rango μM en líneas celulares de astrocitoma, que expresan de manera endógena el sistema x_c^- (Patel et al., 2004). Observamos que 4-S-CPG tiene una gran similitud estructural con el pCMB y pCMBs (figura 29), por lo que nos pareció interesante realizar estudios de protección con este inhibidor.

En primer lugar, determinamos la actividad de transporte de 4F2hc/xCT a distintas concentraciones de L-glutamato en presencia o en ausencia de distintas concentraciones de 4-S-CPG (análisis dixon plot) en oocitos. Los resultados indican que la inhibición es de tipo competitivo, con una k_i de $24.9 \pm 5.5 \mu\text{M}$ (figura 32). Para comprobar que este inhibidor no es transportado realizamos experimentos de eflujo (si se produce salida de sustrato en presencia de 4-S-CPG, es que éste se transporta hacia el interior). Como se espera de un inhibidor que no se transporta, 4-S-CPG no transestimuló la salida de L-glutamato (figura 32). Estos resultados nos confirmaron que en nuestro sistema de expresión de 4F2hc/xCT, 4-S-CPG es un inhibidor competitivo que no se transporta, con una k_i en el rango μM .

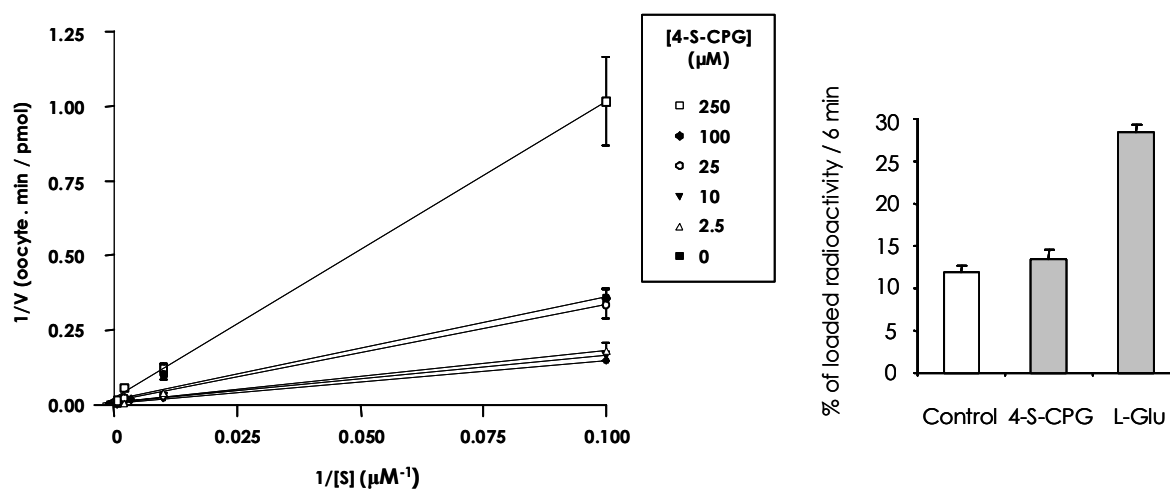


Figura 32 4-S-CPG es un inhibidor competitivo no transportable de 4F2hc/xCT. A) Análisis Dixon plot de la inhibición por 4-S-CPG en el transporte de L-glutamato inducido por 4F2hc/xCT en oocitos de *Xenopus*. Se determinó el transporte de L- ^3H -glutamato a diferentes concentraciones (10, 100, 500 μM y 2mM) en ausencia y en presencia de las concentraciones indicadas de 4-S-CPG. Todas las líneas cruzan en valores negativos para $1/[S]$ y positivos para $1/V$, indicando que se trata de una inhibición competitiva. La estimación de $K_i = 24.9 \pm 5.5 \mu\text{M}$ (media \pm S.E.) se ha hecho con el programa Graph Pad ($R^2 = 0.8385$). Los datos corresponden a un experimento representativo con 7-8 oocitos por condición. Un segundo experimento independiente dio resultados similares ($K_i = 9.7 \pm 2.9 \mu\text{M}$). B) Eflujo de L-glutamato en oocitos de *Xenopus* que expresan 4F2hc/xCT. Después de 60 min de incubación con L- ^3H glutamato se determinó la salida de radioactividad en ausencia de aminoácido (control) y en presencia de 4-S-CPG o L-glutamato 2mM, en grupos de 7 oocitos. Los resultados están expresados en porcentaje respecto al total de radioactividad cargada en el oocito. El eflujo (media \pm SEM) de la condición 4-S-CPG resultó estadísticamente diferente $p < 0.001$, t Student) del eflujo trans-estimulado por L-glutámico pero no del grupo control (sin transestimular). La figura corresponde al Material Suplementario del artículo 6 (figuras C y D). Un segundo experimento independiente dio resultados similares.

Iniciamos entonces una serie de experimentos de protección mediante 4-S-CPG que resultaron fallidos: a pesar de ser un reactivo que no se une covalentemente al transportador, no conseguimos disociar la 4-S-CPG del transportador después de lavar los oocitos 30 minutos en presencia o en ausencia de sustrato (figura 33), hecho que también sucede en células Hela (comunicación de Emma Gasol).

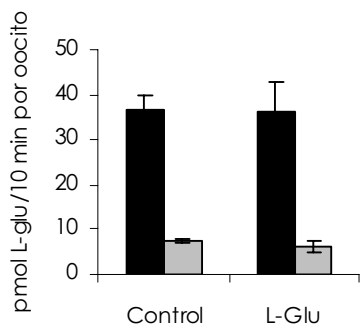


Figura 33 4-S-CPG no se disocia de 4F2hc/xCT tras 30 minutos de lavado. Grupos de 7-8 oocitos inyectados con 10 ng 4F2hc/xCT se preincubaron durante 10 minutos con (gris) o sin (negro) 2 mM 4-S-CPG 2 días después de la inyección. Seguidamente, se lavaron durante 30 minutos en presencia o en ausencia de 2 mM L-Glu, y se determinó el transporte de 100 μM L^[3H]-glutamato en 10 minutos. El resultado (media \pm S.E.M) se expresa en velocidad de captación de L-Glu 100 μM (pmol L-Glu/oocito/10 min). Se muestra un experimento representativo de n=2.

2.2.5. Análisis de los mutantes C327S, C327A, C327T y C327L

El residuo C327 o bien está conservado, o bien es una treonina en el resto de subunidades ligeras de mamífero conocidas (figura 5A artículo 5), por lo que no se espera que sea un determinante de la especificidad de sustrato. Aún así, como los resultados obtenidos hasta el momento parecen indicar que la C327 juega un papel en la unión o translocación de sustrato, realizamos una serie de mutantes en la posición 327 para tratar de detectar posibles cambios cinéticos, de expresión de la proteína, e incluso de especificidad de sustrato, que proporcionen más información acerca de la implicación de este residuo en la unión del sustrato.

Además del mutante C327S, se construyeron los mutantes C327A, C327T y C327L, y se analizó su función de transporte y expresión (figuras 5B y 6, y tabla I del artículo 5). Todos los mutantes son activos al analizar la actividad de transporte de L-glutamato 100 μM , excepto el mutante C327L, que es inactivo (se obtiene una actividad en pmol/oocito/10 min para el C327L y para el salvaje de, respectivamente: 0.47 ± 0.11 y 16.31 ± 1.77 (25 μM L-glu); 0.24 ± 0.14 y 51.56 ± 4.24 (100 μM L-glu); -2.34 ± 1.07 y 133.5 ± 11 (2 mM L-glu)). Los análisis cinéticos revelan un leve incremento en la k_m del L-glutamato en C327S y C327A (2 y 1.5 veces, respectivamente) (figura 33, y tabla I del artículo 4), que es estadísticamente significativo (F-test, $p < 0.005$). Paralelamente, el mutante xCT *cysless* muestra 1.9 veces de incremento en la k_m del L-glutamato ($329 \pm 66 \mu\text{M}$), muy parecido a lo que se observa con el mutante C327S. Al analizar el mutante xCT_{cysless}+C327 se observa que la k_m ($121 \pm 23 \mu\text{M}$) disminuye 2.6 veces, y es similar a la de xCT salvaje ($K_m = 174 \pm 15 \mu\text{M}$ (figura 34) y $92 \pm 14 \mu\text{M}$ en (Bassi et al., 2001)). Así, la mutación C327S produce incrementos similares de k_m del L-glutamato tanto en contexto salvaje como en contexto *cysless*.

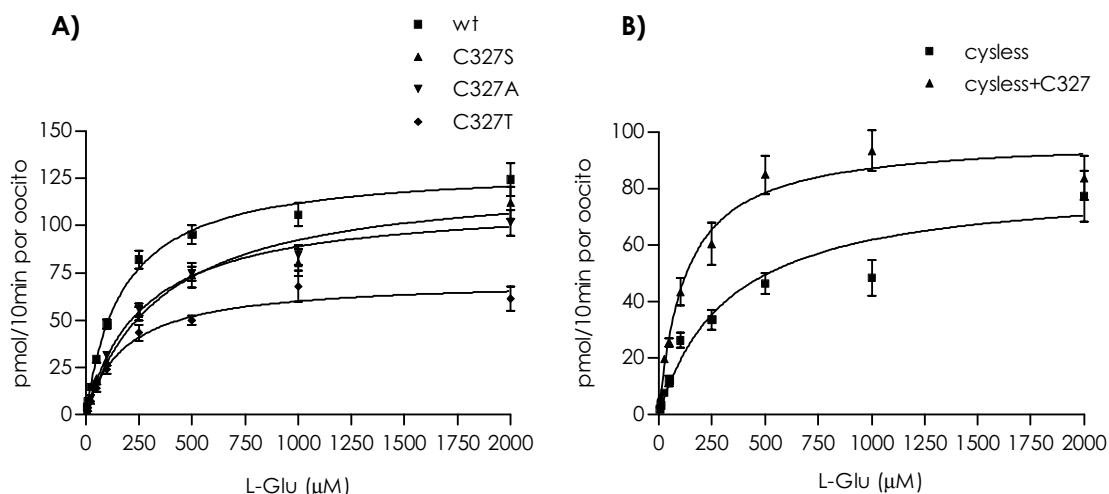


Figura 34 Análisis cinético del transporte de glutámico inducido por: A) 4F2hc/xCT wt, C327S, C327A y C327T; y B) 4F2hc/xCT cysless y xCT cysless+C327. Se inyectaron los oocitos con 10 ng de cRNA de 4F2hc y xCT wt o mutante. Dos o tres días después de la inyección se midió el transporte de L- ^{3}H glutamato a diferentes concentraciones de sustrato (5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 y 2000 μM) durante 10 minutos. El transporte inducido (pmol/10 min por oocito) se ha calculado restando el transporte presente en oocitos no inyectados. Los datos (media \pm SEM) provienen de 4 experimentos (7-8 oocitos por grupo). En el cálculo de los parámetros cinéticos se ha usado el GraphPad Prism program

Decidimos realizar entonces los experimentos de especificidad de sustrato directamente en el mutante C327S, que es el que presenta un mayor cambio en K_m . Como se observa en la figura 35, no se detecta transporte de L-arginina ni de L-leucina, comprobándose que este residuo no está implicado en la especificidad de sustrato.

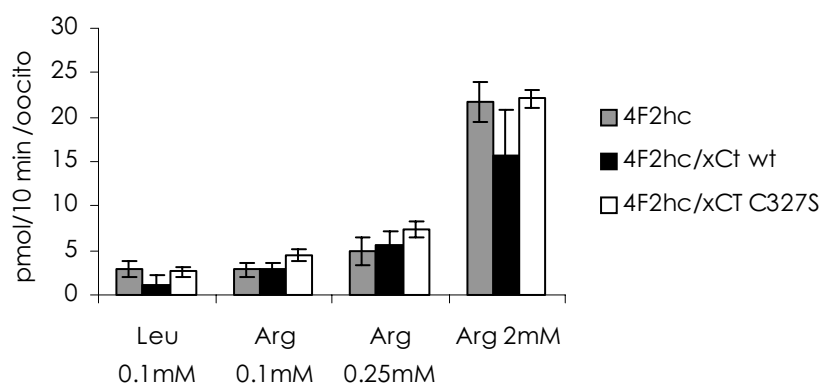


Figura 35 Especificidad de sustrato del transporte de xCT. Se inyectaron oocitos con 10 ng cRNA de 4F4hc/xCt wt o C327S. Después de tres días se analizó el transporte de L-arginina y L-leucina durante 10 minutos a las concentraciones que se indican.

Para el análisis de la expresión del transportador en la superficie celular, se construyeron las proteínas salvaje y mutante con el epítipo *myc* en el extremo N-terminal. Su actividad y sensibilidad a pCMBS son indistinguibles respecto a los mutantes sin el epítipo *myc* (figura 6A artículo 5). Los experimentos de inmunofluorescencia demuestran que todos los mutantes se expresan de manera similar en la membrana (en presencia de 4F2hc) (figura 6B artículo 5). Por lo tanto, los cambios cinéticos entre los mutantes no son debidos a problemas de

expresión. El fenotipo inactivo del mutante C327L no es debido a defectos de tráfico o plegamiento, sino a defectos en la actividad de transporte.

Finalmente, y para determinar si la C327 juega un papel en la dependencia de pH de este transportador en el transporte de L-cistina (Bassi et al., 2001), se analizó la dependencia de pH del mutante xCTcysless+C327 respecto a xCTcysless. Como se observa en la figura 36, la dependencia de pH no se ve modificada en el contexto cysless ($K_{0.5} = 7 \pm 0.20$ y 6.7 ± 0.25 para xCTcysless y xCTcysless+C327 respectivamente), aunque se observa una tendencia hacia valores más básicos de pH si se comparan con el valor $K_{0.5}$ de xCT salvaje ($K_{0.5} = 6.3 \pm 0.25$, figura 36), sugiriendo que otras cisteínas distintas de la 327 pueden tener un papel en la dependencia de pH del transportador en el transporte de cistina.

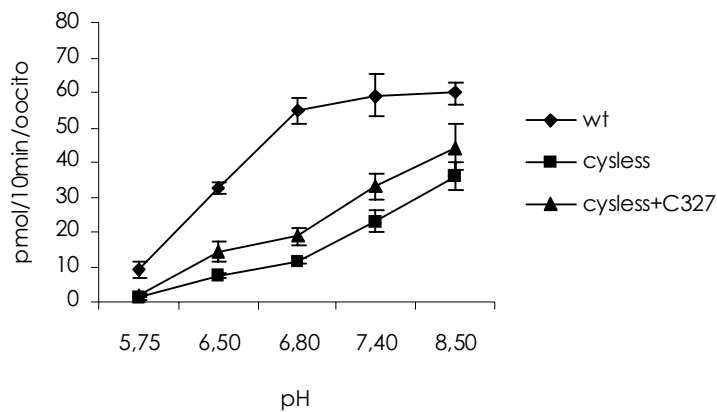


Figura 36 Sensibilidad al pH del transporte de cistina. Se inyectaron oocitos con 10 ng de cRNA xCT wt, cysless o cysless + C327 (siempre junto con el cRNA de 4F2hc). Después de tres días se determinó el transporte de 50 μ M L-[³⁵S]cistina en 10 minutos, a diferentes pHs (5.75, 6.5, 6.8, 7.4 y 8.5)

On the oligomerization of the heteromeric amino acid transporters

Esperanza Fernández^{1*}, Maite Jiménez-Vidal^{1*}, María Calvo², Antonio Zorzano¹, Francesc Tebar², Manuel Palacín^{1†} and Josep Chillarón^{1†}

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, and Barcelona Science Park, University of Barcelona, Barcelona, Spain; and ² Departament de Biologia Cel·lular, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, 08036 Barcelona, Spain.

* E.F and M.J-V. contributed equally to this study and share first authorship

† M. P. and J. C. share last authorship, to whom correspondence should be addressed:

Josep Chillarón
chillaro@worldonline.es
 Tel. 34 934034700
 Fax 34 934034717
 Manuel Palacín
mpalacin@bio.ub.es
 Tel. 34 934034617
 Fax 34 934021559

Dpt. of Biochemistry and Molecular Biology
 New Building, Faculty of Biology,
 University of Barcelona
 Av. Diagonal, 645, E-08028, Barcelona, SPAIN
 and
 IRBB-Barcelona Science Park
 Josep Samitier 1-5, E-08028 Barcelona, SPAIN

SUMMARY

Heteromeric amino acid transporters (HAT) are composed of a catalytic light subunit (LSHAT; α) and a heavy subunit (HSHAT; β) linked by a disulfide bridge (α - β). We have analyzed the oligomerization of the heterodimers $b^{0,+}AT$ -rBAT and xCT-4F2hc. Gel exclusion, Blue Native Gel Electrophoresis, cross-linking, and FRET *in vivo* indicate that $b^{0,+}AT$ -rBAT is a heterotetramer (α - β)₂, and xCT-4F2hc behaves as an (α - β)₁ heterodimer. Co-injection of α subunits sensitive (α_s) and insensitive (α_i) to the inactivation by a sulfhydryl reagent, and expression of α_s - α_i (and α_i - α_s) concatamers indicate that the (α - β)₁ heterodimer is the functional unit of both transporters. Together with earlier studies the results suggest that two

asymmetric translocation pathways (export and import) co-exist on a single α subunit.

INTRODUCTION

Heteromeric amino acid transporters (HATs) are composed by disulfide-linked heavy (HSHAT) and light (LSHAT) subunits (Verrey *et al.*, 2003;Palacín and Kanai, 2004). The heavy subunit is a type II membrane glycoprotein with a large extracellular domain and is involved in trafficking of the heterodimer to the plasma membrane. The light subunit is a polytopic membrane protein that confers transport function and specificity (Verrey *et al.*, 2003;Palacín *et al.*, 2004). Two heavy subunits are known, rBAT and 4F2hc. rBAT forms system $b^{0,+}$ with the light subunit $b^{0,+}AT$ (Fernandez *et al.*, 2002). 4F2hc heterodimerizes with LAT1 and LAT2 to form two different system L isoforms and with γ^+LAT1 and γ^+LAT2 to form two γ^+L isoforms. 4F2hc with asc1 and xCT constitute system asc and system x_c^- respectively (Torrents *et al.*, 1998;Pineda *et al.*, 1999;Sato *et al.*, 1999;Pfeiffer *et al.*, 1999a;Fukasawa *et al.*, 2000;Uchino *et al.*, 2002).

System $b^{0,+}$ localizes to the apical membrane of the epithelial cells of the proximal tubule and the small intestine (Furriols *et al.*, 1993;Pfeiffer *et al.*, 1999b) and mediates all cystine

reabsorption and part of the dibasic amino acid reabsorption in the kidney (Fernandez *et al.*, 2002). Mutations in rBAT or b⁰⁺AT cause the inherited disease cystinuria. rBAT mutations cause mainly type I cystinuria and most mutations in b⁰⁺AT cause non-type I cystinuria (Calonge *et al.*, 1994;Pras *et al.*, 1994;Feliubadalo *et al.*, 1999). These two phenotypes can be discriminated by analyzing the amino acid concentrations in the obligate heterozygotes: type I carriers are undistinguishable from the control population, whereas non-type I carriers hyperexcrete cystine and dibasic amino acids. In some cases their hyperexcretion produces cystine stones (Font, 2001 46 /id}. In this sense, non-type I cystinuria can be classified as a dominant disease with incomplete penetrance. The molecular basis for its dominant phenotype is not known. Apical system b⁰⁺ acts in concert with the basolateral heterodimers γ⁺LAT1-4F2hc and LAT2-4F2hc in epithelial cells (Bauch *et al.*, 2003), which mediate the net efflux of dibasic amino acids and cysteine across the basolateral membrane to the blood, respectively (Torrents *et al.*, 1999;Borsani *et al.*, 1999;Fernandez *et al.*, 2003). System x_c⁻ mediates a 1:1 obligatory antiport of anionic cystine and glutamate (Bannai, 1986;Bassi *et al.*, 2001). xCT is expressed in most cell lines, in activated macrophages and in the brain (Sato *et al.*, 1999;Sato *et al.*, 2002). System x_c⁻ functions physiologically for cystine uptake and glutamate efflux. Cytosolic cystine is rapidly reduced to cysteine, the rate-limiting substrate for the synthesis of intracellular glutathione (Bannai, 1986;Sato *et al.*, 1999). A role of xCT in cellular antioxidant defense has been proposed (Sasaki *et al.*, 2002). Moreover, system x_c⁻ in macrophages and microglia is envisaged as a mechanism for glutamate efflux potentially leading to excitotoxic neural injury in

pathological states (Ye *et al.*, 1999;Barger and Basile, 2001).

Structure-function studies of the HAT family are scarce: the topology of the xCT subunit has been experimentally determined and shown to fit with a 12-transmembrane domain model, with a re-entrant loop between the 2nd and 3rd transmembrane (TM) domains (Gasol *et al.*, 2004). His110 located in this loop, as well as Cys327 in the 8th transmembrane domain could be involved in the substrate-translocation pathway (Gasol *et al.*, 2004;Jimenez-Vidal *et al.*, 2004). Most of the LSHATs are 1:1 obligate antiporters, but the detailed transport mechanism has been addressed only in the case of b⁰⁺AT-rBAT: the b⁰⁺AT light subunit is sufficient for carrier function (Reig *et al.*, 2002) and transport requires the formation of a ternary complex substrate-in:carrier:substrate-out (Torras-Llort *et al.*, 2001). In addition, two different studies support a two-alternative access model for the transport mechanism of b⁰⁺AT-rBAT (Coady *et al.*, 1996;Pineda *et al.*, 2004).

The quaternary structure of plasma membrane proteins, and in particular of channels and transporters, is becoming a subject of intense work (Veenhoff *et al.*, 2002). Several transporters have been shown to oligomerize *in vivo* (Schmid *et al.*, 2001;Sorkina *et al.*, 2003), and different functions have been ascribed to oligomerization: it can be essential for activity or regulate it in different ways. In many cases the relationship between oligomeric structure and function is not well established (Veenhoff *et al.*, 2002). To date, there are no studies on the oligomerization of the HAT family. Here we have addressed this question with b⁰⁺AT-rBAT and xCT-4F2hc. The results indicate that the functional units are the heterodimers (α-β)₁, whereas structurally, b⁰⁺AT-rBAT is a heterotetramer (α-β)₂ and xCT-4F2hc behaves as a heterodimer (α-β)₁.

RESULTS

***In vitro* analysis of the quaternary structure of heteromeric amino acid transporters**

We and other groups have shown by Western Blot under denaturing and non-reducing conditions that rBAT and b^{0,+}AT, either from native membranes or expressed in heterologous cell systems, run as two bands of 130 and 250 kDa (Fernandez *et al.*, 2002). The 250 kDa band represents from 30 to more than 80 % of the total, depending on the preparation. This band is maintained even when samples are obtained in the presence of 5-20 mM NEM, conditions that prevent artifactual disulfide bond formation (Fernandez *et al.*, 2002). The 130 kDa band is the disulfide-linked b^{0,+}AT-rBAT¹ heterodimer; the 250 kDa has been suggested to be a dimer of heterodimers (see Figure 2A).

The size of the b^{0,+}AT-rBAT and LAT2-4F2hc transporters was measured by exclusion gel chromatography. *In vivo*, both heterodimers are cell surface proteins (Furriols *et al.*, 1993; Rossier *et al.*, 1999; Pfeiffer *et al.*, 1999b). 1 % digitonin-solubilized kidney brush border and total membranes (for b^{0,+}AT-rBAT and LAT2-4F2hc, respectively) were applied to the chromatography column and the eluate fractions were analyzed by Western Blot with specific antibodies. The heterodimers run as single peaks of ~295 and ~502 kDa, for LAT2-4F2hc and b^{0,+}AT-rBAT, respectively (Figure 1). Similar results to LAT2-4F2hc were obtained with the xCT-4F2hc heterodimer (data not shown).

¹ In this manuscript, the notation $\alpha\text{-}\beta$ (i.e. b^{0,+}AT-rBAT) indicates that the light subunit α and the heavy subunit β are disulfide-linked and expressed from different genes/vectors; $\alpha\approx\beta$ (i.e. b^{0,+}AT-rBAT) indicate that both subunits are expressed as a concatamer.

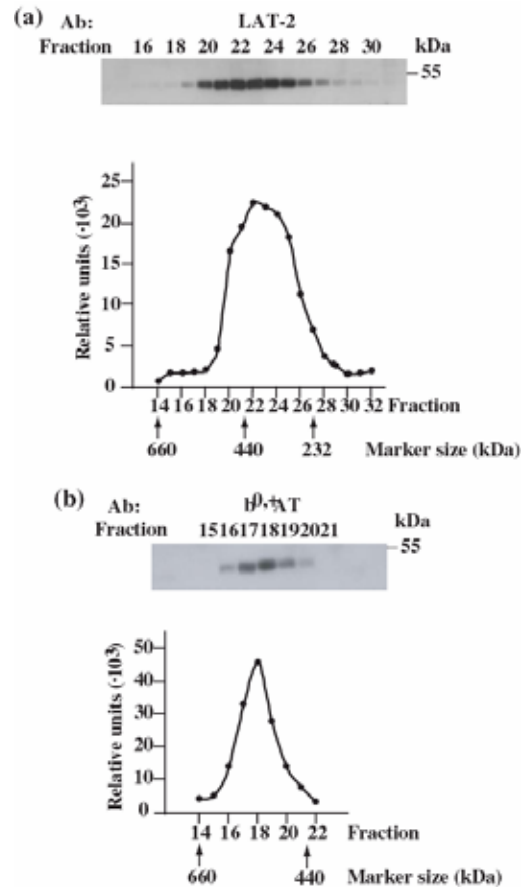


Figure 1 Exclusion gel chromatography of LAT2-4F2hc and b^{0,+}AT-rBAT. 750 μ g of mouse kidney total membranes (A) or brush border membranes (B) were solubilized in 1 % digitonin, and injected onto a Superose 6HR 10/30 column. The eluate was collected in 250 μ l fractions. 25 μ l of each fraction were loaded for SDS/PAGE under reducing conditions followed by Western blotting with specific antibodies against LAT2 (α LAT2) or b^{0,+}AT (α b^{0,+}AT). The Western blot of the relevant fractions and its quantification are shown. The molecular size markers are indicated.

Since b^{0,+}AT-rBAT and LAT2-4F2hc heterodimers run similarly in denaturing gels under non-reducing conditions (130 versus 125 kDa, respectively; Fernández *et al.*, 2002), the exclusion gel chromatography is consistent with the association of b^{0,+}AT-rBAT into oligomers of a higher order than LAT2-4F2hc.

To gain independent insight onto the architecture of the $b^{0,+}AT$ -rBAT and xCT-4F2hc, we studied their quaternary structure by using BN-PAGE (Blue Native Gel Electrophoresis) (Schagger and von Jagow, 1991; Schagger et al., 1994) followed by Western Blot. rBAT and $b^{0,+}AT$ appeared as a single band of 535 ± 18 kDa (Figure 2A), very similar to the size in exclusion gel chromatography. This band was detected in different sources of the heterodimer with antibodies against both subunits (Figure 2A). It does not correspond to isolated rBAT or $b^{0,+}AT$ subunits because: i) it is detected in brush border membranes, where only the disulfide-linked heterodimer is detected; and ii) a fully functional His-tagged $b^{0,+}AT$ -rBAT concatamer ((Pfeiffer et al., 1999b)) run with the same mobility. As expected, no $b^{0,+}AT$ band was detected in brush border membranes from the null $b^{0,+}AT$ KO mice (Feliubadalo et al., 2003), whereas an rBAT band appeared (Figure 2A), indicating that another rBAT-bound light subunit is present in mouse brush border membranes (called X, for unknown, (Fernandez et al., 2002; Feliubadalo et al., 2003)). X-rBAT may share then a common architecture with $b^{0,+}AT$ -rBAT.

The size of $b^{0,+}AT$ -rBAT in Blue Native (BN) gels is compatible with oligomerization of the heterodimer. BN-PAGE allows further analysis of the stoichiometry of the oligomerization. The strategy is based on the use of agents causing a partial dissociation of the complex (Nicke et al., 1998; Horiuchi et al., 2001; Gendreau et al., 2004). Increasing concentrations of urea did not change the mobility of the digitonin-solubilized $b^{0,+}AT$ -rBAT complex, suggesting that there was no high order oligomers or that oligomers were tightly bound and stable (Supplementary Figure B2) (Meisinger et al., 2001).

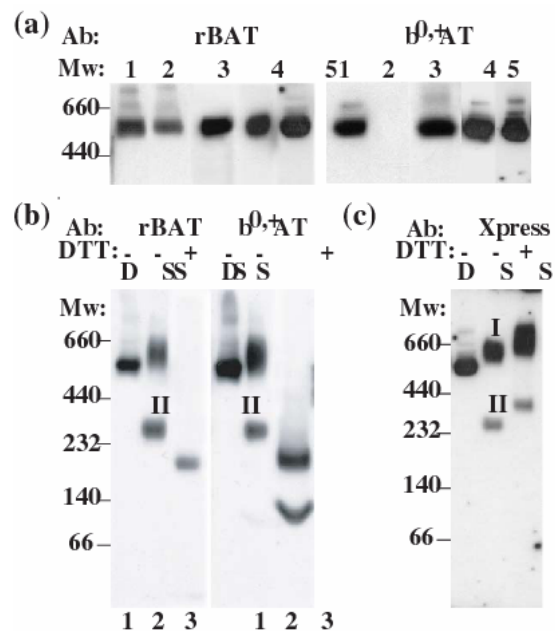


Figure 2 Blue Native Gel PAGE analysis of $b^{0,+}AT$ -rBAT. A. 1 % digitonin extracts from different sources were supplemented with Blue Native sample buffer and loaded on 5-15% Blue gels for Western Blot with antibodies against $b^{0,+}AT$ ($\alpha b^{0,+}AT$) or rBAT ($\alpha rBAT$): 1, mouse kidney brush border membranes; 2, the same membranes from a null $b^{0,+}AT$ KO mouse; 3, total membranes from HeLa cells co-transfected with rBAT and $b^{0,+}AT$, 4, total membranes from HeLa cells transfected with the concatamer His- $b^{0,+}AT$ -rBAT, and 5, the sample on lane 4 was purified on a nickel-chromatography column and eluted in imidazol buffer containing 0.1% digitonin. Preimmune antisera did not detect any band in the Blue gels (not shown). B. HeLa cells were co-transfected with rBAT and $b^{0,+}AT$ and total membranes were isolated. The membranes were either solubilized with 1% digitonin (D) or after solubilization with 1% digitonin, 2% SDS was added for 30 min. at 37 °C (S) in the absence (-) or in the presence (+) of DTT. The treated membranes were then supplemented with Blue Native sample buffer and loaded on 5-15% Blue gels for Western Blot with antibodies against $b^{0,+}AT$ ($\alpha b^{0,+}AT$) or rBAT ($\alpha rBAT$). C. The concatamer His- $b^{0,+}AT$ -rBAT was transfected in HeLa cells. Total membranes were isolated, solubilized with 1% digitonin and applied to a nickel chromatography column. The purified concatamer was eluted with imidazol buffer containing 0.1% digitonin and either left untreated (D) or treated with 2% SDS for 30 min. at 37 °C (S) in the absence (-) or presence (+) of DTT. Blue Native sample buffer was added for loading on 5-15% Blue gels, and the Western Blot was decorated with antibodies against the Xpress tag ($\alpha Xpress$) contiguous to the Histidine tag of the concatamer. Longer periods in SDS or higher incubation temperatures did not modify the results. No other bands were seen in any of the gels even with longer exposure times. A representative experiment from n=5 experiments is shown. Ab: antibody. (I) Band I; (II) Band II, see Results.

In contrast, addition of 2 % SDS partially dissociated the complex in two different forms (I and II) (Figures 2B and C). Similar results were obtained with brush border membranes (data not shown). The relative amounts of the two bands slightly varied among experiments, although $b^{0,+}AT-rBAT$ was never completely shifted to band II, again suggesting a very stable complex. In parallel experiments, the amount of the $b^{0,+}AT-rBAT$ band II was smaller than with $b^{0,+}AT-rBAT$ (Figures 2B and C). Band I is larger than the untreated sample: we speculate that partial unfolding of $b^{0,+}AT-rBAT$ exposes hydrophobic domains which disturb detergent and/or CBG binding. A slower mobility of band I (and band II) was observed upon DTT addition to $b^{0,+}AT-rBAT$ (see below), suggesting further unfolding by the reduction of the rBAT intramolecular disulfide bonds or the intermolecular $b^{0,+}AT-rBAT$ disulfide bond.

Dissociation of the complex in its subunits was accomplished by addition of the reducing reagent DTT (Figure 2B). rBAT appeared as a single band of 162 ± 5 kDa and $b^{0,+}AT$ run as a doublet of 160 ± 2 and 84 ± 2 kDa. Control SDS-PAGE followed by Western Blot experiments confirmed that DTT completely reduced the samples (Supplementary Figure B3). As expected, no dissociated subunits appeared with $b^{0,+}AT-rBAT$ (Figure 2C). According to a recently proposed empirical rule, the molecular weight of a polytopic transporter should be multiplied by an empirical factor of 1.8 to obtain its mobility in BN gels (Heuberger et al., 2002). The mobility of $b^{0,+}AT$ fits with this factor, confirming that the 84 ± 2 kDa band is a $b^{0,+}AT$ monomer and that the 160 ± 2 band is then a $b^{0,+}AT$ dimer (Figure 2B). It is interesting that rBAT mobility fits also with the 1.8 factor: its large extracellular domain (more than 80 % of the protein) is highly hydrophobic and earlier topology models predicted 3 C-terminal

transmembrane domains (Tate et al., 1992). In conclusion, BN-PAGE strongly suggests that $b^{0,+}AT-rBAT$ has an $(\alpha-\beta)_2$ structure: i) only two bands were observed after partial dissociation of the complex with SDS; ii) after DTT reduction, the $b^{0,+}AT$ appeared as two bands compatible with an α_1 monomer and a dimer α_2 ; and iii) the mobility of the untreated sample (~ 535 kDa) doubles band II (260 ± 6 kDa); in addition, the sum of the mobility of the monomeric rBAT (162 ± 5 kDa) and the monomeric $b^{0,+}AT$ (84 ± 2 kDa) fits with the mobility of band II (260 ± 6 kDa).

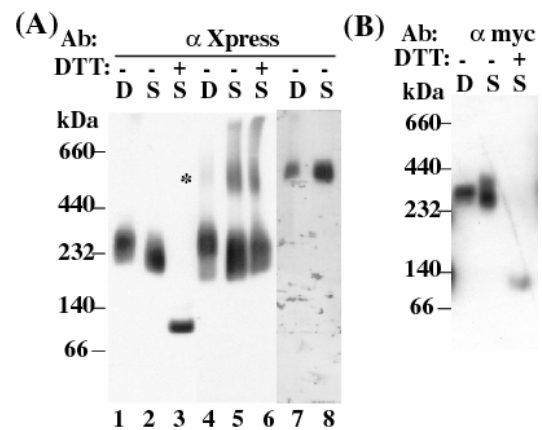


Figure 3 Blue Native PAGE analysis of xCT-4F2hc and LAT2-4F2hc. HeLa cells were transfected with 4F2hc and His-xCT (lanes 1-3), the concatamer His -xCT-4F2hc (lanes 4-6), or the concatamer myc -xCT-xCT with 4F2hc (lanes 7, 8) (each transfection correspond to a different gel). Total membranes were isolated. The membranes were either solubilized with 1% digitonin (D) or after solubilization with 1% digitonin, 2% SDS was added for 30 min. at 37°C (S) in the absence (-) or in the presence (+) of DTT. The treated membranes were then supplemented with Blue Native sample buffer and loaded on 5-15% Blue gels for Western Blot with antibodies against the Xpress tag (α Xpress) contiguous to the Histidine tag of the xCT or α myc. The asterisk (*) indicates the high molecular band in lanes B. HeLa cells were co-transfected with 4F2hc and myc -LAT2. Total membranes were isolated and treated as in A. The Western Blot was decorated with the α myc antibody 9E10.

BN-gels of xCT-4F2hc and LAT2-4F2hc showed a different picture. HeLa cells were co-transfected with His-xCT and 4F2hc (Figure 3A), or myc-LAT2 and 4F2hc (Figure 3B), and total membranes were solubilized in 1% digitonin and loaded. A single band was detected which did not dissociate even with 2% SDS. Its mobility (~250kDa) was in good agreement with the size of LAT2-4F2hc on exclusion gel chromatography and is similar to band II of b^{0,+}AT-rBAT. Further addition of DTT resulted in the detection of the His-xCT and myc-LAT2 subunits as a single band (~80kDa) compatible with a monomer. The heterodimer LAT2-4F2hc from the basolateral membrane behaved similar to the myc-LAT2-4F2hc heterodimer in HeLa cells (data not shown).

Two different xCT concatamers were also studied: i) an His-xCT≈4F2hc concatamer (which is fully functional, C. del R. and M.P., unpublished results) run with the same mobility as His-xCT-4F2hc (Figure 3A, lanes 4-6), that was not modified neither by SDS nor by DTT; ii) an myc-xCT≈xCT dimeric concatamer (see below for functional data), co-transfected with 4F2hc, run at ~540kDa, about two-fold the mobility of His-xCT-4F2hc and His-xCT≈4F2hc (Figure 3A, lanes 7-8). As expected, this band was not modified by SDS. Interestingly, a faint band of similar size was observed with His-xCT≈4F2hc concatamer after a long exposure (Figure 3A, asterisk). In summary, the results suggest that LSHAT-4F2hc heterodimers do not assemble into higher order oligomers, although an (α-β)₁ ↔ (α-β)₂ equilibrium may exist, strongly shifted to the (α-β)₁ form.

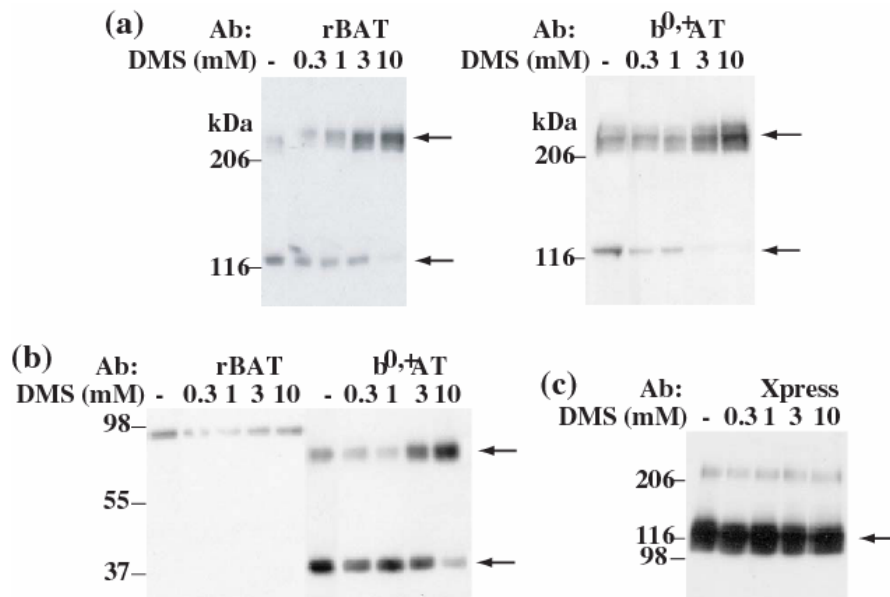


Figure 4 Crosslinking of b^{0,+}AT-rBAT and xCT-4F2hc. A. HeLa cells were co-transfected with rBAT and b^{0,+}AT. 36 hours later total membranes were isolated and resuspended in reaction buffer containing the indicated concentrations of the cross-linking agent DMS (- indicates no cross-linker added). The reaction was stopped, supplemented with SDS sample buffer without the reducing agent DTT, and loaded on SDS-PAGE for Western Blotting with antibodies against b^{0,+}AT (αb^{0,+}AT) or rBAT (αrBAT). B. The same samples in A. were supplemented with SDS sample buffer with DTT. C. HeLa cells were co-transfected with 4F2hc and His-xCT, and were treated as in A. Western Blot was performed with antibodies against the Xpress tag (αXpress) contiguous to the Histidine tag of the xCT subunit. Equal protein amounts were loaded on each lane of the same gel. We did not observe higher molecular weight cross-linking bands in any of the gels. Arrows indicate the specific bands. Ab: antibody. A representative experiment from n=4 is shown.

Exclusion gel chromatography and BN-PAGE do not escape general criticisms to detergent-based methods. Therefore, we applied the primary amine cross-linker DMS (dimethyl suberimidate) to total membranes from HeLa cells transiently transfected with expression vectors for rBAT and b⁰⁺AT, and 4F2hc and an HIS-tagged xCT, which is fully functional (Gasol *et al.*, 2004). DMS shifted the mobility of the b⁰⁺AT-rBAT heterodimer from the 130 to the 250 kDa band in a dose-dependent manner, indicating that two heterodimers are in very close contact (Figure 4A). Cross-linking efficiency was very high (10 mM DMS quantitatively shifted b⁰⁺AT-rBAT to the 250 kDa band), revealing that both the intracellular and the plasma membrane heterodimer, the sites where b⁰⁺AT-rBAT is found in HeLa transfected cells (E.F., M.P. and J.C., unpublished results), were likely in the same oligomeric state. The same samples were also run under reducing conditions to detect the individual subunits: while rBAT size was not modified by the cross-linker, a dose-dependent increase of the dimeric form of b⁰⁺AT was observed (Figure 4B). Therefore, two or more lysines on two different b⁰⁺AT subunits must be in close contact. In addition, under reducing conditions b⁰⁺AT run as a monomer and an SDS-resistant dimer even in the absence of cross-linker, consistent with the two bands observed in non-reducing conditions (compare Figures 4A and B, (Fernandez *et al.*, 2002)). DMS had no effect on the xCT-4F2hc heterodimer (Figure 4C): under non-reducing conditions, the 125 kDa band represented the majority of the total xCT-4F2hc heterodimer and a faint band at 240 kDa did not increase after cross-linker addition.

***In vivo* analysis of the quaternary structure of heteromeric amino acid transporters**

In order to study oligomerization *in vivo* we set up the sensitized FRET emission method (Sorkina *et al.*, 2003) in HeLa cells transiently transfected with N-terminally (YFP or CFP) tagged versions of the concatamers b⁰⁺AT≈rBAT (see Figure 5A) and xCT≈4F2hc (see below). CFP- and YFP-b⁰⁺AT≈rBAT completely co-localized at the plasma membrane and in intracellular sites (Figure 5B). Positive CFP→YFP FRET^C signals were detected at the plasma membrane when CFP- and YFP-b⁰⁺AT≈rBAT were co-expressed (Figure 5B), suggesting close proximity of the amino termini of the two fusion proteins (i.e., the amino termini of the b⁰⁺AT subunits) and that b⁰⁺AT-rBAT forms dimers or higher order oligomers at the cell surface. The fusion proteins displayed a 15-20 % of the L-cystine transport activity of their untagged control (data not shown). As a control we measured FRET signals in cells co-expressing YFP-b⁰⁺AT≈rBAT with an unrelated integral membrane protein, the receptor for the epidermal growth factor tagged with CFP (CFP-EGFR). The two fusion proteins co-localized in the plasma membrane (Figure 5B). However, no FRET^C signals were detected, suggesting that the two proteins did not form complexes.

Because the efficiency of energy transfer depends on the amount of donor and acceptor capable of interaction, FRET^C values were divided by the product of YFP and CFP intensities on a pixel-by-pixel basis to obtain normalized FRET^C (FRET^N) at the plasma membrane. FRET^N values in cells co-expressing CFP- and YFP-b⁰⁺AT≈rBAT (2.33 ± 0.36 (E-04)) were substantially higher than in control cells co-expressing two co-localized but non-interacting proteins, YFP-b⁰⁺AT≈rBAT and CFP≈EGFR (0.35 ± 0.12 (E-04)) (Figure 5C).

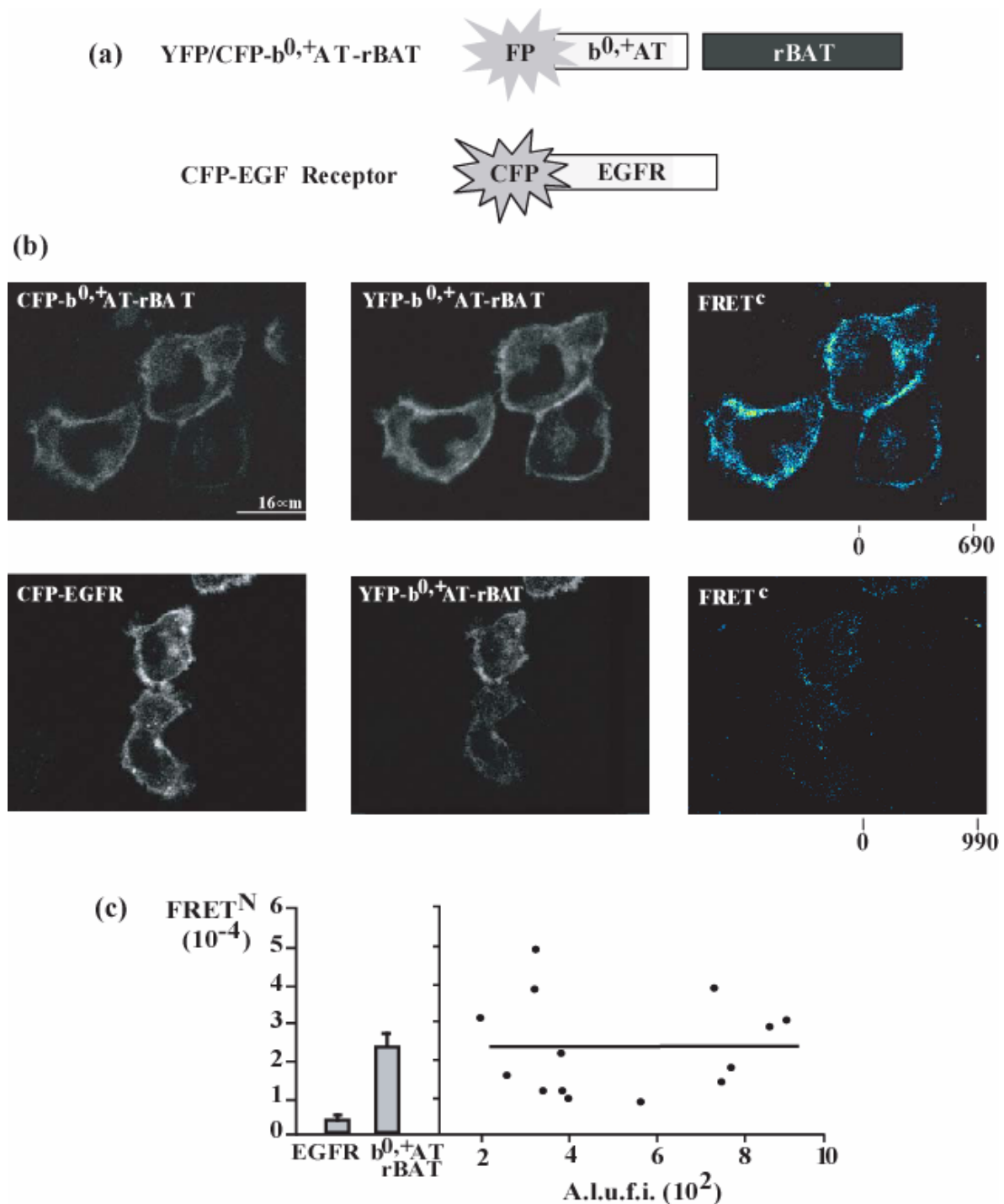


Figure 5 FRET analysis of $b^{0,+}AT$ -rBAT tagged with GFP variants. Scheme of the expressed fusion proteins. B. YFP- and CFP- $b^{0,+}AT$ -rBAT (the three upper images) or YFP- $b^{0,+}AT$ -rBAT and CFP-EGFR (EGFR) (the three lower images) were transiently co-transfected in HeLa cells and grown for 36 hours on glass coverslips. CFP, YFP and FRET images were acquired from living cells at room temperature. FRETc was calculated as described under Materials and methods and is presented as pseudocolor intensity-modulated images (FRETc/YFP). C. Left, FRET^N values (bars) of YFP- and CFP- $b^{0,+}AT$ -rBAT ($b^{0,+}AT$ -rBAT) and YFP- $b^{0,+}AT$ -rBAT and CFP-EGFR (EGFR). Right, the mean FRET^N values calculated from plasma membrane regions of individual cells co-transfected with YFP- and CFP- $b^{0,+}AT$ -rBAT were plotted against the intensity of the YFP- $b^{0,+}AT$ -rBAT in the same regions. A.I.u.f.i.: arbitrary linear units of fluorescence intensity.

In addition, mean FRET values calculated from plasma membrane regions of individual cells were independent of the amount of YFP fusion protein, thus validating the method of FRET measurement (Figure 5C)

We also measured FRET in HeLa cells co-expressing YFP- and CFP-xCT \approx 4F2hc. Localization of the fusion proteins were similar to YFP- and CFP-b^{0,+}AT \approx rBAT (not shown). The FRET value (0.78 ± 0.26 (E-04)) was significantly different from the values obtained when YFP-xCT \approx 4F2hc was co-expressed with CFP-EGFR (which were zero), but lower than for b^{0,+}AT \approx rBAT (see above). The YFP- and CFP-xCT \approx 4F2hc fusion proteins displayed a 13-18 % of the L-cystine transport activity of their untagged control (data not shown). In some experiments we applied the acceptor photobleaching FRET method (Scholze et al., 2002; Herrick-Davis et al., 2004). In YFP- and CFP-b^{0,+}AT \approx rBAT co-expressing cells photobleaching efficiency was 51.6 ± 5 %, with a calculated FRET efficiency of 6 ± 0.9 %; in contrast, in YFP- and CFP-xCT \approx 4F2hc co-expressing cells the photobleaching was more efficient (73.6 ± 2.5 %), but FRET efficiency was not different from zero (2 ± 2 %). The results are consistent with the existence of b^{0,+}AT-rBAT oligomers at the cell surface, and suggest that most of the xCT-4F2hc heterodimers do not form oligomers.

The transport unit of system xC⁻ is the heterodimer (α - β)₁

To determine the transport unit of xCT-4F2hc, we functionally expressed the wild type xCT or the fully functional Cys327Ser xCT mutant together with 4F2hc in *Xenopus* oocytes. xCT is completely inactivated by the externally applied sulfhydryl reagent pCMB, whereas the mutant is unaffected (Jimenez-Vidal et al., 2004). We used oocytes because of the higher level of expression of xCT compared with

transfected cells (Bassi et al., 2001). First, we co-injected varying proportions of cRNA encoding the wild type and the Cys327Ser xCT, together with 4F2hc. If the two xCT variants associated randomly to form functional oligomeric complexes, we would expect a strict relationship between the inhibition of transport function after pCMB exposure and the proportion of the two xCT cRNAs injected, that would depend on the number of xCT units (n) of the oligomer. This relationship, derived from the binomial theorem (Mackinnon, 1991; Wang and Goldstein, 1995), under the assumption that oligomers that comprise one or more wild type xCT components will show full inhibition of transport after pCMB incubation, is given by the equation

$$\% \text{ inhibition} = 100(1 - U_{S^-}/U_{S^+}) = 100(1 - (f_{CS})^n)$$

where U_{S^-} and U_{S^+} are the induced uptake of substrate (S) without (-) and with (+) prior incubation with pCMB, respectively, and f_{CS} is the fraction of Cys327Ser xCT cRNA injected.

First, we verified that transport activity of both xCT variants correlated with the amount of cRNA injected, and that it was of a very similar magnitude (data not shown and (Jimenez-Vidal et al., 2004)), indicating that the proteins seemed to be expressed with similar efficiency. Figure 6A compare the experimental curve obtained by co-injection of different wild type/Cys327Ser xCT ratios with the theoretical curves for a monomeric (straight line) or a dimeric (curve) functional unit. The results excluded a transport unit of more than two xCT subunits, and fitted better with a monomer than with a dimer. However, as the actual amounts of each xCT variant on the oocyte surface were not measured we used a second approach.

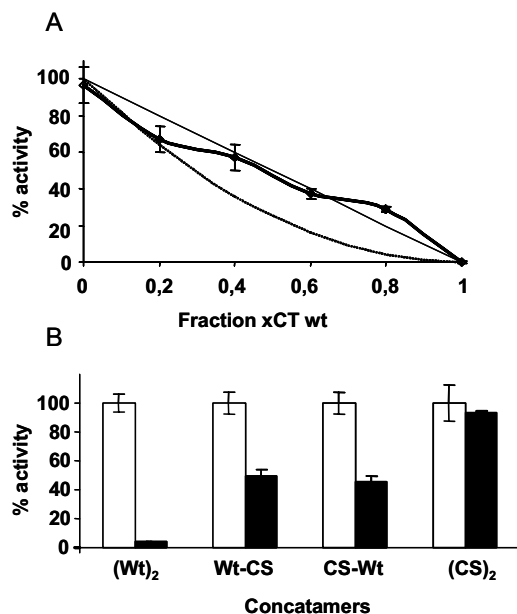


Figure 6 The functional unit of xCT-4F2hc. A. *Xenopus* oocytes were co-injected with different ratios of wild type and Cys327Ser xCT cRNA (total cRNA 5 ng) together with 5 ng of 4F2hc cRNA. Two days after, transport of 20 μ M L-cystine was assayed after preincubation for 5 minutes in 1 mM pCMB or vehicle. The % activity is obtained as the ratio of the induced transport activities (i.e. the difference from non-injected oocytes similarly treated) in the absence and in the presence of pCMB. The theoretical curves for a dimeric (curve) and monomeric (straight line) functional unit, derived from the binomial theorem (see Results) are also depicted. A representative experiment of $n=4$ is shown. B. *Xenopus* oocytes were injected with 25 ng of the indicated concatamers cRNAs together with 5 ng of 4F2hc cRNA. Three days after, transport of 100 μ M L-glutamate was assayed after preincubation for 5 minutes in 1 mM pCMB or vehicle. The % activity is obtained as the ratio of the induced transport activities (i.e. the difference from non-injected oocytes similarly treated) in the absence (white bars) and in the presence (black bars) of pCMB. Wt: wild type; CS: Cys327Ser mutant. The mean \pm S.E.M of $n=5$ experiments is shown.

We constructed a concatamer between the wild type and the Cys327Ser xCT in both orientations so that when expressed the wild type and the Cys327Ser would be represented in precisely equal proportions. If a monomer would be indeed the functional unit, we would expect that pCMB addition would result in roughly 50 % loss of transport activity, whereas a transport unit constituted by two subunits would result in total loss of function. As controls,

concatamers of two wild type subunits and two Cys327Ser subunits were also constructed: the first should be completely sensitive to pCMB whereas no effect should be observed in the second. Blue Native gels showed that these concatamers were expressed and run with the expected dimeric size (see Figure 4A) and exclusion gel chromatography and Western blot confirmed this (data not shown). The transport function of the concatamers was a 15-25 % of the activity of the wild type or Cys327Ser xCT (Supplemental Figure C1). After pCMB exposure the wild type and the Cys327Ser concatamers were completely inhibited or unaffected, respectively, by pCMB. In contrast, both combined concatamers showed an inhibition very close to the theoretical 50 % after pCMB treatment (Figure 6B), validating the results of the co-injections. We concluded that the transport unit of xCT-4F2hc is the $(\alpha-\beta)_1$ heterodimer.

The transport unit of system $b^{0,+}$ is the heterodimer $(\alpha-\beta)_1$

We then sought to use an identical strategy to investigate the $b^{0,+}$ AT-rBAT transport unit. Transiently transfected HeLa cells were used because injection of rBAT cRNA alone already induces a potent system $b^{0,+}$ activity in oocytes (most likely by heterodimerization with the *Xenopus* $b^{0,+}$ AT subunit) which avoids analysis of heterologous $b^{0,+}$ AT (Pfeiffer *et al.*, 1999b). First, the sensitivity of $b^{0,+}$ AT to different sulfhydryl reagents was assayed. Neither pCMB nor MTSET or MTSES affected $b^{0,+}$ AT-rBAT induced transport (data not shown), but exposure to MTSEA completely abolished uptake (Figure 7A). As $b^{0,+}$ AT alone is functional in a reconstituted system (Reig *et al.*, 2002) we reasoned that the residues responsible for MTSEA inactivation may reside in $b^{0,+}$ AT and therefore several $b^{0,+}$ AT Cys to Ser mutants were analyzed for sensitivity to

MTSEA. The Cys321Ser $b^{0,+}$ AT mutant, located in the intracellular loop between transmembrane segments 8 and 9, is insensitive to MTSEA and showed 50 to 70 % the activity of the wild type $b^{0,+}$ AT (Figure 7A).

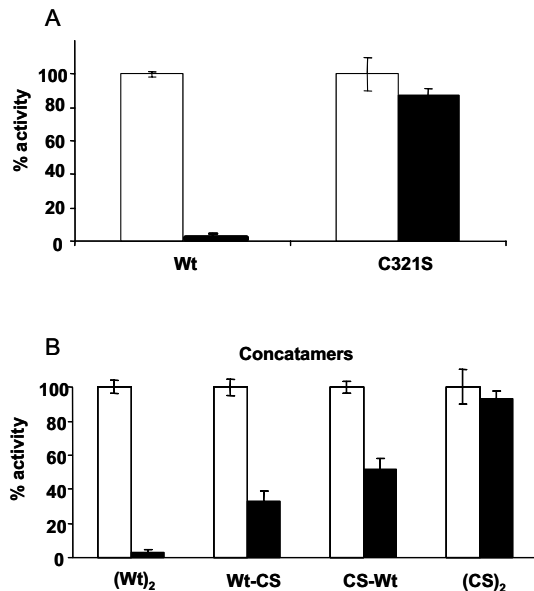


Figure 7 . The functional unit of $b^{0,+}$ AT-rBAT. A. HeLa cells were co-transfected with wild type or Cys321Ser $b^{0,+}$ AT together with rBAT. 36 hours later the transport of 20 μ M L-cystine was assayed after preincubation for 5 minutes in 2.5 mM MTSEA or vehicle. The % activity is obtained as the ratio of the induced transport activities (i.e. the difference from non-transfected cells similarly treated) in the absence (white bars) and in the presence (black bars) of MTSEA. A representative experiment of $n=4$ is shown. B. HeLa cells were transfected with the indicated concatamers together with rBAT. 36 hours later the transport of 20 μ M L-cystine was assayed after preincubation for 5 minutes in 2.5 mM MTSEA or vehicle. The % activity was calculated as in A. Wt: wild type; CS: Cys321Ser mutant. The mean \pm S.E.M. of $n=5$ experiments is shown.

It was technically not possible to perform similar experiments to those shown in Figure 6A because transient transfection of different ratios of plasmids encoding wild type and Cys321Ser $b^{0,+}$ AT was subjected to large variation. Therefore, and in analogy to xCT, dimeric concatamers of wild type and Cys321Ser $b^{0,+}$ AT, and the dimeric wild type and Cys321Ser controls were constructed. The transport function of the concatamers was a 15-30 % of the activity of $b^{0,+}$ AT (Supplemental Figure C2).

After incubation with MTSEA the wild type and the Cys321Ser concatamers were completely inhibited or unaffected, respectively. In contrast, the combined concatamers showed an inhibition much closer to the theoretical 50 % after MTSEA treatment (32.8 ± 5.8 % remaining activity the wild type-Cys327Ser and 51.9 ± 5.9 % remaining activity the Cys327Ser-wild type) (Figure 7B). These results strongly suggest that the transport unit of $b^{0,+}$ AT-rBAT is also an $(\alpha-\beta)_1$ heterodimer.

DISCUSSION

Systems $b^{0,+}$ and x_c^- do not share a common quaternary structure

Based on our studies we propose the following working model for the oligomerization of the amino acid transport systems $b^{0,+}$ and x_c^- (Figure 8A) at the plasma membrane. A single heterodimer is sufficient for transport activity. Reconstitution of $b^{0,+}$ AT showed that rBAT is dispensable for carrier activity (Reig *et al.*, 2002); similar evidence for 4F2hc is at present lacking. The two transport systems differ structurally: $b^{0,+}$ AT-rBAT is a heterotetramer $(\alpha-\beta)_2$ whereas xCT-4F2hc is most likely a heterodimer $(\alpha-\beta)_1$.

We have drawn an equilibrium $(\alpha-\beta)_1 \leftrightarrow (\alpha-\beta)_2$, which would be strongly shifted to the dimeric or monomeric structure in the case of the $b^{0,+}$ and x_c^- systems, respectively. $b^{0,+}$ AT-rBAT is detected in the $(\alpha-\beta)_1$ form only after SDS treatment, either in SDS-PAGE or in BN-PAGE in non-reducing conditions, and the $(\alpha-\beta)_2$ is never completely shifted to the $(\alpha-\beta)_1$ form. Even urea did not dissociate the heterotetramer, a property also observed for the 400 kDa General Import Pore (GIP) complex from the outer membrane of mitochondria (Meisinger *et al.*, 2001). In addition, in BN gels

the reducing agent DTT alone did not affect the size of the heterotetrameric complex in the absence of SDS, despite the complete reduction of the intersubunit disulfide bond, as seen in control SDS-PAGE gels (data not shown). FRET analysis is not indicative of the presence or not of $(\alpha-\beta)_1$ and $(\alpha-\beta)_2$ forms in equilibrium, but demonstrates that $b^{0,+}AT-rBAT$ heterodimers do form higher order oligomers at the plasma membrane of live cells. A quantitative interpretation of the FRET^C and FRET^N data has to take into account that even under conditions of an equimolar amount of YFP- and CFP- $b^{0,+}AT\approx rBAT$ the probability of heterodimerization of the two fusion proteins is only 50 %, which reduces the maximal FRET^C and FRET^N by 2-fold compared with the values that would be observed for the same affinity interaction of two different proteins (Sorkina *et al.*, 2003). Altogether, it is very likely that the vast majority of $b^{0,+}AT-rBAT$ exists as an $(\alpha-\beta)_2$ structure at the cell surface.

Our data do not rule out higher order oligomerization of xCT-4F2hc and is still consistent with a small amount of the heterodimer in a $(\alpha-\beta)_2$ form. Faint bands compatible with an heterotetramer were detected in SDS and BN-gels, but they constituted a minor fraction, in strong contrast to $b^{0,+}AT-rBAT$. Moreover, whereas the $b^{0,+}AT$ subunit appear as a doublet (α and α_2) in BN-gels after DTT + SDS treatment, the xCT and the LAT2 subunits appeared only as monomers α_1 . FRET results were not conclusive. The lower FRET^N value compared to $b^{0,+}AT-rBAT$ may be due to multiple factors: although we consider it unlikely, the N-termini of xCT and $b^{0,+}AT$ could be differently positioned in a heterotetramer, precluding a higher FRET efficiency in the case of xCT; differential protein-protein interactions may cause a similar effect. However, the FRET efficiency after acceptor photobleaching was

not different from zero for xCT-4F2hc, in contrast to $b^{0,+}AT-rBAT$, despite of the higher photobleaching efficiency (see Results). Moreover, FRET values fully agree with the *in vitro* results and are also consistent with the functional data. Overall, an $(\alpha-\beta)_1$ structure of xCT-4F2hc (perhaps in equilibrium with a low amount of $(\alpha-\beta)_2$ forms) is the most supported model. The scheme on Figure 8A can be probably extended to LAT2 (the $(\alpha-\beta)_1$) and the X subunit (the $(\alpha-\beta)_2$). It is tempting to speculate that other 4F2hc-bound LSHATs may behave similar to xCT and LAT2.

Interactions within the $b^{0,+}AT-rBAT$ heterotetramer

We found some hints about subunits and subunit domains which participate in the heterotetramerization of $b^{0,+}AT-rBAT$. First, cross-linking suggests that the two light subunits in the heterotetramer are in direct contact, with two or more lysine in different $b^{0,+}AT$ molecules at a maximum distance of 11 Å (Figure 8B). In addition, on SDS-gels under reducing conditions and, more important, on SDS and DTT treated samples in BN-gels, $b^{0,+}AT$ run as an α monomer and an α_2 dimer, whereas rBAT run only as a β_1 monomer. We also observed that partial dissociation of the $b^{0,+}AT-rBAT$ tetramer after SDS treatment was less efficient with the concatamer $b^{0,+}AT\approx rBAT$, which might be due to the artificial *freezing* of an interaction between the C-terminal domain of $b^{0,+}AT$ and the N-terminal domain of rBAT. Finally, FRET directly revealed close proximity between the N-terminal domains of $b^{0,+}AT$. Contacts between rBAT subunits (or between rBAT and $b^{0,+}AT$ subunits in *trans*) cannot be discarded. In this sense, it is intriguing that the 4F2hc subunits LAT2 and xCT on the one hand, and the rBAT subunits $b^{0,+}AT$ and X on the other, seem to share a common architecture. Comparison of

xCT and LAT2 with the b⁰⁺AT amino acid sequence do not give any clues about motifs or domains which may account at least in part for their different quaternary structure. On the contrary, despite 4F2hc and rBAT share a common topology, a ~30 % identity, and a strong similarity to α -glucosidases, they differ in several domains (Chillaron et al., 2001): i) domain B of α -glucosidases is present in rBAT, but not in 4F2hc; ii) a putative leucine-zipper in the rBAT sequence is not present in 4F2hc (Wells and Hediger, 1992); and iii) the C-terminal 31 residues of rBAT are absent in 4F2hc. These are good candidates to participate in the heterotetramerization of b⁰⁺AT-rBAT, and also in the specific recognition of rBAT-bound versus 4F2hc-bound light subunits.

May b⁰⁺AT-rBAT oligomerization have a role on type non-I cystinuria?

As far as the basic transport unit of b⁰⁺AT-rBAT seems to be the (α - β)₁ heterodimer, the function of the heterotetramerization remains to be elucidated. Two main roles for membrane transporter oligomerization have been suggested: modulation of carrier function, and the control of different aspects of transporter cell biology. In general, the relationship between oligomeric structure and transport has been established only in a few cases. Among them, dimerization of the Na⁺-H⁺ antiporter NhaA modifies its pH dependency (Gerchman et al., 2001); the two subunits of the LacS dimer of *S. thermophilus* may be functionally coupled in the proton-motive-force-driven mode of uptake (Veenhoff et al., 2001); and the change from a tetrameric to a dimeric GLUT1 glucose transporter regulates allostereism between the subunits (Zottola et al., 1995). Another example is constituted by the CAP70-facilitated dimerization of CFTR, which may potentiate its chloride channel activity (Wang et al., 2000). In

a preliminary attempt to correlate oligomerization and function of b⁰⁺AT-rBAT, we isolated the complex for BN analysis in the absence or presence of substrate, and found no differences (data not shown). Cell biology studies on transporter oligomerization have focused on trafficking to the cell surface, as it is well documented that assembly is a pre-requisite for ER exit of many oligomeric membrane complexes (Deutsch, 2002). Other points have been also addressed, as interaction with the cytoskeleton (Liu et al., 1995) or with PDZ proteins (Wang et al., 2000). Oligomerization of sodium-dependent neurotransmitter transporters may be necessary for efficient traffic to the plasma membrane (Scholze et al., 2002), and mutagenesis studies in combination with FRET strongly suggest that oligomerization of the GABA transporter-1 is required for ER exit (Scholze et al., 2002). rBAT and b⁰⁺AT co-transfected in mammalian cells are found at the plasma membrane and in intracellular sites (Figure 5 and E.F., M.P. and J.C., unpublished results). We suggest that b⁰⁺AT-rBAT is already oligomerized in these intracellular locations, as the ~535 kDa band is the only one detected in BN gels from HeLa cells and the cross-linking efficiency is practically 100 %. A trafficking function for b⁰⁺AT-rBAT oligomerization could have relevant consequences for the understanding of the dominant phenotype of type non-I cystinuria: most of the obligate heterozygotes with b⁰⁺AT mutations already hyperexcrete cystine and dibasic amino acids, and in a few cases, cystine stones are formed (Font et al., 2001)). In the null b⁰⁺AT KO mouse model of type non-I cystinuria, the heterozygous mice showed hyperexcretion of cystine and dibasic amino acids (Feliubadalo et al., 2003), indicating that b⁰⁺AT expression limits the reabsorption of these amino acids. However, most of the cystinuria b⁰⁺AT mutations are missense, and from the few

so far studied all but one are expressed in similar amounts when compared to the wild type protein in HeLa cells (Reig *et al.*, 2002). This raises the possibility that co-expression of mutant $b^{0,+}AT$ exerts a dominant negative effect on the assembly and trafficking of the heterotetrameric complex. Therefore, and besides heterodimer assembly (Bauch and Verrey, 2002; Pineda *et al.*, 2004), higher order oligomerization would add a new (and perhaps more distal) quality control step for plasma membrane localization of rBAT- $b^{0,+}AT$. Future experiments should address the intracellular site where the $(\alpha-\beta)_1$ heterodimers are assembled into $(\alpha-\beta)_2$ structures, and the impact of the formation of mixed wild type-mutant $b^{0,+}AT$ -rBAT heterotetramers on trafficking to the plasma membrane.

From the quaternary structure to the transport mechanism of the HATs

The transport mechanism of the HAT transporters has been studied in detail only in $b^{0,+}AT$ -rBAT. The chicken intestinal system $b^{0,+}$ showed a sequential mechanism of exchange, compatible with the formation of a ternary complex (i.e., the transporter is bound at the same time to its intracellular and extracellular amino acid substrates) (Torras-Llort *et al.*, 2001). The analog aminoisobutyrate (AIB) induced an unequal exchange with other substrates through the rBAT-induced system $b^{0,+}$ in oocytes (i.e., using the endogenous $b^{0,+}AT$ subunit) (Coady *et al.*, 1996), which led the authors to propose a two-alternative access transport model. This model was further supported by the study of the cystinuria-specific rBAT mutation R365W which, in addition to a trafficking defect, showed a defect in the efflux of arginine but not in its influx (Pineda *et al.*, 2004). This is consistent with two transport pathways, one for influx and another for efflux. These

results can be explained by a heterotetrameric $b^{0,+}AT$ -rBAT, with one light subunit used for export and the other for import. However, the sensitivity to MTSEA of the combined concatamers was clearly distinct from the sensitivity of the control concatamers, indicating that the two translocation pathways should co-exist in only one $b^{0,+}AT$ subunit, which is sufficient for transport activity. The results support a similar scenario for the xCT-4F2hc transporter, although it is not known whether the exchange follows a sequential or a *ping-pong* mechanism. The functional properties of the rBAT R365W mutant already suggested an $(\alpha-\beta)_1$ functional unit for $b^{0,+}AT$ -rBAT because in the rBAT(R365W)- $b^{0,+}AT$ holotransporter the two translocation pathways would be asymmetric: only the efflux pathway, but not the influx, seems to be affected. This fits better with a functional $(\alpha-\beta)_1$ heterodimer, where rBAT interacts asymmetrically with different domains of a single $b^{0,+}AT$ subunit (i.e. *efflux-related versus influx-related domains*), than with an $(\alpha-\beta)_2$ functional unit, which (assuming a symmetric $(\alpha-\beta)_2$ structure) can hardly account for the R365W functionally asymmetric defect. A summary of the evidence supporting our current model for $b^{0,+}AT$ -rBAT oligomerization and transport mechanism is presented on Figure 8B. To our knowledge, a two-alternative access model within a single transporter polypeptide has not been proposed for any other antiporter. However, a similar sequential mode of exchange is experimentally supported for most members of the mitochondrial carrier family, which are antiporters. Interestingly, their functional unit is a dimer (Schroers *et al.*, 1998), and each polypeptide has a 6-TM topology (Kunji, 2004), suggesting that one translocation pathway, either export or import, resides within one monomer. The 12-TM topology of the xCT subunit, and likely of the rest of the LSHATS including $b^{0,+}AT$, may function during the

transport cycle in an analogous way to the 2 x 6-TM topology of these mitochondrial carriers, representing a striking case for convergent evolution of (an antiport) carrier mechanism. Additional evidence for this hypothesis would be possible with the study of system $b^{0,+}$ oligomerization mutants and/or by studying monomeric homologues of $b^{0,+}$ AT, but final proof awaits the 3D-structure of fully substrate-bound homologues of LSHATs.

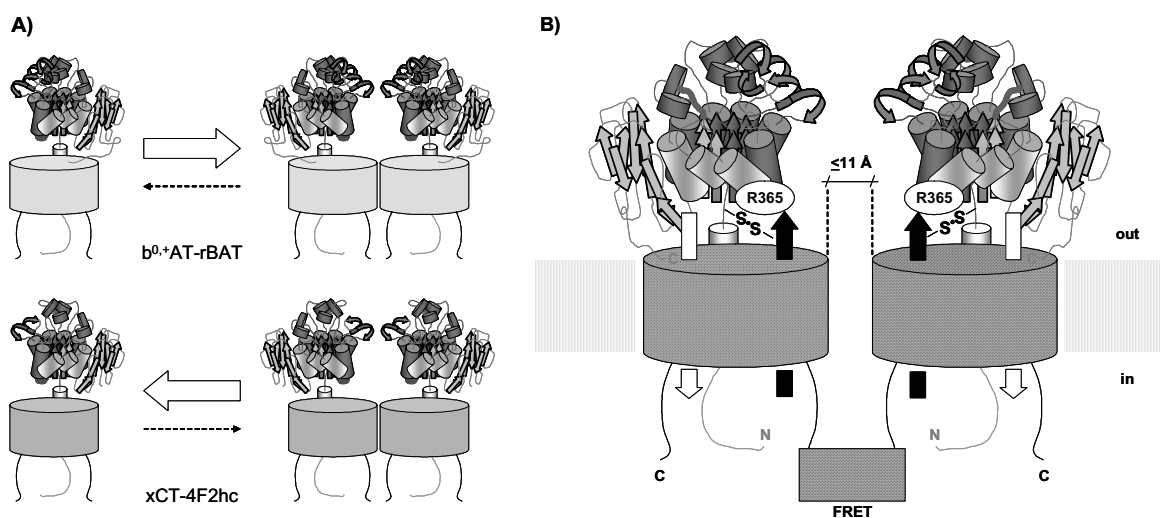


Figure 8 Working model for oligomerization of $b^{0,+}$ AT-rBAT and xCT-4F2hc at the plasma membrane A. Oligomerization of $b^{0,+}$ AT-rBAT is strongly shifted to a very stable dimeric (α - β)₂ form in vivo, whereas the reverse holds most likely true for xCT-4F2hc. The light subunits (α , the polytopic membrane proteins) are the actual antiporters (arrows). This is demonstrated for $b^{0,+}$ AT (Reig et al., 2002). B. The draw puts together the available data to construct an integrated model of the oligomerization and transport mechanism of system $b^{0,+}$. The rBAT and $b^{0,+}$ AT subunits are drawn to scale. The proposed contacts between the α subunits of the heterotetramer are shown: DMS cross-linking analysis within this study indicates that primary amines in the $b^{0,+}$ AT subunits are located at a maximum distance of 11 Å. FRET studies show that the N-termini of the two $b^{0,+}$ AT subunits are in close proximity. The two asymmetric translocation pathways (relative to the position of the rBAT R365 residue) are indicated (influx: white arrow; efflux: black arrow). The relative positions of rBAT and $b^{0,+}$ AT within the complex are not known. Anyway, they should be constrained by the intersubunit disulfide bond and probably also by the proximity of the rBAT R365 residue to the efflux pathway (Pineda et al., 2004). The structural model for the extracellular domain of rBAT and 4F2hc is based on the structural alignment with the 3D structure of bacterial glucosidases that show significant homology (Chillaron et al., 2001). The rBAT R365 residue lies between the $\alpha\beta 5$ and the $\alpha\alpha 5$ (domain A: TIM-barrel beta sheet 5 and alpha helix 5), a region of ~50 residues without homology with the bacterial glucosidases.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and antibodies

The reagents used were from Sigma if not otherwise indicated. Digitonin was purchased from Calbiochem, Coomassie Blue G from Serva, and the DMS cross-linker was obtained from Pierce. L-[³H]glutamate and L-[³⁵S]cystine were from ARC and Amersham, respectively. Molecular weight markers for exclusion gel chromatography and Blue Native Electrophoresis were from Amersham (17-0441-01 and 17-0445-01, respectively). The methanethiosulfonate reagents MTSET ([2-(trimethylammonium) ethyl] methanethiosulfonate), MTSEA (2-aminoethyl methanethiosulfonate) and MTSES (2-sulfonatoethyl methanethiosulfonate) were obtained from Toronto Research Chemicals, Inc. The organomercurial reagent pCMB was from Sigma. These reagents were prepared in DMSO, frozen in aliquots at 1M (MTS reagents) or 100mM (pCMB). Prior to use, they were freshly diluted from the frozen stock in uptake solution. A final concentration of 1mM pCMB and 2.5mM MTSEA was used that consistently gave full inhibition of transport function of xCT wt (ref) and b^{0,+}AT wt, respectively.

Antibodies against human and mouse b^{0,+}AT and rBAT have been described elsewhere (Furriols *et al.*, 1993; Font *et al.*, 2001; Fernandez *et al.*, 2002). The anti-Xpress antibody was purchased from Invitrogen and the anti-myc 9E10 hybridoma was from ATCC. The polyclonal antibody against mouse LAT2 was produced in rabbits at Research Genetics (Supplementary Figure A). The peptide used as an antigen was CPIFKPTPVKDPDSEEQP (the last C-terminal 17 residues). The cysteine was introduced to facilitate keyhole limpet hemocyanin

conjugation. The preimmune antisera used in the study was obtained from the same rabbit.

cDNA constructs and transcripts

The vectors for mammalian cell expression of human rBAT and b^{0,+}AT, and human his-tagged xCT (his-xCT) have been described elsewhere (Font *et al.*, 2001; Gasol *et al.*, 2004). The construct pCDNA3-mycLAT2 is derived from the pNKS2-mycLAT2 vector (Pineda *et al.*, 1999). Briefly, pNKS2-mycLAT2 was cut with BamHI and NotI and cloned into these sites of pCDNA3 (Invitrogen). The human b^{0,+}AT single cysteine mutants C65S, C82S, C266S, C321S, and C440S were generated in pCDNA3-b^{0,+}AT by site-directed mutagenesis (QuickChange™, Stratagene) using the following oligonucleotides:

b^{0,+}AT_C65S 5'AGCTGTGGGGCCC(A)GCCTCAT CATATGG 3'; b^{0,+}ATC82S 5'CTGGGTGCCCTG(A) GCTTTCGGAGC3'; b^{0,+}ATC266S 5'TGGTGAC GGCG(A)GCTACATCCTCATGAACG3'; b^{0,+}AT_C321S 5'TGCTAACGGGACC(A)GCTTCACAGCG GG 3'; b^{0,+}AT_C440S 5'GGAGTACCTCTAC(A)GT GTGCTGTTTATTAAGCGG 3'. The mutated nucleotide is in parenthesis. Only the sense oligonucleotide is given. The mutated regions were subcloned back into the original plasmid. All mutations were confirmed by DNA sequencing. All sequences carried out in this work were performed on both strands with d-Rhodamine dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer Applied Biosystems). The sequence reactions were analysed with an Abi Prism 377 DNA Sequencer.

The LSHAT-LSHAT concatamers comprised either two wt xCT or b^{0,+}AT LSHATS (wt-wt), two C327S (xCT) or C321S (b^{0,+}AT) mutants (CS-CS), or both proteins in the two possible combinations (wt-CS and CS-wt). The pNKS2-xCT-Cys327Ser mutant has been described elsewhere

(Jimenez-Vidal *et al.*, 2004). The two units of the concatamer (A and B) were constructed in pNKS2 (for xCT) or in pCDNA3 (for b^{0,+}AT) and joined through the linker peptide SLGAAPDAAPGS. To insert the linker peptide, unit B was elongated at the 5' using polymerase chain reaction. The corresponding primer (see below) contained an upstream HindIII site followed by the linker. A HindIII site was also introduced at the 3' end of unit A by polymerase chain reaction. The corresponding primer (see below) contained the HindIII site in place of the stop codon, in frame with the linker. For unit A, the corresponding sense and antisense primers were, respectively: 5' TATCATAC ACATACGATTAGGTG 3' and 5' TTATGC **AAGCTT**AACTTATCTTCTTCTGGTACAAC 3', for xCT; and 5' AACCCACTGCTTACTGGC TTATCG3' and 5' TTATGC**AAGCTT**CAGGG TCTTCCTCCGGTGGGAC3', for b^{0,+}AT (HindIII sites are indicated in bold). For unit B the corresponding sense and antisense primers were, respectively: 5' AGTT**AAGCTT**AGGTGC IGCTCCTGATGCTGCTCCTGGATCTATGGTCAG AAAGCCTGTTGTGCC3' and 5' TCACT ATAGGGAGACCGGAATTCG 3', for xCT; and 5' AGTT**AAGCTT**AGGTGCTGCTCCTGAT GCTGCTCCTGGATCTATGGGGATACTGGCCT GAGAAAG3' and 5' GAGGCTGATCAG CGAGCTCTAGCA3' for b^{0,+}AT (HindIII site is indicated in bold, and the linker sequence is underlined). The PCR fragment corresponding to unit B was digested with HindIII and XhoI, and reintroduced back into the same vector of origin digested with the same enzymes. The mutated construct containing unit B and the linker was then linearized with HindIII, treated with alkaline fosfatase, and purified. The PCR fragment corresponding to unit A was digested with HindIII and ligated to the linearized vector containing the unit B and the linker.

The xCT-xCT concatamers were also constructed with a different linker QQQQQQQQSLGA APDAAPG: using as template the above concatamers, unit A was elongated by PCR with the sense primer used for unit A construction and an antisense primer containing an upstream HindIII site followed by the in-frame inserted 8 glutamine residues (see below). These primers were 5' TATCATACACATACGATTAGGTG 3' and 5' TAGGC**AAGCTT**GCTGTTGCTGCTGCTGCTGCTGCT GTAACTTATCTTCTTCTGGTACAAC3'; (the HindIII site is indicated in bold and the polyglutamine is underlined). The elongated unit A fragment was digested with HindIII and the fragment was subcloned back to the initial concatamer vector linearized with the same enzyme. The myc-tagged xCT-xCT concatamer was constructed as follows: the pCDNA3-myc-xCT (Jimenez-Vidal *et al.*, 2004) and pNKS2-xCT-xCT vectors were digested with EcoRV, which cuts at nucleotide 501 of the xCT coding sequence. The EcoRV fragment of the pNKS2-xCT-xCT vector (containing the sequence after nucleotide 501 of unit A, followed by the linker and then nucleotides 1 to 501 of unit B) was ligated into pCDNA3-myc-xCT vector digested with EcoRV. All PCR fragments and ligations were confirmed by DNA sequencing as described above.

To construct the his-xCT-4F2hc concatamer in pCDNA4HISMAX (Invitrogen), the linker peptide GAAPDGAPGC was used. To insert the linker peptide, xCT (in pCDN4HisMax) and 4F2hc (in pSPORT) were elongated by PCR at the 3' and 5', respectively. The corresponding primers (see below) contained the linker, and the stop codon of xCT was eliminated. A XhoI site was also added at the 3' of 4F2hc. The two PCR fragments were used as a template for a third PCR polymerase chain reaction that resulted in the linked xCT-4F2hc fragment. This fragment

Resultados- Artículo 4

was then digested with XhoI and cloned into the XhoI-linearized vector pCDNA4HisMax-xCT. All PCR fragments and ligations were confirmed by DNA sequencing as described above. For 4F2hc, the corresponding sense and antisense primers were, respectively: 5'GGIGCTGCTCCTGATGGTGCTCCTGGTTGCATGAGCCAGGACACCGAGGTGG3' and 5'**GTATACTCGA**GTCAGGCCGCGTAGGGGAA 3' (XhoI site is indicated in bold, and the linker sequence is underlined). For xCT, the corresponding sense and antisense primers were, respectively: 5'TGTGGGGTCTGTCACTATT GG3' and 5'GCAACCAGGAGCCACCATCAGGAGCAGCACCTAACTATCTTCTCTGGTCAA3' (the linker sequence is underlined).

CFP/YFP-fusion proteins were generated as follows. For the construction of pECFP-C3 and pEYFP-C3 vectors, the pECFP-N1 and pEYFP-N1 vectors (Clontech, PaloAlto, CA) were digested with AgeI and BsrG1, and the fragment containing CFP and YFP ORFs were ligated into pEGFP-C3 vector (Clontech, Palo Alto, CA) after removal of the GFP protein sequence with the previous enzymes. To generate the cyan and yellow fusion proteins of b⁰⁺AT-rBAT (CFP-b⁰⁺AT-rBAT and YFP-b⁰⁺AT-rBAT), the ORF of b⁰⁺AT-rBAT was placed into the pECFP-C3 and pEYFP-C3 vectors. For this, the plasmid pCDNA4-his-rBAT-b⁰⁺AT was digested with Asp718 and XbaI and the fragment containing b⁰⁺AT-rBAT was ligated into pCFP-C3 and pYFP-C3 previously digested with the same enzymes. A similar procedure was used for CFP-xCT-4F2hc and YFP-xCT-4F2hc fusion proteins. The fusion proteins were checked by sequencing as above and expressed in HeLa cells for transport studies and FRET analysis.

Synthesis of human 4F2hc cRNA has been described elsewhere (Estevez et al., 1998). In vitro synthesis of human xCT wild-type, xCT

C327S, and xCT concatamers was conducted with the NotI-linearized plasmid template using the in vitro transcription protocol provided by AMBION (mMESSAGE mMACHINE, Ambion, Austin, USA). Mixtures of cRNA were prepared immediately prior to injection with a calibrated pipette. The amount of transcribed RNA was calculated by the 260nm absorbance before microinjection into *Xenopus* oocytes. Each of the cRNA species was synthesized at least on two occasions. In mixing experiments, oocytes were injected with 4F2hc cRNA (5ng) together with xCT wt (5ng), xCT C327S (5ng) or with a mixture of xCT wt and xCT C327S that make a total amount of 5ng cRNA. For the concatamers, 25ng of the corresponding cRNA together with 5 ng of 4F2hc cRNA were injected per oocyte.

Injection and maintenance of *Xenopus* oocytes

These procedures have been described in detail elsewhere (Bertran et al., 1992). Oocytes were injected with either 50nl of water or 50nl of water containing the mixture of cRNA. Oocytes were incubated in modified Barth's solution, and the experiments were performed 2-4 days after injection.

Cell culture and transfection

HeLa cells were grown in DMEM containing 10% fetal bovine serum, 2 mM L-Glutamine, penicillin (100 U/ ml) and streptomycin (100 µg/ ml). For transport studies, cross-linking and Blue Native electrophoresis, the cells were transiently transfected with calcium phosphate as described (Font et al., 2001). For *in vivo* FRET analysis, the cells were plated on a 6-well plate and transiently transfected at ~ 60% confluence using the FuGENE transfection reagent (Boehringer). 6 µl of FuGENE-6 reagent was added to serum free medium (100 µl) at room

temperature during 5 min. Then, this medium was incubated with DNA (2µg) for 30 min. and the mixture was added to the cells grown in culture medium. After 5-6 hours of incubation the cells were washed twice with PBS, trypsinized and reseeded into 6-well plate containing one coverslip (22 mm, Electron Microscopy Science) per plate.

Transport assays

Influx rates of 100 µM L-[³H]glutamate or 20 µM L-[³⁵S] cystine in *Xenopus* oocytes or transfected HeLa cells were performed as described (Font *et al.*, 2001; Jimenez-Vidal *et al.*, 2004). The effect of pCMB and MTS reagents was assayed as described elsewhere (Gasol *et al.*, 2004; Jimenez-Vidal *et al.*, 2004).

Membrane preparation and protein purification by Ni²⁺-NTA chromatography

Kidney brush border membranes were obtained as described (Fernandez *et al.*, 2002). For obtention of kidney total membranes, the kidney was homogenised in Hepes 25 mM pH 7.4, EDTA 4 mM, Sucrose 250 mM, NEM 20 mM, with the protease inhibitors aprotinin, leupeptin, PMSF and pepstatin, on a CPCU Politron. The homogenate was centrifuged at 10000 g for 10 min. at 4° C, and the supernatant was further centrifuged at 200000 g for 90 min. at 4° C. A similar procedure was used to obtain total membranes from HeLa cells, but here the cells (~10⁷ cells/1 ml homogenisation buffer) were homogenised by 15 passages through a 25 gauges needle. When the membranes were used for Blue Native Electrophoresis or cross-linking they were resuspended directly in the appropriate buffers (see below).

For Ni²⁺-NTA chromatography, total membranes from HeLa cells were resuspended

in Tris-HCl 25 mM pH 7, 50 mM NaCl, 1% digitonin, with a final detergent/protein (w/w) ratio of 3.3, and solubilization proceeded for 30 min. Insoluble material was discarded by 10 min 10000 g centrifugation at 4° C. The supernatant was diluted in the buffer above containing 15 mM imidazol and applied to the Ni²⁺-NTA beads (Qiagen). After 30 min end-over-end mixing at ambient temperature, the beads were washed 4 times in a similar buffer now containing 0.1 % digitonin and 10 mM imidazol. Elution was performed by raising the imidazol concentration to 100 mM for 10 min at ambient temperature. The eluted material was then processed for Blue Native Electrophoresis (see below).

Exclusion gel chromatography

The chromatography was performed on a Pharmacia FPLC system equipped with a Superose 6HR 10/30 column. The column was equilibrated in NaCl 150 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 7.0 at 0.5 ml/min flow rate and calibrated with high molecular weight gel filtration protein standards (Amersham) at a 0.4 ml/min flow rate. The column was then re-equilibrated with the same buffer supplemented with 1% digitonin. Approximately, 750 µg of fresh kidney brush borders or total membranes, or total membranes from transfected HeLa cells were solubilized in the above buffer containing 1% digitonin, with a final detergent/protein (w/w) ratio of 3.3. Detergent extracts were cleared by a 20-min centrifugation at 4°C at 100,000 × g on an Optima™ Ultracentrifuge (Beckman). The supernatant was injected onto the column and eluted with the equilibration buffer at 0.4 ml/min flow rate. Fractions (250 µl) were collected and the elution profile of b^{0,+}AT, LAT-2 or xCT proteins was determined by SDS-PAGE of individual fractions followed by Western blot.

BN and SDS PAGE

The membrane samples were solubilized for 30 min. at ambient temperature in Tris-HCl 25 mM pH 7, NaCl 50 mM, 1 % digitonin at a detergent/protein ratio (w/w) of 3.3. In some experiments further treatment with 100 mM DTT or 2 % SDS with or without 100 mM DTT was carried out at 37 °C for 30 min. After solubilization, Blue Native buffer was added and Blue Native PAGE (BN) was carried out as described (Schagger *et al.*, 1991; Schagger *et al.*, 1994). Native molecular weight markers were visualized by Coomassie staining. For control SDS PAGE, SDS sample buffer (without DTT) was added to the solubilized samples, which were immediately loaded (without heating) in SDS PAGE gels.

In preliminary experiments we tested different detergent/protein (w/w) ratios for setting up the method, with a fixed Coomassie Blue G (CBG)/detergent ratio (w/w) of 1/2.5 (Nicke *et al.*, 1998). With 0.5-1 % digitonin extracts and a 3.3/1 detergent/protein ratio we observed that rBAT and b⁰+AT appeared as a single band of 535 ± 18 kDa (Figure 2A). Similar results were obtained with 0.25-0.5 % dodecyl- α -D-maltoside (DDM), although a smear appeared above the ~535 kDa band (see Supplemental Figure B1). Other detergents did not resolve any band or increased the smearing, but we did not observe additional bands (data not shown). Values of detergent/protein ratio below 3.3/1 increased smearing and decreased the intensity of the ~535 kDa band and at 0.25/1 ratio no band was detected; ratios up to 10/1 were similar to the 3.3/1 ratio (data not shown).

Western Blots were performed as described (Pineda *et al.*, 2004). After transference of BN gels, the membrane was destained (Methanol 50 %, acetic acid 10 %) to eliminate excess CBG

and washed with bidistilled water before blocking.

Cross-linking

Total membrane proteins from transfected HeLa cells were prepared and resuspended in Phosphate Buffered Saline. The membranes were incubated (at final concentration of 2 mg/ml) with the indicated concentrations of the cross-linker agent Dimethylsuberimide (DMS) for 30 min at room temperature. The cross-linking was terminated by addition of Tris-HCl 100 mM pH 8.0 for 15 min at ambient temperature. Cross-linking products were analyzed by SDS-PAGE and Western blot.

FRET

For fluorescence resonance energy transfer (FRET) analysis, CFP-b⁰+AT-rBAT, YFP-b⁰+AT-rBAT, CFP-xCT-4F2hc, YFP-xCT-4F2hc, CFP-EGFR, and YFP-EGFR fusion proteins were transiently expressed in HeLa cells.

FRET measurements were based on the sensitized emission method described previously (Gordon *et al.*, 1998; Sorkin *et al.*, 2000) with minor modification for the confocal microscope. A Leica TCS SL laser scanning confocal spectral microscope (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany) equipped with Argon laser, 63x oil immersion objective lens and a double dichroic filter (458/514 nm) was used. We used CFP as the donor fluorochrome paired with YFP, as the acceptor fluorochrome.

To measure FRET, three images were acquired in the same order in all experiments through 1) CFP channel (Abs. 458 nm, Em. 465-510nm), 2) FRET channel (Abs. 458 nm, Em. 525-600 nm) 3) YFP channel (Abs. 514 nm, Em. 525-600 nm). Background was subtracted from images before carrying FRET calculations. Control and

experiment images were taken under the same conditions of photomultiplier gain, offset and pinhole aperture. The cross over of the donor and acceptor fluorescence through the FRET filter is a constant proportion between the fluorescence intensity levels of donor and acceptor and their bleed through.

In order to calculate the spectral bleed through of the donor and acceptor through the FRET filter, images of cells expressing only CFP-b⁰+AT-rBAT, CFP-xCT-4F2hc or CFP-EGFR and cells expressing only YFP- b⁰+AT-rBAT, YFP-xCT-4F2hc or YFP-EGFR were also taken under the same conditions as for the experiments. The fraction of bleed-through of CFP (A) and YFP(B) fluorescence, through the FRET filter channel, was calculated for different experiment conditions. Areas with unusually high or low CFP:YFP ratios (i.e.: outside the 1:1 to 1:4 stoichiometric range) were excluded from analysis.

Corrected FRET was calculated on a pixel by-pixel-basis for the entire image by using equation:

$$(1) \text{ FRET}^C = \text{FRET} - (A \times \text{CFP}) - (B \times \text{YFP}),$$

where FRET, CFP and YFP correspond to background-subtracted images of cells expressing CFP and YFP acquired through the FRET, CFP and YFP channels, respectively. Images of FRET^C intensity are renormalized according to a lookup table where the minimum and maximum values are displayed as blue and red, respectively. Mean FRET^C values were calculated from mean fluorescence intensities for each selected region of interest (ROI) according to equation (1), and normalized sensitized FRET (FRET_N) values for selected subregion of the image

were calculated according to the following equation:

$$(2) \text{ FRET}_N = \text{FRET}^C / (\text{YFP} * \text{CFP})$$

where FRET^C, CFP and YFP are the mean intensities of FRET^C, CFP and YFP fluorescence in the selected subregion of the image. The negative FRET^C values obtained in some experiments are due to slight overestimation of the spectral bleed-through coefficients. All calculations were performed using the Image Processing Leica Confocal Software and Microsoft Excel.

In some experiments, FRET efficiency was calculated using the acceptor photobleaching method. In the presence of FRET, bleaching of the acceptor (YFP) results in a significant increase in fluorescence of the donor (CFP). Half part of the cell was bleached in the YFP channel using the 514 argon laser line at 100% intensity. Before and after the bleach, CFP and YFP images were collected to assess changes in donor and acceptor fluorescence. To minimize the effect of photobleaching due to imaging, images were collected at low laser intensity. The gain of the photomultiplier tubes was adjusted to obtain the best possible dynamic range.

The FRET efficiency was calculated as:

$$E = (I_{\text{post}} - I_{\text{pre}}) * 100 / I_{\text{post}},$$

where I_{pre} is the prebleach CFP intensity and I_{post} is the postbleach CFP intensity in the bleached region. As an internal negative control, an unbleached region in the same cell was measured.

Supplementary Figures

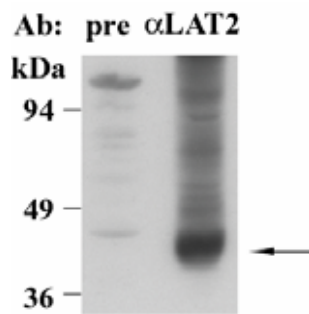


Figure A Preliminary characterization of anti-mouse LAT2 antibody. 50µg of total membranes from mouse kidney were loaded on an SDS-PAGE gel under reducing conditions. Preimmune (pre) and immune (αLAT2) sera were used to decorate the Western Blot, at a 1/100 v/v dilution. The specific band is indicated by the arrow. After this preliminary Western Blot the signal to noise ratio was improved essentially by increasing sera dilution up to 1/1000, which was routinely used for the αLAT2 Western Blots (Figures 1A and 4C on Results).

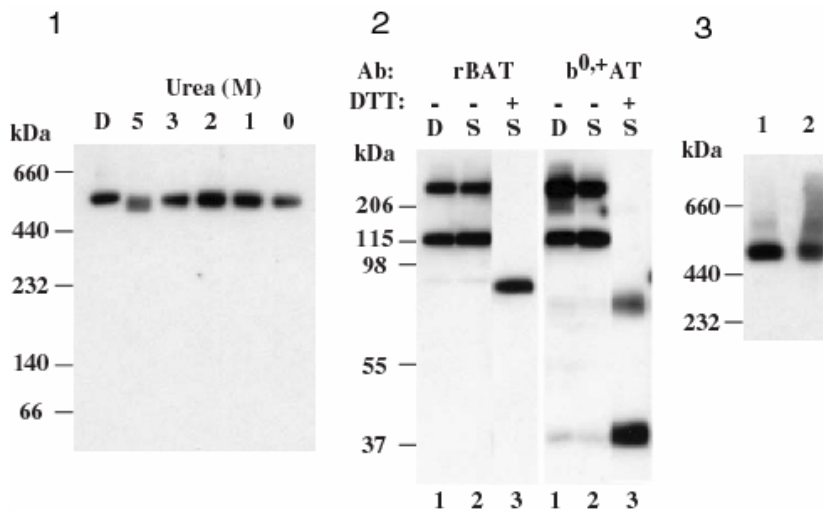


Figure B Blue Native PAGE analysis of the oligomerization of $\alpha b^{0,+}AT$ -rBAT 1. Mouse brush border kidney membranes were solubilized with 1 % digitonin (lane 1) or 0.5 % dodecylmaltoside (lane 1), supplemented with Blue Native buffer and loaded on Blue Native gels. The Western Blot was performed with the $\alpha b^{0,+}AT$ antibody. 2. Mouse brush border kidney membranes were solubilized with 1 % digitonin (D) and further treated with increasing concentrations of urea (0 to 5M) for 30 min. at room temperature. The samples were supplemented with Blue Native buffer and loaded on Blue Native gels. The Western Blot was performed with the $\alpha b^{0,+}AT$ antibody. Notice that only with 5M urea the single band displays a slightly increased mobility. 3. Half the volume of the samples used for Figure 2B were supplemented with SDS-PAGE sample buffer (before the addition of the Blue Native buffer) without DTT, and immediately (i.e. without heating) loaded on a 10 % SDS-PAGE gel. Western Blots were decorated with antibodies against rBAT ($\alpha rBAT$) or $b^{0,+}AT$ ($\alpha b^{0,+}AT$). The order of the lanes is exactly as in Figure 2B.

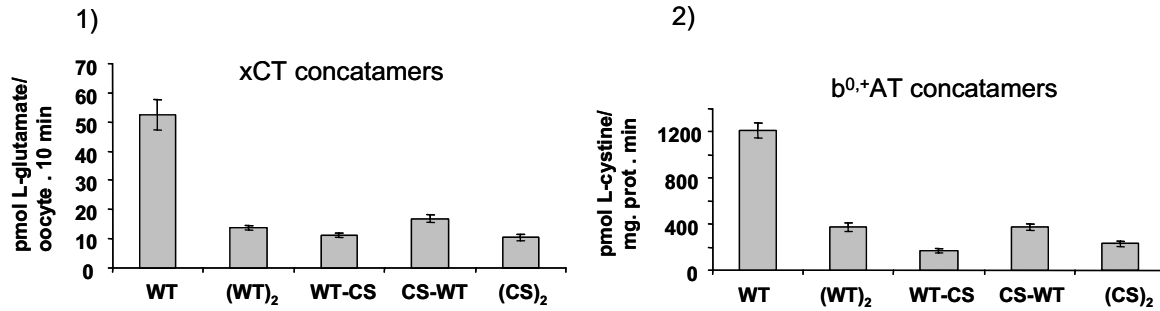


Figure C Transport activity of xCT \approx -xCT and b^{0,+}AT \approx b^{0,+}AT concatamers. 1. *Xenopus* oocytes were injected with 5 ng of wild type xCT or 25 ng of the indicated concatamer cRNAs, together with 5 ng of 4F2hc cRNA. Three days after, transport of 100 μ M L-glutamate was assayed. The induced transport was calculated by subtracting transport in non-injected oocytes. 2. HeLa cells were transfected with the indicated concatamers or with the wild type b^{0,+}AT, together with rBAT. 36 hours later the transport of 20 μ M L-cystine was assayed. The induced transport was calculated by subtracting transport in non-transfected cells. WT: wild type light subunit; CS: Cys to Ser mutant light subunit.

REFERENCES

- Bannai,S. (1986). Exchange of cystine and glutamate across plasma membrane of human fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **261**, 2256-2263.
- Barger,S.W. and Basile,A.S. (2001). Activation of microglia by secreted amyloid precursor protein evokes release of glutamate by cystine exchange and attenuates synaptic function. *Journal of Neurochemistry*, **76**, 846-854.
- Bassi,M.T., Gasol,E., Manzoni,M., Pineda,M., Riboni,M., Martin,R., Zorzano,A., Borsani,G., and Palacin,M. (2001). Identification and characterisation of human xCT that co-expresses, with 4F2 heavy chain, the amino acid transport activity system xc-. *Pflugers Arch.*, **442**, 286-296.
- Bauch,C., Forster,N., Loffing-Cueni,D., Summa,V., and Verrey,F. (2003). Functional cooperation of epithelial heteromeric amino acid transporters expressed in madin-darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.*, **278**, 1316-1322.
- Bauch,C. and Verrey,F. (2002). Apical heterodimeric cystine and cationic amino acid transporter expressed in MDCK cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, **283**, F181-F189.
- Bertran,J., Werner,A., Moore,M.L., Stange,G., Markovich,D., Biber,J., Testar,X., Zorzano,A., Palacin,M., and Murer,H. (1992). Expression Cloning of a cDNA from Rabbit Kidney Cortex that Induces a Single Transport System for Cystine and Dibasic and Neutral Amino Acids. *PNAS*, **89**, 5601-5605.
- Borsani,G., Bassi,M.T., Sperandeo,M.P., De Grandi,A., Buoninconti,A., Riboni,M., Manzoni,M., Incerti,B., Pepe,A., Andria,G., Ballabio,A., and Sebastio,G. (1999). SLC7A7, encoding a putative permease-related protein, is mutated in patients with lysinuric protein intolerance. *Nat Genet*, **21**, 297-301.
- Calonge,M.J., Gasparini,P., Chillaron,J., Chillon,M., Gallucci,M., Rousaud,F., Zelante,L., Testar,X., Dallapiccola,B., Di Silverio,F., Barcelo,P., Estivill,X., Zorzano,A., Nunes,V., and Palacin,M. (1994). Cystinuria caused by mutations in rBAT, a gene involved in the transport of cystine. *Nat Genet*, **6**, 420-425.
- Chillaron,J., Roca,R., Valencia,A., Zorzano,A., and Palacin,M. (2001). Heteromeric amino acid transporters: biochemistry, genetics, and physiology. *Am J Physiol Renal Physiol*, **281**, F995-1018.
- Coady,M.J., Chen,X.Z., and Lapointe,J.Y. (1996). rBAT is an amino acid exchanger with variable stoichiometry. *J Membr. Biol.*, **149**, 1-8.
- Deutsch,C. (2002). POTASSIUM CHANNEL ONTOGENY. *Annual Review of Physiology*, **64**, 19-46.
- Estevez,R., Camps,M., Rojas,A.M., Testar,X., Deves,R., Hediger,M.A., Zorzano,A., and Palacin,M. (1998). The amino acid transport system y⁺L/4F2hc is a heteromultimeric complex. *FASEB J.*, **12**, 1319-1329.

Resultados- Artículo 4

13. Feliubadalo,L., Font,M., Purroy,J., Rousaud,F., Estivill,X., Nunes,V., Golomb,E., Centola,M., Aksentijevich,I., Kreiss,Y., Goldman,B., Pras,M., Kastner,D.L., Pras,E., Gasparini,P., Bisceglia,L., Beccia,E., Gallucci,M., de Sanctis,L., Ponzone,A., Rizzoni,G.F., Zelante,L., Bassi,M.T., George,A.L., Jr., Palacin,M., and . (1999). Non-type I cystinuria caused by mutations in SLC7A9, encoding a subunit (bo,+AT) of rBAT. *International Cystinuria Consortium. Nat. Genet.*, **23**, 52-57.
14. Feliubadalo,L., Arbones,M.L., Manas,S., Chillaron,J., Visa,J., Rodes,M., Rousaud,F., Zorzano,A., Palacin,M., and Nunes,V. (2003). Slc7a9-deficient mice develop cystinuria non-I and cystine urolithiasis. *Hum. Mol. Genet.*, **12**, 2097-2108.
15. Fernandez,E., Carrascal,M., Rousaud,F., Abian,J., Zorzano,A., Palacin,M., and Chillaron,J. (2002). rBAT-b(0+)AT heterodimer is the main apical reabsorption system for cystine in the kidney. *Am. J. Physiol Renal Physiol*, **283**, F540-F548.
16. Fernandez,E., Torrents,D., Chillaron,J., Martin,D.R., Zorzano,A., and Palacin,M. (2003). Basolateral LAT-2 has a major role in the transepithelial flux of L-cystine in the renal proximal tubule cell line OK. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **14**, 837-847.
17. Font,M.A., Feliubadalo,L., Estivill,X., Nunes,V., Golomb,E., Kreiss,Y., Pras,E., Bisceglia,L., d'Adamo,A.P., Zelante,L., Gasparini,P., Bassi,M.T., George,A.L., Jr., Manzoni,M., Riboni,M., Ballabio,A., Borsani,G., Reig,N., Fernandez,E., Zorzano,A., Bertran,J., and Palacin,M. (2001). Functional analysis of mutations in SLC7A9, and genotype-phenotype correlation in non-Type I cystinuria. *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 305-316.
18. Fukasawa,Y., Segawa,H., Kim,J.Y., Chairoungdua,A., Kim,D.K., Matsuo,H., Cha,S.H., Endou,H., and Kanai,Y. (2000). Identification and Characterization of a Na⁺-independent Neutral Amino Acid Transporter That Associates with the 4F2 Heavy Chain and Exhibits Substrate Selectivity for Small Neutral D- and L-Amino Acids. *J. Biol. Chem.*, **275**, 9690-9698.
19. Furriols,M., Chillaron,J., Mora,C., Castello,A., Bertran,J., Camps,M., Testar,X., Vilaro,S., Zorzano,A., and Palacin,M. (1993). rBAT, related to L-cysteine transport, is localized to the microvilli of proximal straight tubules, and its expression is regulated in kidney by development. *J Biol. Chem.*, **268**, 27060-27068.
20. Gasol,E., Jimenez-Vidal,M., Chillaron,J., Zorzano,A., and Palacin,M. (2004). Membrane topology of system xc⁻ light subunit reveals a re-entrant loop with substrate-restricted accessibility. *J. Biol. Chem.*, **279**, 31228-31236.
21. Gendreau,S., Voswinkel,S., Torres-Salazar,D., Lang,N., Heidtmann,H., Detro-Dassen,S., Schmalzing,G., Hidalgo,P., and Fahlke,C. (2004). A Trimeric Quaternary Structure Is Conserved in Bacterial and Human Glutamate Transporters. *J. Biol. Chem.*, **279**, 39505-39512.
22. Gerchman,Y., Rimon,A., Venturi,M., and Padan,E. (2001). Oligomerization of NhaA, the Na⁺/H⁺ antiporter of *Escherichia coli* in the membrane and its functional and structural consequences. *Biochemistry*, **40**, 3403-3412.
23. Gordon,G.W., Berry,G., Liang,X.H., Levine,B., and Herman,B. (1998). Quantitative Fluorescence Resonance Energy Transfer Measurements Using Fluorescence Microscopy. *Biophys. J.*, **74**, 2702-2713.
24. Herrick-Davis,K., Grinde,E., and Mazurkiewicz,J.E. (2004). Biochemical and biophysical characterization of serotonin 5-HT_{2C} receptor homodimers on the plasma membrane of living cells. *Biochemistry*, **43**, 13963-13971.
25. Heuberger,E.H.M.L., Veenhoff,L.M., Duurkens,R.H., Friesen,R.H.E., and Poolman,B. (2002). Oligomeric state of membrane transport proteins analyzed with blue native electrophoresis and analytical ultracentrifugation1. *Journal of Molecular Biology*, **317**, 591-600.
26. Horiuchi,M., Nicke,A., Gomeza,J., Aschrafi,A., Schmalzing,G., and Betz,H. (2001). Surface-localized glycine transporters 1 and 2 function as monomeric proteins in *Xenopus* oocytes. *PNAS*, **98**, 1448-1453.
27. Jimenez-Vidal,M., Gasol,E., Zorzano,A., Nunes,V., Palacin,M., and Chillaron,J. (2004). Thiol Modification of Cysteine 327 in the Eighth Transmembrane Domain of the Light Subunit xCT of the Heteromeric Cystine/Glutamate Antiporter Suggests Close Proximity to the Substrate Binding Site/Permeation Pathway. *J. Biol. Chem.*, **279**, 11214-11221.
28. Kunji,E.R.S. (2004). The role and structure of mitochondrial carriers. *FEBS Letters*, **564**, 239-244.
29. Liu,S.C., Palek,J., Yi,S.J., Nichols,P.E., Derick,L.H., Chiou,S.S., Amato,D., Corbett,J.D., Cho,M.R., and Golan,D.E. (1995). Molecular basis of altered red blood cell membrane properties in Southeast Asian ovalocytosis: role of the mutant band 3 protein in band 3 oligomerization and retention by the membrane skeleton. *Blood*, **86**, 349-358.

30. Mackinnon,R. (1991). Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature*, **350**, 232-235.
31. Meisinger,C., Ryan,M.T., Hill,K., Model,K., Lim,J.H., Sickmann,A., Muller,H., Meyer,H.E., Wagner,R., and Pfanner,N. (2001). Protein Import Channel of the Outer Mitochondrial Membrane: a Highly Stable Tom40-Tom22 Core Structure Differentially Interacts with Preproteins, Small Tom Proteins, and Import Receptors. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 2337-2348.
32. Nicke,A., Baumert,H.G., Rettinger,J., Eichele,A., Lambrecht,G., Mutschler,E., and Schmalzing,G. (1998). P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J*, **17**, 3016-3028.
33. Palacin,M. and Kanai,Y. (2004). The ancillary proteins of HATs: SLC3 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch.*, **447**, 490-494.
34. Pfeiffer,R., Rossier,G., Spindler,B., Meier,C., Kuhn,L., and Verrey,F. (1999a). Amino acid transport of y+L-type by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of the glycoprotein-associated amino acid transporter family. *EMBO J*, **18**, 49-57.
35. Pfeiffer,R., Loffing,J., Rossier,G., Bauch,C., Meier,C., Eggermann,T., Loffing-Cueni,D., Kuhn,L.C., and Verrey,F. (1999b). Luminal Heterodimeric Amino Acid Transporter Defective in Cystinuria. *Mol. Biol. Cell*, **10**, 4135-4147.
36. Pineda,M., Fernandez,E., Torrents,D., Estevez,R., Lopez,C., Camps,M., Lloberas,J., Zorzano,A., and Palacin,M. (1999). Identification of a membrane protein, LAT-2, that Co-expresses with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transport activity with broad specificity for small and large zwitterionic amino acids. *J. Biol. Chem.*, **274**, 19738-19744.
37. Pineda,M., Wagner,C.A., Broer,A., Stehberger,P.A., Kaltenbach,S., Gelpi,J.L., Martin,D.R., Zorzano,A., Palacin,M., Lang,F., and Broer,S. (2004). Cystinuria-specific rBAT(R365W) mutation reveals two translocation pathways in the amino acid transporter rBAT-b⁰+AT. *Biochem. J.*, **377**, 665-674.
38. Pras,E., Arber,N., Aksentijevich,I., Katz,G., Schapiro,J.M., Prosen,L., Gruberg,L., Harel,D., Liberman,U., Weissenbach,J., Pras,M., and Kastner,D.L. (1994). Localization of a gene causing cystinuria to chromosome 2p. *Nat Genet*, **6**, 415-419.
39. Reig,N., Chillaron,J., Bartoccioni,P., Fernandez,E., Bendahan,A., Zorzano,A., Kanner,B., Palacin,M., and Bertran,J. (2002). The light subunit of system b(o,+) is fully functional in the absence of the heavy subunit. *EMBO J.*, **21**, 4906-4914.
40. Rossier,G., Meier,C., Bauch,C., Summa,V., Sordat,B., Verrey,F., and Kuhn,L.C. (1999). LAT2, a New Basolateral 4F2hc/CD98-associated Amino Acid Transporter of Kidney and Intestine. *J. Biol. Chem.*, **274**, 34948-34954.
41. Sasaki,H., Sato,H., Kuriyama-Matsumura,K., Sato,K., Maebara,K., Wang,H., Tamba,M., Itoh,K., Yamamoto,M., and Bannai,S. (2002). Electrophile response element-mediated induction of the cystine/glutamate exchange transporter gene expression. *J. Biol. Chem.*, **277**, 44765-44771.
42. Sato,H., Tamba,M., Okuno,S., Sato,K., Keino-Masu,K., Masu,M., and Bannai,S. (2002). Distribution of cystine/glutamate exchange transporter, system x(c)-, in the mouse brain. *J. Neurosci.*, **22**, 8028-8033.
43. Sato,H., Tamba,M., Ishii,T., and Bannai,S. (1999). Cloning and Expression of a Plasma Membrane Cystine/Glutamate Exchange Transporter Composed of Two Distinct Proteins. *J. Biol. Chem.*, **274**, 11455-11458.
44. Schagger,H., Cramer,W.A., and von Jagow,G. (1994). Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.*, **217**, 220-230.
45. Schagger,H. and von Jagow,G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.*, **199**, 223-231.
46. Schmid,J.A., Scholze,P., Kudlacek,O., Freissmuth,M., Singer,E.A., and Sitte,H.H. (2001). Oligomerization of the Human Serotonin Transporter and of the Rat GABA Transporter 1 Visualized by Fluorescence Resonance Energy Transfer Microscopy in Living Cells. *J. Biol. Chem.*, **276**, 3805-3810.
47. Scholze,P., Freissmuth,M., and Sitte,H.H. (2002). Mutations within an Intramembrane Leucine Heptad Repeat Disrupt Oligomer Formation of the Rat GABA Transporter 1. *J. Biol. Chem.*, **277**, 43682-43690.
48. Schroers,A., Burkovski,A., Wohlrab,H., and Kramer,R. (1998). The Phosphate Carrier from Yeast Mitochondria. DIMERIZATION IS A PREREQUISITE FOR FUNCTION. *J. Biol. Chem.*, **273**, 14269-14276.
49. Sorkin,A., McClure,M., Huang,F., and Carter,R. (2000). Interaction of EGF receptor and Grb2 in living cells visualized by fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy. *Current Biology*, **10**, 1395-1398.

Resultados- Artículo 4

50. Sorkina,T., Doolen,S., Galperin,E., Zahniser,N.R., and Sorkin,A. (2003). Oligomerization of Dopamine Transporters Visualized in Living Cells by Fluorescence Resonance Energy Transfer Microscopy. *J. Biol. Chem.*, **278**, 28274-28283.
51. Tate,S.S., Yan,N., and Udenfriend,S. (1992). Expression Cloning of a Na⁺-Independent Neutral Amino Acid Transporter from Rat Kidney. *PNAS*, **89**, 1-5.
52. Torras-Llort,M., Torrents,D., Soriano-Garcia,J.F., Gelpi,J.L., Estevez,R., Ferrer,R., Palacin,M., and Moreto,M. (2001). Sequential amino acid exchange across b^(0,+)-like system in chicken brush border jejunum. *J Membr. Biol.*, **180**, 213-220.
53. Torrents,D., Mykkanen,J., Pineda,M., Feliubadalo,L., Estevez,R., de Cid,R., Sanjurjo,P., Zorzano,A., Nunes,V., Huoponen,K., Reinikainen,A., Simell,O., Savontaus,M.L., Aula,P., and Palacin,M. (1999). Identification of SLC7A7, encoding y+LAT-1, as the lysinuric protein intolerance gene. *Nat. Genet.*, **21**, 293-296.
54. Torrents,D., Estevez,R., Pineda,M., Fernandez,E., Lloberas,J., Shi,Y.B., Zorzano,A., and Palacin,M. (1998). Identification and Characterization of a Membrane Protein (y+L Amino Acid Transporter-1) That Associates with 4F2hc to Encode the Amino Acid Transport Activity y+L. A CANDIDATE GENE FOR LYSINURIC PROTEIN INTOLERANCE. *J. Biol. Chem.*, **273**, 32437-32445.
55. Uchino,H., Kanai,Y., Kim,d.K., Wempe,M.F., Chairoungdua,A., Morimoto,E., Anders,M.W., and Endou,H. (2002). Transport of amino acid-related compounds mediated by L-type amino acid transporter 1 (LAT1): insights into the mechanisms of substrate recognition. *Mol. Pharmacol.*, **61**, 729-737.
56. Veenhoff,L.M., Heuberger,E.H., and Poolman,B. (2001). The lactose transport protein is a cooperative dimer with two sugar translocation pathways. *EMBO J*, **20**, 3056-3062.
57. Veenhoff,L.M., Heuberger,E.H.M.L., and Poolman,B. (2002). Quaternary structure and function of transport proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, **27**, 242-249.
58. Verrey,F., Closs,E.I., Wagner,C.A., Palacin,M., Endou,H., and Kanai,Y. (2003). CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch.*
59. Wang,K.W. and Goldstein,S.A. (1995). Subunit composition of minK potassium channels. *Neuron*, **14**, 1303-1309.
60. Wang,S., Yue,H., Derin,R.B., Guggino,W.B., and Li,M. (2000). Accessory protein facilitated CFTR-CFTR interaction, a molecular mechanism to potentiate the chloride channel activity. *Cell*, **103**, 169-179.
61. Wells,R.G. and Hediger,M.A. (1992). Cloning of a Rat Kidney cDNA that Stimulates Dibasic and Neutral Amino Acid Transport and has Sequence Similarity to Glucosidases. *PNAS*, **89**, 5596-5600.
62. Ye,Z.C., Rothstein,J.D., and Sontheimer,H. (1999). Compromised Glutamate Transport in Human Glioma Cells: Reduction-Mislocalization of Sodium-Dependent Glutamate Transporters and Enhanced Activity of Cystine-Glutamate Exchange. *J. Neurosci.*, **19**, 10767-10777.
63. Zottola,R.J., Cloherty,E.K., Coderre,P.E., Hansen,A., Hebert,D.N., and Carruthers,A. (1995). Glucose transporter function is controlled by transporter oligomeric structure. A single, intramolecular disulfide promotes GLUT1 tetramerization. *Biochemistry*, **34**, 9734-9747.

Thiol Modification of Cysteine 327 in the Eighth Transmembrane Domain of the Light Subunit xCT of the Heteromeric Cystine/Glutamate Antiporter Suggests Close Proximity to the Substrate Binding Site/Permeation Pathway*

Received for publication, September 5, 2003, and in revised form, January 8, 2004
Published, JBC Papers in Press, January 13, 2004, DOI 10.1074/jbc.M309866200

Maite Jiménez-Vidal^{‡§¶}, Emma Gasol^{‡||}, Antonio Zorzano[‡], Virginia Nunes[§], Manuel Palacín^{‡***‡‡}, and Josep Chillarón^{‡***§§}

From the [‡]Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, and the Barcelona Science Park, University of Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain and the [§]Medical and Molecular Genetics Center, Institut de Recerca Oncològica, L'Hospitalet de Llobregat, E-08028 Barcelona, Spain

We measured sensitivity to thiol modification of the heteromeric glutamate/cystine transporter 4F2hc-xCT expressed in *Xenopus* oocytes. *p*-Chloromercuribenzoate (pCMB) and *p*-chloromercuribenzenesulfonate (pCMBS) rapidly blocked transport activity. Cys³²⁷, located in the middle of the eighth transmembrane domain of the light subunit (xCT), was found to be the main target of inactivation. Cysteine, an impermeant reducing reagent, reversed pCMB and pCMBS effects only when applied from the extracellular medium. L-Glutamate and L-cystine, but not L-arginine, protected from the inactivation with an IC₅₀ similar to the K_m. Protection was not temperature-dependent, suggesting that it did not depend on large substrate-induced conformational changes. Mutation of Cys³²⁷ to Ala and Ser slightly modified the K_m and a C327L mutant abolished transport function without compromising transporter expression at the plasma membrane. The results indicate that Cys³²⁷ is a functionally important residue accessible to the aqueous extracellular environment and is structurally linked to the permeation pathway and/or the substrate binding site.

Heteromeric amino acid transporters (HATs)¹ are composed of a heavy subunit and a light subunit (LSHAT) linked by a

* This study was supported in part by the Spanish Ministry of Science and Technology (PM99-017-CO-01/02 and SAF2003-08940 to M. P. and V. N.), the Institut de Salut Carlos III (Networks C3/08P to M. P., G03/054 to M. P. and V. N., and C03/07 to V. N.), and the Comissionat per a Universitats i Recerca (to M. P.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¶ Supported by BIOMED Grant BMH4 CT98-3514.

|| Recipient of a pre-doctoral fellowship from the Spanish Ministry of Education and Culture.

** These authors share lead authorship.

‡‡ To whom correspondence may be addressed: Barcelona Science Park, Josep Samitier 1-5, 08028 Barcelona, Spain. Tel.: 34-934034617; Fax 34-934021559; E-mail: mpalacin@bio.ub.es.

§§ A researcher from the Programa Ramón y Cajal of the Spanish Ministry of Science and Technology. To whom correspondence may be addressed: Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, New Bldg., Faculty of Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal 645, E-08028 Barcelona, Spain. Tel.: 34-934034700; Fax: 34-934034717; E-mail: chillaro@worldonline.es.

¹ The abbreviations used are: HAT, heteromeric amino acid transporter; LSHAT, HAT light subunit; pCMB, *p*-chloromercuribenzoate; pCMBS, *p*-chloromercuribenzenesulfonate; NEM, *N*-ethylmaleimide; MTS, methanethiosulfonate; APC, amino acid/polyamine/organic cation; APA, basic amino acid/polyamine antiporter; GABP, *E. coli* γ -aminobutyric acid permease.

conserved disulfide bridge (1, 2). The heavy subunit is important for trafficking of the heterodimer to the plasma membrane, whereas the light subunit confers transport function and specificity (3, 4). Two heavy subunits are known, 4F2hc and rBAT (1, 2). The light subunit xCT bound to 4F2hc elicits sodium-independent transport of anionic L-cystine and L-glutamate by a 1:1 obligatory exchange (system x_c⁻) (5, 6). xCT is expressed in most cell lines, in activated macrophages, and in the brain (5, 7). System x_c⁻ functions physiologically for cystine uptake and glutamate efflux because of the low and high intracellular concentrations of cystine and glutamate, respectively. Cytosolic cystine concentrations are kept very low because of its rapid reduction to cysteine, the main source for the synthesis of intracellular glutathione. Indeed, transport of cystine and its intracellular reduction to cysteine are the rate-limiting steps in glutathione biosynthesis (5, 8). This is consistent with the known regulation of xCT; its mRNA and x_c⁻ activity are induced by lipopolysaccharide in macrophages, and this induction is modulated by the ambient oxygen concentration (*i.e.* hypoxia decreases xCT expression and activity) (9). Moreover, the xCT gene carries an electrophil-response element that may mediate some of these effects (10). The authors concluded that xCT provides an antioxidant defense for these cells, especially in regions of inflammation. In the brain, the localization of xCT suggests that it contributes to the maintenance of the redox state in the cerebrospinal fluid (7).

Little is known about the structure-function relationships of the HAT family. Reconstitution studies with the b^{0,+}AT light subunit have shown that the rBAT heavy subunit is not necessary for the basic transport function (4). The relevant functional determinants should lie on the LSHATs. The topology of LSHATs has not been tested experimentally but is believed to adopt the classic model of 12-transmembrane domains. An approximation to the substrate binding site of LAT1 has been proposed based on substrate specificity and semi-empirical computational analysis (11, 12). Recently, Boado *et al.* (13) reported a naturally occurring interspecific change (W234L) that slightly modified LAT1 K_m. Finally, the y⁺LAT1 L334R mutant found in lysinuric protein-intolerant patients inactivates transport as does the cystinuria mutation, A354T in b^{0,+}AT (4, 14).

Here we report that Cys³²⁷ in transmembrane domain 8 of the xCT light subunit is the target for transport inactivation caused by organic mercury compounds. We provide evidence that this residue may be closely linked to the substrate permeation pathway. To our knowledge, this is the first report to provide significant experimental insight into the structure-

function of the LSHATs as well as a framework for a systematic study (15) of this family.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Site-directed Mutagenesis—Construction of human 4F2hc Cysless has been described elsewhere (16). The human xCT in pNKS2 was used as the template for site-directed mutagenesis (QuikChange™, Stratagene). A Cysless xCT was engineered by replacing the seven endogenous cysteine residues with serine. The mutated regions were excised by digestion with the appropriate restriction enzymes and subcloned back into the original plasmid. At position 327, cysteine was also mutated to Ala, Leu, and Thr, and the mutated region was then subcloned into N-terminally Myc-tagged human xCT (in pNKS2) with the appropriate restriction enzymes. Cysteine 327 was reintroduced into Cysless xCT by restriction enzyme digestion and subcloning into the Cysless construct. Mutations were confirmed by DNA sequencing. Sequencing was performed on both strands with a d-Rhodamine dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PerkinElmer Life Sciences). The sequence reactions were analyzed with an Abi Prism 377 DNA sequencer.

cRNA Preparation and Microinjection into *Xenopus* Oocytes—Synthesis of human wild type and Cysless 4F2hc cRNAs has been described elsewhere (16). *In vitro* synthesis of human xCT construct cRNAs was conducted with the NotI-linearized plasmid template using the protocol provided by Ambion (mMessage mMACHINE, Ambion, Austin, TX). The quality and the amount of transcribed RNA were checked by gel inspection and 260 nm absorbance before microinjection into *Xenopus* oocytes. The procedure for *Xenopus* oocyte isolation and the microinjection technique are described elsewhere (17). Defolliculated stage VI *Xenopus laevis* oocytes were injected with 50 nl of human 4F2hc and human xCT constructs alone or in combination (10 ng/oocyte).

Transport Measurement—Influx rates of L-[³H]glutamate (American Radiolabeled Chemicals) and L-[³⁵S]cystine (Amersham Biosciences) were measured at 1 μCi/μl in 100 mM choline-Cl medium 2 or 3 days after injection and under linear conditions as described elsewhere (6). Amino acid transport rates obtained with oocytes injected with water (50 nl) were similar to those of noninjected oocytes (data not shown). Results for transport experiments are given as mean ± S.E. for 6–8 individual oocytes. For the determination of the kinetic parameters of the different human xCT Cys³²⁷ mutants, the oocytes were incubated with different concentrations of L-glutamate (5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 μM, 1 and 2 mM). V_{max} and K_m values were derived by the Michaelis-Menten equation using GraphPad Prism. Each experiment was performed at least twice on different batches of oocytes. Nonradioactive amino acids and chemicals were purchased from Sigma.

Determination of the Effect of Sulfhydryl Reagents—Oocytes were incubated for 5 min at room temperature with choline-Cl medium containing 1 mM *p*-chloromercuribenzoate (pCMB), 1 mM *p*-chloromercuribenzenesulfonate (pCMBS), 5 mM *N*-ethylmaleimide (NEM), 1 mM [2-(trimethylammonium)ethyl] methanethiosulfonate (MTSET), 2.5 mM 2-aminoethyl methanethiosulfonate (MTSEA), 10 mM 2-sulfonatethyl methanethiosulfonate (MTSES), 1 mM [4-(*N*-maleimido)benzyl] trimethylammonium (MBTA), 1 mM iodoacetamide, or 1 mM mersalyl acid and washed three times in choline-Cl medium. Subsequently transport of L-[³H]glutamate or L-[³⁵S]cystine was assayed. To test whether methanethiosulfonate (MTS) reagents, iodoacetamide, NEM, and mersalyl acid reached the human xCT 327 cysteine, a second incubation was performed with 1 mM pCMB for 5 min before uptake measurement. For the protection assays, 2 mM L-glutamate, 2 mM L-arginine, or 300 μM L-cystine was added to the choline-Cl medium with pCMB or pCMBS and incubated at room temperature for 10 min (if not otherwise indicated on the figure). For some experiments different concentrations of unlabeled L-glutamate (5, 10, 25, 50, 100, 250, or 500 μM or 1 or 2 mM) or L-cystine (6, 15, 30, 60, 90, 150, or 300 μM) were included along with 50 μM pCMB during the 10-min preincubation step. For protection experiments at 4 °C, the preincubation step was done at 4 °C at the times indicated on Fig. 4. Then, oocytes were washed three times at room temperature in choline-Cl medium to remove unbound sulfhydryl reagent and amino acids. Transport was then measured as described above. In reactivation experiments, following incubation with the sulfhydryl reagents, either 10 mM free cysteine or 5 mM β-mercaptoethanol was added to the medium for 5, 10, and 20 min. At the end of the incubation, the oocytes were washed three times in choline-Cl medium, and transport was then measured as described above. The MTS reagents and pCMBS were purchased from Toronto Research Chemicals, Inc. pCMB, mersalyl acid, iodoacetamide, and NEM were purchased from Sigma. Each of the sulfhydryl reagents was dissolved as a 1 M

stock solution (MTS reagents, NEM, and iodoacetamide) or as a 100 mM stock solution (pCMB and pCMBS) in Me₂SO. After dilution in choline-Cl medium to the final concentration, the reagents were used immediately.

Immunofluorescence Microscopy—Groups of five oocytes were prepared for immunofluorescence 3 days after injection with 10 ng of human 4F2hc, *N*-myc-human xCT wild type, or Cys³²⁷ mutant cRNA/oocyte, alone or in combination. Oocytes were placed in 500-mm³ cryomolds (Tissue-Tek, Miles, Elkhart, IN) and then sliced, fixed, and permeabilized as described elsewhere (16). Slices were incubated with monoclonal antibody 9E10 anti-Myc (ATCC, Manassas, VA), diluted 1:500 in 10% phosphate-buffered saline, at room temperature for 1 h. Slices were washed three times in phosphate-buffered saline, incubated with 7.5 μg/ml Texas Red-conjugated goat anti-mouse (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) at room temperature for 1 h, washed three times in phosphate-buffered saline, and mounted in Immunofluore (ICN, Madrid, Spain).

Data Analysis—Nonlinear regression fits of experimental and calculated data were performed with GraphPad Prism. The half-life times ($t_{1/2}$) and IC₅₀ values were determined by plotting the fraction of uptake remaining ($F = \text{uptake after/uptake before}$) as a function of the concentration or time of incubation of the reagent and then fitted to a nonlinear regression equation for one-phase exponential decay ($F = F_{max} \times e^{(-Kc \times t)} + F_{min}$ or $F = F_{max} \times e^{(-Kt \times c)} + F_{min}$) where t is the incubation time in seconds, c is the concentration of reagent, and K_c and K_t are the pseudo first-order rate constants (when concentration or time were fixed, respectively). IC₅₀ values were calculated as $0.6932/K_c$ and $t_{1/2}$ as $0.6932/K_t$. F_{min} was set to zero, as both pCMB and pCMBS completely inhibited transport. In Fig. 3C, a nonlinear regression fit to a one-site binding (hyperbola) curve determined the IC₅₀ values.

RESULTS

We have started a systematic approach (15) to the study of the structure-function relationships of the light subunits of the HAT family. The xCT light subunit was chosen as a model because of (i) its high activity in the oocyte expression system (5, 6); (ii) its narrow substrate selectivity (*i.e.* glutamate and cystine); and (iii) its sensitivity to organic mercurials (as shown by preliminary experiments; see below and Fig. 1).

The 4F2hc-xCT Heterodimer Is Inactivated by Mercurial Reagents—We tested the ability of pCMB and its impermeant derivative pCMBS to modify the transport elicited by the 4F2hc-xCT heterodimer in *Xenopus* oocytes. Both reagents completely inhibited glutamate transport in a dose-dependent manner with fast kinetics (at 1 min of incubation, the IC₅₀ values were 75.5 ± 11.2 μM for pCMB and 300.4 ± 89.7 μM for pCMBS; see also Figs. 3A and 4). The permeable reducing reagent β-mercaptoethanol completely reversed the inhibition when applied for 10 min at 5 mM, verifying that a cysteine(s) residue was the target of mercury compounds (data not shown). The impermeant reagent cysteine (10 mM for 10 min) also reversed the inhibition ($49.7 \pm 13.5\%$ of control value). The spontaneous reactivation was negligible for 10 min (data not shown).

Cys³²⁷ in Transmembrane Domain 8 Is the Main Target for pCMB and pCMBS Transport Inactivation—We next examined which subunit carried the targeted cysteine(s). 4F2hc has two cysteines, one (Cys¹⁰⁹) forming a disulfide bond with the xCT light subunit (Fig. 1). Early studies reported that 4F2hc cysteines are not essential for transport activity (16, 18). The expression of xCT together with 4F2hc without cysteines (Cysless 4F2hc) did not severely affect transport function (Fig. 1). pCMB and pCMBS fully inhibited glutamate transport, indicating that the target cysteine(s) was located in xCT. The seven endogenous cysteines of xCT (Fig. 2A) were mutated to serine in different combinations and transport activity, and pCMB/pCMBS reactivity was assayed. As shown in Fig. 2B, 100 μM L-glutamate uptake was relatively unaffected by the mutations, indicating that neither of the cysteines was essential *per se* for function. Strikingly, only C327S completely lost sensitivity to both pCMB and pCMBS, suggesting that this cysteine

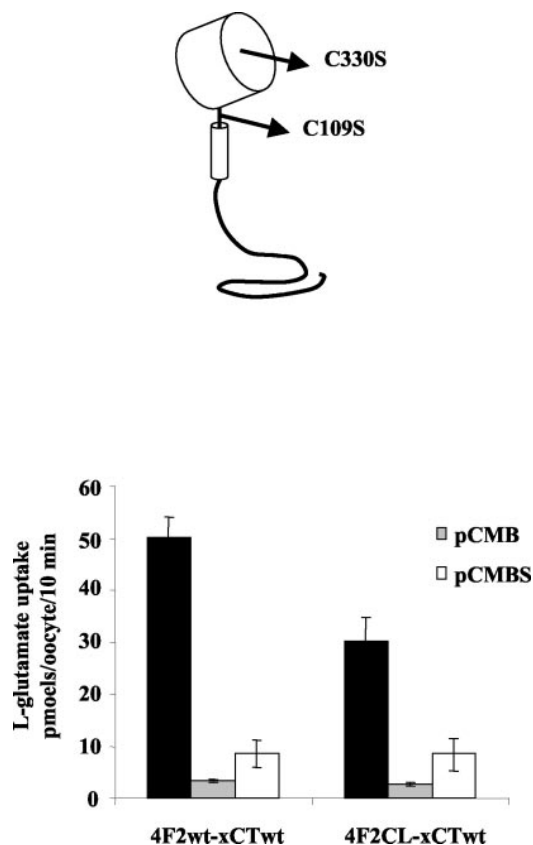


FIG. 1. The xCT light subunit of the 4F2hc-xCT heteromeric transporter confers sensitivity to the mercury compounds pCMB and pCMBS. Oocytes were injected with the xCT cRNA together with the 4F2hc wild type cRNA or Cysless 4F2hc (4F2CL). The top panel depicts the intracellular N terminus, the transmembrane domain (smaller cylinder), and the extracellular domain (larger cylinder) of 4F2hc with the location of the replaced cysteines. After 3 days the oocytes were preincubated with pCMB, pCMBS, or vehicle prior to assay L-glutamate uptake as stated under "Experimental Procedures." A representative experiment is shown.

was the main target of the reagents. The result was confirmed by generating a Cysless form of the xCT (Cysless xCT) and reintroducing Cys³²⁷ (Cysless-C327) in this background (Fig. 2C). The Cysless xCT was 10–20% active compared with the wild type (which is enough for functional studies, given the high transport activity of the wild type). As expected, Cysless-C327, but not Cysless, was sensitive to both pCMB and pCMBS. We concluded that Cys³²⁷ is the main target of pCMB and pCMBS.

Topology predictions for xCT with a variety of different computer algorithms locate Cys³²⁷ in the middle of transmembrane domain 8 (2, 5) (Fig. 2A). Results from our group using the 3-(*N*-maleimidylpropionyl)biocytin labeling procedure (19) show that the preceding loop is extracellular, whereas the next loop is intracellular.² Despite transmembrane localization, the sensitivity of Cys³²⁷ to the impermeant reagents pCMBS and cysteine indicate that it is accessible to the extracellular aqueous environment.

Cys³²⁷ Is Located in a Structurally Restricted Environment—The effect of other cysteine-specific reagents (MTS reagents, NEM, iodoacetamide, ([4-(*N*-maleimido)benzyl] trimethylammonium, and mersalyl acid; see "Experimental Procedures") was tested. At the concentrations used, none of them inhibited 4F2hc-xCT L-glutamate uptake even when this amino acid was present with the reagent during the preincubation time (data

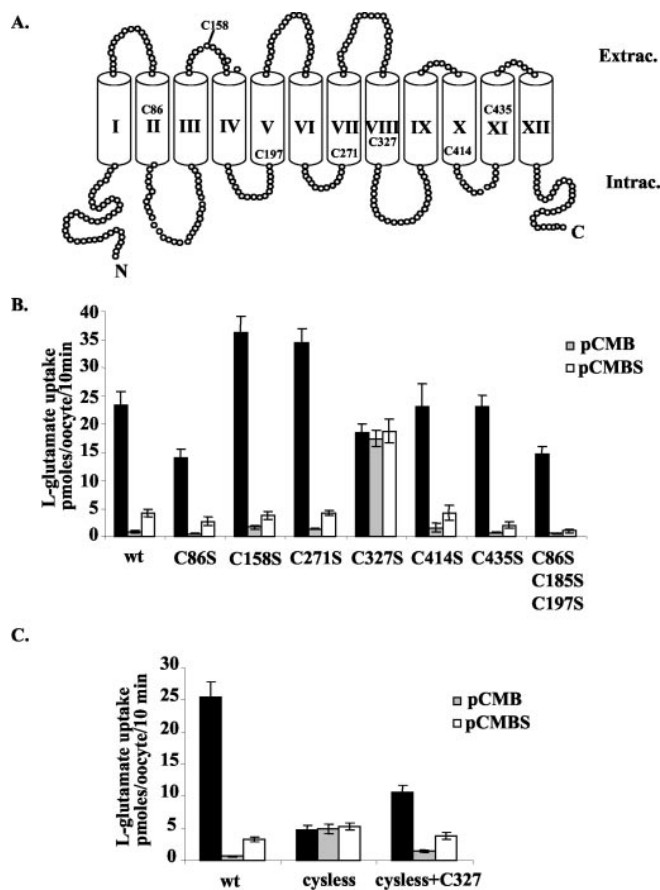


FIG. 2. The xCT residue Cys³²⁷ is the target for transport inactivation by pCMB and pCMBS. A, the predicted topological model for the xCT transporter. The protein has 12 transmembrane domains with intracellular N and C termini. Location of the seven endogenous cysteines is shown. B, different Cys to Ser substitutions were generated in a wild type xCT background. xCT cRNAs were injected together with 4F2hc cRNA. L-glutamate uptake was tested after preincubation with pCMB, pCMBS, or vehicle, as described in the legend to Fig. 1. A representative experiment is shown. The results from another independent experiment are similar. C, an xCT devoid of cysteines was constructed (Cysless), and Cys³²⁷ was re-introduced in this background (Cysless+C327). L-Glutamate transport in oocytes was assayed as described previously. A representative experiment is shown.

not shown). The same result was obtained with the Cysless-C327 xCT (data not shown). The reagents may have not reacted with any cysteine, or the reaction may have not affected transport activity. To distinguish between the two possibilities, oocytes expressing 4F2hc-xCT were preincubated with the different cysteine reagents, washed, and incubated again with pCMB under conditions that should normally lead to transport inhibition. The preincubation did not modify pCMB inhibition, indicating that they did not have access to Cys³²⁷ (data not shown). Given the diversity of the reagents used (in size, structure, reaction mechanism, and membrane permeability), pCMB and pCMBS may gain access to Cys³²⁷ via a structurally restricted pathway.

xCT Substrates Protect from Transport Inactivation—The above data indicate that Cys³²⁷ is accessible at least to the extracellular medium during the transport cycle. This raised the possibility that this residue may be part of (or close to) the substrate permeation pathway. If this is true, amino acid substrates should delay the reaction of pCMB and pCMBS. Indeed, glutamate (Fig. 3A) and cystine (data not shown) strongly protected 4F2hc-xCT L-glutamate uptake from pCMB and pCMBS inhibition. The calculated $t_{1/2}$ values were, for pCMB, 83.5 ± 7 s in the absence of amino acid, 1475 ± 690 s in the

² E. Gasol and M. Palacín, manuscript in preparation.

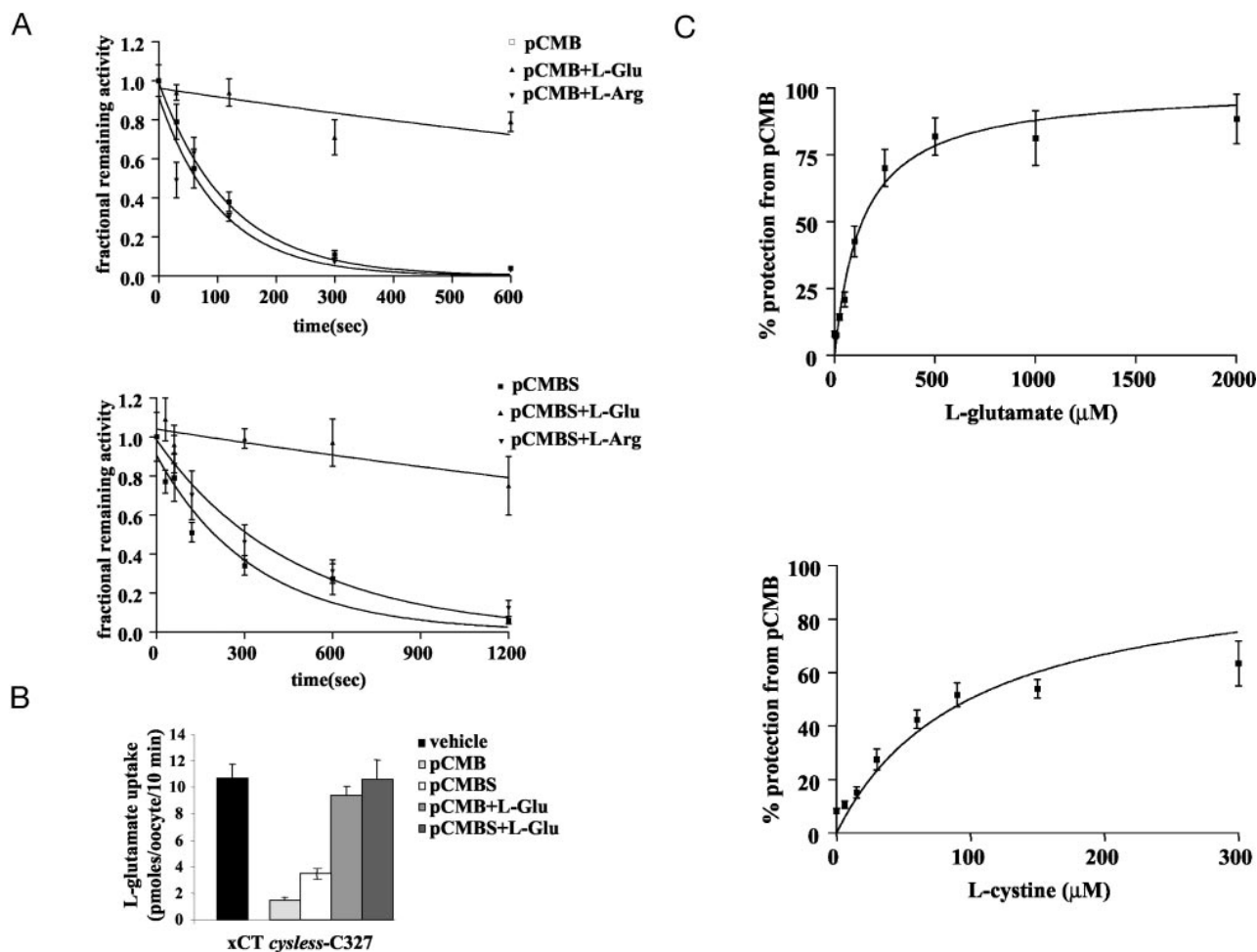


FIG. 3. Substrate protection from pCMB and pCMBS-mediated transport inactivation. *A*, time-dependent inactivation of L-glutamate transport measured in oocytes injected with 4F2hc and xCT cRNAs after the preincubation with either pCMB (*top*) or pCMBS (*bottom*) alone or in combination with L-glutamate or L-arginine. The results are expressed as the fractional remaining activity compared with the transport without prior preincubation. *B*, oocytes injected with 4F2hc and Cysless C327 xCT cRNAs were preincubated with the indicated reagents and washed, and L-glutamate uptake was assayed as described previously. *C*, oocytes injected with 4F2hc and xCT cRNAs were preincubated with vehicle or with pCMB, alone or together, with the indicated concentrations of either L-glutamate (*top*) or L-cystine (*bottom*), washed, and L-glutamate uptake was measured. L-Cystine concentration was not increased because of its poor solubility in the uptake medium. Results are expressed as the percentage of protection from pCMB-mediated transport inactivation compared with the control without amino acids. Representative experiments are shown.

presence of L-glutamate, and 72.5 ± 21.7 s in the presence of L-arginine; and for pCMBS, 230.7 ± 51.4 s in the absence of amino acid, 3081 ± 959 s in the presence of L-glutamate, and 319.4 ± 39 s in the presence of L-arginine. As expected, L-arginine, neither a substrate nor an inhibitor, did not protect. Similar results were obtained with the Cysless-C327 xCT (Fig. 3*B*). Moreover, half-maximal protection (Fig. 3*C*) occurred at substrate concentrations similar to the K_m measured in *Xenopus* oocytes (in the presence of pCMB, IC_{50} was 138 ± 16.3 μM for L-glutamate and 99.2 ± 9.2 μM for L-cystine) (see Refs. 5 and 6 and Table I), suggesting that substrate protection of the Cys³²⁷ residue occurs at a step within the transport process.

At least two different mechanisms may account for protection: (i) substrates may directly compete with pCMB and pCMBS for the substrate binding site/permeation pathway, or alternatively, (ii) a substrate-induced conformational change may occlude the access of mercury compounds to Cys³²⁷. It is generally accepted that large conformational changes in proteins are much more sensitive to temperature changes than substrate binding (20, 21). This feature has been exploited experimentally to detect conformational changes in different carriers such as the serotonin transporter (22) and the neuronal glycine transporter (23). We carried out a time course of the modification of xCT by pCMB (50 μM) in the presence of glutamate (2 mM) at 25 and 4 °C (Fig. 4). pCMB completely inhibited uptake at both temperatures although, as expected, at a slower rate at 4 °C ($t_{1/2} = 63.6 \pm 9$ s at 25 °C and 436 ± 110 s at 4 °C). Glutamate equally protected from the inhibition both at 25 and 4 °C ($t_{1/2} = 1272 \pm 455$ s⁻¹ at 25 °C and 6932 ± 4852 s at 4 °C). Thus, glutamate protects the Cys³²⁷ residue at a step in the transport cycle, most likely prior to temperature-sensitive substrate-induced conformational changes.

TABLE I

Kinetic parameters of Cys³²⁷ mutants

Oocytes were injected with 4F2hc cRNA together with cRNA from the wild type xCT or Cys³²⁷ mutations to serine, alanine, leucine, or threonine. After 3 days, transport of 5 - 2000 μM L-[³H]glutamate was measured and kinetic parameters determined. Values represent the means \pm S.E. of $n = 2-4$ determinations. ND, not determined.

	K_m	V_{max}
	μM	pmol/oocyte/10 min
Wt	173.7 ± 15.3	131.4 ± 9
C327S	359.8 ± 62^a	125.6 ± 7.2
C327A	267.6 ± 19.9^a	112.8 ± 2.6
C327L	ND	ND
C327T	186.3 ± 31.2	71.3 ± 3.4

^a Statistically significant (*F* test, $p < 0.005$) compared with the wild type.

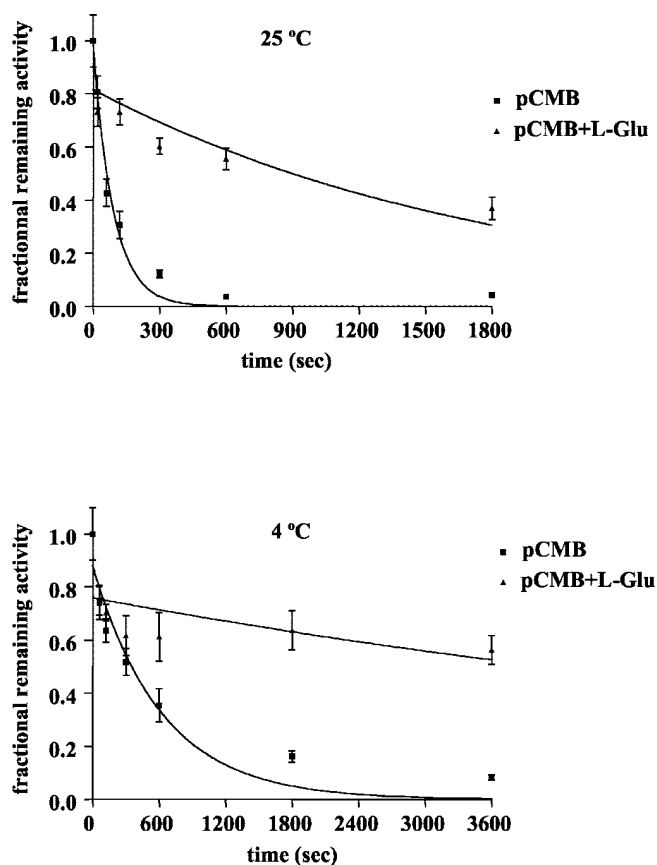


FIG. 4. Temperature dependence of substrate protection. The experiment described in Fig. 3A legend was repeated at 25 °C (top) and 4 °C (bottom). In the latter case, preincubations were made at 4 °C, and subsequent washes and transport assay were done at 25 °C. Note the different time scales in both panels because of the slower reactivity of pCMB at 4 °C. A representative experiment is shown. Similar data was obtained in two other experiments with different oocyte batches.

Analysis of Cys³²⁷ Mutants—Cys³²⁷ residue is either conserved or changed to Thr in the known mammalian LSHAT sequences (see Fig. 5A). Therefore, it is not expected to be a determinant of substrate specificity. Nevertheless, our results are consistent with a role for this residue in substrate binding. To test this hypothesis, we mutated Cys³²⁷ to Ser, Ala, Thr, and Leu and measured the transport function and expression (Figs. 5B and 6, and Table I). No significant differences were found between wild type and C327S, C327A, and C327T when 100 μ M L-glutamate uptake was assayed. However, we observed a clear tendency of L-glutamate transport to decrease in the C327S mutant ($72.5 \pm 6\%$ compared with the wild type) (Fig. 5B). The C327L mutant was inactive (Fig. 5B) even when 10 mM glutamate uptake was assayed (data not shown). Kinetic analysis revealed a slight increase in the K_m for glutamate in the Ser and Ala mutants (2- and 1.5-fold, respectively) (Table I), which was statistically significant (F -test, $p < 0.005$). Cysless xCT showed a 1.9-fold increase in the K_m for glutamate ($328.8 \pm 66.2 \mu$ M) compared with wild type (Table I). Interestingly, re-introducing the Cys³²⁷ in the Cysless xCT background decreased by 2.6-fold the K_m for glutamate ($124.1 \pm 23 \mu$ M), resembling the K_m for glutamate in wild type xCT (Table I). Thus, mutation of Cys³²⁷ to Ser produces a similar increase in the K_m for glutamate in the wild type and Cysless backgrounds. Moreover, the pH dependence of the xCT-mediated cystine transport (6) was not modified when Cys³²⁷ was re-introduced in the Cysless background ($K_{0.5}$ values were 7 ± 0.20 and 6.7 ± 0.25 for Cysless xCT and xCT Cysless-C327, respectively). On

A.

	TM VIII
b ⁰ -AT	VLYP <u>PASWIVPLPFVAFSTIGAANGTCFTAG</u>
γ +LAT1	IFGIFNWIIPLS <u>VALSCFGLGNASIVAAS</u>
γ +LAT2	TFGMFSWTIPIA <u>VALSCFGLGNASIFASS</u>
LAT1	HLGV <u>MSWIIPVVFVGLSCFGSVNGSLFTSS</u>
LAT2	LLGVMAWIMPI <u>SVALSTFGGVNGSLFTSS</u>
xCT	LLGN <u>FLAVPIFVALSCFGSMNGGVFAVS</u>
asc1	LLGYFSWVMPV <u>SVALSTFGGINGYLFTYS</u>

↑

B.

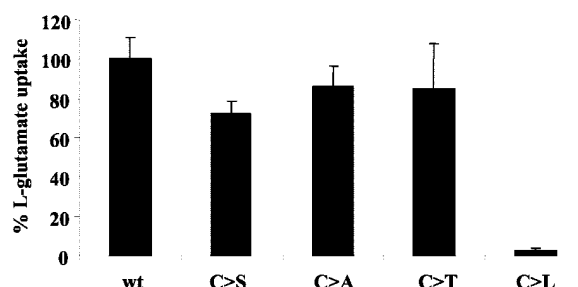


FIG. 5. Transport activity of Cys³²⁷ mutants. A, LSHAT alignment of the transmembrane (TM) domain VIII (underlined) (only the human proteins are shown). The residue corresponding to xCT Cys³²⁷ is bolded. ClustalW software was used for the alignment, and the HMMTOP algorithm was used for transmembrane domain assignment. Although the limits of the transmembrane domains slightly vary between different algorithms, Cys³²⁷ is always located in the middle of transmembrane domain VIII, somehow biased to the C-terminal half. B, oocytes were injected with 4F2hc cRNA and the different Cys³²⁷ mutant cRNAs. After 3 days 100 μ M L-glutamate uptake was measured. The values represent the means \pm S.E. of 3–5 determinations. No significant differences were found between groups (except for the C327L mutant).

the other hand, there was a tendency to shift the $K_{0.5}$ to more basic values when compared with the wild type ($K_{0.5}$ was 6.3 ± 0.25), suggesting that other cysteines (but not Cys³²⁷) might have a role in the pH dependence.

To check for transporter expression, Myc-tagged wild type and mutant xCT transporters were constructed. Their activity and sensitivity toward pCMB and pCMBs were indistinguishable from the untagged versions (Fig. 6A and data not shown). All xCT variants (in the presence of 4F2hc) were expressed at similar levels on the oocyte surface as judged by immunofluorescence experiments (Fig. 6B). Therefore, large changes in transporter expression at the plasma membrane do not account for the functional differences among the Cys³²⁷ variants. More important, the inactive phenotype of the C327L xCT is not due to folding/trafficking alterations and may reflect a defective transport cycle. Together, the results suggest a location of Cys³²⁷ close to the substrate binding site.

DISCUSSION

Here we provide evidence suggesting that Cys³²⁷ is located close to the substrate permeation pathway of xCT. When mutated, residues involved in the binding of substrates are expected to modify the K_m and the substrate selectivity (24, 25). Cys³²⁷ is either a cysteine or a threonine in the mammalian

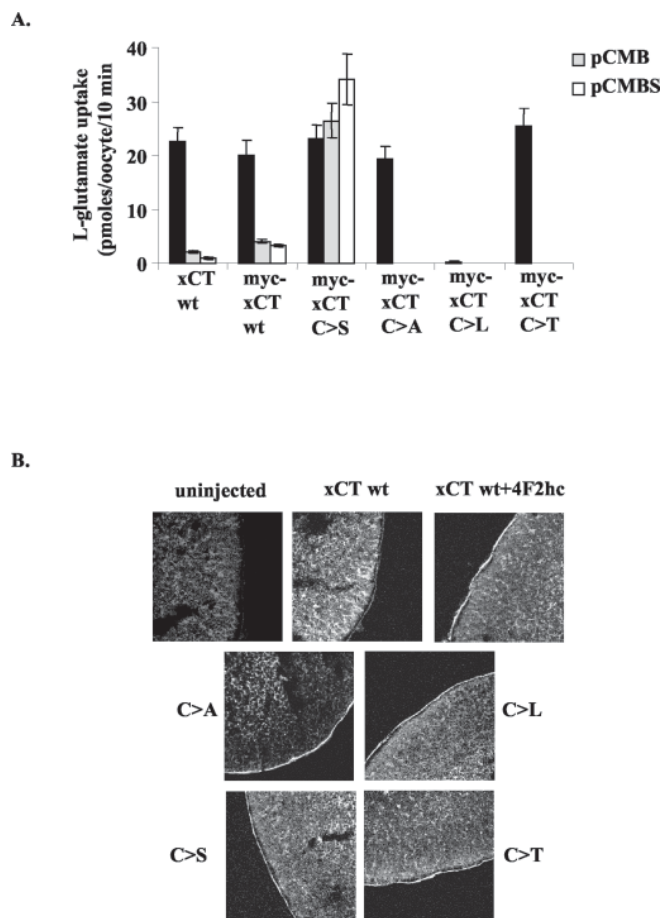


FIG. 6. Transport activity, mercury compounds sensitivity, and localization of Myc-tagged wild type (wt) xCT and Cys³²⁷ mutants. A, oocytes were injected with 4F2hc cRNA and the indicated xCT cRNAs. After 3 days, L-glutamate uptake (100 μ M) was measured. Sensitivity to pCMB and pCMBS was tested as described in Fig. 2B legend. A representative experiment is shown. B, oocytes expressing xCT alone (xCT wt), together with 4F2hc (+4F2hc), the Cys³²⁷ mutants (C>A, L, S, T) together with 4F2hc, or uninjected were subjected to immunofluorescence experiments (see "Experimental Procedures") with the anti-Myc-specific antibody (all xCT versions were Myc-tagged). Two different batches of oocytes gave similar results.

LSHAT proteins (Fig. 5A). No correlation is found with substrate selectivity of the different transporters; as an example, y⁺LAT1 and -2, LAT1, and xCT light subunits transport basic and neutral amino acids, large neutral amino acids, and acidic amino acids, respectively (1, 2). Therefore, variations in substrate selectivity are not expected in the Cys³²⁷ xCT mutants. In this sense, neither transport of L-arginine nor L-leucine was detected in the C327S xCT mutant (data not shown). On the other hand, we observed a higher K_m in the C327S and C327A mutants but not in the C327T mutant (Table I). Threonine is the residue found in this position in some LSHAT proteins (see Fig. 5A). Although low (1.5–2-fold), the increase in K_m is in the range of those found in other studies; Cys¹⁴⁴ of the creatine transporter (CreaT) is located close to the substrate binding site, and a C144A mutant displays a 1.7-fold higher K_m (24); on the well studied lactose permease (LacY) Cys¹⁴⁸ mutants (to Ala, Ser, Thr, and Val) either decrease or increase the K_m for lactose from 1.5 to 2.6-fold (25). Analyses of the Cys³²⁷ mutants show that a small side chain is required at this position and bulky amino acids are not tolerated (C327L mutant; see Figs. 5B and 6), indicating that this residue, if not essential, is at least important for the transport cycle. Preliminary results show that size restrictions may be even more important in

other LSHAT proteins; mutation of the homologous cysteine to serine in y⁺LAT1 abolishes transport (data not shown). Therefore, we favor a scenario in which Cys³²⁷ could be close to the xCT substrate binding site; small side chains at this position are permissive for substrate binding and/or translocation, although they do not bind substrate, and bulky amino acids may impose a strong steric restriction to the transport cycle. Although structurally unrelated to xCT, it is interesting to note that the recently reported crystal structure of LacY (26) indicates that the K_m effects of Cys¹⁴⁸ mutants (see above) are explained by steric hindrance of the substrate binding site.

Independent support for a link of the Cys³²⁷ residue to the permeation pathway comes from our studies with pCMB and pCMBS. First, Cys³²⁷-dependent transport inactivation by pCMB and pCMBS is protected by substrates with an IC₅₀ similar to the K_m (Fig. 3). This protection is temperature-independent, suggesting that no large conformational changes are involved (20, 21). We do not exclude the possibility, however, that minor conformational changes were not detected by the temperature dependence experiment. Second, despite its location in the middle of transmembrane domain 8, Cys³²⁷ is targeted by the impermeant reagents pCMBS and cysteine, indicating that it is accessible to the aqueous environment (Fig. 2). Cys³²⁷ may be facing the extracellular medium, as pCMB, pCMBS, and cysteine were unable to react with this residue when injected into the oocytes at a high millimolar final concentration (data not shown). Spontaneous reactivation of the pCMB or pCMBS inactivation was not observed but may occur at an extremely slow rate. However, these data must be interpreted with caution (27); the sulfhydryl reagents may be quenched by a large excess of thiols in the oocyte cytosol, and intracellular cysteine may be rapidly incorporated to glutathione. Moreover, as xCT mediates cystine/glutamate antiport, intracellular binding sites may be saturated by the large concentration of L-glutamate in oocytes (28), preventing access of the reagents to Cys³²⁷.

A striking feature of Cys³²⁷ is its inaccessibility to a variety of other thiol-reactive compounds. A similar reaction pattern has been described for the V165C mutation in GLUT1 (glucose transporter-1 (27)) and for Cys³⁰⁰ in GABP (*Escherichia coli* γ -aminobutyric acid permease (29)). In both cases a similar size and shape of the aromatic ring of pCMB and pCMBS and substrates of those transporters were invoked to explain the rapid access of these reagents compared with some MTS reagents (29), iodoacetate, and NEM (27, 29). This can hardly apply to the xCT transporter, and as expected, millimolar concentrations of pCMB or pCMBS did not inhibit transport when assayed on the C327S mutant (data not shown). The specific effect of pCMB and pCMBS may be related to the stacking of the aromatic ring with vicinal Phe or Tyr residues; there are three Phe residues in transmembrane domain 8 (Phe³¹⁵, Phe³²², and Phe³²⁸; see Figs. 5A and 7).

Amino acid residues surrounding Cys³²⁷ in transmembrane domain 8 lie on a highly conserved region in the LSHAT family (Figs. 5 and 7), and therefore they are not expected to play a major role in substrate selectivity. However, this region might be important for some general transport step(s). A preliminary model of the amino acid binding site has recently been proposed for the LSHATs LAT1 and y⁺LAT1 (11, 12). The authors suggest three recognition subsites: one for the α -carboxyl group, one for the α -amino group, and one for the side chains. Whereas the latter would be divergent in each member of the family, the first two may be similar or conserved among all the members. Cys³²⁷ might be part of these subsites.

To gain more insight into the functional role of Cys³²⁷, we closely inspected the region including transmembrane domain

	I II
xCT	FSLAVPI FVAL S CFGSMNGGVFAVSRFLFYVASREGHLPEI
LAT1	MSWIIPVFVGL S CFGSVNGSLFTSSRLLFFVGSREGHLPSI
LAT2	MAWIMPISVAL S TFFGGVNGSLFTSSRLLFFAGAREGHLPSV
y ⁺ LAT1	FNWIIPLSVAL S CFGGLNASIVAASRLFFVGSREGHLPPDA
y ⁺ LAT2	FSWTIPIAVAL S CFGGLNASIFASSRLLFFVGSREGHLPLDL
asc1	FSWVMPVSVAL S TFFGGINGYLFTYSRLCFSGAREGHLPSL
b ^{0,+} AT	ASWIVPLFVAF S TIGAANGTCFTAGRLIYVAGREGHMLKV
cadB	AAPLVSAFTAF A CLTSLGSSWMLLVGQAGVRAANDGNFPKV
yjdE	AGAIVSFCAAAG C LSLGGWTLTLAGQTAKAAAADDGLFPPI
potE_ECOLI	VGKVIAMLMVM S CCGSLLGWQFTIAQVFKSSSDEGYFPKI
potE_HAEIN	VGKVIIMGLMVM S CFGSLLGWQFTIAQVFKSSAEEGYFPF
arcD	GAVLISVGLLI S LLGALLS WVLLCAEIMFAAAK DHTMPEF
lysI	GAALISLGLCL S VLGAYVSWQMLCAEPLAL MAMDGLIPSK
	:
gabP	AKLIMDCVILLSVT S CLNSALYTASRMLYSLSRRGDAPAV
	:

FIG. 7. Transmembrane domain 8 region in three different APC subfamilies. A ClustalW alignment was performed with the LSHAT mammalian proteins (only the human orthologues are shown) (subfamily 2.A.3.8), the APA proteins (subfamily 2.A.3.2), and gabP from *E. coli*, a member of the 2.A.3.1 subfamily. The dots (period and colon) indicate conserved residues. The predicted transmembrane domain VIII was found with the HMMTOP algorithm. The eight residues from the two overlapping (G/S/A)XXX(G/S/A) motifs (I and II) are shown in bold. Note that only motif II is conserved in gabP. PCMB- and pCMBS-sensitive cysteines in both human xCT and in gabP proteins are shown as white letters within black squares. Residues within white squares have been shown to be important for transport activity. The residues in xCT very close to or within the transmembrane domain are shown in gray; the conserved Phe residue in LSHAT proteins is also in gray (it is substituted by Ile only in b^{0,+}AT). See "Discussion" for details. GenBankTM accession numbers for human LSHATs are: xCT, AB026891; LAT1, AF077866; LAT2, AF171669; y⁺LAT1, AF092032; y⁻LAT2, D87432; asc1, NM_019849; b^{0,+}AT, AF141289. GenBankTM accession numbers for the APA proteins are: *E. coli* cadB, AAP76293; *E. coli* yjdE, P39269; *E. coli* potE, NP_415219; *Haemophilus influenzae* potE, P44768; *Pseudomonas aeruginosa* arcD, P18275; *Corynebacterium glutamicum* lysI, CAA42855; *E. coli* gabP, NP_31551.

8 and compared it with related transport proteins. The LSHAT proteins belong to the 2.A.3.8 family of APC (amino acid/polyamine/organic cation) transporters (30). Within the APC superfamily, the LSHATs can be aligned along the whole sequence, despite the low identity (14–16%), with the prokaryotic transporter proteins PotE, YjdE, CadB, and LysI (2.A.3.2 family or APA (basic amino acid/polyamine antiporters)) (30). The alignment over transmembrane domain 8 and part of intracellular loop 4 of these proteins with the human LSHATs (including xCT) interacting with 4F2hc or rBAT is shown in Fig. 7. Two overlapping (G/S/A)X₁X₂X₃(G/S/A) motifs (see Fig. 7, motifs I and II) are found, which have been reported to constitute a framework for transmembrane helix-helix association (31, 32). X represents any amino acid. It is possible that in the xCT context a bulky side chain like Leu in the X₁ of motif I may cause alterations in helix packing leading to transport inactivation. In PotE, three important residues for transport are located in this transmembrane domain; one of them is the cysteine at the same position of the alignment (33). Interestingly, Cys³⁰⁰ in the GABP protein (see above) is also located in transmembrane domain 8, and is the X₁ of a (G/S/A)X₁X₂X₃(G/S/A) motif; it corresponds to motif II in the alignment among LSHATs and the proteins from family 2.A.3.2 (Fig. 7), and it seems to be conserved among proteins from the 2.A.3.1 AAT family (amino acid transporter) to which GABP belongs and the 2.A.3.10 YAT family (yeast amino acid transporter) (34). Cys³⁰⁰ in GABP is targeted by sulfhydryl reagents in a manner similar to xCT Cys³²⁷ (29). Mutation to Ala renders a protein 5% active compared with the wild type. Although the mutant retains substrate binding, no comparison with the wild type protein was made, and therefore its role in substrate binding is unclear

(35). The GABP Cys³⁰⁰ seems to initiate a 20-amino acid residue amphipathic α -helix comprising the C-terminal half of transmembrane domain 8 and extending into the fourth intracellular loop connecting TM8 and TM9. The authors have speculated that this structure may be conserved among the members of the 2.A.3.1 and 2.A.3.10 families (29, 34, 35, 36). Further studies are needed to address whether a similar structure may exist in other APC families (*i.e.* LSHAT family, APA family, etc). Indeed, there is evidence indicating an important function for this region; the type B cystinuria mutation, R333W, and the lysinuric protein intolerance mutation, L334R, impair transport (human b^{0,+}AT and human y⁺LAT1, respectively) and lie on intracellular loop 4 (14, 37). On the CAT (cationic amino acid) transporters (the 2.A.3.3 family of APC), this loop modulates substrate affinity (38, 39).

We have therefore identified Cys³²⁷ of xCT as the target of inactivation by mercurial reagents. Substrate protection experiments and analysis of Cys³²⁷ mutants favor a view in which this residue lies close to the substrate binding site. Our data are still compatible with slight conformational changes occurring upon substrate binding, together with a partial overlap between substrate and pCMB/pCMBS binding sites. A non-transported substrate analogue (21), not yet available for the 4F2hc-xCT transporter, would be useful in distinguishing these possibilities. To our knowledge, this is the first systematic effort to elucidate the structure-function relationships in the LSHAT family. The Cys³²⁷ active mutants and the Cysless xCT protein will provide an excellent background for probing residues in transmembrane domain 8 and other domains by cysteine-scanning mutagenesis.

Acknowledgments—We thank Dr. Marta Camps for help and advice with the immunofluorescence experiments, Dr. Josep Lluís Gelpí for help with data analysis, Judit García for technical assistance, and Robin Rycroft for editorial support.

REFERENCES

- Verrey, F., Meier, C., Rossier, G., and Kuhn, L. C. (2000) *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **440**, 503–512
- Chillaron, J., Roca, R., Valencia, A., Zorzano, A., and Palacin, M. (2001) *Am. J. Physiol.* **281**, F995–F1018
- Nakamura, E., Sato, M., Yang, H., Miyagawa, F., Harasaki, M., Tomita, K., Matsuoka, S., Noma, A., Iwai, K., and Minato, N. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 3009–3016
- Reig, N., Chillaron, J., Bartocioni, P., Fernandez, E., Bendahan, A., Zorzano, A., Kanner, B., Palacin, M., and Bertran, J. (2002) *EMBO J.* **21**, 4906–4914
- Sato, H., Tamba, M., Ishii, T., and Bannai, S. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 11455–11458
- Bassi, M. T., Gasol, E., Manzoni, M., Pineda, M., Riboni, M., Martin, R., Zorzano, A., Borsani, G., and Palacin, M. (2001) *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **442**, 286–296
- Sato, H., Tamba, M., Okuno, S., Sato, K., Keino-Masu, K., Masu, M., and Bannai, S. (2002) *J. Neurosci.* **22**, 8028–8033
- Bannai, S., Sato, H., Ishii, T., and Sugita, Y. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 18480–18484
- Sato, H., Kuriyama-Matsumura, K., Hashimoto, T., Sasaki, H., Wang, H., Ishii, T., Mann, G. E., and Bannai, S. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 10407–10412
- Sasaki, H., Sato, H., Kuriyama-Matsumura, K., Sato, K., Maebara, K., Wang, H., Tamba, M., Itoh, K., Yamamoto, M., and Bannai, S. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 44765–44771
- Uchino, H., Kanai, Y., Kim do, K., Wempe, M. F., Chairoungdua, A., Morimoto, E., Anders, M. W., and Endou, H. (2002) *Mol. Pharmacol.* **61**, 729–737
- Kanai, Y., and Endou, H. (2001) *Curr. Drug Metab.* **2**, 339–354
- Boado, R. J., Li, J. Y., and Pardridge, W. M. (2003) *J. Neurochem.* **84**, 1322–1331
- Mykkanen, J., Torrents, D., Pineda, M., Camps, M., Yoldi, M. E., Horelli-Kuitunen, N., Huoponen, K., Heinonen, M., Oksanen, J., Simell, O., Savontaus, M. L., Zorzano, A., Palacin, M., and Aula, P. (2000) *Hum. Mol. Genet.* **9**, 431–438
- Kaback, H. R., Sahin-Toth, M., and Weinglass, A. B. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 610–620
- Estevez, R., Camps, M., Rojas, A. M., Testar, X., Deves, R., Hediger, M. A., Zorzano, A., and Palacin, M. (1998) *FASEB J.* **12**, 1319–1329
- Bertran, J., Werner, A., Moore, M. L., Stange, G., Markovich, D., Biber, J., Testar, X., Zorzano, A., Palacin, M., and Murer, H. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 5601–5605
- Pfeiffer, R., Spindler, B., Loffing, J., Skelly, P. J., Shoemaker, C. B., and Verrey, F. (1998) *FEBS Lett.* **439**, 157–162
- Grunewald, M., Bendahan, A., and Kanner, B. I. (1998) *Neuron* **21**, 623–632
- Chen, J. G., and Rudnick, G. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 1044–1049
- Seal, R. P., and Amara, S. G. (1998) *Neuron* **21**, 1487–1498
- Androutsellis-Theotokis, A., Ghassemi, F., and Rudnick, G. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 45933–45938
- López-Corcuera, B., Núñez, E., Martínez-Maza, R., Geerlings, A., and Aragón, C. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 43463–43470
- Dodd, J. R., and Christie, D. L. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 46983–46988
- Jung, H., Jung, K., and Kaback, H. R. (1994) *Biochemistry* **33**, 12160–12165
- Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H. R., and Iwata, S. (2003) *Science* **301**, 611–615
- Mueckler, M., and Makepeace, C. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 30141–30146
- Meier, C., Ristic, Z., Klausner, S., and Verrey, F. (2002) *EMBO J.* **21**, 80–89
- Hu, L. A., and King, S. C. (1999) *Biochem. J.* **339**, 649–655
- Jack, D. L., Paulsen, I. T., and Saier, M. H. (2000) *Microbiology* **146**, 1797–1814
- Russ, W. P., and Engelman, D. M. (2000) *J. Mol. Biol.* **296**, 911–919
- Senes, A., Gerstein, M., and Engelman, D. M. (2000) *J. Mol. Biol.* **296**, 921–936
- Kashiwagi, K., Kuraishi, A., Tomitori, H., Igarashi, A., Nishimura, K., Shira-hata, A., and Igarashi, K. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 36007–36012
- Hu, L. A., and King, S. C. (1998) *Biochem. J.* **330**, 771–776
- Hu, L. A., and King, S. C. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 20162–20167
- Hu, L. A., and King, S. C. (1998) *Biochem. J.* **336**, 69–76
- Font, M. A., Feliubadalo, L., Estivill, X., Nunes, V., Golomb, E., Kreiss, Y., Pras, E., Bisceglia, L., d'Adamo, A. P., Zelante, L., Gasparini, P., Bassi, M. T., George, A. L., Jr., Manzoni, M., Riboni, M., Ballabio, A., Borsani, G., Reig, N., Fernandez, E., Zorzano, A., Bertran, J., Palacin, M., and International Cystinuria Consortium (2001) *Hum. Mol. Genet.* **10**, 305–316
- Closs, E. I., Lyons, C. R., Kelly, C., and Cunningham, J. M. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 20796–20800
- Habermeier, A., Wolf, S., Martine, U., Graf, P., and Closs, E. I. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 19492–19499

Membrane Topology of System x_c^- Light Subunit Reveals a Re-entrant Loop with Substrate-restricted Accessibility*[§]

Received for publication, March 3, 2004, and in revised form, May 17, 2004
Published, JBC Papers in Press, May 19, 2004, DOI 10.1074/jbc.M402428200

Emma Gasol^{‡,§}, Maite Jiménez-Vidal^{‡,¶}, Josep Chillarón^{‡,**}, Antonio Zorzano[‡],
and Manuel Palacín^{‡,‡‡}

From the [‡]Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology and Barcelona Science Park, University of Barcelona and the [¶]Medical and Molecular Genetics Center, Institut de Recerca Oncològica, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona E-08028, Spain

Heteromeric amino acid transporters are composed of a heavy and a light subunit linked by a disulfide bridge. 4F2hc/xCT elicits sodium-independent exchange of anionic L-cysteine and L-glutamate (system x_c^-). Based on the accessibility of single cysteines to 3-(N-maleimidylpropionyl)biocytin, we propose a topological model for xCT of 12 transmembrane domains with the N and C termini located inside the cell. This location of N and C termini was confirmed by immunofluorescence. Studies of biotinylation and accessibility to sulfhydryl reagents revealed a re-entrant loop within intracellular loops 2 and 3. Residues His¹¹⁰ and Thr¹¹², facing outside, are located at the apex of the re-entrant loop. Biotinylation of H110C was blocked by xCT substrates, by the non-transportable inhibitor (S)-4-carboxyphenylglycine, and by the impermeable reagent (2-sulfonatoethyl) methanethiosulfonate, which produced an inactivation of H110C that was protected by L-glutamate and L-cysteine with an IC₅₀ similar to the K_m . Protection was temperature-independent. The data indicate that His¹¹⁰ may lie close to the substrate binding/permeation pathway of xCT. The membrane topology of xCT could serve as a model for other light subunits of heteromeric amino acid transporters.

conserved disulfide bridge (1, 2). The heavy subunit is important for trafficking of the heterodimer to the plasma membrane, whereas the light subunit confers transport function and specificity. Two heavy subunits are known, 4F2hc and rBAT, which combine with a range of LSHATs to form several transport systems. 4F2hc heterodimerizes with xCT to elicit sodium-independent transport of anionic L-cysteine and L-glutamate by a 1:1 obligatory exchange (system x_c^-) (3, 4). xCT is expressed in most cell lines, in activated macrophages and in the brain (4, 5). System x_c^- functions physiologically for cysteine uptake and glutamate efflux because of the low and high intracellular concentrations of cysteine and glutamate, respectively. Cytosolic concentrations of cysteine are kept low because of its rapid reduction to cysteine, the rate-limiting substrate for the synthesis of intracellular glutathione (4, 6). Consistent with a role of xCT in cellular antioxidant defense, the xCT gene carries an electrophil response element that may mediate the up-regulation of system x_c^- activity by oxygen in macrophages and fibroblasts (5, 7). Moreover, system x_c^- in macrophages and microglia is envisaged as a mechanism for glutamate efflux potentially leading to excitotoxic neural injury in pathological states (5, 8, 9).

Little is known of the protein structure or the structure-function relationships of HATs. rBAT and 4F2hc are believed to be type II membrane glycoproteins with an intracellular N terminus, a single transmembrane domain, and a bulky (N-glycosylated) extracellular domain (1). The N terminus of 4F2hc has a cytoplasmic location (10). In contrast, LSHATs are not N-glycosylated and show a hydrophobicity profile suggesting 12 transmembrane domains. Reconstitution studies with the $b^{0,+}$ AT light subunit showed that the rBAT heavy subunit is not necessary for the basic transport function (11). Then the relevant functional determinants should lie on the LSHATs. Our knowledge of the structure-function relationships of LSHATs rely on a few single residues. A naturally occurring interspecific change (W234L) slightly modified the K_m of LAT1 (12). Among the mutations identified in y^+ LAT1 causing lysinuric protein intolerance (13) and those in $b^{0,+}$ AT causing cystinuria (14), L334R (y^+ LAT1) and A354T ($b^{0,+}$ AT) inactivate the transporter (11, 15). Finally, there is evidence that Cys³²⁷ lies close to the substrate binding site/permeation pathway of xCT (16).

To describe the membrane topology of LSHATs, we performed cysteine scanning accessibility studies using xCT as a model. Our results are compatible with 12 transmembrane domains and with intracellular N and C termini. Moreover, evidence is presented in support of a re-entrant loop between transmembrane domains 2 and 3, the accessibility of which is restricted by xCT substrates/inhibitor.

Heteromeric amino acid transporters (HATs)¹ are composed by a heavy subunit and a light subunit (LSHAT) linked by a

* This work was supported in part by Spanish Ministry of Science and Technology Grants PM99-017-CO-01/02 and SAF2003-08940-01/02, by Institut de Salut Carlos III Networks G03/054 and C03/08, by Generalitat de Catalunya Grant 2001 SGR 00118, and by funds from the Comissionat per a Universitats i Recerca (to M. P.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[§] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental figures.

[¶] Recipient of a predoctoral fellowship from the Spanish Ministry of Education and Culture.

^{‡‡} Supported by BIOMED Grant BMH4 CT98-3514.

^{**} Researcher from the Programa Ramón y Cajal of the Spanish Ministry of Science and Technology.

^{‡‡‡} To whom correspondence should be addressed: Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Avda. Diagonal 645, Barcelona E-08028, Spain. Tel.: 34-93-4034617; Fax: 34-93-4021559; E mail: mpalacin@bio.ub.es.

¹ The abbreviations used are: HAT, heteromeric amino acid transporter; LSHAT, light subunit HAT; BM, 3-(N-maleimidylpropionyl) biocytin; Ni-NTA, nickel-nitrilotriacetic acid; PBS, phosphate-buffered saline; SLO, streptolysin O; MTS, methanethiosulfonate; MTSET, [2-(trimethylammonium)ethyl] methanethiosulfonate; MTSEA, 2-aminoethyl methanethiosulfonate; MTSES, 2-sulfonatoethyl methanethiosulfonate; Ilx-y, intracellular loop between transmembrane domains x and y; 4-S-CPG, (S)-4-carboxyphenyl glycine; Elx-y, extracellular loop between transmembrane domains x and y.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Construction of the Cysteineless xCT and the Single Cysteine Mutants—The seven native cysteine residues of the wild-type transporter (residues 86, 158, 197, 271, 327, 414, and 435) were each replaced by serine (Cys-less xCT) by sequential site-directed mutagenesis (QuikChange™; Stratagene), using human xCT in pNKS2 as a template. The mutated regions were excised by digestion and subcloned back into the original plasmid. The Cys-less xCT was then subcloned by enzyme digestion into the pCDNA4 HisMax vector to insert a six-histidine tail at its N terminus (His-Cys-less). Single cysteine mutants were made in the same way by using His-Cys-less as a template. The mutations were confirmed by DNA sequencing with a d-Rhodamine dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (PerkinElmer Life Sciences) in an Abi Prism 377 DNA Sequencer.

Cell Culture and Transfections in HeLa Cells—HeLa cells were cultured as described (11) and grown at 37 or 33 °C, as indicated. Transient transfections were performed by standard calcium phosphate precipitation as described (15) in 10-cm plates with a mixture of DNA containing 2 µg of pEGFP (Clontech) and 18 µg of the indicated pCDNA4 HisMax xCT construct. The green fluorescence protein-encoding plasmid was included to monitor transfection efficiencies, which ranged from 70 to 90% as assessed by fluorescence-activated cell sorter analysis for BM labeling and transport assay experiments.

Transport Measurements—Transiently transfected HeLa cells were cultured in 24-well plates. 48 h later, influx rates of 25 µM L-[³⁵S]cysteine (Amersham Biosciences) and 50 µM L-[³H]glutamate (American Radiolabeled Chemicals) were measured for 45 s (linear conditions) as described previously (15). Induced transport values were calculated by subtracting transport in mock transfected cells (*i.e.* empty pCDNA3-transfected cells). Each independent experiment was performed with 4–6 replicates. Efflux measurements were performed as described in the legend to Supplemental Fig. A. Nonradioactive amino acids and chemicals were purchased from Sigma.

Labeling with BM and Purification on Ni-NTA Beads—Labeling with 500 µM BM was carried out as described previously (17), with the following modifications. After the biotinylation step, the cells were lysed with 100 µl/well of a solution containing 0.3 M NaCl, 1% Triton X-100, 0.025 M imidazole, protease inhibitor mixture (phenylmethylsulfonyl fluoride, aprotinin, leupeptin, and pepstatin), and 0.05 M NaPO₄ (pH 7.4). The cells were scraped, transferred into a 1.5-ml tube, and incubated on a rotating orbital. After 30 min, the insoluble material was removed by centrifugation at 12,000 rpm for 10 min. The supernatants were incubated with 20 µl of Ni-NTA-agarose beads (Qiagen) pre-equilibrated in 150 µl of lysis solution for 30 min at 4 °C. After 1.5 h of incubation at 4 °C with the solubilized cellular proteins, the beads were washed twice in 750 µl of a PBS solution containing 0.5 M NaCl and 0.05 M imidazole (pH 7.4). The proteins were eluted with 45 µl of elution buffer (PBS solution containing 0.5 M NaCl and 0.25 M imidazole, pH 7.4) after 15 min of shaking incubation at room temperature. When indicated, the cells were permeabilized with streptolysin O (SLO) (Sigma) immediately before the biotinylation step, as described (17). The SLO buffer, as recommended by the supplier, was 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) supplemented with 1 mM dithiothreitol. 4-fold concentrated SDS-PAGE loading buffer and 100 mM dithiothreitol were added to the eluates from the Ni-NTA beads. After SDS-PAGE, the eluates were transferred onto nitrocellulose, and the biotinylated proteins were detected by using streptavidin-peroxidase (Roche Applied Science) and ECL (Amersham Biosciences) according to the instructions of the manufacturer. For each of the mutants, biotinylation was performed at least three times. Densitometries were carried out with the program Gene Tools from Syngene.

Effect of MTS Reagents on Transport—HeLa cells were transfected with the indicated plasmid and cultured in 24-well plates. 48 h later the cells were incubated for 5 min at room temperature with uptake solution without amino acid (137 mM methyl gluconate, 2.8 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5.4 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7.5) containing the indicated concentrations of MTSET, MTSEA, or MTSES. For protection assays, unlabeled L-cysteine, L-glutamate, or L-arginine was added to 10 mM MTSES solution. Then cells were washed three times with uptake solution (without amino acid) and subsequently assayed for transport activity. For substrate-protection dependence curves, MTSES was used at 1 mM for 10 min of incubation time in the presence of a range of L-glutamate or L-cysteine concentrations. MTS reagents (Toronto Research Chemicals) were dissolved as a 1 mM stock solution in Me₂SO. After dilution in the medium to the final concentration, the reagents were used immediately.

Immunofluorescence Microscopy—HeLa cells were transfected on

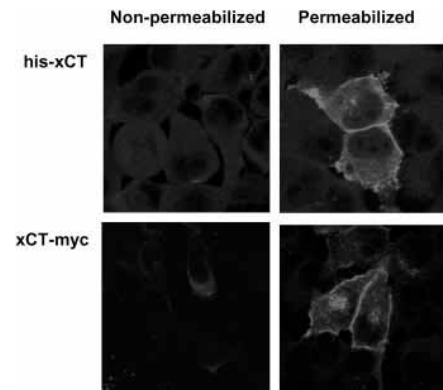


FIG. 1. Immunofluorescence detection of N- and C-tagged xCT transporters. HeLa cells were transfected with Nterm-His-Xpress-xCT (His-xCT) or with xCT-myc-Cterm (xCT-myc). After 72 h, the cells were subjected, before and after permeabilization, to immunofluorescence detection with anti-Xpress or anti-Myc-specific antibodies. Untagged xCT-transfected cells showed no signal even after permeabilization (data not shown). Two independent experiments gave similar results.

cover slides (Marienfeld) with the indicated plasmid and 2 µg of pEGFP (Clontech). After 48 h, the cells were fixed with 3% paraformaldehyde in PBS solution and permeabilized for 10 min with PBS with 0.1% Triton X-100. After 30 min of incubation with 1% bovine serum albumin, each cover slide was incubated for 1 h at room temperature with anti-Xpress antibody (Invitrogen), diluted 1:100 in PBS containing 20 mM glycine and 1% bovine serum albumin. The slides were washed twice in PBS-glycine and incubated for 45 min at room temperature with Texas Red-conjugated goat anti-mouse (Molecular Probes), diluted 1:100. After two washes in PBS, the slides were mounted on microscope slides (Menzel-Glaser) with mowiol. The images were obtained from the Leica TCS NT confocal microscope, at the Scientific Services of the Barcelona Science Park (Fig. 1). Transfection efficiencies in these experiments (*i.e.* green fluorescence protein signal) ranged from 50 to 70%.

Western Blot Analysis of His-tagged xCT—Eluates from the purification on Ni-NTA beads containing 4-fold concentrated SDS-PAGE loading buffer and 100 mM dithiothreitol were loaded for SDS-PAGE (10% polyacrylamide) and transferred onto Immobilon (Millipore Iberica). The membranes were blocked with 3% bovine serum albumin in Tris-buffered saline (0.05 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.5) for 1 h at 37 °C. Anti-Xpress antibody (Invitrogen) was used at a 1:5000 dilution in 1% bovine serum albumin and 0.05% Tween 20 in Tris-buffered saline, according to the manufacturer's instructions. Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse antibody (Sigma) was used as a secondary antibody at 1:50,000 dilution. Antibody bonding was detected using ECL Western blot detection system (Amersham Biosciences).

Oocyte Dixon Plot and Efflux Studies—Oocyte origin, management, cRNA synthesis, and injections were as described elsewhere (18). Dixon plot of 4-S-CPG inhibition of transport and efflux determination via 4F2hc/xCT were performed as described in the legends to Supplemental Figs. C and D.

Kinetic Data Analysis—Nonlinear regression fits of experimental and calculated data to estimate V_{max} and K_m (Michaelis-Menten equation), half-life times ($t_{1/2}$) for transporter inactivation, IC_{50} values for substrate protection, and K_i for 4-S-CPG were performed with GraphPad Prism as described (16).

RESULTS

Localization of the N and C Termini of xCT—Two tagged versions of xCT were constructed, His-xCT (*i.e.* His-Xpress at the N terminus) and xCT-myc (*i.e.* myc at the C terminus). Transfection of human His-xCT alone or in combination with human 4F2hc resulted in the induction of both 50 µM L-[³H] glutamate (4-fold) and 25 µM L-[³⁵S] cysteine (6-fold) uptake over background (Supplemental Fig. A). The His-xCT-induced transport was similar to that elicited by nontagged xCT (88 ± 9 and 84 ± 7% of the transport of 25 µM L-[³⁵S]cysteine and 50 µM L-[³H]glutamate in nontagged xCT-transfected cells, respectively; data not shown; $n = 5$ independent experiments). The characteristics of the His-xCT-induced transport agree with

TABLE I
Kinetic parameters of xCT mutants

The number of independent experiments with four replicas each is shown in parentheses. ND, nondetected activity. xCT mutants in the wild-type background were grown at 37 °C, whereas xCT mutants in the cysteine-less background were grown at 30 °C. His-xCT, His-tagged xCT at the N terminus; His-H110C, His-H110D, and His-H110D, mutants at position His¹¹⁰ in the His-xCT background; His-Cys-less, His-tagged cysteine-less xCT at the N terminus; His-H110C-Cys-less, H110C mutant in the His-Cys-less background.

	Glutamate		Cysteine	
	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}
	μM	$\text{pmol}/\text{min}\cdot\text{mg protein}$	μM	$\text{pmol}/\text{min}\cdot\text{mg protein}$
His-xCT	224 ± 78 (4)	6087 ± 897	110 ± 19 (3)	9597 ± 886
His-H110C	192 ± 53 (4)	5654 ± 1997	89 ± 36 (3)	7665 ± 1360
His-H110D	154 ± 41 (1)	8121 ± 599	85 ± 27 (1)	12696 ± 1411
His-H110K	ND		ND	
His-Cys-less	827 ± 171 (1)	5073 ± 356	117 ± 41 (1)	8709 ± 1165
His-H110C-Cys-less	1036 ± 144 (1)	10365 ± 544	143 ± 46 (2)	9960 ± 1456

FIG. 2. Transport activity of His-tagged single cysteine mutants of xCT. The indicated native residues were replaced by cysteine. L-[³⁵S]Cysteine transport was measured in HeLa cells expressing these mutants or the parental His-tagged cysteineless xCT (His-Cys-less). The values are expressed as percentages relative to the His-Cys-less. Each bar is the mean ± S.E. ($n = 3-5$). His-Cys-less-induced transport was 1051 ± 109 pmol/min·mg protein ($n = 12$).

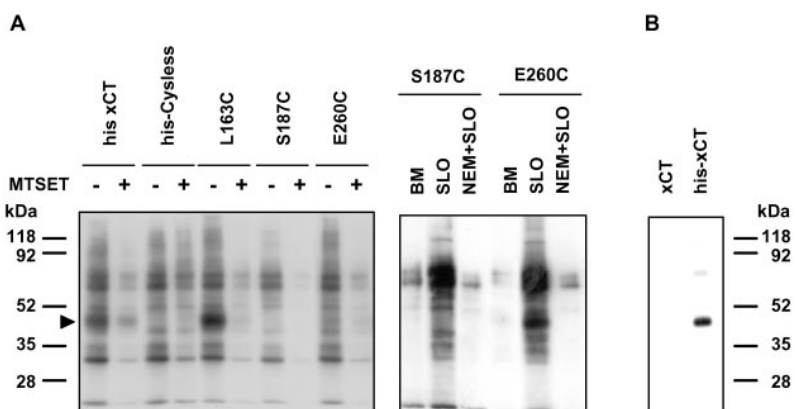
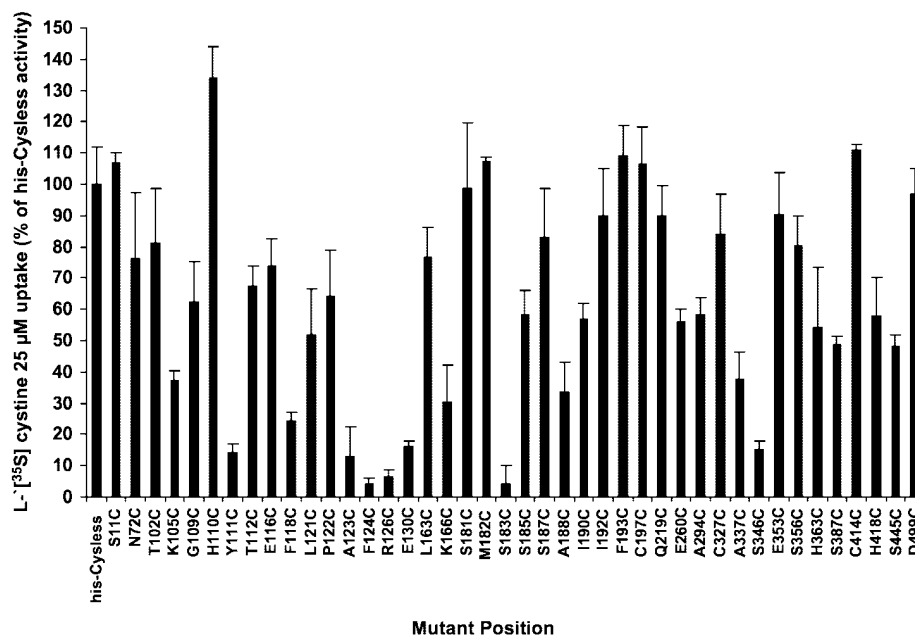


FIG. 3. Biotinylation of His-xCT and the single cysteine derivatives L163C, S187C, and E260C. A, cells expressing His-tagged derivatives of wild-type xCT (His-xCT), of cysteineless xCT (His-Cys-less), and of the mutants L163C, S187C, and E260C in the His-Cys-less background were pretreated or not with 1 mM MTSET and then biotinylated with BM (left panel). In the right panel, the single cysteine residues were biotinylated before (BM) or after streptolysin O treatment (SLO). In the latter case, when indicated, a preincubation step with 1.5 mM *N*-ethylmaleimide for 10 min was carried out prior to SLO. The apparent molecular masses (kDa) of the prestained markers (New England Biolabs) are on the left. The triangle indicates the position of the ~40-kDa xCT monomer. B, Western blot analysis of Ni-NTA eluates from HeLa cells transfected with untagged (xCT) or tagged (His-xCT) xCT blotted with α -Xpress. The apparent molecular masses (kDa) of the markers are on the right.

those obtained previously with wild-type xCT and 4F2hc (3, 4, 16): sodium independence (data not shown), K_m values for substrates in the μM range (Table I), and L-cysteine transstimulation of L-glutamate efflux (Supplemental Fig. A). Sim-

ilarly, xCT-myc also elicited system x_c⁻ transport activity (4-fold of 25 μM L-[³⁵S]cysteine over background, representing $67 \pm 7\%$ of the untagged transporter; $n = 8$). Tag immunodetection of His-xCT and xCT-myc occurred only when the cells

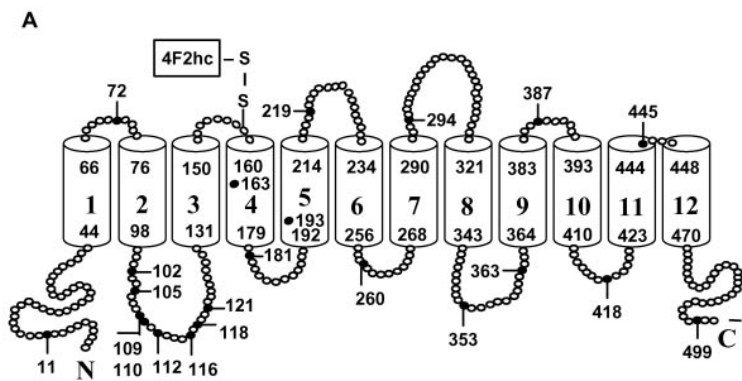
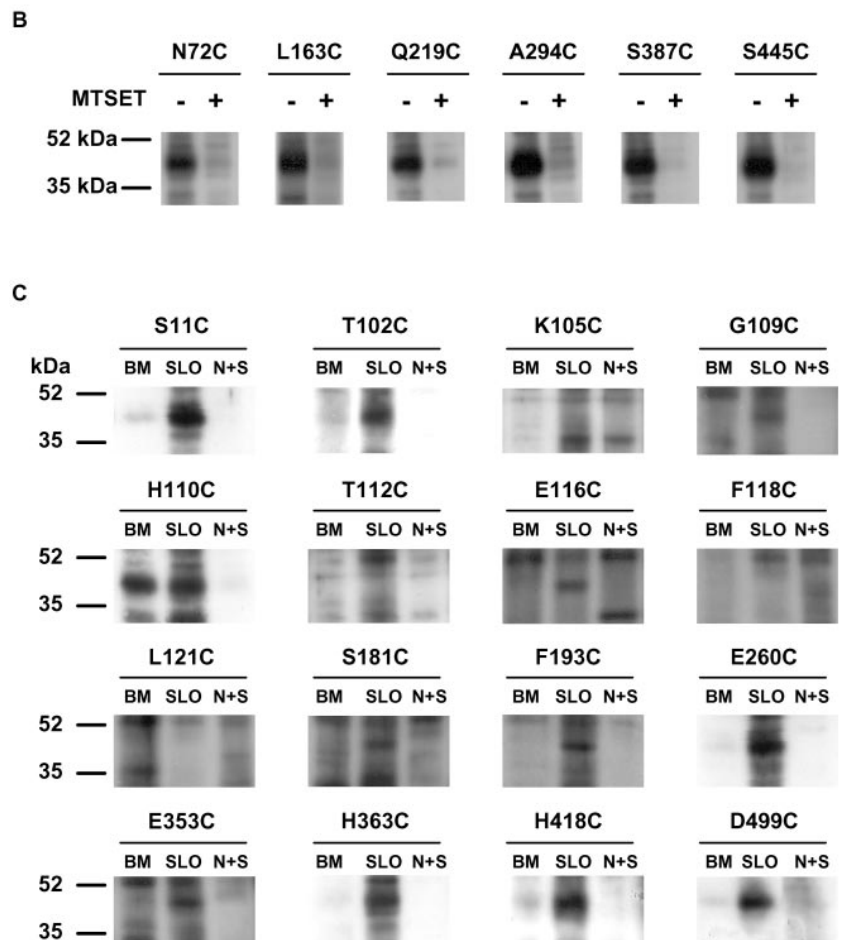


FIG. 4. Biotinylation of single cysteine residues of xCT. *A*, HMMTOP topology model of xCT with 12 transmembrane domains (residue numbers indicate the limits of each segment), with N and C termini located intracellularly. The residues analyzed for biotinylation are indicated with closed circles and numbered. The disulfide bond between 4F2hc and xCT (Cys¹⁵⁸) is shown. *B*, single cysteine residues expected to be located outside were pretreated or not with 1 mM MTSET and then biotinylated with BM. *C*, single cysteine residues expected to be located within the cell were biotinylated with BM. When indicated, biotinylation (BM) was performed after streptolysin O permeabilization (SLO) or after *N*-ethylmaleimide pretreatment and consequent SLO permeabilization (N+S). The positions of two markers are indicated at the left (*B* and *C*). Biotinylation was performed three to five times with similar results.



were permeabilized (Fig. 1). In this case, in addition to intracellular signal, a clear label of the plasma membrane was obtained. This strongly supports the intracellular location of both ends of xCT.

HeLa cells express 4F2hc and are devoid of rBAT expression (11). This suggests that endogenous 4F2hc drives transfected xCT to the plasma membrane. This is in agreement with previous results obtained in HeLa cells for asc-1² and xCT in NIH3T3 cells (19), where transfection of the corresponding LSHAT alone resulted in full transport activity in the plasma membrane. For simplicity in the rest of experiments, the cells were transfected with the corresponding wild-type, tagged, or mutated human xCT versions alone.

Biotinylation of Single Cysteine xCT Subunit—To study the

membrane topology of human xCT, a cysteine accessibility strategy was performed (17). An N-terminal His-tagged cysteineless xCT (His-Cys-less) was obtained by mutating the 7 endogenous cysteine residues to serine. His-Cys-less showed transport characteristics similar to those of wild-type xCT. In cells grown at 33 °C to increase transport induction, as learned with rBAT/b^{0,+}AT (20), 25 μM L-[³⁵S] cysteine xCT-induced transport was 3065 ± 142 pmol/mg protein min in His-xCT-transfected cells and 1045 ± 75 pmol/mg protein min in His-Cys-less-transfected cells (*i.e.* 34% ± 5% of His-xCT) (*n* = 8). This represents 7.6- and 3.3-fold transport activity over background conditions (462 ± 50 pmol/mg protein min in mock-transfected cells; *n* = 8) in His-xCT- and His-Cys-less-transfected cells respectively. His-Cys-less showed similar apparent *K_m* for cysteine and 3.6-fold higher apparent *K_m* for glutamate than His-xCT (Table I). Mutation of cysteine residue 327 to

² M. Pineda and M. Palacín, unpublished results.

serine is responsible for the increased glutamate K_m (16). Therefore, we have used His-Cys-less as the basis for the topology determination. Fig. 2 shows the positions where single cysteine residues were introduced in His-Cys-less and the transport activity of L-[35 S]cysteine induced upon transfection in HeLa cells. Single cysteine mutants with transport activities below 25% of His-Cys-less were not considered for further studies.

A typical experiment, in which biotinylated xCT derivatives are visualized, is shown in Fig. 3A. HeLa cells expressing the xCT constructs were reacted with BM. After solubilization of the membrane proteins, the His-tagged transporters were purified on Ni-NTA beads. The covalently bound biotin was readily visualized after SDS-PAGE in reducing conditions by probing the blotted proteins with streptavidin peroxidase. The biotinylated His-tagged xCT (His-xCT) ran as a band around 40 kDa, which is consistent with the mobility of immunodetected His-xCT (Fig. 3B). Other labeled bands are not specific because they were detected in nontagged xCT-transfected cells (data not shown) and in His-Cys-less. Preincubation of the cells expressing His-xCT with the membrane-impermeable sulfhydryl reagent MTSET (21) blocked biotinylation only partially. This suggests that some of the seven endogenous cysteines are accessible from the external medium (*i.e.* MTSET-sensitive label), whereas others are accessible to the slightly permeable BM, suggesting access to the internal milieu. As shown in Fig. 3B, overexpressed His-xCT showed another faint band of ~80 kDa, representing most probably a homodimer. This dimerization in reducing SDS-PAGE has been previously reported for other LSHATs (*e.g.* b $^{0,+}$ AT; Refs. 14 and 22). Biotinylation of the ~80-kDa band was not detected, most probably because of the low expression of this band and the presence of nonspecific biotinylated bands in this mobility range.

When Leu¹⁶³ was replaced by cysteine (in His-Cys-less background), biotinylation was again apparent as a specific ~40-kDa band. Preincubation with MTSET completely blocked this biotinylation. This suggests that the cysteine introduced at the 163 position is accessible from the external medium. In contrast, cysteine residues introduced at positions 187 (S187C) or 260 (E260C) did not result in biotinylation of the 40-kDa band. This lack of biotinylation seems not to be due to a loss of expression of the mutants as they showed significant transport activity (Fig. 2). When SLO was used to permeabilize HeLa cells expressing E260C, the transporter became biotinylated (Fig. 3A). In this case, preincubation with the highly membrane permeable *N*-ethylmaleimide blocked this biotinylation. As expected, SLO permeabilization did not increase biotinylation of the externally located residue 163 (E163C) (data not shown). This suggests that the cysteine introduced at the 260 position is accessible from the inside. In contrast, S187C was not biotinylated after SLO (Fig. 3A). This negative result is ambiguous; it may mean that this residue is located in hydrophobic surroundings within the membrane, is facing an aqueous access channel too narrow to be accessible to the bulky BM, or is hidden within a particular secondary structure of the xCT transporter or by interacting proteins (*e.g.* the heavy subunit 4F2hc). Biotinylation of two bands around ~80 kDa (Fig. 3A) is unspecific because biotinylation of these bands are also visible in nontagged xCT- and His-Cys-less-transfected cells (data not shown).

Biotinylation Screening to Establish the Membrane Topology of xCT Subunit—To identify the membrane topology of additional sites, we introduced single cysteines at many other positions of His-Cys-less. Fig. 4A shows a 12-transmembrane domain model of xCT based on the HMMTOP algorithm (23). Residues with an expected extracellular location at positions

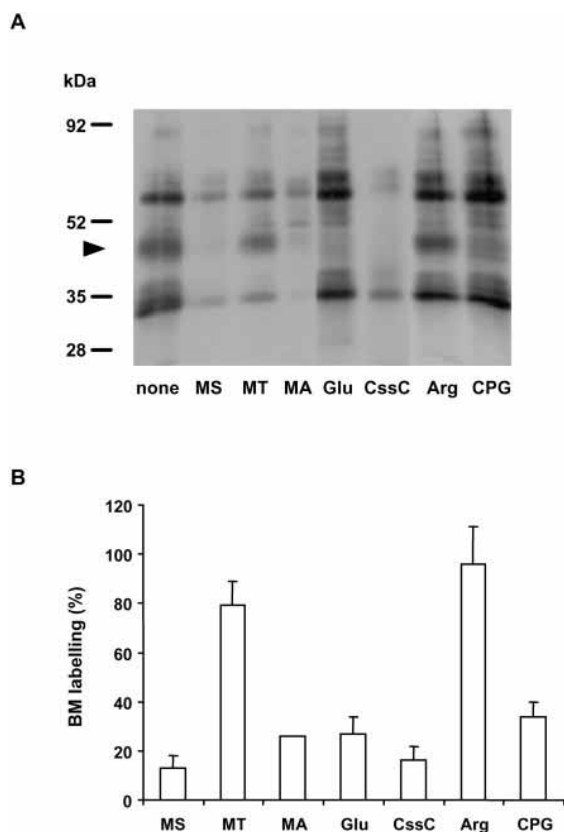
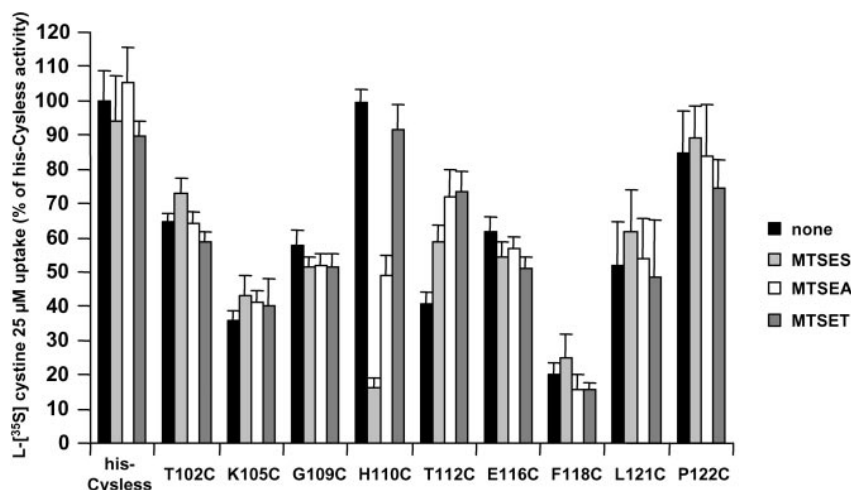


FIG. 5. Blockade of biotinylation of residue H110C. A, HeLa cells expressing H110C in the His-Cys-less background were processed for biotinylation with BM. When indicated, the cells were left untreated (*none*) or pretreated with 10 mM (*MS*), 1 mM MTSET (*MT*), or 2.5 mM MTSEA (*MA*) for 10 min. Biotinylation was performed in the absence (*none*) or presence of 10 mM L-arginine (*Arg*), 1 mM 4-S-CPG (*CPG*), 10 mM L-glutamate (*Glu*), or 350 μ M L-cysteine (*CssC*). The triangle indicates the position of the ~40-kDa xCT monomer. Prestained markers are on the left. B, quantitative analysis of the biotinylation of the xCT monomer (means \pm S.E.; $n = 3-6$), expressed as percentages of the biotinylation without pretreatments or additions (*none*). MTSEA data are the means of two independent experiments.

Asn⁷² (EL1-2), Leu¹⁶³ (already shown in Fig. 3A), Gln²¹⁹ (EL5-6), Ala²⁹⁴ (EL7-8), Ser³⁸⁷ (EL9-10), and Ser⁴⁴⁵ (EL11-12) when mutated to cysteine showed biotinylation, which was blocked by MTSET (Fig. 4B). This showed that these residues are accessible from the external medium, as expected. Fig. 4C shows biotinylation of residues expected to be located inside (Fig. 4A). Positions Ser¹¹ (N terminus), Thr¹⁰² (IL2-3), Ser¹⁸¹ and Phe¹⁹³ (IL4-5), Glu²⁶⁰ (IL6-7; also shown in Fig. 3A), Glu³⁵³ and His³⁶³ (IL8-9), His⁴¹⁸ (IL10-11), and Asp⁴⁹⁹ (C terminus) when mutated to cysteine become strongly biotinylated only after permeabilization with SLO. Moreover, *N*-ethylmaleimide blocked biotinylation of these residues. Several residues (S11C, T102C, E260C, H363C, H418C, and D499C) showed slight biotinylation without permeabilization. This is most probably due to the fact that BM has some permeability through the plasma membrane (17). Indeed, this biotinylation was MTSET-insensitive (data not shown), and biotinylation increased strongly after permeabilization with SLO. This shows that all these residues are accessible from inside. Biotinylation of residues within putative IL4-5 was difficult. Thus, in addition to the intracellularly accessible residues Ser¹⁸¹ and Phe¹⁹³, other residues within this loop (Ile¹⁸², Ser¹⁸⁵, Ser¹⁸⁷ (Fig. 3A), Ala¹⁸⁸, Ile¹⁹⁰, and Ile¹⁹²) showed no biotinylation even after permeabilization (data not shown). The inside location of the N and C terminus suggested by the biotinylation

FIG. 6. Effect of MTS reagents on single cysteine mutants in IL2–3.

HeLa cells expressing His-tagged cysteineless xCT (His-Cys-less) and the indicated mutants, in the same cysteineless background, were left untreated (none) or treated with 10 mM MTSES, 2.5 mM MTSEA, or 1 mM MTSET for 5 min. Then the cells were washed and assayed for 25 μ M L-[³⁵S]cysteine transport. The data (means \pm S.E.; $n = 2$ –4) represent percentages relative to His-Cys-less-induced transport without treatment. Inactivation of His-H110C-Cys-less by MTSES and MTSEA was statistically significant ($p < 0.001$; Student t test). This MTSES inactivation was greater than that by MTSEA ($p < 0.05$; Student t test). Stimulation of His-T112C-Cys-less activity by MTSES, MTSEA, and MTSET was statistically significant ($p < 0.001$; Student t test).



studies confirms the immunofluorescence results shown in Fig. 1. Finally, residues predicted to be located within transmembrane domains (Lys¹⁶⁶ in transmembrane domain 4, Cys¹⁹⁷ in transmembrane domains 5, and Cys³²⁷ and Ala³³⁷ in transmembrane domain 8) showed no biotinylation even after permeabilization with SLO (data not shown). In all, these results give experimental support to the 12-transmembrane domain model of xCT.

Biotinylation of Single Cysteine Residues within IL2–3—Mutant H110C showed biotinylation from the external medium (biotinylation is blocked by the membrane impermeable MTSES; Fig. 5), whereas the neighboring residue Thr¹⁰² (mutant T102C) showed biotinylation from inside (Fig. 4C). This fostered more extensive screening of the intracellular loop 2–3 (Fig. 4C). Residues Thr¹⁰² and Glu¹¹⁶, flanking position His¹¹⁰ at 6 or 8 residues, showed biotinylation from inside. This suggests a re-entrant loop-like structure within IL2–3. One of the closest His¹¹⁰-flanking positions, G109C showed biotinylation only after permeabilization with SLO (Fig. 4C). The other closest flanking position, Tyr¹¹¹, is a fully conserved residue (Supplemental Fig. E), which when mutated to cysteine resulted in very little transport activity (Fig. 2) and mistrafficking to the plasma membrane (Supplemental Fig. B). Other positions within IL2–3 gave no accessibility information. Thus, positions Lys¹⁰⁵, Thr¹¹², Phe¹¹⁸, Leu¹²¹, and Pro¹²² (data not shown) when mutated to cysteine showed no biotinylation even after permeabilization (Fig. 4C). Positions Ala¹²³, Phe¹²⁴, Arg¹²⁶, and Glu¹³⁰ were not analyzed because of the very low residual transport activity of the corresponding cysteine mutants (Fig. 2).

The biotinylation of His-H110C-Cys-less from outside prompted studies with membrane-impermeable cysteine reagents. Preincubation with the negatively charged MTSES blocked biotinylation, whereas the positively charged MTSET did not (Fig. 5). This supports the external accessibility of residue His¹¹⁰ and suggests that negatively charged reagents may have greater accessibility to this residue from outside than positively charged reagents. System x_c⁻ exchanges anionic substrates (glutamate and anionic cysteine) (3, 4). This coincidence in negative charge fostered substrate protection experiments of H110C biotinylation. L-Glutamate and L-cysteine, but not L-arginine (neither a substrate nor an inhibitor of xCT), blocked biotinylation of H110C (Fig. 5). Recently it has been shown that 4-S-CPG is a nonsubstrate competitive inhibitor of system x_c⁻ with a K_i in the low μ M range (24). Similarly, 4F2hc/xCT-induced transport in *Xenopus* oocytes was competitively inhibited by 4-S-CPG with a K_i of 24.9 \pm 5.5 μ M (Supplemental Fig. C). As expected for a nonsubstrate inhibitor, 4-S-CPG failed to

trans-stimulate L-glutamate efflux through 4F2hc/xCT (Supplemental Fig. D). Interestingly, a saturating concentration of 4-S-CPG (1 mM) blocks H110C biotinylation to a similar extent to a saturating concentration of L-glutamate (10 mM) (Fig. 5). This suggests that occupation of the substrate binding site prevents accessibility of residue His¹¹⁰ from outside.

Effect of Methanethiosulfonate Derivative Reagents on Single Cysteine Residues within IL2–3—Next, we investigated transport inactivation by MTS reagents of single cysteine residue mutants of IL2–3. To compensate the differential reactivity of the MTS reagents used with free cysteine in solution (MTSES is 10 and 4 times less reactive than MTSET and MTSEA, respectively (21)), MTSES was used at 10 mM, MTSEA was used at 2.5 mM, and MTSET was used at 1 mM (Fig. 6). As expected, His-Cys-less transport activity was unaffected by the MTS reagents. Interestingly, only His-H110C-Cys-less was inactivated by MTSES and to a lesser extent by the membrane permeable MTSEA. In contrast, MTSET did not inactivate His-H110C-Cys-less-induced transport. This order of inactivation was also obtained when the three MTS reagents were used at 1 mM for 10 min. Residual transport activity was 32.6 \pm 9.3, 58.7 \pm 3.2, and 107.0 \pm 8.0% after MTSES, MTSEA, and MTSET treatment, respectively ($p < 0.05$ between the three groups; Student t test; means \pm S.E.; representative experiment with five replicas). This confirms the previous biotinylation studies and strongly supports the outside accessibility of residue His¹¹⁰. MTSES did not abolish completely His-H110C-Cys-less-induced transport. Thus, at maximal conditions of inactivation (10 mM MTSES for 5 min; Fig. 7), similar residual transport activity was obtained at 25 μ M (17.4 \pm 2.9%; $n = 8$) and 350 μ M (16.7 \pm 5.8%; $n = 3$) L-[³⁵S]cysteine (*i.e.* four times below and three times above apparent K_m , respectively; Table I). This indicates that MTSES reduces \sim 6-fold the transport activity of His-H110C-Cys-less, probably affecting V_{max} . Treatment with the impermeable MTSES and MTSET and the permeable MTSEA resulted in the stimulation of His-T112C-Cys-less transport activity (up to 80% increase) (Fig. 6). This suggests that Thr¹¹² is accessible from the outside. The permeable MTSEA did not affect the transport activity of T102C, G109C, or E116C (Fig. 6), which are biotinylated from the inside (Fig. 4). These residues might be modified by MTSEA, but transport activity was not affected. Indeed, MTSEA did block biotinylation of G109C and E116C (data not shown), showing the accessibility of MTSEA to these residues. In contrast, MTSEA did not block biotinylation of T102C, suggesting that this residue is not accessible to the reagent. In all, biotinylation and MTS reagent treatment studies suggest that the accessibility within this re-entrant loop is restricted to posi-

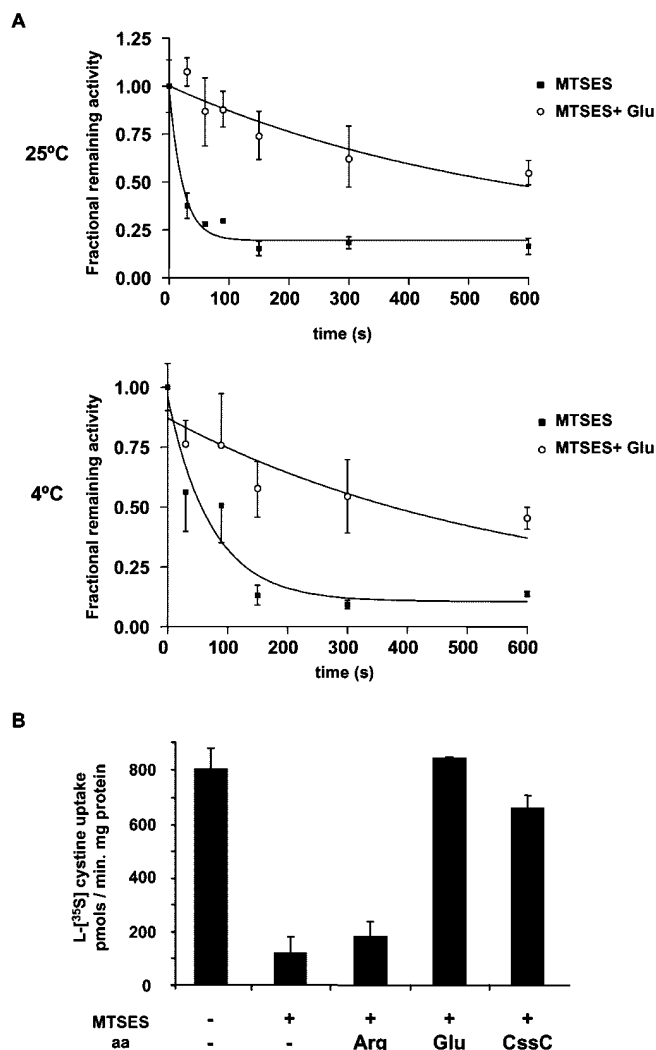


FIG. 7. Substrate protection from H110C-dependent MTSES-mediated transport inactivation. HeLa cells expressing H110C in a cysteineless background (His-H110C-Cys-less) were pretreated with 10 mM MTSES and then assayed for 25 μ M L-[³⁵S]cysteine transport. *A*, time-dependent inactivation of His-H110C-Cys-less-induced transport after MTSES preincubation at 25 °C or 4 °C, alone or in the presence of 10 mM L-glutamate (*Glu*). The data (means \pm S.E.) are expressed as the fractional remaining activity. His-Cys-less-induced transport in untreated cells for the protection experiments at 25 and 4 °C was 769 \pm 105 and 1118 \pm 152 pmol/min-mg protein, respectively (five replicas in each of the representative experiments shown). *B*, protection by different amino acids (*aa*) from MTSES inactivation of His-H110C-Cys-less-induced transport. The cells were pretreated or not with MTSES for 30 s alone or in combination with 10 mM L-arginine (*Arg*), 10 mM L-glutamate (*Glu*), or 350 μ M L-cysteine (*CssC*). Transport is expressed in pmol/min-mg protein (means \pm S.E. from a representative experiment).

tions His¹¹⁰ and Thr¹¹² from outside and to positions T102C, G109C, and E116C from inside.

Substrate Protection of MTSES Inactivation of His-H110C-Cys-less—The blockade by glutamate, 4-S-CPG, and MTSES of His-H110C-Cys-less biotinylation strongly suggests that substrates would delay the reaction of MTSES inactivation, as it is shown in Fig. 7. Preincubation with L-cysteine and L-glutamate strongly protected against inactivation by MTSES at 25 °C. Indeed, the $t_{1/2}$ calculated for 10 mM MTSES were 16 \pm 3 s in the absence of amino acid and 394 \pm 83 s in the presence of glutamate (data from a representative experiment done with four replicas). As expected, L-arginine, neither a substrate nor an inhibitor, did not protect. Moreover, half-maximal protection occurred at substrate concentrations (Fig. 8) similar to the

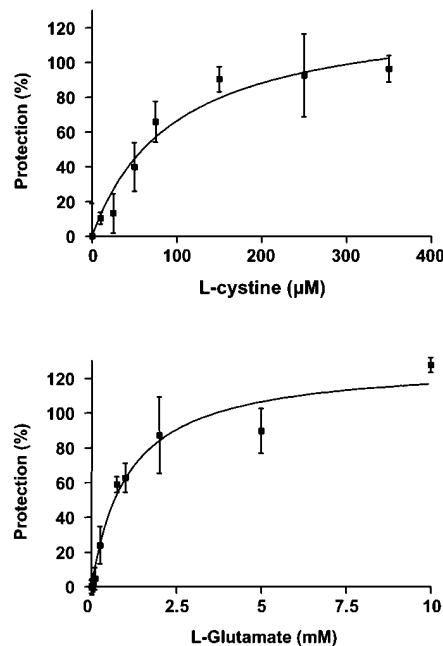
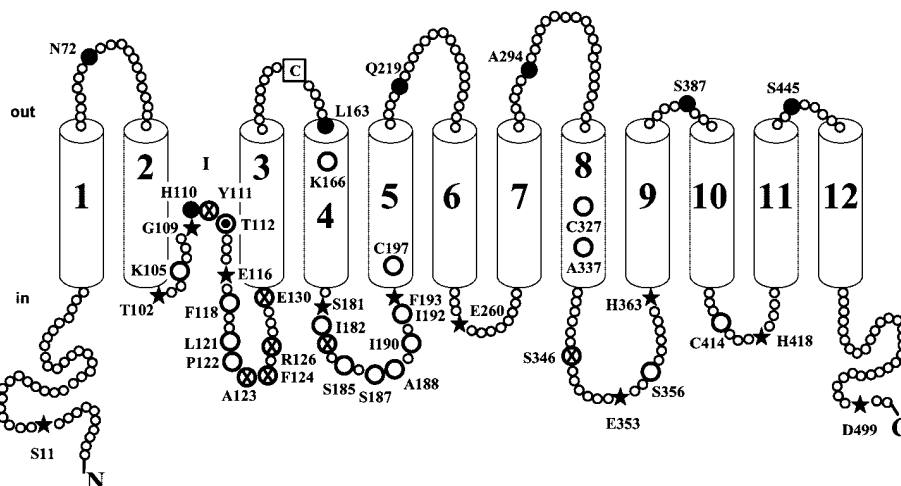


FIG. 8. Concentration dependence of the substrate protection from H110C-dependent MTSES-mediated transport inactivation. HeLa cells transfected with H110C in a cysteineless background were treated or not with 10 mM MTSES for 10 min at 25 °C, alone or in combination with different concentrations of L-cysteine (10, 25, 50, 75, 150, 250, and 350 μ M) (*upper graph*) or L-glutamate (50 μ M, 100 μ M, 250 μ M, 500 μ M, 750 μ M, 1 mM, 2 mM, 5 mM, and 10 mM) (*lower graph*). Then transport of 25 μ M L-[³⁵S]cysteine was measured. These conditions of inactivation by MTSES were chosen because maximal inactivation was accomplished (88% \pm 7%) with a low inactivation rate ($t_{1/2}$ = 295 \pm 114 s; representative experiment with five replicas) (data not shown). In this instance, residual transport activity is a good estimation of the rate of inactivation. The data represent the percentages of protection respect to the transport elicited without MTSES treatment (means \pm S.E. from a representative experiment).

K_m for His-H110C-Cys-less (Table I); The IC_{50} values for L-glutamate and L-cysteine were 1078 \pm 223 and 807 \pm 302 μ M (in two independent experiments) and 97 \pm 30 μ M (representative experiment), respectively. This suggests that substrate protection of the Cys¹¹⁰ residue occurs at a step within the transport process.

At least two mechanisms may account for protection: substrates may directly compete with MTSES for the substrate binding site/permeation pathway, or alternatively a substrate-induced conformational change may prevent the access of MTSES to Cys¹¹⁰. It is generally accepted that large conformational changes in proteins are much more sensitive to temperature changes than substrate binding (25, 26). This feature has been exploited experimentally to detect conformational changes in various carriers, such as the serotonin transporter (27), the neuronal glycine transporter (28), and the xCT transporter (16). Indeed, xCT-induced transport is completely abolished at 4 °C (data not shown), even though the temperature dependence of xCT substrate binding is unknown. We examined the time course of the modification of His-H110C-Cys-less by 10 mM MTSES in the presence of 10 mM glutamate at 4 °C (Fig. 7A). MTSES, as expected, inhibited uptake more slowly than at 25 °C ($t_{1/2}$ = 51 \pm 20 s) (representative experiment). L-Glutamate also protected from the inactivation at 4 °C ($t_{1/2}$ = 339 \pm 121 s) (representative experiment). Thus, L-glutamate protects the Cys¹¹⁰ residue at a step in the transport cycle most likely prior to temperature-sensitive substrate-induced conformational changes. The degree of protection by glutamate was lower at 4 °C ($t_{1/2}$ increased 7-fold) than at 25 °C ($t_{1/2}$ increased 24-fold). This can be explained by additional tempera-

FIG. 9. **Topological model of human xCT.** The 12 transmembrane domains are numbered, and the re-entrant loop is marked (*I*). The *dark circles* indicate biotinylation from outside, and the *stars* indicate biotinylation from inside. The *large white circles* indicate no biotinylation even after SLO permeabilization, and the *crossed circles* indicate very low activity when substituted by cysteine (<25% of His-Cys-less xCT). The *black circle* within the *open circle* (Thr¹¹²) indicates the accessibility from the outside to MTSES and MTSET but not to BM. Cys¹⁵⁸ involved in the disulfide bridge with 4F2hc is indicated with a *C* in a *square*.



ture-sensitive substrate-induced conformational changes or by a lower affinity for glutamate at 4 °C. Confirmation that substrates block the modification by MTSES at a step prior to substrate translocation could not be carried out with the non-substrate inhibitor 4-S-CPG because the inhibitor did not dissociate even after a 30-min wash (data not shown).

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first experimental evidence for the overall membrane topology of transporter xCT as a model for the LSHATs. Our data (Figs. 3 and 4) revealed residues of the xCT transporter compatible with 12 transmembrane domains and the N and C termini located intracellularly (Fig. 9). This is in agreement with predictions by membrane topology algorithms (*e.g.* HMMTOP; Fig. 4A). Independent evidence for the intracellular location of the N and C termini was obtained by immunodetection of N- and C-tagged versions of xCT only after plasma membrane permeabilization (Fig. 1). The intracellular location of the C terminus of LSHATs is in agreement with functional concatamers Nterm-b^{0,+}T-rBAT-Cterm (29) and Nterm-xCT-4F2hc-Cterm.³ The N terminus of 4F2hc is located intracellularly (10), and therefore these concatamers would only be functional with light subunits with an intracellular C terminus. Similarly, the extracellular location of residue Leu¹⁶³ (extracellular loop EL3–4) (Figs. 3A and 4B) is in agreement with the participation of the conserved neighbor residue Cys¹⁵⁸ in the disulfide bridge that covalently links the light and heavy subunits of HATs (3, 30). The 12-transmembrane domain model of xCT gives structural support to the transport function of LSHATs in the absence of the heavy subunit, as has been demonstrated for b^{0,+}AT (11).

Biotinylation of residues after permeabilization with SLO within the putative IL4–5 of xCT was difficult. IL4–5 comprises residues 180–193 (Fig. 9). Biotinylation was only accomplished at the ends of this loop (S181C and F193C). Cysteine substitution mutants of residues Ile¹⁸², Ser¹⁸⁵, Ser¹⁸⁷, Ala¹⁸⁸, Ile¹⁹⁰, and Ile¹⁹² showed no biotinylation after SLO permeabilization (Fig. 9). Similarly, no topology information is available on the C-terminal half of the IL2–3. Residues Phe¹¹⁸, Leu¹²¹ (Fig. 4C), and Pro¹²² (data not shown) showed neither biotinylation nor inactivation with MTS reagents, and residues Ala¹²³, Phe¹²⁴, Arg¹²⁶, and Glu¹³⁰ do not tolerate replacement by cysteine (Table I). This suggests that most of IL4–5 and the C-terminal half of IL2–3 is hidden. Whether this is due to insertion in the plasma membrane or interaction within these intracellular loops or with the intracellular N terminus of

4F2hc is unknown at present. Further studies are needed to test these possibilities.

Biotinylation of residues within the N-terminal half of the putative IL2–3 suggests a re-entrant loop structure (Fig. 9). Residues Thr¹⁰², Gly¹⁰⁹, and Glu¹¹⁶ are biotinylated from inside, whereas residue His¹¹⁰ is biotinylated from outside (Figs. 4c and 5). Moreover, mutants H110C and T112C, in a cysteine-less background, are inactivated or stimulated by the membrane-impermeable reagent MTSES, respectively (Fig. 6). Thus, there are two residues (His¹¹⁰ and Thr¹¹²) with accessibility from outside flanked by residues with accessibility from inside (Thr¹⁰², Gly¹⁰⁹, and Glu¹¹⁶) within a stretch of 15 residues (Fig. 9). This arrangement is reminiscent of pore loops from ion channels (31, 32), glutamate receptors (33) and more recently described transporters (*e.g.* glutamate transporters GLT1, EAAT1, and GltT; the Na⁺/Ca²⁺ exchanger NCX1; and the citrate/malate transporter CimH) (17, 34–39). The re-entrant loop of xCT shares common characteristics with those mentioned above: 1) Substrates (L-glutamate and L-cysteine) and the nontransportable inhibitor (4-S-CPG) protect against the modification of the key residue H110C (Figs. 5, 7, and 8). 2) The re-entrant loop has a restricted external accessibility, apparently to residues His¹¹⁰ and Thr¹¹². Topology of Tyr¹¹¹ could not be determined with the methodology available because of a plasma membrane trafficking defect of His-Y111C-Cys-less (Supplemental Fig. B). His¹¹⁰ is, among the residues studied within IL2–3, the only one with BM accessibility from outside. (Figs. 4C and 5). This suggests that this residue is located within the apex of the re-entrant loop. 3) As indicated by the solved structure of potassium channels, it appears that the apex of re-entrant pore loops does not reach the levels of the phospholipids head groups on the other side of the membrane (31). BM reacts only with cysteines exposed to the aqueous phase. The clear biotinylation of H110C from outside suggests few steric restrictions within the external access channel to the apex of the xCT re-entrant loop. Residue G109C, next to the external apex of the re-entrant loop, is biotinylated from inside. Thus, the internal face of the transporter should be wide enough to allow access to the bulky BM at this position.

We also provide evidence that His¹¹⁰ lies close to the substrate binding/permeation pathway of xCT: 1) BM biotinylation of H110C is blocked by substrates and the nontransportable inhibitor 4-S-CPG (Fig. 5). 2) His¹¹⁰-dependent transport inactivation by MTSES is protected by xCT substrates with an IC₅₀ similar to the K_m (Fig. 8). This protection is temperature-independent (Fig. 7), suggesting that no large conformational changes are involved. 3) Replacement of His¹¹⁰ by cysteine (His-H110C) or aspartate (His-H110D) (mimicking LSHATs

³ C. del Rio, N. Reig, and M. Palacín, unpublished data.

with neutral amino acid substrates like LAT1, LAT2, and asc1; Supplemental Fig. E) had no significant effect on the K_m for xCT substrates (Table I) nor the substrate specificity of the transporter. Thus, His-H110C and His-H110D did not induce transport of amino acids specific to other LSHATs (e.g. L-leucine, L-alanine, and L-arginine) (data not shown). In contrast, replacement of His¹¹⁰ by lysine (His-H110K) resulted in an inactive transporter that reached the plasma membrane (Supplemental Fig. E), suggesting that the large side chain of lysine is not tolerated at this position. This suggests that His¹¹⁰, within the apex of a re-entrant loop, is close to the substrate binding/permeation pathway of the transporter, but it might not interact with the substrate in the transport cycle. MTS reagent modification of His¹¹⁰ may produce steric hindrance for substrate occupancy of the binding site or permeation through the transporter. Alternatively His¹¹⁰ might be located within a water-filled substrate translocation pathway that extends to the cytoplasm-membrane interface. Perhaps this issue can only be solved after successful crystallization and structure determination of LSHATs.

Only two critical xCT residues have been described: Cys³²⁷ (16) and His¹¹⁰ (present study). Both residues show external accessibility, and inactivation by their modification is protected by xCT substrates with an IC₅₀ similar to the K_m and in a temperature-independent manner. In addition, the two residues present clear differences: 1) C327S and C327A increases glutamate K_m 1.5–2-fold, suggesting a role in substrate binding or permeation. 2) His¹¹⁰ is located in the external apex of re-entrant loop I, whereas Cys³²⁷ is most probably located within transmembrane domain 8 (Fig. 9). 3) These residues present striking differences in their reactivity to thiol reagents. Cys³²⁷ is reactive with PCMB and PCMBs but is not accessible to MTS reagents. For these latter reagents, H110C shows a range of accessibility: MTSES > MTSEA > MTSET (Figs. 5 and 6). The size of the reagent does not appear important because H110C is accessible to BM. Similar results have been reported for residue Arg⁴²⁰ within the external apex of a re-entrant loop in the citrate and malate transporter CimH (36). It is tempting to explain the different reactivity of the MTS reagents in these residues by assuming that the entrance pathway for the substrate from the outside would be optimized for negative substrates (glutamate and anionic cysteine for xCT and citrate and malate for CimH) and the negative membrane-impermeable MTSES. In all, this suggests different roles and locations for His¹¹⁰ and Cys³²⁷ in xCT. A preliminary model of the amino acid-binding site has recently been proposed for the LSHATs LAT1 and γ^+ LAT1 (40, 41). The authors suggest three recognition subsites: one for the α -carboxyl group, one for the α -amino group, and one for the side chains. The first two may be similar or conserved among all LSHATs, and Cys³²⁷ might be part of these subsites. In contrast, His¹¹⁰ might be close to the side chain subsites, which would recognize a carboxylate group in the case of xCT.

Our results provide experimental support for 12 transmembrane domains for xCT, indicate a re-entrant loop-like structure between transmembrane domains 2 and 3, and identify His¹¹⁰, at the apex facing outside of this re-entrant loop, accessibility to which is restricted by substrates and the inhibitor 4-S-CPG. Functional studies of substituted residues and cysteine accessibility analyses are in progress to gain a more detailed knowledge of the functional key residues and membrane topology of xCT.

Acknowledgment—We thank Robin Rycroft for editorial help.

REFERENCES

- Chillaron, J., Roca, R., Valencia, A., Zorzano, A., and Palacin, M. (2001) *Am. J. Physiol.* **281**, F995–F1018
- Verrey, F., Meier, C., Rossier, G., and Kuhn, L. C. (2000) *Pfluegers Arch. Eur. J. Physiol.* **440**, 503–512
- Bassi, M. T., Gasol, E., Manzoni, M., Pineda, M., Riboni, M., Martin, R., Zorzano, A., Borsani, G., and Palacin, M. (2001) *Pfluegers Arch. Eur. J. Physiol.* **442**, 286–296
- Sato, H., Tamba, M., Ishii, T., and Bannai, S. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 11455–11458
- Sato, H., Tamba, M., Kuriyama-Matsumura, K., Okuno, S., and Bannai, S. (2000) *Antioxid. Redox. Signal.* **2**, 665–671
- Bannai, S., Sato, H., Ishii, T., and Sugita, Y. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 18480–18484
- Sasaki, H., Sato, H., Kuriyama-Matsumura, K., Sato, K., Maehara, K., Wang, H., Tamba, M., Itoh, K., Yamamoto, M., and Bannai, S. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 44765–44771
- Barger, S. W., and Basile, A. S. (2001) *J. Neurochem.* **76**, 846–854
- Piani, D., and Fontana, A. (1994) *J. Immunol.* **152**, 3578–3585
- Fenczik, C. A., Zent, R., Dellos, M., Calderwood, D. A., Satriano, J., Kelly, C., and Ginsberg, M. H. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 8746–8752
- Reig, N., Chillaron, J., Bartocioni, P., Fernandez, E., Bendahan, A., Zorzano, A., Kanner, B., Palacin, M., and Bertran, J. (2002) *EMBO J.* **21**, 4906–4914
- Boado, R. J., Li, J. Y., and Partridge, W. M. (2003) *J. Neurochem.* **84**, 1322–1331
- Torrents, D., Mykkanen, J., Pineda, M., Feliubadalo, L., Estevez, R., de Cid, R., Sanjurjo, P., Zorzano, A., Nunes, V., Huoponen, K., Reinikainen, A., Simell, O., Savontaus, M. L., Aula, P., and Palacin, M. (1999) *Nat. Genet.* **21**, 293–296
- Feliubadalo, L., Font, M., Purroy, J., Rousaud, F., Estivill, X., Nunes, V., Golomb, E., Centola, M., Aksentjevich, I., Kreiss, Y., Goldman, B., Pras, M., Kastner, D. L., Pras, E., Gasparini, P., Bisceglia, L., Beccia, E., Gallucci, M., de Sanctis, L., Ponzone, A., Rizzoni, G. F., Zelante, L., Bassi, M. T., George, A. L., Jr., Palacin, M., and (1999) *Nat. Genet.* **23**, 52–57
- Font, M. A., Feliubadalo, L., Estivill, X., Nunes, V., Golomb, E., Kreiss, Y., Pras, E., Bisceglia, L., d'Adamo, A. P., Zelante, L., Gasparini, P., Bassi, M. T., George, A. L., Jr., Manzoni, M., Riboni, M., Ballabio, A., Borsani, G., Reig, N., Fernandez, E., Zorzano, A., Bertran, J., and Palacin, M. (2001) *Hum. Mol. Genet.* **10**, 305–316
- Jimenez-Vidal, M., Gasol, E., Zorzano, A., Nunes, V., Palacin, M., and Chillaron, J. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 11214–11221
- Grunewald, M., Bendahan, A., and Kanner, B. I. (1998) *Neuron* **21**, 623–632
- Bertran, J., Werner, A., Moore, M. L., Stange, G., Markovich, D., Biber, J., Testar, X., Zorzano, A., Palacin, M., and Murer, G. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 5601–5605
- Wang, H., Tamba, M., Kimata, M., Sakamoto, K., Bannai, S., and Sato, H. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **305**, 611–618
- Pineda, M., Wagner, C. A., Broer, A., Stehberger, P. A., Kaltenbach, S., Gelpi, J. L., Martin, D. R., Zorzano, A., Palacin, M., Lang, F., and Broer, S. (2004) *Biochem. J.* **377**, 665–674
- Karlin, A., and Akabas, M. H. (1998) *Methods Enzymol.* **293**, 123–145
- Fernandez, E., Carrascal, M., Rousaud, F., Abian, J., Zorzano, A., Palacin, M., and Chillaron, J. (2002) *Am. J. Physiol.* **283**, F540–F548
- Tusnady, G. E., and Simon, I. (2001) *Bioinformatics* **17**, 849–850
- Patel, S. A., Warren, B. A., Rhoderick, J. F., and Bridges, R. J. (2004) *Neuropharmacology* **46**, 273–284
- Chen, J. G., and Rudnick, G. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 1044–1049
- Seal, R. P., and Amara, S. G. (1998) *Neuron* **21**, 1487–1498
- Androutsellis-Theotokis, A., Ghassemi, F., and Rudnick, G. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 45933–45938
- Lopez-Corcuera, B., Nunez, E., Martinez-Maza, R., Geerlings, A., and Aragon, C. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 43463–43470
- Pfeiffer, R., Loffing, J., Rossier, G., Bauch, C., Meier, C., Eggermann, T., Loffing-Cueni, D., Kuhn, L. C., and Verrey, F. (1999) *Mol. Biol. Cell* **10**, 4135–4147
- Pfeiffer, R., Spindler, B., Loffing, J., Skelly, P. J., Shoemaker, C. B., and Verrey, F. (1998) *FEBS Lett.* **439**, 157–162
- Doyle, D. A., Morais, C. J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (1998) *Science* **280**, 69–77
- MacKinnon, R. (1995) *Neuron* **14**, 889–892
- Kuner, T., Wollmuth, L. P., Karlin, A., Seeburg, P. H., and Sakmann, B. (1996) *Neuron* **17**, 343–352
- Grunewald, M., and Kanner, B. I. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 9684–9689
- Iwamoto, T., Uehara, A., Imanaga, I., and Shigekawa, M. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 38571–38580
- Krom, B. P., and Lolkema, J. S. (2003) *Biochemistry* **42**, 467–474
- Seal, R. P., Leighton, B. H., and Amara, S. G. (2000) *Neuron* **25**, 695–706
- Shigekawa, M., Iwamoto, T., Uehara, A., and Kita, S. (2002) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **976**, 19–30
- Slotboom, D. J., Sobczak, I., Konings, W. N., and Lolkema, J. S. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 14282–14287
- Kanai, Y., and Endou, H. (2001) *Curr. Drug Metab.* **2**, 339–354
- Uchino, H., Kanai, Y., Kim, d. K., Wempe, M. F., Chairoungdua, A., Morimoto, E., Anders, M. W., and Endou, H. (2002) *Mol. Pharmacol.* **61**, 729–737

1. HACIA UNA MEJOR COMPRENSIÓN DE LA CISTINURIA

1.1. Nuevas mutaciones en cistinuria

En esta tesis se describen un total de 32 mutaciones nuevas en *SLC3A1*. Junto con las 16 mutaciones nuevas en *SLC7A9* caracterizadas por Mariona Font y Luigi Bisceglia (artículo 3), suman un total de 48 mutaciones nuevas en cistinuria. Desde que se identificaron ambos genes hasta la fecha de escritura de esta tesis se han caracterizado un total de 103 mutaciones en *SLC3A1* y 66 en *SLC7A9*. Estas mutaciones incluyen cambios y pérdidas de sentido, defectos de *splicing*, desplazamientos de la pauta de lectura, y grandes reordenamientos.

De entre todas las mutaciones nuevas identificadas hay que destacar las que provocan defectos en el mRNA. Entre ellas, mutaciones exónicas silentes, como la c.586C>T en *SLC7A9*, que crea un donador de *splicing* alternativo; o mutaciones intrónicas, como la c.1012-23C>G en *SLC3A1*, que produce el *skipping* del exón 6, y que podría estar localizada en un *enhancer* de *splicing* intrónico (ISE), ya que se encuentra en medio de un motivo rico en A y C, hecho que apunta a favor de que esta región sea un ISE, como se ha visto para otras secuencias ricas en A y C (ACEs o A/C rich ISEs, (Coulter et al., 1997)). Se han descrito mutaciones intrónicas situadas lejos de las secuencias consenso de *splicing* que producen anomalías en el mismo, en el gen *TSC2*, causante de la esclerosis tuberosa (Mayer et al., 2000), y en el gen *MTM1*, causante de la miopatía tubular (Tanner et al., 1999), entre otros. En los pacientes de la base de datos del ICC no disponemos de muchas muestras de RNA, de manera que no hemos podido analizar el impacto de las mutaciones puntuales en el mRNA.

Las mutaciones que afectan las secuencias consenso de *splicing* representan un 15% en las enfermedades genéticas humanas (Krawczak et al., 1992). En cambio, la caracterización de numerosas mutaciones en el gen de la neurofibromatosis NF1 (Ars et al., 2000) y en el gen de la ataxia-telangiectasia ATM (Teraoka et al., 1999) demuestra que el 43-48% de estas mutaciones causan alteraciones de *splicing*. Incluso mutaciones de cambio de sentido o de pérdida de sentido que a primera vista podríamos pensar que afectan la función de la proteína, producen una anomalía en el *splicing* porque afectan *enhancers* exónicos de *splicing* (ESEs). Este podría ser el caso de la mutación c.1035G>A en *SLC3A1*, que según el programa de predicción ESEfinder (Cartegni et al., 2003), está localizada en medio de un ESE reconocido por el complejo SF2/ASF (Liu et al., 1998). De hecho, M.Font ha detectado recientemente que la mutación R333W (c.997C>T) en b^{0,+}AT produce defectos de *splicing* en lugar de un cambio de sentido. Esta mutación, localizada también en un ESE putativo, sufre dos procesos erróneos de *splicing* cuando se transcribe: un *skipping* del exón 9 y 10 [r.874_1074del201] y un *skipping* del exón 10 [r.978_1074del201]. El exón 10 es el que contiene el cambio nucleotídico, pero no se ha detectado nunca la presencia de mRNA con el cambio de sentido. En el caso de traducirse, estos dos transcritos originarían dos proteínas diferentes: T292_Y358del67 (delección en pauta), y R327fsX2 (rotura de pauta) (Tesis doctoral M.Font, en fase de escritura). Por lo tanto, en este caso, el defecto de transporte de la

Discusión

mutación R333W no se puede asociar al fenotipo observado en el paciente, aunque es útil para conocer la importancia de este residuo en la función del transportador. Estos hechos remarcan la importancia de investigar las consecuencias en el mRNA de cambios intrónicos fuera de las secuencias consenso y del resto de mutaciones puntuales en las regiones codificantes del gen.

Como se ha explicado en la Introducción, el dominio extracelular de rBAT presenta homología con α -glucosidasas. Todas las mutaciones puntuales de rBAT responsables de cistinuria, excepto la mutación L89P, se encuentran en este dominio. Sin embargo, estudios preliminares del mutante L89P no revelan más información acerca de las HSHATS. Como el resto de mutantes de cistinuria en rBAT, se trata de un mutante de tráfico, aunque no se ha comprobado si además provoca cambios cinéticos o en el estado oligomérico. En este sentido, sólo se ha descrito una mutación en rBAT (R365W) que altera las propiedades funcionales del holotransportador (Pineda et al., 2004b). Este hecho es muy interesante ya que como ya se ha comentado, la subunidad $b^{0,+}AT$ es la subunidad catalítica y es funcional en ausencia de rBAT (Reig et al., 2002). De hecho, la afinidad de $b^{0,+}AT$ por la arginina extracelular en un sistema reconstituido y en ausencia de rBAT es muy superior (K_m 0.5 μM) a la que presenta rBAT/ $b^{0,+}AT$ en células HeLa (K_m 200 μM) (Reig et al., 2002). Esta diferencia podría ser debida, al menos en parte, a la presencia de rBAT. Además, estudios de reconstitución del concaténmero rBAT- $b^{0,+}AT$ sugieren que este presenta un comportamiento similar al holotransportador en células HeLa (C. del Río, comunicación personal). También se ha demostrado que la afinidad de $b^{0,+}AT$ por sus sustratos varía cuando se expresa junto con rBAT o 4F2hc en células HRPE (Rajan et al., 2000). Por lo tanto, diferentes evidencias sugieren que rBAT afecta las propiedades cinéticas del transportador $b^{0,+}$. Este hecho, y que la estructura oligomérica de rBAT/ $b^{0,+}AT$ sea un heterotetrámero, a diferencia de los sistemas estudiados con 4F2hc, que son heterodímeros (ver más adelante en esta discusión), hace interesante realizar más estudios cinéticos y de oligomerización de mutantes de cistinuria en rBAT.

En su conjunto, el estudio que se presenta en esta tesis representa el mayor porcentaje de alelos explicados en una muestra grande de pacientes cistinúricos, recogida en la base de datos del ICC, y que incluye pacientes principalmente de origen Italiano, español y judío-libio. Se ha completado la búsqueda de mutaciones en un total de 164 familias de la base de datos del ICC, representando 164 pacientes independientes completamente genotipados, y el mayor porcentaje de alelos explicados en una gran cohorte de pacientes (86.8 %; 282 de 325 alelos). La proporción de alelos identificados es similar en los pacientes con distintos tipos de cistinuria (~89.3%) aunque es un poco más bajo en pacientes no tipados (~83.6%), lo que podría ser atribuido a la presencia de portadores de *SLC7A9* con urolitiasis de cistina. En un estudio reciente (Schmidt et al., 2003) sólo se explican el 64.7% de los alelos (75 de 116 alelos). De hecho, el primer artículo presentado en esta tesis, en el que se analizó únicamente mutaciones en *SLC3A1* en alelos de tipo I, resultó en la caracterización del 73.9% del total de cromosomas de tipo I, representado un aumento considerable en la proporción de alelos de tipo I explicados en comparación con estudios previos (Bisceglia et al., 1996; Gasparini et al., 1995; Horsford et al., 1996).

Las mutaciones más frecuentes en *SLC3A1* y *SLC7A9*, son M467T (26.4%) y G105R (27.4%), respectivamente. Esto concuerda con otros estudios en otras cohortes más pequeñas de pacientes con cistinuria (Botzenhart et al., 2002; Gitomer et al., 1998; Harnevik et al., 2001). Las cinco mutaciones más comunes en *SLC3A1* y en *SLC7A9* suman, respectivamente, el 44.8% y el 63.1% de los alelos identificados en cada gen. Además, 55 mutaciones en *SLC3A1* y 45 en *SLC7A9* cubren, respectivamente, 125 y 157 alelos explicados, lo que significa que en la base de datos del ICC, *SLC3A1* presenta más heterogeneidad genética que *SLC7A9*. En total, las mutaciones en *SLC3A1* y en *SLC7A9* son responsables del 44.3% y 55.7% de los alelos explicados, respectivamente. Estas son las primeras frecuencias relativas que se dan, pero deben ser vistas con precaución ya que el ICC fue muy activo recogiendo casos de cistinuria de tipo no-I con el objetivo de identificar el gen *SLC7A9* (Bisceglia et al., 1997; Feliubadalo et al., 1999), con lo que la prevalencia de mutaciones en *SLC7A9* podría estar sobrestimada.

1.2. Necesidad de una nueva clasificación genética

El gran número de alelos caracterizados ha permitido aumentar el conocimiento de las características clínicas de la enfermedad en los homocigotos, y nos ha llevado a establecer una nueva clasificación de la cistinuria, basada en los datos genéticos. La necesidad de esta nueva clasificación surge a partir del número relativamente elevado de portadores de mutaciones en *SLC7A9* encontrados (14%), que presentan un patrón de excreción urinario normal (fenotipo I), y que hace imprecisa la clasificación tradicional, basada en el fenotipo. Además, la identificación de una mutación en *SLC3A1* que presenta fenotipo no-I, duE5-E9, por vez primera en cistinuria, también hace necesario el establecimiento de esta nueva clasificación basada en el genotipo. La nueva clasificación genética divide los tipos de cistinuria en: tipo A, causada por dos mutaciones en *SLC3A1* (rBAT), tipo B, causada por dos mutaciones en *SLC7A9* ($b^{0,+AT}$), y un posible tercer tipo, AB, con una mutación en cada gen. Esta nueva clasificación no descarta la que está basada en el fenotipo, sino que ambas son complementarias y necesarias para establecer una buena correlación genotipo-fenotipo.

Rozen y colaboradores identificaron dos heterocigotos de tipo I con mutaciones en *SLC7A9*, I44T y P261L, respectivamente (Leclerc et al., 2002). En nuestra base de datos hay 10 mutaciones más en *SLC7A9* de este tipo. Cuatro de ellas (A182T, T123M, A126T y P261L) afectan residuos de aminoácidos no conservados en la familia de subunidades ligeras (LSHATS). A182T es una mutación suave, con defecto de tráfico hacia la membrana plasmática (Reig et al., 2002) y con una actividad residual de transporte sustancial (~50%) (Font et al., 2001). Resulta interesante que pacientes BB con cistinuria de tipo mixto o de tipo I (es decir, con heterocigotos de tipo B y fenotipo I en sus familias), también presenten un fenotipo urinario suave (tabla 8 y figura 1 artículo 3). Esto concuerda con el fenotipo urinario suave detectado anteriormente para pacientes con cistinuria de tipo mixto (Goodyer et al., 1998). El defecto leve detectado en el transporte de aminoácidos en estos mutantes podría estar indicando las causas del fenotipo urinario suave de estos pacientes. En cambio, otras mutaciones que presentan fenotipo I en heterocigotos implican residuos de aminoácidos

Discusión

conservados (I44T, G63R, G105R, V170M, G195R, y Y232C), o resultan en grandes cambios en la proteína (W69X, que trunca b^{0,+}AT después del primer dominio trans-membrana; y c.614dupA, que resulta en el *skipping* de los exones 5 y 6, según estudios de mRNA (Tesis doctoral Mariona Font, en proceso de escritura)). De ellas, las mutaciones G105R y V170M presentan muy poca función de actividad de transporte (Font et al., 2001). Hay que remarcar que una pequeña proporción de heterocigotos portadores de las mutaciones severas y frecuentes como c.614dupA (uno de 19 portadores) y G105R (uno de 32 portadores), presentan fenotipo I, mientras que un cuarto de los heterocigotos portadores de V170M manifiestan fenotipo I (todos de origen judío libio). Esto indica que, además de la actividad residual, otros factores (ambientales o genéticos) contribuyen al fenotipo urinario de los portadores.

Algunos heterocigotos para la mutación dupE5-E9 de *SLC3A1*, que resulta en la duplicación en pauta del fragmento E298-D539 de rBAT, presentan fenotipo no-I (tabla 6, artículo 3). Todas las demás mutaciones de *SLC3A1*, incluyendo algunas muy severas en la secuencia de rBAT (p.ej. c.163delC que produce un desplazamiento de la pauta de lectura provocando la aparición de un codón de stop cercano, eliminando los dominios trans-membrana y extracelular (p.Q55fsX51) y c.431_2055del, que elimina el 80% de los residuos del extremo C-terminal (p.G144-C685del)), muestran fenotipo I, tanto en este estudio como en los publicados anteriormente (Botzenhart et al., 2002; Calonge et al., 1994; Horsford et al., 1996; Saadi et al., 1998). Esto indica que la mutación dupE5-E9 tiene un efecto dominante negativo en el complejo heteromérico rBAT/b^{0,+}AT. El estudio funcional de esta mutación revelará si el fenotipo no-I refleja heterodimerización con b^{0,+}AT, resultando en un complejo heteromérico no-activo, y puede proporcionar más información estructural y funcional del complejo heterotetramérico 2x(rBAT/b^{0,+}AT) que se observa mediante las técnicas BN PAGE, cromatografía de exclusión molecular, *crosslinking* y FRET *in vivo*.

Clínicamente, no se observan diferencias evidentes entre los pacientes clasificados según el fenotipo o el genotipo. El año de establecimiento, las consecuencias clínicas y la severidad de la enfermedad no difiere entre los subtipos, ni tampoco hay diferencias evidentes en la formación de cálculos ni en el número de intervenciones por año. Sin embargo no se debe olvidar que el tratamiento recibido por los pacientes puede haber influido, eliminando las diferencias entre pacientes. Casos severos pueden haber recibido un tratamiento más fuerte. En cambio, sí se observan diferencias respecto al género. Los hombres producen más cálculos que las mujeres de manera significativa. Las diferencias en severidad entre géneros, además de las diferencias dentro de una misma familia entre hermanos gemelos que comparten las mismas mutaciones (Dello et al., 2002) sugiere que otros factores, genéticos y ambientales, juegan un papel en la determinación del fenotipo final. En este sentido, el hecho que algunos ratones *Stones* (*knockout* de *slc7a9*), generados en un *background* genético mixto (Feliubadalo et al., 2003), desarrollen cálculos de cistina a una edad temprana mientras que otros no los desarrollen en el primer año de vida, apoya la implicación de genes modificadores en el fenotipo litiasico.

1.3. Implicación de la digenia en cistinuria

La clasificación genética de la cistinuria abre la posibilidad de digenia en el tipo AB, sobretudo en las familias clasificadas como tipo mixto con una mutación en cada gen. En la base de datos del ICC sólo 3 pacientes son dobles heterocigotos compuestos con mutaciones en ambos genes. Se ha descrito otro paciente AA(B) (Harnevik et al., 2003), pero no se muestra su fenotipo urinario. El grado de aminoaciduria de este tipo de pacientes y de sus familiares, y el hecho de que ninguno de los individuos AB presente urolitiasis de cistina, indica que la herencia digénica en cistinuria tiene sólo un efecto parcial en el fenotipo, restringida a un impacto variable en la aminoaciduria. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que algunas combinaciones de mutaciones A y B produzcan suficiente hiperexcreción de cistina para causar urolitiasis. En este sentido, la actividad urolitiásica de los individuos B/+, con una baja penetrancia para la urolitiasis de cistina (1.7%), podría verse agravada por la adición del efecto de un alelo de tipo A.

Los estudios iniciales de expresión de rBAT y $b^{0,+}AT$ en células COS (Feliubadalo et al., 1999) en células Hela (Fernandez et al., 2003) y en células MDCK (Bauch and Verrey, 2002) han demostrado que ambas proteínas se necesitan mutuamente para llegar a la superficie celular. Además, la presencia de $b^{0,+}AT$ estabiliza la proteína rBAT y permite la maduración de sus N-glicosilaciones, y en consecuencia, la expresión del heterodímero rBAT/ $b^{0,+}AT$ en la superficie (Bauch and Verrey, 2002;Reig et al., 2002). Por otro lado, como se ha comentado anteriormente, $b^{0,+}AT$ es estable y catalíticamente activa cuando se expresa en proteoliposomas en ausencia de rBAT (Reig et al., 2002). Estos resultados han sugerido un modelo para la biogénesis de rBAT, donde $b^{0,+}AT$ actúa de chaperona de la subunidad pesada (figura 36): $b^{0,+}AT$ se sintetiza en el retículo endoplasmático (1); rBAT se sintetiza en el retículo y adquiere una conformación inmadura que es inestable (2); $b^{0,+}AT$ se une a rBAT y la estabiliza (3); se produce el tráfico del complejo al aparato de Golgi, donde se produce la maduración de la glicosilación de rBAT (4); finalmente, se produce el tráfico del holotransportador a la membrana plasmática.

Basándonos en este modelo de biogénesis (figura 36) se pueden hacer diversas hipótesis para explicar el hecho que las mutaciones en *SLC3A1* presenten un fenotipo recesivo, mientras que la mayoría de mutaciones en *SLC7A9* presenten un fenotipo parcialmente dominante. Una de las hipótesis sería que mutaciones en la subunidad ligera $b^{0,+}AT$ tengan un efecto dominante negativo sobre rBAT, pero no a la inversa. Esta posibilidad no ha sido estudiada experimentalmente. Por otro lado, la mutación nula del KO de $b^{0,+}AT$ (Stones) causa también un fenotipo recesivo incompleto (Feliubadalo et al., 2003). La hipótesis más probable es que rBAT se encuentra en exceso respecto a $b^{0,+}AT$ en el túbulo proximal y que $b^{0,+}AT$ controla la expresión funcional del complejo heteromérico rBAT/ $b^{0,+}AT$. La interacción con $b^{0,+}AT$ estabiliza rBAT y el exceso de rBAT es degradado, como se observa en células transfectadas (Bauch and Verrey, 2002;Reig et al., 2002). Entonces, aunque mutaciones en heterocigosis en rBAT (excepto dupE5-E9), provocasen la degradación de la proteína mutada, su exceso permitiría la expresión necesaria del heterodímero rBAT/ $b^{0,+}AT$ en la membrana plasmática, y por lo tanto no conducirían a la hiperexcreción de aminoácidos

(fenotipo I). En cambio, mutaciones en $b^{0,+}AT$ en heterocigosis (heterocigotos de mutaciones en *SLC7A9* severas o el heterocigoto del ratón *knockout* (Feliubadalo et al., 2003)) provocarían disminución significativa en la expresión del complejo heteromérico $rBAT/b^{0,+}AT$ en la membrana plasmática, causando hiperexcreción de cistina y aminoácidos dibásicos (fenotipo no-I). Esto está de acuerdo con el hecho de que, en los heterocigotos portadores de mutaciones en $b^{0,+}AT$ se den fenotipos I o no-I, en función de la severidad de la mutación, y de la existencia de pacientes B/+ con urolitiasis.

La falta de herencia digénica en cistinuria también se podría explicar con este modelo de biogénesis del heterodímero $rBAT/b^{0,+}AT$ (figura 37) y los fenotipos urinarios en cistinuria: en los dobles heterocigotos (AB), la mutación en $rBAT$ no compromete la heterodimerización y tráfico a la membrana plasmática de media dosis de $b^{0,+}AT$ salvaje con la otra media dosis de $rBAT$ salvaje. Así, los individuos se comportan como heterocigotos B con un grado variable de aminoaciduria, que puede ser mayor que en los heterocigotos simples dentro de la familia, dependiendo de la combinación particular de las mutaciones. La demostración de esta hipótesis requiere el estudio en profundidad de mutaciones en $rBAT$ y $b^{0,+}AT$ en la biogénesis (incluyendo la mutación dominante negativa de $rBAT$ *dupE5-E9*).

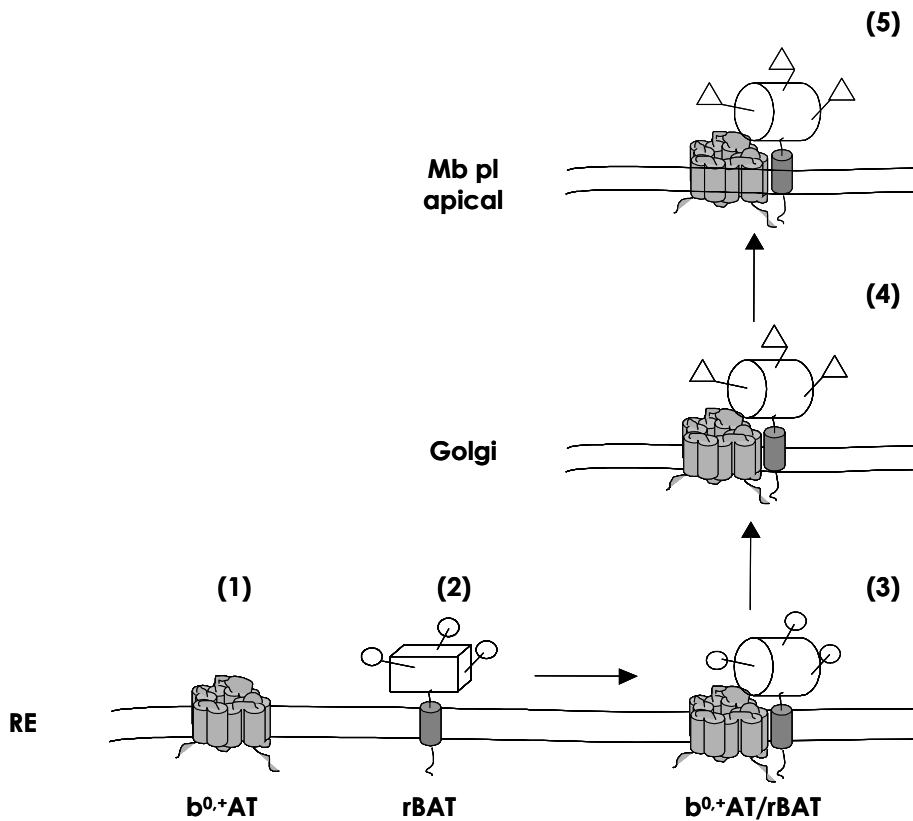


Figura 37 Modelo hipotético de biogénesis del transportador $rBAT/b^{0,+}AT$. La proteína $b^{0,+}AT$ se pliega y alcanza una conformación funcional (1), mientras que $rBAT$ se encuentra en una conformación inestable susceptible de degradación (2). La interacción entre $b^{0,+}AT$ y $rBAT$ permite alcanzar una conformación más estable a $rBAT$ (3), su maduración mediante N-glicosilación (4), y el tráfico del heterodímero hacia la membrana plasmática (5).

1.4. ¿Quedan nuevos genes de cistinuria por identificar?

Experimentalmente, la búsqueda de mutaciones ha sido muy cuidadosa, y se han utilizado diversas técnicas como SSCP, DHPLC, la secuenciación directa, y PCR multiplex semicuantitativa. Se han analizado completamente las regiones codificantes y los límites exón/intrón. Entonces, los alelos de cistinuria no explicados (13.2%) pueden ser debidos a mutaciones en regiones intrónicas o promotoras no analizadas en los dos genes de cistinuria conocidos, a la acción de polimorfismos en combinación con mutaciones específicas de cistinuria, o a la existencia de genes no identificados. Los motivos que apuntan a estas tres posibilidades son:

- La región promotora de estos genes no ha sido analizada completamente, pero es posible que exista un pequeño número de mutaciones en estas regiones. En este sentido, se han publicado dos variantes (G(-265)A y G(-194)C) en la secuencia promotora de *SLC3A1* (Boutros et al., 1999). G(-265)A localiza en un sitio AP-2 y mediante experimentos de transfección se ha visto que disminuye la actividad del promotor a un 60% del salvaje (Boutros et al., 1999). En nuestra cohorte de pacientes hemos realizado una búsqueda de mutaciones en las secuencias promotoras de *SLC3A1* y *SLC7A9* en aquellos pacientes con mutaciones por identificar, aunque no hemos detectado ninguna mutación. En *SLC7A9* existen muchos polimorfismos en la región promotora, pero hacen falta estudios funcionales para saber si están implicados en la enfermedad.
- Mutaciones intrónicas que afecten otras secuencias distintas a los sitios consenso de *splicing* podrían explicar estos alelos, pero serían necesarios estudios de RNA para identificarlas. Como se ha comentado anteriormente no disponemos de muchas muestras de RNA en nuestra cohorte de pacientes.
- Polimorfismos en *SLC3A1* y *SLC7A9*, en combinación con mutaciones específicas de cistinuria, podrían causar la enfermedad, como se ha sugerido (Schmidt et al., 2003). En *SLC7A9* existen muchos polimorfismos (M. Font, tesis doctoral en proceso de escritura). En *SLC3A1*, la mutación de cambio de sentido c.797T>C (F266S), afecta un residuo altamente conservado en las secuencias de rBAT. Detectamos este cambio en 5 alelos cistinúricos de un total de 94 alelos analizados (mientras que sólo 1 en un total de 108 controles). El hecho de que se encuentre en pacientes clasificados como noI/+ (familia 69, una mutación identificada en *SLC7A9*: tipo B/+) y no-I (familia 107, ninguna mutación identificada), hace muy interesante su estudio porque podría estar relacionada con el fenotipo no-I, y en el caso de la familia B/+ podría tratarse de otro caso de digenia. Sin embargo, estudios preliminares de su función no muestran diferencias de actividad respecto a la proteína salvaje, con lo que no parece implicado en la enfermedad. Aun así haría falta más estudios, tanto funcionales (comprobar si se trata de un mutante de tráfico, o si modifica propiedades cinéticas del transportador), como de mRNA (comprobar si afecta el *splicing*), para descartarlo definitivamente.

Discusión

- Un tercer gen de cistinuria no se puede descartar, pero estaría relegado a una proporción muy pequeña de pacientes, y parece improbable (sólo en un 3% de los pacientes no se ha detectado ninguna mutación). El grupo de Goodyer propuso *SLC7A10* como gen candidato para cistinuria (Leclerc et al., 2001). *SLC7A10* se encuentra al lado del gen *SLC7A9* en el cromosoma 19q13.1 y codifica para la subunidad ligera renal asc-1, que forma con 4F2hc el holotransportador asc con selectividad de sustrato para la cistina y otros aminoácidos pequeños neutros. Los autores encontraron la mutación E112D asociada con cistinuria. En cambio, estudios recientes de Marta Pineda y Mariona Font en nuestro grupo descartan esta hipótesis ya que: i) mutaciones específicas de cistinuria no se encuentran en pacientes con alelos no explicados por mutaciones en los dos genes de cistinuria (Pineda et al., 2004a; Schmidt et al., 2004), ii) la mutación conservativa E112D no afecta el transporte de 4F2hc-asc-1 (Pineda et al., 2004a), y iii) el mRNA de asc-1 se expresa en el túbulo distal donde la reabsorción renal de aminoácidos no es relevante, pero donde asc-1 puede tener un papel en regulación osmótica (Pineda et al., 2004a).

Por otro lado, la implicación de LAT-2 en el flujo transepitelial neto de cistina sugiere un papel en la modulación de la reabsorción de este aminoácido. Mutaciones en este gen podrían alterar la reabsorción de cistina, y producir la salida de este aminoácido hacia el lumen tubular. Este mecanismo sería similar al provocado por una disminución en la actividad de transporte basolateral y^+L en la lisinuria con intolerancia proteica (LPI). Sin embargo, la secuenciación de la región codificante de LAT2 en los pacientes de la base de datos del ICC con mutaciones por identificar no ha evidenciado ninguna mutación, únicamente polimorfismos (tesis de Mariona Font, en proceso de escritura). Esto hace pensar que LAT2 no es un gen de cistinuria. Es posible que mutaciones en LAT2 sean deletéreas a causa de su expresión en intestino, placenta, hígado, cerebro y músculo (Pineda et al., 1999). Todavía no se puede descartar la posibilidad de que algunos polimorfismos de LAT2 (que afectasen por ejemplo la K_m intracelular de cisteína u otro aminoácido) pudieran ser en parte, responsables de la variabilidad individual que hay en la reabsorción de cistina tanto en la población control como en pacientes cistinúricos de tipo I y no I. El ratón *knockout* para LAT-2 podría demostrar cual es la función de esta proteína en la reabsorción de cistina y otros aminoácidos en el túbulo proximal y en otros tejidos. Aunque el hecho de que no exista una correlación entre los niveles de excreción de cistina y la formación de cálculos, hace pensar que otros genes no relacionados con la reabsorción de cistina, estén implicados en este fenómeno, como por ejemplo canales iónicos o modificadores de la agregación de microcristales.

En este punto hay que añadir los resultados de los estudios de coimmunoprecipitación y del modelo de ratón *knockout* para *SLC7A9* (*Stones mice*). Estos estudios muestran que rBAT forma complejos en el túbulo proximal de riñón de ratón con otra proteína (rBAT/X), posiblemente de la familia LSHAT y que también podría ser cierto en membranas “brush border” de riñón humanas (Fernandez et al., 2002). Resultados recientes han demostrado que la heterodimerización de rBAT con esta otra proteína tiene lugar en riñones de ratones machos pero no en hembras (E. Fernández y J. Chillarón, comunicación personal). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos a partir del ratón *Stones*, (Feliubadalo et al., 2003): en ratones *knockout* machos rBAT se acompleja con otra proteína pero esto no ocurre

en las hembras *knockout* (L. Feliubadaló, comunicación personal). Entonces, el gen codificante para X podría ser un candidato de cistinuria. Sin embargo, la hiperecreción de aminoácidos en orina en pacientes AA y BB detectada es similar, hecho que no apoya esta hipótesis. Si X codificase para un gen de cistinuria, esperaríamos que los pacientes AA tuviesen un mayor grado de aminoaciduria que los pacientes BB, ya que mientras que las mutaciones en $b^{0,+}AT$ sólo estarían afectando el sistema $b^{0,+}$, mutaciones en rBAT afectarían al sistema $b^{0,+}$ y también la actividad de transporte del complejo heteromérico rBAT/X.

Como se ha presentado en la introducción de esta memoria, estudios recientes realizados por los Drs. J. Chillarón y E. Fernández han identificado en el genoma de ratón una nueva subunidad ligera de la familia LSHAT (*arPAT*, *Aromatic Preferring Amino acid Transporter*) que presenta una identidad de secuencia con el resto de miembros de la familia del 32-43 %. Su caracterización funcional muestra que induce transporte de aminoácidos neutros, preferentemente aromáticos, independiente de sodio, trans-estimulable, estereoselectivo y de baja afinidad (E. Fernández, J. Chillarón y M. Palacín, artículo sometido). Podría representar una variante del sistema de transporte de aminoácidos T (figura 1, Introducción), ya que se clonó por RT-PCR a partir de riñón de ratón (E. Fernández, Tesis Doctoral). Su actividad de transporte se induce tanto cuando *arPAT* se expresa con rBAT o 4F2hc en células HeLa. El ortólogo humano de *arPAT* está silenciado en el genoma humano (E. Fernández, M. Palacín y J. Chillarón, artículo sometido). De hecho, es uno de los 33 genes ya identificados como silenciados en los genomas humano y de chimpancé (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004).

Es atractivo pensar que la proteína *arPAT* pudiera ser la subunidad X de rBAT. Experimentos de *Northern blot* presentan señal de *arPAT* en riñón, intestino delgado, cerebro, hígado y corazón pero al aumentar la astringencia de lavado, sólo aparece expresión en cerebro e intestino delgado, perdiendo la señal en riñón (E. Fernández, Tesis Doctoral). Experimentos de hibridación *in situ* parecen confirmar que *arPAT* no se expresa en riñón (E. Fernández y J. Chillarón, comunicación personal). En este caso, cabría descartar la posibilidad de que *arPAT* fuera la subunidad X y, por tanto, todavía faltaría por identificar, al menos, otra subunidad ligera. La búsqueda por BLAST de nuevas subunidades ligeras de la familia HAT en el genoma humano y de ratón no revela la existencia de miembros adicionales para esta familia (Junio 2004), aunque podrían existir nuevos miembros con bajas homologías a las LSHAT ya conocidas hasta el momento.

2. RELACIÓN ESTRUCTURA-FUNCIÓN EN LOS HATS

2.1. Determinación de la mínima unidad funcional en la estructura oligomérica

La coexpresión de proteínas de transporte salvaje y mutante en la misma célula es un método ampliamente utilizado para estudiar interacciones potenciales entre polipéptidos. La supresión de la actividad de transporte por un mutante inactivo coexpresado con el salvaje (dominancia negativa) o restauración de la actividad de transporte por la coexpresión de dos mutantes inactivos (complementación funcional) puede proporcionar evidencias de la organización oligomérica. Con el transportador de tetraciclina Tet, un "antiporter" acoplado a H⁺ con 12 dominios TM, se ha demostrado complementación funcional entre mutantes de cambio de sentido inactivos (Rubin and Levy, 1990). Con la permeasa de lactosa de *E.coli*, que forma parte de la misma superfamilia de transportadores de membrana que Tet, se ha observado complementación con pares de moléculas que contienen grandes deleciones, pero no con mutaciones de cambio de sentido (Bibi and Kaback, 1992). Además, hay numerosos ejemplos de dominancia negativa en receptores y canales de membrana, como en los receptores NMDA (Laube et al., 1998), el canal de potasio MinK (Wang and Goldstein, 1995), y el canal epitelial de Na⁺ (ENAC) (Kosari et al., 1998) entre otros. Estos estudios de coexpresión de alelos activos e inactivos se basan en los trabajos de R. MacKinnon con el canal de K⁺, Na⁺ y Cl⁻, en los que aplica el análisis binomial para determinar la estequiometría de subunidades del canal mediante la coexpresión de la proteína salvaje con mutantes dominantes negativos insensibles a una toxina que inhibe el canal (MacKinnon, 1991).

En la determinación de la unidad funcional mínima de los HATs se han realizado dos tipos de aproximación basadas en el análisis binomial: la primera implica la coinyección de distintas fracciones de cRNA salvaje y mutante, y la segunda se basa en la coexpresión de dos subunidades ligeras fusionadas en tándem en forma de concatenámeros. En una primera aproximación, se utilizaron los mutantes de rBAT E268K y T341A, que son mutaciones de cistinuria. El estudio en el que se identificaron estas mutaciones, sugería que eran mutaciones dominantes negativas (Miyamoto et al., 1995). Sin embargo no pudimos reproducir esos resultados. De hecho no observamos un defecto claro en la actividad de transporte de estos mutantes inyectados en oocitos. Al comprobar el fenotipo de los heterocigotos portadores de estas mutaciones en ese estudio, observamos que eran de tipo no-I. Es posible entonces que los pacientes tuviesen mutaciones en *SLC7A9* y que las mutaciones E268K y T341A en rBAT fuesen polimorfismos (como el caso de F266S). Por este motivo, se han utilizado los mutantes inactivos G54V y L334R en y⁺LAT1, y los mutantes C327S en xCT y C321S en b^{0,+}AT, que pierden la sensibilidad de la proteína salvaje a los reactivos sulfhidrilo pCMB(S) y MTSEA, respectivamente.

En los experimentos de coinyección con los sistemas y^+L y x_c^- , al correlacionar la actividad residual obtenida experimentalmente con la estimada mediante la ecuación binomial, se obtiene mayoritariamente una estequiometría de subunidades funcional de $n=1$ (unidad funcional monomérica, correspondiente al heterodímero) tanto para el sistema y^+L como x_c^- . Sin embargo, en algunas fracciones la actividad residual obtenida experimentalmente corresponde a un valor estimado de $n=2$ con dominancia positiva, tanto en $4F2hc/y^+LAT1$ como en $4F2hc/xCT$. La dificultad de distinguir entre monómero y dímero puede deberse a la dificultad del método de coinyección en sí: en primer lugar, la coinyección en oocitos de cantidades iguales de dos cRNAs diferentes no garantiza que un porcentaje dado de cRNA de lugar a la cantidad correspondiente de proteína expresada en la membrana. Por ejemplo, la expresión en membrana de una proteína podría estar favorecida sobre la otra, dependiendo del estado de la maquinaria de expresión del oocito; en segundo lugar, la expresión puede variar significativamente entre distintas isoformas del mismo transportador. En este sentido, se ha observado que las isoformas humanas y de ratón del transportador NaPi-IIa, que presentan elevada identidad molecular con la isoforma de rata, presentan significativamente menor expresión funcional (hasta 5 veces) para la misma cantidad de cRNA inyectado y la misma preparación de oocitos (Kohler et al., 2000); y en tercer lugar, los valores de expresión o actividad en función del tiempo de dos proteínas puede diferir dependiendo de los oocitos individualmente o entre ranas. En cuanto al tipo de dominancia que se observa en algunas fracciones (positiva), significaría que un monómero activo complementa la falta de actividad del monómero inactivo, como ocurre en el caso del transportador de tetraciclina Tet (Rubin and Levy, 1990). Sin embargo, aunque existen numerosos ejemplos con mutantes inactivos puntuales y sería válido para el caso de y^+LAT-1 , no existen ejemplos de dominancia positiva con mutantes inactivados con un reactivo sulfhidrilo, como los que hemos utilizado para xCT y $b^{0,+}AT$. Esto apunta a que el efecto de la dominancia positiva es resultado de la dificultad metodológica de los experimentos de coinyección, y no un efecto en la actividad.

Aunque la cantidad de cRNA inyectado correlaciona con la actividad de y^+LAT1 salvaje, no podemos determinar lo mismo para los mutantes G54V y L334R ya que son inactivos. Igualmente, por estudios anteriores sabemos que llegan a la membrana del oocito de manera similar a la proteína salvaje (Mykkanen et al., 2000). En el caso de xCT , existen diferencias entre la actividad de la proteína salvaje y el mutante C327S, que presenta una actividad que oscila entre el 75 y el 100%. Por este motivo hemos utilizado además el mutante C435S, de actividad similar a C327S, y que igual que la proteína salvaje, es sensible a pCMB y pCMBs. Respecto a la expresión en función del tiempo, no hemos observado diferencias cualitativas entre xCT salvaje, C327S, y C435S desde día 2 a día 4 después de la inyección. Para tratar de resolver estas dificultades hemos realizado un mayor número de experimentos en la fracción $\frac{1}{2}$, que es donde teóricamente se espera una mayor diferencia de actividad entre dímero y monómero. Los resultados obtenidos para esta fracción, alrededor del 50% de actividad para los sistemas y^+L y x_c^- , sugieren que la unidad funcional es el monómero.

Discusión

La fusión de dos o más proteínas en tándem en un mismo plásmido proporciona un sistema modelo que permite la expresión "acoplada" de dos o más moléculas con las siguientes ventajas: i) las moléculas están fusionadas, manteniendo una proximidad espacial que es presumiblemente favorable para la interacción, y ii) todas las subunidades del concatenámero se expresan en una misma proporción. Esta aproximación se ha utilizado para demostrar la unidad funcional monomérica de la permeasa de lactosa de *E. coli* (Sahin-Toth et al., 1994) y del transportador renal de Na^+/P_i (Kohler et al., 2000); y también en el estudio de la oligomerización de numerosos receptores y canales de membrana, como la trimerización del receptor P2X (Stoop et al., 1999), la naturaleza heterotetramérica de los canales CNG (cyclic nucleotide-gated) (Shapiro and Zagotta, 1998) y ENAC (canal de Na^+ epitelial) (Firsov et al., 1998), y la naturaleza pentamérica de los receptores GABA_A (Baumann et al., 2001), entre otros.

El hecho de que los concatenámeros xCT-xCT y $b^{0+}\text{AT}-b^{0+}\text{AT}$ sean entre un 10 y 30% funcionales respecto a la proteína salvaje individual, y que el concatenámero wt-wt sea sensible a pCMB y pCMBS en el caso de xCT y a MTSEA en el caso de $b^{0+}\text{AT}$, así como que los concatenámeros CS-CS (CS = C327S para xCT y C321S para $b^{0+}\text{AT}$) sean insensibles a la acción de estos reactivos, valida su uso para este estudio. Además, el resultado de BN-PAGE con los concatenámeros his-xCT-xCT , confirma la integridad de las proteínas de fusión por la presencia de una única banda que tiene el doble de peso molecular de las proteínas individuales. Aun así, los datos de actividad sugieren que la proteína fusionada en tándem no se inserta en la membrana tan eficientemente como la proteína salvaje. Esto podría deberse a las restricciones impuestas por el tamaño del conector entre las subunidades del concatenámero. La pérdida de actividad de proteínas fusionadas en concatenámeros puede deberse a la proximidad forzada de las dos subunidades, que imposibilite la formación correcta del transportador, o a que el conector sea demasiado corto. Algunos estudios han determinado la longitud óptima del conector en los concatenámeros. En el caso de los receptores GABA_A , se ha determinado que la longitud óptima del conector debe encontrarse entre 10 y 23 residuos (Baumann et al., 2001). En este sentido, hemos analizado dos longitudes de conector en los concatenámeros xCT-xCT, el primero de 12 residuos, y el segundo de 20. No se observan diferencias significativas en la actividad, de manera que la disminución en la actividad de transporte respecto a las proteínas individuales puede ser debida a defectos de plegamiento y/o de tráfico y ensamblaje en la membrana plasmática.

Los concatenámeros mixtos (CS-salvaje y salvaje-CS) proporcionan más evidencias de una unidad funcional monomérica (formada por el heterodímero) para los sistemas x_c^- y b^{0+} , ya que tanto los concatenámeros mixtos de xCT como los de $b^{0+}\text{AT}$ retienen una actividad ~50% después del tratamiento con el reactivo sulfhidrilo. Una alternativa es que los dímeros por ellos mismos se asocien en *trans* para formar tetrámeros funcionales. Si este fuera el caso, dada la asociación al azar de dímeros CS-salvaje, después del tratamiento con el reactivo sulfhidrilo esperaríamos un 75% de actividad para el caso de dominancia positiva (asumiendo que sólo se inactivan los tetrámeros que contienen todas las subunidades salvaje) o de un 25% para dominancia negativa (asumiendo inactivación de los tetrámeros que contienen como mínimo una subunidad salvaje). Nuestros resultados con los

concatenámicos, alrededor del 50% de actividad, excluyen esta posibilidad. Como en el caso de la coinyección, el comportamiento de los concatenámicos mixtos es consistente con el que se espera para un monómero funcional.

Los resultados funcionales presentan evidencia que los sistemas de transporte de aminoácidos γ^+L , x_c^- y $b^{0,+}$ son funcionales como monómeros (heterodímeros HSHAT/LSHAT) cuando se expresan en oocitos (4F2hc/ γ^+LAT1 , 4F2hc/xCT), o en células Hela (rBAT/ $b^{0,+}AT$). Aunque con esta estrategia funcional no se puede excluir que las moléculas se auto asocien, para dar lugar a múltiples vías de translocación independientes dentro del mismo complejo, los resultados sugieren que la oligomerización en si no es una condición necesaria para el transporte de los sistemas γ^+L , x_c^- y $b^{0,+}$.

2.2. Modelo de oligomerización de los HATs

Sobre la base de los resultados obtenidos por la Dra. E. Fernández mediante técnicas biofísicas, y con los estudios funcionales de la presente tesis, proponemos el modelo siguiente para la oligomerización de los sistemas de transporte de aminoácidos $b^{0,+}$ y x_c^- en la membrana plasmática: el heterodímero es suficiente para la función de transporte, aunque los dos sistemas de transporte difieren estructuralmente. rBAT/ $b^{0,+}AT$ es, probablemente, un heterotetrámero, y 4F2hc/xCT es, probablemente, un heterodímero (figura 38).

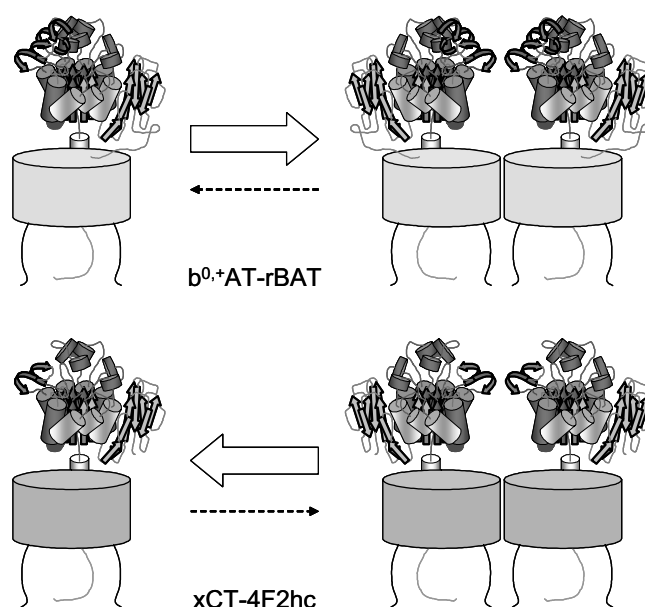


Figura 38 Modelo de la oligomerización de rBAT/ $b^{0,+}AT$ y 4F2hc/xCT en la membrana plasmática. La oligomerización de rBAT/ $b^{0,+}AT$ está fuertemente desplazada *in vivo* hacia una forma heterotetramérica muy estable, mientras que la forma heterodimérica es más probable para 4F2hc/xCT. Cilindro grande, subunidades ligeras. La flecha grande indica la dirección del desplazamiento del equilibrio teórico entre heterodímero y heterotetrámero, para cada sistema de transporte, según los resultados biofísicos. El modelo estructural para el dominio extracelular de rBAT y 4F2hc está basado en el alineamiento estructural con la estructura 3D de las glucosidasas bacterianas que muestran homología significativa (Chillaron et al., 2001).

Discusión

En este modelo existe un equilibrio estructural heterodímero ↔ heterotetrámero, que estaría fuertemente desplazado a la estructura heterotetrámerica o heterodimérica en el caso de los sistemas $b^{0,+}$ y x_c^- , respectivamente. Aun así, no tenemos evidencias directas de la existencia de este equilibrio *in vivo*. rBAT/ $b^{0,+}$ AT se detecta sólo en la forma heterodimérica después de tratamiento con SDS en condiciones no reductoras, tanto en SDS-PAGE como en BN-PAGE, y la forma heterotetrámerica nunca está desplazada completamente hacia la forma heterodimérica. Incluso el tratamiento con urea no disocia el heterotetrámero. Esta propiedad también ha sido observada en el complejo GIP (General Import Pore) de la membrana externa de la mitocondria (Meisinger et al., 2001). Además, en BN-PAGE el agente reductor DTT, en ausencia de SDS, no afecta el tamaño del complejo heterotetrámerico, a pesar de la reducción completa del puente disulfuro entre la subunidad ligera y la pesada. El análisis FRET de rBAT/ $b^{0,+}$ AT tampoco es indicativo del equilibrio entre heterodímeros y heterotetrámeros aunque los resultados sugieren que la gran mayoría de rBAT/ $b^{0,+}$ AT existe como una estructura heterotetrámerica en la superficie celular.

En cuanto a 4F2hc/xCT, a pesar de que los resultados de cromatografía de exclusión y BN-PAGE indican la formación de heterodímeros, nuestros datos no excluyen un orden de oligomerización mayor. Mediante SDS-PAGE y BN-PAGE se han detectado bandas débiles compatibles con un heterotetrámero, pero siempre constituyen una fracción minoritaria, a diferencia de rBAT/ $b^{0,+}$ AT. Además, mientras que la subunidad $b^{0,+}$ AT aparece como doblete en BN-PAGE, después del tratamiento con DTT+SDS, las subunidades xCT y LAT2 aparecen sólo como monómeros. Las técnicas de cromatografía de exclusión y BN-PAGE no escapan a las críticas generales de los métodos basados en detergentes, que son técnicas de no equilibrio (Tanford and Reynolds, 1976). Es posible que durante el análisis de la muestra con una técnica de no equilibrio, los complejos oligoméricos se disocien, de modo que las especies que se observen dependerán de la constante de disociación proteína-proteína. Por este y otros motivos, cuando se estudia la oligomerización a partir de soluciones de detergente es recomendable utilizar más de una estrategia y más de un detergente. Respecto al análisis FRET, la señal que se obtiene para 4F2hc/xCT, comparada con la de rBAT/ $b^{0,+}$ AT, es más baja. Esto podría deberse a múltiples factores. Por ejemplo, el extremo N-terminal de xCT y $b^{0,+}$ AT podrían estar posicionados de forma distinta en el heterotetrámero, impidiendo una mayor eficiencia FRET en el caso de xCT. Se han usado concatenámeros por razones técnicas, especialmente la reducción del número de plásmidos a co-transfectar, por lo que otras fusiones GFP podrían haber sido más adecuadas para FRET. Además, las líneas celulares de mamífero no son la mejor elección para medir FRET de 4F2hc/xCT: la mayoría de líneas celulares, sino todas, contienen tanto sistema x_c^- endógeno u otros antiporters relacionados, como el sistema L o asc. En este escenario, la baja señal de FRET podría deberse a la competición con otras cadenas ligeras para la interacción con 4F2hc, o a la asociación con heterodímeros endógenos 4F2hc/xCT. De cualquier modo, los valores de FRET concuerdan con los resultados *in vitro* y también son compatibles con los estudios funcionales. En conjunto, en las condiciones experimentales utilizadas, una estructura heterodimérica de 4F2hc/xCT (posiblemente en equilibrio con una pequeña cantidad de formas heterotetrámicas) es el mejor modelo de trabajo que se adapta en el presente.

El esquema de la figura 38 podría extenderse a LAT2 y a la subunidad X. Estudios anteriores han demostrado que rBAT forma parte de dos complejos, uno con $b^{0,+}AT$ y otro con una proteína X hasta ahora desconocida (Fernandez et al., 2002). Este último complejo se expresa en mayor cantidad en ratones macho que en ratones hembra, resultado confirmado con el ratón *knockout* de $b^{0,+}AT$ (Feliubadaló, comunicación personal). Este complejo tiene una estructura oligomérica similar, al menos en tamaño, al complejo rBAT/ $b^{0,+}AT$, ya que en ratones *knockout* de $b^{0,+}AT$, rBAT forma parte de un supercomplejo de ~500 kDa. El hecho de que rBAT/ $b^{0,+}AT$ y rBAT/X posean una estructura cuaternaria diferente que los transportadores 4F2hc/LAT-2 y 4F2hc/xCT sugiere que la subunidad pesada es la responsable de que el transportador adquiera esta estructura. Para comprobar esta hipótesis se están construyendo las quimeras 4F2hc/ $b^{0,+}AT$ y rBAT/xCT de las que se estudiará su oligomerización. En cualquier caso, se podrían construir quimeras entre las diferentes subunidades ligeras y pesadas y delimitar aquellas regiones responsables de la oligomerización. Por otro lado, la estructura oligomérica del complejo rBAT/X será examinada en más detalle, cuando se caracterice la proteína X y se obtenga un anticuerpo que la reconozca.

En cuanto a que dominios participan en la heterotetramerización de rBAT/ $b^{0,+}AT$ hay algunas evidencias indirectas. En primer lugar, los experimentos de *crosslinking* sugieren que las dos subunidades ligeras están en contacto directo en el heterotetrámero, con la participación de dos o más lisinas en dos moléculas de $b^{0,+}AT$ a una distancia de 11 Å como máximo (figura 39). Además, en SDS-PAGE en condiciones reductoras, y en BN-PAGE en presencia de SDS y DTT, $b^{0,+}AT$ migra como monómero y como dímero, mientras que rBAT migra sólo como monómero. También se observa que la disociación parcial del tetrámero rBAT- $b^{0,+}AT$ después del tratamiento con SDS es menos eficiente en el concatenámero $b^{0,+}AT$ -rBAT, lo que puede ser debido a la estabilización artificial, debida al conector, de interacciones entre el dominio C-terminal de $b^{0,+}AT$ y el dominio N-terminal de rBAT. Finalmente, los resultados de FRET revelan un contacto estrecho entre los dominios N-terminales de las subunidades ligeras. Sin embargo, contactos entre subunidades de rBAT, o contactos en *trans* entre subunidades rBAT y $b^{0,+}AT$ no se pueden descartar.

La comparación de xCT y LAT-2 con la secuencia de aminoácidos de $b^{0,+}AT$ no da ninguna pista en cuanto a motivos o dominios que podrían ser responsables, al menos en parte, de su oligomerización distinta a $b^{0,+}AT$. En cuanto a la comparación de las subunidades pesadas, a pesar de que 4F2hc y rBAT comparten una topología común, un 30% de identidad, y una gran similitud a α -glucosidasas, difieren en varios dominios (Chillaron et al., 2001): i) en rBAT, el dominio B de las α -glucosidasas está presente, pero no en 4F2hc; ii) en rBAT, existe un dominio de cremallera de leucina en el extremo C-terminal, que no se conserva en 4F2hc, y que podría estar implicado en la interacción con otra proteína, bien con otra molécula de rBAT o con otra proteína extracelular (Bertran et al., 1992b; Wells and Hediger, 1992); y iii) los últimos 31 residuos del extremo C-terminal de rBAT no están presentes en 4F2hc. Estas zonas son candidatas para participar en la heterotetramerización de rBAT/ $b^{0,+}AT$, y también en el reconocimiento específico y unión de la subunidad ligera a rBAT o 4F2hc.

Aún no podemos descartar que en el supercomplejo de rBAT/b⁰⁺AT existan otras proteínas responsables de su estructura oligomérica, tanto en células HeLa como en las células del túbulo proximal donde se expresan. El marcaje con L-[³⁵S]metionina y la purificación del complejo a partir de células HeLa que lo sobreexpresen podría resolver esta cuestión. Pensando en futuros análisis de otros complejos proteicos mediante estas técnicas, se debe tener en cuenta que la composición lipídica de la membrana en la que se expresa el complejo (diferentes sistemas celulares de expresión, liposomas, etc.) puede afectar la estructura oligomérica del complejo (Heuberger *et al.*, 2002) y debe ser contrastada con membranas donde se expresa de forma natural.

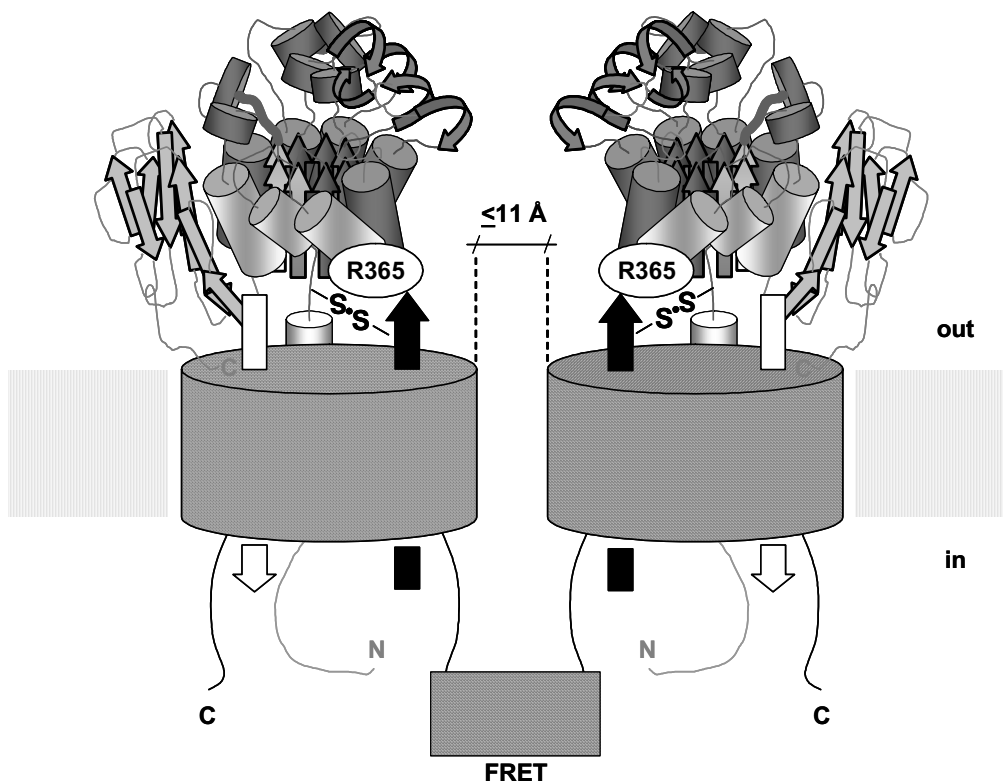


Figura 39 Modelo de oligomerización y mecanismo de transporte de rBAT/b⁰⁺AT en la membrana plasmática.

El esquema reúne los datos disponibles de la oligomerización y el mecanismo de transporte del sistema b⁰⁺. rBAT y b⁰⁺AT están dibujadas a en escala. b⁰⁺AT es la subunidad catalítica ("antiporter") (Reig *et al.*, 2002). Se muestran los posibles contactos entre las subunidades ligeras del heterotetrámero: el análisis mediante cross-linking con DMS indica que aminas primarias en las subunidades b⁰⁺AT están localizadas a una distancia máxima de 11 Å. Los estudios de FRET muestran que los extremos N-terminales de dos subunidades b⁰⁺AT están próximos. Se indican las dos vías de translocación asimétricas (relativas a la posición del residuo R365W de rBAT) (influjo: flecha blanca; eflujo: flecha negra). Las posiciones relativas de rBAT y b⁰⁺AT dentro del complejo se desconocen. Aún así, deben estar restringidas por el puente disulfuro entre la subunidad ligera y pesada, y probablemente por la proximidad del residuo R365W de rBAT a la vía de eflujo (Pineda *et al.*, 2004b). El modelo estructural para el dominio extracelular de rBAT está basado en el alineamiento estructural con la estructura 3D de las glucosidasas bacterianas que muestran homología significativa (Chillaron *et al.*, 2001). El residuo R365W de rBAT se ocaliza entre los dominios Aβ5 y Aα5 (dominio A: TIM-barrel hoja beta 5 y hélice-α 5), que comrende una región de ~50 residuos que no presenta homología a las glucosidasas bacterianas.

2.3. Implicación de la oligomerización de rBAT/b^{0,+}AT en cistinuria

Ya que la unidad básica de transporte de rBAT/b^{0,+}AT parece ser un heterodímero, la función asociada a la heterotetramerización queda por elucidar, y podría tener otras funciones no directamente relacionadas con la actividad del transportador. En este sentido, sería interesante estudiar qué papel juega la estructura cuaternaria de este transportador en la membrana apical del túbulo proximal de riñón. En un intento preliminar de correlacionar oligomerización y función de rBAT/b^{0,+}AT, se ha purificado el complejo en presencia y en ausencia de sustrato para análisis mediante BN-PAGE, pero no se han encontrado diferencias.

Como se explica en la Introducción, aunque se ha estudiado la oligomerización de algunos transportadores, hay muy pocos de los que se conoce con exactitud la relación que existe entre la oligomerización y la función. En general, se han sugerido dos funciones principales para la oligomerización de los transportadores de membrana: i) cambios dinámicos en el estado oligomérico modulan la función (como en el transportador de Na⁺/H⁺ de *E.coli* NhaA, que a pesar de no requerir interacción entre las subunidades del dímero para la función de transporte, es necesaria en su regulación por el pH (Gerchman et al., 2001); y en el transportador de glucosa GLUT1, el cambio de la forma tetramérica a la dimérica regula el alosterismo entre subunidades (Zottola et al., 1995); o ii) la oligomerización puede controlar distintos aspectos de la biología celular del transportador, como el direccionamiento de la proteína desde el retículo endoplasmático hacia la membrana celular (Sitte and Freissmuth, 2003).

Se sabe que el ensamblaje correcto es un prerrequisito para la salida del RE de muchos complejos de membrana oligoméricos, como el receptor beta-2 adrenérgico (Salahpour et al., 2004) y canales heteromultiméricos (Deutsch, 2002). También se ha visto que en los transportadores de neurotransmisores dependientes de sodio la oligomerización podría ser necesaria para el tráfico eficiente a la membrana plasmática (Scholze et al., 2002). Estudios de mutagénesis, en combinación con análisis FRET del transportador de GABA, sugieren que se requiere la oligomerización del transportador para su salida del RE (Scholze et al., 2002). Estos estudios hacen pensar que la oligomerización de rBAT/b^{0,+}AT también podría estar relacionada con su biogénesis y direccionamiento hacia la membrana celular, y por lo tanto, tener una correlación con los fenotipos observados en cistinuria.

Cuando se cotransfectan rBAT y b^{0,+}AT en células de mamífero, se encuentran tanto en la membrana plasmática como en membranas intracelulares. Los resultados biofísicos sugieren que rBAT/b^{0,+}AT ya está oligomerizado en estas localizaciones intracelulares, ya que la banda de 535 kDa es la única que se detecta por BN-PAGE a partir de células Hela, y la eficiencia de *crosslinking* es de prácticamente el 100%. Entonces, la oligomerización de rBAT/b^{0,+}AT podría tener una función en el tráfico, y podría correlacionar con el fenotipo dominante con penetrancia incompleta de la cistinuria de tipo no-I. En el modelo de ratón *knockout* de cistinuria de tipo no-I (*stones*), los ratones heterocigotos muestran hiperexcreción de cistina y aminoácidos dibásicos (Feliubadalo et al., 2003), indicando que una reducción del 50% en la expresión de b^{0,+}AT es suficiente para explicar el fenotipo

parcialmente dominante en estos ratones. Como se ha explicado anteriormente en el modelo de biogénesis del complejo (figura 36), el ensamblaje covalente de rBAT con b^{0,+}AT en el retículo endoplasmático es un control de calidad temprano para la expresión del holotransportador; En este escenario, la heterotetramerización proporcionaría un paso nuevo de control para su localización en la membrana. Actualmente se están realizando en nuestro grupo estudios de biogénesis del complejo rBAT/b^{0,+}AT. En concreto, los experimentos investigarán el lugar intracelular donde el heterodímero se ensambla en estructuras heterotetraméricas. También se analizará el impacto de mutantes mixtos b^{0,+}AT/rBAT (tipo AB) y de la mutación de rBAT de fenotipo no-I dupE5-E9 en la formación de heterotetrámeros, en el tráfico a la membrana plasmática, y en la funcionalidad del transportador.

2.4. Oligomerización de rBAT/b^{0,+}AT y mecanismo de transporte

El mecanismo de transporte de los HATs sólo se ha estudiado en detalle en rBAT/b^{0,+}AT. El análisis cinético de la actividad de transporte b^{0,+} en vesículas de membrana apical de intestino de pollo han demostrado que el mecanismo de este transporte es simultáneo (llamado también mecanismo secuencial), implicando la existencia de un complejo ternario en el cual el transportador está unido a una molécula de sustrato a cada lado de la membrana (Torras-Llort et al., 2001). Lo mismo se observa para un homólogo procarionta reconstituido en proteoliposomas (STE serine/threonine exchanger) de *B. subtilis* (Nuria Reig, Cesar Del Rio, Manuel Palacín, resultados no publicados). Se ha propuesto que el mecanismo simultáneo requiere dos vías de translocación (Palmieri et al., 1993). En este sentido, el grupo de Coady ya había propuesto un modelo de transporte con dos poros (Coady et al., 1996). Estos autores observaron que, en oocitos que expresaban rBAT, el aminoisobutirato (AIB) inducía la salida de sustratos, a mayor velocidad que la de su propio transporte. Esto sugería que el AIB enlentecía la vía de entrada de sustratos, mientras que la vía de salida permanecía permeable a los aminoácidos básicos y neutros. Para explicar estos resultados, los autores propusieron un modelo de "doble compuerta" con lugar de unión a sustrato accesible a ambas caras de la membrana, compatible con un modelo de dos vías de translocación.

Este modelo ha sido apoyado por los estudios de la mutación específica de cistinuria en rBAT R365W, que como se ha explicado anteriormente, además de provocar defectos en el tráfico de la proteína a la membrana plasmática, altera específicamente una propiedad funcional del holotransportador rBAT/b^{0,+}AT (Pineda et al., 2004b). R365W reduce el eflujo de arginina sin afectar el influjo ni la afinidad intracelular ni extracelular para este aminoácido. En cambio, el eflujo de leucina o lisina no están afectadas en el mutante. Por lo tanto, este mutante presenta un defecto específico para la translocación de la arginina intracelular, o bien en su disociación. Este hecho sugiere que el complejo rBAT/b^{0,+}AT presenta dos vías de translocación. En el mutante estas dos vías serán asimétricas: una utilizada para la entrada y otra para la salida. La vía de salida presentará defecto al transportar arginina intracelular. El comportamiento de este mutante no podría explicarse por un modelo en que existiese sólo

una vía de translocación o que las dos vías se uniesen alternativamente para la entrada y salida, ya que esto comportaría que el mutante tuviese que presentar el mismo defecto en la entrada y salida de arginina. El modelo propuesto para el comportamiento del mutante R365W se esquematiza en la figura 40. Este modelo necesita que el lugar de unión de sustrato en la vía de salida sea accesible preferentemente desde el citosol. Después de la disociación de los sustratos, el transportador vuelve a la conformación inicial. Como este modelo está basado en el defecto de la salida de arginina del mutante R365W, podría ser específico del transportador mutado pero no del transportador salvaje.

Los resultados con el mutante R365W podrían explicarse mediante la formación del complejo heterotetramérico de rBAT/b⁰⁺AT, con una subunidad ligera utilizada para el eflujo, y la otra para el influjo. Sin embargo, los estudios funcionales con los concatenámeros de b⁰⁺AT en células HeLa indican que una única molécula de b⁰⁺AT es suficiente para la actividad de transporte, sugiriendo que las dos vías de translocación, una para el influjo y otra para el eflujo, deben coexistir en una subunidad b⁰⁺AT (figura 38). En realidad, las propiedades funcionales del mutante R365W ya sugieren una unidad funcional monomérica, porque en el holotransportador rBAT R365W/b⁰⁺AT las dos vías de translocación son asimétricas: sólo la vía de eflujo, pero no la de influjo, parece estar afectada. Un modelo de dos poros dentro de una único polipéptido transportador no se ha propuesto para ningún otro antiporter. Sin embargo, los intercambiadores mitocondriales estudiados en proteoliposomas presentan un mecanismo de transporte secuencial (o simultáneo), con la excepción del transportador de carnitina, que presenta un mecanismo ping-pong (revisado en (Palmieri et al., 1993)).

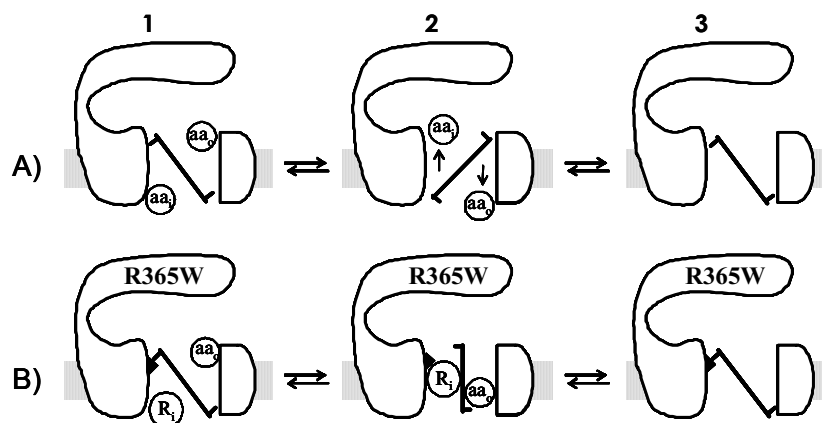


Figura 40 Representación esquemática del modelo de dos vías de translocación para rBAT/b⁰⁺AT.

A) El transportador salvaje presenta dos vías de translocación. Los sustratos se unen a ambos lados de la membrana (formación del complejo ternario) (1), ocurre la translocación (2), y posteriormente la disociación de los sustratos y el retorno a la conformación original (3). B) En el transportador rBAT(R365W)/b⁰⁺AT, después de la formación del complejo ternario con arginina intracelular (1), la translocación o disociación de los sustratos es defectuosa (2-3). En el mutante, es necesario que una vía de translocación se use para la entrada de sustratos (en el dibujo, vía de la derecha) y la otra se use para la salida de sustratos (vía de la izquierda), que será defectuosa para la translocación o disociación de arginina. El impacto de la mutación R365W se representa en la figura con un triángulo negro. Imagen cedida por M.Pineda.

Recientemente se ha resuelto la estructura atómica del transportador de ADP/ATP bovino mitocondrial (Pebay-Peyroula et al., 2003) a una resolución de 2.2Å. En los cristales, el transportador aparece únicamente en estado monomérico, a pesar de estudios anteriores que sugieren su dimerización (Bisaccia et al., 1996; Schroers et al., 1998). Este hecho podría tener la siguiente explicación: los transportadores mitocondriales son estructuralmente monómeros en las membranas y en detergente (Kunji and Harding, 2003; Pebay-Peyroula et al., 2003), pero se podrían asociar para formar dímeros como se ha sugerido (Bisaccia et al., 1996; Schroers et al., 1998). Entonces las dos mitades podrían coordinar el cambio conformacional de forma cooperativa para que se diese el intercambio equimolar de los nucleótidos de adenina, como ha sido sugerido (Huang et al., 2001). Es interesante que cada mitad esté formada por seis hélices α TM. Esto sugiere que una vía de translocación, tanto exporte como importe, se encuentra dentro del monómero de 6 dominios TM. La topología de 12 hélices- α TM de xCT, demostrada experimentalmente por la Dra. Emma Gasol en nuestro grupo (Gasol et al., 2004) y de, probablemente, del resto de subunidades ligeras, podría funcionar durante el ciclo de transporte de forma análoga a la topología 2x(6-TM) de los transportadores mitocondriales. En este punto, hay que destacar la información obtenida de la resolución cristalográfica de las estructuras de la permeasa de lactosa (Abramson et al., 2003) y del transportador de glicerol-3-fosfato (Huang et al., 2003) bacterianos, que son monómeros formados por 12 hélices α TM. En ambas estructuras las seis primeras hélices y las seis hélices del extremo C-terminal están dispuestas en dos lóbulos pseudo simétricos alrededor del poro central. No es descabellado predecir entonces, que en el heterodímero rBAT/b^{0,+}AT cada poro estaría formado por seis hélices- α TM. Experimentos futuros de mapeo de lugares de contacto entre las subunidades ligeras b^{0,+}AT y de estudios de dominancia y cristalización 2D de homólogos bacterianos, que se están iniciando en nuestro grupo de investigación, tratarán de resolver todas estas cuestiones.

2.5. Implicación de C327 en la estructura y función de XCT

Los resultados que se presentan en esta tesis proporcionan evidencia que la cisteína 327, localizada en el segmento TM8 de xCT, está situada cerca de la vía de translocación de sustrato. Los experimentos con la C327 empezaron con el estudio de la oligomerización de los HATs, antes del conocimiento de la topología de xCT. Las predicciones de los dominios trans-membrana mediante algoritmos (p.ej. HMMTOP), localizaban la C327 en medio del dominio TM8 (Figura 2A, Artículo 5). A pesar de su localización, era accesible a reactivos impermeables, con lo que nos pareció atractivo estudiarla en profundidad. Actualmente, la topología de membrana de xCT ha sido resuelta experimentalmente por la Dra. Emma Gasol en nuestro grupo (artículo 6), y representa un modelo de subunidad ligera de la familia de transportadores heteroméricos de aminoácidos (LSHATs). Los resultados obtenidos por la Dra. Emma Gasol, siguiendo la estrategia de *cysteine-scanning* mutagénesis con biotilación, indican una topología de 12 dominios trans-membrana, con los extremos N y C-terminales localizados intracelularmente, y con una estructura en forma de *reentrant loop* en la mitad N-terminal del loop IL2-3 (figura 41).

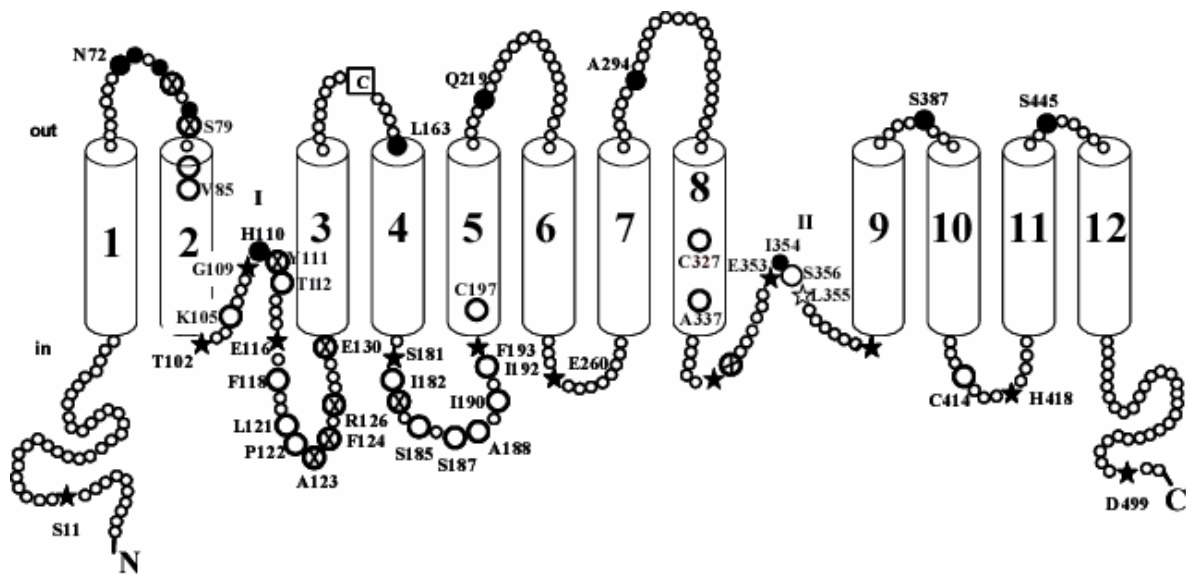


Figura 41 Modelo de topología de xCT. Los 12 dominios transmembrana están numerados. Los círculos negros indican biotilación desde el exterior, y las estrellas, biotilación desde el interior (negra), o desde ambos lados (blanca). Los círculos blancos indican ausencia de biotilación incluso después de la permeabilización con SLO y los círculos con una cruz interior indican una actividad de transporte muy baja (<25% de $_{his-cysless}$). C158, señalado con un cuadrado, es el residuo implicado en la formación del puente disulfuro con 4F2hc. La C327, no se marca con BM, y se sitúa en el segmento TM8. Aparecen dos reentrant loop (I, (Gasol et al., 2004) y II, (E. Gasol, R. Brauner, L. Rodríguez, M. Palacín, resultados en progreso) en los que se localizan residuos clave: H110 y T112 (reentrant loop I), y I354 y L355 (reentrant loop II). Figura extraída y adaptada de (Gasol et al., 2004).

La topología de 12 dominios trans-membrana apoya estructuralmente la función de transporte de las LSHATs en ausencia de la subunidad pesada, como ha sido demostrado para $b^{0,+}AT$ (Reig et al., 2002) y es compatible con el modelo propuesto por los programas de predicción de estructura (p.ej. HMMTOP). La localización intracelular de los extremos N y C-terminales también se ha demostrado mediante inmunodetección (artículo 6). Otra evidencia de la localización intracelular del extremo C-terminal es la actividad de los concatenámeros N- $b^{0,+}AT$ -rBAT-C (Pfeiffer et al., 1999) y N-xCT-4F2hc-C (C. del Río, resultados no publicados). Como el extremo terminal de 4F2hc es intracelular (Fenczik et al., 2001), sólo serían funcionales los concatenámeros (subunidad ligera-subunidad pesada) con el extremo C-terminal de la subunidad ligera intracelular. Del mismo modo, la localización extracelular del residuo L163C (loop extracelular 3-4, EL3-4), concuerda con la participación del residuo conservado C158 en la formación del puente disulfuro que une covalentemente las subunidades ligera y pesada de los HATs.

Los estudios realizados con reactivos sulfhidrilo sugieren la vinculación de la C327 con la vía de translocación de sustrato de xCT. En primer lugar, la inactivación del transporte por pCMB y pCMBS a través de su unión reversible a la C327 es protegible por sustrato con una IC_{50} similar a la K_m . Esta protección es independiente de la temperatura, sugiriendo que no están implicados grandes cambios conformacionales (Chen and Rudnick, 2000; Seal and Amara, 1998). Sin embargo, no podemos excluir la posibilidad de que cambios conformacionales más pequeños no sean detectados por los experimentos de dependencia de temperatura. En segundo lugar, a pesar de su localización en medio del dominio TM8, la C327 es alcanzada por las moléculas impermeables pCMBS y cisteína, indicando que es accesible al ambiente acuoso. La C327 debe estar expuesta al medio extracelular, ya que experimentos preliminares demuestran que el pCMB y el pCMBS son incapaces de reaccionar o reaccionan muy lentamente con este residuo desde el medio intracelular cuando se inyectan en el oocito a una concentración final milimolar. En este sentido, no se observa reactivación espontánea de la inactivación por pCMB o pCMBS, pero sí cuando se aplica cisteína desde el exterior y no desde el interior mediante inyección. Estos resultados deben ser interpretados con precaución (Mueckler and Makepeace, 1997): los reactivos sulfhidrilo pueden ser apantallados por un exceso de tioles en el citosol del oocito, y la cisteína intracelular puede ser incorporada rápidamente a glutatión. Además, como xCT media el antiporte de cistina/glutamato, los sitios de unión intracelulares pueden estar saturados debido a la gran concentración de L-glutamato en oocitos (Meier et al., 2002), protegiendo el acceso de los reactivos a la C327 por la cara intracelular. Aunque este residuo debe estar expuesto al exterior, intentos de marcarlo con el reactivo BM en un entorno cysless no han mostrado biotinilación para la C327, como sucede en los residuos que forman parte de los dominios trans-membrana (tesis doctoral Emma Gasol, 2004).

Una característica peculiar de la C327 es su inaccesibilidad a una variedad de otros reactivos sulfhidrilo, como la iodoacetamida, el NEM, el ácido mersalilo, y los reactivos MTSET, MTSEA, MTSES y MBTA. Esto mismo ocurre con el mutante V165C del transportador de glucosa GLUT1 (Mueckler and Makepeace, 1997) y la C300 de la permeasa de γ -aminobutírico GABP de *E. coli* (Hu and King, 1999). En estos dos casos, el parecido estructural entre el anillo aromático del pCMB y pCMBS con el sustrato explican el rápido acceso de estos reactivos comparado con algunos reactivos MTS (Hu and King, 1999), iodoacetamida y NEM (Hu and King, 1999; Mueckler and Makepeace, 1997). Esto no se puede aplicar al transportador xCT, ya que concentraciones de pCMB o pCMBS en el rango milimolar no inhiben el transporte cuando se ensayan en el mutante C327S, así como tampoco son capaces de inhibir ni proteger los distintos aminoácidos aromáticos. El efecto específico entre el pCMB y el pCMBS puede estar relacionado con la interacción de su anillo aromático con residuos de fenilalanina o tirosina vecinos a la C327 en el dominio TM8 (F315, F322 y F328, figura 41).

En este punto hay que destacar el efecto del reactivo 4-S-CPG sobre xCT. La estructura de 4-S-CPG es muy parecida al pCMB y al pCMBS, y contiene un anillo aromático (figura 28). Patel y colaboradores han demostrado recientemente a partir de líneas celulares de astrocitoma que expresan de manera endógena el sistema x_c^- , que 4-S-CPG es un inhibidor competitivo del sistema x_c^- , y que además no es transportado (Patel et al., 2004). El mismo resultado hemos obtenido al expresar 4F2hc/xCT de manera heteróloga en oocitos de

Xenopus y analizar su actividad antes y después del tratamiento con 4-S-CPG mediante experimentos de Dixon Plot y de flujo. La similitud en la estructura de 4-S-CPG, pCMB y pCMBS apunta a que se unen en el mismo sitio, que en el caso de la 4-S-CPG tiene que ser el sitio de unión de sustrato, ya que un inhibidor de tipo competitivo debe unirse en el mismo sitio en el que se une el sustrato. Además, el hecho que 4-S-CPG sea capaz de bloquear el marcaje de la H110 por BM, residuo implicado en la unión o translocación de sustrato (tesis doctoral Emma Gasol, artículo 6), sugiere que estos residuos deben estar relacionados en algún momento del mecanismo de transporte. En este sentido, se están realizando experimentos de *crosslinking* para determinar la proximidad de estos dos residuos (E. Gasol, resultados en progreso).

El trabajo de Patel y colaboradores, pretendía evaluar las características de los inhibidores de xCT y cuáles de ellos son transportables (Patel et al., 2004). Una estrategia para conseguir buenos inhibidores consiste en restringir las rotaciones de los enlaces de forma que los grupos funcionales adopten una configuración que mimetice la conformación presumiblemente adoptada por los sustratos endógenos al unirse al transportador. En el caso de los transportadores EAATs (*Excitable Amino Acid Transporters*), esto se ha conseguido precisamente mediante la introducción de anillos aromáticos en el esqueleto carbonado del análogo (Chamberlin et al., 1998). Y en el caso de xCT, cuatro de estos compuestos inhiben más eficazmente que la propia L-cistina: ibotenate, (RS)-4-bromohomoibotenate, L-quisqualato y (S)-4-carboxifenilglicina (S-4-CPG) (Patel et al., 2004).

Diferenciar inhibidores sustrato de no-sustrato y, por tanto, distinguir los compuestos que se unen y se transportan, de los que se unen y no se transportan respectivamente, puede aportar información sobre las características que requiere la translocación del sustrato. En este sentido, Patel y colaboradores concluyen que los mejores inhibidores competitivos del sistema x_c^- (L-quisqualato y 4-S-CPG), son los peores sustratos, sugiriendo que las características estructurales que determinan la unión al sustrato son diferentes de las que permiten la translocación del mismo (Patel et al., 2004). Al no ser transportado, 4-S-CPG debe inhibir el transporte en un paso anterior a los cambios conformacionales que tienen lugar en la translocación de sustrato. Esta propiedad hacía el inhibidor 4-S-CPG muy atractivo para realizar ensayos de protección y distinguir si la protección de la C327 es debida a la unión o a pequeños cambios conformacionales insensibles a la temperatura, que resulten de la translocación, pero no hemos encontrado unas condiciones experimentales a las que el reactivo se disocie del transportador. Lo mismo ocurre con el reactivo MTSBn. Este presenta un anillo aromático y tiene también una estructura similar a la 4-S-CPG, el pCMB y el pCMBS. Sorprendentemente, el MTSBn es capaz de inhibir hasta el transportador desprovisto completamente de cisteínas (4F2hc cysless/xCT cysless), sugiriendo que actúa mediante un mecanismo de reacción similar que la 4-S-CPG, independientemente de las cisteínas endógenas el transportador, aunque se observa una ligera contribución de la C327 en la acción de este reactivo.

Los residuos implicados en la unión de sustrato, cuando se cambian por otro residuo distinto, se espera que modifiquen la K_m y la selectividad de sustrato (Dodd and Christie, 2001; Jung et al., 1994). La C327 es una cisteína o una treonina en las LSHATS de mamíferos

(Figura 42). En esta posición no se encuentra ninguna correlación con la selectividad de sustrato de las LSHATS: γ^+ LAT-1, γ^+ LAT-2, LAT1 y xCT, que contienen cisteína transportan aminoácidos básicos y neutros, aminoácidos neutros de cadena lateral larga, y aminoácidos acídicos respectivamente (Verrey et al., 2000). Mientras que LAT-2, asc-1, y $b^{0,+}$ AT que contienen treonina, transportan aminoácidos neutros (LAT-2 y asc-1), y aminoácidos básicos y cistina ($b^{0,+}$ AT). Debido a esta falta de correlación, no se esperan variaciones de selectividad de sustrato en los mutantes C327 en xCT. En efecto, en el mutante C327S no se detecta transporte de L-arginina ni de L-leucina. Pero por otro lado, se produce un incremento de K_m en los mutantes C327S y C327A aunque no en el C327T (tabla 1 artículo 5). A pesar de que el incremento que se observa es pequeño (entre 1.5 y 2 veces), está dentro del rango del que se encuentra en otros estudios. Así pues, la C144 del transportador de creatina CreaT, está localizada cerca del sitio de unión del sustrato, y un mutante C144A presenta una K_m 1.7 veces mayor (Dodd and Christie, 2001). Y en la permeasa de lactosa LacY de *E.coli*, los mutantes de la C148 (C148A, C148S, C148T y C148V), tanto disminuyen como aumentan la k_m para la lactosa desde 1.5 a 2.6 veces (Jung et al., 1994). Los análisis con los mutantes de la C327 muestran que en esta posición sólo se acepta una cadena lateral pequeña, y que aminoácidos más voluminosos no son tolerados, como es el caso del mutante C327L, que es inactivo a pesar de llegar a la membrana (figuras 5B y 6, artículo 5). Esto indica que este residuo, aunque no esencial, como mínimo es importante para el ciclo de transporte.

Estudios con mutantes de otras LSHATS confirman esta hipótesis y muestran que las restricciones de tamaño en esta posición son incluso más dramáticas. Cuando se cambia la posición homóloga a la C327 por un aminoácido de tamaño pequeño, el cambio es tolerado. En $b^{0,+}$ AT, la mutación de la treonina 313 homóloga a cisteína (T313C), que tiene tamaño más pequeño, no provoca ninguna diferencia en la actividad de transporte inducida. En cambio, en γ^+ LAT-1, la mutación de la cisteína homóloga a serina (C320S) elimina la actividad de transporte, indicando que en esta LSHAT aún está más restringido el tamaño de la cadena lateral en esta posición. Proponemos entonces un escenario en el que la C327 podría estar cercana al sitio de unión de sustrato de xCT. Cadenas pequeñas en esta posición son permitidas para la unión de sustrato y su translocación, aunque no una directamente el sustrato, y aminoácidos voluminosos deben imponer una fuerte restricción estérica al ciclo de transporte. Aunque no están estructuralmente relacionadas, es interesante remarcar que la estructura cristalográfica de LacY, recientemente publicada (Abramson et al., 2003), indica que los efectos de k_m observados en los mutantes de la C148 se explican por impedimentos estéricos del sitio de unión de sustrato.

Los aminoácidos vecinos a C327 en el segmento TM8 se encuentran en una región altamente conservada en la familia LSHAT (figura 41) con lo que no es de esperar que juegue un papel destacado en la selectividad de sustrato. Sin embargo, esta región podría ser importante en alguno de los pasos del reconocimiento del sustrato. En la introducción se presenta un modelo del sitio de unión de sustrato para las LSHATS LAT1 y γ^+ LAT-1 (Kanai and Endou, 2001; Uchino et al., 2002). Los autores de este modelo sugieren tres sub-sitios de reconocimiento de sustrato: uno para el grupo α -carboxilo, uno para el grupo α -amino, y uno para la cadena lateral. Mientras que este último sitio sería divergente en cada miembro

de la familia, los dos primeros podrían ser similares o conservados a lo largo de todos los miembros, y la C327 podría formar parte de ellos. Otra posibilidad es que los anillos aromáticos de la F315, F322 y F328 vecinos a la C327 en el segmento TM8 formen un *cluster* aromático o sub-sitio hidrofóbico, capaz de interactuar con el anillo aromático del pCMB, pCMBS, 4-S-CPG y MTSBn, y que forme parte o esté cerca de un sub-sitio de unión de sustrato. Interacciones de este tipo, con *clusters* aromáticos, han sido sugeridas a partir de datos estructurales y funcionales en la unión de agonistas de dopamina con el receptor de dopamina D2. Este receptor, contiene también tres sub-sitios de unión de ligando, uno contiene una carga negativa, otro contiene una o más serinas para formar un puente de hidrógeno, y el último es un sub-sitio hidrofóbico que une un anillo aromático. Este último corresponde a un *cluster* aromático formado por tres fenilalaninas, y un triptófano en el segmento TM6 y que son accesibles al reactivo MTSEA (Javitch et al., 1998). Además, hay una cisteína vecina (C385) a estos residuos aromáticos, que no es reactiva al MTSEA (Javitch et al., 1998), lo mismo que ocurre a la C327 de xCT. Faltaría comprobar que a la C385 del receptor de dopamina D2 puede acceder en cambio el reactivo pCMB o pCMBS para establecer más paralelismos con la C327 de xCT.

Para profundizar sobre la implicación funcional de la C327, se ha analizado la región que incluye el segmento TM8 comparándolo con transportadores de membrana relacionados. Así, se ha realizado un alineamiento de secuencia entre las LSHATS y los transportadores de membrana procarióticos PotE, YjdE, CadB y Lysl (familia APA o basic amino acid/polyamine antiporters) (Jack et al., 2000), que al igual que las LSHATS, pertenecen a la superfamilia APC. Dentro de esta superfamilia, las LSHATS se pueden alinear a lo largo de toda la secuencia con estos transportadores de la familia APA, a pesar de presentar baja identidad de secuencia ~14-16%. El alineamiento del segmento TM8 y parte del *loop* intracelular 4 se muestra en la figura 41. Aparecen dos motivos solapados (G/S/A) $X_1X_2X_3$ (G/S/A) (I Y II), que constituyen una estructura de asociación hélice-hélice (Russ and Engelman, 2000; Senes et al., 2000), donde X representa cualquier aminoácido. Es posible que en el contexto de xCT una cadena voluminosa como la leucina en la posición X_1 del motivo I cause alteraciones en el empaquetamiento de las hélices que de lugar a una inactivación del transporte. En PotE tres residuos importantes para el transporte están localizados en este dominio transmembrana (C285, C86 y Trp292), siendo uno de ellos una cisteína en la misma posición del alineamiento (C285) (Kashiwagi et al., 2000).

En la introducción se ha hablado de la implicación de la C300 en GabP de E.coli. Precisamente, esta cisteína se localiza también en el segmento TM8, y corresponde a la posición X_1 en el motivo II (G/S/A) $X_1X_2X_3$ (G/S/A) del alineamiento entre las LSHATS y las proteínas de la familia APA, y parece conservarse entre los miembros de la familia AAT (*amino acid transporter*) a la que pertenece GabP, y a la familia YAT (*yeast amino acid transporter*) (Hu and King, 1998c), ambas pertenecientes también a la superfamilia APC. La C300 de GabP es diana de reactivos sulfhidrilo de forma muy parecida a C327 (Hu and King, 1999). Su mutación a alanina da lugar a una proteína que retiene ~5% de la actividad comparada con la proteína salvaje. Aunque el mutante retiene la capacidad de unir sustrato, no se ha hecho ninguna comparación con la proteína salvaje, con lo que la implicación de la C300 en la unión de sustrato no está clara (Hu and King, 1998b). Parece ser

que la C300 inicia una hélice-amfipática formada por 20 residuos de aminoácidos, que comprende la mitad C-terminal del dominio TM8 y se extiende dentro del *loop* intracelular 4 que conecta el TM8 y TM9 (CAR, *Consensus Amphipatic Region*). Los autores especulan que esta estructura debe estar conservada entre los miembros de las familias AAT y YAT (Hu and King, 1998a;Hu and King, 1998b;Hu and King, 1998c;Hu and King, 1999). Serían necesarios más estudios para comprobar si existe una estructura similar en otras familias dentro de la superfamilia APC como la familia LSHAT y la familia APA. En una primera aproximación, se podría hacer *cysteine scanning* de toda la hélice TM8 y del *loop* intracelular 4 que conecta el TM8 y TM9 de xCT para comprobar si se trata de una hélice amfipática como en el caso del CAR. Hay numerosos estudios de este tipo realizados con el reactivo pCMBS, que analizan la accesibilidad de los residuos de una hélice, por ejemplo en GLUT1 (Mueckler et al., 2004;Olsowski et al., 2000) y en Uhpt (Hall and Maloney, 2001) entre otros.

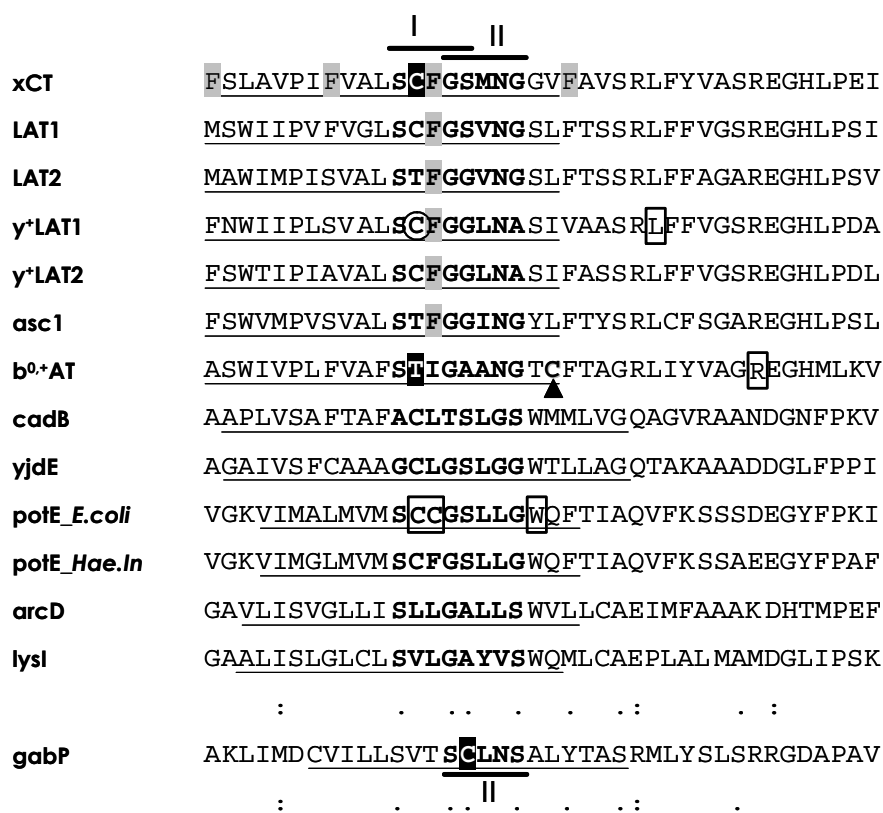


Figura 42 Dominio TM8 en tres familias APC diferentes. Para el alineamiento se ha utilizado el programa CLUSTALW, a partir de todas las secuencias LSHAT de mamífero (aunque sólo se presentan los ortólogos humanos) (subfamilia LAT 2.A.3.8), las proteínas APA (subfamilia 2.A.3.2) y gabP de *E.coli* (subfamilia 2.A.3.1). Los puntos en la parte inferior indican residuos conservados. El dominio TM8 putativo se ha obtenido con el programa HMMTOP. Los ocho residuos de los dos motivos (G/S/A)XXX(G/S/A) solapados (I y II) se muestran en negrita. Sólo el motivo II está conservado en GabP. Las cisteínas sensibles a pCMB y pCMBS de xCT humano y GabP están recuadradas en negro. La cisteína sensible a MTSEA en b⁰⁺AT (C321) se remarca en negrita y está señalada con una flecha. Los residuos recuadrados en blanco son importantes para la actividad del transportador (R333W en b⁰⁺AT, L334R en y⁺LAT1). Los residuos de Phe en xCT en el dominio TM8, o cercanos a el, aparecen en gris. Paralelamente, el residuo de Phe conservado en las LSHATS también se muestra en gris (sólo en b⁰⁺AT es sustituido por una Ile). La cisteína 320 de y⁺LAT1 (dentro de un círculo, misma posición que la C327 de xCT), causa inactivación del transportador cuando se muta a serina (C320S). La treonina 313 de b⁰⁺AT (recuadrada en negro, misma posición que la C327 de xCT) aumenta la sensibilidad del transportador b⁰⁺AT a pCMBS cuando se muta a cisteína (T313C). Extraída y adaptada de la Figura 7 del artículo 5 (Jimenez-Vidal et al., 2004)

Existen más evidencias de que la región delimitada entre el dominio TM8 y el *loop* intracelular 4 que conecta el TM8 y TM9 es importante para la función de las LSHATS. La mutación R333W en $b^{0,+}AT$ y L334R en $y^{+}LAT-1$ localizan en el *loop* intracelular 4, después del segmento TM8, y causan la inactivación del transportador. En los transportadores CAT (cationic amino acid transporters), otra familia perteneciente a la superfamilia APC, este *loop* modula la afinidad de sustrato (Habermeier et al., 2003). También hay evidencias de que el *loop* intracelular 4, que conecta los dominios TM8 y TM9 de xCT, podría tratarse de otro *reentrant-loop* (E. Gasol, R. Brauner, L. Rodríguez, M. Palacín, resultados en progreso). Hay que destacar que el mutante T313C de $b^{0,+}AT$, posición homóloga a la C327 de xCT aumenta su reactividad al pCMBS, quizás proporcionando más rápido acceso del pCMBS a su diana, o bien proporcionando otra diana más de interacción en esta posición, lo que indicaría accesibilidad a un reactivo impermeable en el dominio TM8 de $b^{0,+}AT$. Es interesante que la C321 de $b^{0,+}AT$, localizada en la cara citoplasmática del dominio TM8 sea accesible al MTSEA, que inactiva el transporte. Este reactivo sulfhidrilo, es capaz de permeabilizar la membrana en función de su carga positiva, que depende del pH del entorno ($pK_a \sim 8.5$) (Karlin and Akabas, 1998). El reactivo MTSET, que presenta carga positiva permanente no tiene acceso a este mutante, aunque es mayor que el MTSEA (MW de 278.24 Da y 236.15 Da, respectivamente).

En el Artículo 6 que se incluye en esta tesis se presentan evidencias de otro residuo de xCT importante para el ciclo de transporte, localizado en el ápice del *reentrant-loop* (figura 40). El trabajo, desarrollado por E. Gasol en nuestro grupo, muestra que la histidina 110 (H110) también está cercana al sitio de unión o vía de translocación de sustrato de xCT, y se apoya en las siguientes evidencias: i) la biotilación de H110C con BM se bloquea por los sustratos y el inhibidor no transportable 4-S-CPG (Figura 5, Artículo 6); ii) la inactivación provocada por MTSES en el transporte de H110C también se protege por los sustratos con una IC_{50} similar a la de la K_m para cada sustrato (Figura 8, Artículo 6). Esta protección es independiente de la temperatura (Figura 7, artículo 6), sugiriendo que no implica grandes cambios conformacionales; y iii) la sustitución de H110 por una cisteína (H110C) o un aspartato (H110D), imitando las otras LSHAT con aminoácidos neutros como sustratos, es decir, LAT-1, LAT-2 y asc-1 (Figura E de Material Suplementario, Artículo 6), no tiene ningún efecto significativo en la K_m para los sustratos de xCT (Tabla 1, Artículo 6) ni para la especificidad del transportador. Así, his -H110C y his -H110D no inducen ninguna actividad de transporte específica de otras LSHATs (p.ej. L-leucina, L-alanina y L-arginina) (Tesis doctoral E. Gasol, 2004). En cambio, la sustitución de H110 por una lisina (H110K) resulta en un transportador inactivo que llega a la membrana plasmática (Tesis doctoral E. Gasol), sugiriendo que, aunque se mantenga la carga positiva del residuo, la larga cadena lateral de la lisina no es tolerada en esta posición. La importancia de la cadena lateral en esta posición está apoyada por el hecho que la sustitución de E96 en $b^{0,+}AT$, posición homóloga a H110 en xCT, por un residuo incluso más pequeño, como la cisteína ($b^{0,+}AT$ E96C), resulta en un transportador inactivo (figura 21).

Los estudios de estructura-función de xCT han identificado dos residuos críticos hasta ahora: H110 y C327. Ambos residuos muestran accesibilidad exterior y la inactivación del transporte por reactivos sulfhidrilo es protegible por los sustratos de xCT con una IC_{50} similar a su K_m y de forma temperatura-independiente. A pesar de estas similitudes, presentan claras diferencias: i) Las sustituciones a serina y alanina de C327, a diferencia de las sustituciones de H110, aumentan de 1.5 a 2 veces la K_m del glutamato, sugiriendo una implicación en la unión al sustrato; ii) mientras que H110 se encuentra en el ápice externo de un *reentrant loop* entre los dominios trans-membrana 2 y 3, C327 se encuentra en un dominio trans-membrana (TM8); iii) ambos residuos presentan diferencias sustanciales en cuanto a la naturaleza de los reactivos sulfhidrilo que actúan sobre ellos: el residuo C327 reacciona con PCMB y PCMBs pero no es accesible a los reactivos MTSET, MTSEA, MTSES, NEM, iodocetamina, MBTA, y ácido mersalilo. Se justifica esta especificidad por la interacción del anillo aromático del PCMB y PCMBs con residuos cercanos de fenilalanina (F315, F322 y F328). El residuo H110, por otro lado, presenta accesibilidad al reactivo impermeable cargado negativamente MTSES y al permeable positivo MTSEA, con mayor inactivación por el primero que por el segundo. Sorprendentemente, sin embargo, H110 no es accesible al reactivo impermeable cargado positivamente MTSET. El MTSET es más grande que el MTSEA pero probablemente este argumento no pueda aplicarse ya que también es accesible al BM, que es voluminoso. Quizás la carga positiva permanente del MTSET impide el acceso a la H110 mientras que la carga del MTSEA, que depende del pH del entorno ($pK_a \sim 8.5$) (Karin and Akabas, 1998), le permita acceder a esta histidina. Se han publicado resultados similares para el transportador de citrato/malato CimH de *Bacillus subtilis* (Krom and Lolkema, 2003). Es tentador explicar estas diferencias de reactividad en H110C de xCT y R240C de CimH (MTSES>MTSEA>MTSET) aludiendo a que el camino de paso del sustrato está optimizado para sustratos negativos (glutamato y cistina aniónica para xCT, y citrato y malato para CimH).

La posición homóloga a H110 de xCT en otras LSHATs muestra correlación sustrato-específica (His en xCT, transportador de sustratos aniónicos; Asp en isoformas LAT y asc-1, de aminoácidos neutros; Ser en isoformas γ -LAT, de aminoácidos básicos; y Glu en $b^{0,+}$ AT, de aminoácidos neutros y básicos); De acuerdo con el modelo de sub-sitios de reconocimiento descrito anteriormente, la H110 podría ser el sub-sitio de la cadena lateral, divergente en cada miembro de la familia. Aún así, H110 determina la especificidad de sustrato como se deduce de los transportes de xCT con la mutación H110D (tesis doctoral E. Gasol, 2004), pero los resultados de inhibición y protección que aparecen en el artículo 6, junto con el hecho que el mutante H110K inactiva completamente la función del transportador aún encontrándose éste en la membrana plasmática de la célula, sugieren la proximidad de la H110 al lugar de unión y/o vía de translocación de sustrato.

Es necesario identificar otros residuos cercanos físicamente en la estructura tridimensional del transportador que actúen coordinados con H110 y C327. Los estudios actuales de topología de xCT, que evidencian la existencia de un nuevo *reentrant loop* (E. Gasol, R. Brauner, L. Rodríguez, M. Palacín, resultados en progreso), y estudios de estructura, como la cristalización de miembros bacterianos homólogos (N. Reig, C. del Río, M. Ratera, D. Fotiadis y M. Palacín; resultados en progreso), serán clave para la comprensión de las relaciones estructura-función en los HATs.

I. Análisis Mutacional de rBAT en Cistinuria

11. Se han identificado 32 mutaciones nuevas en *SLC3A1* en un total de 164 familias cistinúricas de la base de datos del ICC. El total de mutaciones identificadas en *SLC3A1* representan el 44.3% de los alelos explicados en la base de datos. Las mutaciones más frecuentes en *SLC3A1* son: M467T (26.4%), T216M (6.4%), dupE5-E9 (4%), c.163delC (4%), R270X (4%), y c.765+1G>T (3.2%). Estas mutaciones representan un 48.0% del total de alelos de la base de datos con mutaciones en *SLC3A1*. El resto de mutaciones en *SLC3A1* se han identificado en tres o menos alelos independientes. Las mutaciones nuevas, junto con las previamente publicadas, hacen un total de 103 mutaciones identificadas en *SLC3A1*.
12. La correlación genotipo-fenotipo revela que distintas mutaciones en *SLC7A9* se asocian con los fenotipos I y no-I, y que solo una mutación en *SLC3A1* presenta fenotipo no-I en heterocigotos. Esto hace que la clasificación tradicional basada en el fenotipo de los portadores sea imprecisa, y se ha establecido una nueva clasificación de la cistinuria, basada en los datos genéticos: tipo A, debida a dos mutaciones en *SLC3A1*, tipo B, debida dos mutaciones en *SLC7A9*, y un posible tercer tipo AB, con una mutación en cada gen. Las familias mixtas presentan todos los genotipos posibles, dentro de los cuales, el genotipo BB es el más representativo. Sólo 3 pacientes de la base de datos del ICC son dobles heterocigotos compuestos con mutaciones en ambos genes (dos pacientes AA(B) y un paciente BB(A)). El grado de aminoaciduria de este tipo de pacientes y de sus relativos indica que la herencia digénica en cistinuria tiene sólo un efecto parcial en el fenotipo, restringida a un impacto variable en la aminoaciduria.

II. Relación Estructura-Función en los HATs

13. En la estructura oligomérica de los Transportadores Heteroméricos de Aminoácidos, la unidad funcional mínima de los sistemas 4F2hc/y⁺LAT-1, 4F2hc/xCT y rBAT/b^{0,+}AT es el monómero (heterodímero subunidad pesada/subunidad ligera).
14. La C327 de xCT, situada en el segmento TM8, es la diana de inactivación por pCMB y pCMBS. Este residuo se encuentra expuesto a un entorno acuoso y estructuralmente restringido. La inactivación por pCMB y pCMBS se protege por sustrato con una IC₅₀ similar a su K_m, y de forma independiente de la temperatura. Esto sugiere proximidad de la C327 al sitio de unión o vía de translocación de sustrato.

1. CLASIFICACIÓN DE LOS PACIENTES

Se han estudiado un total de 164 familias de la base de datos del Consorcio Internacional de Cistinuria. Estas familias provienen de Italia (91), España (50), Israel (12), Bélgica (4), Portugal (3), Suiza (2), Reino Unido (1) y Alemania (1).

Todos los pacientes en este estudio cumplen los siguientes parámetros que definen la cistinuria: excreción de cistina en orina mayor de $1040\mu\text{mol/g}$ de creatinina en una muestra individual o 24h de orina, y al menos un cálculo de cistina identificado (eliminado espontánea o quirúrgicamente). La muestra de pacientes también incluye gemelos de pacientes cistinúricos según la definición anterior, que presentan las mismas mutaciones, si bien alguno de ellos puede no hacer cálculos. Los valores de excreción de aminoácidos en orina se han determinado a partir de muestras de orina de 24h (Turnell and Cooper, 1982), y se han corregido por gramo de creatinina excretado.

Para los estudios de correlación fenotipo-genotipo se han seguido dos clasificaciones, una basada en la excreción de aminoácidos en orina, y la otra en los datos genéticos.

1.1. Clasificación basada en la excreción de aminoácidos en orina

Los pacientes se han clasificado en tipo I, tipo no-I, mixtos y no tipados en función de los valores de excreción en orina de cistina y aminoácidos dibásicos (lisina, arginina y ornitina) en los heterocigotos obligados.

Primero se procede a la clasificación de los heterocigotos obligados en: fenotipo I (silentes), o fenotipo no-I (hiperexcretadores). Cuando al menos dos de los parámetros (lisina, arginina, ornitina o la suma de cistina y de los tres aminoácidos en orina) son mayores que el 95 percentil en controles, se consideran como fenotipo no-I. Y cuando los parámetros se encuentran dentro del rango de los controles se clasifican como fenotipo I.

- ❖ **Tipo I:** Cuando los dos heterocigotos obligados presentan excreción urinaria de aminoácidos dentro del rango de los controles (ambos presentan fenotipo I).
- ❖ **Tipo no-I:** Cuando los dos padres presentan fenotipo no-I, el probando se clasifica con cistinuria de tipo no-I. En algunos casos el probando presenta valores de excreción urinaria similares al del padre que transmite la enfermedad y dentro del rango superior de los heterocigotos con fenotipo no-I, mientras que el otro padre presenta un fenotipo de excreción urinaria normal. En estos casos el probando se ha clasificado como heterocigoto con cistinuria de tipo no-I.
- ❖ **Mixto:** cuando uno de los transmisores de cistinuria en la familia esta en el rango de los controles (fenotipo I), y el otro está por encima del rango control (fenotipo no I).
- ❖ **No tipado:** cuando los valores de excreción urinaria de los padres no se ha podido conseguir los probandos se consideran como no tipada

1.2. Clasificación genética

Los pacientes se han clasificado como tipo A, tipo B, tipo AB, y tipo ?? en función de las mutaciones encontradas.

- ❖ **Tipo A:** pacientes con mutaciones en *SLC3A1* (A? cuando sólo es posible explicar un alelo y AA cuando los dos alelos están explicados).
- ❖ **Tipo B:** Pacientes con mutaciones en *SLC7A9* (B? con un sólo alelo explicado, y BB y B+ con los dos alelos explicados).
- ❖ **Tipo AB:** Individuos con una mutación en *SLC3A1* y otra en *SLC7A9*. Pacientes con más de dos alelos mutados se han clasificado como AA(B) o BB(A), dependiendo de la distribución de las mutaciones en los dos genes.
- ❖ **Tipo ??:** probandos en los cuales no se han encontrado mutaciones

2. ANÁLISIS MUTACIONAL

Esta parte de la tesis se ha realizado en el *Centre de Genética Medica i Molecular* (CGMM) del *Institut de Recerca Oncologica (IRO)*. A todos los pacientes cistinúricos y sus familiares se les ha realizado una búsqueda de mutaciones en *SLC3A1*, *SLC7A9* o en ambos genes de la siguiente forma: en primer lugar, a los pacientes con cistinuria de tipo I se les analiza el gen *SLC3A1* y a los de tipo no-I el gen *SLC7A9*. Después de esta búsqueda inicial de mutaciones, a los pacientes no genotipados se les analiza el otro gen. A los pacientes mixtos, heterocigotos no-I, y no tipados se les ha analizado ambos genes.

La búsqueda de mutaciones se ha realizado en toda la región codificante del gen, los límites exón-intrón, y en secuencias intrónicas (como media unos 50 pb a cada lado de cada exón) mediante PCR, RT-PCR (cuando ha sido posible disponer de muestra de RNA), SSCP-HD, Southern-Blot, DHPLC o PCR multiplex semicuantitativa. También se ha utilizado la secuenciación directa de DNA para confirmar los resultados obtenidos, identificar la posición mutada en el gen, o para identificar mutaciones no detectables con las técnicas antes mencionadas.

A continuación detallaré las técnicas que he usado en este trabajo para identificar mutaciones en el gen *SLC3A1*: SSCP-HD a partir de DNA genómico, y RT-PCR a partir de RNA total, extraídos de sangre periférica. La PCR y la secuenciación de DNA se detallan en el apartado dedicado a técnicas de manipulación de DNA, por ser técnicas ampliamente utilizadas en biología molecular y que he utilizado a lo largo de toda la tesis y no sólo en la identificación de mutaciones.

2.1. Extracción de DNA genómico a partir de sangre

Procedimiento:

- A partir de 5-20 ml de sangre periférica (conservada como máximo una noche a 4°C) se añade suero fisiológico hasta 50 ml. Se mezcla por inversión y se centrifuga a 800 x g a 4°C sin freno.

- Se aspira el sobrenadante con cuidado de no perder la interfase (capa de leucocitos). Se añaden hasta 50ml de solución de lisis de eritrocitos recién preparada y se agita suavemente por inversión. Se centrifuga 15 minutos a 2500 x g a 4°C.

- Se decanta el sobrenadante. Se repite el lavado, pero con tampón fosfato salino (PBS). En este punto el precipitado se puede congelar a -20°C ó -80°C, o continuar con la extracción.

- Se añaden 3-6 ml de solución de lisis de leucocitos, en función del tamaño del precipitado. Se añade 200-400 µl de SDS al 10% y 500-1000 µl de solución de proteinasa K. Se agita con vórtex hasta obtener un aspecto homogéneo. Se incuba o/n a 37°C en agitación. La extracción puede continuar automáticamente en un extractor (*340A Nucleic Acid Extractor, Applied Biosystems*) que combina etapas de fenol y fenol/cloroformo.

Alternativamente, se puede seguir un método manual de precipitación por sales:

- Se añade a la mezcla 1ml de NaCl saturado a 5,5 mM. Se agita con vórtex unos segundos y se centrifuga 15 minutos a 2500 x g a 4°C.

- Se recoge el sobrenadante y se vuelve a centrifugar.

- Se recoge el sobrenadante y se añade un volumen igual de cloroformo. Se agita enérgicamente por inversión y se centrifuga 15 minutos a 2500 x g a 4°C sin freno.

- Se recoge la fase superior, con cuidado de no perder la interfase.

- Se añaden 2 volúmenes de etanol absoluto y se mezcla suavemente por inversión hasta que aparece una "medusa" de DNA. Se recoge rápidamente la "medusa" con un gancho de vidrio (haciendo curvar una pipeta Pasteur en la llama de un Bunsen) y se lava sumergiéndola en un tubo con 10 ml de etanol al 70% y moviéndola arriba y abajo con cuidado de no perderla.

- Se deja secar la "medusa" 30 segundos en el aire y se desengancha en 300-500µl de tampón TE (10:0.2). Se deja resuspender o/n en un agitador orbital a temperatura ambiente, o 2-3 horas a 37°C en agitación.

2.2. Extracción de RNA total a partir de sangre

Esta extracción se basa en la descrita por Chomczynski y Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 1987). Los rasgos más destacados son la separación de leucocitos mediante una centrifugación con ficol y la inactivación de las RNAsas endógenas con tiocianato de guanidinio.

Procedimiento:

- Se diluyen 10 ml de sangre con 10 ml de PBS 1x. Se prepara un tubo de 50ml con 7.5ml de ficol (Amersham 17-1849-02). Se añade poco a poco la sangre diluida para que no se mezclen. Se centrifuga 20 minutos a 770 x g a 20°C. Aquí la temperatura es importante para evitar que se rompan los eritrocitos y proporcionar una velocidad óptima de agregación. Se formaran cuatro capas: la inferior contiene los eritrocitos agregados, la siguiente el ficol con algunos granulocitos, la siguiente, bastante fina, los leucocitos, y la superior, el plasma diluido.

- Con una pipeta Pasteur de plástico se recoge la capa de leucocitos (atravesando la fase superior) y se pasa a un tubo de 50ml. Se lleva el volumen a 50ml con PBS y se centrifuga a 770 x g durante 5 minutos a 4°C.

- Se decanta el sobrenadante. Aquí se puede parar el protocolo y conservar el precipitado a -80°C. De este punto en adelante, las muestras se mantienen en hielo para evitar la degradación del RNA.

- Se añaden 500µl de solución D y 50µl de acetato sódico 2M (pH4.0). Se mezcla bien. Se añaden 500µl de fenol (con tampón citrato 100mM pH 4.3, Sigma P4682) y 100ml de cloroformo. Se pasa todo a un tubo de 2ml. Se mezcla con vórtex 10 segundos y se deja en hielo 15 minutos. Se centrifuga 20 minutos a 10.000 x g a 4°C.

- Se recoge la capa superior sin apurar y se pasa a otro tubo. Se añade un volumen de isopropanol (guardado a -20°C) y se deja precipitar entre 2 h y o/n a -20°C. También se puede parar el protocolo hasta una semana en este punto. Si se quiere parar más tiempo, es conveniente guardar la muestra a -80°C.

- Se centrifuga 20 minutos a 10.000 x g a 4°C, controlando en que lugar de la pared del tubo se espera el precipitado.

- Se lava el precipitado con etanol 70% (guardado a -20°C). Este precipitado no está demasiado enganchado en la pared del tubo por lo que se debe ir con cuidado en el momento de decantar o aspirar el etanol, y no agitar el tubo durante el lavado. Se decanta el precipitado directamente y se deja secar el tubo hacia abajo sobre papel absorbente 5 minutos. Se disuelve el precipitado en agua bidestilada estéril.

- Se calienta 2 minutos a 65°C. Se separan 1µl para determinar su concentración en un espectofotómetro en una dilución 1/50, y 1µl más para comprobar su integridad en un gel de agarosa no desnaturizante. Se guarda a -80°C.

2.3. Detección de mutaciones mediante SSCP-HD (Single strand conformational polymorphism- heteroduplex)

El análisis SSCP-HD es un método rápido para detectar cambios pequeños en una secuencia de DNA amplificada por PCR (Orita et al., 1989). El producto de PCR se calienta para conseguir la disociación de las cadenas, y se analiza por electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturizante (PAGE). Bajo condiciones no desnaturizantes, los fragmentos de DNA de cadena sencilla se pliegan en conformaciones únicas, que vienen determinadas por su secuencia primaria ya que la estructura se estabiliza por interacciones intramoleculares. Esta estructura secundaria es difícil de predecir teóricamente y es sumamente dependiente de variables como la temperatura y la concentración de iones.

Según la conformación que adopte el fragmento de DNA de cadena sencilla, migrará en una u otra posición del gel, pudiéndose distinguir dos fragmentos que sólo difieran en una única base. Por otro lado, también es posible analizar en el mismo gel de SSCP los fragmentos de doble cadena que hayan podido reasociarse en el proceso, siempre que se deje correr el gel el tiempo adecuado para ver estas bandas, teniendo en cuenta que migran más rápidamente que las cadenas sencillas. Cuando hay un cambio en una de las secuencias de DNA, se formaran tanto homodúplex como heteroduplex (HD) en el proceso de reasociación, que se pueden distinguir entre ellos debido también a cambios conformacionales que los hacen migrar en posiciones diferentes en el gel. Mediante esta técnica se puede distinguir fácilmente los cambios en homocigosis de los que están en heterocigosis ya que siempre se analizan en paralelo fragmentos de DNA control.

Actualmente existen kits que proporcionan los geles a diferentes porcentajes de poliacrilamida, así como todos los reactivos necesarios para su posterior tinción con plata. Estos geles comerciales se montan encima de unidades de electroforesis *Multiphor II* de *Pharmacia Biotech*, que se pueden refrigerar a la temperatura deseada, de manera que este parámetro tan importante se puede controlar.

En este trabajo se han utilizado geles al 10% y al 12% kits *Excel Gel™ DNA Analysis* (#17-1198-07), *CleanGel DNA Analysis Kit* (#17-1198-06) y las temperaturas a las que se han hecho migrar las muestras en el gel han sido de 4°C y 25°C respectivamente. Los geles se han teñido con el kit *DNA Silver Staining Kit Plus One* (#17-6000-30) de *Amersham Pharmacia*. Se han seguido las instrucciones recomendadas por el fabricante.

2.4. RT-PCR

Esta reacción consiste en la síntesis de cDNA a partir de RNA mensajero que se toma como molde. El enzima que lleva a cabo esta reacción es la retrotranscriptasa y se han seguido las instrucciones que indica la casa comercial que la suministra (*SuperScript™ II RnaseH Reverse Transcriptase*, *Invitrogen*, #18064-014).

3. TÉCNICAS BÁSICAS DE MANIPULACIÓN DE DNA Y RNA

En la realización de esta tesis las técnicas de manipulación de DNA y RNA han sido ampliamente utilizadas. Estas técnicas son más o menos comunes en todos los laboratorios de Biología Molecular, y se pueden encontrar ampliamente detalladas en los manuales "Molecular Cloning. A Laboratory Manual" (Sambrook. et al., 1989) y "Current Protocols in Molecular Biology" (Coligan et al., 2001), así como en anteriores tesis de nuestro grupo de investigación.

El trabajo con bacterias requiere la utilización de material estéril para evitar contaminaciones con DNAsas, otras bacterias y DNAs ajenos. El material se esteriliza en autoclave a 1 atmósfera de presión a 120° C durante 20 min. Las bacterias se manipulan junto a un mechero Bunsen que proporciona un área estéril de trabajo. Los reactivos se preparan con un agua de calidad ultrapura (sistema Milli Q de Millipore) y finalmente, se esterilizan en autoclave o por filtración con filtros de 0.22 µm de diámetro de poro.

3.1. Obtención de bacterias competentes y transformación.

Para mantener y amplificar plásmidos, éstos se han transformado en las cepas de *E. coli* DH5α (Bethesda Research Laboratories, 1986) y XLBlue (Stratagene). Estas bacterias son competentes cuando se han sometido a un proceso de sensibilización a la transformación. Una vez las bacterias son transformadas, se las hace crecer en placas con antibiótico, donde sólo crecerán las bacterias que hayan incorporado el DNA plasmídico exógeno.

En este trabajo se han obtenido bacterias competentes mediante tratamiento por cloruro cálcico, que han sido transformadas por choque térmico (Cohen et al., 1972). Por otro lado, también se han obtenido bacterias competentes para la transformación por choque eléctrico mediante electroporador (*Cell Porator* acoplado al amplificador *Voltage Booster*; Gibco), siguiendo el protocolo que se detalla en el manual de instrucciones. La elección de uno u otro método depende de la cantidad de DNA a transformar. Generalmente, cuando se dispone de poco DNA y éste proviene de una ligación complicada se ha utilizado la transformación por electroporación.

3.2. Obtención de DNA plasmídico a partir de cultivos bacterianos

Para purificar plásmidos a partir de cultivos bacterianos se han utilizado diferentes *kits* comerciales en función de la cantidad y calidad necesitada. Para preparaciones a pequeña escala con finalidades analíticas se han realizado mini-preparaciones. Para preparaciones de mayor cantidad (entre 1-5mg de DNA plasmídico purificado) se han utilizado los *kits* de maxi o mega-preparaciones, (Qiagen 12163 y 12191, respectivamente).

3.3. Análisis de DNA con enzimas de restricción

La digestión de DNA con estos enzimas se realiza siguiendo las instrucciones de las casas comerciales que los suministran. En general, se utiliza el tampón comercial indicado. La cantidad de enzima nunca debe sobrepasar el 10% del volumen final ya que el glicerol al 50% que contiene puede inhibir la reacción enzimática. Generalmente se utiliza entre 1 y 5U/ μ g de DNA y la reacción se lleva a cabo a la temperatura indicada para cada enzima. Cuando se trata de digestiones dobles o triples y el tampón de los enzimas es incompatible, el DNA digerido se extrae del tampón y del enzima con fenol-cloroformo o bien se purifica en un gel de agarosa antes de proceder con la siguiente digestión.

3.4. Extracción del DNA con fenol-cloroformo y precipitación con etanol

Al volumen de digestión se añade agua destilada hasta llegar a un volumen final de 300 μ l. Se añade un volumen equivalente de fenol-cloroformo, se mezcla en un agitador vórtex durante 30s y se centrifuga 2 min a 14000 r.p.m. en una centrífuga de sobremesa a temperatura ambiente. Se recupera el sobrenadante, se añade 1/10 del volumen de acetato sódico 3M, se mezcla y se añaden 2.5 volúmenes de etanol absoluto. La precipitación ocurre durante al menos 1 h. a -80° C. Se centrifuga a 14000 r.p.m. durante 30 min a temperatura ambiente. El precipitado se lava dos veces con etanol al 70% previamente enfriado a -20° C y se deja secar a temperatura ambiente. El DNA se resuspende en agua Milli Q.

3.5. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

La electroforesis en gel de agarosa no desnaturalizante es un método estándar que se utiliza para separar fragmentos de DNA. La migración de estos fragmentos en el gel es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular. El porcentaje de agarosa que se utiliza depende del tamaño de los fragmentos a separar (1% de agarosa separa fragmentos de entre 0.4 y 6 kb). Para resolver fragmentos más pequeños se recomienda un porcentaje superior o una electroforesis en un gel de acrilamida. Siempre se resuelven marcadores de peso molecular (1 kb DNA; Gibco BRL, # 15615-016) en paralelo a las muestras.

3.6. Purificación de fragmentos de DNA a partir de un gel de agarosa.

Los fragmentos de DNA separados en un gel de agarosa se recuperan con el objetivo de ligarlos a otros fragmentos o utilizarlos como sondas, entre otras finalidades. En este trabajo se ha utilizado un *kit* comercial (Amersham, #27-9602-9) y se ha seguido las instrucciones de la casa proveedora.

3.7. Otros enzimas utilizados en DNA.

Cuando se hacen construcciones de fragmentos de DNA en plásmidos es necesario el uso de otros enzimas. En este trabajo se han utilizado enzimas como la fosfatasa alcalina, que corta el grupo fosfato del extremo 5' de un fragmento de DNA e impide así la religación del fragmento, y la T4 DNA ligasa, que une fragmentos de DNA con extremos compatibles. Estos enzimas se utilizan como indica la casa comercial que los suministra.

3.8. Secuenciación.

Esta reacción consiste en una PCR cuya amplificación es aritmética y en la que se incluyen dideoxinucleótidos fluorescentes. Se ha utilizado para conocer la secuencia de un fragmento de DNA después de una amplificación por PCR, una mutagénesis, una construcción plasmídica, etc. Se ha utilizado el *kit* comercial *ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction siguiendo las instrucciones recomendadas*. Después, se purifica el producto de la PCR de secuenciación mediante una columna gel filtración *AutoSeq™ G50 (#27-5340)* de *Amersham Pharmacia Biotech* siguiendo las instrucciones del fabricante, de forma que quedan retenidos los oligonucleótidos no incorporados. Se liofiliza al vacío, y se entrega en el servicio de secuenciación para ser analizado. Alternativamente al uso de la columna gel filtración, también se puede precipitar la muestra con etanol.

Las reacciones de secuencia han sido analizadas por el Servicio de Secuenciación del Departamento de Genética Médica y Molecular del Institut de Recerca Oncològica y por los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona, en un secuenciador automático 373 de Applied Biosystems.

3.9. PCR

La *Polimerase Chain Reaction* (PCR) es una reacción que consiste en la amplificación de un fragmento de DNA a partir de un DNA molde. El enzima responsable de esta amplificación es la DNA polimerasa. En este trabajo se han utilizado tres polimerasas diferentes en función de las características que ofrece cada una. La *Taq DNA polimerase* procedente de *Termus aquaticus* (Roche, #1430-000) no posee actividad exonucleasa, y se utiliza para PCRs de rutina que impliquen fragmentos de pequeño tamaño, o para obtener fragmentos de DNA con extremos protuberantes que permitan su posterior ligación con en el sistema PGM-T; la *Expand High Fidelity Taq polimerase* (Roche, #1732650) sí posee actividad exonucleasa 3'5' y se utiliza para amplificar fragmentos de DNA que deben mantener una elevada fiabilidad en su secuencia. Finalmente, se ha utilizado la *Pfu turbo DNA Polimerase* para amplificar fragmentos de DNA largos y hasta plásmidos enteros, con una máxima fiabilidad en su secuencia.

Las cantidades de enzima, tampón, DNA molde, dNTPs y oligos se indican en la hoja informativa que acompaña el enzima. La temperatura de fusión de los oligos depende de su T_m (*melting Temperature*) y la temperatura de extensión es característica de cada polimerasa. En cuanto al tiempo de extensión es recomendable al menos 1 minuto para sintetizar 1 kilobase de DNA aunque puede variar en función de la polimerasa que se utilice.

3.10. Mutagénesis dirigida

Esta técnica ha sido utilizada en esta tesis para la construcción de los distintos mutantes y posterior análisis de su función en las proteínas estudiadas. Se ha utilizado el kit de mutagénesis *QuikChange™ Site-Directed Mutagénesis Kit* de STRATAGENE, que permite la obtención rápida de plásmidos mutantes a partir de DNA de doble cadena. El método se basa en la amplificación del DNA por PCR con la *Pfu* DNA polimerasa, a partir de los oligonucleótidos complementarios que contienen la mutación que se quiere introducir. Una vez finalizada la amplificación, el producto se trata con el enzima DpnI, que únicamente corta el DNA metilado, de forma que sólo las cadenas sintetizadas *in vitro* serán resistentes a la acción de este enzima. Después se transforma este DNA en bacterias *E. Coli* super competentes que se suministran con el kit, y se analizan mediante secuenciación o restricción los clones obtenidos. Los oligonucleótidos de mutagénesis utilizados se encuentran detallados en el apéndice A.

3.11. Síntesis de cRNA

La reacción de síntesis de cRNA se ha usado ampliamente en esta tesis ya que la mayoría de los estudios funcionales se han realizado en oocitos de *Xenopus* microinyectados con el cRNA obtenido.

Esta reacción consiste en la síntesis *in vitro* de un fragmento de cRNA a partir de cDNA plasmídico que contiene un promotor para la RNA Polimerasa del fago T7, T3 o SP6. El DNA plasmídico que contiene el cDNA de interés se corta con un enzima de restricción con la finalidad de linearizar el plásmido más allá del extremo 3' de la región codificante. Es preferible utilizar enzimas que dejen extremos 5' protuberantes o extremos romos, ya que los extremos 3' protuberantes pueden actuar como cebadores para la síntesis de cRNA antisentido. El plásmido linearizado se purifica por extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol, y se resuspende en agua mili-Q autoclavada.

El elemento esencial de un vector para transcripción a cRNA y expresión en oocitos es la presencia del promotor de la RNA polimerasa del fago T7, T3 ó SP6. Además, existen vectores diseñados para aumentar los niveles de expresión de las proteínas exógenas expresadas en oocitos (Shih et al., 1998). Así, algunos vectores añaden los extremos 5' y 3' no traducidos de mensajeros muy estables en oocitos, como por ejemplo el mensajero de la β -globina. El vector pNKS2 usado en este trabajo incluye los extremos no traducidos del mRNA de la subunidad $\beta 3$ de la Na^+/K^+ -ATPasa (Gloor et al., 1995).

Para la reacción de transcripción se ha utilizado el *kit mMessage mMachine* (Ambion; T7 RNA Polymerase, 1344; T3 RNA Polymerase, 1348; SP6 RNA Polymerase, 1340) siguiendo las instrucciones de uso.

Al finalizar el proceso, se valora la concentración del cRNA sintetizado en el espectrofotómetro y se corre una alícuota en un gel de agarosa-formaldehído para comprobar que el cRNA tiene el tamaño adecuado y no se observa degradación de la muestra. El cRNA obtenido puede guardarse a -80°C durante meses, aunque la descongelación/congelación de la muestra muchas veces puede provocar la degradación del RNA.

Para la manipulación del RNA, las soluciones y el material usados deben ser libres de RNAsas. Para este fin deben tomarse una serie de medidas:

- uso de guantes de cirugía durante todo el proceso.
- material de vidrio esterilizado por calor a 200°C durante un mínimo de 4 horas.
- reactivos reservados para este propósito (libres de RNAsas), manipulados con guantes y sin introducir espátulas.
- material de plástico estéril.
- soluciones preparadas con agua MiliQ autoclavada o previamente tratada con DEPC.

3.12. Electroforesis de RNA en geles de agarosa-formaldehído

El gel de agarosa-formaldehído es un sistema de electroforesis desnaturante que asegura la migración electroforética del RNA proporcional a su tamaño. Este tipo de gel ha sido utilizado para visualizar los cRNAs sintetizados *in vitro*.

Procedimiento:

- La polimerización del gel se realiza en campana. El portageles, el peine y la cubeta de electroforesis se lavan con etanol y se aclaran con agua DEPC.

- Se funde agarosa al 1% al microondas en tampón MOPS 1x. Cuando se enfría a aproximadamente 50°C , debajo de la campana extractora, se añade el formaldehído a una concentración final de 0.66M (2.7ml de formaldehído 37% en 50ml de solución de agarosa).

- Se vierte la agarosa-formaldehído al portageles con el peine y, cuando el gel ha polimerizado, se coloca en la cubeta, cubierto de tampón MOPS 1x.

- Para la preparación de las muestras se pone en un tubo $1\mu\text{l}$ de cRNA (que proviene de la síntesis *in vitro*) o de marcador de masa molecular 0.24-9.5 Kb (Gibco 15620-016), $1\mu\text{l}$ de solución de bromuro de etidio (400mg/ml), $3\mu\text{l}$ de tampón de muestra 2x (Ambion 1344), y $5\mu\text{l}$ de agua estéril. Se desnaturizan a 85°C durante 5 min. Las muestras se mantienen en hielo hasta el momento de cargarlas. - Se cargan las muestras y se conecta la cubeta a 60V durante 30 min aproximadamente.

4. OBTENCIÓN Y MICROINYECCIÓN DE OOCITOS DE *Xenopus*

Desde que el grupo de K. Sumikawa (Miledi et al., 1982a; Miledi et al., 1982b) demostró que canales iónicos y receptores podían expresarse funcionalmente en oocitos de *Xenopus*, este sistema se ha convertido en un método estándar para la expresión de proteínas heterólogas, y para la clonación funcional de transportadores y canales (Romero et al., 1998; Shih et al., 1998; Sigel, 1990).

El hecho que el oocito maduro tenga un tamaño grande (1.0-1.2 mm) debido a la acumulación de proteínas de reserva, y que contenga grandes cantidades de mRNAs y maquinaria de traducción (ribosomas, tRNAs...) para usarlos durante el desarrollo embrionario, lo hace útil en estudios de expresión funcional de proteínas (Colman et al., 1984). Además, el hecho que los oocitos no necesiten captar los alimentos del medio supone otra ventaja, ya que hace que presenten baja expresión endógena para muchas de las proteínas expresadas heterológamente.

4.1. Adquisición y mantenimiento de ranas *Xenopus laevis*

Las ranas *Xenopus laevis* son originarias de Sur África. Actualmente en nuestro laboratorio se compran a la empresa sur-africana *African Xenopus Facility* (afxeno@mweb.co.za).

Hemos utilizado ranas *Xenopus laevis* hembras, de 12-15 cm de largo. Según nuestra experiencia, las ranas salvajes sur-africanas son más grandes y tienen oocitos de mejor calidad que las ranas criadas en laboratorios. Para identificar cada uno de los animales y poder hacer un seguimiento, se ha implantado un chip (*Implantable Transponder* ID 100; Trovan) en el tórax de la parte dorsal de cada rana. La lectura del código del chip se hace mediante un lector (*Hand Held Reader* LID500; Trovan).

El mantenimiento de las ranas se realiza en los estabularios de la Facultad de Biología y del Parque Científico de Barcelona. Las ranas se someten a ciclos continuos de luz y oscuridad de 12 horas en una sala termostaticada a 19-21°C. Se mantienen en grupos de 10 a 12 animales en acuarios con capacidad entre 100 y 200 litros de agua. Los acuarios deben tener tapa para prevenir que los animales se escapen ya que, fuera del agua, las ranas mueren por deshidratación al cabo de pocas horas.

La instalación y puesta a punto de los acuarios en el estabulario de la Facultad de Biología la realizamos los miembros de nuestro grupo de investigación que utilizamos los oocitos como sistema de expresión, siguiendo las recomendaciones del Dr. Bruno Hagenbush de la Universidad de Zürich:

- Se forraron los acuarios con papel adhesivo de color azul hasta la mitad de su altura, con el objetivo de que las ranas no se estresasen debido al movimiento de personas en la misma sala. Para llenar los acuarios, se utilizó agua del grifo que previamente pasa por un filtro de organoclorados.

Material y Métodos

- Se instalaron bombas (2224 Professional Canister Filter; Eheim) para filtrar continuamente el agua del acuario. Estas bombas contienen en su interior dos filtros porosos y dos cestas: la inferior contiene zeolita (Ehfisubstrat; Eheim) y la superior contiene carbón activo (dentro de una malla). En el extremo del tubo de la bomba que aspira el agua del acuario se colocó un prefiltro cilíndrico poroso para evitar que se aspiren restos de comida u otros residuos que podrían obstruir las bombas.

- Se instaló un compresor de aire que a través de una piedra porosa permite la oxigenación del agua del acuario.

- Antes de poner las ranas en los acuarios se tiene que permitir que se instalen bacterias degradadoras de amonio en los filtros de la bomba. Por este motivo, se inocularon bacterias (Tetra Bactozym; Tetra) en el agua, y se dejaron durante unos 2-3 días las bombas en funcionamiento. Pasado este tiempo, las bacterias tienen que ser capaces de degradar el amonio, y esto se puede monitorizar añadiendo una concentración conocida de amonio (por ejemplo 1 mg/l de NH_4Cl) y comprobando como ésta concentración disminuye a medida que pasan los días. En este momento ya se pueden instalar las ranas en el acuario.

Para mantener las ranas en condiciones óptimas se tiene que controlar la calidad del agua de los acuarios. Este control se hace midiendo diversos parámetros:

- pH: tiene que estar entre 6.5 y 7.5. Se valora con tiras de papel de pH (Merck).

- Amonio: tiene que ser < 2.5 mg/l. Se valora con el *kit Ammonium-Test* (1.14400.0001; Merck).

- Nitratos: tienen que ser < 2.5 mg/l. Se valora con el *Kit Nitrat-Test* (1.100200.0001; Merck)

- Nitritos: tienen que ser < 0.15 mg/l. SE valora con el *kit Nitrit-Test* (1.14658.0001; Merck).

La calidad del agua se mide 3 veces por semana. Si la calidad no es la apropiada, se renueva parcialmente el agua del acuario o bien se cambia parcialmente el contenido de carbón activo y zeolita del interior de la bomba. Hay que decir que el interior de la bomba se limpia una vez por semana, y una vez al mes se limpian todos los sistemas de tubos.

En cuanto a su alimentación, las ranas sur-africanas no aceptan el pienso a priori. Por este motivo, las ranas son alimentadas 2 veces por semana (lunes y jueves) con corazón de ternera cortado a trocitos. En alguna ocasión también se les ha da grillos vivos pero esto ocasiona algunos problemas de limpieza del acuario. Sin embargo, las que tenemos en el estabulario del parque científico son alimentadas con pienso por normas internas. Actualmente, el mantenimiento de las ranas lo llevan a cabo los técnicos de cada estabulario.

4.2. Extracción de oocitos, digestión con colagenasa y microinyección

4.2.1. Extracción:

Los oocitos se extraen de la rana un día antes de la inyección en las instalaciones del estabulario. Para ello, las ranas son anestesiadas por inmersión en una solución 1g/l de 3-aminobenzoic acid ethyl ester (SIGMA A-5040) en agua del grifo durante unos 20 minutos. Después la rana se pone sobre una superficie de hielo para que se mantenga dormida durante la operación (ya que es un animal poiquiloterma).

Los oocitos se extraen mediante una incisión de 1cm de longitud en un lado del abdomen de la parte ventral de la rana: primero se hace el corte en la piel y después en el músculo. Los oocitos se extraen con ayuda de unas pinzas de cirugía. Normalmente se extraen 3 ó 4 lóbulos del ovario. Hay que tener precaución de no extraer el ovario entero, ya que entonces los oocitos no se regenerarían. Una misma rana se opera, como mínimo, cada tres meses. Normalmente cada animal se usa para 8-10 extracciones. Cuando los oocitos producidos ya no son de calidad, las ranas son sacrificadas por sobredosis de anestésico (4g/l). Los oocitos extraídos se ponen en placas de petri con tampón ORII 1x. La incisión se cierra con puntos de cirugía: normalmente se hacen 4-5 puntos en el músculo y 4-5 puntos en la piel. Mientras se despierta, se mantiene la rana húmeda pero no sumergida completamente en agua.

4.2.2. Digestión con colagenasa:

Las células foliculares del oocito pueden separarse manualmente o por digestión con colagenasa, que es el método utilizado en nuestro laboratorio. Se ha utilizado la colagenasa D, proveniente de *Clostridium histolyticum* (1088866; Roche). Es preferible utilizar una colagenasa con actividad tripsina baja (<0.05 U/mg liofilizado), ya que actividades elevadas pueden afectar la integridad de los oocitos durante la digestión. A veces ha sido necesario probar distintos lotes de colagenasa para escoger la más eficiente y menos tóxica para los oocitos.

Procedimiento:

- Se prepara un tubo Falcon de 15ml con una solución de 10ml a 2 mg/ml de colagenasa D en tampón ORII 1x. Los lóbulos ováricos extraídos se cortan en trocitos pequeños, se secan con cuidado sobre papel de celulosa y se introducen en la solución de colagenasa, con cuidado que el volumen de oocitos del tubo no supere los 3ml.

- La digestión se realiza en un agitador orbital durante 45 minutos dentro de un incubador (HotCold-S, Selecta) a 18°C. Pasado este tiempo se hacen tres lavados con ORII 1x y se inicia una segunda digestión con solución de colagenasa fresca en las mismas condiciones que la primera, durante 15-45 minutos. Esta segunda digestión de los oocitos se va controlando sacando unos cuantos y observándolos en la lupa binocular (Nikon 546225).

Materiales y Métodos

- Cuando la digestión está completa, se hacen 4 lavados con tampón ORII 1x y 4 lavados con tampón BARTH'S suplementado y se ponen los oocitos en una placa de petri (Sterilin) con tampón BARTH'S suplementado.

Debido a que la ovogénesis en *Xenopus* es asincrónica (es decir, existen oocitos en todos los estadios del desarrollo a la vez), se tienen que seleccionar manualmente en la lupa binocular los oocitos maduros para ser inyectados. Se seleccionan los oocitos en estadio V-VI del desarrollo (Dumont, 1972). Estos presentan un diámetro de 1.0-1.2 mm, los dos hemisferios claramente diferenciados, y el polo animal ligeramente más claro que en los oocitos de estadio IV.

Los oocitos se mantienen a partir de este momento en tampón BARTH'S suplementado, dentro de viales de vidrio (Liquid scintillation vials V-7130; SIGMA) y en un incubador a 18°C y en la oscuridad. Cada día se observan en la lupa binocular, se quitan los oocitos que no tienen aspecto óptimo, y se cambia la solución de BARTH'S.

4.2.3. Microinyección

La microinyección de los oocitos de *Xenopus* se realiza con un dispensador unido a un micromanipulador (Narishige MN-15) que permite el movimiento en tres dimensiones. Los oocitos se han inyectado con distintos cRNAs, sintetizados por transcripción *in vitro* a partir del cDNA correspondiente.

Procedimiento:

- En primer lugar, se preparan micropipetas con las que se inyectará el cRNA dentro del oocito. Esto se consigue a partir de capilares (*Disposable micro-pipettes*; Drummond) que se estiran con un aparato para hacer micropipetas (Inject+Matic Puller; Gèneve). Luego, las micropipetas se calibran con agua para que inyecten un volumen de 50nl, con la ayuda de una tira de papel milimetrado.

- Los oocitos que hay que inyectar se ponen en una placa de 35 mm de diámetro con tampón BARTH'S. Para mantener los oocitos inmovilizados en la placa, se engancha previamente una reja de polipropileno en el fondo de la placa.

- El cRNA a inyectar se centrifuga para precipitar las posibles impurezas presentes. Esto disminuye la probabilidad de que la aguja se obture durante el proceso de inyección.

- Se pone un trozo de parafilm encima de una placa de 35 mm. Enzima del parafilm se coloca la gota de cRNA para inyectar. Se aspira la gota controlando el proceso en la lupa, que tiene una fuente de luz adecuada (Intralux 5000; Volpi). Después se posiciona la aguja encima del polo vegetal de cada oocito y se hace bajar lentamente hasta que la aguja atraviesa el oocito. Entonces se inyectan los 50 nl de cRNA en el oocito.

5. CULTIVOS CELULARES Y TRANSFECCIÓN

Cuando se manipulan células en cultivo se deben seguir unas normas muy estrictas de limpieza. Se trabaja siempre dentro de una campana de flujo vertical que se limpia con etanol al 70% antes de comenzar a trabajar. El uso de llama dentro de ésta es opcional. Para evitar contaminaciones no se debe pasar las manos o cualquier objeto no estéril sobre el material estéril. Los medios de cultivo, las soluciones y todos los materiales que entran en contacto con las células han de esterilizarse, bien por filtración con filtros de 0,22µm de diámetro de poro o por otros métodos (autoclave, irradiación, etc.). Estas condiciones se mantienen cuando las botellas se abren y cierran sólo dentro de la campana. Además, estas soluciones se atemperan a 37°C antes de ser utilizadas. Los restos biológicos se tratan con lejía al 30% y los materiales utilizados se autoclavan. Una vez finalizado el trabajo dentro de la campana se limpia la superficie con etanol al 70% y se reduce el flujo a las condiciones de mantenimiento. Generalmente, las células se mantienen en incubadores con las siguientes condiciones: 37° C, 90% de humedad relativa y 5% de CO₂.

5.1. Condiciones de cultivo de células HeLa

Las células HeLa (ATCC CCL-2) proceden de adenocarcinoma de cérvix humano. Presentan un fenotipo epitelial y tienen incorporado secuencias del papilomavirus humano 18 (HPV-18). Estas células son ampliamente utilizadas para el estudio de diferentes proteínas expresadas de manera transitoria.

Se han crecido en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; 41966-029 GIBCO; con L-glutamina y D-glucosa y sin HEPES) suplementado con 100U/ml de penicilina, que actúa inhibiendo la síntesis de proteoglicanos de la pared bacteriana; 100 µg/ml de estreptomina (BioWhittaker 17-602^a), que inhibe la síntesis proteica de la subunidad 70S del ribosoma; y 10% de suero fetal bovino (FBS; 10270-106 BioWhittaker) previamente inactivado (30 minutos a 56°C) del sistema del complemento y de posibles anticuerpos presentes. Se han mantenido en incubadores con las siguientes condiciones: 37 o 33°C, 90% de humedad relativa y 5% de CO₂.

El cultivo se tiene que mantener en unas condiciones de crecimiento óptimas. Esto se consigue haciendo subcultivos de las células una vez han alcanzado la confluencia, y su posterior redistribución en placas para realizar experimentos o simplemente para mantenerlas en crecimiento. El subcultivo consiste en la separación de las células de la superficie donde están adheridas por acción de una proteasa y la siembra posterior.

Hay que decir que las células HeLa son de crecimiento rápido (aproximadamente una duplicación cada 24 horas), por lo cual hay que subcultivarlas al menos dos veces por semana. El número de pases afecta a la transfección transitoria. A partir del pase 35-40 el porcentaje de células transfectadas decae considerablemente.

Normalmente se subcultivan células a partir de placas de 100mm de diámetro que alcanzan el 100% de confluencia o incluso el 150%. Se elimina el medio que cubre las células y se hacen 2 lavados con 10ml de PBS. Se añade 1ml de tripsina 0.1% y se incuba a temperatura ambiente durante 3 min aproximadamente. El proceso puede tener lugar a 37°C pero evitando siempre una sobre-exposición a la tripsina ya que ésta puede causar daños importantes en las células. Una vez tripsinizadas, se acaban de desenganchar de la placa con ligeros golpes contra la palma de la mano e inmediatamente se añaden 9ml de medio suplementado. Las células se resuspenden con una pipeta de 10ml hasta conseguir una suspensión que se plaquea diluida en función de la cantidad y del tiempo en el que necesitemos las células. Así, si una placa de 100mm confluyente al 100% se tripsiniza y se siembra a un 10% de confluencia tardará 2-3 días en volver a un 100% de confluencia. En el caso de que se utilicen para una transfección transitoria, a partir de una placa confluyente al 100% se siembra a un 20% a primera hora de la mañana, de manera que si se transfecta por la tarde estará a un 30-40% de confluencia. No conviene hacer diluciones mayores ya que la homogeneidad de la población podría verse alterada.

Para su congelación, las células tripsinizadas se sedimentan a 1200 r.p.m. (200 x g) durante 4 min y se resuspenden en 10ml de medio de cultivo (previamente en hielo) que contiene 20% de FBS y 10% de DMSO (Sigma, #D2650). La suspensión se distribuye en criotubos (enfriados previamente en hielo) que se colocan en un recipiente de isopropanol y se congela a -80° C. Después de 24 h se pasan a un tanque de nitrógeno líquido. Es muy importante que el proceso de congelación sea lento. Por esto, se recomienda el uso del tanque de isopropanol en el que la temperatura disminuye 1° C por minuto.

La descongelación es un proceso que debe llevarse a cabo de manera muy rápida. El criotubo se saca del tanque de nitrógeno líquido y se descongela a 37°C. La suspensión de células se diluye en 10ml de medio de cultivo que está a 37°C y se precipita a 200 x g durante 3 min a temperatura ambiente. Se elimina el sobrenadante, las células se resuspenden en 10ml de medio de cultivo fresco y se siembran en una placa de 100mm. Al día siguiente se cambia el medio para eliminar las células muertas no adheridas a la placa.

El micoplasma es un parásito intracelular que puede afectar los cultivos celulares sin indicios aparentes de contaminación. Es aconsejable realizar un test de micoplasma periódicamente que sea capaz de detectar diferentes especies del parásito. Se ha utilizado el *EZ PCR Mycoplasma test Kit* (Biological Industries Co.) basado en la amplificación por PCR del genoma del parásito. Contiene oligonucleótidos degenerados capaces de amplificar un trozo de secuencia de las ocho especies más comunes de micoplasma. Como molde de reacción se utiliza 1ml de medio de cultivo que haya estado, como mínimo, 48 horas en contacto con las células.

5.2. Transfección celular transitoria.

El estudio funcional de una proteína requiere en muchos casos, su expresión transitoria en una línea celular. En este trabajo se ha utilizado el método de transfección basado en la introducción de un coprecipitado de DNA exógeno y fosfato cálcico dentro de la célula (Sambrook et al., 1989). El mecanismo por el cual el precipitado entra en la célula no está muy claro, aunque se cree que inicialmente se adhiere a la superficie de la célula y por endocitosis se incorpora al interior de ésta. Este precipitado se forma al mezclar dos soluciones, una salina que contiene cloruro cálcico y otra de tamponación que contiene el fosfato; el DNA presente queda incorporado en los cristales del precipitado formado.

Uno de los parámetros más importantes en este método es el pH de la solución que contiene el fosfato. Pequeñas variaciones en este factor determinan el tamaño del precipitado y por consiguiente su endocitosis en la célula. Se recomienda probar la eficiencia de transfección con soluciones de fosfato de diferente pH dentro de un rango óptimo teórico de 6-7. Este rango puede variar considerablemente entre las diferentes líneas celulares y la calidad del DNA que se utiliza.

Para monitorizar la eficiencia de transfección, se ha utilizado un plásmido que codifica la *Green Fluorescent Protein* (GFP). Las células se transfectan con el plásmido de interés y un 10% de plásmido GFP. De esta manera, se puede conocer el porcentaje de células transfectadas cuando se cuentan en un citómetro de flujo. Un parámetro que puede ser importante en la formación del precipitado es la cantidad de DNA. En este trabajo se ha utilizado siempre la misma cantidad en función del número de células a transfectar: 20µg de DNA en una placa de 100mm; 40µg de DNA en una placa de 150mm, y 4µg en un pocillo de una placa de 6.

Finalmente, se debe tener en cuenta la densidad del cultivo celular en el momento de la transfección. Este parámetro depende del tipo celular y del método de transfección que se utilizan. Las transfecciones con fosfato cálcico en células Hela se realizan sobre cultivos que se encuentran entre un 20% y un 50% de confluencia.

Todo el proceso de transfección se lleva a cabo en una campana de flujo laminar ya que implica la manipulación de células en cultivo. Las células se siembran el día antes o el mismo día por la mañana teniendo en cuenta que deben alcanzar el 20-40 % de confluencia en el momento de la transfección. El medio de cultivo se reemplaza por medio fresco antes de la transfección.

Procedimiento:

- La mezcla de DNAs se prepara en un tubo estéril de 15 ml: 18µg del DNA de interés, 2µg de plásmido GFP y hasta 250µl de agua. Si se trata de una transfección doble o triple, se mezclan cantidades equimolares de DNA. Se añade 250 µl de la solución de Calcio y se agita vigorosamente para mezclar el Calcio y el DNA. Se introduce una pipeta de 2 ml y con el pipeteador automático se hacen burbujas mientras se añaden 500µl de la solución de fosfato gota a gota y se deja reposar 15 min a temperatura ambiente para favorecer la formación de los precipitados.

- Es importante que la temperatura de la campana no sea elevada. Transcurrido este tiempo, se vuelve a hacer burbujas con el pipeteador automático durante 15-20 s y se añade a las células gota a gota mientras se agita la placa para distribuir la solución de transfección. Pasadas 12-20 h se sacan las células del incubador, se lavan dos veces con PBS y se añade medio de cultivo fresco. Alternativamente, las células se pueden tripsinizar y volver a sembrar según el experimento que se quiera realizar. Es conveniente que el 10% se siembre en un pocillo de una placa de 12 y se destine para saber el porcentaje de transfección en el citómetro de flujo. Al cabo de 24-48 h se puede realizar el experimento y la monitorización de la transfección en el citómetro de flujo.

6. ENSAYOS DE TRANSPORTE

Los ensayos de transporte se realizan en una zona del laboratorio adecuada para trabajar con material radioactivo (^3H y ^{35}S), ya que los aminoácidos utilizados están marcados radiactivamente. Por este motivo hay que seguir todas las precauciones adecuadas para este tipo de manipulación. El análisis de los datos de transporte obtenidos se ha realizado mediante el programa Graphpad prism

6.1. Ensayos de transporte en oocitos

Se han realizado ensayos de entrada y de salida de sustrato

❖ Ensayos de entrada de sustrato:

Procedimiento:

- Se ponen 7-8 oocitos en un vial de vidrio con tampón de transporte 1x y se mantienen durante 30 segundos. Se cogen con una pipeta *pasteur* de plástico y se ponen en un tubo de transporte. Se aspira el medio con cuidado con una micropipeta y se añaden 100 μl de medio de transporte (10 $\mu\text{Ci/ml}$). Se incuba en este medio durante un periodo de tiempo determinado.

- Transcurrido este tiempo, se aspira el medio radioactivo con una micropipeta y se hacen tres lavados con 4ml de medio de *stop* frío. El exceso de aminoácido no marcado del medio de *stop* permite desplazar el aminoácido marcado que pueda haberse unido a la superficie del oocito. Cada uno de los oocitos se pone en un vial de centelleo en presencia de 200 μl de solución de lisis, y se deja en agitación a temperatura ambiente hasta que el oocito se disuelve completamente.

- Se añade a cada vial 3 ml de líquido de centelleo y se ponen a contar en un contador beta. Por otro lado se cuentan 10 μl de medio de transporte sobrante para determinar la actividad específica.

- La entrada de sustratos inducida en los oocitos inyectados se calcula restando la entrada que se produce en los oocitos no inyectados. Los resultados se expresan como pmoles de aminoácido por unidad de tiempo y por oocito.

❖ Ensayos de salida de sustrato:

En los ensayos de salida de sustrato, se necesita cargar el oocito de medio radioactivo. Este proceso se realiza mediante la preincubación de los oocitos en el medio de carga durante un tiempo determinado.

Procedimiento:

- Se ponen 7 oocitos en un vial de vidrio con tampón de transporte 1x y se mantienen durante 30 segundos. Se cogen con una pipeta pasteur de plástico y se ponen en un tubo de transporte. Se aspira el medio con cuidado con una micropipeta.

- Inmediatamente, se añade al tubo 100µl de medio de carga (30µCi/ml) y se incuba en este medio durante una hora. Transcurrido este tiempo se aspira el medio radioactivo con una micropipeta. Algunos de estos oocitos se usarán como controles de carga y otros para realizar el ensayo de salida.

- En los oocitos usados para realizar el ensayo de salida, se hacen cuatro lavados con 4ml de tampón de transporte 1x a temperatura ambiente, se aspira el tampón con cuidado con una micropipeta e inmediatamente se añade al tubo el volumen necesario de medio de salida (en función del número de alícuotas que haga falta sacar en el paso siguiente).

- A la vez que se mueve el tubo suavemente, se van sacando alícuotas de 200µl de medio de salida a tiempo cero y a diferentes tiempos. Cada una de las alícuotas se pone en un vial en presencia de 3 ml de líquido de centelleo y se cuenta en un contador beta.

- Por otro lado, en los oocitos utilizados como control de carga, se hacen tres lavados con 4ml de medio de stop frío. Cada oocito se pone en un vial de centelleo en presencia de 200 µl de solución de lisis. Se deja en agitación a temperatura ambiente hasta que el oocito se disuelve completamente, y se pone a contar en un contador beta en presencia de 3 ml de líquido de centelleo. Esta medición nos permite determinar la radioactividad total cargada en el oocito.

- A partir de las medidas anteriores, puede calcularse la velocidad de salida del aminoácido radioactivo como porcentaje de radioactividad que sale a un tiempo determinado: (radioactividad liberada al medio / radioactividad total en el oocito x 100).

6.2. Ensayos de transporte en células HeLa

En este trabajo se han realizado ensayos de entrada de sustrato utilizando células HeLa transfectadas transitoriamente y sembradas en placas de 24 pocillos, en las que cada pocillo refleja un punto de transporte. El valor de cada condición de transporte se determinada por la media de los valores obtenidos en cuatro pocillos ± el error estándar. Las células se mantienen en el incubador a 37° C o 33° C hasta el inicio del transporte. A 33° C,

la cantidad de proteína que se expresa es mayor probablemente debido a que los mecanismos de degradación proteica son más lentos.

Procedimiento:

- Las células en placas de 24 pozos se ponen en una cabina termostatzada a 37°C una hora antes del inicio del transporte. Se aspira el medio de cultivo y se hacen 2 lavados con 1ml de tampón de transporte 1x a 37° C. El medio se aplica contra la pared del pocillo teniendo especial cuidado en que las células no se despeguen de la placa.

- Seguidamente, se añaden en el pozo 200µl de medio de transporte (2.5 µCi/ml) a 37°C y se incuba en este medio durante un período de tiempo determinado. Transcurrido este tiempo se aspira el medio radioactivo y se hacen tres lavados con medio de stop a 4°C.

- Para determinar la unión inespecífica del aminoácido radioactivo en la superficie celular, se hacen tres lavados con medio de stop frío, se añade el medio de transporte también frío e inmediatamente se hacen tres lavados más con medio de stop frío.

- Se añaden 250 µl de solución de lisis en cada pozo y se lisan las células con una micropipeta hasta que el lisado sea homogéneo. Se ponen 100µl del lisado en viales en presencia de 3 ml de líquido de centelleo y se cuentan en un contador beta. 20µl del lisado se utilizan para valorar la concentración de proteínas por el método de BCA. El resultado del transporte se expresa en picomoles de aminoácido transportado por mg de proteína en un tiempo determinado.

6.3. Ensayos con reactivos sulfhidrilo

Se han utilizado diferentes reactivos sulfhidrilo que se unen específicamente a cisteínas de manera covalente, con el objetivo de inactivar el transporte. Todos los reactivos sulfhidrilo se han disuelto en una solución concentrada a 1M (metanotiosulfonatos, iodoacetamida y NEM) o a 100mM (pCMB y pCMBS) en DMSO, que se mantiene congelada a -20°C. Después de su dilución en medio colina-Cl a la concentración final, los reactivos se usan inmediatamente ya que algunos presentan elevada sensibilidad a ser hidrolizados en tiempos cortos. Los reactivos MTS y el pCMBS son obtenidos de Toronto Research Chemicals, Inc. El pCMB, ácido mersalilo, iodoacetamida, y NEM son de SIGMA.

❖ Efecto de reactivos sulfhidrilo:

- Los oocitos o células Hela se incuban durante 5 minutos (o el tiempo indicado) a temperatura ambiente, con medio colina (oocitos) o MGA (células Hela) que contiene 1mM pCMB (p-chloromercuribenzoate), 1 mM pCMBS (p-chloromercuribenzenesulfonate), 5 mM NEM (N-ethyl maleimide), 1mM MTSET ([2-(trimethylammonium)ethyl] methanethiosulfonate), 2.5 mM MTSEA (2-aminoethyl methanethiosulfonate), 10mM MTSES (2-sulfonatoethyl methanethiosulfonate), 1mM MBTA ([4-(N-maleimido)benzyl] trimethylammonium), 1mM iodoacetamide, o 1 mM mersalyl acid. Después de esta incubación se realizan tres lavados con medio colina-Cl a temperatura ambiente. Después se ensaya la actividad de transporte como se ha descrito anteriormente.

- En los experimentos de reactivación (con cisteína o β -mercaptoetanol) o que implican una doble incubación de reactivos sulfhidrilo, tras la primera incubación se realizan tres lavados a temperatura ambiente, se procede a la segunda incubación con el siguiente reactivo durante el tiempo indicado, se realizan otros tres lavados, y se ensaya el transporte tal y como se ha descrito. En los experimentos en los que se inyecta reactivo dentro del oocito se tiene en cuenta el volumen que representa el oocito y el volumen que se inyecta para calcular la concentración final de reactivo dentro del oocito.

❖ Ensayos de protección:

- En la incubación con reactivo sulfhidrilo se añade 2mM L-glutamato, 2 mM L-arginina o 300 μ M L-cystina y se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos o el tiempo indicado. En algunos experimentos se han utilizado concentraciones distintas de L-glutamato (5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 250 μ M, 500 μ M, 1 mM y 2 mM) o L-cistina (6 μ M, 15 μ M, 30 μ M, 60 μ M, 90 μ M, 150 μ M y 300 μ M) junto con 50 μ M pCMB durante los 10 min de preincubación. En los experimentos de protección a 4°C, la preincubación se realizó a 4°C en los tiempos indicados. Después, los oocitos se lavaron tres veces a temperatura ambiente en medio colina-Cl y seguidamente se determinó el transporte como se explica anteriormente.

6.4. Análisis de los datos

La regresión no lineal de los datos experimentales, los cálculos cinéticos y estadísticos se ha realizado con GraphPad Prism. Las constantes de segundo orden se han determinado a partir de la fracción de actividad residual ("F=uptake after/ uptake before") en función de la concentración o del tiempo de incubación del reactivo y se ha realizado una regresión no lineal para de ecuación: $F = F_{max} * e^{-\gamma t} + F_{min}$ donde t es el tiempo de incubación en segundos, c es la concentración de reactivo, e γ es la constante de segundo orden expresada como $M^{-1}s^{-1}$. F_{min} se ha considerado cero, ya que tanto pCMB como pCMBS inhiben completamente el transporte. Los valores IC_{50} se han determinado mediante regresión no lineal con la ecuación "one-site binding (hyperbola)". El parámetro IC_{50} se ha calculado como $0.6932/\gamma t$.

7. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN Y DETECCIÓN DE PROTEÍNAS

7.1. Obtención de proteínas totales de oocitos

Los oocitos se homogenizan en 20 μ l/oocito de solución inmunomix mediante 20 pasadas con un homogeneizador de teflón-vidrio de tamaño ependorf. El homogenizado se centrifuga tres veces a 1000 x g durante 10 minutos a 4°C para eliminar el vitelo. Se recupera el sobrenadante cada vez. Después se deja el sobrenadante a temperatura ambiente

durante 30 minutos en agitación en un orbital. Se centrifuga a velocidad máxima en una centrifuga de sobremesa durante 10 minutos a 4°C. Se guarda el sobrenadante, que contiene las proteínas a -20°C.

7.2. Determinación de la concentración de proteínas: método de BCA

En este trabajo se ha utilizado el método para valorar la concentración de proteínas que utiliza el reactivo *Pierce BCA Protein Assay Reagent* (Pierce, #23225), que es más tolerante con determinados detergentes y concentraciones que el método de Bradford por ejemplo. Este método se basa en la reacción de Biuret, en la que las proteínas reaccionan con Cu^{2+} , para liberar Cu^{1+} que reacciona con BCA y forma un compuesto de color púrpura. La absorbancia se lee a 562 nm.

El reactivo que contiene el Cu^{2+} se diluye 1:50 con la solución de dilución y se añade 200 μl de esta solución por cada 10 o 20 μl de muestra, en el caso de utilizar placas de 96 pocillos. Se debe tener en cuenta que las muestras se hacen por duplicado, incluida la curva patrón que comprende de 0 a 20 μg de albúmina (Albúmina 2 mg/ml, Pierce, #23225). El protocolo continúa como indican las instrucciones del *kit*.

7.3. Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis de proteínas en un gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) es uno de los sistemas más comúnmente utilizados para separar proteínas en función de su masa molecular (Laemmli, 1970). Previo a la electroforesis, se añade a la muestra de proteínas tampón de carga que contiene una cantidad de SDS suficiente para desnaturalizarlas y conferirles carga negativa. De esta manera, se mantiene constante la relación carga/masa. Cuando estas muestras se someten a un campo eléctrico establecido sobre un gel que contiene una malla del polímero acrilamida-bisacrilamida, las proteínas se resuelven en función de su tamaño. En este tipo de electroforesis se preparan dos geles de diferente pH y concentración de acrilamida: gel concentrador y gel separador. En el gel concentrador las proteínas se mueven muy rápido debido al gran tamaño de poro facilitando así que todas entren a la vez en el gel separador. El porcentaje de acrilamida del gel separador varía en función de la masa molecular de las proteínas que nos interesa separar. Para el caso de las subunidades ligeras de la familia de transportadores de aminoácidos heteroméricos, que se encuentran alrededor de los 40-50 kDa, un gel del 10% de acrilamida permite que se separen bien.

En paralelo a las muestras, se corren estándares preteñidos de diferentes tamaños moleculares, lo que nos permite visualizar la separación de las proteínas y calcular aproximadamente su tamaño molecular.

En este trabajo se ha utilizado el sistema de electroforesis Mini-Protean (BioRad). Permite trabajar con volúmenes de muestra relativamente pequeños (20-100 μl) y manipular

fácilmente los geles. Una vez hecha la electroforesis, las proteínas se han detectado mediante un análisis Western blot.

Material y reactivos:

- Tampón de carga Laemmli x3 (LSB x3): 4 ml Tris-HCl 1.5 M pH 6.8, 12 ml glicerol 87%, 1.2 g SDS, 1 mg Azul de Bromofenol y agua Q hasta 20 ml. A partir de éste se hacen diluciones en agua Q para obtener LSB x2 y LSB x1.
- Gel concentrador o *stacking gel*: Archilamida 3.3%; bis-N,N'-metilenbisacrilamida 0.088%; Tris-HCl 0.125 M pH 6.8; SDS 0.1%; Persulfato amónico 0.1%, y TEMED 6.6 mM. Se preparan 3 ml.
- Gel separador o *running gel*: Acrilamida 6%, 7.5%, 10%, o 12% según el tamaño de proteínas que queremos separar; bis-N,N'-metilenbisacrilamida 0.27%; Tris-Base 0.375 M pH 8.8; SDS 0.1%; Persulfato amónico 0.1%, y TEMED 2.2mM. Se preparan 7.5 ml.
- Tampón de electroforesis x10: Tris-Base 250 mM, glicina 1.9 M y SDS 0.1%. Se guarda a temperatura ambiente.
- Marcadores de tamaño molecular preteñidos (*Broad range molecular weight markers*; BioRad, 161-0318).
- DTT 2 M en agua destilada. Se conserva a -20° C y cuando se descongela se mantiene en hielo.
- MiniProtean (BioRad)
- Jeringas Hamilton de 25, 50 y 100 μ l.
- Isopropanol

Procedimiento:

a) Polimerización de los geles:

Se montan los vidrios del sistema de electroforesis según las instrucciones del fabricante. Se prepara el *running gel* teniendo en cuenta que el TEMED es catalizador de la reacción de polimerización por lo que se añade en último lugar. El gel se vierte entre los vidrios hasta que el volumen ocupe 3/4 de éstos aproximadamente. Se deposita una ligera capa de isopropanol para nivelar el gel, eliminar burbujas de aire y evitar que el oxígeno inhiba la polimerización. Una vez polimerizado el gel (tarda 10-15 min. aproximadamente), se decanta el isopropanol y se añade el *running gel*. Inmediatamente se coloca el peine sumergiéndolo en el gel y se deja que polimerice a temperatura ambiente.

b) Preparación de las muestras:

En un tubo eppendorf se deposita la cantidad de proteínas deseada teniendo en cuenta el volumen máximo final que entra en el pocillo del *stacking gel*: 80 μ l en un peine de 10 pocillos de 1.5 mm. de grosor y 40 μ l en un peine de 15 pocillos de 1.5 mm de grosor, ambos para un sistema MiniProtean. Se añade LSB x3 necesario para que la concentración de LSB final sea x1. En el caso de que el volumen de la muestra sea muy grande se utiliza LSB x4. Cuando las muestras se tratan con DTT (para eliminar interacciones por puentes disulfuro),

éste se añade sobre la muestra con LSB a una concentración final de 100 mM. Se mezcla, se hierven las muestras a 95° C durante 5 min. y se centrifugan a 12000g durante 30 s a temperatura ambiente. Mientras no se cargan, se mantienen en hielo.

c) Electroforesis:

Una vez preparadas las muestras y polimerizado el *stacking gel* se sacan los peines, se colocan los geles en el sistema y se sumerge en una cubeta con tampón de electroforesis. Se cargan las muestras y los marcadores de peso molecular con una jeringa Hamilton. Se coloca la tapa con los electrodos y se conecta a una fuente de alimentación. Se fija el amperaje a 30 mA por gel y se corre durante 1-2 h a temperatura ambiente. Finalmente, se desmonta el sistema y se separan los vidrios. A continuación, el gel se ha transferido a una membrana de PVDF para análisis de Western blot.

7.4. Análisis de Western blot o inmunodetección

El análisis de Western-blot permite que una proteína separada por electroforesis y transferida a una membrana, sea identificada mediante un anticuerpo que la reconoce específicamente.

Este proceso consiste en i) el bloqueo de la membrana mediante la incubación en una solución rica en proteínas que evita la adsorción del anticuerpo a la membrana, ii) incubación con el anticuerpo primario, iii) incubación con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa HRP (*horse radish peroxidase*) y, iv) la posterior detección con el sistema ECL (*Enhanced Chemiluminescence*) de la casa comercial Amersham.

Material y reactivos:

- Solución de bloqueo: depende del tipo de anticuerpo primario que se utiliza. En este trabajo se ha utilizado leche en polvo desnatada al 5% en PBS para el anticuerpo anti-myc y albúmina bovina al 3% en TBS para el anticuerpo anti-Xpress .
- Solución de anticuerpo primario: generalmente se prepara en la solución de bloqueo diluida y depende del tipo de anticuerpo: dilución 1/1000 del anti-myc en leche 1% en PBS, dilución 1/5000 del anti-Xpress en 1% BSA, 0.05% Tween-20 en TBS.
- Tampón de lavado: Tween-20 al 0.3% en PBS para el anti-myc y Tween-20 al 0.05% en TBS para el anti-Xpress.
- Solución de anticuerpo secundario: producido en cabra y acoplado a HRP (*Horseradish Peroxidase*) contra IgG de ratón (*HRP-conjugated goat anti-mouse-IgG solution*, Sigma). Se ha utilizado tanto contra el anti-myc como el anti-Xpress, con una dilución 1:50000 leche desnatada 1% en PBS (para el anti-myc) o en 1% BSA en TBS-0.05% Tween-20 (para el anti-Xpress).
- Reactivo ECL: este reactivo permite la detección de los anticuerpos conjugados con HRP debido a que la peroxidasa cataliza una reacción química que produce un sustrato luminiscente. (Amersham, RPN 2209).

- Filmes para autorradiografía.
- Soluciones de revelado y fijación (Kodak)

Procedimiento:

- Para evitar al máximo la adsorción de anticuerpos en la membrana, ésta se preincuba con una solución rica en proteínas. Las incubaciones posteriores con los anticuerpos primario y secundario también se hacen en soluciones que contienen proteínas. Este bloqueo se lleva a cabo durante 1 h a 37° C (leche 5% o BSA 3% en PBS). Finalizado este tiempo se incuba con 5 ml de solución de anticuerpo primario (membrana de 9x5 cm) durante 16 h a 4°C o 1h 15 min a temperatura ambiente. Para eliminar el exceso de anticuerpo y las interacciones inespecíficas de éste, se hacen 3 lavados de la membrana con tampón de lavado durante 10 min a 37° C y en agitación. Una vez lavada, se incuba con la solución de anticuerpo secundario durante 45 min a temperatura ambiente y se hacen 3 lavados de 5 min a temperatura ambiente. Se eliminan los restos de tampón de lavado con PBS, se cubre la membrana con un plástico para evitar que se seque y se añade 500µl del reactivo ECL sobre la cara de la membrana que contiene las proteínas. Después de 1 min se limpian los restos de reactivo y las proteínas se detectan con una exposición a un film autorradiográfico.

7.5. Estudios de inmunolocalización en secciones de oocito

Los estudios de inmunolocalización se basan en el uso de anticuerpos secundarios conjugados a un fluorocromo (rodamina, *Texas Red*, fluoresceína, Oregon Green, etc.) que reconocen las cadenas pesadas del anticuerpo primario específico. Se han utilizado para detectar la expresión de proteínas en la superficie celular del oocito. En este aspecto, hay que decir que algunas proteínas de reserva del oocito de *Xenopus* son fluorescentes en la misma longitud de onda que la fluoresceína. Por este motivo se han utilizado anticuerpos secundarios conjugados a otros fluorocromos, como por ejemplo la rodamina y el *Texas Red*.

Procedimiento:

- Los estudios de inmunolocalización en oocitos se han realizado sobre cortes de oocitos montados sobre un portaobjetos tratados previamente con gelatina 0.5%. Encima de una superficie de nieve carbónica se pone a enfriar una placa metálica. Cuando está fría, se ponen los criomoldes (Cryomold 4565; Tissue-Tek) encima y se deja que se enfríen durante un rato. Se añade una gota de OCT (Agar Scientific Ltd, Essex, England) en los criomoldes y rápidamente ponemos un grupo de 5 oocitos encima y se cubre todo con OCT. Se intenta que los oocitos queden separados entre ellos y envueltos de OCT (se pueden mover con cuidado con una punta de pipeta para posicionarlos adecuadamente). Se deja que el OCT se congele completamente y se guardan los moldes a -80°C hasta el momento de hacer los cortes. Se hacen secciones de 15mM de los moldes en el criostato, siguiendo las instrucciones indicadas en Shih et al., 1998. La cámara del criostato (Criocut 2800 E, Reichert-Jung) los moldes y la cuchilla se enfrían previamente a -20°C durante 10 horas. Los cortes se adhieren fácilmente a los portaobjetos debido a la diferencia de temperatura

entre el portaobjetos y el corte. Se guardan los cortes en una caja cerrada a -20°C hasta el momento de hacer la inmunocitoquímica.

- Para la inmunolocalización los portaobjetos que contienen las secciones de oocitos se calientan a 37°C durante 10 minutos sobre una placa calefactora. Para evitar perder volumen de las soluciones que utilizaremos, se hace un círculo con un rotulador PapPen (rotulador de grasa) alrededor de las secciones.

- A partir de aquí todo el proceso se hace a temperatura ambiente. Se incuban los cortes en solución de fijación (paraformaldehído 3% en PBS) durante 10 minutos. Para disminuir la autofluorescencia debida al proceso de fijación, se incuban los cortes durante 10 minutos con glicina 100 mM en PBS. Posteriormente, se incuban en solución de permeabilización (TritónX100 1% en PBS) durante 10 minutos y se hacen tres lavados con PBS.

- Los cortes se incuban en solución de bloqueo (FBS 10% en PBS) durante 30 minutos. Mientras tanto, se diluyen los anticuerpos en FBS 10% en PBS. Se utiliza un volumen de 200µl de anticuerpo diluido para cada portaobjetos. Se preparan las diluciones y se centrifugan a máxima velocidad a 4°C durante 5 minutos para hacer precipitar posibles impurezas. Los sobrenadantes se transfieren a nuevos tubos y se guardan en hielo hasta su utilización.

- Una vez acabado el bloqueo, se realiza la incubación con el anticuerpo primario (anti-myc diluido 1/500 en 10% FBS-PBS) durante 1 hora. Cada anticuerpo se utiliza a una determinada concentración. Si ésta se desconoce puede empezarse probando una dilución 10 veces más concentrada que la que se utiliza para Western blot con el mismo anticuerpo. Posteriormente se hacen tres lavados con PBS.

- A continuación, se incuban durante 1 hora los cortes con la dilución de anticuerpo secundario (*Goat anti-mouse Texas Red*, Molecular Probes) diluido 1/100 en 10% FBS-PBS. Es fotosensible y por este motivo se guarda protegido de la luz. La incubación también se realiza protegida de la luz (los portaobjetos pueden taparse con una tapa forrada con papel de aluminio). Posteriormente se hacen tres lavados con PBS y, finalmente, los portaobjetos se secan a 37°C.

- Se coloca sobre los cortes medio de montaje para inmunofluorescencia (ICN 622701) y un cubreobjetos. Las preparaciones se dejan secar 12 horas a temperatura ambiente y protegidas de la luz y después se mantienen a 4°C hasta su observación al microscopio confocal de los Servicios Científico-Técnicos (PCB-Universidad de Barcelona).

8. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS

HGMDG Database: "Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff". Base de datos que recoge mutaciones descritas en genes responsables de enfermedades humanas (<http://www.hgmd.org>). Las mutaciones de cistinuria identificadas en esta tesis han sido introducidas en esta base de datos.

ESEfinder: Este programa predice la presencia de *enhancers* exónicos de *splicing* (ESEs). A partir de una matriz de secuencias de ESEs conocidas el programa predice la presencia de ESEs reconocidos por los complejos SF2/ASF, SC35, SRp40 y SRp55. El programa da un valor de referencia para cada complejo (1.956 para SF2/ASF, 2.383 para SC35, 2.670 para SRp40 y 2.676 para SRp55). Si el valor que se obtiene en la secuencia de interés (de 20 nucleótidos de tamaño) está por encima del valor de referencia, existe elevada probabilidad de que sea un motivo ESE. <http://rulai.cshl.edu/tools/ESE/>

CLUSTALW: Este programa compara múltiples secuencias de DNA o de proteína y muestra el mejor alineamiento posible entre ellas. Pueden utilizarse dos accesos diferentes al programa: el Baylor College of Medicine (BCM; <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/Options/clustalw.html>) que permite alineamientos de hasta treinta secuencias diferentes de DNA o de proteína sin mostrar los residuos conservados, y el European Bioinformatic Institute (EBI; <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>) que, además de indicar los residuos conservados, describe la identidad en porcentaje entre las secuencias enviadas y permite la construcción de árboles filogenéticos.

HMMTOP (Hidden Markov Model for TOpology Prediction): Es un programa desarrollado en The Institute of Enzymology, dentro de la Hungarian Academy of Biological Sciences Research Center en Budapest, para la predicción de hélices trans-membrana y la topología de proteínas. El método se basa en el principio de la máxima divergencia en la composición de los segmentos de aminoácidos (Tusnady and Simon, 1998). Al someter la secuencia de la proteína de interés, el programa hace una predicción del número de segmentos trans-membrana, especificando el intervalo de residuos de cada segmento, indica la localización de los extremos terminales y la entropía del modelo. Testado para 148 proteínas conocidas, el programa fue capaz de predecir correctamente las hélices trans-membrana en 131 de ellas y, la topología, en 105. Se puede encontrar directamente en: <http://www.enzim.hu/hmmtop>.

MEDLINE Entrez: Es una base de datos de publicaciones que pertenece a la *National Library of Medicine* (NLM). Dispone de información bibliográfica del campo de la biomedicina, con citas a más de 4500 revistas publicadas en EEUU, Europa y otros países, la gran mayoría de ellas de lengua inglesa. Se actualiza semanalmente. La búsqueda puede hacerse por palabra clave, título, autor, revista, año de publicación o una combinación de éstos. El resultado aparece en forma de listado de referencias, con acceso libre al abstract de cada artículo y, en la mayoría de casos, al texto completo. Sin embargo, algunas publicaciones requieren suscripción para acceder al texto u ofrecen la posibilidad de "comprarlo". El acceso, a través del PubMed, se encuentra en la dirección: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>.

Membrane Proteins of Known Structure: recopilación actualizada de las proteínas de membrana con estructura resuelta. Aparecen clasificadas e incluye las condiciones de cristalización y las referencias bibliográficas. Es una página de Hartmut Michel (Universidad de Frankfurt). <http://www.mpibp-frankfurt.mpg.de/michel/public/memprotstruct.html>

Toronto Research Chemicals: página de la empresa canadiense suministradora de todos los reactivos MTS utilizados en esta tesis. Aporta amplia información bibliográfica sobre estos productos. <http://www.trc-canada.com>

○ **Apéndice A: Oligonucleótidos utilizados en el análisis mutacional de SLC3A1**

Nombre	Secuencia (5'→3')	Posición*	Tamaño fragmento (pb)	Exón
D5'	GAAGGCACTCCGAAGACATAA	-32; -12	500	1
E1R	ATCCTGTCACCCACCCTAAATG	430+38; 430+17		
iDT	GTAGGGTTTATTCATGACTTTGAC	431-36; 431-13	252	2
iRH	TCATCCCCATCTTGCCCACT	610+36; 610+17		
iD3	CCTTAGCCTCCCAGTGTATT	611-118; 611-95	311	3
iR3	CTGCCITTTACCCCTTTGTAAG	765+42; 765+21		
iD4P	AAGGATCAGGGAGGGCAATGA	766-81; 766-61	258	4
iR4P	AATACCTAAACCTCCATTAATGG	891+51; 891+29		
iDV	CGTAGTAATGTAACCAAGCA	892-41; 892-21	271	5
iR5	GACACAGGACAAAACCTCATCT	1011+110; 1011+90		
iD6	CCTTTGAAGAGGTTGTCTACA	1012-92; 1012-72	254	6
iRL	AGCCTGGGAAGAAATGAGAGC	1136+37; 1136+17		
iD7	TTCTGACAGGCCCCGATGAC	1137-45; 1137-25	285	7
iRR	GGCAACAGCAGGACATTATG	1332+44; 1332+25		
iDX	CTGTGTATACAGCTGTGTTT	1333-40; 1333-21	314	8
iR8	TCAGCAATGCAATAGAGAGATA	1500+106; 1500+85		
iD9	ATGCTAATGAGGACAAACACTA	1501-127; 1501-106	288	9
iRZ	TCATTGTTTCTAGAATCAACATA	1617+44; 1617+21		
iDN	GGATCGAGTGTGTTGGTAAAT	1618-103; 1618-82	629	10
17R	CCAAGCAGCATGCTGTACAT	2055+87; 2055+69		

Tabla 8 Amplificación de los exones y regiones intrónicas flanqueantes de SLC3A1 a partir de DNA genómico

Nombre	Secuencia (5'→3')	Posición*	Tamaño fragmento (pb)
Pdir	CTGGGATTACAGGTGCACAC	-343;-324	323
PRev	TATCTTCAGCCATGTCTCAC	+13;-7	

Tabla 9 Amplificación del promotor de SLC3A1 a partir de DNA genómico

Nombre	Secuencia (5'→3')	Posición*	Tamaño fragmento (pb)	Exón
P19D	GACGAAGTGCGAAACCAATGTTA	799;821	25Kb (salvaje);	5-8 (+i4-7)
iR8	TCAGCAATGCAATAGAGAGATA	1500+106; 1500+85	7Kb (Del ex.5-7)	
P12RC	GTGCCAGGACAGTTATGAGA	1182;1163	467pb (salvaje);	4-7
C3D	GGCATGACTGTACCCATGAA	716;735	342pb (1012-23G>C)	

Tabla 10 Amplificación de diferentes exones de SLC3A1 a partir de cDNA o DNA genómico

*Las posiciones se indican en referencia a los respectivos cDNAs.

o **APÉNDICE B. Constructos de DNA**

En los mutantes que se han generado mediante mutagénesis dirigida se muestra el oligonucleótido de mutagénesis directo utilizado. El oligonucleótido reverso es el complementario al directo. Las mutaciones y las ligaciones de los constructos intermedios han sido comprobadas por secuenciación.

B.1. Constructos de rBAT humano

rBAT L89P (pSPORT) 5' ATACCTCGGGAGATCC(C)CTTCTGGCTCACAGTG3'

rBAT L89P (pCDNA3)

El mutante rBAT(L89P) en pSPORT se ha digerido con los enzimas Clal y KpnI. Se obtiene un fragmento que contiene el cDNA de rBAT con la mutación L89P de un tamaño ~pb. El fragmento se ha purificado. Por otro lado, el constructo que contiene el cDNA de rBAT en pCDNA3 (clonado por la Dra. Nuria Reig entre EcoRI i XbaI) ha sido digerido con los mismos enzimas y se ha purificado el fragmento correspondiente al vector de tamaño ~pb. Ambos fragmentos se han ligado.

rBAT F266S (en pCDNA3) 5' ACTCCAGTTGGCACTCTGACGAAGTGCGAAACC 3'

B.2 Constructos de b^{0,+}AT humano

Realizados mediante mutagénesis. Clonados en el vector pCDNA3

b^{0,+}AT L283F 5' ATGACTGCCACCGAATTCCTGCAGGTCCCAGGC 3'

b^{0,+}AT T313C 5' ACTTTTGTGGCATTTC(A)(TG)CATCGGTGCTGCTAACGGG 3'

b^{0,+}AT C65S 5' AGCTGTGGGGCCC(A)GCCTCATCATATGG 3'

b^{0,+}AT C82S 5' CTGGGTGCCCTG(A)GCTTTGCGGAGC 3'

b^{0,+}AT C266S 5'TGGTGACGGCG(A)GCTACATCCTCATGAACG 3'

b^{0,+}AT C321S 5' TGCTAACGGGACC(A)GCTTCACAGCGGG 3'

b^{0,+}AT C440S 5' GGAGTACCTCTAC(A)GTGTGCTGTTTATATTAAGCGG 3'

B.4 Costructos de xCT

Mutantes C327 individuales de xCT en pNKS2

xCT C327A hxCTC327ALAdir 5' TGCCCTCTCC(G)CCTTTGGCTCC 3'

xCT C327I hxCTC327THRdir 5' TGCCCTCTCC(A)CCTTTGGCTCC 3'

xCT C327L hxCTC327LEUdir 5' TGCCCTCTCC(TT)CCTTTGGCTCC 3'

Mutantes C327 individuales de *myc*xCT en pNKS2

Los mutantes individuales C327 obtenidos por mutagénesis dirigida sobre xCT salvaje humano en pNKS2 se han digerido con los enzimas NdeI y NotI. Se obtiene un fragmento que contiene el cDNA de xCT con la mutación C327, de un tamaño ~pb. El fragmento se ha purificado. Por otro lado, el constructo *myc*xCT humano salvaje en pNKS2 (construido por la Dra. Emma Gasol) ha sido digerido con los mismos enzimas y se ha purificado el fragmento correspondiente al vector. Ambos fragmentos se han ligado.

xCT cysless C327 en pNKS2

El constructo que contiene el cDNA de xCT salvaje en pNKS2 (construido por la Dra. Emma Gasol) se ha digerido con los enzimas MscI y XhoI. Se obtiene un fragmento que contiene el cDNA de xCT que contiene C327, de tamaño ~2400pb. El fragmento se ha purificado. Por otro lado, el constructo que contiene el cDNA de xCT cysless en pNKS2 (construido por la Dra. Emma Gasol) ha sido digerido con los mismos enzimas y se ha purificado el fragmento correspondiente al vector de tamaño ~pb. Ambos fragmentos se han ligado.

*His*xCT cysless C327 en pCDNA4

El mutante xCT cysless C327 en pNKS2 se ha digerido con los enzimas EcoRV y NotI. Se obtiene un fragmento que contiene el cDNA de xCT cysless C327 de tamaño ~pb. El fragmento se ha purificado. Por otro lado, el constructo que contiene el cDNA de *His*xCT cysless en pCDNA4 (clonado por la Dra. Emma Gasol) ha sido digerido con los mismos enzimas y se ha purificado el fragmento correspondiente al vector de tamaño ~pb. Ambos fragmentos se han ligado.

B.5. Concatenámeros xCT-XCTConector de 12 aminoácidos:

Se han utilizado unos oligonucleótidos (PLFA y PNRA) que amplifican todo el cDNA de xCT en pNKS2 y añaden en pauta el conector de 12 residuos (SLGAAPDAAPGS, se muestra subrayado en el oligonucleótido) más una diana de restricción HindIII (se muestra en negrita en el oligonucleótido) en el extremo 5' del cDNA de xCT. Primero se amplifica todo el cDNA de xCT (salvaje o C327S) con estos oligos, y después se digiere el fragmento de PCR con los enzimas HindIII y NotI. Se obtiene un inserto de ~1700pb. Por otro lado, el constructo que contiene el cDNA de xCT en pNKS2 (clonado por la Dra. Emma Gasol) se digiere con los mismos enzimas y se purifica el fragmento correspondiente al vector de tamaño ~2800pb. Ambos fragmentos se ligan. Este constructo contiene el cDNA de xCT (salvaje o C327S) con el conector unido en pauta en el extremo 5', más una diana HindIII al inicio del conector. Este constructo se lineariza con el enzima HindIII, se trata con fosfatasa alcalina para evitar que se religue, y se purifica el fragmento, correspondiente al vector. Por otro lado, se procede a amplificar un nuevo cDNA de xCT (salvaje o C327S) en pNKS2 con unos oligos (PHFB y PNSHRB) que añaden la diana HindIII en el extremo 3' y eliminan el codón de terminación de manera que quede en pauta con el conector. Se obtiene un inserto de

~1700pb que se digiere con HindIII, y se liga con el vector anterior. Con las distintas combinaciones en la ligación se obtienen los cuatro tipos de concatenámeros: salvaje-C327S, C327S-salvaje, salvaje-salvaje y C327S-C327S.

PLFA: 5' AGTT**AAGCTT**AGGTGCTGCTCCTGATGCTGCTCCTGGATCTATGGTCAGAAAGCCTGTGTGTCC 3'

PNRA: 5' TCACTATAGGGAGACCGGAATTCG 3'

PHFB: 5' TATCATACACATACGATTAGGTG 3'

PNSHRB: 5' TTATGCA**AAGCTT**AACTTATCTTCTTCTGGTACAAC 3'

Conector de 20 aminoácidos:

Se han utilizado unos oligonucleótidos (PHFB y PLQCR 5'TAGGCA**AAGCTT**GCTGTTGCTGCTGCTGTTGCTGTAAGCTTAACTTATCTTCTTCTGGTACAAC3') que amplifican todo el cDNA de xCT (usando los concatenámeros anteriores como DNA molde) y añaden en pauta un conector de 8 residuos de glutamina (aparece subrayado en el oligonucleótido) más una diana HindIII (en negrita) en el extremo 3' de xCT. Primero se amplifica todo el cDNA de xCT (salvaje o C327S) con estos oligos, y después se digiere el fragmento de PCR con el enzima HindIII. Se obtiene un inserto de ~1700pb. Por otro lado, los constructos que contienen los concatenámeros anteriores se digieren con el mismo enzima, se tratan con fosfatasa alcalina para evitar que se religuen, y se purifican los fragmentos, correspondientes al vector. Se ligan vector e inserto. Con las distintas combinaciones en la ligación se obtienen los cuatro tipos de concatenámeros: salvaje-C327S, C327S-salvaje, salvaje-salvaje y C327S-C327S.

B.6. Concatenámeros b^{0,+}AT-b^{0,+}AT

Se han utilizado unos oligonucleótidos que amplifican todo el cDNA de b^{0,+}AT en pCDNA3 y añaden en pauta el conector de 12 residuos (SLGAAPDAAPGS, se muestra subrayado en el oligonucleótido) más una diana de restricción HindIII (se muestra en negrita en el oligonucleótido) en el extremo 5' del cDNA de b^{0,+}AT (P6OLIGOM1D y P6OLIGOM1R). Primero se amplifica todo el cDNA de b^{0,+}AT (salvaje o C321S) con estos oligos, y después se digiere el fragmento de PCR con los enzimas HindIII y XhoI. Se obtiene un inserto de ~1700pb. Por otro lado, el constructo que contiene el cDNA de b^{0,+}AT en pCDNA3 (clonado por la Dra. Nuria Reig) se digiere con los mismos enzimas y se purifica el fragmento correspondiente al vector de tamaño ~5400pb. Ambos fragmentos se ligan. Este constructo contiene el cDNA de b^{0,+}AT (salvaje o C321S) con el conector unido en pauta en el extremo 5', más una diana HindIII al inicio del conector. Este constructo se lineariza con el enzima HindIII, se trata con fosfatasa alcalina para evitar que se religue, y se purifica el fragmento, correspondiente al vector. Por otro lado, se procede a amplificar un nuevo cDNA de b^{0,+}AT (salvaje o C321S) en pCDNA3 con unos oligos que añaden la diana HindIII en el extremo 3' y eliminan el codón

de terminación de manera que quede en pauta con el conector (P6OLIGOM2D y P6OLIGOM2R). Se obtiene un inserto de ~1700pb que se digiere con HindIII, y se liga con el vector anterior. Con las distintas combinaciones en la ligación se obtienen los cuatro tipos de concatenámeros: salvaje-C321S, C321S-salvaje, salvaje-salvaje y C321S-C321S.

P6OLIGOM1D:

5'AGTT**AAGCTT**AGGTGCTGCTCCTGATGCTGCTCCTGGATCTATGGGGGATACTGGCCTGAGA
AAG 3'

P6OLIGOM1R: 5' GAGGCTGATCAGCGAGCTCTAGCA 3'

P6OLIGOM2D: 5' AACCCACTGCTTACTGGCTTATCG 3'

P6OLIGOM2R: 5' TTATGCA**AAGCTT**CAGGGTCTTCCTCCGGTGGGAC 3'

B.7. Concatenámero _{his}xCT-4F2hc en pCDNA4

Se ha amplificado el cDNA de xCT (en pCDNA4) con unos oligos (xCTD1 y LVXCT) que añaden el conector de 10 residuos GAAPDGAPGC en pauta en el extremo 3' de xCT y eliminan el codón de terminación. El fragmento que se obtiene tiene un tamaño ~1270pb. Por otro lado, se ha amplificado el cDNA de 4F2hc con otros oligos (LV4F2 y XHOI4F2) que añaden el conector y una diana XhoI en los extremos 5' y 3' de 4F2hc respectivamente. El fragmento que se obtiene tiene un tamaño ~1630pb. Los dos fragmentos de PCR se han utilizado como molde y cebador en una tercera PCR. Estos contienen las secuencias del conector complementarias que actuarán como cebador. Además se añaden los oligos de los extremos 5' y 3' D1 y XHOI4F2 respectivamente. El fragmento que se obtiene contiene xCT y 4F2hc unidos en pauta mediante el conector, de tamaño ~2900pb. Se digiere el fragmento con XhoI y se purifica el inserto, de tamaño ~2100pb. Por otro lado se digiere el constructo _{his}xCT en pCDNA4 con XhoI, se trata con fosfatasa alcalina, y se purifica el vector. Se ligan inserto y vector.

XHOI4F2 5' GTATACTCGAGTCAGGCCGCGTAGGGGAA 3'

LVXCT 5' GCAACCAGGAGCCACCATCAGGAGCAGCACCTAACTTATCTTCTCTGGTACAA
3'

LV4F2 5' GGTGCTGCTCCTGATGGTGCTCCTGGTTCATGAGCCAGGACACCGAGGTGG 3'

B.3 Costructo _{his}4F2hc

El cDNA de 4F2hc en pSPORT se ha amplificado con unos oligos (ASP7184F2 y XHOI4F2) que añaden las dianas de restricción Asp718 y XhoI en los extremos 5' y 3' de 4F2hc respectivamente. En este caso es esencial que la cola de histidinas y el epítipo Xpress estén en pauta de lectura con el ORF de 4F2hc. El fragmento que se obtiene se digiere con estas enzimas y se purifica. Por otro lado, el vector pCDNA4/HisMax (Invitrogen) ha sido digerido con las mismas enzimas y se ha purificado el fragmento correspondiente al vector de

Materiales y Métodos

tamaño ~5400pb. Este vector está diseñado para la sobreproducción de proteínas recombinantes en líneas celulares de mamífero. Contiene el promotor pCMV (Human cytomegalovirus immediate-early), estimuladores de la traducción (enhancer QBISP 163), genes de resistencia a la zeocina y ampicilina, el lugar de reconocimiento de la enterokinasa, y lo más importante, una cola de 6 histidinas y el epítipo de reconocimiento del anticuerpo Xpress. Finalmente, los fragmentos correspondientes al vector e inserto (PCR digerida y purificada) se han ligado. El constructo resultante fue comprobado por digestión y secuenciación completa del inserto.

B.8 Constructo de γ LAT-1

γ LAT-1 C320S

5' TGTCAGTTGCATTATTCAGTTTTGGTGGCCTCAATGCC3'

o **APÉNDICE C. Soluciones generales**

- LB

Triptona 1%

Extracto de levadura 0.5%

NaCl 0.5%

Se ajusta el pH a 7.5 con NaOH y se autoclava.

En el caso de preparar LB-agar, se añade agar a 1.5% (p/v) en la botella que contiene el LB justo antes de autoclararlo. Una vez autoclavado, se deja atemperar hasta 50°C. En este momento se añade el antibiótico, si se requiere. Se vierte el medio sobre las placas y se dejan enfriar a temperatura ambiente. Se guardan a 4°C en posición invertida.

- Ampicilina

Se disuelve en agua MilliQ a 100 mg/ml. La solución se filtra con filtros de 0.22 mm de diámetro, se alícuota y se guarda a -20°C. A temperaturas superiores a 55°C la ampicilina se inactiva.

- PBS

NaCl 136 mM

KCl 2.7 mM

Na₂HPO₄ 8 mM

KH₂PO₄ 1.5 mM

Se ajusta el pH a 7.4. con HCl.

Si se ha de utilizar para cultivos celulares, se autoclave la solución.

- TBS

Tris-HCl 0.05 M

NaCl 0.15 M

Se ajusta el pH a 7.5

Material es y Métodos

- LSB

Se prepara una solución madre de LSBx4:

Tris-HCl 0.4 M, pH 6.8

Glicerol 80% (v/v)

SDS 8% (p/v)

Dilución 1/250 de una solución de azul de bromofenol al 10%

A partir de éste, se obtienen las demás concentraciones por dilución.

- H2O-DEPC

Agua desionizada (MilliQ, Millipore)

DEPC (dietilpirocarbonato) 0.01%

Incubamos el agua desionizada con el DEPC durante 12 h a 37°C y en agitación. Se autoclave para inactivar el DEPC que podría modificar químicamente las purinas del RNA.

- Solución concentrada de L-[35S]-cistina

La cistina radiactiva (SJ126, Amersham) se entrega en polvo y es necesario disolverla para preparar la solución stock de cistina marcada. Se disuelve en 10 mM DTT oxidado (D-3511, Sigma) y 1% de etanol absoluto en agua MilliQ. Esta solución se lleva a un pH de 2.5 añadiendo un par de gotas de HCl concentrado y comprobándolo con tiras de pH (Merck). Teniendo en cuenta la cantidad de cistina del recipiente comercial, preparamos el volumen necesario de esta solución para disolver la cistina a 350 μ M. Siguiendo las precauciones adecuadas para un producto radiactivo, se añaden pequeños volúmenes de esta solución a la cistina en polvo y se le aplica vórtex. Se recoge el volumen en un tubo estéril. Se repite la operación hasta acabar el volumen de la solución y asegurarse que no queda nada en el envase comercial. A continuación, se cuenta 1 μ l de la solución en el contador beta. Se hacen tres réplicas para asegurarnos que la solución es homogénea. A partir del contaje, y conociendo la concentración de cistina, podemos calcular la actividad específica de esta solución. Se reparte en alícuotas de 300 μ l en tubos eppendorf, bajo una corriente de N₂ gas, y se guarda a -80°C.

- Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Iwata, S., and Kaback, H.R. (2003a). The lactose permease of *Escherichia coli*: overall structure, the sugar-binding site and the alternating access model for transport. *FEBS Lett.* 555, 96-101.
- Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H.R., and Iwata, S. (2003b). Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science* 301, 610-615.
- Ahmed, A., Peter, G.J., Taylor, P.M., Harper, A.A., and Rennie, M.J. (1995). Sodium-independent currents of opposite polarity evoked by neutral and cationic amino acids in neutral and basic amino acid transporter cRNA-injected oocytes. *J.Biol.Chem.* 270, 8482-8486.
- Akabas, M.H., Stauffer, D.A., Xu, M., and Karlin, A. (1992). Acetylcholine receptor channel structure probed in cysteine-substitution mutants. *Science* 258, 307-310.
- Albers, A., Lahme, S., Wagner, C., Kaiser, P., Zerres, K., Capasso, G., Pica, A., Palacin, M., Lang, F., Bichler, K.H., and Eggermann, T. (1999). Mutations in the SLC3A1 gene in cystinuric patients: frequencies and identification of a novel mutation. *Genet.Test.* 3, 227-231.
- Albi, J.L., Canals, P., Gallardo, M.A., and Sánchez, J. (1994). Na⁺-independent L-alanine uptake by trout cells. Evidence for the existence of at least two functionally different asc systems. *J Membr Biol* 140, 189-196.
- Amara, S.G. (1996). Neurotransmitter transporters: new insights into structure, function and pharmacology. *Rev.Bras.Biol.* 56 *Su 1 Pt 1*, 5-19.
- Androutsellis-Theotokis, A., Ghassemi, F., and Rudnick, G. (2001). A conformationally sensitive residue on the cytoplasmic surface of serotonin transporter. *J.Biol.Chem.* 276, 45933-45938.
- Androutsellis-Theotokis, A. and Rudnick, G. (2002). Accessibility and conformational coupling in serotonin transporter predicted internal domains. *J.Neurosci.* 22, 8370-8378.
- Angelo, S., Irarrazabal, C., and Deves, R. (1996). The binding specificity of amino acid transport system y⁺L in human erythrocytes is altered by monovalent cations. *J.Membr.Biol.* 153, 37-44.
- Arriza, J.L., Eliasof, S., Kavanaugh, M.P., and Amara, S.G. (1997). Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 4155-4160.
- Arriza, J.L., Fairman, W.A., Wadiche, J.I., Murdoch, G.H., Kavanaugh, M.P., and Amara, S.G. (1994). Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *J.Neurosci.* 14, 5559-5569.
- Ars, E., Serra, E., Garcia, J., Kruyer, H., Gaona, A., Lazaro, C., and Estivill, X. (2000). Mutations affecting mRNA splicing are the most common molecular defects in patients with neurofibromatosis type 1. *Hum.Mol.Genet.* 9, 237-247.
- Bannai, S. (1984a). Induction of cystine and glutamate transport activity in human fibroblasts by diethyl maleate and other electrophilic agents. *J.Biol.Chem.* 259, 2435-2440.

Referencias

- Bannai,S. (1984b). Transport of cystine and cysteine in mammalian cells. *Biochim.Biophys.Acta* 779, 289-306.
- Bannai,S. (1986). Echange of cystine and glutamate across plasma membrane of human fibroblasts. *J.Biol.Chem.* 261, 2256-2263.
- Bannai,S. and Kitamura,E. (1980). Transport interaction of L-cystine and L-glutamate in human diploid fibroblasts in culture. *J.Biol.Chem.* 255, 2372-2376.
- Bannai,S., Sato,H., Ishii,T., and Sugita,Y. (1989). Induction of cystine transport activity in human fibroblasts by oxygen. *J.Biol.Chem.* 264, 18480-18484.
- Bannai,S., Takada,A., Kasuga,H., and Tateishi,N. (1986). Induction of cystine transport activity in isolated rat hepatocytes by sulfobromophthalein and other electrophilic agents. *Hepatology* 6, 1361-1368.
- Bannai,S. and Tateishi,N. (1986). Role of membrane transport in metabolism and function of glutathione in mammals. *J.Membr.Biol.* 89, 1-8.
- BARON,D.N., DENT,C.E., HARRIS,H., HART,E.W., and JEPSON,J.B. (1956). Hereditary pellagra-like skin rash with temporary cerebellar ataxia, constant renal amino-aciduria, and other bizarre biochemical features. *Lancet* 271, 421-428.
- Bassi,M.T., Gasol,E., Manzoni,M., Pineda,M., Riboni,M., Martin,R., Zorzano,A., Borsani,G., and Palacin,M. (2001). Identification and characterisation of human xCT that co-expresses, with 4F2 heavy chain, the amino acid transport activity system xc-. *Pflugers Arch.* 442, 286-296.
- Bauch,C., Forster,N., Loffing-Cueni,D., Summa,V., and Verrey,F. (2003). Functional cooperation of epithelial heteromeric amino acid transporters expressed in madin-darby canine kidney cells. *J.Biol.Chem.* 278, 1316-1322.
- Bauch,C. and Verrey,F. (2002). Apical heterodimeric cystine and cationic amino acid transporter expressed in MDCK cells. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 283, F181-F189.
- Baumann,S.W., Baur,R., and Sigel,E. (2001). Subunit arrangement of gamma-aminobutyric acid type A receptors. *J.Biol.Chem.* 276, 36275-36280.
- Bertran,J., Magagnin,S., Werner,A., Markovich,D., Biber,J., Testar,X., Zorzano,A., Kuhn,L.C., Palacin,M., and Murer,H. (1992a). Stimulation of system y(+)-like amino acid transport by the heavy chain of human 4F2 surface antigen in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89, 5606-5610.
- Bertran,J., Werner,A., Chillaron,J., Nunes,V., Biber,J., Testar,X., Zorzano,A., Estivill,X., Murer,H., and Palacin,M. (1993). Expression cloning of a human renal cDNA that induces high affinity transport of L-cystine shared with dibasic amino acids in *Xenopus* oocytes. *J.Biol.Chem.* 268, 14842-14849.
- Bertran,J., Werner,A., Moore,M.L., Stange,G., Markovich,D., Biber,J., Testar,X., Zorzano,A., Palacin,M., and Murer,H. (1992b). Expression cloning of a cDNA from rabbit kidney cortex that induces a single transport system for cystine and dibasic and neutral amino acids. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89, 5601-5605.

- Bertran,J., Werner,A., Stange,G., Markovich,D., Biber,J., Testar,X., Zorzano,A., Palacin,M., and Murer,H. (1992c). Expression of Na(+)-independent amino acid transport in *Xenopus laevis* oocytes by injection of rabbit kidney cortex mRNA. *Biochem.J.* 281 (Pt 3), 717-723.
- Bibi,E. and Kaback,H.R. (1992). Functional complementation of internal deletion mutants in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89, 1524-1528.
- Bisaccia,F., Zara,V., Capobianco,L., Iacobazzi,V., Mazzeo,M., and Palmieri,F. (1996). The formation of a disulfide cross-link between the two subunits demonstrates the dimeric structure of the mitochondrial oxoglutarate carrier. *Biochim.Biophys.Acta* 1292, 281-288.
- Bisceglia,L., Calonge,M.J., Dello,S.L., Rizzoni,G., de Sanctis,L., Gallucci,M., Beccia,E., Testar,X., Zorzano,A., Estivill,X., Zelante,L., Palacin,M., Gasparini,P., and Nunes,V. (1996). Molecular analysis of the cystinuria disease gene: identification of four new mutations, one large deletion, and one polymorphism. *Hum.Genet.* 98, 447-451.
- Bisceglia,L., Calonge,M.J., Totaro,A., Feliubadalo,L., Melchionda,S., Garcia,J., Testar,X., Gallucci,M., Ponzzone,A., Zelante,L., Zorzano,A., Estivill,X., Gasparini,P., Nunes,V., and Palacin,M. (1997). Localization, by linkage analysis, of the cystinuria type III gene to chromosome 19q13.1. *Am.J.Hum.Genet.* 60, 611-616.
- Boado,R.J., Li,J.Y., and Pardridge,W.M. (2003). Site-directed mutagenesis of rabbit LAT1 at amino acids 219 and 234. *J.Neurochem.* 84, 1322-1331.
- Borsani,G., Bassi,M.T., Sperandeo,M.P., De Grandi,A., Buoninconti,A., Riboni,M., Manzoni,M., Incerti,B., Pepe,A., Andria,G., Ballabio,A., and Sebastio,G. (1999). SLC7A7, encoding a putative permease-related protein, is mutated in patients with lysinuric protein intolerance. *Nat.Genet.* 21, 297-301.
- Botzenhart,E., Vester,U., Schmidt,C., Hesse,A., Halber,M., Wagner,C., Lang,F., Hoyer,P., Zerres,K., and Eggermann,T. (2002). Cystinuria in children: distribution and frequencies of mutations in the SLC3A1 and SLC7A9 genes. *Kidney Int.* 62, 1136-1142.
- Boutros,M., Ong,P., Saadi,I., Hiou-Tim,F., Vicanek,C., Rozen,R., and Goodyer,P. (1999). The human rBAT promoter and promoter mutations in cystinuria. *American Journal of Human Genetics* 65, A94.
- Bovee,K.C., Bush,M., Dietz,J., Jezyk,P., and Segal,S. (1981). Cystinuria in the maned wolf of South America. *Science* 212, 919-920.
- Boyd,C.A. and Crawford,D.H. (1992). Activation of cationic amino acid transport through system y+ correlates with expression of the T-cell early antigen gene in human lymphocytes. *Pflugers Arch.* 422, 87-89.
- Brand,E. and Cahill,G.F. (1934). Further studies on metabolism of sulfur compounds in cystinuria. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 31, 1247.
- Bridges,C.C., Kekuda,R., Wang,H., Prasad,P.D., Mehta,P., Huang,W., Smith,S.B., and Ganapathy,V. (2001). Structure, function, and regulation of human cystine/glutamate transporter in retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 42, 47-54.

Referencias

- Broer,A., Friedrich,B., Wagner,C.A., Fillon,S., Ganapathy,V., Lang,F., and Broer,S. (2001). Association of 4F2hc with light chains LAT1, LAT2 or γ -LAT2 requires different domains. *Biochem.J.* 355, 725-731.
- Broer,A., Hamprecht,B., and Broer,S. (1998). Discrimination of two amino acid transport activities in 4F2 heavy chain- expressing *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem.J.* 333 (Pt 3), 549-554.
- Broer,A., Klingel,K., Kowalczyk,S., Rasko,J.E., Cavanaugh,J., and Broer,S. (2004). Molecular cloning of mouse amino acid transport system B0, a neutral amino acid transporter related to Hartnup disorder. *J.Biol.Chem.* 279, 24467-24476.
- Broer,A., Wagner,C.A., Lang,F., and Broer,S. (2000). The heterodimeric amino acid transporter 4F2hc/ γ -LAT2 mediates arginine efflux in exchange with glutamine. *Biochem.J.* 349 Pt 3, 787-795.
- Broer,S. (2002). Adaptation of plasma membrane amino acid transport mechanisms to physiological demands. *Pflugers Arch.* 444, 457-466.
- Broer,S., Broer,A., and Hamprecht,B. (1995). The 4F2hc surface antigen is necessary for expression of system L-like neutral amino acid-transport activity in C6-BU-1 rat glioma cells: evidence from expression studies in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem.J.* 312 (Pt 3), 863-870.
- Busch,A.E., Herzer,T., Waldegger,S., Schmidt,F., Palacin,M., Biber,J., Markovich,D., Murer,H., and Lang,F. (1994). Opposite directed currents induced by the transport of dibasic and neutral amino acids in *Xenopus* oocytes expressing the protein rBAT. *J.Biol.Chem.* 269, 25581-25586.
- Calonge,M.J., Gasparini,P., Chillaron,J., Chillon,M., Gallucci,M., Rousaud,F., Zelante,L., Testar,X., Dallapiccola,B., Di Silverio,F., and . (1994). Cystinuria caused by mutations in rBAT, a gene involved in the transport of cystine. *Nat.Genet.* 6, 420-425.
- Calonge,M.J., Volpini,V., Bisceglia,L., Rousaud,F., de Sanctis,L., Beccia,E., Zelante,L., Testar,X., Zorzano,A., Estivill,X., and . (1995). Genetic heterogeneity in cystinuria: the SLC3A1 gene is linked to type I but not to type III cystinuria. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92, 9667-9671.
- Campbell,W.A. and Thompson,N.L. (2001). Overexpression of LAT1/CD98 light chain is sufficient to increase system L-amino acid transport activity in mouse hepatocytes but not fibroblasts. *J.Biol.Chem.* 276, 16877-16884.
- Cartegni,L., Wang,J., Zhu,Z., Zhang,M.Q., and Krainer,A.R. (2003). ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res.* 31, 3568-3571.
- Chairoungdua,A., Kanai,Y., Matsuo,H., Inatomi,J., Kim,D.K., and Endou,H. (2001). Identification and characterization of a novel member of the heterodimeric amino acid transporter family presumed to be associated with an unknown heavy chain. *J.Biol.Chem.* 276, 49390-49399.
- Chairoungdua,A., Segawa,H., Kim,J.Y., Miyamoto,K., Haga,H., Fukui,Y., Mizoguchi,K., Ito,H., Takeda,E., Endou,H., and Kanai,Y. (1999). Identification of an amino acid transporter associated with the cystinuria-related type II membrane glycoprotein. *J.Biol.Chem.* 274, 28845-28848.

- Chamberlin,A.R., Koch,H.P., and Bridges,R.J. (1998). Design and synthesis of conformationally constrained inhibitors of high-affinity, sodium-dependent glutamate transporters. *Methods Enzymol.* 296, 175-189.
- Chang,A.S., Starnes,D.M., and Chang,S.M. (1998). Possible existence of quaternary structure in the high-affinity serotonin transport complex. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 249, 416-421.
- Chen,J.G., Liu-Chen,S., and Rudnick,G. (1997). External cysteine residues in the serotonin transporter. *Biochemistry* 36, 1479-1486.
- Chen,J.G. and Rudnick,G. (2000). Permeation and gating residues in serotonin transporter. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 1044-1049.
- Chillaron,J., Estevez,R., Mora,C., Wagner,C.A., Suessbrich,H., Lang,F., Gelpi,J.L., Testar,X., Busch,A.E., Zorzano,A., and Palacin,M. (1996). Obligatory amino acid exchange via systems bo,+like and y+L-like. A tertiary active transport mechanism for renal reabsorption of cystine and dibasic amino acids. *J.Biol.Chem.* 271, 17761-17770.
- Chillaron,J., Estevez,R., Samarzija,I., Waldegger,S., Testar,X., Lang,F., Zorzano,A., Busch,A., and Palacin,M. (1997). An intracellular trafficking defect in type I cystinuria rBAT mutants M467T and M467K. *J.Biol.Chem.* 272, 9543-9549.
- Chillaron,J., Roca,R., Valencia,A., Zorzano,A., and Palacin,M. (2001). Heteromeric amino acid transporters: biochemistry, genetics, and physiology. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 281, F995-1018.
- Chomczynski,P. and Sacchi,N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* 162, 156-159.
- Christensen,H.N. (1966). Methods for distinguishing amino acid transport systems of a given cell or tissue. *Fed Proc* 25, 850-853.
- Christensen,H.N. (1990). Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol Rev.* 70, 43-77.
- Christensen,H.N., Albritton,L.M., Kakuda,D.K., and MacLeod,C.L. (1994). Gene-product designations for amino acid transporters. *J.Exp.Biol.* 196, 51-57.
- Christensen,H.N. and Antonioli,J.A. (1969). Cationic amino acid transport in the rabbit reticulocyte. Na⁺-dependent inhibition of Na⁺-independent transport. *J.Biol.Chem.* 244, 1497-1504.
- Closs,E.I., Graf,P., Habermeier,A., Cunningham,J.M., and Forstermann,U. (1997). Human cationic amino acid transporters hCAT-1, hCAT-2A, and hCAT-2B: three related carriers with distinct transport properties. *Biochemistry* 36, 6462-6468.
- Closs,E.I., Lyons,C.R., Kelly,C., and Cunningham,J.M. (1993). Characterization of the third member of the MCAT family of cationic amino acid transporters. Identification of a domain that determines the transport properties of the MCAT proteins. *J.Biol.Chem.* 268, 20796-20800.

Referencias

Coady,M.J., Chen,X.Z., and Lapointe,J.Y. (1996). rBAT is an amino acid exchanger with variable stoichiometry. *J.Membr.Biol.* 149, 1-8.

Coady,M.J., Jalal,F., Chen,X., Lemay,G., Berteloot,A., and Lapointe,J.Y. (1994). Electrogenic amino acid exchange via the rBAT transporter. *FEBS Lett.* 356, 174-178.

Cohen,S.N., Chang,A.C., and Hsu,L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 69, 2110-2114.

Coligan,J.E., Dunn,B.M., Ploegh,H.L., Speicher,D.W., and Wingfield,P.T. (2001). *Current Protocols in Protein Sciences*. John Wiley & Sons, Inc. USA).

Colman,A., Bhamra,S., and Valle,G. (1984). Post-translational modification of exogenous proteins in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem.Soc.Trans.* 12, 932-937.

Coulter,L.R., Landree,M.A., and Cooper,T.A. (1997). Identification of a new class of exonic splicing enhancers by in vivo selection. *Mol.Cell Biol.* 17, 2143-2150.

Crane,R.K. (1965). Na^+ -dependent transport in the intestine and other animal tissues. *Fed Proc* 25, 1000-1006.

CRAWHALL,J.C., SCOWEN,E.F., and WATTS,R.W. (1963). Effect of penicillamine on cystinuria. *Br.Med.J.* 5330, 588-590.

CRAWHALL,J.C. and WATTS,R.W. (1968). Cystinuria. *Am.J.Med.* 45, 736-755.

Cuff,J.A., Clamp,M.E., Siddiqui,A.S., Finlay,M., and Barton,G.J. (1998). JPred: a consensus secondary structure prediction server. *Bioinformatics.* 14, 892-893.

Dahl,S.G., Sylte,I., and Ravna,A.W. (2004). Structures and models of transporter proteins. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 309, 853-860.

Dahlberg,P.J., van den,B., Kurtz,S.B., Wilson,D.M., and Smith,L.H. (1977). Clinical features and management of cystinuria. *Mayo Clin.Proc.* 52, 533-542.

Danbolt,N.C. (2001). Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology* 65, 1-105.

de Jong,J.C., Willems,P.H., Mooren,F.J., van den Heuvel,L.P., Knoers,N.V., and Bindels,R.J. (2003). The structural unit of the thiazide-sensitive NaCl cotransporter is a homodimer. *J.Biol.Chem.* 278, 24302-24307.

Dello Strologo L., Carbonari,D., Gallucci,M., Gasparini,P., Bisceglia,L., Zelante,L., Rousaud,F., Nunes,V., Palacin,M., and Rizzoni,G. Inter- and intrafamilial clinical variability in patients with cystinuria type I and identified mutations. *J.Am.Soc.Nephrol.* 8[388A]. 1997.

Ref Type: Abstract

Dello,S.L., Pras,E., Pontesilli,C., Beccia,E., Ricci-Barbini,V., de Sanctis,L., Ponzzone,A., Gallucci,M., Bisceglia,L., Zelante,L., Jimenez-Vidal,M., Font,M., Zorzano,A., Rousaud,F., Nunes,V., Gasparini,P., Palacin,M., and Rizzoni,G. (2002a). Comparison between SLC3A1 and

SLC7A9 cystinuria patients and carriers: a need for a new classification. *J.Am.Soc.Nephrol.* 13, 2547-2553.

Dello,S.L., Pras,E., Pontesilli,C., Beccia,E., Ricci-Barbini,V., de Sanctis,L., Ponzone,A., Gallucci,M., Bisceglia,L., Zelante,L., Jimenez-Vidal,M., Font,M., Zorzano,A., Rousaud,F., Nunes,V., Gasparini,P., Palacin,M., and Rizzoni,G. (2002b). Comparison between SLC3A1 and SLC7A9 cystinuria patients and carriers: a need for a new classification. *J.Am.Soc.Nephrol.* 13, 2547-2553.

Demolombe,S., Baro,I., Pereon,Y., Bliet,J., Mohammad-Panah,R., Pollard,H., Morid,S., Mannens,M., Wilde,A., Barhanin,J., Charpentier,F., and Escande,D. (1998). A dominant negative isoform of the long QT syndrome 1 gene product. *J.Biol.Chem.* 273, 6837-6843.

Denning,G.M., Anderson,M.P., Amara,J.F., Marshall,J., Smith,A.E., and Welsh,M.J. (1992). Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature* 358, 761-764.

DENT,C.E. and ROSE,G.A. (1951). Aminoacid metabolism in cystinuria. *Q.J.Med.* 20, 205-219.

DENT,C.E. and SENIOR,B. (1955). Studies on the treatment of cystinuria. *Br.J.Urol.* 27, 317-332.

Deora,A.B., Ghosh,R.N., and Tate,S.S. (1998). Progressive C-terminal deletions of the renal cystine transporter, NBAT, reveal a novel bimodal pattern of functional expression. *J.Biol.Chem.* 273, 32980-32987.

Desjeux,J.F., Simell,R.O., Dumontier,A.M., and Perheentupa,J. (1980). Lysine fluxes across the jejunal epithelium in lysinuric protein intolerance. *J.Clin.Invest* 65, 1382-1387.

Deutsch,C. (2002). Potassium channel ontogeny. *Annu.Rev.Physiol* 64, 19-46.

Deves,R. and Angelo,S. (1996). Changes in membrane and surface potential explain the opposite effects of low ionic strength on the two lysine transporters of human erythrocytes. *J.Biol.Chem.* 271, 32034-32039.

Deves,R. and Boyd,C.A. (1998). Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. *Physiol Rev.* 78, 487-545.

Deves,R. and Boyd,C.A. (2000). Surface antigen CD98(4F2): not a single membrane protein, but a family of proteins with multiple functions. *J.Membr.Biol.* 173, 165-177.

Deves,R., Chavez,P., and Boyd,C.A. (1992). Identification of a new transport system (γ +L) in human erythrocytes that recognizes lysine and leucine with high affinity. *J.Physiol* 454, 491-501.

DiBartola,S.P., Chew,D.J., and Horton,M.L. (1991). Cystinuria in a cat. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 198, 102-104.

Dierks,T. and Kramer,R. (1988). Asymmetric orientation of the reconstituted aspartate/glutamate carrier from mitochondria. *Biochim.Biophys.Acta* 937, 112-126.

Referencias

Ding,P.Z. and Wilson,T.H. (2001). The proximity between helix I and helix XI in the melibiose carrier of *Escherichia coli* as determined by cross-linking. *Biochim.Biophys.Acta* 1514, 230-238.

Dodd,J.R. and Christie,D.L. (2001). Cysteine 144 in the third transmembrane domain of the creatine transporter is located close to a substrate-binding site. *J.Biol.Chem.* 276, 46983-46988.

Doyle,D.A. (2004). Structural themes in ion channels. *Eur.Biophys.J.* 33, 175-179.

Dumont,J.N. (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J.Morphol.* 136, 153-179.

Egoshi,K.I., Akakura,K., Kodama,T., and Ito,H. (2000). Identification of five novel SLC3A1 (rBAT) gene mutations in Japanese cystinuria. *Kidney Int.* 57, 25-32.

Elbaz,Y., Steiner-Mordoch,S., Danieli,T., and Schuldiner,S. (2004). In vitro synthesis of fully functional EmrE, a multidrug transporter, and study of its oligomeric state. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101, 1519-1524.

Eleno,N., Deves,R., and Boyd,C.A. (1994). Membrane potential dependence of the kinetics of cationic amino acid transport systems in human placenta. *J.Physiol* 479 (Pt 2), 291-300.

Endsley,J.K., Phillips,J.A., III, Hruska,K.A., Denneberg,T., Carlson,J., and George,A.L., Jr. (1997). Genomic organization of a human cystine transporter gene (SLC3A1) and identification of novel mutations causing cystinuria. *Kidney Int.* 51, 1893-1899.

Eskandari,S., Kreman,M., Kavanaugh,M.P., Wright,E.M., and Zampighi,G.A. (2000). Pentameric assembly of a neuronal glutamate transporter. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 8641-8646.

Estevez,R., Camps,M., Rojas,A.M., Testar,X., Deves,R., Hediger,M.A., Zorzano,A., and Palacin,M. (1998). The amino acid transport system y⁺L/4F2hc is a heteromultimeric complex. *FASEB J.* 12, 1319-1329.

Fairman,W.A., Vandenberg,R.J., Arriza,J.L., Kavanaugh,M.P., and Amara,S.G. (1995). An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* 375, 599-603.

Fann,M.C., Busch,A., and Maloney,P.C. (2003). Functional characterization of cysteine residues in GlpT, the glycerol 3-phosphate transporter of *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 185, 3863-3870.

Feliubadalo,L., Arbones,M.L., Manas,S., Chillaron,J., Visa,J., Rodes,M., Rousaud,F., Zorzano,A., Palacin,M., and Nunes,V. (2003). Slc7a9-deficient mice develop cystinuria non-I and cystine urolithiasis. *Hum.Mol.Genet.* 12, 2097-2108.

Feliubadalo,L., Font,M., Purroy,J., Rousaud,F., Estivill,X., Nunes,V., Golomb,E., Centola,M., Aksenitjevich,I., Kreiss,Y., Goldman,B., Pras,M., Kastner,D.L., Pras,E., Gasparini,P., Bisceglia,L., Beccia,E., Gallucci,M., de Sanctis,L., Ponzzone,A., Rizzoni,G.F., Zelante,L., Bassi,M.T., George,A.L., Jr., Palacin,M., and . (1999). Non-type I cystinuria caused by mutations in SLC7A9, encoding a subunit (bo,+AT) of rBAT. International Cystinuria Consortium. *Nat.Genet.* 23, 52-57.

- Fenczik,C.A., Sethi,T., Ramos,J.W., Hughes,P.E., and Ginsberg,M.H. (1997). Complementation of dominant suppression implicates CD98 in integrin activation. *Nature* 390, 81-85.
- Fenczik,C.A., Zent,R., Dellos,M., Calderwood,D.A., Satriano,J., Kelly,C., and Ginsberg,M.H. (2001). Distinct domains of CD98hc regulate integrins and amino acid transport. *J.Biol.Chem.* 276, 8746-8752.
- Fernandez,E., Carrascal,M., Rousaud,F., Abian,J., Zorzano,A., Palacin,M., and Chillaron,J. (2002). rBAT-b(0,+)-AT heterodimer is the main apical reabsorption system for cystine in the kidney. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 283, F540-F548.
- Fernandez,E., Torrents,D., Chillaron,J., Martin,D.R., Zorzano,A., and Palacin,M. (2003). Basolateral LAT-2 has a major role in the transepithelial flux of L-cystine in the renal proximal tubule cell line OK. *J.Am.Soc.Nephrol.* 14, 837-847.
- Ferrer,J.V. and Javitch,J.A. (1998). Cocaine alters the accessibility of endogenous cysteines in putative extracellular and intracellular loops of the human dopamine transporter. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 9238-9243.
- Firsov,D., Gautschi,I., Merillat,A.M., Rossier,B.C., and Schild,L. (1998). The heterotetrameric architecture of the epithelial sodium channel (ENaC). *EMBO J.* 17, 344-352.
- Fleming,K.G. (2000). Riding the wave: structural and energetic principles of helical membrane proteins. *Curr.Opin.Biotechnol.* 11, 67-71.
- Font,M.A., Feliubadalo,L., Estivill,X., Nunes,V., Golomb,E., Kreiss,Y., Pras,E., Bisceglia,L., d'Adamo,A.P., Zelante,L., Gasparini,P., Bassi,M.T., George,A.L., Jr., Manzoni,M., Riboni,M., Ballabio,A., Borsani,G., Reig,N., Fernandez,E., Zorzano,A., Bertran,J., and Palacin,M. (2001). Functional analysis of mutations in SLC7A9, and genotype-phenotype correlation in non-Type I cystinuria. *Hum.Mol.Genet.* 10, 305-316.
- FOX,M., THIER,S., ROSENBERG,L., KISER,W., and Segal,S. (1964). EVIDENCE AGAINST A SINGLE RENAL TRANSPORT DEFECT IN CYSTINURIA. *N.Engl.J.Med.* 270, 556-561.
- Friesen,R.H., Knol,J., and Poolman,B. (2000). Quaternary structure of the lactose transport protein of *Streptococcus thermophilus* in the detergent-solubilized and membrane-reconstituted state. *J.Biol.Chem.* 275, 33527-33535.
- Frillingos,S., Sahin-Toth,M., Wu,J., and Kaback,H.R. (1998). Cys-scanning mutagenesis: a novel approach to structure function relationships in polytopic membrane proteins. *FASEB J.* 12, 1281-1299.
- Fukasawa,Y., Segawa,H., Kim,J.Y., Chairoungdua,A., Kim,D.K., Matsuo,H., Cha,S.H., Endou,H., and Kanai,Y. (2000). Identification and characterization of a Na(+)-independent neutral amino acid transporter that associates with the 4F2 heavy chain and exhibits substrate selectivity for small neutral D- and L-amino acids. *J.Biol.Chem.* 275, 9690-9698.
- Furesz,T.C., Moe,A.J., and Smith,C.H. (1995). Lysine uptake by human placental microvillous membrane: comparison of system y+ with basal membrane. *Am.J.Physiol* 268, C755-C761.

Referencias

- Furriols,M., Chillaron,J., Mora,C., Castello,A., Bertran,J., Camps,M., Testar,X., Vilaro,S., Zorzano,A., and Palacin,M. (1993). rBAT, related to L-cysteine transport, is localized to the microvilli of proximal straight tubules, and its expression is regulated in kidney by development. *J.Biol.Chem.* 268, 27060-27068.
- Gasol,E., Jimenez-Vidal,M., Chillaron,J., Zorzano,A., and Palacin,M. (2004). Membrane topology of system xc- light subunit reveals a re-entrant loop with substrate-restricted accessibility. *J.Biol.Chem.* 279, 31228-31236.
- Gasparini,P., Calonge,M.J., Bisceglia,L., Purroy,J., Dianzani,I., Notarangelo,A., Rousaud,F., Gallucci,M., Testar,X., Ponzone,A., and . (1995). Molecular genetics of cystinuria: identification of four new mutations and seven polymorphisms, and evidence for genetic heterogeneity. *Am.J.Hum.Genet.* 57, 781-788.
- Geertsma,E.R., Duurkens,R.H., and Poolman,B. (2003). Identification of the dimer interface of the lactose transport protein from *Streptococcus thermophilus*. *J.Mol.Biol.* 332, 1165-1174.
- Gerchman,Y., Rimon,A., Venturi,M., and Padan,E. (2001). Oligomerization of NhaA, the Na⁺/H⁺ antiporter of *Escherichia coli* in the membrane and its functional and structural consequences. *Biochemistry* 40, 3403-3412.
- Gitomer,W.L. and Pak,C.Y. (1996). Recent advances in the biochemical and molecular biological basis of cystinuria. *J.Urol.* 156, 1907-1912.
- Gitomer,W.L., Reed,B.Y., and Pak,C.Y. (2000). Identification of two novel mutations [P122S (364C>T) and 1601delAC] in the SLC3A1 gene in type I cystinurics. *Hum.Mutat.* 15, 390.
- Gitomer,W.L., Reed,B.Y., Ruml,L.A., and Pak,C.Y. (1998a). 335-base deletion in the mRNA coding for a dibasic amino acid transporter-like protein (SLC3A1) isolated from a patient with cystinuria. *Hum.Mutat. Suppl 1*, S69-S71.
- Gitomer,W.L., Reed,B.Y., Ruml,L.A., Sakhaee,K., and Pak,C.Y. (1998b). Mutations in the genomic deoxyribonucleic acid for SLC3A1 in patients with cystinuria. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 83, 3688-3694.
- Gloor,S., Pongs,O., and Schmalzing,G. (1995). A vector for the synthesis of cRNAs encoding Myc epitope-tagged proteins in *Xenopus laevis* oocytes. *Gene* 160, 213-217.
- Goodyer,P., Saadi,I., Ong,P., Elkas,G., and Rozen,R. (1998). Cystinuria subtype and the risk of nephrolithiasis. *Kidney Int.* 54, 56-61.
- Goodyer,P.R., Clow,C., Reade,T., and Girardin,C. (1993). Prospective analysis and classification of patients with cystinuria identified in a newborn screening program. *J.Pediatr.* 122, 568-572.
- Grasberger,B., Minton,A.P., DeLisi,C., and Metzger,H. (1986). Interaction between proteins localized in membranes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83, 6258-6262.
- Green,A.L., Anderson,E.J., and Brooker,R.J. (2000). A revised model for the structure and function of the lactose permease. Evidence that a face on transmembrane segment 2 is important for conformational changes. *J.Biol.Chem.* 275, 23240-23246.

- Grunewald, M., Bendahan, A., and Kanner, B.I. (1998). Biotinylation of single cysteine mutants of the glutamate transporter GLT-1 from rat brain reveals its unusual topology. *Neuron* 21, 623-632.
- Grunewald, M., Menaker, D., and Kanner, B.I. (2002). Cysteine-scanning mutagenesis reveals a conformationally sensitive reentrant pore-loop in the glutamate transporter GLT-1. *J.Biol.Chem.* 277, 26074-26080.
- Habermeier, A., Wolf, S., Martine, U., Graf, P., and Closs, E.I. (2003). Two amino acid residues determine the low substrate affinity of human cationic amino acid transporter-2A. *J.Biol.Chem.* 278, 19492-19499.
- Hall, J.A. and Maloney, P.C. (2001). Transmembrane segment 11 of UhpT, the sugar phosphate carrier of *Escherichia coli*, is an alpha-helix that carries determinants of substrate selectivity. *J.Biol.Chem.* 276, 25107-25113.
- Handler, J.S. and Kwon, H.M. (2001). Transcriptional regulation by changes in tonicity. *Kidney Int.* 60, 408-411.
- Harbar, J.A., Cusworth, D.C., Lawes, L.C., and Wrong, O.M. (1986). Comparison of 2-mercaptopropionylglycine and D-penicillamine in the treatment of cystinuria. *J.Urol.* 136, 146-149.
- Harnevik, L., Fjellstedt, E., Molbaek, A., Denneberg, T., and Soderkvist, P. (2003). Mutation analysis of SLC7A9 in cystinuria patients in Sweden. *Genet.Test.* 7, 13-20.
- Harnevik, L., Fjellstedt, E., Molbaek, A., Tiselius, H.G., Denneberg, T., and Soderkvist, P. (2001). Identification of 12 novel mutations in the SLC3A1 gene in Swedish cystinuria patients. *Hum.Mutat.* 18, 516-525.
- Hastrup, H., Karlin, A., and Javitch, J.A. (2001). Symmetrical dimer of the human dopamine transporter revealed by cross-linking Cys-306 at the extracellular end of the sixth transmembrane segment. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 10055-10060.
- Hastrup, H., Sen, N., and Javitch, J.A. (2003). The human dopamine transporter forms a tetramer in the plasma membrane: cross-linking of a cysteine in the fourth transmembrane segment is sensitive to cocaine analogs. *J.Biol.Chem.* 278, 45045-45048.
- Haugeto, O., Ullensvang, K., Levy, L.M., Chaudhry, F.A., Honore, T., Nielsen, M., Lehre, K.P., and Danbolt, N.C. (1996). Brain glutamate transporter proteins form homomultimers. *J.Biol.Chem.* 271, 27715-27722.
- Haynes, B.F., Hemler, M.E., Mann, D.L., Eisenbarth, G.S., Shelhamer, J., Mostowski, H.S., Thomas, C.A., Strominger, J.L., and Fauci, A.S. (1981). Characterization of a monoclonal antibody (4F2) that binds to human monocytes and to a subset of activated lymphocytes. *J.Immunol.* 126, 1409-1414.
- Heard, K.S., Fidyk, N., and Carruthers, A. (2000). ATP-dependent substrate occlusion by the human erythrocyte sugar transporter. *Biochemistry* 39, 3005-3014.

Referencias

- Hebert,D.N. and Carruthers,A. (1991). Chololate-solubilized erythrocyte glucose transporters exist as a mixture of homodimers and homotetramers. *Biochemistry* 30, 4654-4658.
- Hebert,D.N. and Carruthers,A. (1992). Glucose transporter oligomeric structure determines transporter function. Reversible redox-dependent interconversions of tetrameric and dimeric GLUT1. *J.Biol.Chem.* 267, 23829-23838.
- Hediger,M.A., Romero,M.F., Peng,J., Rolfs,A., Takanaga,H., and Bruford,E.A. (2004). The ABC of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *Pflugers Arch.* 447, 465-468.
- Hemler,M.E. and Strominger,J.L. (1982). Characterization of antigen recognized by the monoclonal antibody (4F2): different molecular forms on human T and B lymphoblastoid cell lines. *J.Immunol.* 129, 623-628.
- Henderson,P.J. (1991). Studies of translocation catalysis. *Biosci.Rep.* 11, 477-53.
- Henthorn,P.S., Liu,J., Gidalevich,T., Fang,J., Casal,M.L., Patterson,D.F., and Giger,U. (2000). Canine cystinuria: polymorphism in the canine SLC3A1 gene and identification of a nonsense mutation in cystinuric Newfoundland dogs. *Hum.Genet.* 107, 295-303.
- Heuberger,E.H., Veenhoff,L.M., Duurkens,R.H., Friesen,R.H., and Poolman,B. (2002). Oligomeric state of membrane transport proteins analyzed with blue native electrophoresis and analytical ultracentrifugation. *J.Mol.Biol.* 317, 591-600.
- Hirai,T., Heymann,J.A., Shi,D., Sarker,R., Maloney,P.C., and Subramaniam,S. (2002). Three-dimensional structure of a bacterial oxalate transporter. *Nat.Struct.Biol.* 9, 597-600.
- Hoppe,A., Denneberg,T., Jeppsson,J.O., and Kagedal,B. (1993). Urinary excretion of amino acids in normal and cystinuric dogs. *Br.Vet.J.* 149, 253-268.
- Horiuchi,M., Nicke,A., Gomeza,J., Aschrafi,A., Schmalzing,G., and Betz,H. (2001). Surface-localized glycine transporters 1 and 2 function as monomeric proteins in *Xenopus* oocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 1448-1453.
- Horsford,J., Saadi,I., Raelson,J., Goodyer,P.R., and Rozen,R. (1996). Molecular genetics of cystinuria in French Canadians: identification of four novel mutations in type I patients. *Kidney Int.* 49, 1401-1406.
- Hruz,P.W. and Mueckler,M.M. (2001). Structural analysis of the GLUT1 facilitative glucose transporter (review). *Mol.Membr.Biol.* 18, 183-193.
- Hu,L.A. and King,S.C. (1998a). Functional sensitivity of polar surfaces on transmembrane helix 8 and cytoplasmic loop 8-9 of the *Escherichia coli* GABA (4-aminobutyrate) transporter encoded by *gabP*: mutagenic analysis of a consensus amphipathic region found in transporters from bacteria to mammals. *Biochem.J.* 330 (Pt 2), 771-776.
- Hu,L.A. and King,S.C. (1998b). Functional significance of the "signature cysteine" in helix 8 of the *Escherichia coli* 4-aminobutyrate transporter from the amine-polyamine-choline superfamily. Restoration of Cys-300 to the Cys-less *Gabp*. *J.Biol.Chem.* 273, 20162-20167.

- Hu,L.A. and King,S.C. (1998c). Membrane topology of the Escherichia coli gamma-aminobutyrate transporter: implications on the topography and mechanism of prokaryotic and eukaryotic transporters from the APC superfamily. *Biochem.J.* 336 (Pt 1), 69-76.
- Hu,L.A. and King,S.C. (1999). Identification of the amine-polyamine-choline transporter superfamily 'consensus amphipathic region' as the target for inactivation of the Escherichia coli GABA transporter GabP by thiol modification reagents. Role of Cys-300 in restoring thiol sensitivity to Gabp lacking Cys. *Biochem.J.* 339 (Pt 3), 649-655.
- Huang,S.G., Odoy,S., and Klingenberg,M. (2001). Chimers of two fused ADP/ATP carrier monomers indicate a single channel for ADP/ATP transport. *Arch.Biochem.Biophys.* 394, 67-75.
- Huang,Y., Lemieux,M.J., Song,J., Auer,M., and Wang,D.N. (2003). Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from Escherichia coli. *Science* 301, 616-620.
- Indiveri,C., Giangregorio,N., Iacobazzi,V., and Palmieri,F. (2002). Site-directed mutagenesis and chemical modification of the six native cysteine residues of the rat mitochondrial carnitine carrier: implications for the role of cysteine-136. *Biochemistry* 41, 8649-8656.
- International Human Genome Sequencing Consortium (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431, 931-945.
- Jack,D.L., Paulsen,I.T., and Saier,M.H. (2000). The amino acid/polyamine/organocation (APC) superfamily of transporters specific for amino acids, polyamines and organocations. *Microbiology* 146 (Pt 8), 1797-1814.
- Janecek,S., Svensson,B., and Henrissat,B. (1997). Domain evolution in the alpha-amylase family. *J.Mol.Evol.* 45, 322-331.
- Jans,A.W. and Leibfritz,D. (1988). A ¹³C-NMR study on the influxes into the tricarboxylic acid cycle of a renal epithelial cell line, LLC-PK1/C14: the metabolism of [2-¹³C]glycine, L-[3-¹³C]alanine and L-[3-¹³C]aspartic acid in renal epithelial cells. *Biochim.Biophys.Acta* 970, 241-250.
- Javitch,J.A., Ballesteros,J.A., Weinstein,H., and Chen,J. (1998). A cluster of aromatic residues in the sixth membrane-spanning segment of the dopamine D2 receptor is accessible in the binding-site crevice. *Biochemistry* 37, 998-1006.
- Jess,U., Betz,H., and Schloss,P. (1996). The membrane-bound rat serotonin transporter, SERT1, is an oligomeric protein. *FEBS Lett.* 394, 44-46.
- Jiang,Y., Ruta,V., Chen,J., Lee,A., and MacKinnon,R. (2003). The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 423, 42-48.
- Jimenez-Vidal,M., Gasol,E., Zorzano,A., Nunes,V., Palacin,M., and Chillaron,J. (2004). Thiol modification of cysteine 327 in the eighth transmembrane domain of the light subunit xCT of the heteromeric cystine/glutamate antiporter suggests close proximity to the substrate binding site/permeation pathway. *J.Biol.Chem.* 279, 11214-11221.
- Joly,D., Rieu,P., Mejean,A., Gagnadoux,M.F., Daudon,M., and Jungers,P. (1999). Treatment of cystinuria. *Pediatr.Nephrol.* 13, 945-950.

Referencias

Jung,H., Jung,K., and Kaback,H.R. (1994). Cysteine 148 in the lactose permease of *Escherichia coli* is a component of a substrate binding site. 1. Site-directed mutagenesis studies. *Biochemistry* 33, 12160-12165.

Just,H., Sitte,H.H., Schmid,J.A., Freissmuth,M., and Kudlacek,O. (2004). Identification of an additional interaction domain in transmembrane domains 11 and 12 that supports oligomer formation in the human serotonin transporter. *J.Biol.Chem.* 279, 6650-6657.

Kaback,H.R. (1987). Use of site-directed mutagenesis to study the mechanism of a membrane transport protein. *Biochemistry* 26, 2071-2076.

Kaback,H.R., Sahin-Toth,M., and Weinglass,A.B. (2001). The kamikaze approach to membrane transport. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2, 610-620.

Kagan,A., Yu,Z., Fishman,G.I., and McDonald,T.V. (2000). The dominant negative LQT2 mutation A561V reduces wild-type HERG expression. *J.Biol.Chem.* 275, 11241-11248.

Kamdar,G., Penado,K.M., Rudnick,G., and Stephan,M.M. (2001). Functional role of critical stripe residues in transmembrane span 7 of the serotonin transporter. Effects of Na⁺, Li⁺, and methanethiosulfonate reagents. *J.Biol.Chem.* 276, 4038-4045.

Kamsteeg,E.J., Wormhoudt,T.A., Rijss,J.P., van Os,C.H., and Deen,P.M. (1999). An impaired routing of wild-type aquaporin-2 after tetramerization with an aquaporin-2 mutant explains dominant nephrogenic diabetes insipidus. *EMBO J.* 18, 2394-2400.

Kanai,Y. and Endou,H. (2001). Heterodimeric amino acid transporters: molecular biology and pathological and pharmacological relevance. *Curr.Drug Metab* 2, 339-354.

Kanai,Y., Fukasawa,Y., Cha,S.H., Segawa,H., Chairoungdua,A., Kim,D.K., Matsuo,H., Kim,J.Y., Miyamoto,K., Takeda,E., and Endou,H. (2000). Transport properties of a system y⁺L neutral and basic amino acid transporter. Insights into the mechanisms of substrate recognition. *J.Biol.Chem.* 275, 20787-20793.

Kanai,Y., Segawa,H., Miyamoto,K., Uchino,H., Takeda,E., and Endou,H. (1998). Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J.Biol.Chem.* 273, 23629-23632.

Kanai,Y., Stelzner,M.G., Lee,W.S., Wells,R.G., Brown,D., and Hediger,M.A. (1992). Expression of mRNA (D2) encoding a protein involved in amino acid transport in S3 proximal tubule. *Am.J.Physiol* 263, F1087-F1092.

Karlin,A. and Akabas,M.H. (1998). Substituted-cysteine accessibility method. *Methods Enzymol.* 293, 123-145.

Kashiwagi,K., Kuraishi,A., Tomitori,H., Igarashi,A., Nishimura,K., Shirahata,A., and Igarashi,K. (2000). Identification of the putrescine recognition site on polyamine transport protein PotE. *J.Biol.Chem.* 275, 36007-36012.

Kashiwagi,K., Shibuya,S., Tomitori,H., Kuraishi,A., and Igarashi,K. (1997). Excretion and uptake of putrescine by the PotE protein in *Escherichia coli*. *J.Biol.Chem.* 272, 6318-6323.

- Kilic,F. and Rudnick,G. (2000). Oligomerization of serotonin transporter and its functional consequences. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 3106-3111.
- King,J.S., Jr. (1968). Treatment of cystinuria with alpha-mercaptopyrionylglycine: a preliminary report with some notes on column chromatography of mercaptans. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 129, 927-932.
- Kleta,R., Romeo,E., Ristic,Z., Ohura,T., Stuart,C., Arcos-Burgos,M., Dave,M.H., Wagner,C.A., Camargo,S.R., Inoue,S., Matsuura,N., Helip-Wooley,A., Bockenbauer,D., Warth,R., Bernardini,I., Visser,G., Eggermann,T., Lee,P., Chairoungdua,A., Jutabha,P., Babu,E., Nilwarangkoon,S., Anzai,N., Kanai,Y., Verrey,F., Gahl,W.A., and Koizumi,A. (2004). Mutations in SLC6A19, encoding B0AT1, cause Hartnup disorder. *Nat.Genet.* 36, 999-1002.
- Kohler,K., Forster,I.C., Lambert,G., Biber,J., and Murer,H. (2000). The functional unit of the renal type IIa Na⁺/Pi cotransporter is a monomer. *J.Biol.Chem.* 275, 26113-26120.
- Koide,T., Yamaguchi,S., Utsunomiya,M., and Yoshioka,T. A new therapeutic agent for cystinuria. *Proceedings of the VII International Symposium on urolithiasis.* 168. 1992. Penum, Cairns, Australia.
- Ref Type: Conference Proceeding
- Koizumi,A., Matsuura,N., Inoue,S., Utsunomiya,M., Nozaki,J., Inoue,K., and Takasago,Y. (2003). Evaluation of a mass screening program for lysinuric protein intolerance in the northern part of Japan. *Genet.Test.* 7, 29-35.
- Koizumi,A., Shoji,Y., Nozaki,J., Noguchi,A., E X, Dakeishi,M., Ohura,T., Tsuyoshi,K., Yasuhiko,W., Manabe,M., Takasago,Y., and Takada,G. (2000). A cluster of lysinuric protein intolerance (LPI) patients in a northern part of Iwate, Japan due to a founder effect. *The Mass Screening Group. Hum.Mutat.* 16, 270-271.
- Kosari,F., Sheng,S., Li,J., Mak,D.O., Foskett,J.K., and Kleyman,T.R. (1998). Subunit stoichiometry of the epithelial sodium channel. *J.Biol.Chem.* 273, 13469-13474.
- Krawczak,M., Reiss,J., and Cooper,D.N. (1992). The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum.Genet.* 90, 41-54.
- Krom,B.P. and Lolkema,J.S. (2003). Conserved residues R420 and Q428 in a cytoplasmic loop of the citrate/malate transporter CimH of *Bacillus subtilis* are accessible from the external face of the membrane. *Biochemistry* 42, 467-474.
- Kunji,E.R. and Harding,M. (2003). Projection structure of the atractyloside-inhibited mitochondrial ADP/ATP carrier of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* 278, 36985-36988.
- Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature* 227, 680-&.
- Laube,B., Kuhse,J., and Betz,H. (1998). Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. *J.Neurosci.* 18, 2954-2961.

Referencias

- Lauteala,T., Sistonen,P., Savontaus,M.L., Mykkanen,J., Simell,J., Lukkarinen,M., Simell,O., and Aula,P. (1997). Lysinuric protein intolerance (LPI) gene maps to the long arm of chromosome 14. *Am.J.Hum.Genet.* 60, 1479-1486.
- le Coutre,J. and Kaback,H.K. (2000). Structure-function relationships of integral membrane proteins: membrane transporters vs channels. *Biopolymers* 55, 297-307.
- Lebendiker,M. and Schuldiner,S. (1996). Identification of residues in the translocation pathway of EmrE, a multidrug antiporter from *Escherichia coli*. *J.Biol.Chem.* 271, 21193-21199.
- Leclerc,D., Boutros,M., Suh,D., Wu,Q., Palacin,M., Ellis,J.R., Goodyer,P., and Rozen,R. (2002). SLC7A9 mutations in all three cystinuria subtypes. *Kidney Int.* 62, 1550-1559.
- Leclerc,D., Wu,Q., Ellis,J.R., Goodyer,P., and Rozen,R. (2001). Is the SLC7A10 gene on chromosome 19 a candidate locus for cystinuria? *Mol.Genet.Metab* 73, 333-339.
- Leonard,J.V., Marrs,T.C., Addison,J.M., Burston,D., Clegg,K.M., Lloyd,J.K., Matthews,D.M., and Seakins,J.W. (1976). Intestinal absorption of amino acids and peptides in Hartnup disorder. *Pediatr.Res.* 10, 246-249.
- Ligeti,E. and Fonyo,A. (1989). Phosphate transport protein of rat heart mitochondria: location of its SH-groups and exploration of their environment. *Biochim.Biophys.Acta* 973, 170-175.
- Liu,H.X., Zhang,M., and Krainer,A.R. (1998). Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins. *Genes Dev.* 12, 1998-2012.
- Lopez-Corcuera,B., Alcantara,R., Vazquez,J., and Aragon,C. (1993). Hydrodynamic properties and immunological identification of the sodium- and chloride-coupled glycine transporter. *J.Biol.Chem.* 268, 2239-2243.
- Lopez-Corcuera,B., Nunez,E., Martinez-Maza,R., Geerlings,A., and Aragon,C. (2001). Substrate-induced conformational changes of extracellular loop 1 in the glycine transporter GLYT2. *J.Biol.Chem.* 276, 43463-43470.
- MacKinnon,R. (1991). Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* 350, 232-235.
- Makowske,M. and Christensen,H.N. (1982). Hepatic transport system interconverted by protonation from service for neutral to service for anionic amino acids. *J.Biol.Chem.* 257, 14635-14638.
- Markovich,D., Stange,G., Bertran,J., Palacin,M., Werner,A., Biber,J., and Murer,H. (1993). Two mRNA transcripts (rBAT-1 and rBAT-2) are involved in system b₀(+)-related amino acid transport. *J.Biol.Chem.* 268, 1362-1367.
- Martin,X., Salas,M., Labeeuw,M., Pozet,N., Gelet,A., and Dubernard,J.M. (1991). Cystine stones: the impact of new treatment. *Br.J.Urol.* 68, 234-239.

- Mastroberardino,L., Spindler,B., Pfeiffer,R., Skelly,P.J., Loffing,J., Shoemaker,C.B., and Verrey,F. (1998). Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family. *Nature* 395, 288-291.
- Matsuo,H., Kanai,Y., Kim,J.Y., Chairoungdua,A., Kim,d.K., Inatomi,J., Shigeta,Y., Ishimine,H., Chaekuntode,S., Tachampa,K., Choi,H.W., Babu,E., Fukuda,J., and Endou,H. (2002). Identification of a novel Na⁺-independent acidic amino acid transporter with structural similarity to the member of a heterodimeric amino acid transporter family associated with unknown heavy chains. *J.Biol.Chem.* 277, 21017-21026.
- Mayer,K., Ballhausen,W., Leistner,W., and Rott,H. (2000). Three novel types of splicing aberrations in the tuberous sclerosis TSC2 gene caused by mutations apart from splice consensus sequences. *Biochim.Biophys.Acta* 1502, 495-507.
- McNamara,P.D., Pepe,L.M., and Segal,S. (1981). Cystine uptake by rat renal brush-border vesicles. *Biochem.J.* 194, 443-449.
- Meier,C., Ristic,Z., Klauser,S., and Verrey,F. (2002). Activation of system L heterodimeric amino acid exchangers by intracellular substrates. *EMBO J.* 21, 580-589.
- Meisinger,C., Ryan,M.T., Hill,K., Model,K., Lim,J.H., Sickmann,A., Muller,H., Meyer,H.E., Wagner,R., and Pfanner,N. (2001). Protein import channel of the outer mitochondrial membrane: a highly stable Tom40-Tom22 core structure differentially interacts with preproteins, small tom proteins, and import receptors. *Mol.Cell Biol.* 21, 2337-2348.
- Mellerup,E.T., Plenge,P., and Nielsen,M. (1984). Size determination of binding polymers for [3H]imipramine and [3H]paroxetine in human platelet membranes. *Eur.J.Pharmacol.* 106, 411-413.
- Miledi,R., Parker,I., and Sumikawa,K. (1982a). Properties of acetylcholine receptors translated by cat muscle mRNA in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* 1, 1307-1312.
- Miledi,R., Parker,I., and Sumikawa,K. (1982b). Synthesis of chick brain GABA receptors by frog oocytes. *Proc.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 216, 509-515.
- Milne,M.D., Asatoor,A.M., Edwards,K.D.G., and Loughridge,L.W. (1961). The intestinal absorption defect in cystinuria. *Gut* 2, 323.
- Mitaku,S., Wright,J.K., Best,L., and Jahnig,F. (1984). Localization of the galactoside binding site in the lactose carrier of *Escherichia coli*. *Biochim.Biophys.Acta* 776, 247-258.
- Miyamoto,K., Katai,K., Tatsumi,S., Sone,K., Segawa,H., Yamamoto,H., Taketani,Y., Takada,K., Morita,K., Kanayama,H., and . (1995). Mutations of the basic amino acid transporter gene associated with cystinuria. *Biochem.J.* 310 (Pt 3), 951-955.
- Miyamoto,K., Segawa,H., Tatsumi,S., Katai,K., Yamamoto,H., Taketani,Y., Haga,H., Morita,K., and Takeda,E. (1996). Effects of truncation of the COOH-terminal region of a Na⁺-independent neutral and basic amino acid transporter on amino acid transport in *Xenopus* oocytes. *J.Biol.Chem.* 271, 16758-16763.

Referencias

Mizoguchi,K., Cha,S.H., Chairoungdua,A., Kim,D.K., Shigeta,Y., Matsuo,H., Fukushima,J., Awa,Y., Akakura,K., Goya,T., Ito,H., Endou,H., and Kanai,Y. (2001). Human cystinuria-related transporter: localization and functional characterization. *Kidney Int.* 59, 1821-1833.

Mora,C., Chillaron,J., Calonge,M.J., Forgo,J., Testar,X., Nunes,V., Murer,H., Zorzano,A., and Palacin,M. (1996). The rBAT gene is responsible for L-cystine uptake via the b⁰(+)-like amino acid transport system in a "renal proximal tubular" cell line (OK cells). *J.Biol.Chem.* 271, 10569-10576.

Mosckovitz,R., Udenfriend,S., Felix,A., Heimer,E., and Tate,S.S. (1994). Membrane topology of the rat kidney neutral and basic amino acid transporter. *FASEB J.* 8, 1069-1074.

Mueckler,M., Caruso,C., Baldwin,S.A., Panico,M., Blench,I., Morris,H.R., Allard,W.J., Lienhard,G.E., and Lodish,H.F. (1985). Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* 229, 941-945.

Mueckler,M. and Makepeace,C. (1997). Identification of an amino acid residue that lies between the exofacial vestibule and exofacial substrate-binding site of the Glut1 sugar permeation pathway. *J.Biol.Chem.* 272, 30141-30146.

Mueckler,M., Roach,W., and Makepeace,C. (2004). Transmembrane segment 3 of the Glut1 glucose transporter is an outer helix. *J.Biol.Chem.* 279, 46876-46881.

Murakami,S., Nakashima,R., Yamashita,E., and Yamaguchi,A. (2002). Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* 419, 587-593.

Murata,K., Mitsuoka,K., Hirai,T., Walz,T., Agre,P., Heymann,J.B., Engel,A., and Fujiyoshi,Y. (2000). Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* 407, 599-605.

Mykkanen,J., Torrents,D., Pineda,M., Camps,M., Yoldi,M.E., Horelli-Kuitunen,N., Huoponen,K., Heinonen,M., Oksanen,J., Simell,O., Savontaus,M.L., Zorzano,A., Palacin,M., and Aula,P. (2000). Functional analysis of novel mutations in y(+)-LAT-1 amino acid transporter gene causing lysinuric protein intolerance (LPI). *Hum.Mol.Genet.* 9, 431-438.

Nagase,T., Seki,N., Ishikawa,K., Ohira,M., Kawarabayashi,Y., Ohara,O., Tanaka,A., Kotani,H., Miyajima,N., and Nomura,N. (1996). Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. VI. The coding sequences of 80 new genes (KIAA0201-KIAA0280) deduced by analysis of cDNA clones from cell line KG-1 and brain. *DNA Res.* 3, 321-354.

Nakamura,E., Sato,M., Yang,H., Miyagawa,F., Harasaki,M., Tomita,K., Matsuoka,S., Noma,A., Iwai,K., and Minato,N. (1999). 4F2 (CD98) heavy chain is associated covalently with an amino acid transporter and controls intracellular trafficking and membrane topology of 4F2 heterodimer. *J.Biol.Chem.* 274, 3009-3016.

Nakauchi,J., Matsuo,H., Kim,D.K., Goto,A., Chairoungdua,A., Cha,S.H., Inatomi,J., Shiokawa,Y., Yamaguchi,K., Saito,I., Endou,H., and Kanai,Y. (2000). Cloning and characterization of a human brain Na(+)-independent transporter for small neutral amino acids that transports D-serine with high affinity. *Neurosci.Lett.* 287, 231-235.

Navab,F. and Asatoor,A.M. (1970). Studies on intestinal absorption of amino acids and a dipeptide in a case of Hartnup disease. *Gut* 11, 373-379.

- Noguchi,A., Shoji,Y., Koizumi,A., Takahashi,T., Matsumori,M., Kayo,T., Ohata,T., Wada,Y., Yoshimura,I., Maisawa,S., Konishi,M., Takasago,Y., and Takada,G. (2000). SLC7A7 genomic structure and novel variants in three Japanese lysinuric protein intolerance families. *Hum.Mutat.* 15, 367-372.
- Notredame,C., Higgins,D.G., and Heringa,J. (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J.Mol.Biol.* 302, 205-217.
- Novak,D.A., Kilberg,M.S., and Beveridge,M.J. (1994). Ontogeny and plasma-membrane domain localization of amino acid transport system L in rat liver. *Biochem.J.* 301 (Pt 3), 671-674.
- Novak,D.A., Matthews,J.C., Beveridge,M.J., Yao,S.Y., Young,J., and Kilberg,M.S. (1997). Demonstration of system y+L activity on the basal plasma membrane surface of rat placenta and developmentally regulated expression of 4F2HC mRNA. *Placenta* 18, 643-648.
- Olowski,A., Monden,I., Krause,G., and Keller,K. (2000). Cysteine scanning mutagenesis of helices 2 and 7 in GLUT1 identifies an exofacial cleft in both transmembrane segments. *Biochemistry* 39, 2469-2474.
- Orita,M., Iwahana,H., Kanazawa,H., Hayashi,K., and Sekiya,T. (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86, 2766-2770.
- OXENDER,D.L. and Christensen,H.N. (1963). DISTINCT MEDIATING SYSTEMS FOR THE TRANSPORT OF NEUTRAL AMINO ACIDS BY THE EHRlich CELL. *J.Biol.Chem.* 238, 3686-3699.
- Padan,E., Tzuberly,T., Herz,K., Kozachkov,L., Rimon,A., and Galili,L. (2004). NhaA of Escherichia coli, as a model of a pH-regulated Na⁺/H⁺ antiporter. *Biochim.Biophys.Acta* 1658, 2-13.
- Padan,E., Venturi,M., Michel,H., and Hunte,C. (1998). Production and characterization of monoclonal antibodies directed against native epitopes of NhaA, the Na⁺/H⁺ antiporter of Escherichia coli. *FEBS Lett.* 441, 53-58.
- Pajor,A.M., Krajewski,S.J., Sun,N., and Gangula,R. (1999). Cysteine residues in the Na⁺/dicarboxylate co-transporter, NaDC-1. *Biochem.J.* 344 Pt 1, 205-209.
- Palacin,M., Bertran,J., and Zorzano,A. (2000). Heteromeric amino acid transporters explain inherited aminoacidurias. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* 9, 547-553.
- Palacin,M., Borsani,G., and Sebastio,G. (2001). The molecular bases of cystinuria and lysinuric protein intolerance. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 11, 328-335.
- Palacin,M., Chillaron,J., and Mora,C. (1996). Role of the b(o,+)-like amino acid-transport system in the renal reabsorption of cystine and dibasic amino acids. *Biochem.Soc.Trans.* 24, 856-863.
- Palacin,M., Estevez,R., Bertran,J., and Zorzano,A. (1998). Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol Rev.* 78, 969-1054.

Referencias

- Palmieri,F., Indiveri,C., Bisaccia,F., and Kramer,R. (1993). Functional properties of purified and reconstituted mitochondrial metabolite carriers. *J.Bioenerg.Biomembr.* 25, 525-535.
- Parmacek,M.S., Karpinski,B.A., Gottesdiener,K.M., Thompson,C.B., and Leiden,J.M. (1989). Structure, expression and regulation of the murine 4F2 heavy chain. *Nucleic Acids Res.* 17, 1915-1931.
- Parvari,R., Brodyansky,I., Elpeleg,O., Moses,S., Landau,D., and Hershkovitz,E. (2001). A recessive contiguous gene deletion of chromosome 2p16 associated with cystinuria and a mitochondrial disease. *Am.J.Hum.Genet.* 69, 869-875.
- Pascual,J.M., Shieh,C.C., Kirsch,G.E., and Brown,A.M. (1995). K⁺ pore structure revealed by reporter cysteines at inner and outer surfaces. *Neuron* 14, 1055-1063.
- Patel,S.A., Warren,B.A., Rhoderick,J.F., and Bridges,R.J. (2004). Differentiation of substrate and non-substrate inhibitors of transport system xc(-): an obligate exchanger of L-glutamate and L-cystine. *Neuropharmacology* 46, 273-284.
- Pebay-Peyroula,E., Dahout-Gonzalez,C., Kahn,R., Trezeguet,V., Lauquin,G.J., and Brandolin,G. (2003). Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature* 426, 39-44.
- Peces,R., Sanchez,L., Gorostidi,M., and Alvarez,J. (1991). Effects of variation in sodium intake on cystinuria. *Nephron* 57, 421-423.
- Peter,G.J., Davidson,I.G., Ahmed,A., McIlroy,L., Forrester,A.R., and Taylor,P.M. (1996). Multiple components of arginine and phenylalanine transport induced in neutral and basic amino acid transporter-cRNA-injected *Xenopus* oocytes. *Biochem.J.* 318 (Pt 3), 915-922.
- Peter,G.J., Davies,A., Watt,P.W., Birrell,J., and Taylor,P.M. (1999). Interactions between the thiol-group reagent N-ethylmaleimide and neutral and basic amino acid transporter-related amino acid transport. *Biochem.J.* 343 Pt 1, 169-176.
- Peter,G.J., Panova,T.B., Christie,G.R., and Taylor,P.M. (2000). Cysteine residues in the C-terminus of the neutral- and basic-amino-acid transporter heavy-chain subunit contribute to functional properties of the system b(0,+)-type amino acid transporter. *Biochem.J.* 351 Pt 3, 677-682.
- Peters,T., Thaete,C., Wolf,S., Popp,A., Sedlmeier,R., Grosse,J., Nehls,M.C., Russ,A., and Schlueter,V. (2003). A mouse model for cystinuria type I. *Hum.Mol.Genet.* 12, 2109-2120.
- Pfeiffer,R., Loffing,J., Rossier,G., Bauch,C., Meier,C., Eggermann,T., Loffing-Cueni,D., Kuhn,L.C., and Verrey,F. (1999a). Luminal heterodimeric amino acid transporter defective in cystinuria. *Mol.Biol.Cell* 10, 4135-4147.
- Pfeiffer,R., Rossier,G., Spindler,B., Meier,C., Kuhn,L., and Verrey,F. (1999b). Amino acid transport of γ -L-type by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of the glycoprotein-associated amino acid transporter family. *EMBO J.* 18, 49-57.

- Pfeiffer,R., Spindler,B., Loffing,J., Skelly,P.J., Shoemaker,C.B., and Verrey,F. (1998). Functional heterodimeric amino acid transporters lacking cysteine residues involved in disulfide bond. *FEBS Lett.* 439, 157-162.
- Pickel,V.M., Nirenberg,M.J., Chan,J., Mosckovitz,R., Udenfriend,S., and Tate,S.S. (1993). Ultrastructural localization of a neutral and basic amino acid transporter in rat kidney and intestine. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90, 7779-7783.
- Pickel,V.M., Pohorille,A., Chan,J., Tate,S.S., and Nirenberg,M.J. (1999). Regional and subcellular distribution of a neutral and basic amino acid transporter in forebrain neurons containing nitric oxide synthase. *J.Comp Neurol.* 404, 459-472.
- Pineda,M., Fernandez,E., Torrents,D., Estevez,R., Lopez,C., Camps,M., Lloberas,J., Zorzano,A., and Palacin,M. (1999). Identification of a membrane protein, LAT-2, that Co-expresses with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transport activity with broad specificity for small and large zwitterionic amino acids. *J.Biol.Chem.* 274, 19738-19744.
- Pineda,M., Font,M., Bassi,M.T., Manzoni,M., Borsani,G., Marigo,V., Fernandez,E., Rio,R.M., Purroy,J., Zorzano,A., Nunes,V., and Palacin,M. (2004a). The amino acid transporter asc-1 is not involved in cystinuria. *Kidney Int.* 66, 1453-1464.
- Pineda,M., Wagner,C.A., Broer,A., Stehberger,P.A., Kaltenbach,S., Gelpi,J.L., Martin,D.R., Zorzano,A., Palacin,M., Lang,F., and Broer,S. (2004b). Cystinuria-specific rBAT(R365W) mutation reveals two translocation pathways in the amino acid transporter rBAT-b⁰,+AT. *Biochem.J.* 377, 665-674.
- Plenge,P., Mellerup,E.T., and Nielsen,M. (1990). Inhibitory and regulatory binding sites on the rat brain serotonin transporter: molecular weight of the [3H]paroxetine and [3H]citalopram binding proteins. *Eur.J.Pharmacol.* 189, 129-134.
- Poolman,B., Knol,J., and Lolkema,J.S. (1995). Kinetic analysis of lactose and proton coupling in Glu379 mutants of the lactose transport protein of *Streptococcus thermophilus*. *J.Biol.Chem.* 270, 12995-13003.
- Poolman,B., Modderman,R., and Reizer,J. (1992). Lactose transport system of *Streptococcus thermophilus*. The role of histidine residues. *J.Biol.Chem.* 267, 9150-9157.
- Poolman,B., Royer,T.J., Mainzer,S.E., and Schmidt,B.F. (1989). Lactose transport system of *Streptococcus thermophilus*: a hybrid protein with homology to the melibiose carrier and enzyme III of phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase systems. *J.Bacteriol.* 171, 244-253.
- Pourcher,T., Bibi,E., Kaback,H.R., and Leblanc,G. (1996). Membrane topology of the melibiose permease of *Escherichia coli* studied by melB-phoA fusion analysis. *Biochemistry* 35, 4161-4168.
- Pras,E., Arber,N., Aksentijevich,I., Katz,G., Schapiro,J.M., Prosen,L., Gruberg,L., Harel,D., Liberman,U., Weissenbach,J., and . (1994). Localization of a gene causing cystinuria to chromosome 2p. *Nat.Genet.* 6, 415-419.

Referencias

- Pras,E., Golomb,E., Drake,C., Aksentijevich,I., Katz,G., and Kastner,D.L. (1998). A splicing mutation (891+4A-->G) in SLC3A1 leads to exon 4 skipping and causes cystinuria in a Moslem Arab family. *Hum.Mutat. Suppl 1*, S28-S30.
- Pras,E., Raben,N., Golomb,E., Arber,N., Aksentijevich,I., Schapiro,J.M., Harel,D., Katz,G., Liberman,U., Pras,M., and . (1995). Mutations in the SLC3A1 transporter gene in cystinuria. *Am.J.Hum.Genet.* 56, 1297-1303.
- Prasad,P.D., Wang,H., Huang,W., Kekuda,R., Rajan,D.P., Leibach,F.H., and Ganapathy,V. (1999). Human LAT1, a subunit of system L amino acid transporter: molecular cloning and transport function. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 255, 283-288.
- Purroy,J., Bisceglia,L., Jaeken,J., Gasparini,P., Palacin,M., and Nunes,V. (2000). Detection of two novel large deletions in SLC3A1 by semi-quantitative fluorescent multiplex PCR. *Hum.Mutat.* 15, 373-379.
- Qian,Y., Melikian,H.E., Rye,D.B., Levey,A.I., and Blakely,R.D. (1995). Identification and characterization of antidepressant-sensitive serotonin transporter proteins using site-specific antibodies. *J.Neurosci.* 15, 1261-1274.
- Qiu,X.Q., Jakes,K.S., Finkelstein,A., and Slatin,S.L. (1994). Site-specific biotinylation of colicin Ia. A probe for protein conformation in the membrane. *J.Biol.Chem.* 269, 7483-7488.
- Quackenbush,E., Clabby,M., Gottesdiener,K.M., Barbosa,J., Jones,N.H., Strominger,J.L., Speck,S., and Leiden,J.M. (1987). Molecular cloning of complementary DNAs encoding the heavy chain of the human 4F2 cell-surface antigen: a type II membrane glycoprotein involved in normal and neoplastic cell growth. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84, 6526-6530.
- Quackenbush,E.J., Gougos,A., Baumal,R., and Letarte,M. (1986). Differential localization within human kidney of five membrane proteins expressed on acute lymphoblastic leukemia cells. *J.Immunol.* 136, 118-124.
- Rajan,D.P., Huang,W., Kekuda,R., George,R.L., Wang,J., Conway,S.J., Devoe,L.D., Leibach,F.H., Prasad,P.D., and Ganapathy,V. (2000a). Differential influence of the 4F2 heavy chain and the protein related to b(0,+)-amino acid transport on substrate affinity of the heteromeric b(0,+)-amino acid transporter. *J.Biol.Chem.* 275, 14331-14335.
- Rajan,D.P., Kekuda,R., Huang,W., Devoe,L.D., Leibach,F.H., Prasad,P.D., and Ganapathy,V. (2000b). Cloning and functional characterization of a Na(+)-independent, broad-specific neutral amino acid transporter from mammalian intestine. *Biochim.Biophys.Acta* 1463, 6-14.
- Rajantie,J., Simell,O., and Perheentupa,J. (1980). Basolateral-membrane transport defect for lysine in lysinuric protein intolerance. *Lancet* 1, 1219-1221.
- Rajantie,J., Simell,O., and Perheentupa,J. (1981). Lysinuric protein intolerance. Basolateral transport defect in renal tubuli. *J.Clin.Invest* 67, 1078-1082.
- Reig,N., Chillaron,J., Bartoccioni,P., Fernandez,E., Bendahan,A., Zorzano,A., Kanner,B., Palacin,M., and Bertran,J. (2002). The light subunit of system b(o,+) is fully functional in the absence of the heavy subunit. *EMBO J.* 21, 4906-4914.

- Romero,M.F., Kanai,Y., Gunshin,H., and Hediger,M.A. (1998). Expression cloning using *Xenopus laevis* oocytes. *Methods Enzymol.* 296, 17-52.
- Rosenberg,L.E., Downing,S., Durant,J.L., and Segal,S. (1966). Cystinuria: biochemical evidence for three genetically distinct diseases. *J.Clin.Invest* 45, 365-371.
- Rossier,G., Meier,C., Bauch,C., Summa,V., Sordat,B., Verrey,F., and Kuhn,L.C. (1999). LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine. *J.Biol.Chem.* 274, 34948-34954.
- Rotem,D., Sal-man,N., and Schuldiner,S. (2001). In vitro monomer swapping in EmrE, a multidrug transporter from *Escherichia coli*, reveals that the oligomer is the functional unit. *J.Biol.Chem.* 276, 48243-48249.
- Rothman,A., Padan,E., and Schuldiner,S. (1996). Topological analysis of NhaA, a Na⁺/H⁺ antiporter from *Escherichia coli*. *J.Biol.Chem.* 271, 32288-32292.
- Rubin,R.A. and Levy,S.B. (1990). Interdomain hybrid Tet proteins confer tetracycline resistance only when they are derived from closely related members of the tet gene family. *J.Bacteriol.* 172, 2303-2312.
- Russ,W.P. and Engelman,D.M. (2000). The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association. *J.Mol.Biol.* 296, 911-919.
- Saadi,I., Chen,X.Z., Hediger,M., Ong,P., Pereira,P., Goodyer,P., and Rozen,R. (1998). Molecular genetics of cystinuria: mutation analysis of SLC3A1 and evidence for another gene in type I (silent) phenotype. *Kidney Int.* 54, 48-55.
- Sahin-Toth,M., Lawrence,M.C., and Kaback,H.R. (1994). Properties of permease dimer, a fusion protein containing two lactose permease molecules from *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91, 5421-5425.
- Saier,M.H., Jr. (2000). Families of transmembrane transporters selective for amino acids and their derivatives. *Microbiology* 146 (Pt 8), 1775-1795.
- Sakhaee,K., Nicar,M., Hill,K., and Pak,C.Y. (1983). Contrasting effects of potassium citrate and sodium citrate therapies on urinary chemistries and crystallization of stone-forming salts. *Kidney Int.* 24, 348-352.
- Salahpour,A., Angers,S., Mercier,J.F., Lagace,M., Marullo,S., and Bouvier,M. (2004). Homodimerization of the beta2-adrenergic receptor as a prerequisite for cell surface targeting. *J.Biol.Chem.* 279, 33390-33397.
- Salas-Burgos,A., Iserovich,P., Zuniga,F., Vera,J.C., and Fischbarg,J. (2004). Predicting the three-dimensional structure of the human facilitative glucose transporter glut1 by a novel evolutionary homology strategy: insights on the molecular mechanism of substrate migration, and binding sites for glucose and inhibitory molecules. *Biophys.J.* 87, 2990-2999.
- Sambrook.,J., Fritsch,E., and Maniatis,T. (1989). *Molecular Cloning. A laboratory manual.* CSH Laboratory Press. USA).

Referencias

- Sasaki,H., Sato,H., Kuriyama-Matsumura,K., Sato,K., Maebara,K., Wang,H., Tamba,M., Itoh,K., Yamamoto,M., and Bannai,S. (2002). Electrophile response element-mediated induction of the cystine/glutamate exchange transporter gene expression. *J.Biol.Chem.* 277, 44765-44771.
- Sato,H., Fujiwara,K., Sagara,J., and Bannai,S. (1995a). Induction of cystine transport activity in mouse peritoneal macrophages by bacterial lipopolysaccharide. *Biochem.J.* 310 (Pt 2), 547-551.
- Sato,H., Kuriyama-Matsumura,K., Hashimoto,T., Sasaki,H., Wang,H., Ishii,T., Mann,G.E., and Bannai,S. (2001). Effect of oxygen on induction of the cystine transporter by bacterial lipopolysaccharide in mouse peritoneal macrophages. *J.Biol.Chem.* 276, 10407-10412.
- Sato,H., Takenaka,Y., Fujiwara,K., Yamaguchi,M., Abe,K., and Bannai,S. (1995b). Increase in cystine transport activity and glutathione level in mouse peritoneal macrophages exposed to oxidized low-density lipoprotein. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 215, 154-159.
- Sato,H., Tamba,M., Ishii,T., and Bannai,S. (1999). Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. *J.Biol.Chem.* 274, 11455-11458.
- Sato,H., Tamba,M., Okuno,S., Sato,K., Keino-Masu,K., Masu,M., and Bannai,S. (2002). Distribution of cystine/glutamate exchange transporter, system x(c)-, in the mouse brain. *J.Neurosci.* 22, 8028-8033.
- Schmid,J.A., Scholze,P., Kudlacek,O., Freissmuth,M., Singer,E.A., and Sitte,H.H. (2001). Oligomerization of the human serotonin transporter and of the rat GABA transporter 1 visualized by fluorescence resonance energy transfer microscopy in living cells. *J.Biol.Chem.* 276, 3805-3810.
- Schmidt,C., Tomiuk,J., Botzenhart,E., Vester,U., Halber,M., Hesse,A., Wagner,C., Lahme,S., Lang,F., Zerres,K., Eggermann,T., Bachmann,H., Bokenkamp,A., Fischbach,M., Frund,S., Pistor,K.G., and Zappel,H.F. (2003a). Genetic variations of the SLC7A9 gene: allele distribution of 13 polymorphic sites in German cystinuria patients and controls. *Clin.Nephrol.* 59, 353-359.
- Schmidt,C., Vester,U., Hesse,A., Lahme,S., Lang,F., Zerres,K., and Eggermann,T. (2004a). The population-specific distribution and frequencies of genomic variants in the SLC3A1 and SLC7A9 genes and their application in molecular genetic testing of cystinuria. *Urol.Res.* 32, 75-78.
- Schmidt,C., Vester,U., Wagner,C.A., Lahme,S., Hesse,A., Hoyer,P., Lang,F., Zerres,K., and Eggermann,T. (2003b). Significant contribution of genomic rearrangements in SLC3A1 and SLC7A9 to the etiology of cystinuria. *Kidney Int.* 64, 1564-1572.
- Schmidt,C., Vester,U., Zerres,K., and Eggermann,T. (2004b). No evidence for a role of SLC7A10 in 19q13 in the etiology of cystinuria. *Clin.Nephrol.* 62, 71-73.
- Scholze,P., Freissmuth,M., and Sitte,H.H. (2002). Mutations within an intramembrane leucine heptad repeat disrupt oligomer formation of the rat GABA transporter 1. *J.Biol.Chem.* 277, 43682-43690.

- Schroers,A., Burkovski,A., Wohlrab,H., and Kramer,R. (1998). The phosphate carrier from yeast mitochondria. Dimerization is a prerequisite for function. *J.Biol.Chem.* 273, 14269-14276.
- Schuldiner,S., Granot,D., Mordoch,S.S., Ninio,S., Rotem,D., Soskin,M., Tate,C.G., and Yerushalmi,H. (2001). Small is mighty: EmrE, a multidrug transporter as an experimental paradigm. *News Physiol Sci.* 16, 130-134.
- Scriver,C.R., Mahon,B., Levy,H.L., Clow,C.L., Reade,T.M., Kronick,J., Lemieux,B., and Laberge,C. (1987). The Hartnup phenotype: Mendelian transport disorder, multifactorial disease. *Am.J.Hum.Genet.* 40, 401-412.
- Seal,R.P. and Amara,S.G. (1998). A reentrant loop domain in the glutamate carrier EAAT1 participates in substrate binding and translocation. *Neuron* 21, 1487-1498.
- Seal,R.P., Leighton,B.H., and Amara,S.G. (1998). Transmembrane topology mapping using biotin-containing sulfhydryl reagents. *Methods Enzymol.* 296, 318-331.
- Segawa,H., Fukasawa,Y., Miyamoto,K., Takeda,E., Endou,H., and Kanai,Y. (1999). Identification and functional characterization of a Na⁺-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J.Biol.Chem.* 274, 19745-19751.
- Senes,A., Gerstein,M., and Engelman,D.M. (2000). Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with beta-branched residues at neighboring positions. *J.Mol.Biol.* 296, 921-936.
- Shapiro,M.S. and Zagotta,W.N. (1998). Stoichiometry and arrangement of heteromeric olfactory cyclic nucleotide-gated ion channels. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 14546-14551.
- Shayakul,C., Kanai,Y., Lee,W.S., Brown,D., Rothstein,J.D., and Hediger,M.A. (1997). Localization of the high-affinity glutamate transporter EAAC1 in rat kidney. *Am.J.Physiol* 273, F1023-F1029.
- Shi,J., Blundell,T.L., and Mizuguchi,K. (2001). FUGUE: sequence-structure homology recognition using environment-specific substitution tables and structure-dependent gap penalties. *J.Mol.Biol.* 310, 243-257.
- Shih,T.M., Smith,R.D., Toro,L., and Goldin,A.L. (1998). High-level expression and detection of ion channels in *Xenopus* oocytes. *Methods Enzymol.* 293, 529-556.
- Shih,V.E., Bixby,E.M., Alpers,D.H., Bartoscas,C.S., and Thier,S.O. (1971). Studies of intestinal transport defect in Hartnup disease. *Gastroenterology* 61, 445-453.
- Shoji,Y., Noguchi,A., Shoji,Y., Matsumori,M., Takasago,Y., Takayanagi,M., Yoshida,Y., Ihara,K., Hara,T., Yamaguchi,S., Yoshino,M., Kaji,M., Yamamoto,S., Nakai,A., Koizumi,A., Hokezu,Y., Nagamatsu,K., Mikami,H., Kitajima,I., and Takada,G. (2002). Five novel SLC7A7 variants and y+L gene-expression pattern in cultured lymphoblasts from Japanese patients with lysinuric protein intolerance. *Hum.Mutat.* 20, 375-381.
- Sigel,E. (1990). Use of *Xenopus* oocytes for the functional expression of plasma membrane proteins. *J.Membr.Biol.* 117, 201-221.

Referencias

Silbernagl,S. and Deetjen,P. (1972). The tubular reabsorption of L-cystine and L-cysteine. A common transport system with L-arginine or not? *Pflugers Arch.* 337, 277-284.

Simell,O. (2001). Lysinuric protein intolerance and other cationic amino acidurias. In *Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*, C. R. Scriver, A. L. Beaudet, S. W. Sly, and D. Valle, eds. (New York: McGraw-Hill), pp. 4933-4956.

Sitte,H.H. and Freissmuth,M. (2003). Oligomer formation by Na⁺-Cl⁻-coupled neurotransmitter transporters. *Eur.J.Pharmacol.* 479, 229-236.

Slatin,S.L., Qiu,X.Q., Jakes,K.S., and Finkelstein,A. (1994). Identification of a translocated protein segment in a voltage-dependent channel. *Nature* 371, 158-161.

Sloand,J.A. and Izzo,J.L., Jr. (1987). Captopril reduces urinary cystine excretion in cystinuria. *Arch.Intern.Med.* 147, 1409-1412.

Sorgen,P.L., Hu,Y., Guan,L., Kaback,H.R., and Girvin,M.E. (2002). An approach to membrane protein structure without crystals. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99, 14037-14040.

Sorkina,T., Doolen,S., Galperin,E., Zahniser,N.R., and Sorkin,A. (2003). Oligomerization of dopamine transporters visualized in living cells by fluorescence resonance energy transfer microscopy. *J.Biol.Chem.* 278, 28274-28283.

Soskine,M., Steiner-Mordoch,S., and Schuldiner,S. (2002). Crosslinking of membrane-embedded cysteines reveals contact points in the EmrE oligomer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99, 12043-12048.

Sperandeo,M.P., Bassi,M.T., Riboni,M., Parenti,G., Buoninconti,A., Manzoni,M., Incerti,B., Larocca,M.R., Di Rocco,M., Strisciuglio,P., Dianzani,I., Parini,R., Candito,M., Endo,F., Ballabio,A., Andria,G., Sebastio,G., and Borsani,G. (2000). Structure of the SLC7A7 gene and mutational analysis of patients affected by lysinuric protein intolerance. *Am.J.Hum.Genet.* 66, 92-99.

Spooner,P.J., Friesen,R.H., Knol,J., Poolman,B., and Watts,A. (2000). Rotational mobility and orientational stability of a transport protein in lipid membranes. *Biophys.J.* 79, 756-766.

Steinmeyer,K., Lorenz,C., Pusch,M., Koch,M.C., and Jentsch,T.J. (1994). Multimeric structure of CIC-1 chloride channel revealed by mutations in dominant myotonia congenita (Thomsen). *EMBO J.* 13, 737-743.

Stephan,M.M., Chen,M.A., Penado,K.M., and Rudnick,G. (1997). An extracellular loop region of the serotonin transporter may be involved in the translocation mechanism. *Biochemistry* 36, 1322-1328.

Stephens,A.D. (1989). Cystinuria and its treatment: 25 years experience at St. Bartholomew's Hospital. *J.Inherit.Metab Dis.* 12, 197-209.

Stevens,B.R., Kaunitz,J.D., and Wright,E.M. (1984). Intestinal transport of amino acids and sugars: advances using membrane vesicles. *Annu.Rev.Physiol* 46, 417-433.

- Stoop,R., Thomas,S., Rassendren,F., Kawashima,E., Buell,G., Surprenant,A., and North,R.A. (1999). Contribution of individual subunits to the multimeric P2X(2) receptor: estimates based on methanethiosulfonate block at T336C. *Mol.Pharmacol.* 56, 973-981.
- Tanner,S.M., Schneider,V., Thomas,N.S., Clarke,A., Lazarou,L., and Liechti-Gallati,S. (1999). Characterization of 34 novel and six known MTM1 gene mutations in 47 unrelated X-linked myotubular myopathy patients. *Neuromuscul.Disord.* 9, 41-49.
- Tarlow,M.J., Seakins,J.W., Lloyd,J.K., Matthews,D.M., Cheng,B., and Thomas,A.J. (1970). Intestinal absorption and biopsy transport of peptides and amino acids in Hartnup disease. *Clin.Sci.* 39, 18P-19P.
- Tate,C.G., Kunji,E.R., Lebendiker,M., and Schuldiner,S. (2001). The projection structure of EmrE, a proton-linked multidrug transporter from *Escherichia coli*, at 7 Å resolution. *EMBO J.* 20, 77-81.
- Tate,C.G., Ubarretxena-Belandia,I., and Baldwin,J.M. (2003). Conformational changes in the multidrug transporter EmrE associated with substrate binding. *J.Mol.Biol.* 332, 229-242.
- Tate,S.S., Yan,N., and Udenfriend,S. (1992). Expression cloning of a Na(+)-independent neutral amino acid transporter from rat kidney. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89, 1-5.
- Teixeira,S., Di Grandi,S., and Kuhn,L.C. (1987). Primary structure of the human 4F2 antigen heavy chain predicts a transmembrane protein with a cytoplasmic NH2 terminus. *J.Biol.Chem.* 262, 9574-9580.
- Teraoka,S.N., Telatar,M., Becker-Catania,S., Liang,T., Onengut,S., Tolun,A., Chessa,L., Sanal,O., Bernatowska,E., Gatti,R.A., and Concannon,P. (1999). Splicing defects in the ataxia-telangiectasia gene, ATM: underlying mutations and consequences. *Am.J.Hum.Genet.* 64, 1617-1631.
- THIER,S., FOX,M., Segal,S., and Rosenberg,L.E. (1964). CYSTINURIA: IN VITRO DEMONSTRATION OF AN INTESTINAL TRANSPORT DEFECT. *Science* 143, 482-484.
- Thier,S.O., Segal,S., FOX,M., BLAIR,A., and Rosenberg,L.E. (1965). CYSTINURIA: DEFECTIVE INTESTINAL TRANSPORT OF DIBASIC AMINO ACIDS AND CYSTINE. *J.Clin.Invest* 44, 442-448.
- Toivonen,M., Mykkanen,J., Aula,P., Simell,O., Savontaus,M.L., and Huoponen,K. (2002). Expression of normal and mutant GFP-tagged $\gamma(+)$ L amino acid transporter-1 in mammalian cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 291, 1173-1179.
- Torras-Llort,M., Torrents,D., Soriano-Garcia,J.F., Gelpi,J.L., Estevez,R., Ferrer,R., Palacin,M., and Moreto,M. (2001). Sequential amino acid exchange across b(0,+)-like system in chicken brush border jejunum. *J.Membr.Biol.* 180, 213-220.
- Torrents,D., Estevez,R., Pineda,M., Fernandez,E., Lloberas,J., Shi,Y.B., Zorzano,A., and Palacin,M. (1998). Identification and characterization of a membrane protein (γ +L amino acid transporter-1) that associates with 4F2hc to encode the amino acid transport activity γ +L. A candidate gene for lysinuric protein intolerance. *J.Biol.Chem.* 273, 32437-32445.

Referencias

- Torrents,D., Mykkanen,J., Pineda,M., Feliubadalo,L., Estevez,R., de Cid,R., Sanjurjo,P., Zorzano,A., Nunes,V., Huoponen,K., Reinikainen,A., Simell,O., Savontaus,M.L., Aula,P., and Palacin,M. (1999). Identification of SLC7A7, encoding γ -LAT-1, as the lysinuric protein intolerance gene. *Nat.Genet.* 21, 293-296.
- Torres,G.E., Carneiro,A., Seamans,K., Fiorentini,C., Sweeney,A., Yao,W.D., and Caron,M.G. (2003). Oligomerization and trafficking of the human dopamine transporter. Mutational analysis identifies critical domains important for the functional expression of the transporter. *J.Biol.Chem.* 278, 2731-2739.
- Tsurudome,M. and Ito,Y. (2000). Function of fusion regulatory proteins (FRPs) in immune cells and virus-infected cells. *Crit Rev.Immunol.* 20, 167-196.
- Turnell,D.C. and Cooper,J.D.H. (1982). Rapid Assay for Amino-Acids in Serum Or Urine by Precolumn Derivatization and Reversed-Phase Liquid-Chromatography. *Clinical Chemistry* 28, 527-531.
- Tusnady,G.E. and Simon,I. (1998). Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. *J.Mol.Biol.* 283, 489-506.
- Ubarretxena-Belandia,I., Baldwin,J.M., Schuldiner,S., and Tate,C.G. (2003). Three-dimensional structure of the bacterial multidrug transporter EmrE shows it is an asymmetric homodimer. *EMBO J.* 22, 6175-6181.
- Ubarretxena-Belandia,I. and Tate,C.G. (2004). New insights into the structure and oligomeric state of the bacterial multidrug transporter EmrE: an unusual asymmetric homo-dimer. *FEBS Lett.* 564, 234-238.
- Uchino,H., Kanai,Y., Kim,d.K., Wempe,M.F., Chairoungdua,A., Morimoto,E., Anders,M.W., and Endou,H. (2002). Transport of amino acid-related compounds mediated by L-type amino acid transporter 1 (LAT1): insights into the mechanisms of substrate recognition. *Mol.Pharmacol.* 61, 729-737.
- van Iwaarden,P.R., Driessen,A.J., and Konings,W.N. (1992). What we can learn from the effects of thiol reagents on transport proteins. *Biochim.Biophys.Acta* 1113, 161-170.
- Van Winkle,L.J., Campione,A.L., and Gorman,J.M. (1988). Na⁺-independent transport of basic and zwitterionic amino acids in mouse blastocysts by a shared system and by processes which distinguish between these substrates. *J.Biol.Chem.* 263, 3150-3163.
- Veenhoff,L.M., Geertsma,E.R., Knol,J., and Poolman,B. (2000). Close approximation of putative α -helices II, IV, VII, X, and XI in the translocation pathway of the lactose transport protein of *Streptococcus thermophilus*. *J.Biol.Chem.* 275, 23834-23840.
- Veenhoff,L.M., Heuberger,E.H., and Poolman,B. (2001). The lactose transport protein is a cooperative dimer with two sugar translocation pathways. *EMBO J.* 20, 3056-3062.
- Veenhoff,L.M., Heuberger,E.H., and Poolman,B. (2002). Quaternary structure and function of transport proteins. *Trends Biochem.Sci.* 27, 242-249.

- Veenhoff,L.M. and Poolman,B. (1999). Substrate recognition at the cytoplasmic and extracellular binding site of the lactose transport protein of *Streptococcus thermophilus*. *J.Biol.Chem.* 274, 33244-33250.
- Veljkovic,E., Stasiuk S., Skelly,P.J., Shoemaker,C.B., and Verrey,F. (2004). Functional Characterization of *Caenorhabditis elegans* Heteromeric Amino acid Transporters. *J.Biol.Chem.* 279, 7655-7662.
- Verrey,F., Closs,E.I., Wagner,C.A., Palacin,M., Endou,H., and Kanai,Y. (2003). CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch.*
- Verrey,F., Closs,E.I., Wagner,C.A., Palacin,M., Endou,H., and Kanai,Y. (2004). CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch.* 447, 532-542.
- Verrey,F., Jack,D.L., Paulsen,I.T., Saier,M.H., Jr., and Pfeiffer,R. (1999). New glycoprotein-associated amino acid transporters. *J.Membr.Biol.* 172, 181-192.
- Verrey,F., Meier,C., Rossier,G., and Kuhn,L.C. (2000). Glycoprotein-associated amino acid exchangers: broadening the range of transport specificity. *Pflugers Arch.* 440, 503-512.
- Wadiche,J.I., Amara,S.G., and Kavanaugh,M.P. (1995). Ion fluxes associated with excitatory amino acid transport. *Neuron* 15, 721-728.
- Wagner,C.A., Lang,F., and Broer,S. (2001). Function and structure of heterodimeric amino acid transporters. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 281, C1077-C1093.
- Wang,K.W. and Goldstein,S.A. (1995). Subunit composition of minK potassium channels. *Neuron* 14, 1303-1309.
- Wang,Y. and Tate,S.S. (1995). Oligomeric structure of a renal cystine transporter: implications in cystinuria. *FEBS Lett.* 368, 389-392.
- Wartenfeld,R., Golomb,E., Katz,G., Bale,S.J., Goldman,B., Pras,M., Kastner,D.L., and Pras,E. (1997). Molecular analysis of cystinuria in Libyan Jews: exclusion of the SLC3A1 gene and mapping of a new locus on 19q. *Am.J.Hum.Genet.* 60, 617-624.
- Weissbach,L., Handlogten,M.E., Christensen,H.N., and Kilberg,M.S. (1982). Evidence for two Na⁺-independent neutral amino acid transport systems in primary cultures of rat hepatocytes. Time-dependent changes in activity. *J.Biol.Chem.* 257, 12006-12011.
- Wellner,M., Monden,I., and Keller,K. (1992). The differential role of Cys-421 and Cys-429 of the Glut1 glucose transporter in transport inhibition by p-chloromercuribenzenesulfonic acid (pCMBS) or cytochalasin B (CB). *FEBS Lett.* 309, 293-296.
- Wellner,M., Monden,I., and Keller,K. (1995). From triple cysteine mutants to the cysteine-less glucose transporter GLUT1: a functional analysis. *FEBS Lett.* 370, 19-22.
- Wells,R.G. and Hediger,M.A. (1992). Cloning of a rat kidney cDNA that stimulates dibasic and neutral amino acid transport and has sequence similarity to glucosidases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89, 5596-5600.

Referencias

- Wells,R.G., Lee,W.S., Kanai,Y., Leiden,J.M., and Hediger,M.A. (1992). The 4F2 antigen heavy chain induces uptake of neutral and dibasic amino acids in *Xenopus* oocytes. *J.Biol.Chem.* 267, 15285-15288.
- Williams,K.A. (2000). Three-dimensional structure of the ion-coupled transport protein NhaA. *Nature* 403, 112-115.
- Williams,K.A., Geldmacher-Kaufer,U., Padan,E., Schuldiner,S., and Kuhlbrandt,W. (1999). Projection structure of NhaA, a secondary transporter from *Escherichia coli*, at 4.0 Å resolution. *EMBO J.* 18, 3558-3563.
- Wolf,D.A., Wang,S., Panzica,M.A., Bassily,N.H., and Thompson,N.L. (1996). Expression of a highly conserved oncofetal gene, TA1/E16, in human colon carcinoma and other primary cancers: homology to *Schistosoma mansoni* amino acid permease and *Caenorhabditis elegans* gene products. *Cancer Res.* 56, 5012-5022.
- Wu,C.C. and Yates,J.R., III (2003). The application of mass spectrometry to membrane proteomics. *Nat.Biotechnol.* 21, 262-267.
- Xu,Y., Kakhniashvili,D.A., Gremse,D.A., Wood,D.O., Mayor,J.A., Walters,D.E., and Kaplan,R.S. (2000). The yeast mitochondrial citrate transport protein. Probing the roles of cysteines, Arg(181), and Arg(189) in transporter function. *J.Biol.Chem.* 275, 7117-7124.
- Yamaguchi,A., Nakatani,M., and Sawai,T. (1992). Aspartic acid-66 is the only essential negatively charged residue in the putative hydrophilic loop region of the metal-tetracycline/H⁺ antiporter encoded by transposon Tn10 of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 31, 8344-8348.
- Yan,N., Mosckovitz,R., Udenfriend,S., and Tate,S.S. (1992). Distribution of mRNA of a Na(+)-independent neutral amino acid transporter cloned from rat kidney and its expression in mammalian tissues and *Xenopus laevis* oocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89, 9982-9985.
- Yan,R.T. and Maloney,P.C. (1993). Identification of a residue in the translocation pathway of a membrane carrier. *Cell* 75, 37-44.
- Yan,R.T. and Maloney,P.C. (1995). Residues in the pathway through a membrane transporter. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92, 5973-5976.
- Yanagida,O., Kanai,Y., Chairoungdua,A., Kim,D.K., Segawa,H., Nii,T., Cha,S.H., Matsuo,H., Fukushima,J., Fukasawa,Y., Tani,Y., Taketani,Y., Uchino,H., Kim,J.Y., Inatomi,J., Okayasu,I., Miyamoto,K., Takeda,E., Goya,T., and Endou,H. (2001). Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim.Biophys.Acta* 1514, 291-302.
- Yao,S.Y., Sundaram,M., Chomey,E.G., Cass,C.E., Baldwin,S.A., and Young,J.D. (2001). Identification of Cys140 in helix 4 as an exofacial cysteine residue within the substrate-translocation channel of rat equilibrative nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-insensitive nucleoside transporter rENT2. *Biochem.J.* 353, 387-393.

- Yernool,D., Boudker,O., Folta-Stogniew,E., and Gouaux,E. (2003). Trimeric subunit stoichiometry of the glutamate transporters from *Bacillus caldotenax* and *Bacillus stearothermophilus*. *Biochemistry* 42, 12981-12988.
- Yernool,D., Boudker,O., Jin,Y., and Gouaux,E. (2004). Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*. *Nature* 431, 811-818.
- Yerushalmi,H., Lebediker,M., and Schuldiner,S. (1996). Negative dominance studies demonstrate the oligomeric structure of EmrE, a multidrug antiporter from *Escherichia coli*. *J.Biol.Chem.* 271, 31044-31048.
- Zhou,Z., Gong,Q., and January,C.T. (1999). Correction of defective protein trafficking of a mutant HERG potassium channel in human long QT syndrome. Pharmacological and temperature effects. *J.Biol.Chem.* 274, 31123-31126.
- Zottola,R.J., Cloherty,E.K., Coderre,P.E., Hansen,A., Hebert,D.N., and Carruthers,A. (1995). Glucose transporter function is controlled by transporter oligomeric structure. A single, intramolecular disulfide promotes GLUT1 tetramerization. *Biochemistry* 34, 9734-9747.
- Zuniga,F.A., Shi,G., Haller,J.F., Rubashkin,A., Flynn,D.R., Iserovich,P., and Fischbarg,J. (2001). A three-dimensional model of the human facilitative glucose transporter Glut1. *J.Biol.Chem.* 276, 44970-44975.
- Zuo,S., Hellman,U., and Lundahl,P. (2003). On the oligomeric state of the red blood cell glucose transporter GLUT1. *Biochim.Biophys.Acta* 1618, 8-16.

