



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

**Transportador de aminoácidos heteromérico xCT**  
**Identificación, caracterización funcional y topología**

**Emma Gasol Escuer**  
**Barcelona 2004**



# **Transportador de aminoácidos heteromérico xCT**

## **Identificación, caracterización funcional y topología**

Memoria presentada por

**Emma Gasol Escuer**

Para optar al grado de

**Doctora en Bioquímica**

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

El Director,

La doctoranda,

Dr. Manuel Palacín Prieto

Emma Gasol Escuer

Barcelona, 2004



**Als meus pares**



Juliol 1999. Títol de Bioquímica per estrenar. Davant meu, el FUTUR. Plans, molts plans. Efervescència existencial. La crida de la ciència més real que mai. Grans dosis d'idealisme. Somnis per realitzar. Moments de respostes a antigues preguntes. Expectatives creades. Un projecte: vull fer una Tesi. I així va començar aquell estiu que ara em sembla tan llunyà i que, per altra banda, em costa tant poc de reviure. Al setembre, una trucada providencial del Manuel va marcar l'inici d'un camí que molts altres ja havien recorregut abans però que a mi em semblava únic. Manuel, tu no te acordarás, pero ese día en la mampara de la planta 6 de biología viví uno de los momentos más felices de mi vida.

Juliol 2004. Gairebé Doctora. De nou, davant meu el FUTUR. Més plans. Més efervescència existencial. Amb certa experiència però amb una mica menys d'idealisme. Amb noves preguntes i amb alguns projectes. Cinc anys de Tesi resumits en aquesta memòria. Moment d'aturar-se. De repassar un temps en el que han passat coses. I moment de donar gràcies. A tots els que m'heu acompanyat en aquest camí que no sempre m'ha estat fàcil i que vosaltres heu fet més planer.

Manuel, gracias por darme la oportunidad de realizar un sueño y crearme una investigadora. Por ser la imagen romántica del científico apasionado. Por tu total dedicación y esa frase tan tuya ¿tienes algo para enseñarme?

Marta, a tu et va tocar ensenyar-m'ho tot. Gràcies per ser tan bona mestra, per la teva infinita paciència, per tot el temps que m'has dedicat. Per cuidar-me des del primer dia, pels moments de complicitat amb les granotes i les xerrades al comptador de radioactius. Has sigut el meu àngel de la guarda tot aquest temps. No saps com t'he trobat a faltar durant l'últim any.

El que no esperava quan vaig començar aquesta tesi és trobar-me amb una gran família: els INSULINOS. Us he de dir que és un plaer compartir la vida al laboratori amb vosaltres. M'heu fet les coses molt fàcils. Antonio, valoro molt els teus comentaris sobre els meus experiments. Xavier Testar, tens el millor "bona tarda a tothom!". Josep, m'has ajudat moltíssim. Gràcies per tenir sempre cinc minuts per mi i resoldre'm tants dubtes. Joan i Judit, no oblidaré la vostra festa. Sou maquíssims! Raúl, al doctorar-te em vas escriure "espero que acabis algunes de les coses que he començat aquí". M'ha costat, però finalment crec que sí. Marta, anar al confocal amb tu és una garantia. Recordo entre els grans moments aquell sopar de germanor a la Floresta... Perla, toda búsqueda es un encuentro, verdad? Luc, el postdoc indie, te felicito por ese toque francés único, por no tener pelos en la lengua y por esos mails a insulina@yahoogroups con los que me he reído tanto. Y evidentemente, por la mejor mousse de chocolate del mundo. Anna Gumà, les converses a l'antic menjadoret del departament no tenien desperdici i segurament et mereixes el premi a les millors preguntes dels seminaris. Manu, marassa, ets tan bona! Tu vas ser de les primeres en parlar-me quan vaig entrar al grup i encara no m'atrevia a obrir la boca. D'això ja fa molt, allà a l'antic edifici... Espe, días de marañuela y quesos asturianos, carcajadas repentinas en el laboratorio, espontaneidad en su estado puro. Ya sabes que soy tu fan. Maite, companya de fatigues de xCT, ens has animat el cotarro amb les teves converses i has portat la música amb tu. Fins i tot vas aconseguir que pugés en bici a Suïssa! Núria, la mega-crack del grup,

passa'm una mica d'aquesta energia desbordant que tens. Allà on vas triomfes. Paola, gracias por ser tan cariñosa y tener siempre una sonrisa para mí. No dejes de promover los cafés de niñas Palacín, me han alegrado más de una tarde. Lorena, sense tu els amics invisibles, els sopars de grup i les recol.lectes de bote no existirien. No deixis de fer-ho, please! Franxesco, tu vas instaurar l'humor al laboratori i la birra dels divendres. M'ho he passat molt bé en els teus seminaris i debatint l'actualitat política amb tu. Sarix, el 2004 és el nostre any! Entre teràpia i teràpia m'has fet riure molt (i t'has rigut molt de mi, eh?) i el que encara falta. Cada vegada que escolto la Oreja de Van Gogh penso en tu. Mericiel, la miss stylish, la més detallista i la sufridora de cultius del Parc durant molt de temps. Definitivament, ets la glamour girl d'insulina (a més de la més matinera). Carles, encara flipo ara quan penso que la versió de Bowie de carretera perduda és teva. Ets una caixa de sorpreses. Quant ens falta per descobrir? Jose, contigo llegó el salero malagueño y esa receta de hummus tan fácil que cuela que te \*\*\*\*\*. La barretina catalana te sienta muy bien, en serio. Susanita, maca, m'agraden molt les teves visites al Parc i el teu positivisme a totes hores. Sort amb LAT4! César, gràcies per cuidar-te de les nenes insulina, tractar-nos com princeses i quedar-te sense croissants per nosaltres. Joana, d'on has tret aquest esperit de matrona? Faltava algú així a insulina. Hans, has estat la meva salvació dels contratemps informàtics i m'has introduït en la grandiositat de Mahler. Quan t'animes amb la meditació? Jordi, gràcies per fer de Hans quan ell no hi és, per les sessions intimistes a cultius i per provocar-me amb les teves frases des de l'altre costat de poyata. Basta ya! Je, je... Deborah, me encanta tu acento! Silvia, hem compartit la creu de descontaminar i aquella escena memorable... Elena, eres la reina de cultivos. Óscar, ya ves que hay perfumes que triunfan... I les noves generacions, el Marc (aprofita bé el saber de la teva mestra), la Mercè (gràcies pel mail de la teva amiga), la Meri, la Tiffany, la Eleonora, l'Alfonso... espero que us trobeu tant bé a insulina com jo.

Una forta abraçada al Reini i la Laura, que s'han animat a seguir el projecte de la topologia de xCT. Chicos, sois una maravilla! També a les nostres tècnics i el seu bon rollo, que ens fan la vida molt més fàcil. Míriam, merci per les comandes de Toronto i per deixar-me el teu ordinador. Susana, m'has alliberat de fer mutants! Ruth, sort de tu amb els residus i Noemí, d'on treus aquest bon humor a totes hores?. David Verde, que et milloris aviat. I a la Judith, gracias niña por preocuparte de mis cosas. També a la gent de l'IRO, la Nònia i la Virgínia i, sobretot a la Mariona, que té molt bon gust musical. Tampoc em vull oblidar de l'equip del citòmetre, sobretot del Jaume, que cada setmana m'han tingut allà, ni de la Nieves del confocal, gracias por ese protocolo "mágico" que no permeabiliza las células. A l'Adela Mazo, per acollir-me d'alumna interna i permetre'm els primers contactes amb la poyata, i al Joaquim, que em va ensenyar a revelar films i que segur que està triomfant a Holanda.

Un petó des d'aquí als que estan en altres projectes però que també han compartit un temps preciós amb mi: Anna Abella, quantes nits em vas acompanyar a casa i quins mails tan macos ens vas enviar de Guatemala! Admiro la teva decisió a la vida. Anna Ros, molta sort amb la vostra casa de natura. Ets l'autèntic esperit d'ONG. Marta Carrasco, qué valenta! Ana Pérez, revolucionaste el personal niña!. Sofía, tú sí



que sabes! Dani, l'últim cuenta-cuentos, no deixis de generar polèmica des de Ginebra. Horacio, els matins de tertúlia es van acabar... Va ser molt divertit compartir poyata amb tu. Anna Vi, admiro esa fuerza vital que tienes.

Tampoc vull deixar d'anomenar a la meva penya de bio i, sobretot, al "quinteto". Eli, Marc i Núria, sou genials! Crec que mai us he agraït la vostra amistat i després de tants anys ja toca. Per tots els sopars entresetmana, per aguantar els meus rollos de ciència, per entendre que marxés aviat les nits de farra i per moltes altres coses... Us prometo que aquest cop ho celebrarem a lo grande. Tu Eli, gran amiga, et mereixes un trosset d'aquesta tesi per totes les paraules que m'han animat en els moments més crítics i m'han ajudat a seguir endavant. També als bioquímics Carles, Maite, Xavi i Vanessa, per les nostres converses arreglant el món mentre preniem txacolí i pinxos. A les meves nenes Sant Ignasi, Mireia, Judit, Cristina i Tahís, que m'estimo molt, heu aconseguit que m'ho passi bé als bars pijos!. A tí Antony, thank you for reminding me my dreaming side every now and then.

Però aquesta tesi no hagués estat possible sense el recolzament incondicional de tota la meva Family. Padrins d'Alpicat i padrina de Cervià, aviat tindreu una néta Doctora! Tieta Pili i tiet Francisco, sempre us heu interessat pels meus progressos... Elisa, Eva y Pedro, ahora sí que ya casi estoy! Cosins Maria, Albert i Montse, ja sabeu què ens toca als Gasol! Tieta Fontsanta, tu sí que saps què és fer una tesi. Padrí Josep Maria, no estic segura d'haver vist el que encara no ha vist ningú però ja et puc dir que ho he intentat. Roser i Joan, vosaltres també m'heu fet costat des del principi. Sisters! M'encanta ser la vostra germana. I que estigueu a casa quan arribo i que fem tertúlia a l'habitació fins les tantes i que a la Rosie li pilli el puntàs de fer una truita de patates i que riguem per les nostres coses i que la pec sigui una indie teen i que m'escrigueu aquests mens tan guais que fan que us trobi a faltar...Smuaaaak!!

I ara vosaltres, papa i mama. Us heu alegrat amb mi dels bons resultats, heu aguantat les hores baixes i heu estat al meu costat quan més difícil era. Mam, no només són els matins que em vas haver de despertar, o els teus dinars dia rere dia i a qualsevol hora... són tantes coses! I tu papa, m'has fet sentir orgullosa de ser una investigadora. Per vosaltres va aquesta tesi que ja sabeu prou el que m'ha costat i que finalment teniu a les mans. Us estimo!

Bernat, tu has sigut qui ha omplert tots els buits que ha deixat la ciència. M'has abraçat sota la pluja i xiuxiuejat a l'orella, m'has portat la lluna i el mar en un petó, m'has fet riure fins haver de parar... Un dia vas despertar-me amb música i ja no ha parat de sonar...com en la cançó de Field Mice "...if you need someone to hold you when you're afraid, I'll hold you; if you need someone to make you happy when you're sad, I'll try to; if you need someone to tell you everything's gonna be alright, I can do that; if you need someone to comfort you when tears go down your face, I'll do what I can..." Encara recordo el dia que me la vas posar per primera vegada...i vaig desitjar que es parés el temps. El disseny de portada que m'has fet amb el Guillem m'encanta!

Emma



# Índice de contenidos

## **Introducción** **1**

1. Sistemas de transporte de aminoácidos en mamíferos .....	3
1.2. Sistema $x_c^-$ .....	4
2. Familia de transportadores heteroméricos de aminoácidos .....	6
2.1. Subunidades pesadas (HSHATs) ..	7
2.1.1. rBAT (SLC3A1) .....	9
2.1.2. 4F2hc (SLC3A2) .....	10
2.2. Subunidades ligeras (LSHATs) ..	11
2.2.1. LAT-1 (SLC7A5) .....	12
2.2.2. LAT-2 (SLC7A8) .....	12
2.2.3. $y^+$ LAT-1 (SLC7A7) .....	13
2.2.4. $y^+$ LAT-2 (SLC7A6) .....	13
2.2.5. $b^{0,+}$ AT (SLC7A9) .....	15
2.2.6. xCT (SLC7A11) .....	15
2.2.7. asc-1 (SLC7A10) .....	15
2.2.8. asc-2 (Slc7a12) .....	16
2.2.9. AGT-1 .....	16
2.3. Aminoacidurias hereditarias .....	16
2.3.1. Cistinuria .....	16
2.3.2. Lisinuria con intolerancia a proteínas (LPI) .....	17
3. Características estructurales de los transportadores .....	18
3.1. Métodos de determinación de topología .....	21
3.1.1. Inserción de puntos de N-glicosilación .....	21
3.1.2. Accesibilidad a cisteínas mediante reactivos sulfhidrilo .....	21
3.1.3. Fusión con genes de actividad enzimática .....	21
3.1.4. Unión a epítomos de anticuerpos .....	22

3.1.5. Digestión por proteasas ....22

3.2. Hacia la estructura-función de los transportadores de la familia APC ....23

3.2.1. Relaciones de estructura-función en los miembros de la familia HAT ..... 24 |

3.2.2. Relaciones de estructura-función en otros miembros de la superfamilia APC ..... 29 |

## **Objetivos** **35**

## **Resultados** **39**

1. Identificación y caracterización del transportador humano xCT, responsable del sistema  $x_c^-$  ..... 41 |

1.1. Obtención de un nuevo cDNA ...41

1.2. Caracterización de la proteína xCT humana ..... 41 |

Localización del gen *SLC7A11* ..... 42 |

Inducción de una actividad de transporte de sistema  $x_c^-$  en oocitos de *X. laevis* ..... 42 |

Los sustratos de hxCT se transportan de forma aniónica ..... 42 |

El transportador xCT/4F2hc es un intercambiador electroneutro con una estequiometría de intercambio 1:1 .. 43 |

2. Identificación de PK y PW, dos nuevas subunidades ligeras ..... 47 |

2.1. Estudios iniciales de caracterización de la proteína de ratón PK ..... 49 |

Patrón de expresión de la proteína .. 49 |

Ensayos de transporte ..... 49 |

Inmunolocalización de PK en células HeLa ..... 50 |

Patrón de expresión de la proteína .. 50 |

Ensayos de transporte en oocitos de <i>X. laevis</i> y células HeLa .....	51
Análisis por Western blot .....	52
Inmunolocalización de PW .....	53
Expresión del concaténmero 4F2hc-PWmyc .....	54
3. Determinación de la topología de xCT e identificación de una estructura de <i>reentrant-loop</i> .....	56
3.1. Introducción .....	56
3.2. Localización de los extremos N y C-terminal de xCT .....	56
3.3. Biotinilación de cisteínas individuales de xCT .....	57
Eliminación de las cisteínas endógenas de xCT .....	57
Screening de biotinilación de cisteínas individuales .....	58
3.4. Localización de una estructura <i>reentrant loop-like</i> .....	61
Efecto de los derivados metanotiosulfonados en los mutantes de cisteína del loop intracelular 2-3 ....	62
Protección por el sustrato de la inactivación de H110C .....	63
Análisis funcional de mutantes .....	65

## **Discusión** **71**

1. Identificación de nuevos miembros de la familia LSHAT .....	73
1.1. Identificación y caracterización de xCT humano .....	73
1.2. Identificación de dos subunidades ligeras "huérfanas" .....	75
1.3. ¿Quedan nuevos miembros LSHAT por identificar? .....	77
2. Papel fisiológico de xCT .....	78
3. Topología de xCT .....	80
3.1. Modelo de 12 segmentos TM .....	80

3.2. Estructura <i>reentrant loop-like</i> en el loop citosólico IL2-3 .....	81
3.3. Implicación del residuo H110 ....	82
3.4. Implicación del residuo C327 ....	83
4. Relaciones de estructura-función .....	84
5. Próximas direcciones .....	90

## **Conclusiones** **93**

## **Materiales y Métodos** **97**

1. Herramientas bioinformáticas .....	99
1.1. Bases de datos .....	99
1.2. Análisis de secuencias .....	100
1.3. Análisis de proteínas .....	101
1.4. Otras páginas web de interés ....	102
2. Obtención y microinyección de oocitos de <i>Xenopus laevis</i> .....	102
2.1 Adquisición de ranas <i>X. laevis</i> ...	103
2.2. Condiciones de mantenimiento .	103
2.3. Alimentación .....	103
2.4. Extracción de los oocitos .....	104
2.5. Selección y mantenimiento de los oocitos .....	105
2.6. Microinyección .....	105
3. Cultivos celulares .....	106
3.1. Normas generales .....	106
3.2. Medios de cultivo .....	106
3.3. Condiciones de cultivo de células HeLa .....	106
3.3.1. Subcultivo .....	107
3.3.2. Congelación y descongelación de células .....	107
3.3.3. Detección de micoplasma ...	107
3.4. Transfección celular transitoria .	108
4. Ensayos de transporte .....	109
4.1. Ensayos de transporte en oocitos de <i>Xenopus laevis</i> .....	109
4.1.1. Entrada de sustratos .....	109
4.1.2. Salida de sustratos .....	110

4.2. Ensayos de transporte en células HeLa .....	111	7.3. Determinación de la concentración de proteínas .....	119
4.2.1. Entrada de sustratos .....	111	7.3.1. Método de Bradford (1976).	119
4.2.2. Ensayos de inhibición o de inactivación .....	112	7.3.2. Método de BCA (1951) .....	119
4.2.3. Salida de sustratos .....	112	7.4. Tratamiento con Enzimas .....	120
5. Técnicas de obtención, manipulación y detección de DNA .....	113	7.4.1. N-Glicosidasa F .....	120
5.1. Técnicas básicas generales .....	113	7.4.2. Endoglicosidasa H .....	120
5.1.1. Bacterias competentes .....	114	7.5. Ensayos de marcaje con 3-N-(maleimidilpropionil)biocitina .....	120
5.1.2. Transformación .....	114	7.6. Tratamiento con SLO .....	122
5.1.3. Recuperación del DNA plasmídico .....	114	7.7. Purificación de una His-proteína con agarosa de Ni-NTA .....	123
5.1.4. Análisis de DNA con enzimas de restricción .....	114	7.8. Electroforesis SDS-PAGE .....	123
5.1.5. Extracción de DNA con fenol-cloroformo y precipitación .....	114	7.9. Métodos de tinción de geles .....	125
5.1.6. Electroforesis en geles de agarosa .....	114	7.9.1. Tinción Coomassie Brilliant Blue .....	125
5.1.7. Purificación de fragmentos de DNA a partir de un gel de agarosa	115	7.9.2. Tinción de plata .....	125
5.1.8. Otros enzimas utilizados .....	115	7.10. Electrotransferencia .....	125
5.2. PCR .....	115	7.11. Análisis de Western blot o inmunodetección .....	126
5.3. Mutagénesis dirigida .....	115	7.12. Revelado de los geles SDS-PAGE con estreptavidina-peroxidasa .....	127
5.4. Secuenciación .....	116	7.13. Estudios de localización por inmunocitoquímica .....	127
6. Técnicas de obtención y detección de RNA .....	116	7.13.1. Inmunolocalización en cortes de oocito de <i>Xenopus laevis</i> .....	128
6.1. Transcripción <i>in vitro</i> .....	116	7.13.2. Inmunolocalización sobre células en cultivo .....	129
6.2. Electroforesis en gel de agarosa-formaldehído .....	117		
7. Técnicas de obtención, manipulación y detección de proteínas .....	117	<b><u>Apéndices</u></b> .....	<b>131</b>
7.1. Obtención de proteínas de oocitos de <i>Xenopus laevis</i> .....	117	APÉNDICE A. Constructos de DNA ..	133
7.1.1. Proteínas totales .....	117	A.1. Constructos de xCT humano ...	133
7.1.2. Proteínas de membrana .....	118	A.2. Mutantes de xCT humano .....	134
7.2. Obtención de proteínas totales de células en cultivo .....	118	A.3. Constructos de PW de ratón ....	136
		A.4. Constructos de PK de ratón .....	137
		APÉNDICE B. Soluciones generales .	139
		<b><u>Referencias Bibliográficas</u></b> .....	<b>141</b>



# Índice de Tablas y Figuras

## Introducción

---

**Tabla 1.** Sistemas de transporte de aminoácidos en mamíferos .....5

**Figura 1.** Representación de los transportadores de aminoácidos heteroméricos .....7

**Tabla 2.** Transportadores Heteroméricos de Aminoácidos (HATs) .....8

**Figura 2.** Alineamiento de las proteínas HSHAT y la O-1,6G .....9

**Figura 3.** Modelo de reabsorción renal de cistina, aminoácidos neutros y básicos ..14

**Tabla 3.** Estructuras tridimensionales de alta resolución .....19

**Figura 4.** Estructura del canal de potasio dependiente de voltaje  $K_vAP$  .....20

**Figura 5.** Árbol filogenético de la superfamilia APC .....24

**Figura 6.** Representación del dominio extracelular con homología a glucosidasas de rBAT ..... 25

**Figura 7.** Modelos propuestos para el lugar de unión al sustratos .....28

**Figura 8.** Alineamiento múltiple de 13 miembros representativos de la superfamilia APC .....31

## Resultados

---

**Figura 9.** Perfil de hidrofobicidad de hxCT .....42

**Figura 10.** Trans-estimulación de la salida de L-glutamato en presencia de sustrato extracelular .....43

**Figura 11.** Alineamiento múltiple de PK y PW con las LSHAT de ratón .....48

**Figura 12.** Distribución tisular del mRNA de PK .....49

**Figura 13.** Ensayos de transporte de PK en células HeLa .....50

**Figura 14.** Alineamiento entre PW de ratón y humana ..... 51

**Figura 15.** Distribución tisular del mRNA de PW .....52

**Figura 16.** PW disminuye el transporte inducido por rBAT en oocitos ..... 53

**Figura 17.** Expresión de PW de ratón en células HeLa .....53

**Figura 18.** PW no llega a la membrana plasmática ni con rBAT ni con 4F2hc ...54

**Figura 19.** Expresión de 4F2hcPWmyc 55

**Figura 20.** Inducción de la actividad del sistema  $x_c^-$  por his-xCT .....57

**Figura 21.** xCT mantiene una actividad parcial después de la eliminación de las cisteínas nativas .....58

**Figura 22.** Análisis cinético de xCT sin cisteínas (his-cysless) .....59

**Figura 23.** La biotilación de los residuos extracelulares no depende del tratamiento con SLO .....59

**Figura 24.** Ausencia de biotilación de los residuos transmembrana .....60

**Figura 25.** Alineamiento múltiple del IL2-3 de las LSHATs humanas que heterodimerizan con 4F2hc o rBAT .....60

**Figura 26.** Localización celular de los mutantes H110C y Y111C .....61

**Figura 27.** 4-S-CPG es un inhibidor competitivo no transportable de xCT ...62

<b>Figura 28.</b> Inactivación de H110C-cysless por los reactivos MTS .....	63
<b>Figura 29.</b> Efecto del MTSEA en la biotilación de los residuos intracelulares T102C, G109C y E116C .....	64
<b>Figura 30.</b> Inactivación del transporte inducido por H110C en presencia de MTSES 1mM .....	64
<b>Figura 31.</b> Actividad de los mutantes del residuo H110 .....	65
<b>Figura 32.</b> La especificidad de sustrato de los mutantes H110C y H110D no está alterada .....	65
<b>Figura 33.</b> Expresión en la membrana plasmática de los mutantes H110 .....	66

<b>Figura 42.</b> Estructura molecular del 3-N-(maleimidilpropionil)-biocitina .....	121
<b>Figura 43.</b> Estructura molecular de 4-S-carboxifenilglicina .....	121
<b>Figura 44.</b> Estructura molecular de los reactivos MTS .....	122

## Discusión

---

<b>Figura 34.</b> Árbol filogenético de la familia LSHAT .....	76
<b>Figura 35.</b> Modelo del ciclo cistina/cisteína .....	79
<b>Figura 36.</b> Modelo topológico de xCT humano .....	81
<b>Figura 37.</b> Dominio transmembrana 8 en tres familias APC diferentes .....	85
<b>Figura 38.</b> Alineamiento múltiple del IL2-3 en miembros de la familia APC .....	87
<b>Tabla 4.</b> Correlación sustrato-residuo ...	88
<b>Figura 39.</b> Acceso extracelular a los residuos I354C y L355C .....	90
<b>Figura 40.</b> Modelo de topología de xCT con dos <i>reentrants loops</i> .....	90

## Materiales y Métodos

---

<b>Figura 41.</b> Manipulación de los oocitos de <i>X. laevis</i> .....	105
---	-----



## Abreviaturas

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*

$b^{0,+}$ AT: *system  $b^{0,+}$  amino Acid Transporter*

BM: 3-(N-maleimidilpropionil)biocitina

CAR: *Consensus Amphipatic Region*

CssC: L-cistina

DEM: Dietilmaleato

DMSO: dimetilsulfóxido

DTT: ditrioteitol

ELx-y: loop extracelular entre los dominios transmembrana x e y

EST: *Expressed Sequence Tag*

GABP: *γ-aminobutiric acid permease*

gpaATs: *glycoprotein-associated Amino acid Transporters*

GSH: glutatión

HAT: *Heteromeric Amino acid Transporter*

HSHAT: *Heavy Subunit Heteromeric Amino acid Transporter*

hxCT: human xCT

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

kDa: kilo Dalton

$K_m$ : constante de Michaelis Menten ( $K_{0,5}$ )

LAT-1: *system L Amino acid Transporter-1*

LAT-2: *system L Amino acid Transporter-2*

LPI: *Lisinuric Protein Intolerance*

LSB: *Laemmli Sumple Buffer*

LSHAT: *Light Subunit Heteromeric Amino Acid Transporter*

MTS: reactivos metanotiosulfonados

MTSEA: (2-aminoetil)metanotiosulfonato

MTSES: [sodio(2-sulfonatoetil)metanotiosulfonato]

MTSET: (2-trimetilamonioetil)metanotiosulfonato

NEM: N-etilmaleimida

PA: fosfatasa alcalina

PAGE: *PolyAmide Gel Electrophoresis*

PBS: *Phosphate Buffer Saline*

pCMB: p-cloromercuriobenzoato

pCMBS: p-cloromercuribenzenosulfonato

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

4F2hc: cadena pesada del antígeno de superficie 4F2

RT: *Room Temperature*

RT-PCR: *Retro-Transcriptase Polymerase Chain Reaction*

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

SLO: Streptolisina O

TM: dominio transmembrana

3D: tridimensional

xCT: *system  $x_c^-$  amino acid Transporter*

$y^+$ LAT-1: *system  $y^+$ L Amino acid Transporter-1*

$y^+$ LAT-2: *system  $y^+$ L Amino acid Transporter-2*



# **Introducción**



La memoria de esta tesis recoge los resultados obtenidos de la caracterización funcional y estructural del transportador de aminoácidos humano xCT, responsable del sistema de transporte conocido como sistema x<sub>c</sub><sup>-</sup>. El trabajo pretende ser, en su medida, una aportación al conocimiento de la familia de transportadores de aminoácidos heteroméricos.

## 1. Sistemas de transporte de aminoácidos en mamíferos

Los aminoácidos son esenciales para la supervivencia celular: intervienen en la síntesis de proteínas, la regulación del metabolismo, el crecimiento celular, la regulación del volumen celular y la producción de energía metabólica, entre otros. El paso de los aminoácidos a través del dominio hidrofóbico de la membrana plasmática está mediado por unas proteínas llamadas transportadores que reconocen, unen y transportan estos aminoácidos desde el medio extracelular al interior de la célula, o viceversa.

En el organismo, el transporte de aminoácidos desempeña una función integral de flujo nutricional entre órganos (Christensen, 1990). El epitelio intestinal capta los aminoácidos ingeridos por la dieta, se liberan a la sangre y desde allí, se re-captan en los distintos órganos y tejidos, como el hígado y el músculo esquelético, y finalmente, se reabsorben de la orina a lo largo de la nefrona renal. En el sistema nervioso central, los transportadores de aminoácidos regulan el paso de los mismos a través de la barrera hematoencefálica (*Blood Brain Barrier*) y son importantes para el suministro metabólico de astrocitos y neuronas. También intervienen en su re-captación de la sinapsis nerviosa, donde algunos aminoácidos como el glutamato, la glicina o el aspartato, actúan de neurotransmisores. En la placenta, los transportadores de aminoácidos suministran nutrientes provenientes de la sangre materna a la sangre fetal y ayudan a detoxificarla.

A partir de los trabajos pioneros del grupo de H.N. Christensen a principios de los años sesenta, revisado en (Christensen, 1990), se identificaron diferentes sistemas de transporte de aminoácidos para mamíferos con especificidades de sustrato amplias (diferentes aminoácidos comparten el mismo sistema de transporte) y solapadas (un mismo aminoácido puede ser transportado por varios sistemas). Esta disposición permite, por un lado, una fina regulación del flujo de aminoácidos tanto a nivel celular como entre órganos y, por otro, una economía de estructuras mediando dichos flujos (Christensen, 1990).

La clasificación de los diferentes sistemas de transporte se hizo siguiendo criterios de funcionalidad: i) tipo de aminoácido transportado y ii) 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 (Bannai et al., 1984). 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) que permitieron hacer búsquedas por homología de secuencia, llevaron a la identificación de un gran número de transportadores de aminoácidos. Su caracterización funcional en sistemas de expresión heterólogos permitió asociarlos a los sistemas de transporte descritos previamente, intentando mantener la nomenclatura adoptada para el sistema correspondiente (Christensen et al., 1994).

Estos nuevos avances modificaron alguno de los conceptos anteriormente desarrollados por Crane (Crane, 1965) y Christensen (Christensen, 1966): i) el mecanismo antiporter predomina en el transporte de aminoácidos y es esencial para el transporte vectorial a través del epitelio; ii) otros gradientes electroquímicos, a parte del sodio, dirigen el transporte o contribuyen en él; 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).

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

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

a) Transportadores de alta capacidad de acumulación (EAAT, transportadores acoplados a  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ): es el caso de los transportadores de neurotransmisores (sistema  $\text{X}_{\text{AG}}^-$ , sistema Gly), que capturan el exceso de neurotransmisor liberado para evitar su excitotoxicidad; los transportadores de osmolitos (sistema  $\beta$ ), que mantienen altas concentraciones de gradiente de sustratos en el riñón; o los transportadores apicales que median la reabsorción de aminoácidos en el epitelio (sistema  $\text{B}^{0,+}$ ).

b) Transportadores de débil capacidad de acumulación (ATA, SN, CAT, TAT): son transportadores asociados al cotransporte de  $\text{Na}^+$  o  $\text{H}^+$ , o bien uniporters. Parecen implicados en mantener altas las concentraciones citosólicas de aminoácidos no esenciales (sistema A, sistema N) para permitir posteriormente la entrada de aminoácidos esenciales por otros transportadores (intercambiadores). La abundancia de uniporters (sistema  $\text{y}^+$ , sistema T) es muy baja debido, quizás, a ser un mecanismo que no protege a la célula de la pérdida de metabolitos importantes ya que cambios en el contenido de aminoácidos en el plasma se trasladan al contenido intracelular.

c) Antiporters o intercambiadores (LAT,  $\text{y}^+\text{LAT}$ ,  $\text{xCT}$ ,  $\text{b}^{0,+}\text{AT}$ ): constituyen la gran mayoría de los transportadores de aminoácidos en mamíferos. Preferentemente, intercambian aminoácidos no esenciales por aminoácidos esenciales. Permiten generar asimetrías, clave para el flujo vectorial de aminoácidos. Un ejemplo es la reabsorción de aminoácidos en el riñón (sistema

$\text{b}^{0,+}$ , sistema L, sistema  $\text{y}^+\text{L}$ ). Dentro de este grupo se encuentran los transportadores heteroméricos de aminoácidos, objeto de estudio del grupo de investigación en el que se ha realizado esta tesis (apartado 2 de la Introducción).

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

Parte de esta tesis está dedicada a la caracterización funcional de la proteína responsable del sistema de transporte  $\text{x}_c^-$ . Por este motivo, a continuación, se describe este sistema en particular.

## 1.2. Sistema $\text{x}_c^-$

El sistema  $\text{x}_c^-$  fue caracterizado por primera vez en el año 1980 por S. Bannai (Bannai and Kitamura, 1980). Estudiando la captación de cistina en fibroblastos diploides humanos (IMR-90) en cultivo, demostraron la existencia de un sistema de transporte común para L-cistina y L-glutamato de tipo sodio-independiente. Las observaciones que apoyaban esta afirmación eran: i) la captación de ambos sustratos era mutuamente competitiva; ii) la  $K_m$  de captación para L-cistina era 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 inhibían la captación de L-cistina también lo hacían en la misma medida para el L-glutamato. Este nuevo sistema de transporte, altamente específico para cistina y glutamato, fue inicialmente designado sistema CG pero, atendiendo a criterios de nomenclatura, pasó a conocerse como sistema  $\text{x}_c^-$  (Makowske and Christensen, 1982b).

**Tabla 1. Sistemas de transporte de aminoácidos en mamíferos**

Sistema de transporte	Isoformas (cDNAs clonados)	Mecanismo	Sustratos
A	ATA1 ATA2 ATA3	Cotransporte 1Na <sup>+</sup> /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 <sup>+</sup> - dependiente	Ala, Ser, Cys Ala, Ser, Cys, Thr, Gln
b <sup>0,+</sup>	b <sup>0,+</sup> AT/rBAT	Antiporte	Lys, Arg, Ala, Ser, Cys, Thr, Asn, Gln, His, Met, Ile, Val, Phe, Tyr, Trp, Cys <sup>-</sup>
B <sup>0</sup>	B <sup>0</sup> AT-1	Cotransporte 2Na <sup>+</sup> /AA	Leu, Ile, Gln, Phe, Ala, Pro, Cys, Val, Met, Ser, Asn, (His, Gly, Thr, Trp, Tyr)
B <sup>0,-</sup>	ATB <sup>0,+</sup>	Cotransporte 2Na <sup>+</sup> /1Cl <sup>-</sup> /AA	Ala, Ser, Cys, His, Met, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Trp, (Lys, Arg, Thr, Asn, Gln)
β (BETA)	GAT1 GAT2 GAT3 GAT4	Cotransporte 2-3Na <sup>+</sup> /1Cl <sup>-</sup> /AA	GABA GABA, betaína, Pro, β-Ala GABA, betaína, taurina GABA, betaína
Gly	GlyT1 GlyT2	Cotransporte 2-3Na <sup>+</sup> /1Cl <sup>-</sup> /AA	Gly Gly
IMINO	PAT1 PAT2 PAT3 (?)	Cotransporte 1H <sup>+</sup> /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 <sup>+</sup> /AA acoplado a H <sup>+</sup> -antiporte	Gln, Asn, His Gln, Asn, His, Ser, Gly
T	TAT1	Uniporte	Phe, Tyr, Trp,
X <sup>AG</sup>	EAAT1 EAAT2 (GLT1) EAAT3 EAAT4 EAAT5	Cotransporte 3Na <sup>+</sup> /1H <sup>+</sup> /AA acoplado a K <sup>+</sup> -antiporte	Glu, Asp Glu, Asp Glu, Asp, Cys Glu, Asp Glu, Asp
x <sub>c</sub> <sup>-</sup>	xCT/4F2hc	Antiporte	Glu, Cys <sup>-</sup> , (Asp)
y <sup>+</sup>	CAT-1 CAT-2A/B CAT-3 CAT-4 (?)	Uniporte	Arg, Lys, His, O Arg, Lys, His, O Arg, Lys ?
y <sup>+L</sup>	y <sup>+</sup> LAT-1/4F2hc y <sup>+</sup> LAT-2/4F2hc	Antiporte 1Na <sup>+</sup> /AA	Lys, Arg, Gln, His, Met, Leu Lys, Arg, Gln, His, Met, Leu, Ala, Cys

Los aminoácidos sustratos se presentan en código de tres letras (Cys<sup>-</sup>: 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 and Wagner, 2002).

Trabajos posteriores demostraron que la cistina era transportada de forma aniónica (Bannai, 1984b) y que el sistema  $x_c^-$  no dependía del potencial de membrana (Guidotti et al., 1984). 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 asoció el sistema  $x_c^-$  con la regulación de la síntesis de glutatión y el estrés oxidativo. En esta dirección se han publicado numerosos trabajos (Sato et al., 1998; Sato et al., 1995a; Sato et al., 1995b; Sagara et al., 1993a; Ishii et al., 1992; Bannai et al., 1989; Bannai et al., 1986; Bannai, 1984a) que demuestran para diferentes células (fibroblastos, células neuronales y de la glia, macrófagos, células pancreáticas y hepatocitos) que la actividad  $x_c^-$  es inducida por agentes que reducen el glutatión intracelular, como el oxígeno (Bannai et al., 1989) y los agentes electrofílicos (Bannai et al., 1986; Bannai, 1984a), por lipopolisacáridos (LPS) (Sato et al., 1995a; Sato et al., 1995b) y por la depleción de cistina.

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 Chillarón et al., 2001). Las características funcionales y estructurales del transportador xCT se describen en los capítulos Resultados y Discusión de esta memoria.

## 2. Familia de transportadores heteroméricos de aminoácidos (HATs)

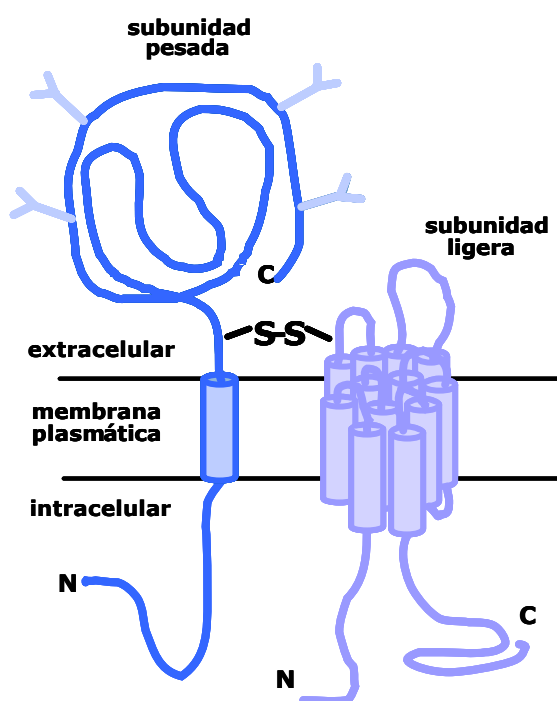
Los transportadores de aminoácidos se clasifican en familias en función de su homología de secuencia y de sus propiedades funcionales, como la especificidad de sustrato, el mecanismo de transporte y el acoplamiento a iones. Una de estas familias posee la característica única de tener estructura heteromérica (*Heteromeric Amino acid Transporter*, HAT): la unidad funcional está compuesta, al menos, por una subunidad pesada (*Heavy Subunit Heteromeric Amino acid Transporter*, HSHAT) y una subunidad ligera (*Light Subunit Heteromeric Amino acid Transporter*, LSHAT) unidas por un puente disulfuro conservado entre los miembros de la familia (Verrey et al., 2004; Chillarón et al., 2001; Wagner et al., 2001) (Figura 1). Algunos de estos miembros están directamente relacionados con aminoacidurias hereditarias (apartado 2.3.).

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

En la Tabla 2 se presentan los miembros 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 se llaman utilizando la raíz SLC (de *SoLute Carrier*), seguido de un numeral correspondiente a la familia “genética” a la que pertenece, la letra A, que actúa de separador, y finalmente el número del transportador (Hediger et al., 2004). Las subunidades pesadas pertenecen a la familia SLC3 mientras que las subunidades ligeras pertenecen a la familia SLC7.



**Figura 1. Representación esquemática de los transportadores heteroméricos de aminoácidos (familia HAT).** La subunidad pesada (HSHAT) está unida por un puente disulfuro (S-S) a la subunidad ligera (LSHAT). Las cisteínas implicadas en este puente disulfuro se localizan extracelularmente, después del segmento *trans*-membrana de la subunidad pesada y en el segundo putativo segmento transmembrana de la subunidad ligera. Existen otras interacciones no covalentes entre las dos subunidades, todavía por determinar. El dominio extracelular de la HSHAT es homólogo a glucosidasas. Y indica punto de glicosilación. La disposición de los 12 putativos segmentos TM de la LSHAT es figurativa. Los dominios *trans*-membrana y los *loops* citosólicos y extracelulares no están dibujados a escala.

## 2.1. Subunidades pesadas (HSHATs)

Sólo dos miembros constituyen las subunidades pesadas de la familia: rBAT (*related to b<sup>0+</sup> Amino acid Transporter*) y 4F2hc (*heavy chain of the surface antigen 4F2 or CD98*) (Tabla 2). Presentan una identidad de secuencia de proteína ~27% y comparten características estructurales y funcionales: i) son proteínas de membrana de tipo II; ii) están N-glicosiladas; iii) los algoritmos de hidrofobicidad predicen un único dominio transmembrana, con el extremo N-terminal intracelular (demostrado para 4F2hc en Fenczik et al., 2001); iv) el residuo de cisteína que participa en la formación del puente disulfuro se encuentra a 4-5 posiciones del extremo del dominio transmembrana en dirección al extremo C-terminal; y v) presentan un voluminoso dominio C-terminal extracelular con significativa homología de secuencia con  $\alpha$ -amilasas; entre éstas, maltasas de insectos ( $\alpha$ -glucosidasas) y sus precursores (35-40% de identidad de secuencia aminoacídica) y  $\alpha$ -glucosidasas bacterianas (~30% de identidad).

La familia de las  $\alpha$ -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  $\beta$  y  $\alpha$  alternadas); ii) un pequeño subdominio o dominio B de unión a calcio que interrumpe el *TIM-barrel* sobresaliendo entre la tercera cadena  $\beta$  y la tercera hélice  $\alpha$ ; y iii) un dominio C para el extremo C-terminal en estructura de láminas  $\beta$  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 2 se muestra el alineamiento de O1,6G con las proteínas humanas

**Tabla 2. Transportadores Heteroméricos de Aminoácidos (HATs)**

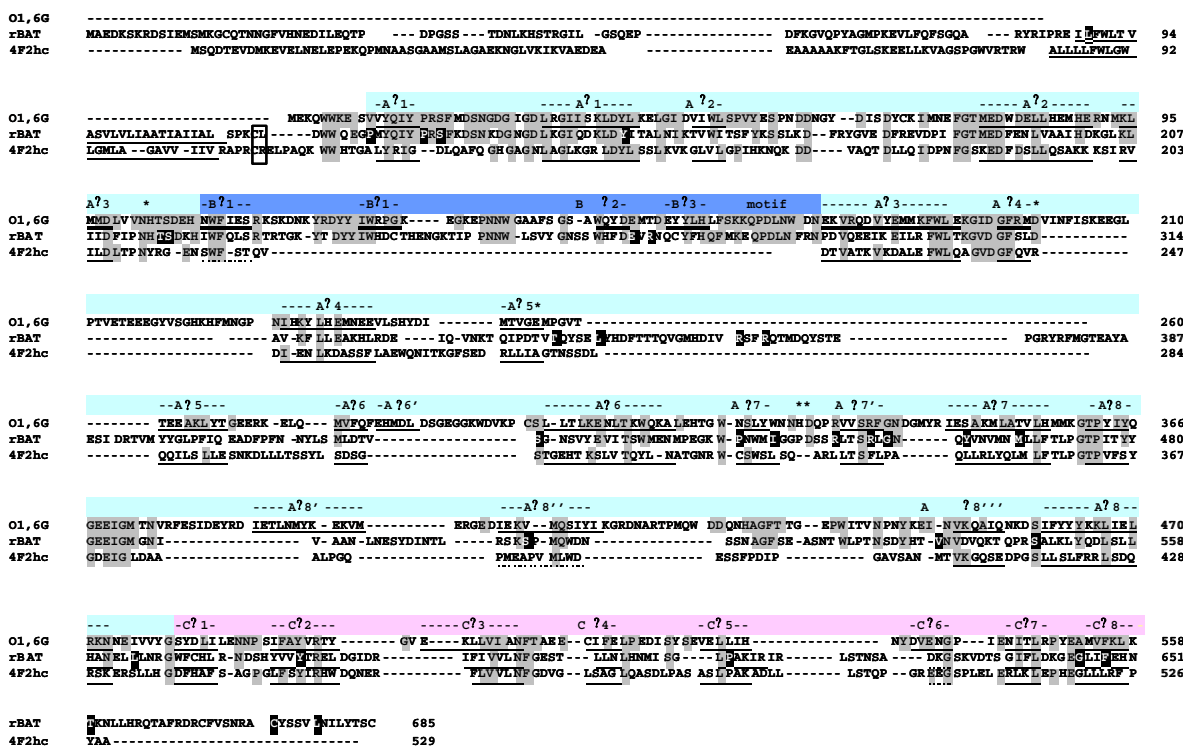
Subunidad pesada (HSHAT)	Subunidad ligera (LSHAT)	Nomenclatura HUGO	Sistema de transporte	Cromosoma humano	Enfermedad asociada
4F2hc (CD98hc)		<i>SLC3A2</i>		11q13	
	LAT-1	<i>SLC7A5</i>	L	16q24.3	
	LAT-2	<i>SLC7A8</i>	L	14q11.2	
	y <sup>+</sup> LAT-1	<i>SLC7A7</i>	y <sup>+</sup> L	14q11.2	LPI
	y <sup>+</sup> LAT-2	<i>SLC7A6</i>	y <sup>+</sup> L	16q22.1	
	asc-1	<i>SLC7A10</i>	asc	19q12-13	
	xCT	<i>SLC7A11</i>	x <sub>c</sub> <sup>-</sup>	4q28-q32	
rBAT		<i>SLC3A1</i>		2p16.3-21	Cistinuria Tipo A
	b <sup>0,+</sup> AT	<i>SLC7A9</i>	b <sup>0,+</sup>	19q12-13	Cistinuria Tipo B
?	AGT-1		-	8q21.3	
	asc-2	<i>Slc7a12</i>	asc	-	
	APAT <sup>(a)</sup>	-	-	-	

(?) no identificado; (-) no descrito; (a) la subunidad ligera APAT todavía no ha sido publicada (E. Fernández, J. Chillarón y M. Palacín, manuscrito en preparación). Adaptada de (Chillarón et al., 2001).

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. Podemos observar 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 a4 y a7 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 glucosil-hidrolasas. Tres de estos residuos (D199, D329 y H105 en O1,6G) pueden localizarse en rBAT (en las versiones de mamífero) pero no es el caso para 4F2hc. De acuerdo con esto, Wells y sus colaboradores (Wells et al., 1992) no observaron actividad a-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 las proteínas 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  $\alpha$ - $\beta$ ; iv) el dominio C, correspondiente al extremo C-terminal, con su estructura de  $\beta$ -barrel con 8 láminas  $\beta$  antiparalelas, se conserva en todas las HSHATs. Sin embargo, se encuentra lejos del centro activo y su función es desconocida; y v) los últimos 30 aminoácidos de rBAT no se alinean con las  $\alpha$ -amilasas.

El papel fisiológico 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 (Figura 1), aunque la eliminación de este puente por sustitución a serina de una de las cisteínas implicadas, no altera la expresión del heterodímero en la membrana plasmática. Esto sugiere la importancia de otras interacciones no covalentes entre ambas



**Figura 2. Alineamiento de las proteínas HSHAT y la oligo-1,6-glucosidasa (O1,6G).** El alineamiento de las secuencias de rBAT y 4F2hc humano y O1,6G de *Bacillus cereus* se realizó inicialmente con el programa *tcoffee*, las zonas de secuencia más problemáticas (entre Ab4 y Ab8) se alinearon con el programa FUGUE y finalmente por el alineamiento de estructuras secundarias predichas con el programa Jpred. Los elementos principales de la estructura secundaria de O1,6G están indicados en la parte superior de la secuencia cuyos residuos están subrayados (a, a-hélice; β, lámina β) en los tres dominios de la proteína: (A, en color azul pálido) *TIM* *barrel*; (B, en color azul) dominio de unión a calcio; (C, en color rosa) dominio de láminas β antiparalelas. Las estructuras secundarias también están predichas para rBAT y 4F2hc (residuos subrayados) con el programa Jpred. Los residuos conservados en O1,6G están sombreados en color gris. Los residuos afectados por mutaciones puntuales en pacientes cistinúricos en rBAT están sombreados en negro sobre letra blanca. El residuo de cisteína conservado en HSHAT está dentro de un cuadrado y el dominio *trans*-membrana putativo está subrayado en color negro. Los asteriscos indican los residuos de O1,6G que posiblemente están implicados en la catálisis del enzima. Adaptado de (Chillarón et al., 2001) y cedido por E. Fernández (Tesis Doctoral, 2003).

subunidades (Jiménez-Vidal et al., 2004; Estévez et al., 1998; Pfeiffer et al., 1998).

### 2.1.1. rBAT (*SLC3A1*)

La proteína rBAT fue el primer miembro clonado de la familia HAT. Se identificó en 1992 por expresión funcional en oocitos de *Xenopus laevis* (Wells and Hediger, 1992; Tate et al., 1992; Bertran et al., 1992b), donde inducía un transporte de aminoácidos similar al descrito anteriormente en blastocitos de ratón como sistema  $b^{0,+}$  (Van Winkle et al., 1988): transporte de cistina y aminoácidos dibásicos y zwitteriónicos de tipo sodio-independiente.

El patrón de expresión del gen revela que rBAT se expresa fundamentalmente en riñón e intestino delgado, aunque también se ha detectado su mRNA en hígado, páncreas y cerebro (Bertran et al., 1993; Lee et al., 1993; Wells and Hediger, 1992; Tate et al., 1992; Bertran et al., 1992b). En estos tejidos se detectaron dos transcritos de 2.3 kb (correspondiente al cDNA descrito) y 4 kb debido a una poliadenilación alternativa (Markovich et al., 1993). Por estudios de inmunolocalización, la proteína se encuentra en la membrana apical de las células epiteliales de la mucosa intestinal y del túbulo renal proximal (Furriols et al., 1993; Pickel et al., 1993), aunque en este último existe un gradiente creciente de expresión desde el segmento

S1 al segmento S3 (revisado en Wagner *et al.*, 2001).

Por su función de transporte y patrón de expresión, rBAT se relacionó con la enfermedad hereditaria cistinuria, provocada por un defecto en la reabsorción de cistina y aminoácidos dibásicos (revisado en Palacín *et al.*, 2001b; Palacín *et al.*, 2000) (apartado 2.3.1.). Efectivamente, se encontraron mutaciones en el gen *SLC3A1* causantes de cistinuria de tipo I (Calonge *et al.*, 1995; Calonge *et al.*, 1994). Hasta el momento se han identificado más de 60 mutaciones de cistinuria en rBAT (revisado en Palacín *et al.*, 2001b).

### 2.1.2. 4F2hc (*SLC3A2*)

El cDNA de 4F2hc fue clonado usando un anticuerpo monoclonal diseñado contra un antígeno de superficie de células de limfoblastoma (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 testar si 4F2hc inducía alguna actividad de transporte en oocitos de *Xenopus*. La expresión de 4F2hc provocó la inducción de una actividad de transporte diferente a la inducida por rBAT pero parecida a la descrita en eritrocitos como sistema  $y^+L$  (Wells and Hediger, 1992; Bertran *et al.*, 1992a): transporte de alta afinidad para aminoácidos L-dibásicos de tipo sodio-independiente pero de alta afinidad para aminoácidos zwitteriónicos en presencia de sodio (revisado en Palacín *et al.*, 1998).

4F2hc se expresa de forma ubicua en ratón, con un mayor nivel de expresión en testículo, pulmón, riñón, cerebro y bazo y sin un patrón claro de regulación durante el desarrollo, además de encontrarse en todas las células y líneas celulares tumorales (Nakamura *et al.*, 1999; Parmacek *et al.*, 1989). En las células epiteliales, la proteína se encuentra en la membrana baso-lateral y, en concreto, su localización en riñón humano y de ratón se limita a la zona del túbulo proximal contorneado (Rossier *et al.*, 1999; Quackenbush *et al.*, 1987).

Además de su implicación en la función de transporte, 4F2hc está implicado en funciones de activación celular, proliferación, adhesión, fusión y diferenciación celular (revisado en Chillarón *et al.*, 2001; Devés and Boyd, 2000). También se ha descrito como proteína reguladora de la activación de integrinas e involucrada en la señalización celular (Fenczik *et al.*, 2001).

Distintas evidencias apuntaban a la posibilidad de que rBAT y 4F2hc fueran componentes de un transportador heteromérico: i) son proteínas poco hidrofóbicas para poder constituir un poro de paso de sustratos a través de la membrana; ii) estudios de Western blot para rBAT en condiciones no reductoras revelan un complejo de alto peso molecular (250 kDa y 125 kDa) que pasa a ser de 90 kDa en condiciones reductoras; iii) el antígeno 4F2 forma parte de un heterodímero constituido por una proteína glicosilada de 85 kDa (4F2hc) unida por un puente disulfuro a una proteína de unos 40 kDa, altamente hidrofóbica y no glicosilada (Quackenbush *et al.*, 1987; Teixeira *et al.*, 1987; Haynes *et al.*, 1981); iv) experimentos de transfección de rBAT en células COS inducen la expresión de la proteína pero ésta no llega a la membrana, sugiriendo la necesidad de otra proteína para que se exprese en superficie (Palacín *et al.*, 1996); v) el transporte inducido por 4F2hc en oocitos de *Xenopus* es saturable mientras la cantidad de 4F2hc en superficie aumenta con los días de expresión, sugiriendo su unión a una proteína endógena del oocito que es limitante (Estévez *et al.*, 1998); y vi) la incubación con reactivos mercuriales impermeables a la membrana plasmática de oocitos inyectados con 4F2hc prácticamente inactivan la actividad de transporte  $y^+L$  que induce 4F2hc. Este efecto podía revertirse con  $\beta$ -mercaptoetanol, indicando que la diana de inactivación se trataba de una/s cisteína/s extracelular/es. Por estudios de mutantes de las 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 (Estévez *et al.*, 1998).

Pronto se confirmaron las hipótesis y 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, es el primer miembro identificado de la familia de Subunidades Ligeras de Transportadores Heteroméricos de Aminoácidos.

## 2.2. Subunidades ligeras (LSHATs)

Las subunidades ligeras de la familia HAT pertenecen a una gran superfamilia conocida con el nombre de transportadores APC (Amino acid/Polyamine/Choline), que incluye más de 175 miembros tanto eucariotas como procariontes (Jack et al., 2000).

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, y<sup>+</sup>LAT-1, y<sup>+</sup>LAT-2, asc-1, xCT), una de ellas se une a rBAT (b<sup>0,+</sup>AT) y existen dos miembros “huérfanos” (asc-2, AGT-1), que no interactúan con las subunidades pesadas descritas y que quizás se unen a una posible subunidad pesada todavía por identificar (Tabla 2). Por trabajos en nuestro grupo, en breve se conocerá un nuevo miembro de la familia (E. Fernández y J. Chillarón, manuscrito en preparación). La asociación de estas proteínas con glicoproteínas de membrana de tipo II (HSHATs) hace que también se las conozca con el nombre gpaATs (*glycoprotein-associated Amino acid Transporters*).

Las diferentes LSHAT (excepto asc-2 y AGT-1, con identidades del 23-29%) mantienen identidades de secuencia aminoacídica que oscilan entre el 39 y 70% entre parálogos y entre el 85 y 98% entre ortólogos de mamífero (revisado en Verrey et al., 2004; Chillarón et al., 2001; Wagner et al., 2001). Presentan características estructurales y funcionales comunes: i) son proteínas altamente hidrofóbicas que no se glicosilan (demostrado para LAT-1 y b<sup>0,+</sup>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, las subunidades ligeras presentan una predicción de estructura de 12 segmentos transmembrana, con extremos N y C-terminal intracelulares, acorde con su función de transportador (la demostración experimental de este modelo de topología ha sido abordada durante el transcurso de esta tesis y se presenta en los capítulos Resultados y Discusión); iii) las LSHAT se unen con la correspondiente HSHAT mediante un puente disulfuro en el que interviene el residuo de cisteína conservado que se encuentra localizado en el dominio extracelular putativo II (y el residuo ya descrito en las HSHATs); iv) los miembros LSHAT necesitan la coexpresión de su correspondiente HSHAT para alcanzar la membrana plasmática en un sistema de expresión heterólogo (Chillarón et al., 2001), aunque no es necesario que ambas se mantengan unidas por el puente disulfuro ya que otras interacciones no covalentes son suficientes para localizar el heterodímero en la membrana (Nakamura et al., 1999; Pfeiffer et al., 1998); v) las LSHAT confieren la especificidad de transporte al complejo heteromérico, representando una gran diversidad de sustratos y acoplamiento a iones: aminoácidos neutros de tamaño grande (LAT-1, LAT-2) (Rajan et al., 2000b; Pineda et al., 1999; Rossier et al., 1999; Segawa et al., 1999), pequeño (asc-1, LAT-2) (Fukasawa et al., 2000), cargados negativamente (xCT) (descrito en Resultados y Discusión) y aminoácidos básicos y neutros (y<sup>+</sup>LAT-1, y<sup>+</sup>LAT-2 y b<sup>0,+</sup>AT) (Kanai et al., 2000; Chairoungdua et al., 1999; Feliubadaló et al., 1999; Pfeiffer et al., 1999a; 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, que se comporta como un intercambiador no obligatorio (Pineda et al., 2004a; Nakauchi et al., 2000); y vii) la subunidad ligera es capaz de mediar el transporte

en ausencia de la subunidad pesada si conseguimos expresarla en superficie, como ocurre en un sistema reconstituido (Reig *et al.*, 2002).

### 2.2.1. LAT-1 (*SLC7A5*)

LAT-1 es el primer miembro identificado de la familia de subunidades ligeras, inicialmente denominada ASUR4, clonada por expresión funcional en oocitos de *X. laevis* a partir de una librería de cDNAs obtenido de células A6 de riñón después de un tratamiento con aldosterona (Mastroberardino *et al.*, 1998). Paralelamente, el grupo de Kanai aisló un cDNA de una librería de células de glioma C6 de rata por 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 expresaba con 4F2hc (Mastroberardino *et al.*, 1998; Kanai *et al.*, 1998).

Esperable para una proteína asociada al sistema de transporte de tipo L (Christensen, 1990; Oxender and Christensen, 1963), su actividad es cloro y sodio-independiente e inhibible por el ácido 2-(-)-endoamino-bicicloheptano-2-carboxílico (BCH). No es inhibible, sin embargo, 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 (Meier *et al.*, 2002; Mastroberardino *et al.*, 1998; Kanai *et al.*, 1998).

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 (Verrey, 2003; Meier *et al.*, 2002).

LAT-1, en tejidos adultos, se expresa en cerebro (en la barrera hematoencefálica), placenta y ovario y, con menor medida, en pulmón, timo, testículos, piel, hígado, músculo esquelético y estómago (Nakamura *et al.*, 1999; Prasad *et al.*, 1999; Kanai *et al.*, 1998). LAT-1 también se expresa en muchas líneas celulares tumorales, en células en proliferación y en tumores primarios humanos (Yanagida *et al.*, 2001; Wolf *et al.*, 1996). Este hecho ha señalado a LAT-1 como un 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 drogas relacionadas con los aminoácidos, como puede ser la L-Dopa, hormonas tiroideas, gabapentina, melfalan o conjugados de cisteína, revisado en (Kanai and Endou, 2001).

### 2.2.2. LAT-2 (*SLC7A8*)

LAT-2 fue identificado en nuestro grupo por homología de secuencia y se caracterizó funcionalmente en oocitos de *Xenopus* (Pineda *et al.*, 1999). LAT-2, en asociación con 4F2hc, también media un transporte de tipo L pero incluso con un rango de selectividad de sustratos todavía mayor que LAT-1 ya que incluye los

aminoácidos neutros pequeños (Pineda *et al.*, 1999; Rossier *et al.*, 1999). Se expresa fundamentalmente en la membrana basolateral del túbulo proximal renal (decreciendo de S1 a S3) e intestino delgado (Bauch *et al.*, 2003; Rossier *et al.*, 1999).

Funcionalmente, LAT-2 intercambia aminoácidos neutros a través de la membrana basolateral equilibrando sus concentraciones relativas. De manera similar a LAT-1, LAT-2 también presenta una afinidad aparente mucho menor por los aminoácidos intracelulares que por los extracelulares (a excepción de la glicina). En conjunto, podemos decir que LAT-2 participa en una ruta de eflujo basolateral unidireccional de determinados aminoácidos neutros. Es un eficiente exportador de L-cisteína (Fernández *et al.*, 2003; Meier *et al.*, 2002), un aminoácido que se importa a las células del túbulo proximal renal como L-cistina, mayoritariamente vía el transportador  $b^{0,+}AT/rBAT$  (apartado 2.2.5.) (defectivo en cistinuria). El papel de LAT-2 /4F2hc en el eflujo basolateral de L-cisteína ha sido demostrado recientemente por un trabajo en nuestro grupo en un modelo de células renales polarizadas (OK, *Opossum Kidney cells*) (Fernández *et al.*, 2003) (Figura 3). Esto implica que LAT2-4F2hc, al sacar L-cisteína proveniente de la reducción de L-cistina intracelular, tiene una función clave en el flujo *trans*-epitelial de cistina y sugiere que *SLC7A8* podría ser un gen modulador de la reabsorción renal de cistina (Fernández *et al.*, 2003). Se está estudiando la asociación entre el grado de hiperexcreción de aminoácidos en orina y polimorfismos de LAT-2 en población normal y en pacientes de cistinuria y sus familiares.

### 2.2.3. $y^+LAT-1$ (*SLC7A7*)

El cDNA de  $y^+LAT-1$  fue identificado por homología de secuencia a LAT-1 (52%) y cuando se co-expresaba con 4F2hc en oocitos de *X. laevis* inducía 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  $y^+LAT-1/4F2hc$  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, esta vez 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  $y^+LAT-1$  en riñón e intestino delgado, sugirió que éste podía ser el transportador defectivo en la enfermedad hereditaria Lisinuria con Intolerancia a Proteínas (LPI). De hecho, se han encontrado mutaciones en el gen *SLC7A7* de pacientes con esta enfermedad (Borsani *et al.*, 1999; Torrents *et al.*, 1999), como se describe en el apartado 2.3.2. de esta Introducción.

Experimentos posteriores confirmaron la localización basolateral del transportador en células del túbulo proximal renal y del intestino delgado siguiendo un gradiente axial decreciente a lo largo del túbulo proximal (Bauch *et al.*, 2003), de forma parecida a LAT-2 y  $b^{0,+}AT$  (Rossier *et al.*, 1999; Pfeiffer *et al.*, 1999b) (Figura 3).

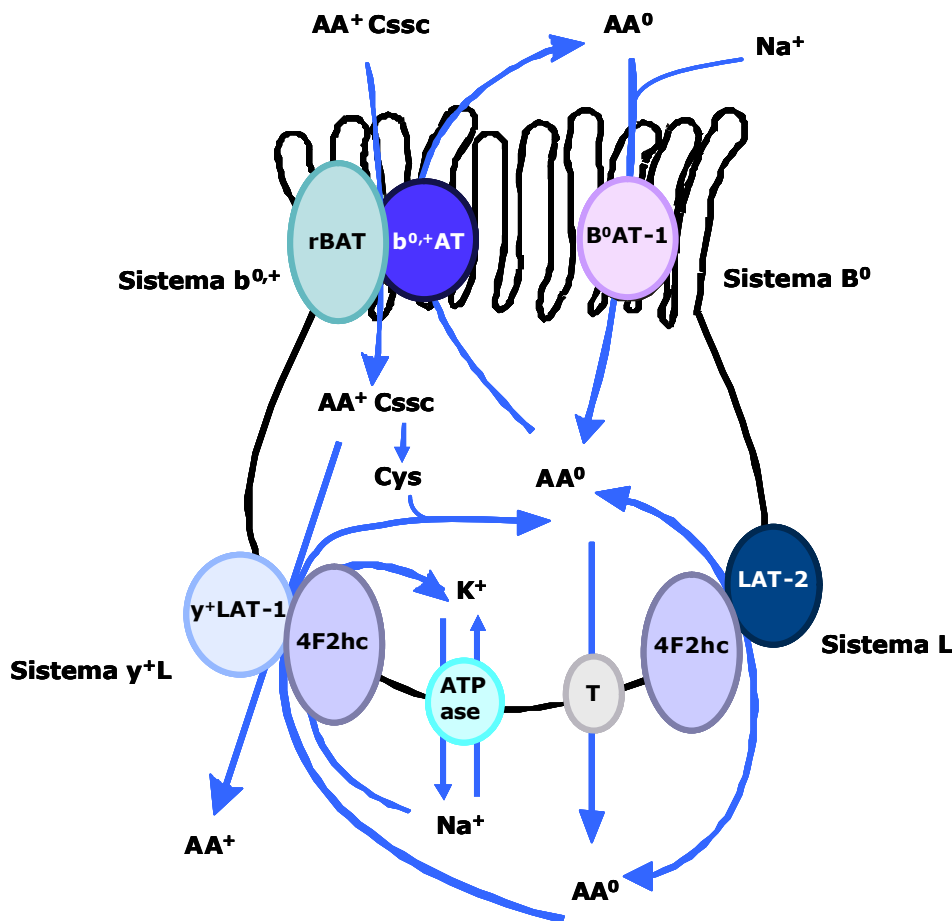
### 2.2.4. $y^+LAT-2$ (*SLC7A6*)

$y^+LAT-2$  también se encontró 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), inicialmente con el nombre KIAA0245 (GenBank ac. No. D87432).  $y^+LAT-2$  se expresa fundamentalmente en cerebro (tanto en neuronas como en astrocitos), testículos y glándula parótida y de forma más débil en intestino delgado, corazón y riñón de ratón.

En asociación con 4F2hc,  $y^+LAT-2$  induce la actividad de transporte  $y^+L$  en oocitos de *Xenopus*: transporta aminoácidos básicos de forma sodio-independiente y neutros de forma sodio-dependiente, con afinidades en el rango micromolar (Torrents *et al.*, 1998). A diferencia de  $y^+LAT-1$ , que también media un transporte de tipo  $y^+L$ , tiene una especificidad de sustrato más amplia

en la que se incluyen la arginina, lisina, leucina, glutamina, histidina, metionina y sorprendentemente glutamato (Broer et al., 2000). El transporte tiene una estequiometría de intercambio de 1:1, igual que los otros miembros de la familia (revisado en Verrey et al., 2004;

Chillarón et al., 2001). Es interesante notar que  $\gamma^+$ LAT-2 media una entrada eficiente de varios aminoácidos neutros y catiónicos (arginina, leucina, glutamina) mientras el eflujo o salida de aminoácidos catiónicos (arginina) es mucho más eficiente que el de los neutros (leucina, glutamina).



**Figura 3. Modelo de reabsorción renal de cistina y de aminoácidos neutros y básicos.** El heterodímero rBAT/b<sup>0,+</sup>AT se expresa en la membrana apical de las células epiteliales renales y media la captación de cistina (C<sub>ssc</sub>) y aminoácidos básicos (AA<sup>+</sup>) acoplado a un intercambio de aminoácidos neutros (AA<sup>0</sup>) (sistema b<sup>0,+</sup>), que entran en la célula junto con sodio a través del transportador apical recientemente identificado, B<sup>0</sup>AT-1 (sistema B<sup>0</sup>). La cistina se reduce a cisteína (Cys) en una reacción asociada a la oxidación de glutatión. Los aminoácidos básicos son liberados al exterior celular a través de la membrana basolateral por 4F2hc/y<sup>+</sup>LAT-1, acoplados a la entrada de aminoácidos neutros y sodio (sistema y<sup>+</sup>L). El heterodímero 4F2hc-LAT-2, también de localización basolateral, intercambia aminoácidos neutros (sistema L). 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. Otro transportador (T) en la membrana basolateral, todavía por identificar, debe ser responsable de la salida neta de aminoácidos neutros. Adaptado de Los aminoácidos neutros entran junto con sodio al interior celular a través de un transportador (T AA<sup>0</sup>) situado en la membrana apical todavía no identificado. En las células OK *knock down* para LAT-2, cuando se encuentran con una concentración de aminoácidos similar en ambas caras del epitelio, la dirección del intercambio favorece la salida neta de cisteína y la entrada neta de alanina, serina. Un transportador T en la membrana basolateral de estas células debe ser responsable de la salida neta de aminoácidos neutros. El sistema de transporte responsable de esta salida todavía no se ha identificado.



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

### 2.2.5. $b^{0,+}$ AT (*SLC7A9*)

El transportador  $b^{0,+}$ AT fue identificado, una vez más, por homología de secuencia con el resto de miembros de la familia LSHAT clonados anteriormente (Chairoungdua *et al.*, 1999; Feliubadaló *et al.*, 1999; Pfeiffer *et al.*, 1999a). El mRNA de  $b^{0,+}$ AT 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 (Rajan *et al.*, 2000a; Chairoungdua *et al.*, 1999; Pfeiffer *et al.*, 1999a), 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 a un 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 (Feliubadaló *et al.*, 1999).

Existe una asimetría por 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). En la Figura 3 se describe el papel de  $b^{0,+}$ AT/rBAT en la reabsorción renal de aminoácidos.

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

un fenotipo similar al de los homocigotos (Dello Strologo *et al.*, 2002) (apartado 2.3.1).

Los patrones de expresión opuestos a lo largo del túbulo proximal de  $b^{0,+}$ AT y rBAT han sugerido la posibilidad de que ambas proteínas, *in vivo*, pudieran 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*) (Fernández *et al.*, 2002). Por otro lado, por inmunoprecipitaciones cuantitativas, se demuestra que la expresión de rBAT supera ampliamente la de  $b^{0,+}$ AT, apoyando la hipótesis de la existencia de otra subunidad ligera que pudiera heterodimerizar con rBAT y que tuviera un patrón de expresión similar (Fernández *et al.*, 2002).

### 2.2.6. xCT (*SLC7A11*)

La clonación de xCT, patrón de expresión tisular, características de transporte y determinación de la topología y otros determinantes estructurales se describen en los capítulos Resultados y Discusión de esta tesis.

### 2.2.7. asc-1 (*SLC7A10*)

asc-1 (*asc-type aminoacid transporter-1*) fue identificado 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 fundamentalmente 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  $\alpha$ -aminoisobutírico y  $\beta$ -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, aún actuar preferentemente como un intercambiador, no es un intercambiador obligatorio y puede

transportar aminoácidos en una sola dirección (Pineda et al., 2004a; Fukasawa et al., 2000). 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 putativo modulador endógeno de los receptores NMDA de glutamato, le atribuye cierta implicación en la regulación de la transmisión sináptica (Nakauchi *et al.*, 2000). En riñón, se había sugerido su posible implicación en la reabsorción renal de cistina/cisteína, proponiéndose como gen adicional de cistinuria (Leclerc et al., 2001). Un trabajo reciente realizado en nuestro grupo (Pineda et al., 2004a) descarta esta posibilidad y propone que asc-1 podría ser el responsable de los flujos basolaterales de los aminoácidos neutros pequeños entre las células del epitelio tubular y el *vasa recta* durante el reciclaje de aminoácidos, implicando a asc-1 en la regulación y adaptación osmótica (Pineda et al., 2004a). En esta dirección, el análisis del gen de asc-1 revela la presencia de motivos TonE (*Tonicity response Enhancers*), relacionados con el aumento de la transcripción en respuesta a situaciones de hipertonicidad (Handler and Kwon, 2001).

#### 2.2.8. asc-2 (*Slc7a12*)

La clonación de asc-2, inicialmente llamada PK, patrón de expresión e intento de caracterización funcional, se describen en el capítulo de Resultados de esta tesis.

#### 2.2.9. AGT-1

La clonación de AGT-1, inicialmente llamada PW, patrón de expresión e intento de caracterización funcional, se describen en el capítulo de Resultados de esta tesis.

## 2.3. Aminoacidurias hereditarias

La pérdida de función en alguno de los miembros de la familia de transportadores heteroméricos de aminoácidos o HATs resulta en fallos en la reabsorción de aminoácidos en riñón e intestino, conocidos como cistinuria y lisinuria con intolerancia a proteínas, respectivamente. La primera, genéticamente asociada a b<sup>0,+</sup>AT y rBAT y, la segunda, a y<sup>+</sup>LAT-1.

### 2.3.1. Cistinuria

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

El tratamiento de la enfermedad está dirigido a favorecer la dilución de la cistina y de los cálculos: se recomienda control dietético, minimizando la ingesta de metionina (precursor de cisteína), y entradas abundantes de líquidos y de alcalinizantes de la orina como el bicarbonato sódico y el citrato de potasio (Dent and Senior, 1955). En cuanto al tratamiento farmacológico, se han utilizado compuestos sulfhidrilo, como la D

penicilamina (Crawhall et al., 1963) o a-mercaptopropionilglicina (King, 1968), que reaccionan con la cistina, forman compuestos más solubles y previenen su cristalización, aunque presentan efectos secundarios como fiebre, erupciones cutáneas y proteinuria. Normalmente se combinan varios métodos para una prevención efectiva (Joly et al., 1999).

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

La cistinuria de tipo I está asociada a mutaciones en el gen que codifica para rBAT (SLC3A1). Se han identificado más de 60 mutaciones distintas para rBAT: mutaciones *nonsense*, *missense*, de lugar de *splicing*, de *frameshift* y deleciones. La mutación más frecuente es M467T, asociada a un defecto de tráfico (Chillarón et al., 1997).

La cistinuria de tipo no-I, está asociada a mutaciones en el gen que codifica para b<sup>0,+</sup>AT (SLC7A9). El Consorcio Internacional de Cistinuria (ICC) ha identificado 35 mutaciones diferentes en este gen, (Font et al., 2001). La mutación más frecuente (25%) es G105R, asociada a un problema en la estabilidad de la proteína (Font *et al.*, 2001).

Un análisis reciente del fenotipo de pacientes heterocigotos portadores de mutaciones en el gen *SLC7A9*, demuestra que la excreción de aminoácidos es normal en un 14% de los casos (Dello Strologo et al., 2002). Estos resultados han obligado al ICC a establecer una nueva clasificación para la enfermedad: i) cistinuria de tipo A, en la que los pacientes presentan mutaciones en los dos alelos del gen *SLC3A1* y los heterocigotos presentan excreción de aminoácidos normal; ii) cistinuria de tipo B, en la que los pacientes presentan mutaciones en ambos alelos del gen *SLC7A9* y los heterocigotos muestran

generalmente hiperexcreción de cistina y aminoácidos básicos (sólo el 14% de los casos la excreción es normal); y iii) se propone la posible existencia de cistinuria de tipo AB, en la que los pacientes presentarían una mutación en el gen *SLC3A1* y otra en el gen *SLC7A9*, aunque no se ha encontrado ningún caso todavía (Dello Strologo et al., 2002).

### 2.3.2. Lisinuria con intolerancia a proteínas (LPI)

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

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

El tratamiento de la LPI se dirige a la corrección del defecto funcional del ciclo de la urea para evitar los episodios de hiperamonemia. Esto puede conseguirse mediante la administración de citrulina, un aminoácido neutro que puede metabolizarse a arginina y ornitina, aportando intermediarios al ciclo de la urea (Carpenter et al., 1985). Por otro lado, la desnutrición provocada por la deficiencia del aminoácido esencial lisina se

puede corregir con la administración de acetil-lisina, un análogo de la lisina que permite aumentar la concentración plasmática de este aminoácido a pesar de su poca disponibilidad y consiguiente alto precio (Rajantie et al., 1983).

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

Al inicio de esta tesis, el *boom* de la era de la clonación empezaba a decaer. Las bases de datos públicas contenían prácticamente la totalidad de las secuencias de los genomas conocidos y la identificación de nuevas proteínas era cada vez menos evidente. La proteómica estaba emergiendo con fuerza como un nuevo campo de conocimiento dirigido a la caracterización estructural y funcional del conjunto de proteínas de un organismo. En este contexto, aunque la identificación de nuevos miembros de la familia HAT no ha concluido, el interés de nuestro grupo de investigación empezó a orientarse hacia: i) el conocimiento de las relaciones estructura-función y de la estructura tridimensional de los transportadores HAT; ii) genómica funcional; y iii) conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos responsables de las enfermedades cistinuria y lisinuria con intolerancia a proteínas. Parte de los resultados presentados en esta tesis se engloban dentro del primer punto, por lo que a continuación se dedica un apartado de la Introducción a tratar este tema.

### 3. Características estructurales de los transportadores

Las proteínas de membrana, entre las que se encuentran los transportadores de aminoácidos, representan el 20-30% de los genes de un genoma (Fleming, 2000; Stevens and Arkin, 2000; Wallin and von Heijne, 1998). Su importancia en la industria farmacéutica es enorme; constituyen ~70% de las dianas terapéuticas (Wu and Yates, 2003). Sin embargo, menos del 1% de las proteínas de estructura conocida son proteínas integrales de membrana (Wu and Yates, 2003).

La cristalización por rayos X es la técnica más poderosa para la determinación estructural de una proteína porque da información a nivel atómico. Pero la obtención de cristales de una proteína de membrana es extremadamente difícil, principalmente por dos motivos: i) su carácter anfipático (compuestas por zonas altamente hidrofóbicas en contacto con los fosfolípidos y zonas hidrofílicas en contacto con la fase acuosa a ambos lados de la membrana) (Ostermeier and Michel, 2004); y ii) las bajas concentraciones a las que se encuentran en los tejidos obliga a sobre-expresarlas en grandes cantidades, proceso costoso en muchas ocasiones (Tate, 2001). A pesar de los avances en las técnicas de producción y purificación proteicas, las estructuras de alta resolución conocidas de transportadores y canales corresponden a organismos bacterianos, fundamentalmente *E.coli* (revisado en Dahl et al., 2004; Doyle, 2004).

En la Tabla 3 se presentan los transportadores y canales con estructura 3D publicada, el organismo de origen, el método utilizado para su determinación y la referencia del trabajo. Se confirma la estructura en  $\alpha$ -hélice de los dominios transmembrana, sugerida en numerosos estudios previos (Dahl *et al.*, 2004), y su flexibilidad conformacional, llevando a cabo movimientos sustanciales durante el proceso de translocación (Jiang et al., 2003a; Jiang et al., 2003b). En la Figura 4 se detalla un ejemplo.

**Tabla 3. Estructuras tridimensionales de alta resolución**

Proteína	Organismo	Método	Resolución	Referencia
NhaA (antiporter Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> )	<i>E. coli</i>	ECM	7-14 Å	(Williams, 2000)
OxIT (oxalato)	<i>O. formigenes</i>	ECM	12 Å	(Hirai et al., 2002)
Transportadores Multi-drug resistentes				
EmrE	<i>E. coli</i>	ECM	7 Å	(Ubarretxena-Belandia et al., 2003)
MDR1 P-gp	Células ováricas de hámster	ECM	10 Å	(Rosenberg et al., 2001)
Transportadores MFS (Major Facilitator Superfamily)				
LacY (lactosa)	<i>E. coli</i>	Rayos X	3.5 Å	(Abramson et al., 2003)
GlpT (G-3-P)	<i>E. coli</i>	Rayos X	3.3 Å	(Huang et al., 2003)
Transportadores de eflujo acoplados a H <sup>+</sup>				
AcrB	<i>E. coli</i>	Rayos X	3.5 Å 3.7 Å	(Murakami et al., 2002) (Yu et al., 2003)
Transportadores ABC (ATP-Binding Cassette)				
MsbA (flipasa)	<i>E. coli</i>	Rayos X	4.5 Å	(Chang and Roth, 2001)
BtuCD (Vitamina B <sub>12</sub> )	<i>E. coli</i>	Rayos X	3.2 Å	(Locher et al., 2002)
Aquaporinas y similares				
AQP1	Células sanguíneas humanas	ECM	3.8 Å	(Murata et al., 2000) (Ren et al., 2001)
AQP1 (canal)	Células sanguíneas bovinas	Rayos X	2.2 Å	(Sui et al., 2001)
GlpF	<i>E. coli</i>	Rayos X	2.2 Å	(Fu et al., 2000)
Aquaporina Z	<i>E. coli</i>	Rayos X	2.5 Å	(Savage et al., 2003)
Canales de Potasio				
KirBac 1.1	<i>B. pseudomallei</i>	Rayos X	3.6 Å	(Kuo et al., 2003)
KcsA	<i>S. lividans</i>	Rayos X	3.2 Å	(Doyle et al., 1998)
K <sub>v</sub> AP	<i>A. pernix</i>	Rayos X	3.2 Å	(Jiang et al., 2003a)3
MthK (Ca <sup>+</sup> -dep)	<i>M. thermoautotrophicum</i>	Rayos X	3.3 Å	(Jiang et al., 2002)
Canales de Cloro				
CIC	<i>E. coli</i>	Rayos X	3.0 Å	(Dutzler et al., 2002)
CIC	<i>S. typhimurium</i>	Rayos X	3.5 Å	(Dutzler et al., 2002)
Canales iónicos mecánico-sensibles				
MscS	<i>E. coli</i>	Rayos X	3.9 Å	(Bass et al., 2002)
MscL	<i>M. tuberculosis</i>	Rayos X	3.5 Å	(Chang et al., 1998)

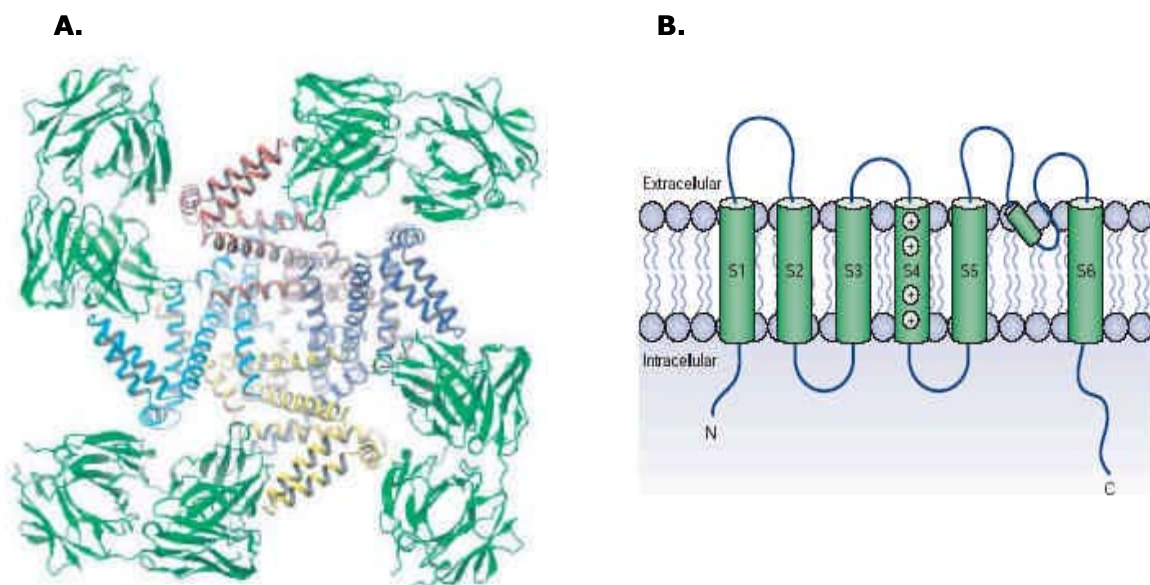
ECM: Microscopía Crio-electrónica (*Electron Cryo Microscopy*). Adaptado de (Dahl et al., 2004).

La dificultad de obtener cristales de proteínas integrales de membrana ha obligado a desarrollar estrategias alternativas, menos precisas, para los estudios de estructura-función (revisado en Sorgen et al., 2002; Kaback et al., 2001; Coutre and Kaback, 2000). Actualmente, algunas de estas estrategias permiten obtener patrones de difracción de resoluciones altas que hacen pensar en un futuro próximo más fructífero. En este contexto, también se han desarrollado un elevado número de programas computacionales de predicción de topología a partir de la secuencia de la proteína de interés o del alineamiento por homología de los miembros de una familia (Krogh et al., 2001; Tusnady and Simon, 1998; Hirokawa et al., 1998; Persson and Argos, 1997) (capítulo de Materiales y Métodos). Las predicciones, aunque muy útiles y de acceso inmediato, no siempre alcanzan los niveles de precisión deseados o incluso han resultado ser incorrectas en algunos casos (p.ej. canal de cloro CIC, (Dutzler et al., 2002). Un informe reciente que ha evaluado el nivel de fiabilidad de estos programas basándose en

estructuras de proteínas determinadas experimentalmente, afirma que incluso los mejores programas sólo llegan a predecir correctamente alrededor del 60% de las estructuras (Ikeda et al., 2003; Ikeda et al., 2002; Chen et al., 2002; Moller et al., 2001).

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

En esta tesis se ha abordado la determinación experimental de la topología de la subunidad ligera xCT, presentada en el capítulo Resultados y Discusión de esta memoria. A continuación se describen brevemente las



**Figura 4. Estructura del canal de potasio dependiente de voltaje  $K_vAP$ .** **A.** Vista del canal tetramérico, aislado de *Aeropyrum pernix* (Jiang et al., 2003), desde el interior celular y mirando hacia el exterior. Las  $\alpha$ -hélices representan los segmentos S1-S6 (en colores diferentes para identificar cada monómero), incluyendo el dominio P. Alrededor del canal (en verde) se encuentran los fragmentos de unión al anticuerpo (Fabs) utilizado para favorecer la cristalización del complejo tetramérico, forzando la adopción de una estructura menos dinámica. **B.** Clásica visión (pre-cristalización) de los segmentos transmembrana de una de las subunidades de un canal de potasio dependiente de voltaje. El diagrama está basado básicamente en el análisis de perfiles de hidrofobicidad. El canal completo está formado por cuatro de estas subunidades. Extraído de la revisión (Ashcroft et al., 2004).

estrategias más usadas y que han resuelto con éxito su propósito.

### 3.1. Métodos de determinación de topología

En la determinación de la topología se pretende definir el número de segmentos transmembrana que conforman la proteína a partir de la orientación de los *loops* hidrofílicos que se encuentran entre los segmentos, incluyendo los extremos N y C terminales.

#### 3.1.1. Inserción de puntos de N-glicosilación

La estrategia consiste en introducir puntos de N-glicosilación en la secuencia de la proteína y comprobar posteriormente si ésta se ha producido o no. Teniendo en cuenta que la N-glicosilación ocurre en la cara luminal del retículo endoplasmático, es un método adecuado sólo para la determinación de los dominios extracelulares.

Si la proteína de interés presenta puntos de glicosilación nativos, se recomienda eliminarlos (p.ej. sustituyendo los aspartatos de las secuencias NX(S/T) por asparaginas) y comprobar posteriormente que no comporta una pérdida de función. Este es el punto de partida para la inserción de puntos consenso de N-glicosilación en los putativos *loops* hidrofílicos extracelulares.

Se comprueba la funcionalidad de los mutantes, se expresan en un sistema heterólogo, reservando un grupo en el que se inhibe la N-glicosilación con tunamicina o bien tratando la muestra posteriormente con endoglicosidasa F, y se recupera el extracto proteico. Para determinar si la N-glicosilación ha tenido lugar, se corren las muestras en un gel de electroforesis, dejando que se separen largamente. Si la proteína de interés presenta una movilidad electroforética más baja que en ausencia de N-glicosilación (o en las muestras tratadas con endo F), se puede asumir que el lugar de N-glicosilación creado es, efectivamente, extracelular. Pueden darse falsos negativos por impedimentos estéricos, ya que la

capacidad de glicosilación es críticamente dependiente de su posición en el *loop*. Esto lleva a hacer varias inserciones independientes en una misma zona.

Este método se ha aplicado con éxito en el estudio de los transportadores GAT-1 (Golovanevsky and Kanner, 1999) y GLYT-1 (Olivares et al., 1997).

#### 3.1.2. Accesibilidad a cisteínas mediante reactivos sulfhidrilo

Esta técnica, también conocida como SCAM (*Substituted Cysteines Accessibility Method*), fue desarrollada inicialmente por M.H. Akabas (revisado en Karlin and Akabas, 1998). La estrategia consiste en introducir cisteínas individuales en distintas posiciones de la proteína de estudio y testar la accesibilidad de estas cisteínas utilizando reactivos tiol-específicos (Seal et al., 1998). Existe una gran variedad de reactivos: permeables, impermeables y unidos a biotina. Éstos últimos pueden detectarse fácilmente con estreptavidina-peroxidasa. En el capítulo de Materiales y Métodos de esta memoria se describe la técnica detalladamente.

Esta técnica es quizás la más ampliamente utilizada y la que se ha aplicado al estudio de la topología de xCT (Resultados y Discusión de esta memoria). 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).

#### 3.1.3. Fusión con genes de actividad enzimática

Esta técnica de inserción de genes, también llamada de *sándwich*, fue descrita inicialmente por Ehrmann (Ehrmann et al., 1990) para determinar la topología de proteínas de membrana como una variante más precisa de la clásica fusión "*end to end*" (revisado en Doi and Yanagawa, 1999; Clark, 1998). La estrategia

consiste en insertar en pauta una proteína *reporter*, como puede ser la fosfatasa alcalina (PA), en varios *loops* celulares de la proteína de interés. La fosfatasa alcalina es activa en el periplasma de la bacteria, donde reside normalmente, pero inactiva cuando se localiza en el citoplasma. El nivel de actividad de la PA es indicativo de su localización: cuando la inserción se produce en un *loop* extracelular, la actividad enzimática es alta y fácilmente detectable; si la inserción tiene lugar en una zona intracelular, la actividad PA detectada es muy pequeña o negligible.

El hecho que la proteína de fusión contenga la totalidad de la secuencia de la proteína de estudio la hace una técnica atractiva de aplicar. Sin embargo, la construcción de estas fusiones puede resultar relativamente complicada ya que no todos los lugares son igual de favorables para las inserciones. Un diseño inadecuado a menudo conlleva la desestabilización de la proteína y su inactivación (Doi and Yanagawa, 1999).

La técnica puede mejorarse combinando otro enzima bacteriano, la  $\beta$ -galactosidasa (Clark, 1998). En este caso, la  $\beta$ -galactosidasa (LacZ) tiene propiedades complementarias a las de la PA: es activa en el citoplasma, donde se encuentra, pero inactiva en el periplasma. Esta complementariedad permite a cada *loop* ser doblemente asignado en su localización.

Existen múltiples ejemplos en los que se ha aplicado este método en proteínas de membrana: el receptor humano  $\beta$ 2-adrenérgico (Lacatena et al., 1994), el receptor humano de la vasopresina V2 (Schulein et al., 1996), el dominio N-terminal de MdrI (*Multi-drug resistance*) (Bibi and Beja, 1994), el componente hidrofóbico del transportador KpsM de la superfamilia ABC (Pigeon and Silver, 1994), y numerosos transportadores de aminoácidos bacterianos (Cosgriff and Pittard, 1997; Pi and Pittard, 1996; Ellis et al., 1995; Sarsero and Pittard, 1995).

### 3.1.4. Unión a epítomos de anticuerpos

Esta técnica es parecida a la descrita anteriormente. En este caso la proteína de interés

se fusiona con el epítomo de reconocimiento de un anticuerpo comercial en las distintas zonas a localizar (Anand, 2000). Las *tagged*-proteínas se expresan en un sistema heterólogo y se analiza la accesibilidad del epítomo por incubación con el anticuerpo específico, antes y después de permeabilizar las células con algún detergente (p.ej. Tritón-X-100). La detección de la señal tiene lugar, generalmente, por inmunofluorescencia. Cuando la señal se detecta sólo después de la permeabilización de las células, es indicativo de una localización intracelular. Algunas veces, la zona circundante a la inserción del epítomo puede limitar o restringir el acceso del anticuerpo, o incluso que la inserción no sea tolerada y el plegamiento final de la proteína no sea el adecuado. Generalmente, los extremos N y C-terminal de las proteínas son los que mejor toleran estas inserciones (localización de los extremos de la proteína xCT, capítulo de Resultados de esta memoria).

Recientemente se ha publicado un método de permeabilización exclusiva de membranas plasmáticas, permaneciendo intactas el resto de membranas intracelulares, y limitando el acceso del anticuerpo a los epítomos citosólicos (Mardones and Gonzalez, 2003). La técnica consiste en congelar-descongelar las células (*freeze-thawing*) seguido de una rápida fijación. Está indicada para la determinación de la topología de proteínas de membrana intracelulares localizadas en compartimentos como el retículo endoplasmático, lisosomas, peroxisomas, Golgi o núcleo (Mardones and Gonzalez, 2003).

### 3.1.5. Digestión enzimática por proteasas

Vuelve a ser una variante de la técnica de fusión. Se introduce en pauta de lectura, en distintas localizaciones de la proteína de interés, los 144 aminoácidos del extremo G-terminal de la proteína secretora prolactina. También puede usarse la proteína  $\beta$ -lactamasa (Cartwright and Tipper, 1991) o la cloramfenicol acetiltransferasa (Xie et al., 1996). La determinación de la orientación del epítomo tiene lugar por ensayos de



protección de digestión enzimática con proteasas. Las cadenas proteicas nacientes en el retículo endoplasmático (RE) están orientadas de forma que los dominios extracelulares se encuentran en el lumen del RE, mientras los dominios citosólicos se encuentran en la cara citosólica del RE. La exposición de estas cadenas a proteinasa K en vesículas de membranas de RE resulta en la digestión de los dominios citosólicos expuestos, mientras los dominios en el lumen del RE están protegidos de tal digestión (Clark, 1998). Dado que la proteinasa K corta de forma inespecífica, todas las regiones de la proteína expuestas al citoplasma estarán sujetas a digestión. Con este método se ha examinado la topología de proteínas como la glicoproteína-P humana (MDR1) (Skach and Lingappa, 1994), el receptor de glutamato GluR3 (Bennett and Dingledine, 1995), el receptor nicotínico de acetilcolina (Chavez and Hall, 1992) y el transportador GAT-1 (Clark, 1997).

### 3.2. Hacia la estructura-función de los transportadores de la superfamilia APC

La superfamilia APC (*Amino acid/Polyamine/Choline or organoCation family*) 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. Los transportadores de aminoácidos de la familia HAT (*Heteromeric Amino acid Transporters*), objeto de estudio de nuestro grupo de investigación, pertenecen a la superfamilia APC (Verrey et al., 1999). Aunque incluye a miembros con mecanismos de transporte diferentes, estequiometrías variadas y acoplamiento a diferentes iones, existe una importante relación filogenética entre ellos (Jack et al., 2000). El árbol filogenético de la Figura 5, 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 presentan

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 5), definida con el nombre del primer miembro identificado.

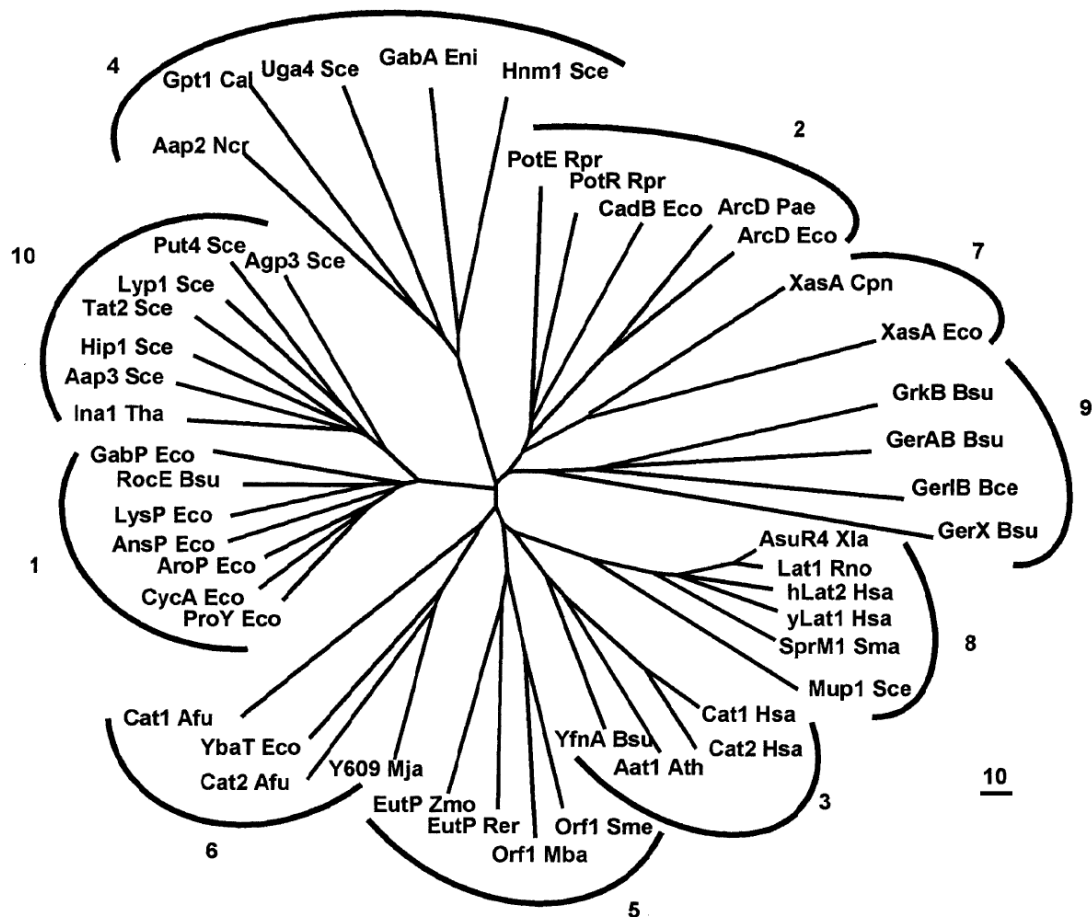
Los algoritmos de hidrofobicidad, basados en alineamientos múltiples generados a partir de las secuencias completas de los integrantes de cada subfamilia, revelan: i) la gran mayoría de los transportadores APC presentan una predicción de topología de 12 segmentos transmembrana (TMs) (en concreto, en 8 de las 10 familias), habiéndose mantenido similares posiciones y longitudes relativas de los diferentes segmentos y *loops* a lo largo de la evolución (Jack et al., 2000); ii) los miembros eucariotas de la familia CAT (*Cationic Amino acid Transporters*) (Devés and Boyd, 1998) presentan 14 TMs, localizados los dos segmentos adicionales en el extremo C-terminal de la proteína; y iii) la familia procariota SGP (*Spore Germination Protein*) tienen sólo 10 TMs, provocado por un truncamiento C-terminal que elimina los TM 11 y 12 (Jack et al., 2000).

Algunas de estas predicciones han sido comprobadas experimentalmente para miembros procariotas representativos de la familia APC (Hu and King, 1998c; Cosgriff and Pittard, 1997; Pi and Pittard, 1996; Ellis et al., 1995) (apartado 3.2.2.). En éstos, los extremos N y C-terminal tienen localización citoplasmática y presentan 12 TMs. Los *loops* que conectan los TMs 1 y 2; 4 y 5; 9 y 10; y 11 y 12 son relativamente cortos comparados con el resto. Tres de estos *loops* cortos son putativamente extracelulares y el cuarto, putativamente citosólico. El resto de *loops* parecen tener tamaños más variables y seguramente son característicos de cada familia. En cualquier caso, los *loops* extracelulares parecen tener una medida media más corta que los intracelulares. En resumen, tanto los perfiles de hidrofobicidad como los tamaños de los *loops* parecen servir de “marca” característica o *footprint* de los miembros de la superfamilia APC (Jack et al., 2000).

### 3.2.1. Relaciones de estructura-función en los miembros de la familia HAT

Los trabajos realizados hasta el momento para enfocar esta cuestión se pueden dividir en tres líneas: los dirigidos a la subunidad pesada o HSHAT (que por su interacción obligatoria con la subunidad ligera los incluimos en este apartado a pesar de no formar parte estrictamente de la superfamilia APC) (revisado en Chillarón *et al.*, 2001); los dirigidos a la subunidad ligera o LSHAT (también revisado en Chillarón *et al.*, 2001); y los dirigidos a establecer la estructura cuaternaria del complejo formado por la unión de ambas subunidades, fundamentalmente a través del estudio de la oligomerización.

**Subunidades pesadas (rBAT y 4F2hc).** Se han publicado dos estudios basados en deleciones (Deora *et al.*, 1998; Miyamoto *et al.*, 1996) y uno en mutaciones (Peter *et al.*, 2000) en el extremo C-terminal de rBAT que sugieren que este extremo es relevante para la interacción con la subunidad ligera. Los dos primeros se realizaron antes de la identificación de las subunidades ligeras y se basan en la expresión de rBAT en oocitos de *X. laevis* que, junto con la subunidad ligera endógena, induce actividad de transporte. El trabajo de Miyamoto (Miyamoto *et al.*, 1996) con rBAT humano muestra que la deleción 511-685, que elimina la última a-hélice del *TIM-barrel*, el



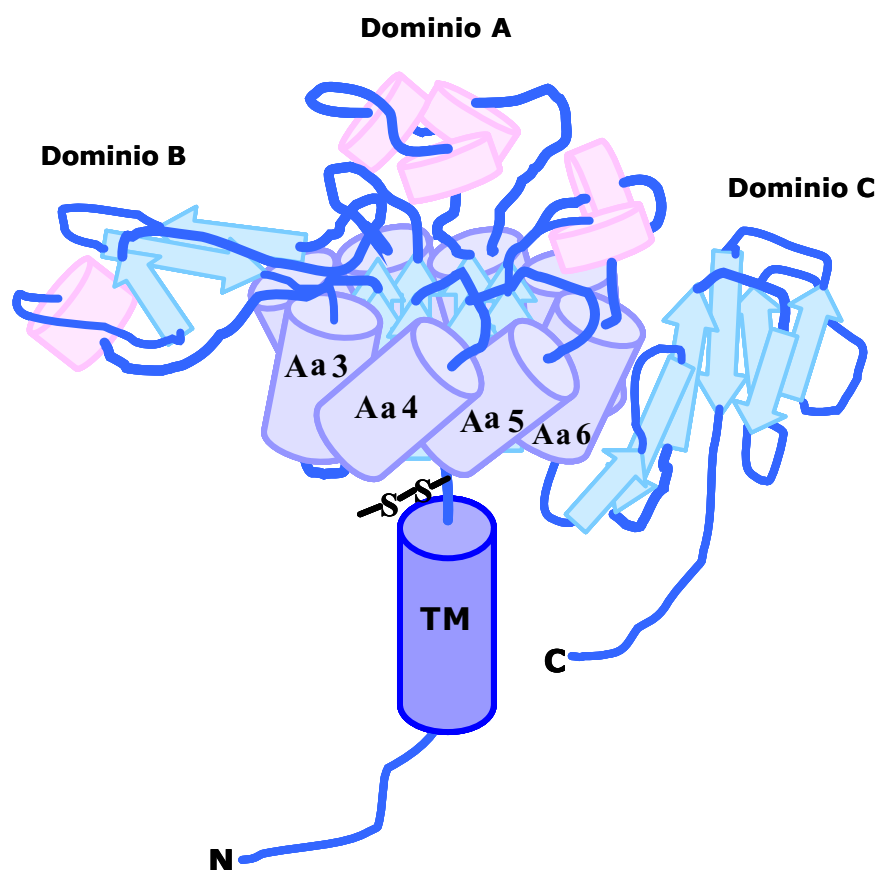
**Figura 5. Árbol filogenético de la superfamilia APC.** La segregación de las proteínas da lugar a 10 *clusters* que definen 10 familias diferentes (indicadas con un número). En el análisis, realizado con el programa TREE, se han incluido al menos 4 proteínas de cada una de las familias, a excepción de la familia GGA (7) donde sólo se han incluido dos miembros. Grupos: 1, familia AAT; 2, familia APA; 3, familia CAT; 4, familia ACT; 5, familia EAT; 6, familia ABT; 7, familia GGA; 8, familia LAT (Transportadores Heteroméricos de Aminoácidos); 9, familia SGP; y 10, familia YAT. Las barras representan la distancia relativa en unidades arbitrarias. Extraído de (Jack *et al.*, 2000).

dominio C y la cola C-terminal (Figura 6), induce una actividad de transporte muy disminuída que se parece a la actividad  $y^+L$  de 4F2hc. La expresión de rBAT con deleciones más largas en el extremo C-terminal anula cualquier actividad de transporte de rBAT en oocitos (revisado en Palacín *et al.*, 1998). Los resultados sugieren que el dominio C-terminal de rBAT es relevante para la interacción con la subunidad endógena.

El trabajo de Deora (Deora *et al.*, 1998), realizado con rBAT de rata, muestra que la deleción mínima 658-683, que elimina las cuatro últimas láminas  $\beta$  del dominio B y la cola C-terminal (Figura 6), elimina la actividad de transporte de rBAT. Los mutantes de la siguiente

serie de deleciones (588-683, a partir de las seis últimas láminas  $\beta$  del dominio B) inducen una actividad de transporte casi como la de rBAT completo y con las características del sistema  $b^{0,+}$ . Deleciones más largas (566-683, eliminación de todo el dominio C; 508-683, eliminación a partir de la última  $\alpha$ -hélice del *TIM barrel*) anulan cualquier inducción de la actividad de transporte.

No hay una razón evidente que explique la discrepancia de resultados entre la deleción 508-683 de rBAT de rata (Deora *et al.*, 1998) y la 511-685 de rBAT humano (Miyamoto *et al.*, 1996). Hay que tener en cuenta que estos experimentos se realizaron antes de la clonación de las subunidades ligeras y podrían interpretarse como diferentes



**Figura 6. Representación del dominio extracelular con homología a glucosidasas de rBAT.** El dominio A está compuesto por 8 cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  alternadas, formando un *TIM-barrel*. El dominio B es más pequeño y sobresale entre la tercera cadena  $\alpha$  y  $\beta$  del dominio A. El dominio C constituye el extremo C-terminal y presenta una estructura en láminas  $\beta$  antiparalelas. El esquema está basado en los resultados de modelaje molecular obtenidos a partir de los alineamientos de secuencia (R. Roca, estudios computacionales). Actualmente se está trabajando en la resolución de cristales obtenidos del dominio extracelular de 4F2hc (J. Fort, I. Fita y M. Palacín, trabajo en progreso). Está representado el puente disulfuro (S-S) con la subunidad ligera.

interacciones con las subunidades ligeras endógenas del oocito, dependiendo de la delección. En trabajos posteriores se confirma el papel relevante del extremo C-terminal de rBAT en la interacción con la subunidad ligera (Peter *et al.*, 2000). El análisis de las mutaciones de los tres residuos de cisteína conservados (C664, C671 y C683 en rBAT de rata), localizados en la cola C-terminal de rBAT, muestra que la sustitución C664A elimina la interacción de rBAT con su subunidad  $b^{0,+}$ AT y provoca la interacción funcional con una putativa subunidad  $y^+$ LAT-*type*.

Estudios paralelos realizados en 4F2hc (Broer *et al.*, 2001) parecen indicar, sorprendentemente, que en este caso la asociación con la subunidad ligera requiere dominios diferentes dependiendo del tipo de subunidad. Así, el tráfico a la membrana del heterómero LAT1-4F2hc requiere la cola N-terminal, el TMs y 30 aminoácidos extracelulares, incluyendo el puente disulfuro y la primera lámina  $\beta$  del dominio B (Figura 6). En cambio, el reconocimiento de LAT-2 y  $y^+$ LAT-2 requiere el dominio extracelular de 4F2hc completo. A este estudio, se le suma el realizado por el grupo de Fenczik (Fenczik *et al.*, 2001), en el que se examina qué dominios de 4F2hc están implicados en el transporte y cuáles en la regulación de integrinas. Mediante la construcción de quimeras, los autores demuestran que el extremo N-terminal y el segmento transmembrana de 4F2hc son necesarios para sus efectos en la función de las integrinas y el tráfico de LAT-1 a la membrana, mientras el dominio extracelular *glucosidasa-like* es necesario para la estimulación de la actividad de transporte inducida por LAT-1 (Fenczik *et al.*, 2001). Actualmente, la cristalización del dominio extracelular (y soluble) de 4F2hc está en curso en nuestro grupo (J. Fort, M. Palacín, I. Fita, resultados en progreso).

La función más evidente para la subunidad pesada parece ser ayudar a la subunidad ligera a llegar a la membrana (Chillarón *et al.*, 2001). De acuerdo con esta idea, varias de las mutaciones de cistinuria en rBAT muestran un defecto de tráfico (Saadi *et al.*, 1998; Chillarón *et al.*, 1997). Recientemente, sin embargo, se ha

demostrado que una mutación de cistinuria en rBAT (R365W) puede modificar las características de transporte del sistema  $b^{0,+}$  (Pineda *et al.*, 2004b). La mutación R365W, localizada en el dominio extracelular de rBAT, tiene un defecto específico en el eflujo de arginina, pero no en su influjo, y no afecta a las  $K_m$  aparentes extra e intracelulares de arginina. Este defecto en el mecanismo de intercambio podría explicarse por la existencia de dos vías alternativas de translocación del sustrato: una vía para influjo y otra para eflujo, la cual es defectiva en el mutante R365W (Pineda *et al.*, 2004b).

**Subunidades ligeras.** Los estudios de estructura-función de las subunidades ligeras son escasos y están basados fundamentalmente en el estudio de mutaciones causantes de lisinuria con intolerancia proteica, en  $y^+$ LAT-1, y causantes de cistinuria, en  $b^{0,+}$ AT. De las 7 mutaciones *missense* de LPI descritas (Palacín *et al.*, 2000; Torrents *et al.*, 1999), dos de ellas han sido analizadas funcionalmente en oocitos de *Xenopus*: G54V (en el putativo TMs 1) y L334R (en el cuarto putativo *loop* intracelular). Ambas llegan a la membrana de los oocitos inyectados con su cRNA, pero no inducen actividad de transporte (Mykkanen *et al.*, 2000). El mismo efecto se ha observado en dos líneas celulares humanas diferentes (Tavoularis *et al.*, 2003). Estas dos mutaciones, por tanto, inactivan la función del transportador  $y^+$ LAT-1.

En cuanto a las 22 mutaciones de un sólo aminoácido descritas de cistinuria, 17 de ellas implican residuos localizados en putativos segmentos transmembrana y el resto, en putativos *loops* intracelulares de  $b^{0,+}$ AT (Chillarón *et al.*, 2001). Ninguna de las mutaciones se encuentra en un putativo *loop* extracelular. Lo mismo ocurre con las mutaciones *missense* de LPI mencionadas anteriormente. De forma similar en otros transportadores de la superfamilia APC, como PotE (Kashiwagi *et al.*, 2000; Kashiwagi *et al.*, 1997) (apartado 3.2.2. de la Introducción), o de otras familias, como el transportador de la lactosa (Poolman *et al.*, 1992; Kaback, 1987) o el de la tetraciclina (Yamaguchi *et al.*, 1992), los aminoácidos más relevantes funcionalmente se

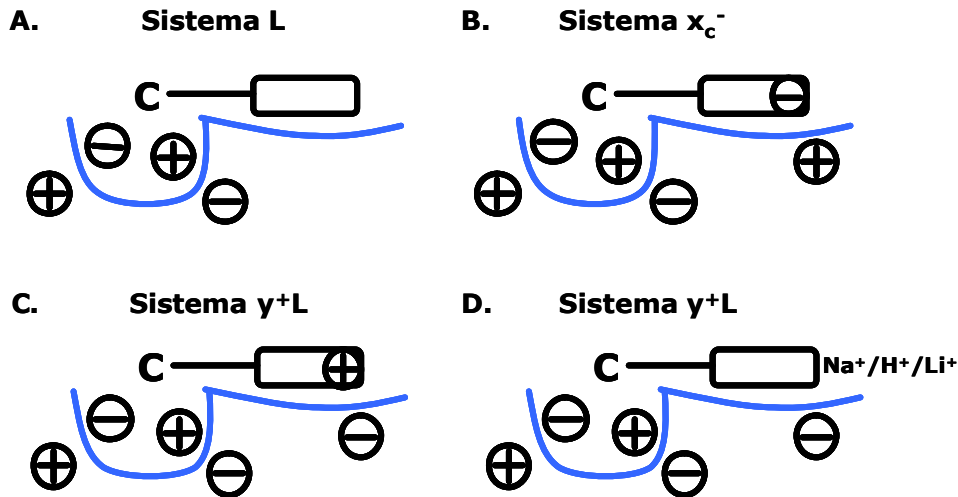
encuentran en los dominios citosólicos de la proteína. Esta asimetría ha sido interpretada por Kashiwagi y colaboradores (Kashiwagi *et al.*, 2000) como la base estructural para proporcionar una respuesta rápida del transportador a cualquier cambio en las concentraciones celulares de los sustratos.

De las mutaciones *missense* descritas en  $b^{0,+}$ AT, 6 han sido analizadas funcionalmente en células HeLa en co-expresión con rBAT (Font *et al.*, 2001). Los efectos sobre la inducción de transporte varían según la mutación, de una caída total de la actividad (V170M, A354T, G105R, R333W) a caídas parciales ~50% (A70V, A182T), pero está por determinar si se trata de un defecto de tráfico o de una inactivación del transportador. El análisis de las excreciones urinarias de cistina y los aminoácidos dibásicos arginina, lisina y ornitina en heterocigotos portadores de estas mutaciones revela que su severidad es mutación-específica (Font *et al.*, 2001). Es decir, los heterocigotos portadores de mutaciones que anulan la actividad del sistema  $b^{0,+}$  presentan niveles de hiperexcreción altos (8-18 veces por encima de los individuos control), mientras los heterocigotos portadores de mutaciones que provocan caídas parciales de la actividad del sistema  $b^{0,+}$  están asociadas a fenotipos leves (5 veces por encima de los controles). Si esta correlación se extiende a mutaciones menos comunes, se pueden extraer algunas conclusiones (Font *et al.*, 2001): 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 (el caso de comportamientos diferentes para el mutante G63R podría explicarse por la variabilidad individual); ii) cuatro mutaciones asociadas a fenotipos severos descritas en  $b^{0,+}$ AT o  $y^+$ LAT-1 se encuentran en putativos segmentos transmembrana y corresponden a aminoácidos con cadenas laterales pequeñas (glicina, alanina o serina) en todos los miembros LSHAT; mientras otras mutaciones

también situadas en putativos TMs pero con aminoácidos de cadenas laterales de tamaño variable, están asociadas a fenotipos leves.

Recientemente se ha señalado la relevancia del tamaño pequeño en las cadenas laterales (glicina, alanina o serina) en las regiones de contacto entre hélices  $\alpha$ . Residuos altamente conservados con cadenas laterales pequeñas (glicina o alanina) están presentes en las zonas de contacto de las hélices  $\alpha$  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 asociación entre hélices  $\alpha$  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). De forma similar, se han encontrado motivos SmxxxSm (donde Sm corresponde a residuos de cadena lateral pequeña, ya sea Gly, Ala o Ser) en los TMs 1, 6, 7 y 8 de los miembros de la familia LSHAT (Chillarón *et al.*, 2001). Las mutaciones G259R en  $b^{0,+}$ AT y G54V en  $y^+$ LAT-1 implican estos motivos SmxxxSm de asociación hélice-hélice en los TM 7 y 1, respectivamente. La mutación G259R está asociada a un fenotipo urinario severo en heterocigotos; y G54V, como comentado anteriormente, está asociada a un fenotipo de dramática pérdida de actividad (Fenczik *et al.*, 2001; 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.

Kanai propone un modelo para los lugares de unión de las subunidades ligeras al sustrato (Kanai and Endou, 2001) (Figura 7). Basándose en comparaciones de varios compuestos relacionados con la fenilalanina, como la tirosina, la L-dopa y el 3-O-metildopa, Kanai 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



**Figura 7. Modelos propuestos para el lugar de unión del sustrato.** El reconocimiento del sustrato propuesto para 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  $\alpha$ -amino o  $\alpha$ -carboxilo (indicado con los símbolos + y - cercanos al carbono- $\alpha$  "C"), y otro para la unión de la cadena lateral del aminoácido sustrato (indicado por el rectángulo unido con una línea). La interacción hidrofóbica entre el 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  $y^+LAT-1$ , equipado para aceptar cargas positivas. Los residuos cargados presuntamente implicados en la unión al sustrato están indicados con símbolos + y -. Adaptado de Kanai and Endou, 2001.

aminoácido sustrato y el punto de unión del transportador y, además, en el reconocimiento de las cargas positivas y negativas alrededor del carbono  $\alpha$  (grupos  $\alpha$ -amino y  $\alpha$ -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, exhibe un amplio espectro de selectividad de sustratos. Para el transportador  $y^+LAT-1$ , se ha propuesto que se requiere una carga positiva en la cadena lateral de los sustratos básicos o bien aportada por el catión inorgánico monovalente, como el  $Na^+$  o el  $H^+$ , para el reconocimiento del sustrato (Kanai *et al.*, 2000). En la Figura 7 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  $xCT$ , Kanai propone un reconocimiento por carga negativa, con un lugar de unión posiblemente compuesto por aminoácidos cargados positivamente para interactuar con las cargas

negativas de las cadenas laterales de sus sustratos (Kanai and Endou, 2001). La longitud de la cadena lateral del sustrato, es decir, la distancia del carbono  $\alpha$  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 fueran buenos sustratos de  $xCT$ , mientras el aspartato no lo fuera (Kanai and Endou, 2001). En cuanto a la cistina, la distancia entre los dos grupos carboxilo sería la adecuada para ser reconocida como un anión y transportada por  $xCT$  (Resultados y Discusión de esta memoria). Precisamente la distancia entre el carbono  $\alpha$  y la carga positiva en el caso de  $y^+LAT-1$  también sería el limitador principal de su espectro de sustratos. El lugar de reconocimiento de  $rBAT-b^{0,+}AT$  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 (Kanai and Endou, 2001).

### Estructura cuaternaria del complejo heteromérico.

Un estudio de la actividad  $b^{0,+}$  en vesículas de membranas *brush border* de intestino de pollo ha propuesto un mecanismo secuencial para la unión de sustratos que implica la formación de un complejo ternario en el que el transportador está unido simultáneamente a los sustratos a ambos lados de la membrana (Torras-Llort et al., 2001). Las constantes de afinidad para el aminoácido extracelular son mucho mayores que para el sustrato intracelular (Reig et al., 2002; Torras-Llort et al., 2001), sugiriendo un mecanismo ordenado en el que se une primero al transportador el aminoácido externo y después, se une el interno. Un modelo similar ha sido propuesto para el transportador mitocondrial aspartato/glutamato (Dierks et al., 1988). Este mecanismo sugirió que la unidad funcional de rBAT- $b^{0,+}$ AT podría ser un dímero de heterodímeros (rBAT- $b^{0,+}$ AT)<sub>2</sub>. Evidencias 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 (Fernández 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 (Fernández 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  $b^{0,+}$  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); y 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 (Wells and Hediger, 1992; Bertran et al., 1992b).

Los estudios de oligomerización se han abordado experimentalmente en nuestro

laboratorio siguiendo dos tipos de técnicas: estructurales (co-inmunoprecipitación y Blue Native PAGE) y funcionales (mutante dominante negativo). Los datos que se presentan a continuación son resultados preliminares (E. Fernández, Tesis Doctoral 2003, y M. Jiménez-Vidal, Tesis Doctoral en preparación). El transportador rBAT- $b^{0,+}$ AT apunta a un dímero de heterodímeros (rBAT- $b^{0,+}$ AT)<sub>2</sub>: i) mediante la técnica de electroforesis Blue Native PAGE se detecta un complejo estable de ~550 kDa del que  $b^{0,+}$ AT forma parte; ii) el tratamiento con SDS y DTT es capaz de disgregar el supercomplejo de ~550 kDa en un complejo de 250 kDa; iii)  $b^{0,+}$ AT presenta dos estados de oligomerización, indicando la presencia de dos moléculas en el supercomplejo; iv) si tenemos en cuenta que las proteínas politópicas de membrana tienen una movilidad en Blue Native PAGE que les proporciona un tamaño que es 1.8 el suyo (Heuberger et al., 2002), este complejo de ~250 kDa correspondería a un complejo de ~139 kDa, que es un tamaño molecular similar al observado para rBAT- $b^{0,+}$ AT cuando se resuelve en SDS PAGE (E. Fernández, Tesis Doctoral 2003).

La estructura oligomérica de los complejos 4F2hc-LAT2 y 4F2hc-xCT, en cambio, apuntan a que estos transportadores probablemente se encuentran en la membrana en forma de monómero (E. Fernández, Tesis Doctoral 2003, y M. Jiménez-Vidal, Tesis Doctoral en preparación). Esta estructura cuaternaria diferente sugiere que la subunidad pesada es la responsable de la estructura del complejo.

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

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

implicados en la función de los transportadores de la familia.

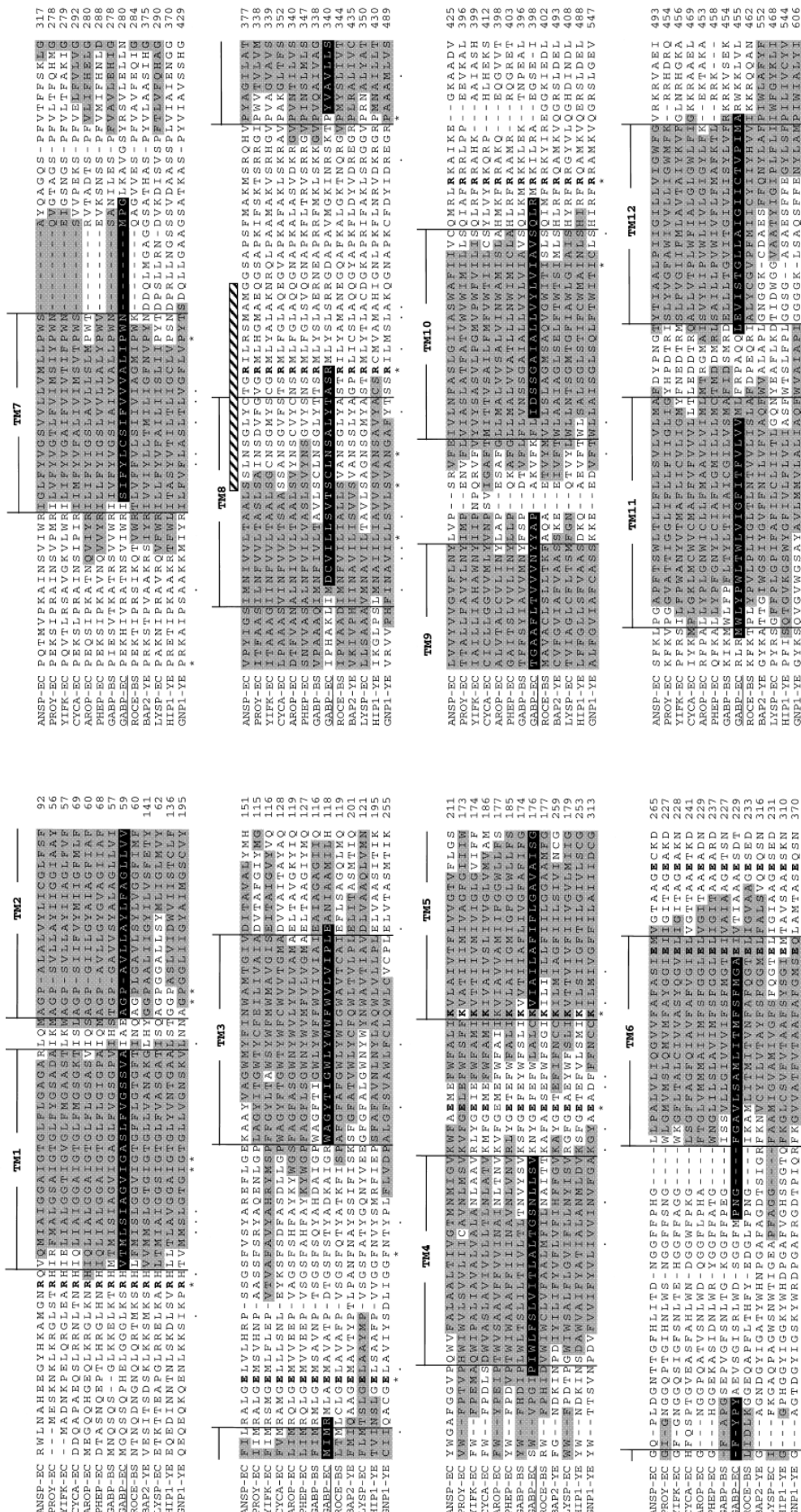
Los modelos de predicción de estructura en 12 segmentos transmembrana, con extremos N y C-terminal intracelulares, han sido comprobados experimentalmente, siguiendo la estrategia de fusión con actividades enzimáticas, para los transportadores bacterianos de lisina LysP (Ellis *et al.*, 1995), de fenilalanina PheP (Pi and Pittard, 1996), el homólogo de aminoácidos aromáticos AroP (Cosgriff and Pittard, 1997), el transportador de putrescina y ornitina PotE (Kashiwagi *et al.*, 1997) y, más recientemente, el de GABA GabP (Hu and King, 1998c). En ellos también se mantiene la longitud relativa de los diferentes *loops* (comentado anteriormente), siendo especialmente cortos el 1-2, 9-10 y 11-12 *loops* extracelulares, y el 10-11 intracelular.

Dado que los transportadores pertenecientes a una misma familia presentan perfiles de hidrofobicidad similares, sus estructuras secundarias y topologías también se esperan similares. Con ayuda de los resultados experimentales obtenidos hasta el momento y el alineamiento de los miembros de la superfamilia APC descritos, se puede llegar a un “modelo consenso” de topología para toda la superfamilia (Hu and King, 1998c). En este modelo, presentado en la Figura 8, además de los datos experimentales y de homología, se aplican dos limitaciones: i) se minimiza el número de residuos cargados embebidos en los dominios transmembrana; ii) los espacios o *gaps* en los alineamientos múltiples se relegan a zonas correspondientes a *loops*, basándose en la teoría de que “inserciones” a lo largo de la evolución en las estructuras secundarias (p.ej. hélices transmembrana) son menos toleradas que inserciones en los *loops* conectivos (Buhr and Erni, 1993). Apoyan esta idea estudios recientes en el transportador de la lactosa (*lac permease*) (Manoil and Bailey, 1997) y la observación que los transportadores eucariotas de la familia APC son sustancialmente más largos que sus homólogos bacterianos, presentando esta longitud *extra* en las zonas “inserción-tolerantes” de los *loops* hidrofílicos (Hu and King, 1998c).

Las organizaciones topológicas presentadas para PheP (Pi and Pittard, 1996) y AroP (Cosgriff and Pittard, 1997) presentan una región de controversia entre los dominios transmembrana 4 y 5. Mientras la topología de PheP maximiza las cargas consignadas al *loop* citoplasmático 4-5, como mantiene el modelo “consenso”, la topología de AroP, más reciente, minimiza la longitud del *loop* 4-5 y embebe en el segmento transmembrana 5 (TM5) a tres residuos cargados (E151, E153, K160), altamente conservados entre los miembros bacterianos y de levadura de la familia (Pi *et al.*, 1993; Reizer *et al.*, 1993). La inserción de residuos cargados en un entorno hidrofóbico es energéticamente desfavorable, sugiriendo una implicación en la función del transportador o en su estructura (Kaback, 1996). Se ha demostrado experimentalmente la relevancia funcional de estos residuos en AroP (Cosgriff and Pittard, 1997): la sustitución individual de cada residuo por un aminoácido neutro como la alanina, anula la actividad del transportador.

Se reconoce de forma creciente, en cambio, que las regiones correspondientes a los *loops* pueden contener importantes determinantes de las características cinéticas de los transportadores y de las propiedades de los lugares de reconocimiento y unión al sustrato, particularmente en los transportadores de GABA (Hu and King, 1998a; Tamura *et al.*, 1995) y en otros miembros de la superfamilia APC (Closs *et al.*, 1997; Closs *et al.*, 1993). En este contexto, se han identificado tres residuos de glutamato funcionalmente claves en el transportador bacteriano de putrescina PotE (Kashiwagi *et al.*, 1997) y localizados en el lado citosólico de la membrana. Estos residuos, E77 (entre los TMs 2 y 3), E207 (después del TMs 6) y E433 (después del TMs 12), al ser mutados individualmente a otros aminoácidos (A, D, N, Q), disminuyeron significativamente tanto la captación como el eflujo de putrescina (Kashiwagi *et al.*, 1997). En un trabajo posterior, los autores identifican otros residuos implicados en la función de PotE (W201, W292 y T425; y en menor medida, T78, T90 y W422), y proponen un modelo de lugar de





**Figura 8. Alineamiento múltiple de las secuencias de 13 miembros representativos de la superfamilia APC.** Las secuencias se han extraído de la Swiss-Prot Database y alineadas con el programa CLUSTALW. Los transportadores indicados son los siguientes: de *E. coli* (EC), de L-asparagina (ANSP), específico de prolina (PROY), de D-serina/D-alanina/glicina (CYCA), de aminoácidos aromáticos (AROP), específico de fenilalanina (PHEP), de GABA (GABP), específica de lisina (LYSP) y, el putativo transportador (YIFK); de *B. subtilis* (BS), de levaduras (YE), de *Leu/Val/ile* (BAP2), de histidina (HIP1) y de glutamina (GNP1). El alineamiento muestra los miembros más significativos del alineamiento, realizado con 30 proteínas homólogas de la familia APC. Los asteriscos señalan los residuos conservados en todos los miembros y los puntos, las posiciones ocupadas por residuos muy similares. Los putativos segmentos transmembrana para cada transportador se indican en gris, en negro se indican los confirmados para GabP de *E.coli* (Hu and King, 1998; extraído de la fig. 3). Los dominios TMs "consenso" se han indicado con líneas verticales.

interacción iónica de estos residuos con el sustrato (Kashiwagi *et al.*, 2000).

Hasta el momento no se han encontrado determinantes estructurales importantes para la función del transportador PotE en los dominios periplásmicos. El análisis de mutaciones de residuos ácidos expuestos al espacio extracelular mostró que ninguno de ellos era esencial para la actividad de transporte (Kashiwagi *et al.*, 2000; Kashiwagi *et al.*, 1997). De hecho, los *loops* extracelulares de PotE, característica común a la mayoría de los miembros de la superfamilia APC (Jack *et al.*, 2000), son relativamente cortos a excepción del *loop* entre los TMs 7 y 8 (*loop* 7-8). Este *loop* comprende aproximadamente 32 aminoácidos y está altamente conservado entre las especies bacterianas, aunque su función es desconocida. Por su tamaño, se hipotetizó que podría estar implicado en la interacción con componentes periplásmicos o incluso con sustratos potenciales. Dos residuos de glutamato, E253 y E272, localizados en este *loop*, no resultaron esenciales para la actividad del transportador (Kashiwagi *et al.*, 1997) pero recientemente, por estudios de deleciones y mutagénesis, se ha demostrado que esta zona es necesaria para la captación de putrescina por parte de PotE (Minchin and McCoubrie, 2004). Además, se han identificado dos residuos, V249 y L254 (Minchin and McCoubrie, 2004), esenciales para la función de transporte y altamente conservados en homólogos bacterianos. La valina 249 se localiza en una región hidrofóbica en la perimembrana del TMs 7, cerca o en la superficie de la bicapa lipídica, y existe una buena correlación entre la hidrofobicidad del aminoácido introducido en esta posición y la constante de primer orden (*first-order rate*) para la captación de putrescina (Minchin and McCoubrie, 2004). Las  $K_m$ , a excepción de V249D, son similares al transportador salvaje, atribuyéndole más un papel en la configuración estructural de la proteína que en la unión al sustrato. El residuo L254 se encuentra en una región hidrofílica del *loop* 7-8 y su sustitución provoca una caída del 60% en la captación de putrescina. El hecho que en el centro de este *loop* exista una segunda zona hidrofóbica que se predice

como a-hélice, hace sugerir que parte del *loop* no esté expuesto al ambiente acuoso y constituya un *re-entrant loop* implicado en el movimiento del sustrato a través del poro del transportador (Minchin and McCoubrie, 2004). Anteriormente, el grupo de Kashiwagi ya había propuesto que los *loops* citoplasmáticos entre los TMs 2-3 y TMs 6-7 podrían entrar a la zona del poro o canal del transportador para configurar el lugar de unión al sustrato (Kashiwagi *et al.*, 2000) (Capítulo de Discusión en esta memoria). En esta dirección se ha publicado un trabajo reciente en el transportador de prolina PrnB de *Aspergillus nidans* (Tavoularis *et al.*, 2003) en el que se identifican residuos relevantes en estas zonas: I119 y G120 al final del *loop* que conecta con el TMs 3, F278 antes del TMs 7, y K245 y F248 en el TMs 6. Estos dos últimos parecen estar directamente relacionados con la función del transportador y/o la unión al sustrato (Tavoularis *et al.*, 2003).

Otra zona relevante en los transportadores de la superfamilia APC es la hélice 8 y el *loop* citoplasmático contiguo (*loop* 8-9). Esta zona contiene el CAR (*Consensus Amphipatic Region*), recientemente descrita en una multitud de transportadores y que incluye a los numerosos homólogos de GabP de la superfamilia APC (Hu and King, 1998a) y en los transportadores catiónicos de ratón (MCAT) (Closs *et al.*, 1993). Se ha sugerido que el CAR podría estar implicado en el paso de translocación del sustrato debido a que contiene elementos (firma de cisteínas en GabP) que afectan a 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 una ventana de 20 aminoácidos del CAR (exactamente el número necesario para atravesar la membrana) es altamente deletéreo para la función del transportador de GABA GabP y define la zona SPS (*Sensitive Polar Surface*) (Hu and King, 1998c). Dado que los segmentos anfipáticos parecen capaces de hacer movimientos transitorios dentro y fuera de la membrana (Slatin *et al.*, 1994; Qiu *et al.*, 1994), la zona CAR podría aportar la base para un mecanismo de catálisis de “barrera móvil” (Henderson, 1991). Los estudios en GabP sitúan

topológicamente la firma de cisteínas (*signature cysteine*) en el dominio TM 8 (Hu and King, 1998b) y la zona SPS en el espacio citosólico. Esta disposición es diferente de la propuesta por los alineamientos múltiples o la asumida para las proteínas MCAT, donde se incluye en su totalidad en el loop que conecta los TMs 8 y 9 (Closs et al., 1997; Closs et al., 1993). Un trabajo más reciente identifica la C300 (*signatura cysteine*) de GapP de *E.coli* como la diana de inactivación del transportador por modificación con reactivos tiol-específicos (Hu and King, 1999). La reactividad del residuo ante estos agentes depende de su estructura: reactivos cargados o voluminosos, que no se parecen a los sustratos transportados, no producen modificaciones en el transportador (Hu and King, 1999). Esta observación es consistente con la idea que el acceso a este residuo funcionalmente relevante requiere solutos que pasen a través de un espacio que imparte selectividad estructural parecida a un poro (*channel-like occlusion*).

Aparte de los estudios en transportadores bacterianos, últimamente también han aparecido algunas publicaciones sobre miembros de levaduras de la superfamilia APC (Kim et al., 2003; Regenber g and Kielland-Brandt, 2001; Gilstring and Ljungdahl, 2000). El modelo de topología presentado anteriormente por los miembros bacterianos de la familia ha sido confirmado por el método de N-glicosilación para la permeasa Gap1p de *S. cerevisiae* (Gilstring and Ljungdahl, 2000). Se han seleccionado mutantes en Gap1p y en su homólogo Can1p que alteren la selectividad de sustrato (Regenber g and Kielland-Brandt, 2001). Los autores localizan mutaciones distribuidas en seis *clusters* correspondientes a dominios transmembrana, regiones citoplasmáticas y *loops* externos. Es interesante resaltar tres residuos altamente conservados entre diferentes miembros de la superfamilia APC y que se han relacionado con el reconocimiento de la arginina como sustrato (Regenber g and Kielland-Brandt, 2001): i) S152, localizada en el *loop* intracelular entre los TMs 2-3, y conservada entre los transportadores; ii) P313, también localizado en un *loop* intracelular, entre los TMs 6-7 (Reizer *et al.*,

1993), aunque su sustitución en el transportador PheP provocó efectos modestos (Pi et al., 1998); y iii) E367, localizado en el *loop 7* extracelular entre los TMs 7 y 8. Este *loop* parece ser un buen candidato para el reconocimiento de varias cadenas laterales de sustratos de diferentes miembros de la superfamilia APC por su variabilidad de secuencias y tamaños (Regenber g and Kielland-Brandt, 2001).

El dominio transmembrana 3 se ha propuesto por el grupo de Cosgriff (Cosgriff and Pittard, 1997) como implicado en el reconocimiento de sustrato de forma general en la superfamilia APC a raíz de sus estudios de quimeras entre AroP y PheP. En apoyo a esta idea, los residuos T173 de Can1p y W239 de Gnp1p alteran la especificidad del transportador al ser sustituidos (Regenber g and Kielland-Brandt, 2001). Mutaciones que afectan a putativos TMs e influyen en la preferencia de sustratos ya han sido descritas anteriormente en otros transportadores: el transportador de lactosa de *E.coli* (Venkatesan and Kaback, 1998; Varela et al., 1997), el transportador de purinas de *A.nidulans* (Diallinas et al., 1998) y el transportador de hexosas de *S.cerevisiae* (Kasahara et al., 1996).

En resumen, se encuentran residuos importantes en localizaciones citosólicas, extracelulares e incluso en dominios transmembrana. Seguramente, algunas de estas mutaciones afectan al reconocimiento de sustrato de forma indirecta aunque es probable que residuos a ambos lados de la membrana entren en contacto con el sustrato en los diferentes pasos del proceso de transporte.



## **Objetivos**



Desde finales de 1998, por aportaciones de nuestro grupo y otros, se había demostrado la existencia de un conjunto de proteínas implicadas en el transporte de aminoácidos y agrupadas dentro de una misma familia conocida como HAT (*Heteromeric Amino acid Transporters*). La elevada homología de secuencia (40-70%) entre los componentes de la familia había permitido la búsqueda en las bases de datos de nuevos miembros a partir de fragmentos de secuencia conservados y/o conocidos. Siguiendo esta estrategia, y con el Proyecto Genoma ya muy avanzado, al inicio de esta Tesis Doctoral se propuso:

**I. Identificar nuevas subunidades ligeras pertenecientes a la familia HAT.**

A medida que las bases de datos públicas se llenaban con las secuencias de genomas completos, la identificación de nuevas proteínas era cada vez menos evidente y crecía el interés por la caracterización funcional y estructural de las proteínas conocidas. Definida la familia HAT, los intereses del grupo de investigación se dirigieron, en parte, hacia los estudios de estructura-función de sus miembros. Los escasos conocimientos que se tenían del tema se reducían a los trabajos realizados en nuestro grupo de investigación sobre el análisis de mutantes de lisinuria (Torrents et al., 1999) y cistinuria (Font et al., 2001) y a los estudios iniciados por R. Estévez en su Tesis Doctoral (Diciembre 1999). En este contexto, se planteó:

**II. Determinar la topología del transportador xCT como modelo de subunidad ligera.**

**III. Identificar residuos clave en el transportador xCT desde el punto de vista estructural y/o funcional.**





## **Resultados**



En este capítulo, dividido en tres apartados, se presentan los resultados obtenidos durante la realización de esta Tesis Doctoral. Los resultados publicados se incluyen en el apartado correspondiente en forma de Artículo, junto con un resumen del mismo. Los resultados no publicados o que constituyen Material Suplementario de los Artículos acompañan al texto en forma de Figuras.

## 1. Identificación y caracterización del transportador humano xCT, responsable del sistema $x_c^-$ .

Los resultados correspondientes a este apartado se encuentran recogidos en el **Artículo 1**. A continuación se presenta un resumen de los mismos.

### 1.1. Obtención de un nuevo cDNA

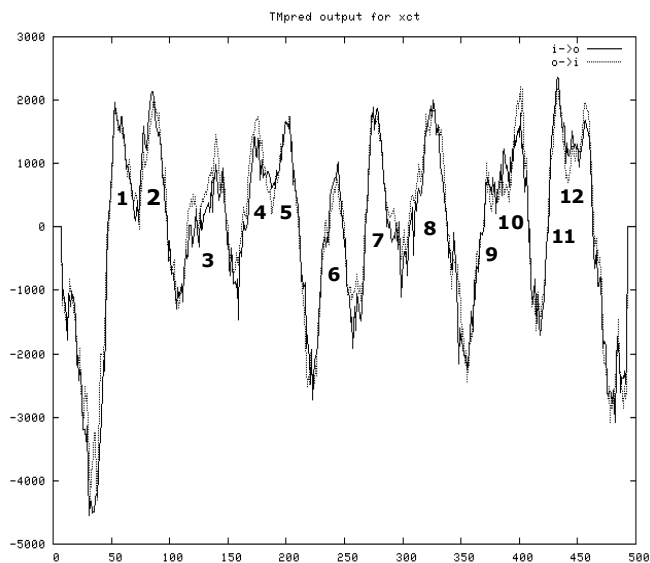
Como se ha comentado anteriormente, a finales de 1998 quedó establecida una nueva familia de transportadores de aminoácidos (Verrey et al., 1999): la familia HAT (*Heteromeric Amino acid Transporters*), formados por la unión de una subunidad pesada (HSHAT) y una subunidad ligera (LSHAT) (ver Introducción de esta memoria). Después de la clonación de rBAT (Bertran et al., 1993) y 4F2hc (Bertran et al., 1992a) humanos, en los dos últimos años se habían identificado las versiones humanas de LAT-1 (Prasad et al., 1999), LAT-2 (Rossier et al., 1999), y<sup>+</sup>LAT-1 (Pfeiffer et al., 1999b), y<sup>+</sup>LAT-2 (Broer et al., 2000), asc-1 (Nakauchi et al., 2000) y b<sup>0,+</sup>AT (Feliubadaló et al., 1999). Sin embargo, la recientemente identificada proteína de ratón xCT (Sato et al., 1999), responsable del transporte de aminoácidos aniónicos, todavía no tenía su ortólogo humano.

En este contexto, el grupo de G. Borsani y M.T. Bassi del Telethon Institute of Genetics and

Medicine de Milán (Tigem), en colaboración con nuestro grupo, utilizaron la secuencia de ratón de xCT (acc. n. AB022345) para encontrar secuencias homólogas en la base de datos humanos (*human dbEST*). Se identificaron dos ESTs humanas correspondientes a los números de acceso AI313891 y W00842, altamente homólogas a la proteína de ratón xCT. A partir de éstas, se sintetizaron dos oligonucleótidos específicos que se utilizaron para amplificar un *pool* de cDNAs de una línea celular humana indiferenciada de teratocarcinoma (NT2). El fragmento resultante, junto con el clon de IMAGE 290903 que cubría el extremo 3' del gen, generó un *contig* de 3144 kb con un ORF (*Open Reading Frame*) de 1503 pb. El producto proteico predicho presentaba un 89% de identidad y un 93% de similitud con la proteína xCT de ratón (Figura 1, Artículo 1), tratándose muy probablemente del ortólogo humano.

### 1.2. Caracterización de la proteína hxCT

La nueva proteína identificada, llamada hxCT (*human xCT*), era altamente homóloga al resto de miembros humanos de la familia LSHAT previamente descritos (43-58% de identidad) (Figura 2, Artículo 1). Incluso con los miembros no mamíferos de la familia se mantenían estas homologías (IU12 de *X. laevis* y SPRMI de *Platyhelminth*, 46 y 40% de identidad, respectivamente). De acuerdo con la estructura predicha para las subunidades ligeras, el perfil de hidrofobicidad de hxCT presentaba 12 dominios transmembrana (Figura 9). El análisis de la secuencia proteica revelaba que mantenía la cisteína implicada en la formación del puente disulfuro con la subunidad pesada (residuo 158) pero que no contenía el putativo lugar de glicosilación presente en el resto de miembros humanos de la familia (Figura 2, Artículo 1). De hecho, se había demostrado para LAT-1 y para LAT-2 que esta putativa glicosilación no tiene lugar (Segawa et al., 1999; Mastroberardino et al., 1998).



**Figura 9. Perfil de hidrofobicidad de hxCT.** El perfil se ha obtenido mediante el programa TMPred. Los picos muestran los 12 putativos segmentos TM. Las probabilidades de la predicción aumentan cuánto mayor es la altura de los picos por encima del valor 0. El eje inferior señala las posiciones de los residuos a lo largo de la secuencia de la proteína.

En resumen, las características de la nueva proteína mostraban que se trataba del séptimo miembro humano identificado de la familia LSHAT.

#### Localización cromosómica del gen *SLC7A11*

El mapaje de la localización cromosómica del gen de hxCT (*SLC7A11*) fue realizado por M.T. Bassi utilizando híbridos de radiación. Se determinó que el gen se encontraba en el cromosoma 4, concretamente en la región 4q28-q32 (entre los marcadores D4S2429 y D4S2659). El resultado se confirmó mediante *screening* de una librería de YACs (*Yeast Artificial Chromosome*), dando positivo para un clon de YAC del cromosoma 4. Posteriormente, el acceso público a la base de datos HTGS (*High Throughput Genomic Sequence Database*) de una secuencia parcial del cromosoma 4 humano (AC055827) también confirmó el resultado.

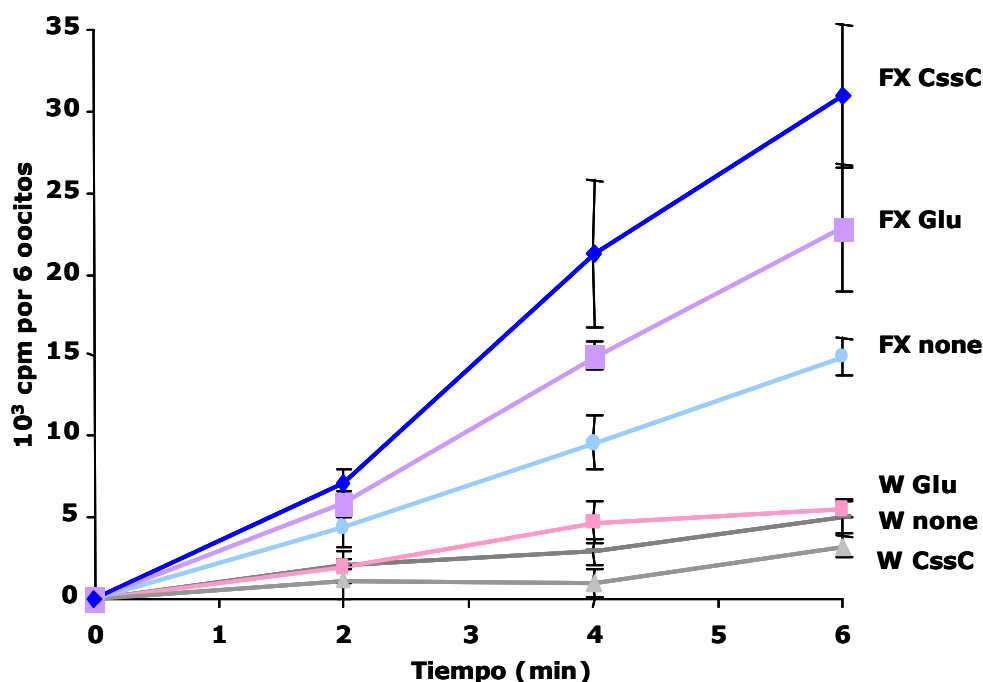
#### Inducción de una actividad de transporte de sistema $x_c^-$ en oocitos de *X. laevis*

Para la caracterización de la actividad de transporte, la doctoranda inyectó el cRNA de hxCT en oocitos de *X. laevis* sólo y en combinación con las cadenas pesadas humanas 4F2hc o rBAT. Los indicios que la nueva proteína era el ortólogo humano de la proteína de ratón responsable del sistema  $x_c^-$ , llevaron a testar los sustratos propios de este sistema de transporte (L-glutamato, L-cistina). La inyección de las cadenas pesadas 4F2hc y rBAT solas no indujo ninguna o muy pequeña actividad de transporte de L-glutamato y L-cistina (Figura 3, Artículo 1). xCT humano solo tampoco indujo ninguna actividad de transporte por encima del nivel basal de los oocitos no inyectados (Figura 3, Artículo 1). Sin embargo, cuando hxCT era inyectado en combinación con 4F2hc el transporte de L-glutamato y L-cistina aumentaba significativamente (de 7-50 veces para el L-glutamato y de 15-200 veces para la L-cistina) y el de L-aspartato también, aunque en menor medida. Esta actividad, además, era independiente de la presencia de sodio en el medio de transporte (Figura 3, Artículo 1). La inyección combinada de hxCT con rBAT, en cambio, no provocaba este efecto. Se demostraba que hxCT, en co-expresión con 4F2hc, inducía una actividad de transporte que correspondía a la descrita para el sistema  $x_c^-$  (Bannai, 1986).

Se había descrito recientemente que el sistema  $x_c^-$  era inhibido por L-lactato (Koyama et al., 2000). De acuerdo con esta observación, comprobamos que la presencia de L-lactato 2.5 mM en el medio de transporte inhibía al 50% la captación de L-glutamato 100  $\mu$ M (de  $12.1 \pm 1.5$  pmoles/10 min · oocito a  $6.0 \pm 0.7$  pmoles/10 min · oocito en presencia de L-lactato).

#### Los sustratos de hxCT se transportan de forma aniónica

Se evaluaron los perfiles de captación de L-cistina y L-glutamato en función del pH del medio de transporte (Figura 4, Artículo 1). Los resultados mostraron una clara dependencia de pH



**Figura 10. Trans-estimulación de la salida de L-glutamato en presencia de sustrato extracelular.** Se inyectaron 10 ng de cRNA humano de 4F2hc y xCT (FX) en oocitos. 30 horas después, se cargaron los oocitos en grupos de 6 con L-[<sup>3</sup>H]-Glutamato 100  $\mu$ M durante 1 hora. A continuación, se determinó la salida de L-glutamato radiactivo a distintos tiempos (0, 2, 4 y 6 min) en ausencia de sustrato en el medio extracelular (FX none) y en presencia de L-glutamato 100  $\mu$ M (FX Glu) o L-Cistina 300  $\mu$ M (FX CscC). Los controles de carga intracelular durante 1h fueron:  $1.6 \pm 0.2$  para W (oocitos no inyectados) y  $33.4 \pm 5.0$  para FX. Los oocitos inyectados únicamente con 4F2hc tuvieron un comportamiento similar a los no inyectados.

para el caso de la L-cistina: al aumentar el pH del medio en el rango ácido se incrementaba la captación mientras ésta disminuía en el rango de pH básico; el L-glutamato, en cambio, presentaba una captación prácticamente independiente de este valor, aunque con una ligera tendencia a disminuir con un pH básico (Figura 4, Artículo 1). Este comportamiento es consistente con las características del sistema  $x_c^-$  descritas anteriormente (Bannai, 1984b; Bannai and Kitamura, 1981b) y confirma que los sustratos de hxCT son transportados de forma aniónica, cada uno con una carga negativa neta.

El análisis cinético del transporte de L-glutamato y L-cistina para el transportador xCT/4F2hc, reveló que las  $K_m$  aparentes para los sustratos son de  $92 \pm 14$  y  $43 \pm 2$ , respectivamente (Figura 5, Artículo 1). Estos valores son similares a los que habían sido descritos anteriormente para el sistema  $x_c^-$  en fibroblastos diploides humanos (Bannai and Kitamura, 1980). Las  $V_{m\acute{a}x}$  de ambos

sustratos fueron de  $164 \pm 7$  pmol/15 min por oocito y  $50 \pm 1$  pmol/10 min por oocito, para L-glutamato y L-cistina, respectivamente, con coeficientes de Hill de  $1.12 \pm 0.09$  y  $1.04 \pm 0.04$  (Figura 5, Artículo 1).

#### **El transportador xCT/4F2hc es un intercambiador electroneutro con una estequiometría de intercambio 1:1**

La salida de aminoácido sustrato a través de xCT/4F2hc es dependiente de la presencia de sustrato en el medio extracelular (Figura 10). Esta característica atribuye al transportador un carácter de intercambiador obligatorio, característico de los miembros de la familia LSHAT (revisado en (Chillarón et al., 2001; Wagner et al., 2001)). Para estudiar la estequiometría de este intercambio, se cuantificó el glutamato que salía del oocito después de 10 min. de incubación en un medio con o sin 100  $\mu$ M L-cistina y se comparó con la L

cistina captada en el mismo tiempo (Tabla 1, Artículo 1). Esta cuantificación se hizo con un analizador automático de aminoácidos mediante cromatografía de intercambio catiónico (R. Martín del Río, Centro Especial Ramón y Cajal, Madrid). Ambos valores, entrada de cistina y salida de glutamato, eran similares ( $78 \pm 3$  y  $89 \pm 12$  pmol/10 min por oocito, respectivamente; Tabla 1, artículo 1). Este resultado, junto con el coeficiente de Hill cercano a 1 para el glutamato, indica que el intercambio cistina/glutamato tiene una ratio molar de 1:1.

### Localización de xCT humano en la membrana plasmática del oocito

Se preparó un constructo de hxCT con un epítipo *myc* en el extremo N-terminal para estudiar su localización celular por inmunocitoquímica. hxCT se encuentra en el interior de la célula cuando se inyecta solo o en combinación con rBAT en los oocitos de *X. laevis* pero llega a la membrana plasmática cuando la inyección se combina con 4F2hc (Figura 6, Artículo 1). En algunos casos, la sobre-expresión de una proteína en un sistema celular heterólogo conlleva interacciones inespecíficas con otras proteínas. Este fenómeno se ha descrito para algunos miembros de la familia LSHAT (Rajan et al., 2000a; Rajan et al., 1999), incluyendo posteriormente para xCT de ratón (Wang et al., 2003), que pueden interaccionar con la otra cadena pesada no implicada en el transporte. Sin embargo, este no es el caso de xCT humano, ya que la co-inyección con rBAT humano no es capaz de llevar xCT a la membrana del oocito (Figura 6, Artículo 1).

### Patrón de expresión de la proteína

M.T. Bassi estudió el patrón de expresión del gen *SLC7A11* mediante Northern blot. Después de una larga exposición, que confirma la baja expresión de este gen descrita anteriormente en ratón (Sato et al., 1999), se detectó una banda de ~12 kb, únicamente en cerebro (Figura 7, Artículo 1). La hibridación con una membrana de diferentes

regiones del sistema nervioso central mostró la misma banda de ~12 kb en todas las zonas testadas (cerebelo, córtex cerebral, medula, cordón espinal y putamen). El tamaño de esta banda, también descrito para xCT de ratón (Sato et al., 1999), es excesivamente grande en relación al tamaño esperado para un cDNA de 501 pb. Esto sugiere que podría tener lugar un *splicing* alternativo, poliadenilaciones alternativas o una combinación de ambos, tanto en el gen humano como en el de ratón. De hecho, el análisis por Northern blot de xCT de ratón en macrófagos de ratón estimulados con LPS (Lipopolisacáridos) y/o DEM (Dietilmaleato), además de la banda de ~12 kb descrita anteriormente, muestra dos transcritos más de 3.5 y 2.5 kb (Sato et al., 1999).

La baja expresión del gen humano de xCT (*SLC7A11*) llevó a examinar por RT-PCR (*Retro-Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) algunos de los tejidos que habían dado negativo en el análisis por Northern Blot, así como algunas líneas celulares humanas (Figura 8, Artículo 1). Se detectó señal en todas las líneas celulares testadas: Caco 2 (epitelio intestinal proveniente de carcinoma de colon diferenciado e indiferenciado), HEK293 (línea celular de riñón embrionario) y HepG2 (hepatocarcinoma humano). En cuanto a los tejidos, sólo se detectó en islotes pancreáticos humanos pero ni en hígado ni en riñón (Figura 8, Artículo 1).

**Artículo 1:**

**Identification and characterisation of human xCT that co-expresses, with 4F2 heavy chain, the amino acid transport activity system  $x_c^-$**

*Pflügers Archives-European Journal of Physiology 442: 286-296 (2001)*

Maria Teresa Bassi\*, Emma Gasol\*, Marta Manzoni, Marta Pineda, Mirko Riboni, Rafael Martín, Antonio Zorzano, Giuseppe Borsani and Manuel Palacín.

(\* , los autores han contribuido igualmente en este trabajo)

La doctoranda ha contribuido con la caracterización de la actividad de transporte inducida por xCT/4F2hc en oocitos de *X. laevis*, el análisis cinético de los sustratos, la estequiometría de intercambio del transportador y su localización celular.





Maria Teresa Bassi · Emma Gasol · Marta Manzoni  
Marta Pineda · Mirko Riboni · Rafael Martín  
Antonio Zorzano · Giuseppe Borsani · Manuel Palacín

## Identification and characterisation of human xCT that co-expresses, with 4F2 heavy chain, the amino acid transport activity system $x_c^-$

Received: 4 October 2000 / Received after revision: 17 January 2001 / Accepted: 17 January 2001 / Published online: 9 March 2001  
© Springer-Verlag 2001

**Abstract** We have identified a new human complementary deoxyribonucleic acid (cDNA), for the  $x_c^-$  amino acid transporter (HGMW-approved name *SLC7A11*; also known as human xCT), that, when co-expressed with the heavy chain of surface antigen 4F2 (4F2hc, also termed CD98), but not with rBAT, (related to the  $b^{0,+}$  amino acid transporter), induces system  $x_c^-$  transport activity in *Xenopus* oocytes. Human xCT is the seventh human member of the family of amino acid transporters that are subunits of 4F2hc or rBAT and, in view of its amino acid sequence identity (89%) with mouse xCT, is most probably the human orthologue thereof. The amino acid transport activity induced by the co-expression of human 4F2hc and xCT in *Xenopus* oocytes was sodium independent and specific for L-cystine, L-glutamate and L-aspartate. This activity also functioned in an exchange mode (e.g. cystine/glutamate) with a substrate stoichiometry of 1:1. Expression of human xCT alone in oocytes did not induce amino acid transport activity and the expressed xCT protein was localised intracellularly. When human xCT was co-expressed with 4F2hc, the former localised to the oocyte plasma membrane. Tissue-expression studies showed that human *SLC7A11* mRNA is expressed mainly in the brain, but also in pancreas and in

cultured cell lines. The transport characteristics of human xCT and the distribution of its tissue expression strongly suggest that it corresponds to the human amino acid transporter system  $x_c^-$ .

**Keywords** Human xCT amino acid transporter · 4F2 light chain · System  $x_c^-$  · Oocytes

### Introduction

Bannai and co-workers [6, 7], have described a plasma membrane-localised,  $Na^+$ -independent, anionic amino acid transport system that is highly specific for cystine and glutamate. This system, termed  $x_c^-$ , is electroneutral, exchanges the anionic form of cystine for glutamate with a molar ratio of 1:1 and is expressed almost ubiquitously in cultured mammalian cell lines [3, 24]. The gradient of substrate concentrations across the plasma membrane determines the direction of the exchange through system  $x_c^-$ . Under physiological conditions  $x_c^-$  mediates the influx of cystine and the efflux of glutamate because the cystine concentration is very low in the cytosol, due to its rapid reduction to cysteine, and, conversely, the concentration of glutamate is much higher inside the cells than in the extracellular fluid due to the activity of different isoforms of the amino acid transport system  $X_{AG}^-$  ( $Na^+$ - and  $K^+$ -dependent glutamate transporter) [3]; this prevents the rise in extracellular glutamate levels that, in the nervous system, induces seizures and causes excitotoxic neuronal death [16]. System  $x_c^-$  is thought to participate in a glutamine-cystine cycle that helps cells resist oxidative stress [5]. Glutamine, entering the cell via different transport systems (e.g. N, ASC and A), is converted to glutamate, which is exchanged for cystine via system  $x_c^-$ . The intracellular cystine is then reduced to cysteine, which is incorporated in proteins and glutathione, the latter protecting the cell against oxidative stress. Indeed, situations or agents that decrease intracellular glutathione (e.g. oxidative stress) are strong inducers of system  $x_c^-$ , this being interpreted as an adaptive response to maintain glutathione levels [8].

M.T. Bassi and E. Gasol contributed equally to this work.

E. Gasol · M. Pineda · A. Zorzano · M. Palacín (✉)  
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular,  
Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona,  
Avda. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain  
e-mail: mpalacin@porthos.bio.ub.es  
Tel.: +34-93-4034617, Fax: +34-93-4021559

M.T. Bassi · M. Manzoni · M. Riboni · G. Borsani  
Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM),  
San Raffaele Biomedical Science Park, 20312 Milan, Italy

R. Martín  
Departamento de Investigación, Centro Especial Ramón y Cajal,  
Ctra. de Colmenar Km 9, 28034 Madrid, Spain

#### Present address:

M.T. Bassi, M. Manzoni, G. Borsani,  
TIGEM, Via Pietro Castellino 111, 80131 Napoli, Italy

Recently, Sato et al. [54] have isolated by expression cloning two complementary deoxyribonucleic acids (cDNAs) [the heavy chain of the 4F2 cell-surface antigen (4F2hc), and xCT] from mouse macrophages encoding the transporter for system  $x_c^-$ . The expression of 4F2hc (also known as CD98) and xCT together, but not separately, induces system  $x_c^-$  transport activity in *Xenopus* oocytes. Mouse xCT shows significant homology with members of the family of light subunits of heteromeric amino acid transporters (LSHAT). This family comprises 12-transmembrane-domain proteins acting as light subunits linked via a disulphide bond to the membrane glycoproteins 4F2hc or rBAT (reviewed in [17, 37, 63]). These two homologous proteins are the heavy subunits of the heteromeric amino acid transporters, previously identified by their capacity to induce amino acid transport in oocytes (reviewed in [38, 39]). In the last 2 years, several LSHAT family members have been identified: human, rat, mouse, bovine and *Xenopus laevis* LAT-1 [12, 25, 31, 34, 60]; human, rat, mouse and rabbit LAT-2 [43, 45, 47, 55]; mouse and human asc-1 [20, 35]; human, rat and mouse cationic  $y^+$ LAT-1 and human  $y^+$ LAT-2 [41, 60]; human, rat, mouse and rabbit  $b^0+$ AT [15, 19, 40, 46] and mouse xCT [54]. In addition, a LSHAT member from the platyhelminth *Schistosoma mansoni* (SPRM1) has been identified [31, 56]. The interaction between 4F2hc or rBAT and the corresponding LSHAT allows the correct localisation of the complex to the plasma membrane, where it mediates amino acid transport with different substrate specificity depending upon the LSHAT involved (reviewed in [17, 37, 63]): (i) with 4F2hc, variants of system L for LAT-1 and LAT-2; system asc for asc-1; system  $y^+L$  for  $y^+$ LAT-1 and  $y^+$ LAT-2; system  $x_c^-$  for xCT; (ii) with rBAT system  $b^0+$  for  $b^0+$ AT. The mouse protein xCT was the first LSHAT found to express transport of anionic amino acids. The relevance of these heteromeric transporters in amino acid transport has been shown by the fact that mutations in  $y^+$ LAT-1,  $b^0+$ AT and rBAT cause lysinuric protein intolerance, non-type I and type-I cystinuria respectively, three inherited aminoacidurias [19, 13, 14, 61].

Here we report the isolation of the human orthologue of mouse xCT, termed *SLC7A11* [solute carrier family 7, member 11; Human Genome Mapping Workshop (HGMW)-approved gene symbol and name] and the functional characterisation of its putative protein product human xCT. This novel protein is the seventh human member of the LSHAT family to be described. The expression of *SLC7A11* in embryonic and tumour cell lines suggests possible induction of the  $x_c^-$  system in growing cells.

## Materials and methods

### Human xCT cDNA cloning

Searches in the data base for human expressed sequence tags (dbEST) were performed as previously described [1]. The IMAGE cDNA clone corresponding to a portion of the xCT transcript was

obtained from the UK Human Genome Mapping Project (HGMP) Resource Centre. The human xCT-specific oligonucleotide primers used to amplify the human xCT cDNA from NT2 (human undifferentiated teratocarcinoma cell line) cDNA were as follows: HCYSG1 5'-ATGGTCAGAAAGCCTGTTG-3' and HCYSG2 5'-TCTTCTGGTACAACCTCCAGTATTA-3'. A cDNA pool from NT2 was prepared using the random hexamers and the Gibco-BRL cDNA transcription kit according to the manufacturer's instructions starting from 5 µg total ribonucleic acid (RNA). The polymerase chain reaction (PCR) was carried out in a final volume of 50 µl using Taq Gold (Perkin Elmer) in buffer conditions as recommended by the manufacturer, at an annealing temperature of 55 °C.

To add a poly(adenylate) [poly(A)] tail and a 5'-untranslated region (UTR) to the open reading frame (ORF) of human xCT, an *EcoRI* fragment of human xCT was subcloned (after Klenow reaction) into the *NcoI/SalI* fragment of pNKS2-*myc* "NotI" vector (a gift from G. Schmalzing). To create an N-myc-tagged human xCT cDNA, pNKS2-hxCT was PCR-amplified with primers 3'-CGGACTTACCGCTTACCCTG-5' and 5'-CAAGCGGTGCGAC-ATGGTCAGAAAGCCTGTTGTG-3' (containing an *AccI* site and the first 21 nt of the ORF of human xCT). The PCR product was digested with *AccI* and *NotI*. The resulting fragment was subcloned into the pNKS2-*myc* *NotI* vector. The N-myc-tagged human xCT cDNA was verified by 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.

### Computer analysis

Amino acid or nucleotide sequence homology searches and the prediction of transmembrane segments of human xCT were performed as indicated elsewhere [60].

### Chromosome mapping

For radiation hybrid (RH) mapping, we used the Genebridge 4 panel (Research Genetics, Huntsville) which includes 93 human/hamster clones. For each hybrid clone 25 ng DNA was used for PCR amplification in 96-well microtitre plates with the following primers, located in the 3'-UTR region of xCT: HCYSG-RH1 5'-ACTCCTTTTGTATTATCACCAAAG-3' and HCYSG-RH2 5'-TGGAAGTTGTACCAGAAGAAG-3'. The PCR reaction was carried out using Taq Gold (Perkin Elmer) at 55 °C as annealing temperature under buffer conditions suggested by the Taq manufacturer. Results were sent to the Radiation Hybrid Mapper server at Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/contig/rhmapper.pl>).

### Oocytes, injections and uptake measurements

Oocyte origin, management and injections were as described elsewhere [11]. Defolliculated, stage-VI *Xenopus laevis* oocytes were injected with human 4F2hc, human rBAT, human xCT or N-myc-hxCT cRNA, alone or in combination (10 ng/oocyte). Synthesis of human 4F2hc and rBAT cRNA has been described elsewhere [9, 10]. Human xCT cRNA and xCT-*myc* cRNA was obtained by cutting the cDNA with *NotI* and using SP6 polymerase.

Influx rates of L-[<sup>3</sup>H]glutamate, L-[<sup>14</sup>C]aspartate and L-[<sup>35</sup>S]cystine (Amersham Pharmacia Biotech) were measured at 1 µCi/µl in 100 mM choline-Cl or 100 mM NaCl medium on the days after injection as indicated and under linear conditions as described elsewhere [11]. Amino acid transport rates obtained with oocytes injected with water (50 nl) were similar to those of non-injected oocytes (data not shown). Kinetic parameters of the induced transport were estimated by using the Hill equation:  $V = V_{max} [S]^n / ([S]^n + K_m^n)$ , where  $n$  is the Hill coefficient,  $[S]$  the

amino acid concentration,  $V_{\max}$  the extrapolated maximal transport and  $K_m$  the apparent Michaelis-Menten constant.

For efflux experiments, nine oocytes were incubated in 125  $\mu$ l choline-Cl medium for 10 min at 30 °C in the presence or absence of 100  $\mu$ M L-cystine. The incubation medium was acidified by adding sulphosalicylic acid to a final concentration of 10% (v/v), centrifuged at 12,000 g for 20 min and the supernatants containing the free amino acids stored at -20 °C until analysis. After neutralisation with NaOH, glutamate content was measured using reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) with *O*-phthalaldehyde precolumn derivatisation, as described elsewhere [27]. In some cases the identity of glutamate was further assessed by cation-exchange chromatography using a high-performance automatic amino acid analyser (Beckman 6300) with ninhydrin post-column reaction. The concomitant influx of 100  $\mu$ M L-[<sup>35</sup>S]cystine (1  $\mu$ Ci/ $\mu$ l) was determined, as indicated above, in groups of nine oocytes from the same batch used for the efflux measurements. The free glutamate content of *Xenopus* oocytes was determined by HPLC, as above, in 20- $\mu$ l aliquots of homogenates obtained by crushing four oocytes, resuspending in 200  $\mu$ l 15% sulphosalicylic acid (w/v) solution and centrifuging (10 min, 12,000 g) with the aid of 1-mm-diameter glass beads. Supernatants were left to stand for 20 min at room temperature and then stored at -20 °C until analysis.

#### Localisation of human xCT expression by confocal microscopy

Groups of five oocytes were prepared for immunofluorescence 2 days after injection with 10 ng human 4F2hc, human rBAT or N-myc-human xCT cRNA per oocyte, alone or in combination. Oocytes were placed in 500-mm<sup>3</sup> cryomoulds (Tissue-Tek, Miles, Elkhart, Ind., USA), then sliced, fixed and permeabilised as described elsewhere [18]. Slices were incubated with monoclonal antibody 9E10 anti-myc (ATCC, Manassas, Va., USA), diluted 1:500 in 10% phosphate-buffered saline (PBS), at room temperature for 1 h. Slices were washed 3 times in PBS, incubated with 7.5  $\mu$ g/ml Texas red-conjugated goat anti-mouse (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) at room temperature for 1 h, washed 3 times in PBS and mounted in immunofluore (ICN, Madrid, Spain).

#### Northern blot and reverse transcription (RT)-PCR analyses

Two Northern blots from Clontech (Clontech, Palo Alto, Calif., USA), each containing 2  $\mu$ g poly[A<sup>+</sup>] RNA, human 12-lane MTN blot (containing RNA from 12 different adult tissues) and human brain MTN Blot II (carrying different portions of human central nervous system) were hybridised with a probe corresponding to the human xCT cDNA region nt 1475–2618. Hybridisation was carried out in Express HybTM Hybridisation solution (Clontech), and wash conditions were as recommended by Clontech.

All cDNAs used in RT-PCR experiments were prepared using the Gibco-BRL kit for cDNA synthesis according to the manufacturer's instructions starting from 5  $\mu$ g total RNA. The RNAs were prepared using standard protocols [52]. RT-PCR experiments on human samples were carried out with the same primers (HCYSG1 and HCYSG2) used to amplify the full length *SLC7A11* cDNA from the NT2 cDNA pool as described above. The RT-PCR fragments were sequenced to demonstrate identity to *SLC7A11* cDNA. For mouse cDNA samples, the primers used for mouse xCT cDNA were: MXCTF1 5'-AAGTGGTTCAGACGATTATCAG-3' and MXCTR 5'-AAGAAACGTGGTAGAGGAATG-3'. The cDNAs were then checked and normalised with respect to the  $\beta$ -actin gene for the mouse samples and *PGK1* gene (phosphoglycerate-kinase gene 1) for the human samples. The sequence of the oligonucleotide primers used for this purpose was as follows: Act1 5'-AAGAGTATCCTGAGTCCATGAGTAC-3' and Act2 5'-ACCTGACCATCAGGAGTTCATAGC-3' for  $\beta$ -actin and HPGK-R1 5'-TCGGCTCCCTCGTTGACCGA-3' and HPGK-R2 5'-AGCTGGGTTGGCACAGGCTT-3' for *PGK1*. The PCR reac-

tions were carried out under standard conditions at the annealing temperature of 53 °C and 52 °C for  $\beta$ -actin and *PGK1* respectively.

#### Accession numbers

The *SLC7A11* nucleotide sequence reported in this article was deposited at the EMBL/GenBank under the accession number AJ277882. During the course of our study, a human xCT nucleotide sequence was deposited at the GenBank under the accession number AB026891. The ORF of both cDNAs shows the same amino acid sequence.

## Results

### cDNA isolation

The entire nucleotide sequence of the mouse xCT cDNA (accession no. AB022345) was used as a query to search the human dbEST. Two highly similar human ESTs were identified (accession nos. AI313891 and W00842) at the 5'- and 3'-ends of the query sequence respectively. Oligonucleotide primers synthesised on these human ESTs i (see Materials and methods) were used to amplify a pool of cDNAs obtained from a human undifferentiated teratocarcinoma cell line (NT2) and a 1.2-kb fragment was obtained and fully sequenced. This nucleotide sequence was then assembled with the complete sequence of the IMAGE clone 290903, covering the 3'-portion of the gene, to generate a contig of 3144 kb showing an ORF of 1503 bp. The 501-amino-acid predicted protein product shows 89% identity and 93% similarity to the mouse xCT protein (Fig. 1), [54] and is probably the human orthologue of this mouse protein.

The newly identified protein, termed hxCT, is highly homologous to all the other human LSHAT family members previously described (Fig. 2): y<sup>+</sup>LAT-1 (55% similarity and 43% identity), y<sup>+</sup>LAT-2 (56% similarity and 44% identity), b<sup>0,+</sup>AT (56% similarity and 43% identity), LAT-2 (56% similarity and 44% identity), LAT-1 (58% similarity and 45% identity). Moreover, significant homology is also detected with non-mammalian members of the family such as the *Xenopus* protein IU12 (58% similarity and 46% identity) and the platyhelminth protein SPRM1 (53% similarity and 40% identity). Like its mouse counterpart, and in accordance with the membrane topology predicted for the other members of the family, (reviewed in [17, 37, 63]) the hydrophobicity profile of hxCT protein indicates 12 transmembrane domains. The putative N-glycosylation site in the y<sup>+</sup>LAT and LAT members and b<sup>0,+</sup>AT (see Fig. 2), though cytoplasmic according to the predicted model, is not present in human or mouse xCT [54], mouse asc-1 [20] or SPRM1 [31]. Indeed, lack of glycosylation has been shown for LAT-1 and LAT-2 [31, 55]. The cysteine residue conserved in all LSHAT members and involved in the disulphide bond with the corresponding heavy subunit (e.g. rBAT or 4F2hc) [42] is also conserved in human xCT (amino acid residue 158) (Fig. 2).

Fig. 1 Amino acid sequence alignment of human and mouse xCT. Alignment was performed using the program CLUSTALW Sequence Alignment from the Baylor College of Medicine. Identical amino acids are indicated in grey boxes

Table showing amino acid sequence alignment for mouse and human xCT. The table lists sequences for mouse and human at various positions (60, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480, 502, 501) with identical amino acids highlighted in grey boxes.

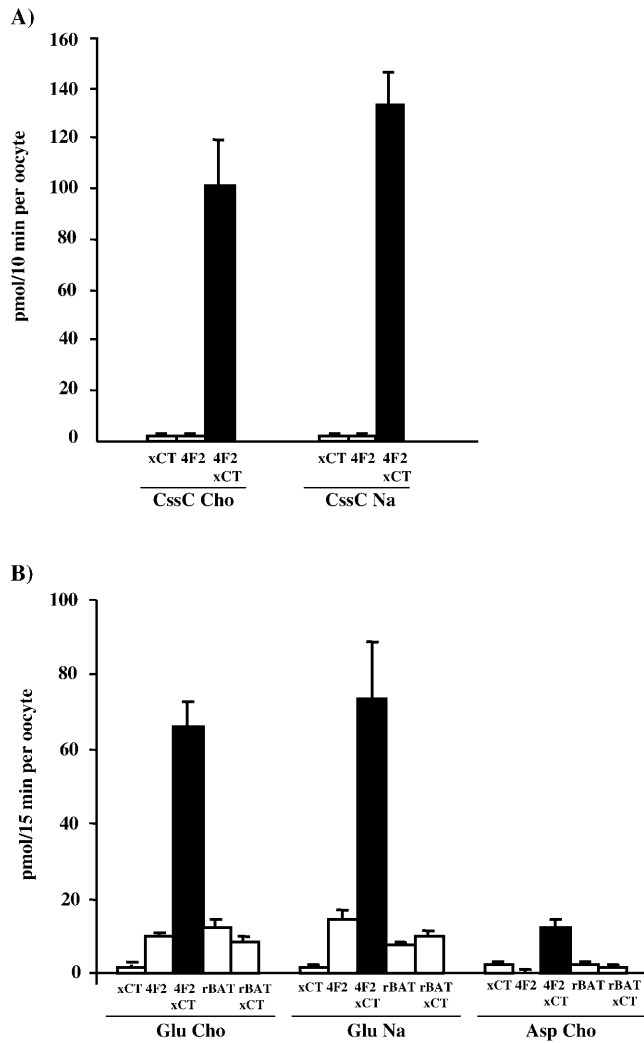
Fig. 2 Amino acid sequence multialignment of the six human members of the light subunits of heteromeric amino acid transporters (LSHAT) family. Multialignment was performed using the program CLUSTALW Sequence Alignment. The thin horizontal lines indicate the 12 putative transmembrane domains determined by computer analysis (see Materials and methods). The amino acid residues conserved in all human LSHAT sequences are indicated in grey boxes. The conserved cysteine residue, involved in disulphide bridge with the corresponding heavy subunit, is indicated with a star. The N-glycosylation consensus sequence conserved in all LSHAT members, but not in human and mouse xCT and SPRM1, is boxed

Table showing a multialignment of amino acid sequences for six human members of the LSHAT family (hb0, hb1, hb2, hb3, hb4, hb5). The alignment includes 12 putative transmembrane domains (I-XII) indicated by thin horizontal lines. Conserved residues are in grey boxes, and a conserved cysteine residue is marked with a star. A boxed region indicates an N-glycosylation consensus sequence. The alignment ends with residues 501-523.

Mapping of human SLC7A11 gene

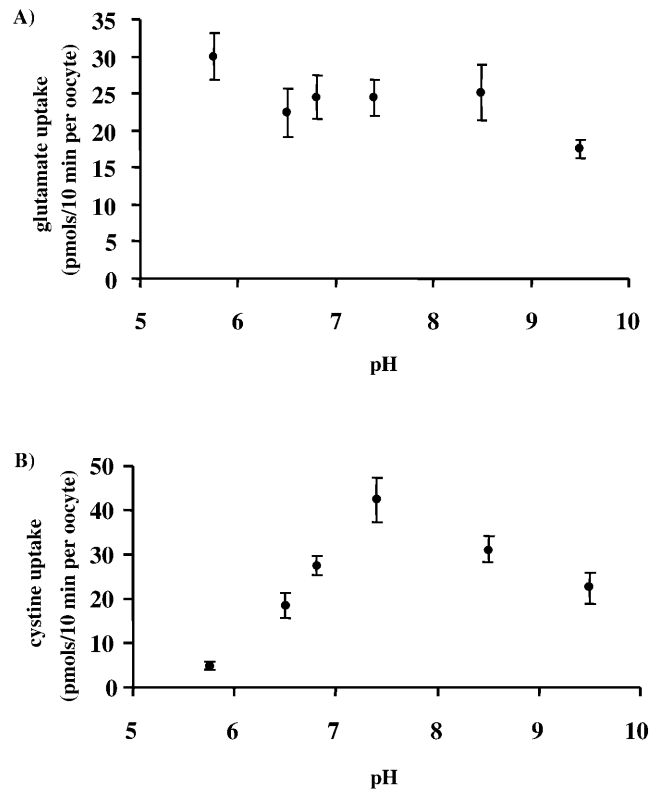
The SLC7A11 gene was mapped using a set of primers (HCYSG-RH1 and -RH2, located in the coding region and in the 3'-UTR respectively (see Materials and

methods) on the Radiation Hybrid mapping panel Gene-bridge 4 (Research Genetics, Huntsville). SLC7A11 mapped on chromosome 4q28-q32 between D4S2429 and D4S2659. A yeast artificial chromosome (YAC) library was also screened and a chromosome 4 YAC



**Fig. 3A, B** Co-expressed amino acid transport activity by human 4F2hc and xCT. Oocytes were injected with human xCT, 4F2hc (4F2) or rBAT complementary ribonucleic acid (cRNA) alone and in combination. Between 2 and 3 days after the injection, the uptake of **A** 50  $\mu\text{M}$  L-[ $^{35}\text{S}$ ] cystine (*CysC*) or **B** 100  $\mu\text{M}$  L-[ $^3\text{H}$ ]glutamate (*Glu*) and 100  $\mu\text{M}$  L-[ $^{14}\text{C}$ ] aspartate (*Asp*) in the presence (*Na*;  $\text{Na}^+$ -containing medium) or absence (*Cho*; choline-containing medium) of 100 mM NaCl was determined for 10 or 15 min, as indicated. Transport in oocytes injected with human xCT in combination with 4F2hc is highlighted in *closed bars*. Amino acid uptake was calculated by subtracting the uptake in non-injected from that in the cRNA-injected groups. Amino acid uptake of non-injected oocytes was: L-[ $^{35}\text{S}$ ]cystine uptake:  $0.6 \pm 0.1$  (Cho) and  $0.6 \pm 0.1$  (Na). L-[ $^{14}\text{C}$ ]aspartate uptake:  $7.4 \pm 0.9$  (Cho). L-[ $^3\text{H}$ ]glutamate uptake:  $2.8 \pm 0.6$  (Cho) and  $3.6 \pm 0.7$  (Na). Data are means  $\pm$  SEM from representative experiments with  $n=6-7$  oocytes/group, and with different batches of oocytes in each case

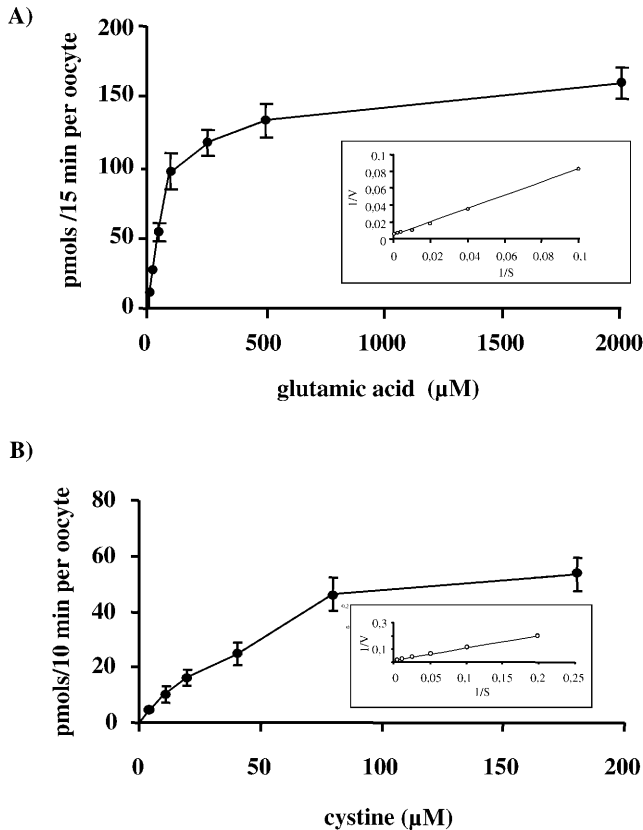
clone positive for *SLC7A11*, 912A2 was obtained that confirmed the mapping. A partial genomic sequence AC055827 from chromosome 4 has become available recently in the public High Throughput Genomic Sequence database (HTGS), which also provided confirmation.



**Fig. 4A, B** pH profile of the uptake of L-glutamate and L-cystine. Oocytes were injected with 4F2hc and xCT cRNA and, 2 days after the injection, the uptake of 100  $\mu\text{M}$  L-[ $^3\text{H}$ ]glutamate (**A**) or 100  $\mu\text{M}$  L-[ $^{32}\text{S}$ ]cystine (**B**) in the absence of sodium was determined for 10 min at different pH values (5.75, 6.5, 6.8, 7.4, 8.5 and 9.5). Uptake in non-injected oocytes was 0.4–0.6 pmols/10 min per oocyte for L-cystine and 0.9–2.3 pmols/10 min per oocyte for L-glutamate, and was subtracted from that of cRNA-injected oocytes. Data are means  $\pm$  SEM from a representative experiment with  $n=11-13$  oocytes/group

#### Induction of system $x_c^-$ activity by expression of human 4F2hc and xCT in oocytes

cRNA from human *SLC7A11* was injected into oocytes alone or in combination with an equal amount of human 4F2hc or human rBAT cRNA and the oocytes tested for amino acid transport (Fig. 3). 4F2hc or rBAT alone induced very little, if any, L-glutamate, L-cystine or L-aspartate transport activity, depending on the batch of oocytes used. Human xCT alone also did not induce amino acid transport above background (i.e. transport in non-injected oocytes). When 4F2hc and xCT were co-injected, induction of L-glutamate, L-cystine or L-aspartate transport activity increased: (e.g. 7- to 50-fold for L-[ $^3\text{H}$ ] glutamate and 15- to 200-fold for L-[ $^{35}\text{S}$ ] cystine over transport in oocytes expressing 4F2hc alone;  $n=3-4$  independent experiments, data not shown). The 4F2hc/xCT-induced transport activity was sodium independent (Fig. 3). In contrast, transport activity was not induced when xCT was co-injected with rBAT. The substrate specificity of 4F2hc/xCT-induced transport activity (i.e. sodium-independent transport of L-cystine, L-gluta-



**Fig. 5A, B** Kinetic analysis of L-glutamate and L-cystine transport co-expressed by human 4F2hc and xCT. Oocytes were injected with human 4F2hc and xCT cRNA and, 2 days after the injection, the uptake of L-[<sup>3</sup>H]glutamate in the absence of sodium was determined for 15 min at different substrate concentrations (10, 25, 50, 100, 250, 500 and 2000 μM, **A**) and the uptake of L-[<sup>35</sup>S]cystine in the absence of sodium was determined for 10 min at different concentrations (5, 10, 20, 40, 80 and 180 μM, **B**). Transport in non-injected oocytes was subtracted from that of cRNA-injected oocytes. Data are means±SEM from a representative experiment with  $n=6-7$  oocytes/group. *Inset*: Lineweaver-Burk plot ( $r=0.99$ ,  $P<0.001$ )

mate and L-aspartate) corresponded to that of system  $x_c^-$  [53]. L-Lactate is known to inhibit system  $x_c^-$  [26]. In agreement with this, L-lactate inhibited the L-glutamate transport induced by 4F2hc and xCT in oocytes: 4F2hc/xCT-induced transport of 100 μM L-[<sup>3</sup>H] glutamate in choline medium was  $12.1\pm1.5$  pmol/10 min per oocyte and  $6.0\pm0.7$  pmol/10 min per oocyte in the presence of 2.5 mM L-lactate (mean±SE from seven oocytes of a representative experiment).

The pH profiles for the L-cystine and L-glutamate transport induced by 4F2hc and xCT in oocytes are shown in Fig. 4. L-Cystine transport showed a marked dependence on pH; it was strongly enhanced on elevating the pH of the uptake medium in the acidic pH range and decreased in the basic pH range. L-Glutamate transport, however, was almost independent of the pH, although there was a tendency for transport to decrease with a basic uptake medium pH. This behaviour of the 4F2hc/xCT-induced transport is consistent with that of system  $x_c^-$  in human diploid fibroblasts in culture [2, 7] and confirms that L-cystine and L-glutamate are transported by system 4F2/xCT (i.e. system  $x_c^-$ ) with a net negative charge. Kinetic analysis of the transport of L-glutamate and L-cystine induced by human 4F2hc/xCT revealed apparent  $K_m$ s of  $92\pm14$  and  $43\pm2$  μM,  $V_{max}$  values of  $164\pm7$  pmol/15 min per oocyte and  $50\pm1$  pmol/10 min per oocyte and Hill coefficients of  $1.12\pm0.09$  and  $1.04\pm0.04$  for L-glutamate and L-cystine respectively (Fig. 5). The apparent  $K_m$ s are very similar to that described for system  $x_c^-$  in human diploid fibroblasts [6].

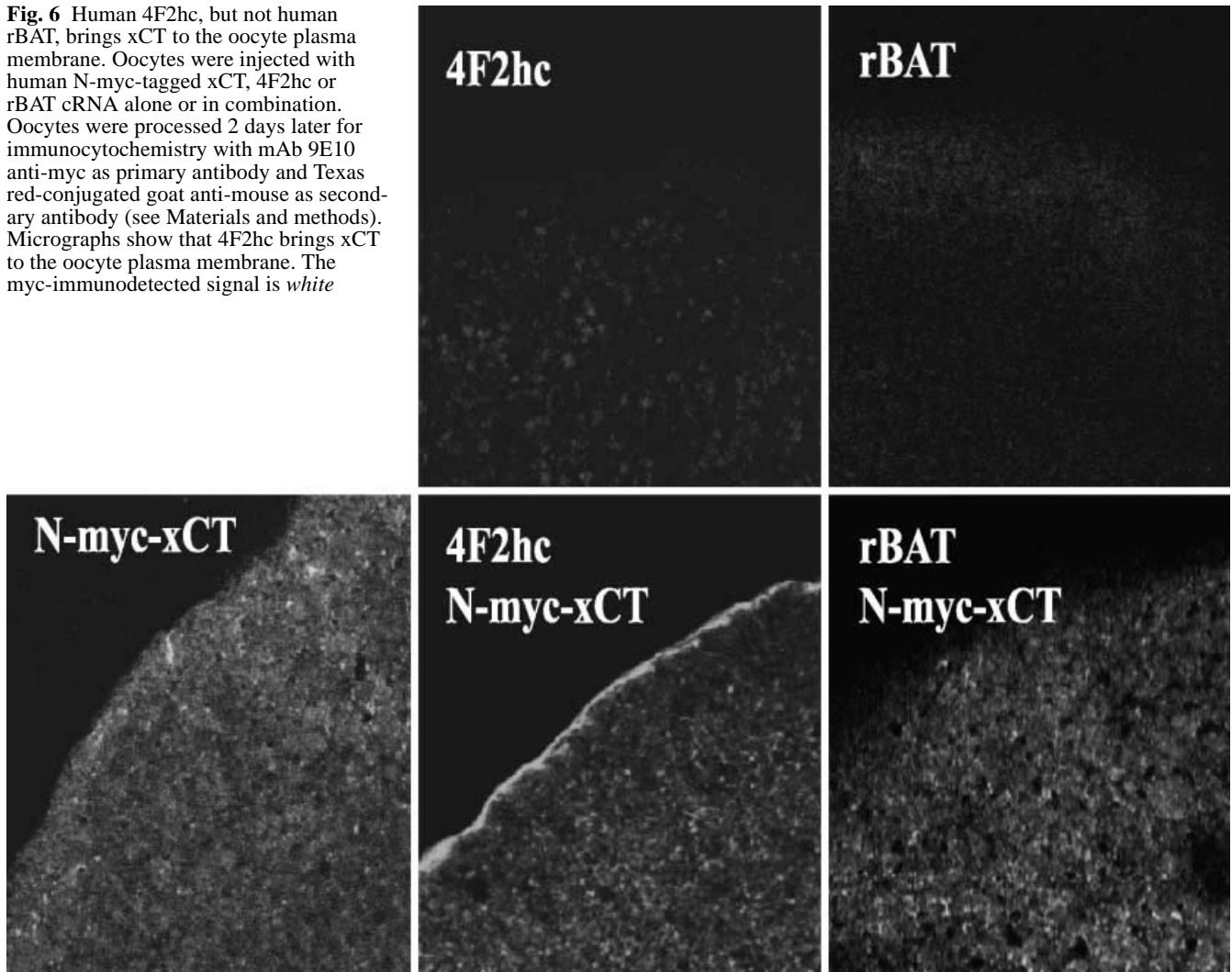
In agreement with the previous report on mouse 4F2hc and xCT, efflux via human 4F2hc/xCT-induced amino acid transport depended on the presence of substrate in the external medium. Thus, Table 1 shows that L-glutamate efflux in *trans* zero conditions (i.e. no amino acid substrate in the medium) in oocytes expressing human xCT/4F2hc was identical to that of non-injected oocytes or oocytes expressing 4F2hc alone. In contrast, L-glutamate efflux was high with 100 μM L-cystine in the medium. The influx of 100 μM L-[<sup>35</sup>S] cystine and

**Table 1** L-Cystine/L-glutamate heteroexchange via system  $x_c^-$  (4F2hc/xCT). Oocytes were non-injected or injected with human 4F2hc or human 4F2hc plus xCT complementary ribonucleic acid (cRNA). In the same batch of oocytes the influx 100 μM L-[<sup>35</sup>S]-cystine and the efflux of L-glutamate were measured 2 days after injections. Induced transport was calculated by subtracting transport in non-injected oocytes from that in cRNA-injected oocytes.

L-cystine-dependent L-glutamate efflux was calculated by subtracting efflux in *trans* zero (0, i.e. no cystine in bathing medium) conditions from that in the presence of 100 μM L-cystine in the medium, and then subtracting that efflux in non-injected oocytes. Glutamate content corresponds to the measurement in two groups of four oocytes each. Transport data are means±SEM,  $n=7$  oocytes (influx) and 9 oocytes (efflux)

	Glutamate content (pmol/oocyte)	Total transport (pmol/10 min per oocyte)			Induced transport (pmol/10 min oocyte)	
		100 μM L-cystine uptake	L-glutamate efflux under <i>trans</i> conditions		L-cystine influx	L-cystine-dependent L-glutamate efflux
			0	100 μM L-cystine		
Non-injected	3264; 3068	$0.5\pm0.04$	$12\pm4$	$17\pm3$	–	–
4F2hc	3486; 3503	$0.9\pm0.3$	$14\pm4$	$15\pm3$	$0.4\pm0.2$	$-4\pm3$
4F2hc/xCT	3346; 3289	$78\pm3$	$19\pm2$	$113\pm12$	$78\pm3$	$89\pm12$

**Fig. 6** Human 4F2hc, but not human rBAT, brings xCT to the oocyte plasma membrane. Oocytes were injected with human N-myc-tagged xCT, 4F2hc or rBAT cRNA alone or in combination. Oocytes were processed 2 days later for immunocytochemistry with mAb 9E10 anti-myc as primary antibody and Texas red-conjugated goat anti-mouse as secondary antibody (see Materials and methods). Micrographs show that 4F2hc brings xCT to the oocyte plasma membrane. The myc-immunodetected signal is *white*



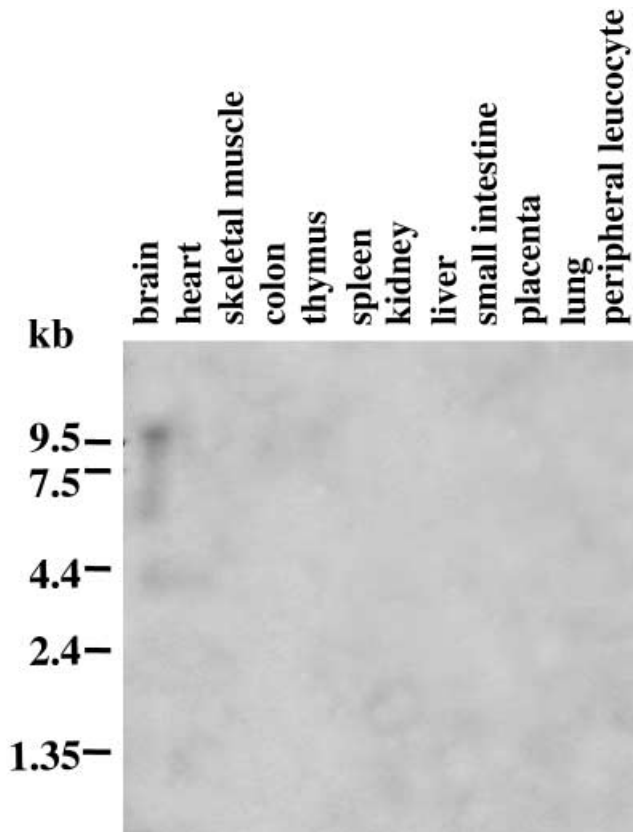
the 100  $\mu$ M L-cystine-dependent efflux of glutamate through human 4F2hc/xCT (system  $x_c^-$ ) were nearly equal (Table 1). Moreover, the expression of human 4F2hc and xCT alone or in combination did not change the oocyte content of L-glutamate (Table 1). This free L-glutamate pool is very large; in comparison the L-aspartate and cystine/cysteine content is almost negligible [59]. Taken together, these results and the fact that the Hill coefficient of the glutamate transport is close to 1 (see above), indicates that cystine/glutamate exchange via the human amino acid transporter 4F2hc/xCT occurred at a 1:1 molar ratio. All these transport characteristics induced by human 4F2hc and xCT correspond to those of system  $x_c^-$ , [3, 6, 7, 54].

In agreement with previous results showing that 4F2hc brings LSHAT to the oocyte plasma membrane (e.g. SPRM1 [31], LAT-2 [43] and  $\gamma$ -LAT-1 [33]), Fig. 6 shows that N-myc-tagged human xCT reached the oocyte plasma membrane when co-injected with 4F2hc but remained intracellular when injected alone or when co-injected with human rBAT. The myc-immunodetected signal is visible inside the oocyte when xCT is expressed

alone or when it is co-expressed with rBAT, but appears at the plasma membrane when co-expressed with 4F2hc. The signal is almost absent in oocytes expressing 4F2hc or rBAT alone. The induced uptake of 100  $\mu$ M L-[ $^3$ H]glutamate (choline medium) was  $3.5 \pm 0.9$  (N-myc xCT),  $4.2 \pm 0.7$  (4F2hc),  $75.8 \pm 10.6$  (4F2hc/xCT) and  $50.0 \pm 8.5$  pmol/10 min per oocyte (4F2hc/myc-hxCT), in the same batch of oocytes. The N-myc-tagged human xCT thus also induces amino acid transport activity when co-injected with 4F2hc in oocytes.

#### Expression pattern

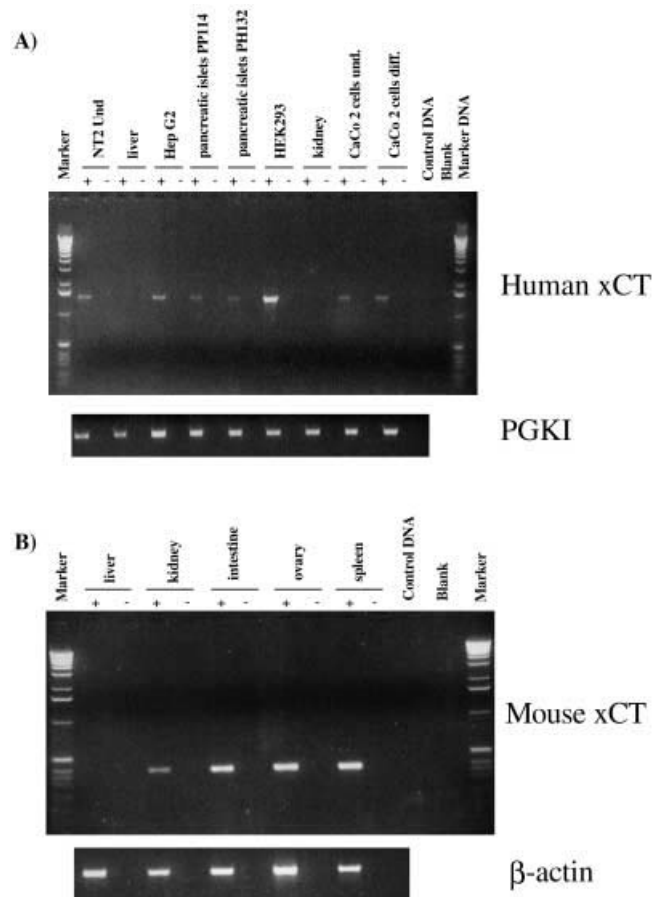
The *SLC7A11* expression pattern was first tested by Northern analysis, using as a probe a cDNA fragment spanning part of the coding region and a portion of the 3'-UTR on a Northern blot (see Materials and methods) as indicated in Fig. 7. A single, faint band of approximately 12 kb was only barely detectable in brain, even after long exposure, confirming the low expression of the human gene in adult tissues as already described for



**Fig. 7** Tissue distribution of human xCT mRNA. The complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) probe prepared as described in Materials and methods, was hybridised with a commercial Northern blot (Clontech) containing 2 µg of polyA<sup>+</sup> RNA from various human adult tissues

mouse [54]. Hybridisation of a Northern blot with different regions of human CNS (Human Brain MTN Blot II) with the same probe showed the same ~12 kb signal in all regions tested (cerebellum, cerebral cortex, medulla, spinal cord and putamen) (data not shown). A transcript of the same size has also been reported in mouse adult brain, whilst in RNA from cultured murine macrophages, three different transcripts have been reported (12, 3.5 and 2.5 kb) [54]. The small size of the human (present study) and mouse [54] cDNAs compared with the corresponding transcript detected by Northern on adult tissues suggests that alternative splicing, alternative polyadenylation sites or a combination of the two could occur either in the mouse or human genes.

To examine the possibility of a low expression level of *SLC7A11* in tissues other than brain, some of the adult human tissues that had proven negative by Northern analysis were tested by RT-PCR, together with human cell lines as indicated in Fig. 8a. A comparative analysis was also carried out on some of the corresponding mouse adult tissues as shown in Fig. 8b. RT-PCR was positive in mouse intestine and in human intestinal epithelium from a undifferentiated or differentiated colon carcinoma cell line (Caco 2 cells) while a faint signal on-



**Fig. 8** Reverse transcriptase (RT) polymerase chain reaction (RT-PCR) experiment on different human tissues and cell lines (A) and mouse tissues (B). Cells from the Caco 2 line were differentiated by growing the cells to confluence (18 days). Pancreatic islet mRNA, a gift from R. Gomis and C. Benito, was obtained as described [51]. The + and - signs indicate the presence or absence respectively of RT in the reaction. Control DNA is human genomic DNA (A) and mouse genomic DNA (B)

ly was detected in mouse kidney and no signal in the human tissue. Nevertheless, a human kidney embryonic cell line HEK293 expresses *SLC7A11*. A similar strong signal was detected in human pancreatic islets and in the human hepatocarcinoma cell line HepG2, whereas no signal was visible in normal liver in either species.

## Discussion

In this study we report the isolation and functional characterisation of a novel human cDNA, the protein product of which shows a high sequence identity with a recently identified mouse protein termed xCT. The amino acid sequence, the amino acid transport activity and the tissue distribution of human xCT demonstrated that it is the human orthologue of mouse xCT [54]. Thus, co-expression of human 4F2hc and xCT in oocytes resulted in the induction of amino acid transport activity with characteristics (e.g. sodium-independent exchange of cystine-gluta-



mate with a molar exchange ratio of 1:1) of system  $x_c^-$  [3, 6, 7, 54]. The analysis of the Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) makes it unlikely that *SLC7A11* gene is involved in the pathogenesis of any of the genetic diseases mapping to the 4q28-q32 chromosomal interval. Significant sequence identity is also shared with all the other members of the LSHAT family from different species, belonging to different transport systems such as L,  $y^+L$ , asc and  $b^{0,+}AT$ . This sequence homology, together with the conservation of the cysteine residue within the loop between the third and fourth transmembrane domain, which is involved in the formation of the disulphide bridge between the LSHAT and the heavy subunits (4F2hc or rBAT), show that the novel protein is an additional member of the LSHAT family. Within this family it is the seventh human member so far identified after LAT-1, LAT-2, asc-1,  $y^+LAT$ -1,  $y^+LAT$ -2 and  $b^{0,+}AT$ .

Induction of the amino acid transport function associated with the LSHAT members requires the expression of either of the two identified heavy subunits, rBAT or 4F2hc (reviewed in [17, 37, 63]): LAT-1 and -2, asc-1,  $y^+LAT$ -1 and -2 and xCT require 4F2hc, whereas  $b^{0,+}AT$  requires rBAT. This is based on several lines of evidence including amino acid transport induction, trafficking to the plasma membrane and co-immunoprecipitation studies in cell expression systems. Only for 4F2hc and LAT-1 has co-immunoprecipitation from natural sources been demonstrated [30, 34, 62]. In the present study we showed that xCT requires 4F2hc for expression at the oocyte plasma membrane and for the induction of system  $x_c^-$  transport activity. Beside these natural occurring heterodimers, promiscuous interaction between 4F2hc-associated LSHAT members and rBAT in foreign expression systems has been demonstrated for LAT-2 (e.g. formation of heterodimers; [47]) and for  $y^+LAT$ -1, LAT-1 and LAT-2, e.g. trafficking to the plasma membrane and induction of amino acid transport (R. Estévez, CA Wagner, M. Pineda, M. Camps, A. Albers, S. Bröer, A. Zorzano, F. Lang, M. Palacin, unpublished observations). Conversely, it has been reported recently that 4F2hc and the putative rBAT-associated LSHAT ( $b^{0,+}AT$ ) co-express amino acid transport activity in HRPE cells [44, 46]. In contrast, in the present study human rBAT did not bring the human xCT to the plasma membrane and therefore did not co-express any amino acid transport activity. To our knowledge this lack of promiscuous interaction among LSHAT is restricted to xCT (present study).

Evidence for the physiological role of system  $x_c^-$  has been gained in cultured cells, in which the activity of system  $x_c^-$  (i.e. influx of cystine and efflux of glutamate) regulates the intracellular levels of glutathione, through the availability of cysteine, the precursor of its synthesis [3, 4]. Activators of system  $x_c^-$ , (e.g. lipopolysaccharide and the electrophilic agent diethylmaleate) increase the mRNA levels of xCT transporter in mouse macrophages [54]. The role of system  $x_c^-$  in vivo is less clear [54]. Here we showed the expression of *SLC7A11* mRNA in

brain, as previously reported in mouse [54]. Expression was present in all brain regions tested, which is consistent with reports of  $x_c^-$  cystine-glutamate exchange activity in glial cells together with  $Na^+$ -dependent high affinity glutamate transporters belonging to the  $X_{AG}^-$  system [48, 49, 50]. It has been proposed also that glial cells take up cystine and then release cysteine to neurons for glutathione synthesis [49]. Moreover in glioma cell lines, over 50% of glutamate transport is  $Na^+$  independent and mediated by the  $x_c^-$  transport [64]. Recently, it has been reported also that up-regulation of cystine-glutamate exchange in conjunction with reduction-mislocalisation of  $Na^+$ -dependent glutamate transporters causes an unusual release of glutamate from glioma cells, which in turn may contribute to tumour-associated necrosis and possibly to seizures in peritumoural brain [64]. However, further experiments are needed to clarify the physiological role of xCT in the nervous system.

RT-PCR demonstrated expression of human *SLC7A11* mRNA in all human tissues tested, including pancreatic islets, with the exception of kidney and liver. Indeed, some of the corresponding mouse tissues that had not been tested before (intestine, ovary and spleen) or showed no xCT expression by Northern analysis (e.g. kidney; present study and [54]), were positive by RT-PCR. Consistent with this tissue distribution of *SLC7A11*, system  $x_c^-$  transport activity has been reported in human and rat pancreas [53, 58] and in rat intestinal crypt cells [32]. The *SLC7A11* expression in pancreatic islets is intriguing in view of the hypothesis of a role for glutamate as an intracellular messenger in glucose-induced insulin exocytosis. Glutamate does not initiate the secretory response but its uptake would render the insulin granules secretion competent, thus coupling glucose metabolism to insulin secretion [28]. The intracellular levels of glutamate might be regulated by the activity of system  $x_c^-$ . Study of the specific cell types that express xCT in pancreatic islets and of the mechanisms which control the induction of the  $x_c^-$  system in these cells should provide more clues about a possible involvement of xCT in the insulin secretory pathway.

System  $x_c^-$  transport activity has also been shown in tumour cell lines other than glioma cells, like mouse lymphoma, human and rat hepatoma cell lines [2, 23, 29]. In the present study, we showed expression of human *SLC7A11* mRNA in the colon tumour cell line CaCo 2, in the embryonic renal cell line EK293 and in the hepatic tumour cell line HepG2, whereas it was absent in liver. Cystine has a higher concentration than cysteine in the extracellular space. Activation of system  $x_c^-$  in proliferating cells may increase cystine availability for cell growth. Indeed, there are other mechanisms that ensure cystine availability for tumour growth, e.g. conversion from glutathione through the up-regulated  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase activity [21, 22, 36, 57]. The identification of human *SLC7A11* will allow the study of the role of system  $x_c^-$  in cysteine/cystine availability during neoplastic conversion.

**Acknowledgements** We thank Ramon Gomis and Carmen Benito (Hospital Clinic, Barcelona) for donating human pancreas mRNA samples for RT-PCR experiments. We also thank Judith Garcia for technical assistance, and Robin Rycroft for editorial help. We thank the YAC Screening Center at San Raffaele Biomedical Science Park and HGMP Resource Center (UK) for providing the IMAGE clone. This research was supported in part by Direcció General de Investigació Científica y Técnica Research Grants PM96/0060 and PM99/0172, grant GRQ94-1040 from Generalitat de Catalunya (Spain), support of the Comissionat per a Universitats i Recerca de la Generalitat de Catalunya to M.P., CT97-BMH4-2284 (EURO-IMAGE) EC grant and Merck Genome Research Institute (MGRI grant #37). E.Gasol is recipient of predoctoral fellowships from the Ministerio de Educación y Cultura, Spain and M. Pineda is recipient of a predoctoral fellowship from the Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica, Catalonia, Spain.

## References

- Banfi S, Guffanti A, Borsani G (1998) How to get the best of dbEST. *Trends Genet* 14:80–81
- Bannai S (1984) Transport of cystine and cysteine in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 779:289–306
- Bannai S (1986) Exchange of cystine and glutamate across the plasma membrane of human fibroblasts. *J Biol Chem* 261:2256–2263
- Bannai S, Ishii T (1982) Transport of cystine and cysteine and cell growth in cultured human diploid fibroblasts: effect of glutamate and homocysteate. *J Cell Physiol* 112:265–272
- Bannai S, Ishii TA (1988) A novel function of glutamine in cell culture: utilization of glutamine for the uptake of cystine in human fibroblasts. *J Cell Physiol* 137:360–366
- Bannai S, 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, Kitamura E (1981) Role of proton dissociation in the transport of cystine and glutamate in human diploid fibroblasts in culture. *J Biol Chem* 256:5770–5772
- Bannai S, Sato H, Ishii T, Sugita Y (1989) Induction of cystine transport activity in human fibroblasts by oxygen. *J Biol Chem* 264:18480–18484
- Bertran J, Werner A, Chillarón J, Nunes V, Biber J, Testar X, Zorzano A, Estivill X, Murer H, Palacín 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, Magagnin S, Werner A, Markovich D, Biber J, Testar X, Zorzano A, Kühn LC, Palacín M, Murer H (1992) Stimulation of system y<sup>+</sup>-like amino acid transport by the heavy chain of human 4F2 surface antigen in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5606–5610
- Bertran J, Werner A, Moore ML, Stange G, Markovich D, Biber J, Testar X, Zorzano A, Palacín M, Murer H (1992) Expression cloning of a human renal cDNA that induces high affinity transport of L-cystine shared with dibasic amino acids in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5601–5605
- Boado RJ, Yi Li J, Magaya M, Zhang C, Pardridge WM (1999) Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:12079–12084
- Borsani G, Bassi MT, Sperandeo MP, De Grandi A, Buoninconti A, Riboni M, Incerti B, Pepe A, Andria G, Ballabio A, Sebastio G (1999) *SLC7A7*, encoding a putative permease-related protein, is mutated in patients with lysinuric protein intolerance. *Nat Genet* 21:297–301
- Calonge J, Gasparini P, Chillarón J, Chillón M, Gallucci M, Rousaud F, Zelante L, Testar X, Dallapiccola B, Di Silveiro F, Barceló P, Estivill X, Zorzano A, Nunes V, Palacín M (1994) Cystinuria caused by mutations in *rBAT*, a gene involved in the transport of cystine. *Nat Genet* 6:420–425
- Chairoungdua A, Segawa H, Kim JY, Miyamoto K-I, Haga H, Fukui Y, Mizoguchi K-I, Ito H, Takeda E, Endou H, Kanai Y (1999) Identification of an amino acid transporter associated with the cystinuria-related type II membrane glycoprotein. *J Biol Chem* 274:8845–28848
- Choi DW, Rothman SM (1990) The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 13:71–182
- Devés R, Boyd CAR (2000) Surface antigen CD98(4F2): not a single membrane protein, but a family of proteins with multiple functions. *J Membr Biol* 173:165–177
- Estévez R, Camps M, Testar X, Hediger M, Zorzano A, Palacín M (1998) The amino acid transport system y<sup>+</sup>L/4F2hc is a heteromultimeric complex. *FASEB J* 12:1319–1329
- Feliubadaló L et al. (International Cystinuria Consortium) (1999) Non-type I cystinuria caused by mutations in *SLC7A9*, encoding a subunit (b<sup>0</sup>+AT) of rBAT. *Nat Genet* 23:52–57
- Fukasawa Y, Segawa H, Kim JY, Chairoungdua A, Kim DK, Matsuo H, Cha SH, Endou H, Kanai Y (2000) Identification and characterization of a Na<sup>+</sup>-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
- Hanigan MH (1995) Mutations in the *ras* proto-oncogene: clues to etiology and molecular pathogenesis of mouse liver tumors. *Carcinogen* 16:181–185
- Hanigan MH, Rickets WA (1993) Extracellular glutathione is a source of cysteine for cells that express gamma-glutamyl transpeptidase. *Biochemistry* 32:6302–6306
- Hishinuma I, Ishii T, Bannai S (1986) Mouse lymphoma L1210 cells acquire a new cystine transport activity upon adaptation in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol* 22:127–134
- Ishii T, Sato H, Miura K, Sagara J, Bannai S (1992) Induction of cystine transport activity by stress. *Ann NY Acad Sci* 663:497–498
- Kanai Y, Segawa H, Miyamoto K, Uchino H, Takeda E, 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
- Koyama Y, Kimura Y, Hashimoto H, Matsuda T, Baba A (2000) L-Lactate inhibits L-cystine/L-glutamate exchange transport and decreases glutathione content in rat cultured astrocytes. *J Neurosci Res* 59:685–691
- Lerma J, Heranz AS, Herreras O, Abaira V, del Río RM (1986) In vivo determination of extracellular concentration of amino acids in the rat hippocampus. A method based on brain dialysis and computerized analysis. *Brain Res* 384:145–155
- Maechler P, Wollheim C (1999) Mitochondrial glutamate acts as a messenger in glucose-induced insulin exocytosis. *Nature* 402:685–689
- Makowske M, Christensen HN (1982) Contrasts in transport systems for anionic amino acids in hepatocytes and a hepatoma cell line HTC. *J Biol Chem* 257:5663–5670
- Mannion BA, Kolesnikova TV, Lin SH, Wang S, Thompson NL, Hemler ME (1998) The light chain of CD98 is identified as E16/TA1 protein. *J Biol Chem* 273:33127–33129
- Mastroberardino L, Spindler B, Pfeiffer R, Skelly PJ, Loffing J, Shoemaker CB, Verrey F (1998) Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family. *Nature* 395:288–291
- Mordrelle A, Huneau JF, Tomé D (1997) Sodium-dependent and -independent transport of L-glutamate in the rat intestinal crypt-like cell line IEC-17. *Biochem Biophys Res Commun* 233:244–247
- Mykkänen J, Torrents D, Pineda M, Camps M, Yoldi ME, Horelli-Kuitunen N, Huoponen K, Heinonen M, Oksanen J, Simell O, Saontaus M-L, Zorzano A, Palacín M, Aula P (2000) Functional analysis of novel mutations in y<sup>+</sup>LAT-1 amino acid transporter gene causing lysinuric protein intolerance (LPI) *Hum Mol Genet* 9:431–438
- Nakamura E, Sato M, Yang H, Miyagawa F, Harasaki M, Tomita K, Matsuoka S, Noma A, Iwai K, Minato N (1999)

- 4F2 (CD98) heavy chain is associated covalently with an amino acid transporter and controls intracellular trafficking and membrane topology of 4F2 heterodimers. *J Biol Chem* 274:3009–3016
35. Nakauchi J, Matsuo H, Kim DK, Goto A, Chairoungdua A, Cha SH, Inatomi J, Shiokawa Y, Yamaguchi K, Saito I, Endou H, Kanai Y (2000) Cloning and characterization of a human brain Na<sup>+</sup>-independent transporter for small neutral amino acids that transports D-serine with high affinity. *Neurosci Lett* 287:231–235
  36. Ozono S, Homma Y, Oyasu R (1985) Gamma glutamyl transpeptidase activity in rat urothelium treated with bladder carcinogens. *Cancer Lett* 29:49–57
  37. Palacín M, Bertran J, Zorzano A (2000) Heteromeric amino acid transporters explain inherited aminoacidurias. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 9:547–553
  38. Palacín M, Estévez R, Zorzano A (1998) Cystinuria calls for heteromultimeric amino acid transporters. *Curr Opin Cell Biol* 10:455–461
  39. Palacín M, Estévez R, Bertran J, Zorzano A (1998) Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol Rev* 78:969–1054
  40. Pfeiffer R, Loffing J, Rossier G, Bauch C, Mier C, Eggermann T, Loffing-Cueni D, Kühn LC, Verrey F (1999) Luminal heterodimeric amino acid transporter defective in cystinuria. *Mol Biol Cell* 10:4135–4147
  41. Pfeiffer R, Rossier G, Spindler B, Meier C, Kühn L, Verrey F (1999) Amino acid transport of y<sup>+</sup>L-type by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of the glycoprotein-associated amino acid transporter family. *EMBO J* 18:49–57
  42. Pfeiffer R, Spindler B, Loffing J, Skelly PJ, Shoemaker CB, Verrey F (1998) Functional heterodimeric amino acid transporters lacking cysteine residues involved in disulfide bond. *FEBS Lett* 439:157–162
  43. Pineda M, Fernández E, Torrents D, Estévez R, López C, Camps M, Lloberas J, Zorzano A, Palacín 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
  44. Rajan DP, Huang W, Kekuda R, George RL, Wang GJ, Conway SJ, Devoe LD, Leibach FH, Prasad PD, Ganapathy V (2000) Differential influence of the 4F2 heavy chain and the protein related to b<sup>0,+</sup> amino acid transport on substrate affinity of the heteromeric b<sup>0,+</sup> amino acid transporter. *J Biol Chem* 275:14331–14335
  45. Rajan DP, Kekuda R, Huang W, Devoe LD, Leibach FH, Prasad PD, Ganapathy V (2000) Cloning and functional characterization of a Na<sup>+</sup>-independent, broad-specific neutral amino acid transporter from mammalian intestine. *Biochim Biophys Acta* 1463:6–14
  46. Rajan DP, Kekuda R, Huang W, Wang H, Devoe LD, Leibach FH, Prasad PD, Ganapathy V (1999) Cloning and expression of a b<sup>0,+</sup>-like amino acid transporter functioning as a heterodimer with 4F2hc instead of rBAT. *J Biol Chem* 274:29005–29010
  47. Rossier G, Meier C, Bauch C, Summa V, Sordat B, Verrey F, Kühn LC (1999) LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine. *J Biol Chem* 274:4948–4954
  48. Sagara J, Makino N, Bannai S (1996) Glutathione efflux from cultured astrocytes. *J Neurochem* 66:1877–1881
  49. Sagara J, Miura K, Bannai S (1993) Maintenance of neuronal glutathione by glial cells. *J Neurochem* 61:1672–1676
  50. Sagara J, Miura K, Bannai S (1993) Cystine uptake and glutathione level in fetal brain cells in primary culture and in suspension. *J Neurochem* 61:1667–1671
  51. Saillan-Barreau C, Dufresne M, Clerc P, Sanchez D, Corominola H, Moriscot C, Guy-Crotte O, Escricut C, Vaysse N, Gomis R, Tarasova N, Fourmy D (1999) Evidence for a functional role of the cholecystokinin-B/gastrin receptor in the human fetal and adult pancreas. *Diabetes* 48:2015–2021
  52. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
  53. Sato H, Kuriyama-Matsumura K, Siow RC, Ishii T, Bannai S, Mann GE (1998) Induction of cystine transport via system x<sub>c</sub>- and maintenance of intracellular glutathione levels in pancreatic acinar and islet cell lines. *Biochem Biophys Acta* 1414:85–94
  54. Sato H, Tamba M, Ishii T, 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
  55. Segawa H, Fukusawa Y, Miyamoto K-I, Takeda E, Enou H, Kanai Y (1999) Identification and functional characterization of a Na<sup>+</sup>-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J Biol Chem* 274:19745–19751
  56. Skelly PJ, Pfeiffer R, Verrey F, Shoemaker CB (1999) SPM11c, a heterodimeric amino acid permease light chain of the human parasitic plathyhelminth, *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 119:569–76
  57. Solt DB, Calderon-Solt L, Odajima T (1985) Rapid induction of carcinomas and gamma-glutamyl transpeptidase-rich clones in *N*-methyl-*N*-benzyl nitrosamine-treated hamster buccal pouch. *J Natl Cancer Inst* 74:437–445
  58. Sweiry SH, Sastre S, Viña J, Elsasser MP, Mann GE (1995) A role for gamma-glutamyl transpeptidase and the amino acid transport system x<sub>c</sub><sup>-</sup> in cystine transport by a human pancreatic duct cell line. *J Physiol (Lond)* 485:167–177
  59. Taylor M, Smith L (1987) Accumulation of free amino acids in growing *Xenopus laevis* oocytes. *Dev Biol* 124:287–290
  60. Torrents D, Estévez R, Pineda M, Fernández E, Lloberas J, Shi Y-B, Zozano A, Palacín M (1998) Identification and characterization of a membrane protein (y<sup>+</sup>L amino acid transporter-1) that associates with 4F2hc to encode the amino acid transport activity y<sup>+</sup>L. *J Biol Chem* 273:32437–32445
  61. Torrents D, Mykkänen J, Pineda M, Feliubadaló L, Estévez R, De Cid R, Sanjurjo P, Zorzano A, Nunes V, Huoponen K, Reinikainen A, Simell O, Savontaus ML, Aula P, Palacín M (1999) Identification of *SLC7A7*, encoding y<sup>+</sup>LAT-1, as the lysinuric protein intolerance gene. *Nat Genet* 21:293–296
  62. Tsuduruome M, Ito M, Takebayashi S-I, Okumura K, Nishio M, Kawano M, Kusagawa S, Komada H, Ito Y (1999). Cutting edge: primary structure of the light chain of fusion regulatory protein-1/CD98/4F2 predicts a protein with multiple transmembrane domains that is almost identical to the amino acid transporter E16. *J Immunol* 162:2462–2466
  63. Verrey F, Jack DL, Paulsen IT, Saier MH Jr, Pfeiffer R (1999) New glycoprotein-associated amino acid transporters. *J Membr Biol* 172:181–192
  64. Ye ZC, Rothstein JD, 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* 19:10767–77



## 2. Identificación de PK y PW, dos nuevas subunidades ligeras.

Después de la identificación y caracterización de xCT humano, se continuó con la búsqueda de nuevas subunidades ligeras pertenecientes a la familia LSHAT. Los estudios funcionales que se estaban haciendo con otros transportadores (Fernández et al., 2002; Pfeiffer et al., 1999a), parecían indicar que todavía quedaban transportadores por clonar. En esta dirección, G. Borsani y M.T. Bassi del Tigem de Milán, en colaboración con nuestro grupo, encontraron dos nuevas EST de ratón (1972468 y 1907807) que presentaban cierto grado de homología con los

otros miembros de la familia LSHAT. Aunque este grado de homología sólo era del ~30%, bastante por debajo del que se establecía entre los otros transportadores LSHAT, se apostó por conseguir la secuencia completa. En ambos casos, M.T. Bassi aplicó 5'RACE-PCR a partir de extracto total de RNA de riñón de ratón. Se obtuvieron dos cDNAs completos: *slc7aK* (siguiendo la nomenclatura de *solut carrier family 7*), de 1891 pb, traducido a una putativa proteína de 465 aminoácidos a la que llamaríamos PK y que fue la primera en resolverse; y *slc7aW*, de 1691 pb, traducido a una putativa proteína de 478 aminoácidos, que llegó un tiempo después. Entre ellas, presentaban una homología de secuencia del 44%.

```

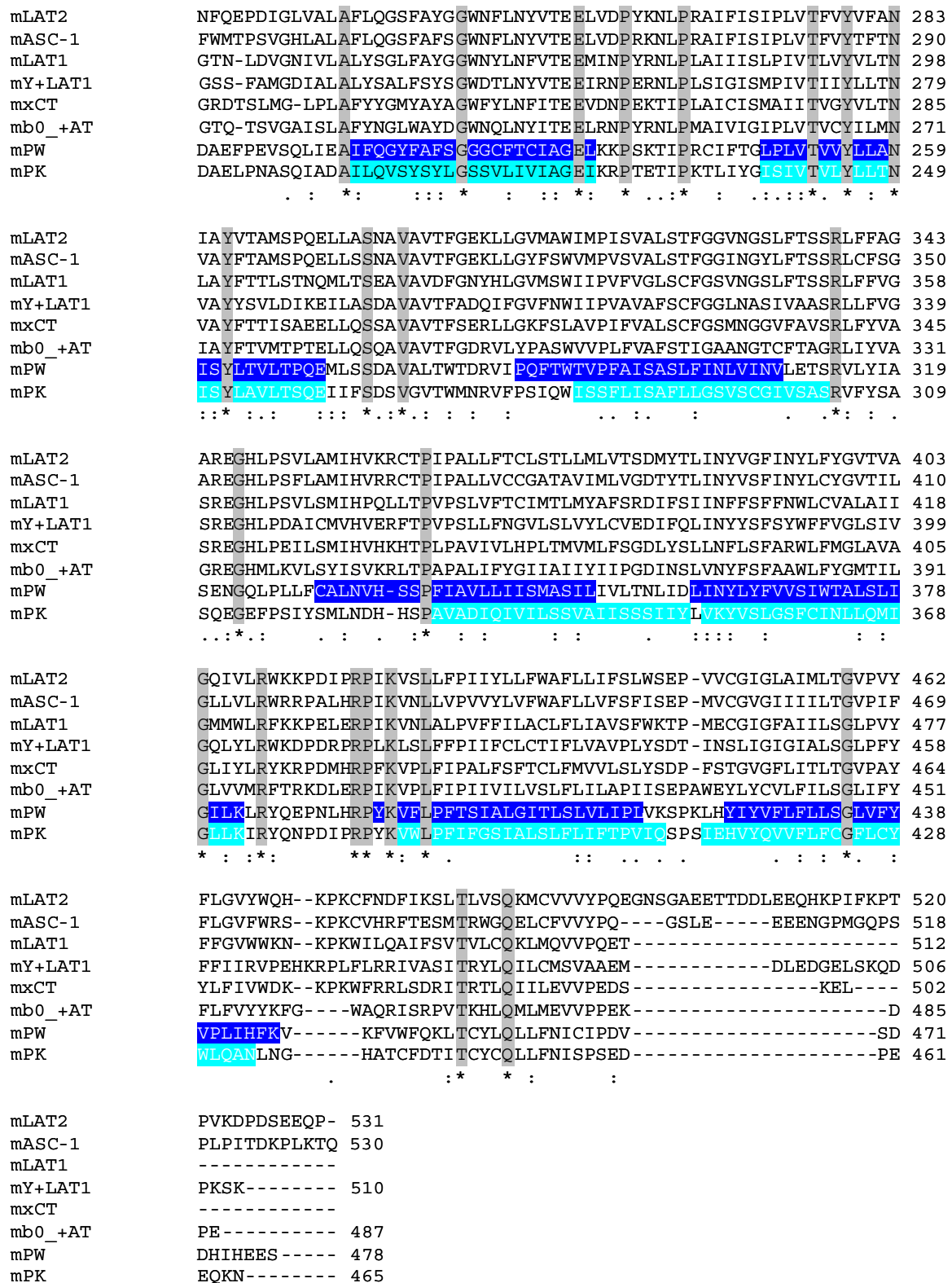
mLAT2      --MEKGARQRNNTAKN----HPGSDTSPEAEASSGGGG-----VALKKEIGLVSACGII 48
mASC-1     --MRRDSDMASHIQPPGGHGNPGPAPSPSPGPGPGAS---ERVALKKEIGLVSACTII 55
mLAT1      MAVAGAKRRAVATPATAAAEEERQAREKMLEARRGDGADPEGEGVTLQRNITLLNGVAII 60
mY+LAT1    --MVNSTKY-----EVAQAHEADDGSALGDGASPVAEQVKLKKEISLLNGVCLI 47
mxCT       --MVRKPVVATISKGG-----YLQGNMSGRLPSMGDQEPGQEKVVLLKKKITLLRGVSI 53
mb0_+AT    --MEETSLR-----RRREDEKSTHSTELKT-----TSLQKEVGLLSGICII 39
mPW        -----MAMDSKKEIRLKRELGYFWGTNFI 24
mPK        -----MQLLRALGVFHVSMIL 16
          : . . . . * : : . : :

mLAT2      VGNIIIGSGIFVSPKGVLENAGS-VGLALIVVI VTGIIITAVGALCYAELGVTIPKSGGDYS 107
mASC-1     IGNIIGSGIFISPKGVLEHSGS-VGLALFVWVVGGLVGTALGSLCYAELGVVAIPKSGGDYA 114
mLAT1      VGTIIGSGIFVPTGVLKEAGS-PGLSLVWVAVCGVFSIVGALCYAELGTTISKSGGDYA 119
mY+LAT1    VGNMIGSGIFVSPKGVLMYSAS-FGLSLVIWAVGGIFSVFGALCYAELGTTIKKSGASYA 106
mxCT       IGTVIGSGIFISPKGILQNTGS-VGMSLVFWSACGVLSLFGALSYAELGTSIKKSGGHYT 112
mb0_+AT    VGTIIGSGIFISPKSVLANTES-VGPCLIWACGILATLGAALCFEALGTMITKSGGEYP 98
mPW        IINIICAGIFVSPKGVLQHSSMNVGVSICVWAVCAVLTLTSAICSAEIGITFPYSGAHYY 84
mPK        FSATLGTGIFVTPKAVLKYSSLNI PVLSLWAGCGLLSIMSALCNAEIATTPYLSGASY 76
          . : * : * : * : * : . * . * . : . : * : * : * : *

mLAT2      YVKDIFGGLAGFLRLWIAVLVIYPTNQAVIALTFSNYVLQPLFPFCFPESGLRLLAAIC 167
mASC-1     YVTEIFGGLAGFLLLSAVLIMYPTSLAVISMFTFSNYVLQPVFPNCIPATASRVLSMAC 174
mLAT1      YMLEVYGSPLPAFLKLWIELLIRPSSQYIVALVFATYLLKPVFPTCPVPEEAALKVACL 179
mY+LAT1    YILEAFGGFLAFIRLWTSLLIEPTSQAVIAITFANYMVQPLFPSCGAPYAAGRLLAAAC 166
mxCT       YILEVFGPLLAFFVRVWVELLIRPGATAVISLAFGRYILEPFFIQCEIPELAIKLVTA 172
mb0_+AT    YLMEAFGPPIPAYLFSWTSLIVMKPSSFAIICLSFSEYVCAAFYSGCKPPAVVVKLLAAA 158
mPW        FLKRCFGPLVAFRLRWTSFLG-PGLIASQALLAEYGVQPFYSPCSAPILPRKCLALAM 143
mPK        FLKRTLGSVAFLSLWIKLFAH-FLGIGAQCCLLIATSVIQCFYSGCPAPELPTKCLALAI 135
          : : * : : * : : . : : . : * * : :

mLAT2      LLLLTWVNCSSVRWATRVDIFTAGKLLALALIIIMGIVQI----CKGEFFWLEPKNAFE 223
mASC-1     LMLLTWVNSSSVRWATRIQVIFTGGKLLALSLIITVGFVQI----FQGHFEELRPTNAFA 230
mLAT1      VLLLTAVNCYSVKAATRVDQFAAAKLLALALII LLGFIQMGKDMGQGDASNLQOKLSFE 239
mY+LAT1    ICLLTFINCAVVKWGLTVQDIFTYAKVLLI AVIIAGIVRLG----QGATANFEN--SFE 220
mxCT       ITVVMVLNSTSVSWSARIQIFLTFCKLTAIILIIIVPGVIQL----IKGQTHHFKD--AFS 226
mb0_+AT    ILFITTVNALSVRLGSYVQNVFTAAKMVIVAI IISGLVFLA----QGNVKNFQN--SFE 212
mPW        LWIVGILNSRGVKELSLQTVSSVLKVGILGVISLSGLFLLVR----GKKENVRQLNQAF 199
mPK        LWSFGIVSARGIKTVAWFNIVSSFIKLSVLCILSLT--VLLVN----GKKENVSRFENAL 189
          : . : . : : : : * : : . : : . : *

```



**Figura 11. Alineamiento múltiple de PK y PW con las LSHAT de ratón.** El alineamiento de las secuencias de aminoácidos se hizo con el programa CLUSTALW *Sequence Alignment*. Resaltados en azul se encuentran los 12 putativos segmentos transmembrana de PK y PW, obtenidos mediante el programa de predicción topológica SOSUI. Los residuos conservados en todos los miembros de la familia se han indicado en gris y, concretamente, la cisteína implicada en la formación del puente disulfuro con la subunidad pesada se ha resaltado en color morado. El punto (·) y los dos puntos (:) indican, respectivamente, un alto y muy alto grado de conservación entre los miembros de la familia del residuo señalado.

## 2.1. Estudios iniciales de caracterización de la proteína de ratón PK

La nueva proteína de ratón identificada, llamada PK, presentaba homologías entre el 25-35% con el resto de las subunidades ligeras. El alineamiento múltiple revelaba que mantenía la cisteína responsable de la formación del puente disulfuro con la subunidad pesada (residuo 121) junto con otros de los residuos conservados en la familia (Figura 11). La predicción de estructura también presentaba 12 putativos segmentos transmembrana, aunque con un extremo citosólico N-terminal ligeramente más corto. A pesar de las bajas homologías, parecía que nos encontrábamos ante un nuevo miembro de la familia LSHAT y nos propusimos abordar su caracterización funcional.

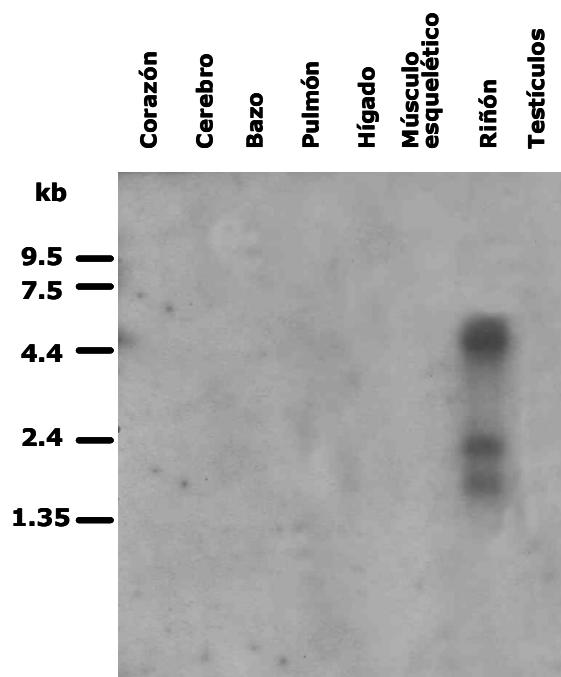
Los intentos por encontrar el ortólogo humano de *slc7aK* en las bases de datos *human dbEST*, Proyecto Genoma Humano y Celera Genomics no fueron fructíferos, pareciendo indicar que se trataba de un gen exclusivo de ratón.

### Patrón de expresión de la proteína

M.T Bassi realizó el análisis por Northern blot de una membrana comercial de tejidos de ratón, utilizando como sonda la secuencia de la EST 1972468 (Figura 12). De los tejidos testados sólo se obtuvo señal en riñón, en forma de tres transcritos: una banda muy intensa ligeramente superior al marcador de 4.4 kb, y otras dos bandas de menor intensidad a una altura aproximada de 1.9 y 1.5 kb, respectivamente.

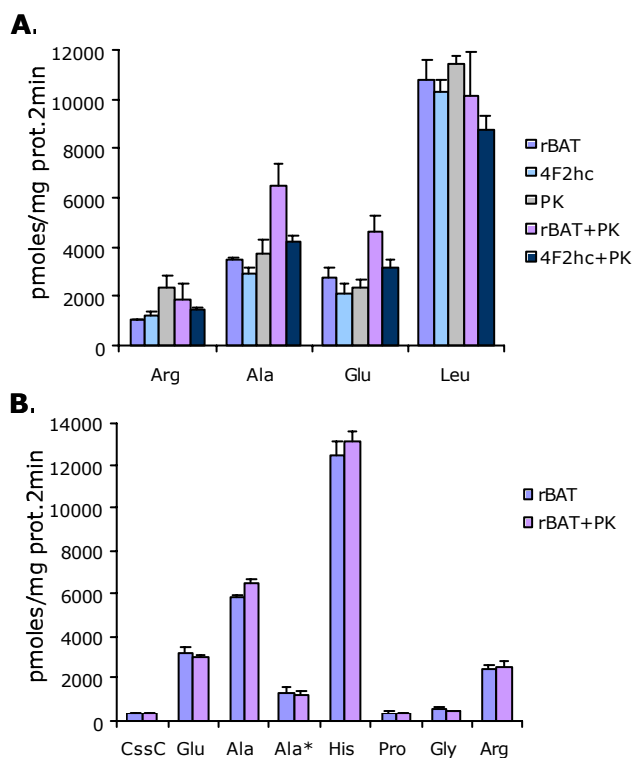
### Ensayos de transporte en células HeLa

El vector de expresión en el que se encontraba el cDNA de PK y la optimización en el laboratorio de las condiciones de transfección por fosfato cálcico de células HeLa puestas a punto por J. Bertran, hacían adecuado abordar los estudios de funcionalidad en este sistema de expresión.



**Figura 12. Distribución tisular del mRNA de PK.** Se hibridó una membrana comercial de tejidos de ratón (Clontech) con una sonda de PK. Después de una larga exposición se obtuvo únicamente señal en riñón, en forma de tres transcritos de ~5kb, ~1.9 kb y ~1.5 kb.

Se desconocía el sustrato que podía transportar la nueva proteína y cuál sería la cadena pesada con la que formaría el puente disulfuro. Inicialmente se probó un aminoácido radiactivo representativo de cada uno de los tipos existentes (Arg, catiónico; Ala, neutro pequeño; Leu, neutro grande; y Glu, aniónico), a una concentración de 50  $\mu$ M (dentro del rango medio habitual de afinidad de los transportadores de la familia y sin que el basal de HeLa sea excesivo) y en combinación con cada una de las subunidades pesadas (Figura 13A). Se eligió incluir sodio en el medio por si el nuevo transportador requería este ión para su función. En un primer momento pareció que PK podía unirse a rBAT e inducir un pequeño transporte de alanina o glutamato (Figura 13A) pero este resultado no se repitió ni tampoco encontramos inducción con ninguno de los sustratos testados (Figura 13B).



**Figura 13. Ensayos de transporte en células HeLa.** Las células se transfectaron con fosfato cálcico con los DNAs indicados y a las 36 horas se evaluó la captación de los aminoácidos marcados con  $^3\text{H}$  a  $50 \mu\text{M}$  de concentración y en presencia de  $\text{Na}^+$  en el medio (excepto \*, sin sodio) durante 2 min. Los valores son la media  $\pm$  ES de un experimento con 4 replicados por punto.

#### Inmunolocalización de PK en células HeLa

En este punto, decidimos introducir un epítipo *myc* en el extremo N-terminal de la proteína porque no disponíamos de anticuerpo específico y queríamos comprobar si PK se expresaba en superficie o permanecía intracelular cuando se transfectaba en células HeLa, sola o en combinación con rBAT o 4F2hc. En ningún caso conseguimos detectar señal de *myc* asociada a PK mientras el control positivo del experimento (asc-1/4F2hc) sí presentaba marcaje fluorescente en superficie. Quizás la introducción del epítipo provoca un mal plegamiento de la proteína y ésta es degradada por la maquinaria celular o bien la falta de su subunidad pesada, diferente de rBAT y 4F2hc, es necesaria para su estabilización. En cualquier caso, los problemas por conseguir expresar y detectar la proteína, junto con la llegada del cDNA completo de *slc7aW* hicieron que

centráramos los esfuerzos en caracterizar ésta última.

#### 2.2. Estudios iniciales de caracterización de la proteína PW

La nueva proteína identificada, llamada PW, de 478 pb, también de ratón, presentaba igualmente bajas homologías (27-33%) respecto al resto de miembros de la familia de subunidades ligeras (Figura 11). El alineamiento múltiple, sin embargo, revelaba características que también hacían pensar que formaba parte de la familia (Figura 11): i) mantenía la cisteína implicada en la formación del puente disulfuro con la subunidad pesada (residuo 129); ii) conservaba residuos clave en la familia a lo largo de la secuencia; y iii) los programas de predicción de estructura también presentaban 12 putativos segmentos transmembrana aunque, como PK, con el extremo citosólico N-terminal ligeramente más corto.

La búsqueda en las bases de datos de secuencias humanas (*human dbEST*, Proyecto Genoma Humano) permitieron identificar un clon parcial con un 72% de identidad y un 83% de similitud que apuntaba a ser el ortólogo humano de *slc7aW*. A partir de éste se obtuvo el cDNA completo de una putativa proteína de 470 aminoácidos. El alineamiento entre las dos proteínas evidenciaba un 70% de identidad y un muy elevado grado de similitud (Figura 14).

#### Patrón de expresión de la proteína

M.T Bassi realizó el análisis por Northern blot de la expresión tanto de PW de ratón como de la humana, utilizando en ambos casos membranas comerciales (Figura 15, Resultados). El resultado mostraba una expresión exclusiva de riñón entre los tejidos testados y un poco en hígado para el caso de PW humano (Figura 15B). La abundancia del transcrito era mayor que la de PK, probablemente indicando una mayor expresión del gen.



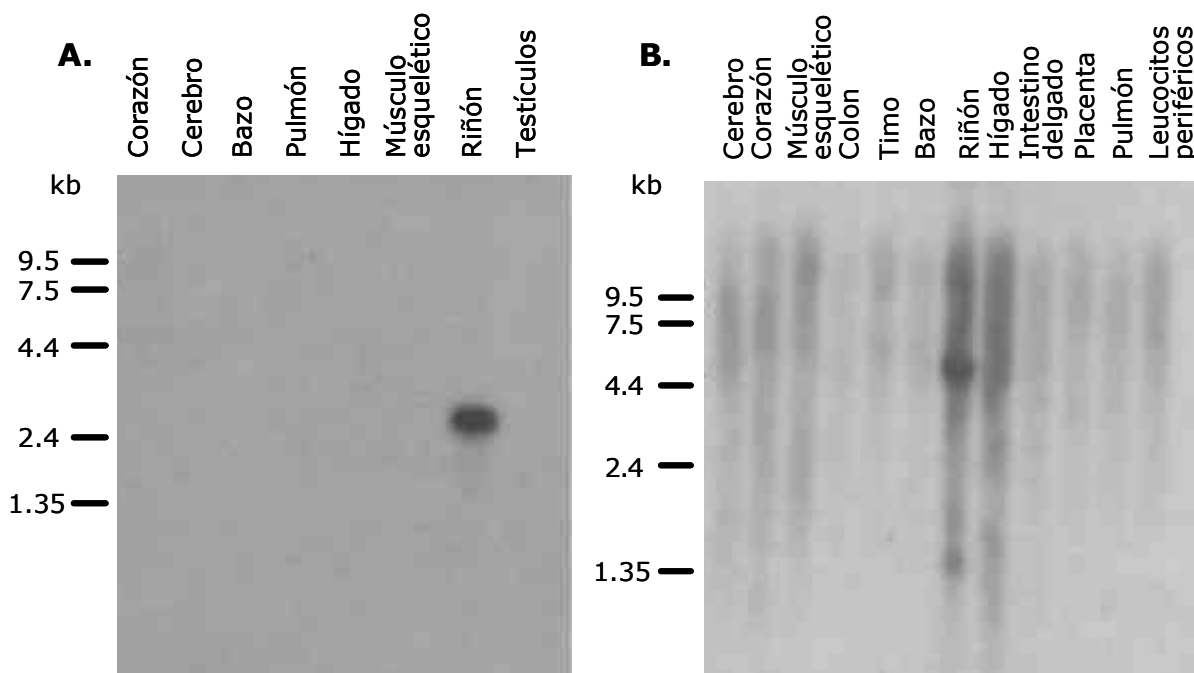
mPW	MAMDSKKEIRLKRELGYFWGTNFLIINIIGAGIFVSPKGVLQHSSMNVGVSLCVWAVCAV	60
hPW	--MDRGEKIQLKRVFGYWWGTSFLLINIIGAGIFVSPKGVLAYSCMNVGVSLCVWAGCAI	58
mPW	LTLTSALCSAEIGITFPYSGAHYYFLKRCFGPLVAFLRLWTSFLFLGPGLIASQALLLAEY	120
hPW	LAMTSTLCSAEISISFPCSGAQYYFLKRYFGSTVAFLNLWTSFLFLGSGVVAGQALLLAEY	118
mPW	GVQPFYPCSAPILPRKCLALAMLWIVGILNSRGVKELSWLQTVSSVLKVGILGVISLSG	180
hPW	SIQPFYPCSVPKLPKKCLALAMLWIVGILTSRGVKEVTWLQIASSVLKVSILSFISLTG	178
mPW	LFLLVRGKKENVQRLQNAFDAEFPEVSQLIEAIFQGYFAFSGGCFTCIAGELKKPSKTI	240
hPW	VVFLIRGKKENVERFQNAFDAELPDISHLIQAIQGYFAFSGGACFTLIAGELKKPRTTI	238
mPW	PRCIFTGLPLVTVVYLLANISYLTVLTPQEMLSDDAVALTWTDRVIPQFTWTVPFSAISAS	300
hPW	PKCIFTALPLMTVVYLLVNISYLTVLTPREILSSGAVAITWADRAFPSLAWIMPFAISTS	298
mPW	LFINLVINVLETSRVLYIASENGQLPLLFALNVHSSPFIAVLLIISMASILIVLTNLID	360
hPW	LFSNLLISIFKSSRPIYLASQEGQLPLLFNTLNSHSSPFTAVLLLVTLGSLAAILTSLID	358
mPW	LINYLYFVVSIIWTALSLIGILKLRYPENLHRPYKVFLPFTSIALGITLSLVLIPLVKSP	420
hPW	LINYIFFTGSLWSILLMIGILRRRYQENLSIPYKVFLSFPLATIVIDVGLVVIPLVKSP	418
mPW	KLHYIYVFLFLLSGLVFYVPLIHFVKVFWFQKLTTCYLQLLFNICIPDVSDDHIHEES	478
hPW	NVHYVYVLLLVLSGLLFYIPLIHFKIRLAWFEKMTCYLQLLFNIGLPDVSEE-----	470

**Figura 14. Alineamiento entre PW de ratón y humana.** El alineamiento de las secuencias de aminoácidos se hizo con el programa CLUSTALW *Sequence Alignment*. Resaltados en gris se indican los residuos conservados en ambas versiones de la proteína (mPW, de ratón; hPW, humana) (69% de identidad). El asterisco señala el residuo de cisteína implicado en la formación del puente disulfuro con la subunidad pesada.

#### Ensayos de transporte en oocitos de *X. laevis* y células HeLa

La caracterización funcional de la proteína PW de ratón se abordó tanto mediante inyección de cRNA en oocitos de *X. laevis* como transfección transitoria en células HeLa. En este caso, tampoco conocíamos que sustrato podría transportar ni cuál sería la subunidad pesada que podría interactuar con ella. De nuevo, se probó al menos un aminoácido radiactivo representativo de cada uno de los tipos existentes (Arg, catiónico; Ala y Gly, neutros pequeños; Leu, neutro grande; Glu, aniónico; Trp, aromático; y Met, Pro y Cys) (Figura 16). Se incluyó sodio en el medio por si el transportador requería este ión para su función. Se probó también una monoamina, la tiramina (Tir), ya que al realizar un BLAST con la secuencia de la proteína, después de todos los miembros de la familia SLC7 aparecía el transportador de aminas PotE (putrescina-ornitina). El alineamiento entre ambas secuencias presentaba un 18% de identidad.

Los resultados de estos ensayos no mostraban inducción de transporte para ninguno de los sustratos testados, ni para PW sola ni en combinación con 4F2hc o rBAT. Sin embargo, la co-expresión de la nueva proteína con la subunidad pesada rBAT disminuía el transporte basal de ésta provocado por la asociación con el homólogo de  $b^{0,+}$ AT de *X. laevis* (Bertran et al., 1993; Wells and Hediger, 1992; Bertran et al., 1992b). Es decir, parecía como si PW estuviera “secuestrando” rBAT e impidiendo que éste formara un complejo transportador con la subunidad endógena. Esta observación sólo se cumplía para los sustratos propios del sistema  $b^{0,+}$  (L-arginina, L-leucina, L-alanina, L-cistina y L-metionina), mientras que en los otros (L-glutamato, L-triptófano, L-glicina y L-prolina) no se apreciaba ninguna diferencia entre la inyección de rBAT sólo o en combinación con PW (Figura 16). Este efecto no podía observarse en células HeLa transfectadas (rBAT,  $887 \pm 75$  pmoles  $L-[^3S]$ -cistina  $150 \mu M/mg$  prot·2min; rBAT+PW,  $975 \pm 200$  pmoles  $L-[^3S]$ -cistina  $150 \mu M/mg$  prot·2min), donde no se detecta expresión



**Figura 15. Distribución tisular del mRNA de PW.** **A.** Northern blot análisis de PW de ratón. Se hibridó una membrana comercial de tejidos de ratón (Clontech) con una sonda de PW correspondiente a la EST 1907807. Después de una exposición de sólo 4 horas se obtuvo una fuerte señal en riñón, en forma de un único transcrito de aproximadamente 2.5 kb. **B.** Northern blot análisis de PW humano. También se utilizó una membrana comercial (Human Blot, Clontech) que se hibridó con una sonda a partir de la secuencia del clon parcial de PW humano. Se obtuvo una intensa banda en riñón a la altura de las 5 kb, junto con otra de intensidad menor y mucho más pequeña, de 1.35 kb. En este caso, además, apareció un transcrito en hígado a la misma altura que el de riñón de ~5 kb pero con menor intensidad que éste.

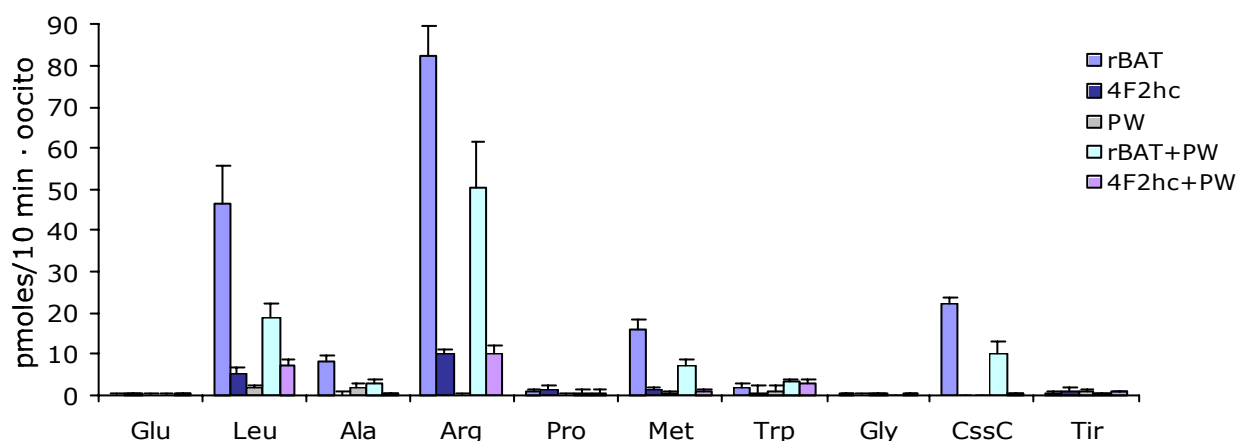
endógena de la proteína  $b^{0,+}AT$  (N. Reig, comunicación personal).

#### Análisis por Western blot

Como no disponíamos del anticuerpo específico contra la proteína, se introdujo el epítipo *myc* en el extremo N-terminal y se transfectaron células HeLa con PW sola o en combinación con cada una de las subunidades pesadas. Por trabajos realizados por M. Pineda en nuestro laboratorio, habíamos aprendido que si se incubaban las células a 33 °C en lugar de a 37 °C, la expresión de proteínas que contenían mutaciones o que se expresaban con dificultad podía incrementarse significativamente (Pineda et al., 2004b). Esta observación parece estar relacionada con un enlentecimiento de la ruta ubiquitina/proteasoma, encargado de degradar las proteínas que se acumulan en el retículo endoplasmático (RE) sin madurar. A la

temperatura permisiva de 33 °C se facilita su maduración y, por tanto, su llegada a la membrana plasmática. Por este motivo, se incubaron células a 37 y 33 °C, se obtuvieron los extractos celulares y se realizó el Western blot tanto en condiciones reductoras (+DTT) como no reductoras (-DTT) (Figura 17).

La proteína PW de ratón, en condiciones reductoras (+DTT), aparecía como una banda de unos ~40 kDa de tamaño molecular (entre los marcadores de 51 y 34 kDa) (Figura 17A). La expresión de la proteína a 37 °C era muy baja pero a 33 °C la intensidad de la banda aumentaba considerablemente. En condiciones no reductoras (-DTT), PW sola o en combinación con 4F2hc tenía el mismo comportamiento que en condiciones reductoras; sin embargo, en el caso de la co-transfección con rBAT, la banda aparecía con un elevado peso molecular (Figura 17B). Esta banda, además, ya tenía intensidad notable en la muestra de las células incubadas a 33 °C.



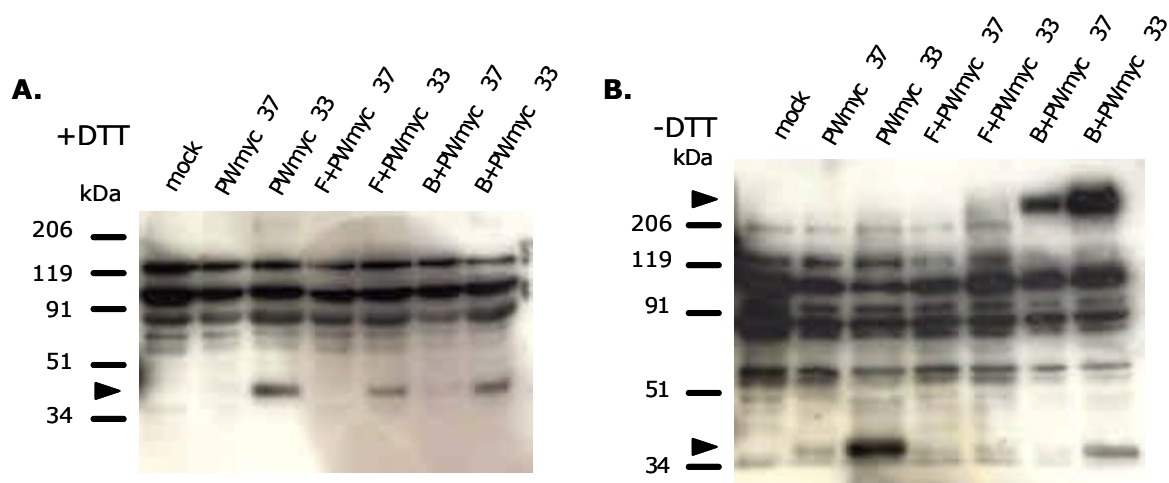
**Figura 16. PW disminuye el transporte inducido por rBAT en oocitos de *X. laevis*.** Se inyectaron 10 ng de cada cRNA indicado en grupos de oocitos de *X. laevis*. Después de 48 h, se determinó la captación de los sustratos radiactivos L-glutamato, L-leucina, L-alanina, L-arginina, L-prolina, L-metionina, L-triptófano, L-glicina, L-cistina (CysC) y tiramina (Tir), a una concentración de 100  $\mu$ M durante 10 minutos. Los resultados están expresados como media $\pm$ ES de 7 oocitos por grupo.

El resultado confirmaba las observaciones de los ensayos de transporte, mostrando una interacción entre PW y rBAT, probablemente mediante la unión por puente disulfuro.

#### Inmunolocalización de PW en células HeLa

Se utilizó la construcción de la proteína

que llevaba unido el epítipo *myc* y se transfectaron células HeLa con PW de ratón sola y, de nuevo, en combinación con rBAT y 4F2hc. Después de la experiencia con PK, también decidimos hacer una inmunolocalización de PW de ratón y comprobar si la posible interacción con rBAT llevaba la proteína a la membrana plasmática o si, por el contrario, seguía permaneciendo intracelular. (Figura 18). En ninguna de las condiciones, PW conseguía llegar a



**Figura 17. Expresión de PW de ratón en células HeLa.** Se cargaron 25  $\mu$ g de proteína en cada carril a partir de los extractos obtenidos de la transfección celular de PWmyc sola (PWmyc), con 4F2hc (F+PWmyc) o con rBAT (B+PWmyc) e incubadas a la temperatura indicada (37 o 33  $^{\circ}$ C). Como control negativo se utilizaron células transfectadas con el vector vacío (mock). **A.** En condiciones reductoras (+DTT), PWmyc aparece como una banda de ~40 kDa en las células incubadas a 33 $^{\circ}$ C. **B.** En condiciones no reductoras (-DTT) también aparece la banda de ~40 kDa y, además, en la co-transfección con rBAT aparece una banda de elevado peso molecular.

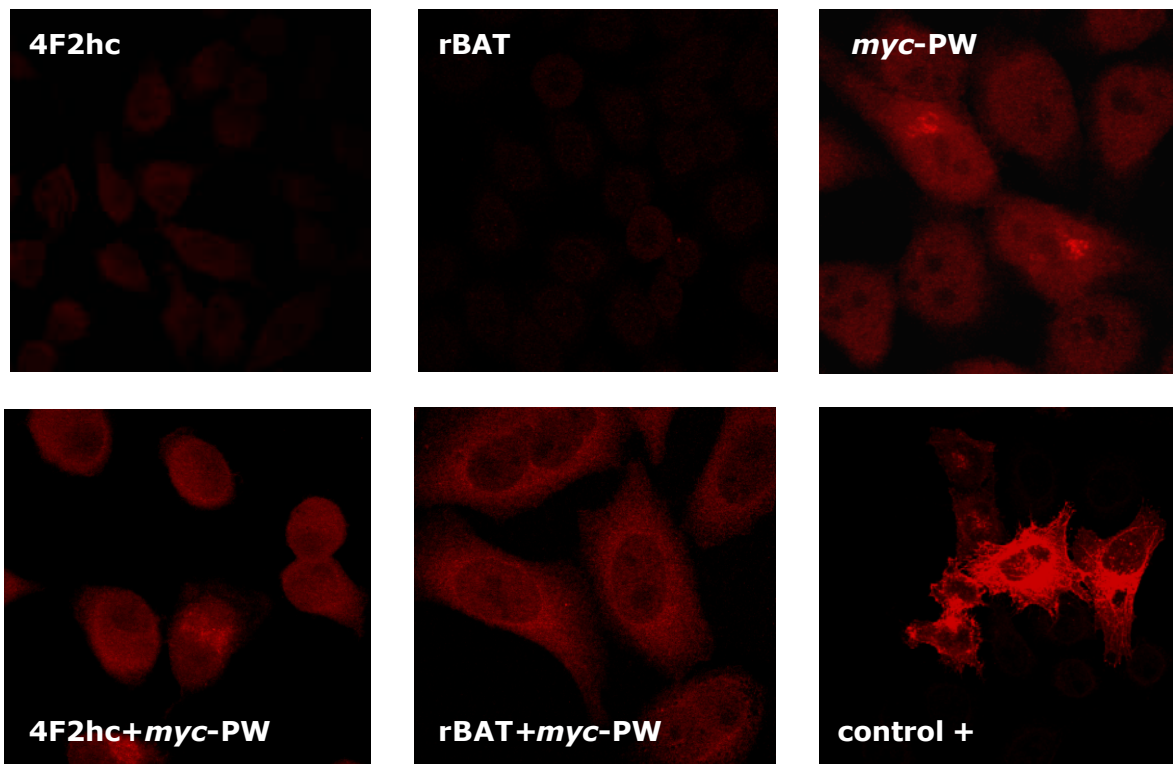
la membrana plasmática de las células (Figura 18). Este resultado parecía evidenciar que PW, y muy seguramente su “hermana” PK, requería de otra subunidad pesada todavía por identificar para poder llegar a la membrana y, en ese caso, realizar su función de transporte. Probablemente, la interacción observada con rBAT sería una interacción inespecífica provocada por la sobre-expresión de ambas proteínas y que se había descrito para otros miembros de la familia LSHAT (Wang et al., 2003; Rajan et al., 2000a; Rajan et al., 1999).

Para proseguir con la caracterización de la proteína PW era necesario conseguir que ésta llegara a la membrana plasmática de la célula. Casualmente, acababa de salir publicado por el grupo de Kanai, un artículo en el que se caracterizaba un nuevo miembro de la familia de

transportadores heterodiméricos de aminoácidos (Chairoungdua et al., 2001). Se trataba de la proteína PK, a la que llamaban asc-2 (del sistema de transporte asc) y de la que decían que no asociaba con ninguna de las cadenas pesadas conocidas. Para que ésta llegara a la membrana y se pudiera caracterizar su función de transporte, construyeron concatenámeros entre asc-2 y 4F2hc o rBAT. Decidimos seguir con la misma estrategia aplicándola a PW, con la sospecha que Kanai podría estar también trabajando con PW.

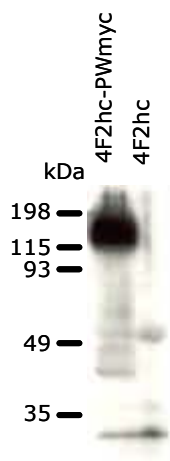
#### Expresión del concatenámero 4F2hc-PWmyc

Se abordó la construcción de los concatenámeros de PWmyc con cada una de las subunidades pesadas. Se trataba de unir al extremo N-terminal de 4F2hc o rBAT, el extremo C-terminal de PW en pauta de lectura. Entre ambas se



**Fig 18. PW no llega a la membrana plasmática ni con rBAT ni con 4F2hc.** Se transfectaron células HeLa con 9 µg de cada DNA indicado (junto con pCDNA3 vacío en las tranfecciones solas). A las 36 horas se realizó la inmunolocalización (descrito en Materiales y Métodos). La observación de las muestras en el microscopio confocal de fluorescencia evidencia la localización intracelular de PW tanto cuando es transfectada sola como en combinación con cada una de las dos subunidades pesadas conocidas (4F2hc y rBAT). En contraste, el último panel a la derecha muestra un ejemplo de localización en membrana plasmática (control+; 4F2hc+myc-asc1).

pondría un *linker* suficientemente largo que permitiera a ambas plegarse correctamente en la membrana del oocito. El grupo de Verrey lo había hecho para rBAT-b<sup>0,+</sup>AT (Pfeiffer et al., 1999a).



**Figura 19. Expresión de 4F2hc-PWmyc.** Se inyectaron 50 ng de cRNA en oocitos de *X. laevis*. A las 48 h se procesaron para obtener el extracto proteico y se cargaron 150  $\mu$ g de proteína en un gel. La inmunodetección se hizo siguiendo el protocolo presentado en Materiales y Métodos. Se detecta una banda de ~150 kDa correspondiente al concaténmero. Como control negativo se inyectaron oocitos con cRNA de 4F2hc.

El primer concaténmero que se obtuvo fue 4F2hc-PWmyc. Se inyectó el cRNA en oocitos de *X. laevis* y se procesaron las muestras para visualizar la expresión del constructo (ensayo de Western blot) (Figura 19) y comprobar que llegara a la membrana del oocito (inmunocitoquímica). El análisis por Western blot revelaba una banda de elevado peso molecular (~150 kDa) que confirmaba la correcta expresión del concaténmero sin que éste fuera degradado por la maquinaria celular del oocito (Figura 19). Los moldes con los oocitos inyectados para hacer los cortes de la inmunocitoquímica quedaron guardados en el congelador de  $-80^{\circ}\text{C}$ . Desafortunadamente, el grupo de Kanai publicaba un artículo en el que se caracterizaba una proteína estructuralmente similar a asc-2, a la que llamarían AGT-1 (*Aspartate/Glutamate Transporter-1*) (Matsuo et al., 2001). Se trataba de la misma secuencia que PW.

Paralelamente al desarrollo de este proyecto se estaban abordando otros estudios que se presentan a continuación, con lo que en este punto decidimos interrumpir esta línea de investigación y concentrar los esfuerzos en el proyecto de determinación de la topología de xCT.

### 3. Determinación de la topología de xCT e identificación de una estructura de *reentrant-loop*.

Los resultados correspondientes a este apartado se encuentran recogidos en los **Artículos 2 y 3**. A continuación se presenta un resumen de los mismos.

#### 3.1. Introducción

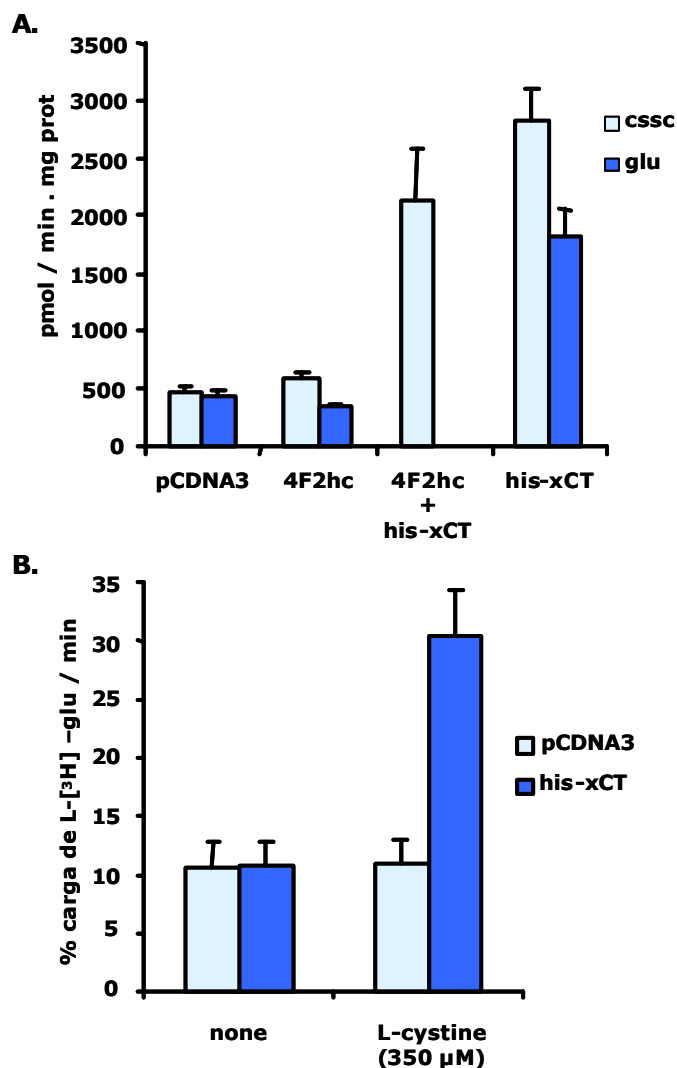
El cercano final de la era de la clonación y el escaso conocimiento de la estructura proteica o de las relaciones de estructura-función entre los miembros de la familia HAT dirigió los objetivos del grupo en esta dirección. Estudios de reconstitución realizados por N. Reig en nuestro laboratorio mostraban que la subunidad pesada no era necesaria para la función de transporte (Reig et al., 2002) y, por tanto, que los determinantes funcionales relevantes deberían encontrarse en la subunidad ligera. En esta dirección sólo se habían estudiado algunos residuos concretos, principalmente mutaciones identificadas en y<sup>+</sup>LAT-1, causantes de lisinuria con intolerancia a proteínas (Torrents et al., 1999), y en b<sup>0,+</sup>AT, causantes de cistinuria (Font et al., 2001) (ver Introducción de esta memoria).

Se decidió, entonces, abordar la determinación experimental de la topología de las subunidades ligeras. Se eligió el método de accesibilidad a cisteínas mediante reactivos sulfidrilo (*cysteine-scanning accessibility method*) (ver Introducción y Materiales y Métodos de esta memoria). Este método es menos agresivo que otros ya que se sustituyen residuos individuales. Además, las sustituciones por cisteínas suelen ser bien toleradas y este aminoácido ofrece muchas posibilidades de reactivos que reaccionan específicamente con él. R. Estévez, en nuestro laboratorio, había iniciado estudios de sensibilidad a reactivos específicos de cisteína (pCMB y pCMBS) con la subunidad ligera IU12 (isoforma

LAT-1 de *X. laevis*) y había mutagenizado sus cisteínas endógenas con el propósito de determinar su topología (R. Estévez, Tesis Doctoral). Finalmente, se optó por utilizar xCT como modelo para la determinación de la topología de las subunidades ligeras. Influyeron en la decisión varios motivos: i) la elevada inducción de transporte provocada por 4F2hc/xCT en oocitos de *X. laevis*; ii) tratarse de una isoforma humana; y iii) el hecho de ser la proteína caracterizada inicialmente por la doctoranda. El volumen de inyección que requeriría hacer la determinación experimental de la topología en oocitos de *X. laevis*, así como los ejemplos de la bibliografía del momento, recomendaban la utilización de células HeLa. Por tanto, los estudios de la topología se realizaron mediante transfección transitoria en células HeLa.

#### 3.2. Localización de los extremos N y C-terminal de xCT

Para determinar la localización de los extremos de xCT se construyeron dos versiones de la proteína: his-xCT, con una cola de 6 histidinas y el epítipo *Xpress* en el extremo N-terminal; y xCT-*myc*, con el epítipo *myc* en el extremo C-terminal. La transfección de his-xCT humano solo o en combinación con 4F2hc resultó en la inducción de transporte tanto de L-glutamato (4 veces) como de L-cistina (6 veces) por encima del nivel basal (Figura 20, Material Suplementario del Artículo 2), con valores comparables a los obtenidos con la proteína salvaje (88% ± 9% y 84% ± 7% del transporte de L-[<sup>35</sup>S]-cistina 25 μM y L-[<sup>3</sup>H]-glutamato 50 μM, respectivamente). El hecho que las células HeLa expresen 4F2hc pero no rBAT (Reig et al., 2002) sugiere que el 4F2hc endógeno conduce xCT transfectado a la membrana plasmática. Resultados similares fueron obtenidos con asc-1 por M. Pineda en nuestro grupo (M. Pineda, Tesis Doctoral), donde la transfección de la correspondiente LSHAT sola resultaba en una plena actividad de transporte en la membrana plasmática. Por simplicidad en el resto



### Figura 20. Inducción de la actividad del sistema $x_c^-$ por his-xCT.

Se transfectaron células HeLa con vector vacío (pCDNA3), 4F2hc, 4F2hc y his-xCT o con his-xCT solo, según indicado. **A.** 48 h después, se determinó el transporte de L-[<sup>35</sup>S]-cistina 25 μM (cssc) y L-[<sup>3</sup>H] glutamato 50 μM (glu). Los resultados están expresados como media±ES de 3 a 5 experimentos con cuatro réplicas cada uno. **B.** Las células transfectadas se cargaron durante 20 min con L-[<sup>3</sup>H] glutamato 100 μM. Se determinó la salida de sustrato en condiciones lineales en ausencia (none) o presencia de L-cistina 350 μM. Sólo se detectó trans-estimulación en las células transfectadas con his-xCT. El resultado (Media±ES) está expresado como porcentaje del total de carga radiactiva por min y corresponde a un experimento representativo con cuatro réplicas. La Figura corresponde al Material Suplementario del Artículo 2 (Figura A).

de experimentos, las células se transfectaron únicamente con la correspondiente versión de la proteína (salvaje, *tagged* o mutada).

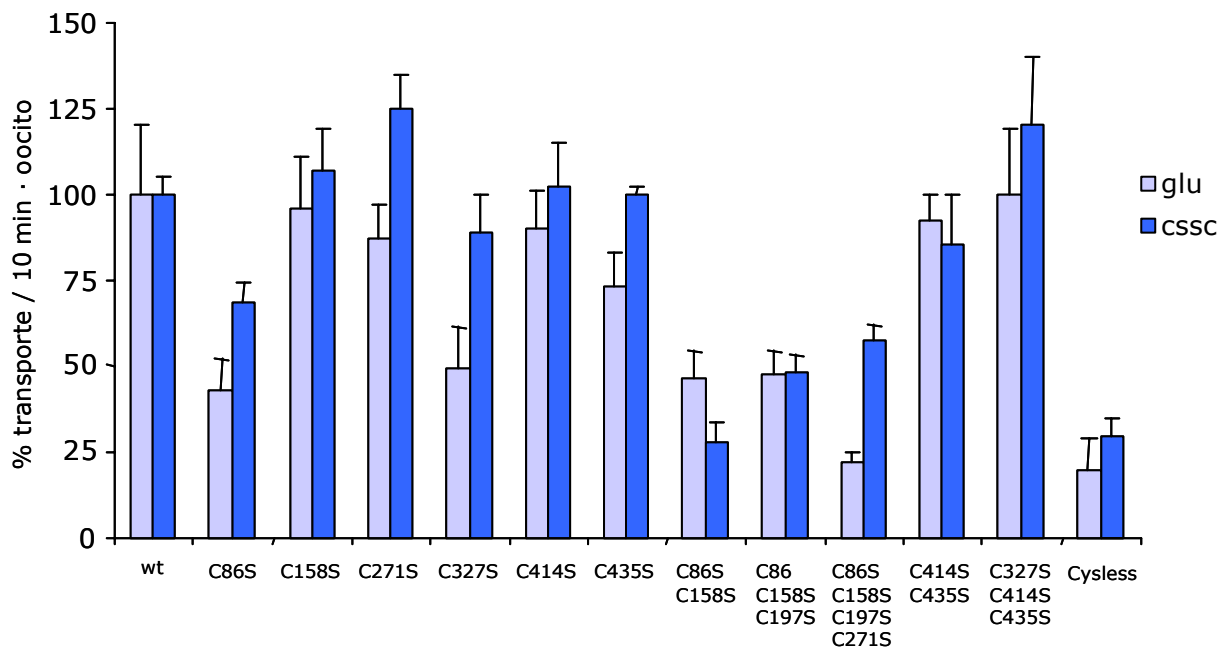
Así, las características del transporte inducido por his-xCT correspondían a las descritas anteriormente por xCT y4F2hc ((Sato et al., 1999) y presente tesis): independencia de sodio, valores de  $K_m$  para los sustratos en el rango μM (Tabla 1, Artículo 2) y trans-estimulación de la salida de L-glutamato en presencia de L-cistina (Figura 20, Material Suplementario del Artículo 2). Paralelamente, el constructo xCT-*myc* también presentó inducción de transporte correspondiente al sistema  $x_c^-$  (4 veces por encima del transporte basal de L-[<sup>35</sup>S]-cistina 25 μM, representando el 67%±7% del transportador salvaje, n=8).

La inmunodetección de his-xCT y xCT-*myc* ocurrió sólo cuando las células fueron permeabilizadas, mostrando una clara señal en la membrana plasmática además de cierta señal intracelular (Figura 1, Artículo 2). Esta observación evidencia la localización intracelular de los dos extremos de xCT.

### 3.3. Biotinilación de cisteínas individuales de xCT

#### Eliminación de las cisteínas endógenas de xCT

Para la aplicación de la estrategia de accesibilidad a cisteínas es necesario partir de una versión de la proteína en la que se han eliminado todas las cisteínas endógenas. xCT contiene siete cisteínas endógenas (86, 158, 197, 271, 327, 414 y 435) (Figura 2A, Artículo 3). Cada una de ellas fue mutada a serina y se evaluó que la actividad no quedara comprometida por el cambio (Figura 21). Luego, se fueron añadiendo secuencialmente hasta formar la versión de xCT sin cisteínas (*cysless*) (Figura 21) y ésta se pasó a un vector de expresión en células de mamífero que, en el extremo N-terminal, contenía el epítipo *Xpress* y una cola de seis histidinas. Es to permitiría detectar y purificar la proteína posteriormente.



**Figura 21. xCT mantiene una actividad parcial después de la eliminación de las cisteínas nativas.** Cada una de las cisteínas de xCT fue mutada a serina y posteriormente combinadas de forma secuencial para obtener la versión sin cisteínas de la proteína (Cysless). Se evaluó la función de transporte de cada mutante determinando la captación de L-[<sup>35</sup>S]-cistina y L-[<sup>3</sup>H]-glutamato 100  $\mu$ M durante 10 min en oocitos de *X. laevis*. Los resultados están expresados en porcentaje respecto a la actividad de la proteína salvaje (wt) (media  $\pm$  ES de 8 oocitos por grupo).

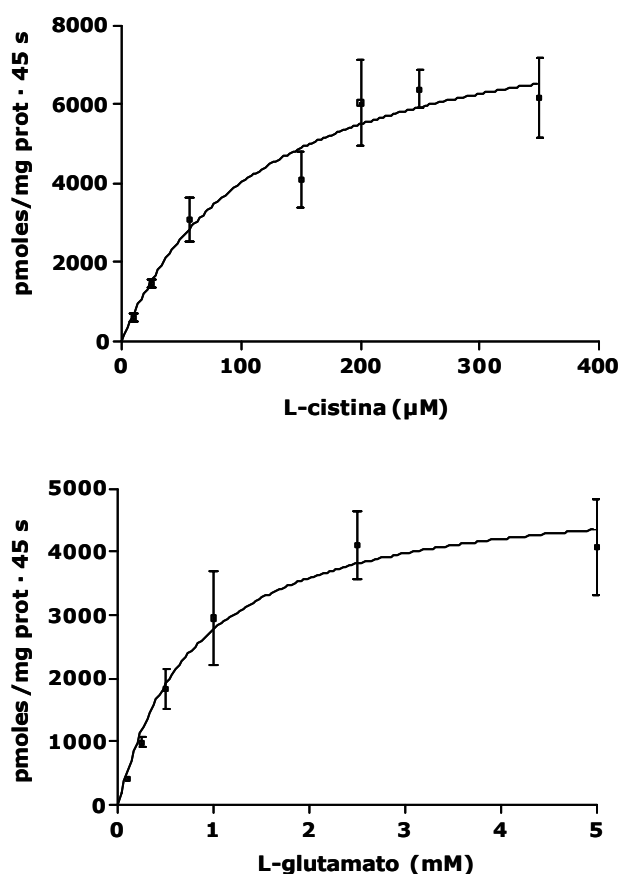
Las características del transporte inducido por la versión sin cisteínas de xCT (his-Cysless) fueron representativas del sistema  $x_c^-$ : his-Cysless presentó una inducción significativa en el transporte de L-cistina 25  $\mu$ M ( $1045 \pm 75$  pmoles/mg proteína·min respecto los  $3065 \pm 142$  del constructo his-xCT,  $n=8$ ;  $34\% \pm 5\%$ ) y de L-glutamato 100  $\mu$ M ( $541 \pm 32$  pmoles/mg proteína·min respecto los  $2728 \pm 145$  del constructo his-xCT,  $n=3$ ;  $20\% \pm 1\%$ ). El valor de  $K_m$  aparente resultó similar para la cistina y 3.6 veces aumentada para el L-glutamato (Tabla 1, Artículo 2) (Figura 22). Este incremento en la  $K_m$  aparente del L-glutamato se explica por la mutación de la cisteína endógena C327 a serina (Tabla 1, Artículo 3, M. Jiménez-Vidal). Demostrada la actividad de sistema  $x_c^-$  para el constructo his-Cysless, y por tanto, asumiendo un correcto plegamiento de la proteína en la membrana, éste sería la base para la determinación de la topología.

#### Screening de biotilación de cisteínas

Se eligió una batería de posiciones de la secuencia de xCT, procurando que no fueran residuos altamente conservados, con representación en cada *loop* extracelular y citosólico a partir del programa de predicción de topología HMMTOP (Tusnady and Simon, 2001) (Figura 4A, Artículo 2). Se mutó a cisteína cada uno de ellos individualmente y se testó su función valorando la inducción de transporte de L-[<sup>35</sup>S]-cistina en células HeLa transfectadas (Figura 2, Artículo 2). Los mutantes con actividades de transporte inferiores al 25% de la actividad de his-Cysless no se consideraron para el estudio.

La figura 3A del Artículo 2 muestra un experimento típico de biotilación. Las células HeLa transfectadas con los correspondientes constructos de xCT son incubadas con el reactivo 3-(N-maleimidilpropionil)biocitina (BM) y, después de solubilizar las proteínas de membrana, se purifican los transportadores con la cola de histidinas mediante una resina de ácido níquel-





**Figura 22. Análisis cinético de his-cysless.**

Se transfectaron células HeLa con el plásmido de his-cysless. Después de 48 h se determinó la captación de distintas concentraciones de L-cistina (10, 25, 50, 150, 200, 250 y 350  $\mu\text{M}$ ) y L-glutamato (100, 250, 500  $\mu\text{M}$ , 1, 2.5 y 5 mM) radiactivos durante 45 s (condiciones lineales). Los parámetros cinéticos obtenidos fueron:  $K_m$  de  $117 \pm 41$  y  $827 \pm 171$   $\mu\text{M}$ , y  $V_{m\acute{a}x}$  de  $8709 \pm 1165$  y  $5073 \pm 356$  pmol/min·mg prot., para la L-cistina y el L-glutamato, respectivamente. Los ajustes de la ecuación (*one binding site*) se hicieron mediante el programa GraphPad Prism, siendo  $R^2$  (fiabilidad del ajuste de la ecuación) de 0.9599 y 0.9795, respectivamente.

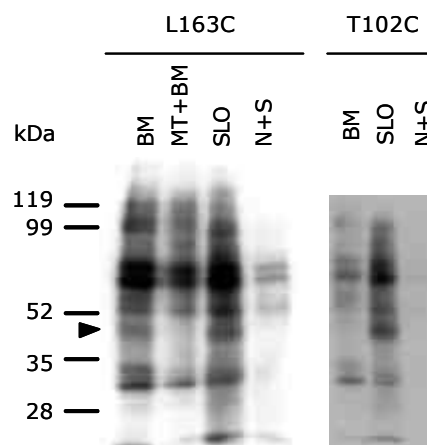
nitrotriacético (*Ni-NTA beads*). La unión covalente de la biotina al residuo de cisteína puede visualizarse después de una electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras y la incubación con estreptavidina-peroxidasa.

La banda correspondiente a xCT biotinilado (his-xCT) aparece con un tamaño de  $\sim 40$  kDa (Figura 3A, Artículo 2), de acuerdo con la inmunodetección mediante anti-Xpress (Figura 3B, Artículo 2). La tenue banda que aparece a  $\sim 80$  kDa (Figura 3B, Artículo 2) probablemente

representa un homodímero. Esta dimerización ya ha sido observada anteriormente para otras LSHATS (Fernández et al., 2002; Feliubadaló et al., 1999). Sin embargo, la biotinilación de esta banda de  $\sim 80$  kDa no se detecta debido seguramente a su baja expresión y a la presencia de bandas inespecíficas en este rango de movilidad.

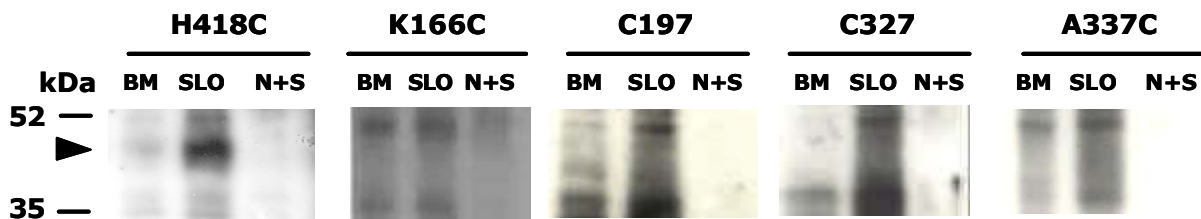
La preincubación de las células con el reactivo sulfidriilo impermeable (2-trimetilamonioetil)metanotiosulfonato (MTSET) (Karlin and Akabas, 1998) bloquea la biotinilación de las cisteínas extracelulares, como es el caso de E163C (Figura 3A, Artículo 2). Por otro lado, para detectar biotinilación en los residuos intracelulares es necesario permeabilizar las células con estreptolisina O (SLO), como es el caso de E260C. En los residuos extracelulares la permeabilización con SLO no implica aumentos significativos en la señal de la biotina (Figura 23).

Un resultado negativo de biotinilación después del tratamiento con SLO es ambiguo: el residuo puede encontrarse en un entorno hidrofóbico dentro de la membrana plasmática; en



**Figura 23. La biotinilación de los residuos extracelulares no depende del tratamiento con SLO.**

En dos experimentos independientes se cuantificó por densitometría la intensidad de la banda correspondiente a L163C biotinilado (triángulo) después de la permeabilización con SLO (SLO): 127% respecto la banda sin permeabilizar (BM) (gel de la imagen) y 106% (sin mostrar). El residuo interno T102C, en cambio, sólo presenta biotinilación después de la permeabilización con SLO. N+S=incubación con NEM antes del tratamiento con SLO.

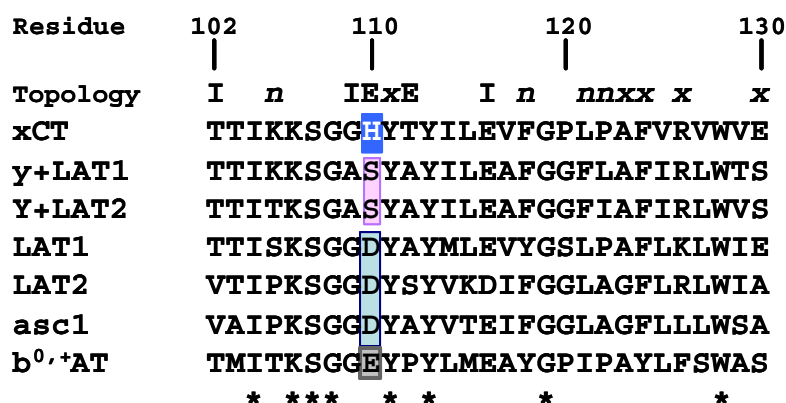


**Figura 24. Ausencia de biotinilación de los residuos transmembrana.** Los mutantes K166C y A337C y las cisteínas endógenas C197 y C327, en putativos segmentos transmembrana (TM4, 5 y 8, respectivamente), no mostraron señal de biotinilación (BM) ni después de la permeabilización de las células con Streptolisina O (SLO). Los residuos intracelulares, en cambio, como H418C, presentan una evidente señal después de la incubación con SLO. N+S es la condición de incubación con NEM antes del tratamiento con SLO.

un canal acuoso demasiado estrecho para permitir el acceso del voluminoso BM; escondido en una estructura secundaria particular del transportador xCT o bien interactuando con otras proteínas (p.ej., la subunidad pesada).

En la Figura 4 del Artículo 2 se muestra el resultado del *screening* de residuos mutados a cisteínas. Las posiciones accesibles desde el medio extracelular fueron: N72 (*loop* extracelular entre los dominios transmembrana 1-2, EL1-2), L163 (EL3-4), Q219 (EL5-6), A294 (EL7-8), S387 (EL9-10) y S445 (EL11-12) (Figura 4B, Artículo 2). En estos casos, la biotinilación fue bloqueada por la preincubación con MTSET.

Los residuos localizados en el interior celular y, por tanto, con señal de biotinilación sólo después de la permeabilización con SLO, fueron: S11 (extremo N-terminal), T102 (*loop* intracelular entre los dominios transmembrana 2-3, IL2-3), S181 y F193 (IL4-5), E260 (IL6-7), E353 y H363 (IL8-9), H418 (IL10-11) y D499 (extremo C-terminal) (Figura 4C, Artículo 2). En estos casos, la preincubación con N-etilmaleimida (NEM) bloqueó la biotinilación de los residuos. Aparte de estos residuos accesibles intracelularmente, otras posiciones supuestamente intracelulares fueron ensayadas sin éxito, incluso después de la permeabilización con SLO. Es el caso de las



**Figura 25. Alineamiento múltiple del IL2-3 de las LSHATs humanas que heterodimerizan con rBAT o 4F2hc.** El alineamiento corresponde a la zona del *loop* intracelular entre los dominios TM2 y 3. H110 en xCT está resaltado en blanco con fondo azul. Los residuos en la posición homóloga son: serina, resaltado en lila, en y+LAT-1 y y+LAT-2; aspartato, resaltado en azul pálido, en LAT-1, LAT-2 y asc-1; y glutamato, resaltado en gris, en b<sup>0</sup>+AT. Topology: I, biotinilación con BM intracelular; E, biotinilación con BM extracelular (H110) o acceso a los reactivos impermeables MTSES y MTSET (T112C, activación del transporte); n, no biotinilación ni después de la permeabilización con SLO; x, la mutación a cisteína resulta en una pérdida de actividad acusada. El alineamiento de la secuencia completa se ha realizado mediante el programa CLUSTALW. \* indica que el residuo está conservado en los siete miembros. Uno de ellos es el residuo Y111. La Figura corresponde al Material Suplementario del Artículo 2 (Figura E-I).

posiciones I182, S185, S187, A188, I190 y I192, localizadas en el IL4-5. Finalmente, también se testaron algunas cisteínas situadas en putativos segmentos transmembrana (TM) sin obtener señal de biotilación, como era esperable: K166C (TM4), C197 endógena (TM5), C327 endógena y A337C (TM8) (Figura 24).

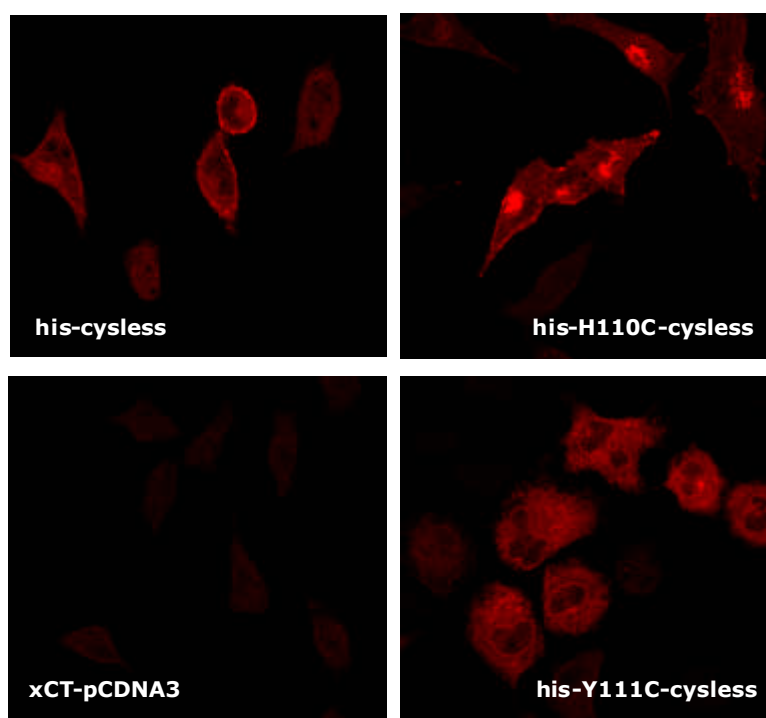
En conjunto, el resultado del *screening* de cisteínas apoyaba experimentalmente el modelo propuesto para xCT de 12 segmentos transmembrana.

### 3.4. Localización de una estructura *reentrant loop-like*

El mutante H110C mostró biotilación desde el medio extracelular a pesar de que el cercano residuo T102 presentaba una localización intracelular (Figura 4C, Artículo 2). Esto nos llevó a estudiar más a fondo esta región de la proteína. En este análisis se encontró que el residuo E116 también presentaba una localización intracelular (Figura 4C, Artículo 2). La presencia de dos residuos intracelulares (T102 y E116) a 8 y 6 posiciones, respectivamente, de otro residuo con

acceso desde el exterior (H110), sugería la existencia de una estructura de tipo *reentrant loop*. En las posiciones vecinas (Figura 4C, Artículo 2): G109C mostró biotilación sólo después de permeabilizar las células con SLO; Y111 es un residuo altamente conservado (Figura 25, Material Suplementario del Artículo 2) que su mutación a cisteína provocó una caída brusca de la actividad de transporte (Figura 2, Artículo 2) y un defecto de tráfico a la membrana plasmática (Figura 26, Material Suplementario del Artículo 2); los mutantes K105C, T112C, F118C, L121C y P122C no mostraron biotilación ni después del tratamiento con SLO (Figura 4C, Artículo 2); y, por último, las posiciones A123, F124, R126 y E130 no pudieron ser analizadas debido a la baja actividad de los mutantes a cisteína (Figura 2, Artículo 2).

Se evaluó el marcaje con BM del mutante H110C-Cysless en presencia de reactivos sulfhidrilo impermeables. La preincubación con el compuesto cargado negativamente [(2-sulfonatoetil) metanotiosulfonato] (MTSES) bloqueó la biotilación de H110C-Cysless mientras que el compuesto positivo MTSET, no lo hizo (Figura 5A, Artículo 2). Esta observación reforzaba la idea



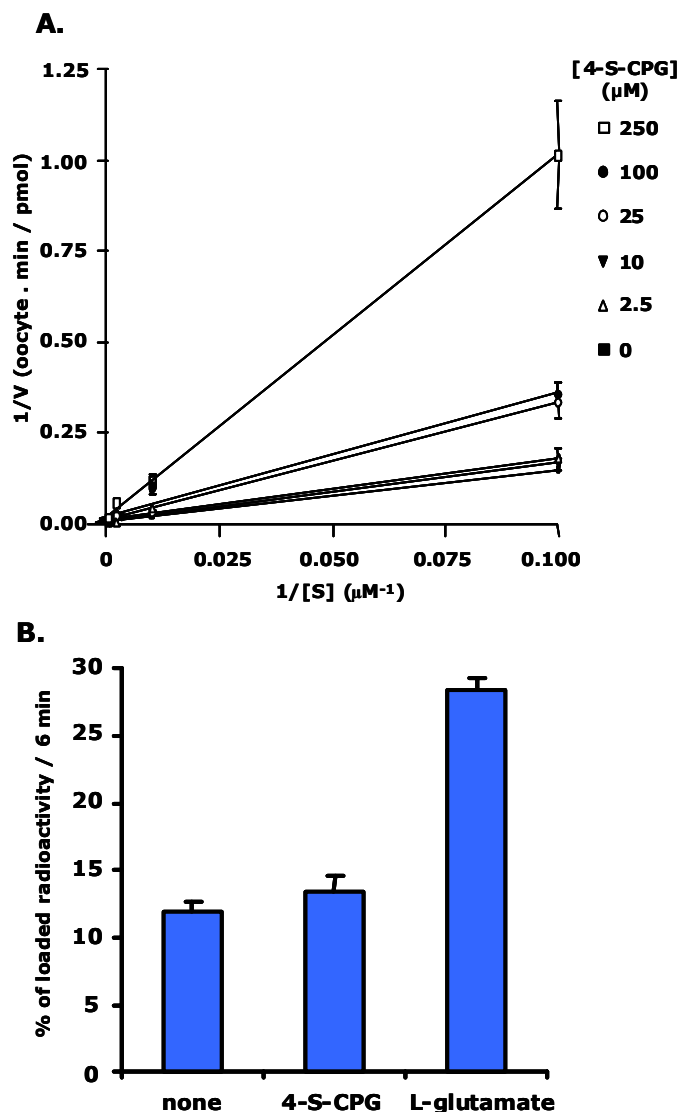
**Figura 26. Localización celular de los mutantes H110C y Y111C.** Se transfectaron células HeLa con el transportador xCT salvaje (xCT-pCDNA3), el transportador sin cisteínas xCT en el vector de histidinas (his-cysless), y los mutantes H110C y Y111C en el entorno sin cisteínas. A las 48 h las muestras fueron permeabilizadas y procesadas para inmunodetección con el anticuerpo anti-Xpress (ver Materiales y Métodos). Los resultados son representativos de tres preparaciones por condición. Se aprecia la señal en la membrana plasmática de las muestras his-cysless y his-H110C-cysless. El mutante Y111C, que no llega a la membrana, probablemente presenta un defecto de tráfico. La Figura corresponde al Material Suplementario del Artículo 2 (Figura B). Las imágenes fueron obtenidas del Microscopio Confocal de los Servicios Científico-Técnicos del Parque Científico de Barcelona.

de accesibilidad exterior para el residuo H110 y sugería que los reactivos negativos tendrían mayor acceso desde fuera a esta posición que los positivos.

Dado que el sistema  $x_c^-$  intercambia sustratos aniónicos (cistina y glutamato aniónico) (apartado 1.3. de Resultados y (Sato et al., 1999)), esta coincidencia con la carga negativa del reactivo nos llevó a realizar experimentos de protección de sustrato sobre la biotilación de H110C. El L-glutamato y la L-cistina, pero no la L-arginina (ni sustrato ni inhibidor de  $xCT$ ), bloquearon la biotilación de H110C (Figura 5, Artículo 2). El recientemente descrito inhibidor competitivo no transportable del sistema  $x_c^-$  (S)-4-carboxifenil glicina (S-4-CPG) (Patel et al., 2004) (Figura 27, Material Suplementario del Artículo 2, M. Jiménez-Vidal), también bloqueó la biotilación de H110C a una concentración saturante (1mM) (Figura 5, Artículo 2). En conjunto, esto sugiere que la ocupación del lugar de unión al sustrato impide que el residuo H110 sea accesible desde el exterior.

#### Efecto de los derivados metanotiosulfonados en los mutantes de cisteína del loop intracelular 2-3

A continuación investigamos la inactivación del transporte en los mutantes individuales de cisteína del IL2-3 provocada por los reactivos metanotiosulfonados (MTS). Para compensar las diferencias de reactividad entre ellos (Karlín and Akabas, 1998), el MTSES se utilizó a una concentración de 10 mM, el (2-aminoetil) metanotiosulfonato (MTSEA) a 2.5 mM y el MTSET a 1mM (Figura 6, Artículo 2). Como era de esperar, la actividad de transporte de his-Cysless no se vió afectada por la incubación con los reactivos MTS. De los mutantes testados, sólo H110C resultó inactivado por MTSES y, en menor medida, por MTSEA (Figura 6, Artículo 2). El reactivo MTSET, en cambio, no afectó el transporte inducido por his-H110C-Cysless. También se obtuvo este orden de inactivación cuando los tres reactivos MTS se utilizaron a una misma concentración de 1mM durante 10 min.

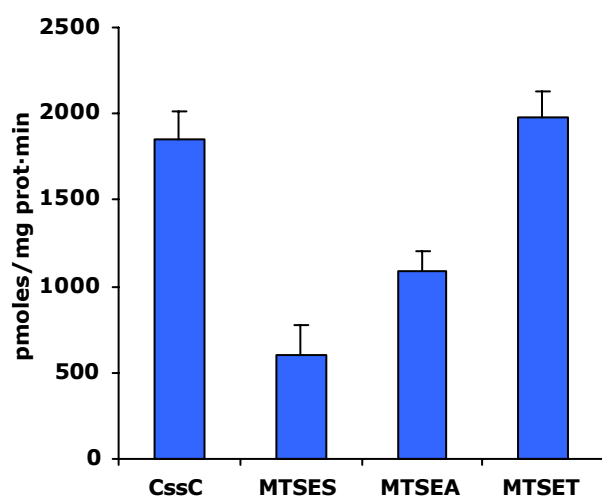


#### Figura 27. 4-S-CPG es un inhibidor competitivo no transportable de $xCT$ .

**A.** Análisis Dixon Plot de la inhibición por 4-S-CPG en el transporte de L-glutamato inducido por 4F2hc/ $xCT$  en oocitos de *X. laevis*. Se determinó el transporte de L-[<sup>3</sup>H]-glutamato a diferentes concentraciones (10, 100, 500  $\mu$ M 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  $K_i=24.9\pm 5.5$   $\mu$ M se ha hecho con el programa GraphPad ( $R^2=0.8358$ ). **B.** Eflujo de L-glutamato en oocitos de *X. laevis* que expresan 4F2hc/ $xCT$ . Después de 60 min de incubación con L-[<sup>3</sup>H]-glutamato, se determinó la salida de radioactividad en ausencia de aminoácido (none) y en presencia de 4-S-CPG o L-glutamato 2mM. Los resultados están expresados en porcentaje respecto el total de radioactividad cargado en el oocito. El eflujo de la condición 4-S-CPG resultó estadísticamente diferente ( $p<0.001$ , t Student) del eflujo trans-estimulado por L-glutamato pero no del grupo none. La Figura corresponde al Material Suplementario del Artículo 2 (Figuras C y D), realizado por M. Jiménez.

(Figura 28). La actividad de transporte residual fue de  $32.6\% \pm 9.3\%$ ,  $58.7\% \pm 3.2\%$  y  $107.0\% \pm 8.0\%$  después de la incubación con MTSES, MTSEA y MTSET, respectivamente ( $p < 0.05$  entre los tres grupos, test t Student) (Figura 28). Estos resultados confirmaban los estudios previos de marcaje con biotina y apoyaban firmemente el acceso exterior del residuo H110. La inactivación por MTSES, sin embargo, no fue total. A las condiciones de máxima inactivación (10 mM MTSES durante 5 min; Figura 7, Artículo 2) se obtuvo una actividad de transporte residual de L-[ $^{35}$ S]-cistina 25  $\mu$ M ( $17.4\% \pm 2.9\%$ ,  $n=8$ ) similar a la obtenida a 350  $\mu$ M ( $16.7\% \pm 5.8\%$ ,  $n=3$ ) (4 veces por debajo y 3 veces por encima de la  $K_m$ , respectivamente; Tabla 1, Artículo 2). Estos resultados indican que el MTSES reduce  $\sim 6$  veces la actividad de transporte de his-H110C-cysless, probablemente afectando la  $V_{m\acute{a}x}$ .

El tratamiento con MTSES, MTSEA y MTSET provocó una estimulación en la actividad de transporte inducida por T112C de hasta un 80% (Figura 6, Artículo 2). Esta observación nos sugirió que T112 también es accesible desde el exterior. El



**Figura 28. Inactivación de H110-cysless por los reactivos MTS.** Se transfectaron células HeLa y a las 48 h se determinó la captación de L-[ $^{35}$ S]-cistina después de la incubación durante 10 min de 1mM MTSES, MTSEA o MTSET, según indicado. El grupo sin inhibidor se trató durante 10 min con tampón MGA (ver Materiales y Métodos). El gráfico muestra el orden de inactivación MTSES>MTSEA>MTSET.

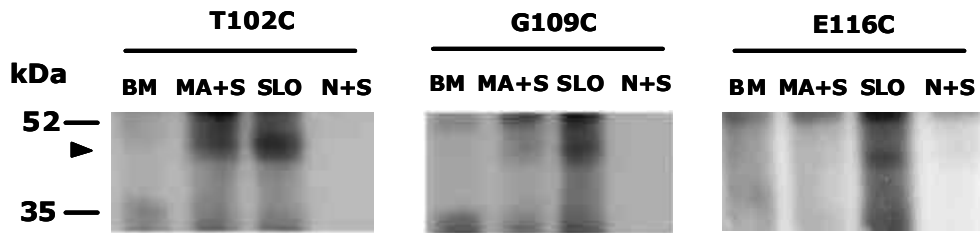
reactivo permeable MTSEA, sin embargo, no afectó la actividad de transporte de T102C, G109C o E116C (Figura 6, Artículo 2), biotinilados desde el interior (Figura 4, Artículo 2). Estos residuos podrían ser modificados por el MTSEA sin que éste afectara la actividad de transporte. De hecho, el MTSEA bloqueó la biotinilación de G109C y E116C (Figura 14, Resultados), evidenciando el acceso de este reactivo a los residuos en cuestión. No ocurrió lo mismo con T102C (Figura 29), sugiriendo que este residuo no es accesible al reactivo, quizás por ser repelido por su carga positiva.

En conjunto, los estudios de biotinilación y de tratamiento con reactivos MTS nos sugieren que la accesibilidad en este *reentrant loop* está restringida a las posiciones H110 y T112 desde el exterior, y a las posiciones T102, G109 y E116 desde el interior.

#### Protección por el sustrato de la inactivación de H110C

El bloqueo de la biotinilación de H110C observado anteriormente para L-glutamato, L-cistina, 4S-CPG y MTSES, nos sugirió que los sustratos podrían retrasar la inactivación del transporte provocada por MTSES sobre his-H110C-Cysless. En esta dirección, la preincubación del MTSES en presencia de L-cistina y L-glutamato a 25 °C (*Room Temperature*) protegió significativamente de su efecto de inactivación (Figura 7, Artículo 2). Como era de esperar, la presencia de L-arginina (ni sustrato ni inhibidor), en cambio, no protegió del efecto del MTSES. El parámetro  $t_{1/2}$ , indicativo del tiempo al que se produce el 50% de la inhibición total, resultó ser de  $16 \pm 3$  s en ausencia de aminoácido y de  $394 \pm 83$  s en presencia de L-glutamato. La estimación de este parámetro o tasa de inactivación se realizó mediante el programa GraphPad Prism.

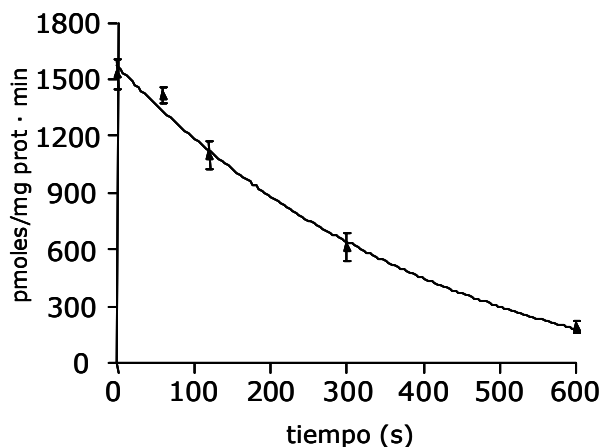
Para determinar el valor de la concentración de sustrato al que ocurre la mitad de la protección máxima ( $IC_{50}$ ) (Figura 8, Artículo 2) era preciso establecer las condiciones de concentración de inhibidor y tiempo de exposición



**Figura 29. Efecto del MTSEA en la biotinilación de T102C, G109C y E116C.** Los residuos T102C, G109C y E116C fueron biotinilados sólo después de la permeabilización de las células con SLO. La preincubación con 2.5 mM MTSEA durante 5 min. previamente al tratamiento con SLO (MA+S) bloqueó la biotinilación de G109C y E116C. Esta modificación, sin embargo, no tenía consecuencias en la actividad de transporte. Para T102C, la preincubación con el MTSEA no bloqueó la biotinilación, sugiriendo que este residuo no es accesible al reactivo o bien es repelido por su carga positiva.

que permitieran obtener el efecto máximo (~88% inactivación) con la tasa mínima de inactivación ( $t_{1/2}$  295 s) (Figura 30). En estas condiciones (1 mM MTSET, 10 min. a 25 °C), la protección (porcentaje de la actividad de transporte residual respecto la de las células sin tratar) ofrece una buena estimación del parámetro  $IC_{50}$ . Los valores de las  $IC_{50}$  para L-glutamato ( $1078 \pm 223$  y  $807 \pm 302$ ,  $n=2$ ) y L-cistina ( $97 \pm 30$ ) (Figura 8, Artículo 2) fueron similares a los de las  $K_m$  para his-H110C-Cysless (Tabla 1, Artículo 2).

Al menos dos mecanismos podrían explicar los experimentos de protección: los sustratos compiten directamente con el MTSES por



**Figura 30. Inactivación del transporte inducido por H110C en presencia de MTSES 1mM.** Se determinó la captación de L-[ $^{35}$ S]-cistina 25  $\mu$ M a distintos tiempos de incubación con MTSES 1 mM en células HeLa que expresaban his-H110C-Cysless. A los 600 s (10 min) la inactivación fue del  $88\% \pm 7\%$  (máxima) y la tasa de inactivación fue de 295 s (lenta).

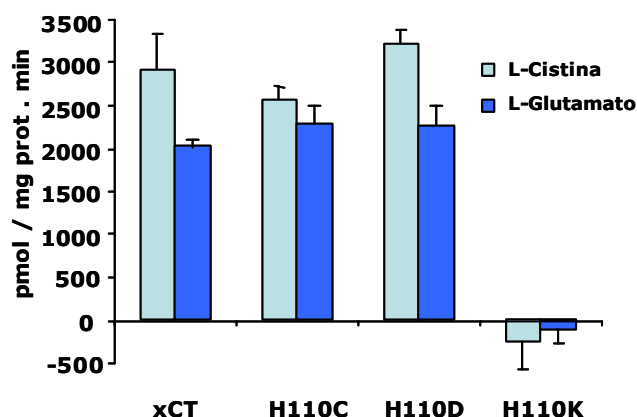
el sitio de unión o, alternativamente, un cambio conformacional inducido por el sustrato evita el acceso del MTSES a la cisteína 110. Está generalmente aceptado que los cambios conformacionales grandes son mucho más sensibles a la temperatura que la unión al sustrato (Chen and Rudnick, 2000; Seal and Amara, 1998). Esta característica se ha utilizado experimentalmente para detectar cambios conformacionales en varios transportadores (Androutsellis-Theotokis et al., 2001; López-Corcuera et al., 2001) y en el propio xCT (Artículo 3). El transporte de xCT a 4°C es insignificante (datos no mostrados). Se examinó la curva de modificación en el tiempo de la inactivación del transporte de H110C por 10 mM MTSES en presencia de 10mM L-glutamato a 4°C (Figura 7A, Artículo 2). El reactivo MTSES, como era esperable, inhibió la captación de sustrato de H110C de forma más lenta que a 25°C ( $t_{1/2} = 51 \pm 20$  s). El L-glutamato también protegió de la inactivación a 4°C ( $t_{1/2} = 339 \pm 121$  s), por tanto, seguramente esta protección ocurre en un paso del ciclo del transporte anterior a los cambios conformacionales sensibles a la temperatura provocados por el sustrato. El grado de protección del L-glutamato a 4°C (la  $t_{1/2}$  aumentó 7 veces) fue inferior que a 25°C (la  $t_{1/2}$  aumentó 24 veces). Esto puede explicarse por cambios conformacionales temperatura-sensibles adicionales o por una menor afinidad por el glutamato a 4°C. La confirmación de que el sustrato bloquea la modificación por MTSES en un paso anterior a la translocación del

sustrato no pudo realizarse con el inhibidor no transportable 4S-CPG. Esto fue debido a que el inhibidor no disociaba del complejo transportador ni después de media hora de lavados.

### Análisis funcional de mutantes H110

Los resultados presentados en las secciones anteriores parecen apoyar un papel del residuo His110 en la unión del sustrato. Por tanto, este residuo podría ser un determinante de especificidad dentro de la familia LSHAT. Las posiciones homólogas en las isoformas  $y^+$ LAT (transportan aminoácidos cargados positivamente) contienen un residuo de serina, un aspartato en las isoformas LAT y asc-1 (transportan aminoácidos neutros), y glutamato en  $b^{0,+}$ AT (transporta aminoácidos positivos y neutros) (Figura 25, Material Suplementario del Artículo 2). Por otro lado, la accesibilidad del residuo H110C es mayor para el reactivo cargado negativamente MTSES que para el positivo MTSET, y los sustratos de xCT, que protegen de la inactivación por MTSES, también están cargados negativamente (glutamato y cistina aniónica).

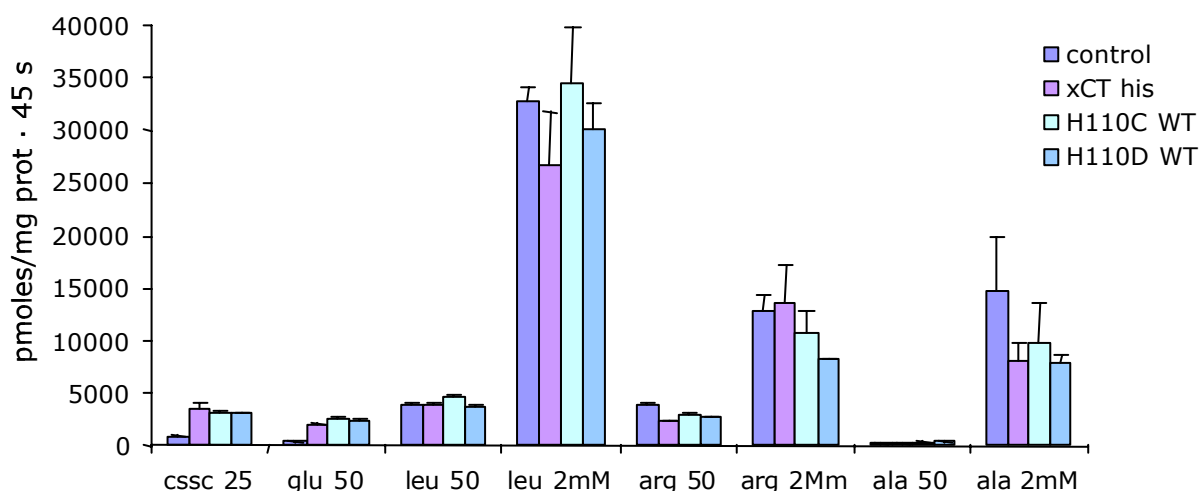
Para probar la hipótesis que el residuo H110C está implicado en la unión al sustrato o en



### Figura 31. Actividad de los mutantes del residuo H110.

Se transfectaron células HeLa con his-xCT y los mutantes H110C, H110D y H110K (también con las cola de histidinas). Después de 48 h se determinó la captación de L-[ $^{35}$ S]-cistina 25  $\mu$ M y L-[ $^3$ H] glutamato 50  $\mu$ M. El transporte inducido (calculado restando los valores obtenidos en las células *mock-transfected*) representa la media  $\pm$ ES de 10-18 determinaciones de 3-4 experimentos independientes. La Figura corresponde al Material Suplementario del Artículo 2 (Figura E-II).

la especificidad del transportador, mutamos el residuo H110 a cisteína (H110C), aspartato (H110D) (como en LAT-1, LAT-2 y asc-1) y lisina (H110K), sobre la versión salvaje de xCT con la cola de histidinas. Se transfectaron células HeLa



### Figura 32. La especificidad de sustrato de los mutantes H110C y H110D no está alterada.

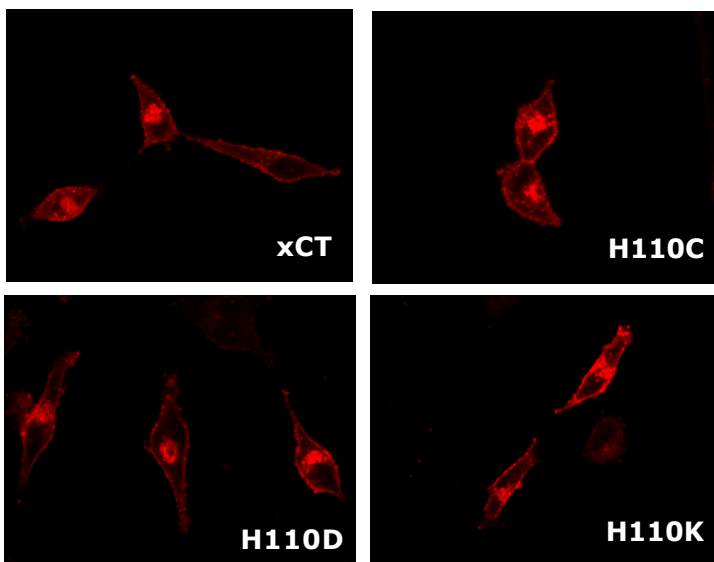
Se determinó la captación de los sustratos propios de xCT (L-cistina 25  $\mu$ M y L-glutamato 50  $\mu$ M) junto con otros sustratos característicos de otras LSHAT (leucina, arginina y alanina 50  $\mu$ M y 2 mM). Los dos mutantes presentaron inducción de transporte por encima de las condiciones basales (control) únicamente para los sustratos de xCT (cssc 25 y glu 50). Para el resto de aminoácidos testados el nivel de captación se encontraba dentro de los valores de transporte basal.

con xCT salvaje y cada uno de los mutantes y se Material Suplementario del Artículo 2). his-H110C y his-H110D mostraron actividades de transporte similares a las de xCT salvaje para L-[<sup>35</sup>S]-cistina 25μM y L-[<sup>3</sup>H]-glutamato 50μM, mientras la mutación his-H110K anuló por completo la función del transportador (Figura 31, Material Suplementario del Artículo 2). His-H110K resultó inactivo incluso cuando se ensayó el transporte de L-glutamato a 10 mM (datos no mostrados).

El análisis cinético no reveló cambios significativos en la K<sub>m</sub> para el glutamato o la cistina en los mutantes de cisteína y aspartato (Tabla 1, Artículo 2). También se probó el transporte a 50 μM y 2mM de los sustratos radiactivos característicos de LAT-1 (leucina),

determinó la actividad de transporte (Figura 31, LAT-2 y asc-1 (alanina), y las isoformas y<sup>+</sup>LAT y b<sup>0,+</sup>AT (arginina). En ningún caso el transporte de los mutantes estuvo por encima de las condiciones basales (*mock-transfection* o xCT salvaje) (Figura 32).

La expresión de los mutantes fue estudiada por inmunocitoquímica (Figura 33, Material Suplementario del Artículo 2). El transportador salvaje (his-xCT) y los tres mutantes, his-H110C, his-H110D y his-H110K, se expresaron en la superficie celular con niveles similares a juzgar por la señal de fluorescencia. El fenotipo inactivo de H110K, por tanto, no se debe a un problema de tráfico a la superficie celular sino más bien a una inactivación del transportador.



**Figura 33. Expresión en la membrana plasmática de los mutantes H110.**

Se transfectaron células HeLa con his-xCT y los mutantes his-H110C, his-H110D y his-H110K, según indicado. Después de 48 h se procesaron para inmunodetección con el anticuerpo específico anti-Xpress después de permeabilizarlas (ver Materiales y Métodos). Las imágenes, obtenidas del Microscopio Confocal de Serveis Científico-Tècnics UB-PCB, son representativas de tres preparaciones por condición. Todos los mutantes, incluso el mutante que no presenta actividad de transporte H110K, se expresan en la membrana plasmática de las células.



**Artículo 2:**

**Membrane Topology of system  $x_c^-$  light subunit reveals a reentrant loop  
with substrate-restricted accessibility**

*Journal of Biological Chemistry* 279 (30) 31228-36 (2004)

Emma Gasol, Maite Jiménez-Vidal, Josep Chillarón, Antonio Zorzano and Manuel Palacín.

La doctoranda ha contribuido con la construcción de los mutantes individuales, los ensayos de transporte para el análisis funcional, los marcajes con biotina en sus variantes, la evaluación de los efectos de los reactivos MTS y su protección por sustrato, la determinación de los parámetros cinéticos y los estudios de inmunofluorescencia.



## Membrane Topology of System $x_c^-$ Light Subunit Reveals a Re-entrant Loop with Substrate-restricted Accessibility\*<sup>§</sup>

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<sup>‡§</sup>, Maite Jiménez-Vidal<sup>‡¶</sup>, Josep Chillarón<sup>‡\*\*</sup>, Antonio Zorzano<sup>‡</sup>,  
and Manuel Palacín<sup>‡‡</sup>

From the <sup>‡</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology and Barcelona Science Park, University of Barcelona and the <sup>¶</sup>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 His<sup>110</sup> and Thr<sup>112</sup>, 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 IC<sub>50</sub> similar to the  $K_m$ . Protection was temperature-independent. The data indicate that His<sup>110</sup> 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.**

Heteromeric amino acid transporters (HATs)<sup>1</sup> 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.

<sup>§</sup> The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental figures.

<sup>¶</sup> Recipient of a predoctoral fellowship from the Spanish Ministry of Education and Culture.

<sup>¶</sup> Supported by BIOMED Grant BMH4 CT98-3514.

<sup>\*\*</sup> Researcher from the Programa Ramón y Cajal of the Spanish Ministry of Science and Technology.

<sup>‡‡</sup> 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](mailto:mpalacin@bio.ub.es).

<sup>1</sup> 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  $y$ .

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<sup>0,+</sup>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<sup>+</sup>LAT1 causing lysinuric protein intolerance (13) and those in b<sup>0,+</sup>AT causing cystinuria (14), L334R (y<sup>+</sup>LAT1) and A354T (b<sup>0,+</sup>AT) inactivate the transporter (11, 15). Finally, there is evidence that Cys<sup>327</sup> 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.

## 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<sup>TM</sup>; 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.

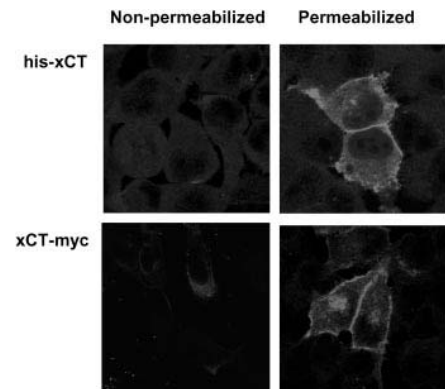
**Cell Culture and Transfections in HeLa Cells**—HeLa cells were cultured as described (11) and grown at 37 or 33 °C, as indicated. Transient transfections were performed by standard calcium phosphate precipitation as described (15) in 10-cm plates with a mixture of DNA containing 2  $\mu$ g of pEGFP (Clontech) and 18  $\mu$ g 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  $\mu$ M L-[<sup>35</sup>S]cysteine (Amersham Biosciences) and 50  $\mu$ M L-[<sup>3</sup>H]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  $\mu$ M BM was carried out as described previously (17), with the following modifications. After the biotinylation step, the cells were lysed with 100  $\mu$ l/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 NaPO<sub>4</sub> (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  $\mu$ l of Ni-NTA-agarose beads (Qiagen) pre-equilibrated in 150  $\mu$ l 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  $\mu$ l of a PBS solution containing 0.5 M NaCl and 0.05 M imidazole (pH 7.4). The proteins were eluted with 45  $\mu$ l 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 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 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 Me<sub>2</sub>SO. 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  $\mu$ g 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  $\mu$ M L-[<sup>3</sup>H] glutamate (4-fold) and 25  $\mu$ M L-[<sup>35</sup>S] cysteine (6-fold) uptake over background (Supplemental Fig. A). The His-xCT-induced transport was similar to that elicited by nontagged xCT (88  $\pm$  9 and 84  $\pm$  7% of the transport of 25  $\mu$ M L-[<sup>35</sup>S]cysteine and 50  $\mu$ M L-[<sup>3</sup>H]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 His<sup>110</sup> 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	
	$K_m$	$V_{max}$	$K_m$	$V_{max}$
	$\mu\text{M}$	$\text{pmol}/\text{min}\cdot\text{mg protein}$	$\mu\text{M}$	$\text{pmol}/\text{min}\cdot\text{mg protein}$
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-[<sup>35</sup>S]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  $1051 \pm 109$  pmol/min·mg protein ( $n = 12$ ).

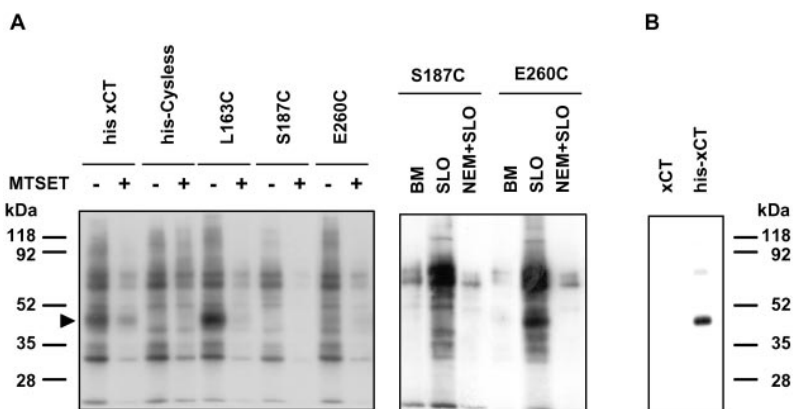
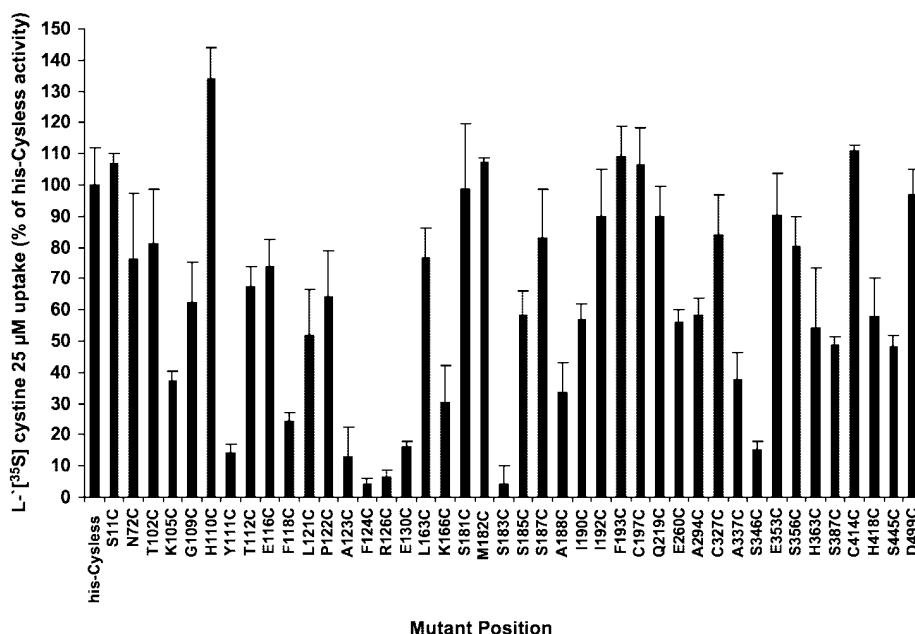
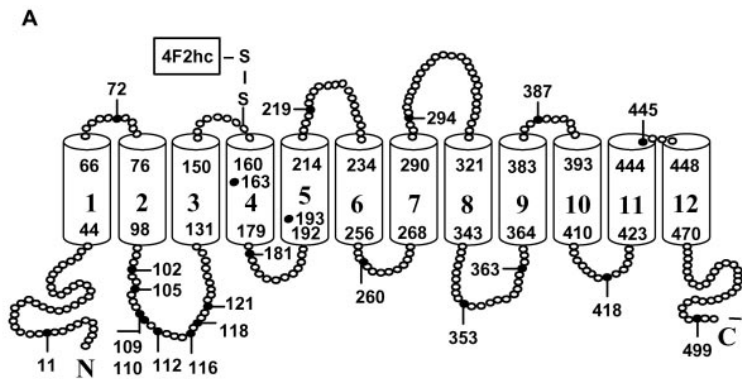


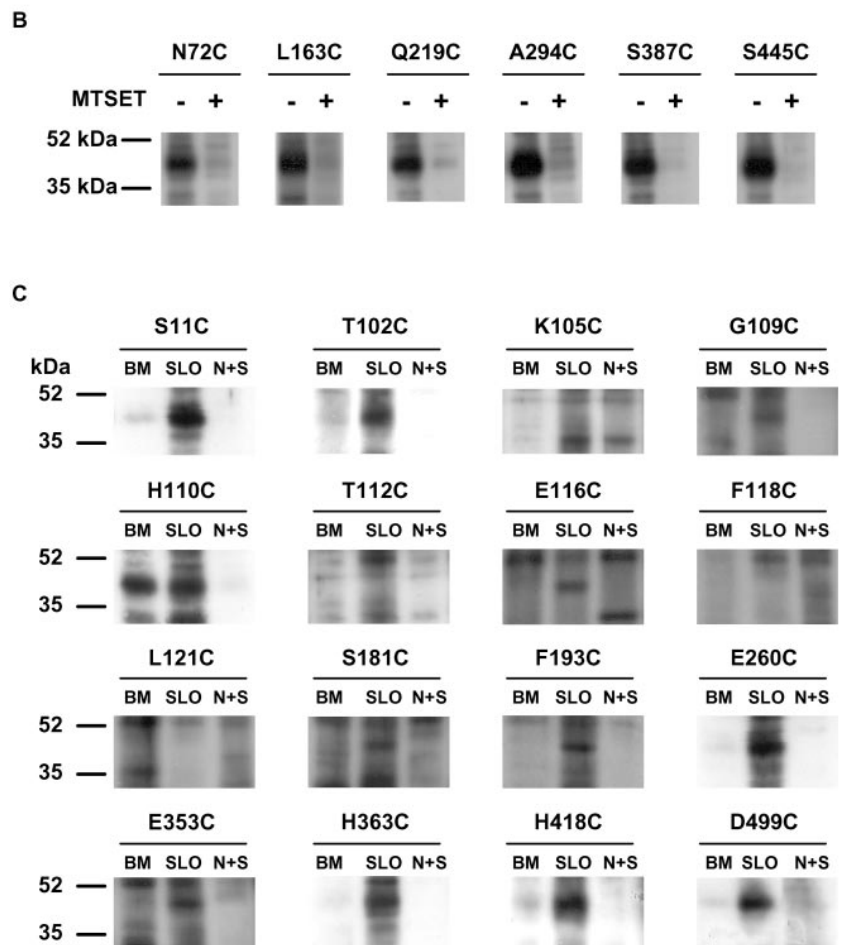
FIG. 3. Biotinylation of His-xCT and the single cysteine derivatives L163C, S187C, and E260C. A, cells expressing His-tagged derivatives of wild-type xCT (His-xCT), of cysteineless xCT (His-Cys-less), and of the mutants L163C, S187C, and E260C in the His-Cys-less background were pretreated or not with 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  $\alpha$ -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  $\mu\text{M}$  range (Table I), and L-cysteine transstimulation of L-glutamate efflux (Supplemental Fig. A). Sim-

ilarly, xCT-myc also elicited system x<sub>c</sub><sup>-</sup> transport activity (4-fold of 25  $\mu\text{M}$  L-[<sup>35</sup>S]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 (Cys<sup>158</sup>) 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-1<sup>2</sup> 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<sup>0,+</sup>AT (20), 25 μM L-[<sup>35</sup>S] 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<sub>m</sub>* for cysteine and 3.6-fold higher apparent *K<sub>m</sub>* for glutamate than His-xCT (Table I). Mutation of cysteine residue 327 to

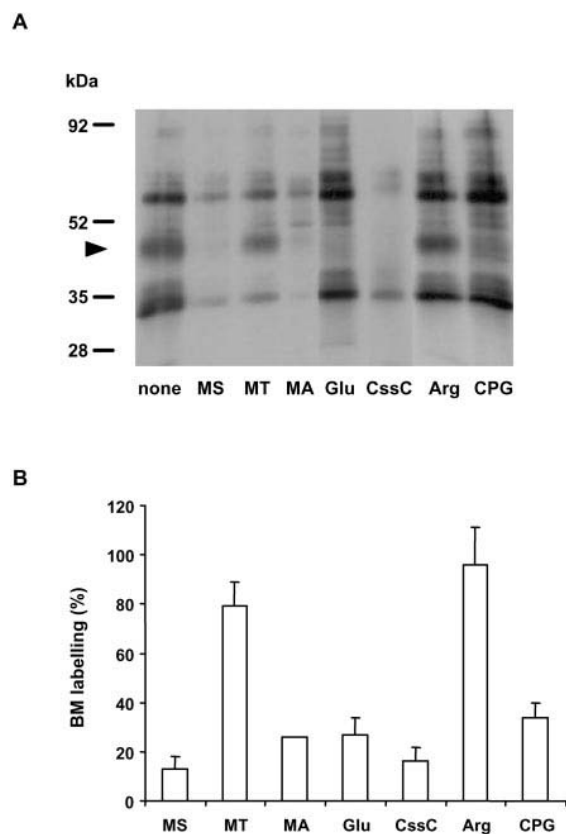
<sup>2</sup> M. Pineda and M. Palacin, unpublished results.

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-[<sup>35</sup>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<sup>0,+</sup>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 Leu<sup>163</sup> 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).

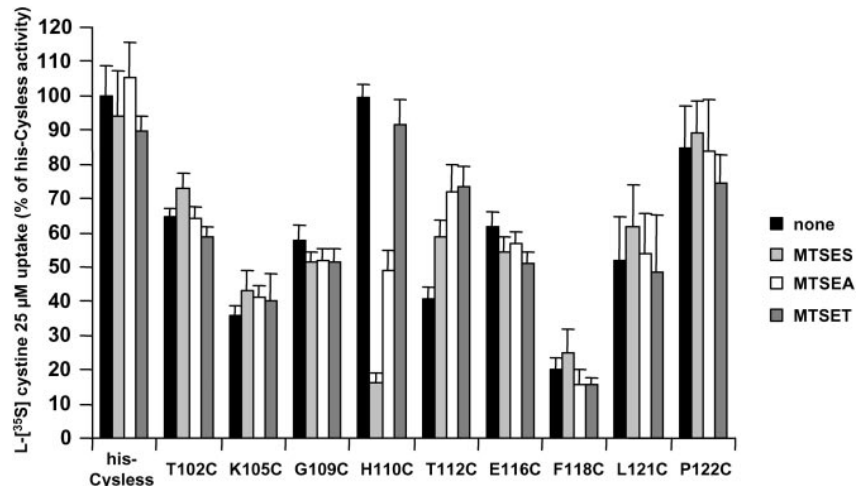
**Biotinylation Screening to Establish the Membrane Topology of xCT Subunit**—To identify the membrane topology of additional sites, we introduced single cysteines at many other positions of His-Cys-less. Fig. 4A shows a 12-transmembrane domain model of xCT based on the HMMTOP algorithm (23). Residues 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  $\mu$ 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.

Asn<sup>72</sup> (EL1-2), Leu<sup>163</sup> (already shown in Fig. 3A), Gln<sup>219</sup> (EL5-6), Ala<sup>294</sup> (EL7-8), Ser<sup>387</sup> (EL9-10), and Ser<sup>445</sup> (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 Ser<sup>11</sup> (N terminus), Thr<sup>102</sup> (IL2-3), Ser<sup>181</sup> and Phe<sup>193</sup> (IL4-5), Glu<sup>260</sup> (IL6-7; also shown in Fig. 3A), Glu<sup>353</sup> and His<sup>363</sup> (IL8-9), His<sup>418</sup> (IL10-11), and Asp<sup>499</sup> (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 Ser<sup>181</sup> and Phe<sup>193</sup>, other residues within this loop (Ile<sup>182</sup>, Ser<sup>185</sup>, Ser<sup>187</sup> (Fig. 3A), Ala<sup>188</sup>, Ile<sup>190</sup>, and Ile<sup>192</sup>) 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  $\mu$ M L-[<sup>35</sup>S]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 (Lys<sup>166</sup> in transmembrane domain 4, Cys<sup>197</sup> in transmembrane domains 5, and Cys<sup>327</sup> and Ala<sup>337</sup> 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.

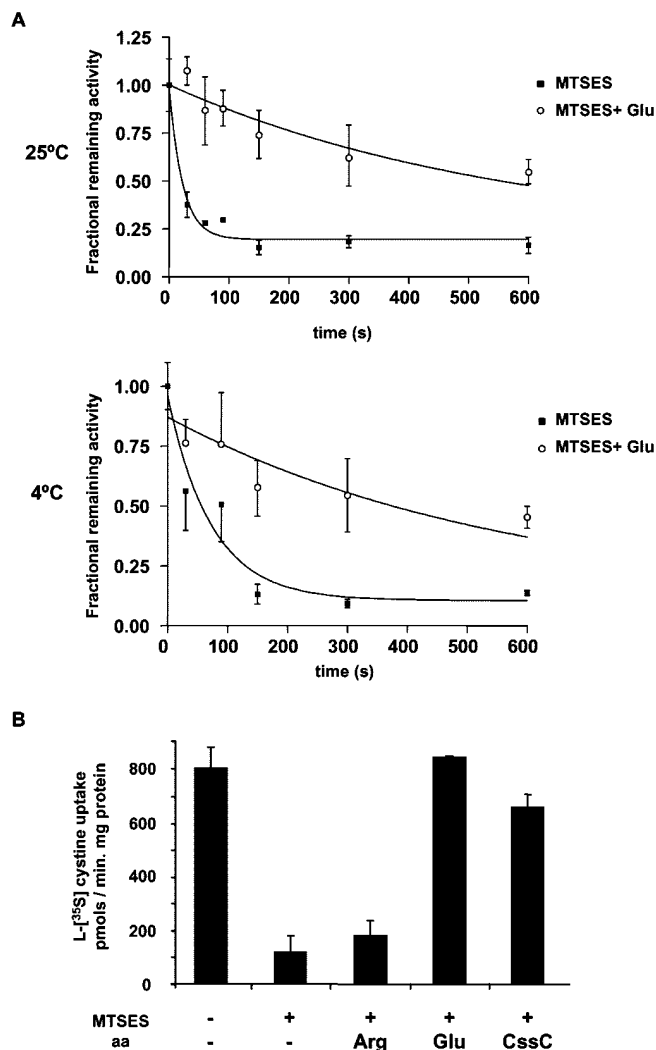
**Biotinylation of Single Cysteine Residues within IL2-3**—Mutant H110C showed biotinylation from the external medium (biotinylation is blocked by the membrane impermeable MTSES; Fig. 5), whereas the neighboring residue Thr<sup>102</sup> (mutant T102C) showed biotinylation from inside (Fig. 4C). This fostered more extensive screening of the intracellular loop 2-3 (Fig. 4C). Residues Thr<sup>102</sup> and Glu<sup>116</sup>, flanking position His<sup>110</sup> at 6 or 8 residues, showed biotinylation from inside. This suggests a re-entrant loop-like structure within IL2-3. One of the closest His<sup>110</sup>-flanking positions, G109C showed biotinylation only after permeabilization with SLO (Fig. 4C). The other closest flanking position, Tyr<sup>111</sup>, 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 Lys<sup>105</sup>, Thr<sup>112</sup>, Phe<sup>118</sup>, Leu<sup>121</sup>, and Pro<sup>122</sup> (data not shown) when mutated to cysteine showed no biotinylation even after permeabilization (Fig. 4C). Positions Ala<sup>123</sup>, Phe<sup>124</sup>, Arg<sup>126</sup>, and Glu<sup>130</sup> 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 His<sup>110</sup> and suggests that negatively charged reagents may have greater accessibility to this residue from outside than positively charged reagents. System x<sub>c</sub><sup>-</sup> 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<sub>c</sub><sup>-</sup> with a  $K_i$  in the low  $\mu$ 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  $\mu$ 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 His<sup>110</sup> 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 His<sup>110</sup>. 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  $\mu$ M (17.4  $\pm$  2.9%;  $n = 8$ ) and 350  $\mu$ M (16.7  $\pm$  5.8%;  $n = 3$ ) L-[<sup>35</sup>S]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 Thr<sup>112</sup> 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-

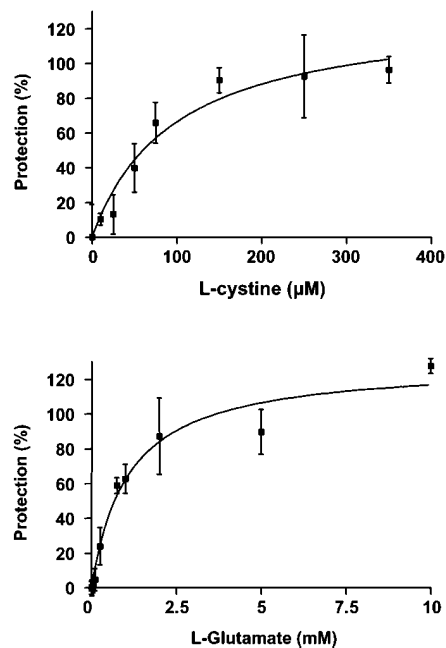




**FIG. 7. Substrate protection from H110C-dependent MTSES-mediated transport inactivation.** HeLa cells expressing H110C in a cysteineless background (His-H110C-Cys-less) were pretreated with 10 mM MTSES and then assayed for 25  $\mu$ M L-[<sup>35</sup>S]cysteine transport. *A*, time-dependent inactivation 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  $\mu$ M L-cysteine (*CssC*). Transport is expressed in pmol/min-mg protein (means  $\pm$  S.E. from a representative experiment).

tions His<sup>110</sup> and Thr<sup>112</sup> 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 experiments 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

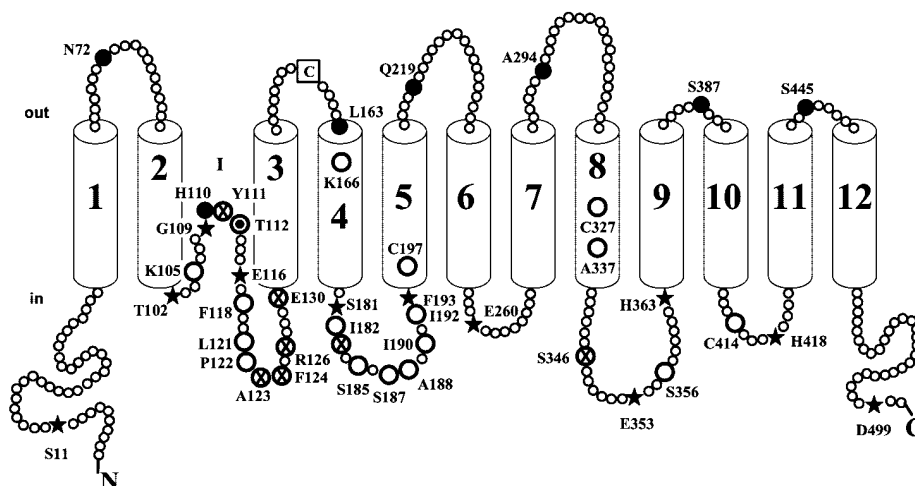


**FIG. 8. Concentration dependence of the substrate protection from H110C-dependent MTSES-mediated transport inactivation.** HeLa cells transfected with H110C in a cysteineless background were treated or not with 1 mM MTSES for 10 min at 25 °C, alone or in combination with different concentrations of L-cysteine (10, 25, 50, 75, 150, 250, and 350  $\mu$ M) (*upper graph*) or L-glutamate (50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 250  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 750  $\mu$ M, 1 mM, 2 mM, 5 mM, and 10 mM) (*lower graph*). Then transport of 25  $\mu$ M L-[<sup>35</sup>S]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  $\mu$ M (in two independent experiments) and 97  $\pm$  30  $\mu$ M (representative experiment), respectively. This suggests that substrate protection of the Cys<sup>110</sup> 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 Cys<sup>110</sup>. 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 Cys<sup>110</sup> 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 (Thr<sup>112</sup>) indicates the accessibility from the outside to MTSES and MTSET but not to BM. Cys<sup>158</sup> 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 concatenamers Nterm-b<sup>0,+</sup>T-rBAT-Cterm (29) and Nterm-xCT-4F2hc-Cterm.<sup>3</sup> The N terminus of 4F2hc is located intracellularly (10), and therefore these concatenamers would only be functional with light subunits with an intracellular C terminus. Similarly, the extracellular location of residue Leu<sup>163</sup> (extracellular loop EL3–4) (Figs. 3A and 4B) is in agreement with the participation of the conserved neighbor residue Cys<sup>158</sup> 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<sup>0,+</sup>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 Ile<sup>182</sup>, Ser<sup>185</sup>, Ser<sup>187</sup>, Ala<sup>188</sup>, Ile<sup>190</sup>, and Ile<sup>192</sup> showed no biotinylation after SLO permeabilization (Fig. 9). Similarly, no topology information is available on the C-terminal half of the IL2–3. Residues Phe<sup>118</sup>, Leu<sup>121</sup> (Fig. 4C), and Pro<sup>122</sup> (data not shown) showed neither biotinylation nor inactivation with MTS reagents, and residues Ala<sup>123</sup>, Phe<sup>124</sup>, Arg<sup>126</sup>, and Glu<sup>130</sup> 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 Thr<sup>102</sup>, Gly<sup>109</sup>, and Glu<sup>116</sup> are biotinylated from inside, whereas residue His<sup>110</sup> 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 (His<sup>110</sup> and Thr<sup>112</sup>) with accessibility from outside flanked by residues with accessibility from inside (Thr<sup>102</sup>, Gly<sup>109</sup>, and Glu<sup>116</sup>) 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<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> 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 His<sup>110</sup> and Thr<sup>112</sup>. Topology of Tyr<sup>111</sup> could not be determined with the methodology available because of a plasma membrane trafficking defect of His-Y111C-Cys-less (Supplemental Fig. B). His<sup>110</sup> 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 His<sup>110</sup> 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) His<sup>110</sup>-dependent transport inactivation by MTSES is protected by xCT substrates with an IC<sub>50</sub> similar to the K<sub>m</sub> (Fig. 8). This protection is temperature-independent (Fig. 7), suggesting that no large conformational changes are involved. 3) Replacement of His<sup>110</sup> by cysteine (His-H110C) or aspartate (His-H110D) (mimicking LSHATs

<sup>3</sup> C. del Rio, N. Reig, and M. Palacin, 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 His<sup>110</sup> 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 His<sup>110</sup>, 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 His<sup>110</sup> may produce steric hindrance for substrate occupancy of the binding site or permeation through the transporter. Alternatively His<sup>110</sup> 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: Cys<sup>327</sup> (16) and His<sup>110</sup> (present study). Both residues show external accessibility, and inactivation by their modification is protected by xCT substrates with an  $IC_{50}$  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) His<sup>110</sup> is located in the external apex of re-entrant loop I, whereas Cys<sup>327</sup> is most probably located within transmembrane domain 8 (Fig. 9). 3) These residues present striking differences in their reactivity to thiol reagents. Cys<sup>327</sup> 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 Arg<sup>420</sup> 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 His<sup>110</sup> and Cys<sup>327</sup> in xCT. A preliminary model of the amino acid-binding site has recently been proposed for the LSHATs LAT1 and  $\gamma^+$ LAT1 (40, 41). The authors suggest three recognition subsites: one for the  $\alpha$ -carboxyl group, one for the  $\alpha$ -amino group, and one for the side chains. The first two may be similar or conserved among all LSHATs, and Cys<sup>327</sup> might be part of these subsites. In contrast, His<sup>110</sup> 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 His<sup>110</sup>, 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., Bartoccioni, 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., 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) *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, H. (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



**Artículo 3:**

**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**

*Journal of Biological Chemistry* 279 (12) 11214-11221 (2004)

Maite Jiménez-Vidal, Emma Gasol, Antonio Zorzano, Virginia Nunes,  
Manuel Palacín\* and Josep Chillarón\*.

(\* , los autores comparten la dirección del trabajo)

La doctoranda ha contribuido con la construcción de los mutantes individuales de cisteína y la versión completa sin cisteínas de xCT (cysless) y en el análisis funcional de los mismos en oocitos de *X. laevis*.



## 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<sup>‡§¶</sup>, Emma Gasol<sup>‡¶</sup>, Antonio Zorzano<sup>‡</sup>, Virginia Nunes<sup>§</sup>, Manuel Palacín<sup>‡\*\*\*‡‡</sup>, and Josep Chillarón<sup>‡\*\*\*§§</sup>

From the <sup>‡</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, and the Barcelona Science Park, University of Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain and the <sup>§</sup>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. Cys<sup>327</sup>, 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 IC<sub>50</sub> similar to the K<sub>m</sub>. Protection was not temperature-dependent, suggesting that it did not depend on large substrate-induced conformational changes. Mutation of Cys<sup>327</sup> to Ala and Ser slightly modified the K<sub>m</sub> and a C327L mutant abolished transport function without compromising transporter expression at the plasma membrane. The results indicate that Cys<sup>327</sup> 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)<sup>1</sup> are composed of a heavy subunit and a light subunit (LSHAT) linked by a

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<sub>c</sub><sup>-</sup>) (5, 6). xCT is expressed in most cell lines, in activated macrophages, and in the brain (5, 7). System x<sub>c</sub><sup>-</sup> 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<sub>c</sub><sup>-</sup> 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<sup>0,+</sup>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<sub>m</sub>. Finally, the y<sup>+</sup>LAT1 L334R mutant found in lysinuric protein-intolerant patients inactivates transport as does the cystinuria mutation, A354T in b<sup>0,+</sup>AT (4, 14).

Here we report that Cys<sup>327</sup> 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-

\* 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.

<sup>1</sup> 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*  $\gamma$ -aminobutyric acid permease.

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-[<sup>3</sup>H]glutamate (American Radiolabeled Chemicals) and L-[<sup>35</sup>S]cystine (Amersham Biosciences) were measured at 1  $\mu$ Ci/ $\mu$ l 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  $\pm$  S.E. for 6–8 individual oocytes. For the determination of the kinetic parameters of the different human xCT Cys<sup>327</sup> mutants, the oocytes were incubated with different concentrations of L-glutamate (5, 10, 25, 50, 100, 250, 500  $\mu$ M, 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-sulfonatoethyl 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-[<sup>3</sup>H]glutamate or L-[<sup>35</sup>S]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  $\mu$ M 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  $\mu$ M or 1 or 2 mM) or L-cystine (6, 15, 30, 60, 90, 150, or 300  $\mu$ M) were included along with 50  $\mu$ M 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  $\beta$ -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 Me<sub>2</sub>SO. 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 Cys<sup>327</sup> mutant cRNA/oocyte, alone or in combination. Oocytes were placed in 500-mm<sup>3</sup> 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  $\mu$ g/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 IC<sub>50</sub> 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). IC<sub>50</sub> 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 IC<sub>50</sub> 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 IC<sub>50</sub> values were  $75.5 \pm 11.2 \mu$ M for pCMB and  $300.4 \pm 89.7 \mu$ M for pCMBS; see also Figs. 3A and 4). The permeable reducing reagent  $\beta$ -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).

**Cys<sup>327</sup> 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 (Cys<sup>109</sup>) 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  $\mu$ M 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



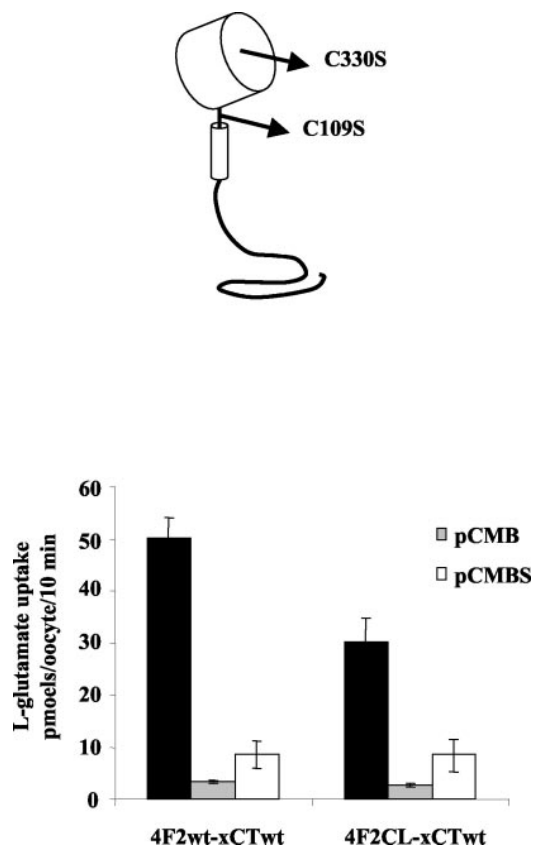


FIG. 1. The xCT light subunit of the 4F2hc-xCT heteromeric transporter confers sensitivity to the mercury compounds pCMB and pCMBS. Oocytes were injected with the xCT cRNA together with the 4F2hc wild type cRNA or Cysless 4F2hc (4F2CL). The top panel depicts the intracellular N terminus, the transmembrane 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 Cys<sup>327</sup> (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 Cys<sup>327</sup> is the main target of pCMB and pCMBS.

Topology predictions for xCT with a variety of different computer algorithms locate Cys<sup>327</sup> 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.<sup>2</sup> Despite transmembrane localization, the sensitivity of Cys<sup>327</sup> to the impermeant reagents pCMBS and cysteine indicate that it is accessible to the extracellular aqueous environment.

**Cys<sup>327</sup> 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

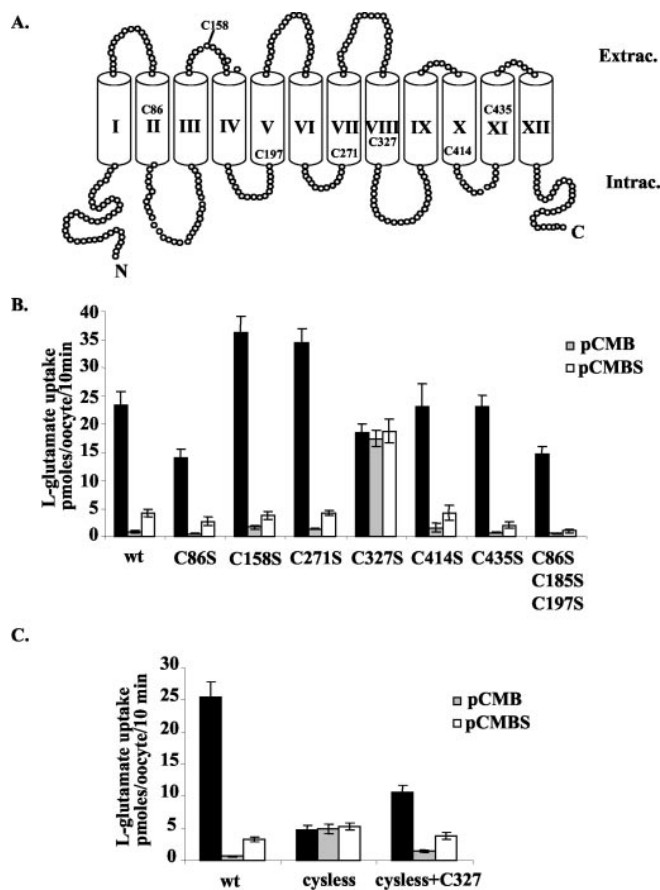


FIG. 2. The xCT residue Cys<sup>327</sup> is the target for transport inactivation by pCMB and pCMBS. A, the predicted topological model for the xCT transporter. The protein has 12 transmembrane domains with intracellular N and C termini. Location of the seven endogenous cysteines is shown. B, different 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 Cys<sup>327</sup> 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 Cys<sup>327</sup> (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 Cys<sup>327</sup> via a structurally restricted pathway.

**xCT Substrates Protect from Transport Inactivation**—The above data indicate that Cys<sup>327</sup> 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,  $83.5 \pm 7$  s in the absence of amino acid,  $1475 \pm 690$  s in the

<sup>2</sup> E. Gasol and M. Palacín, manuscript in preparation.

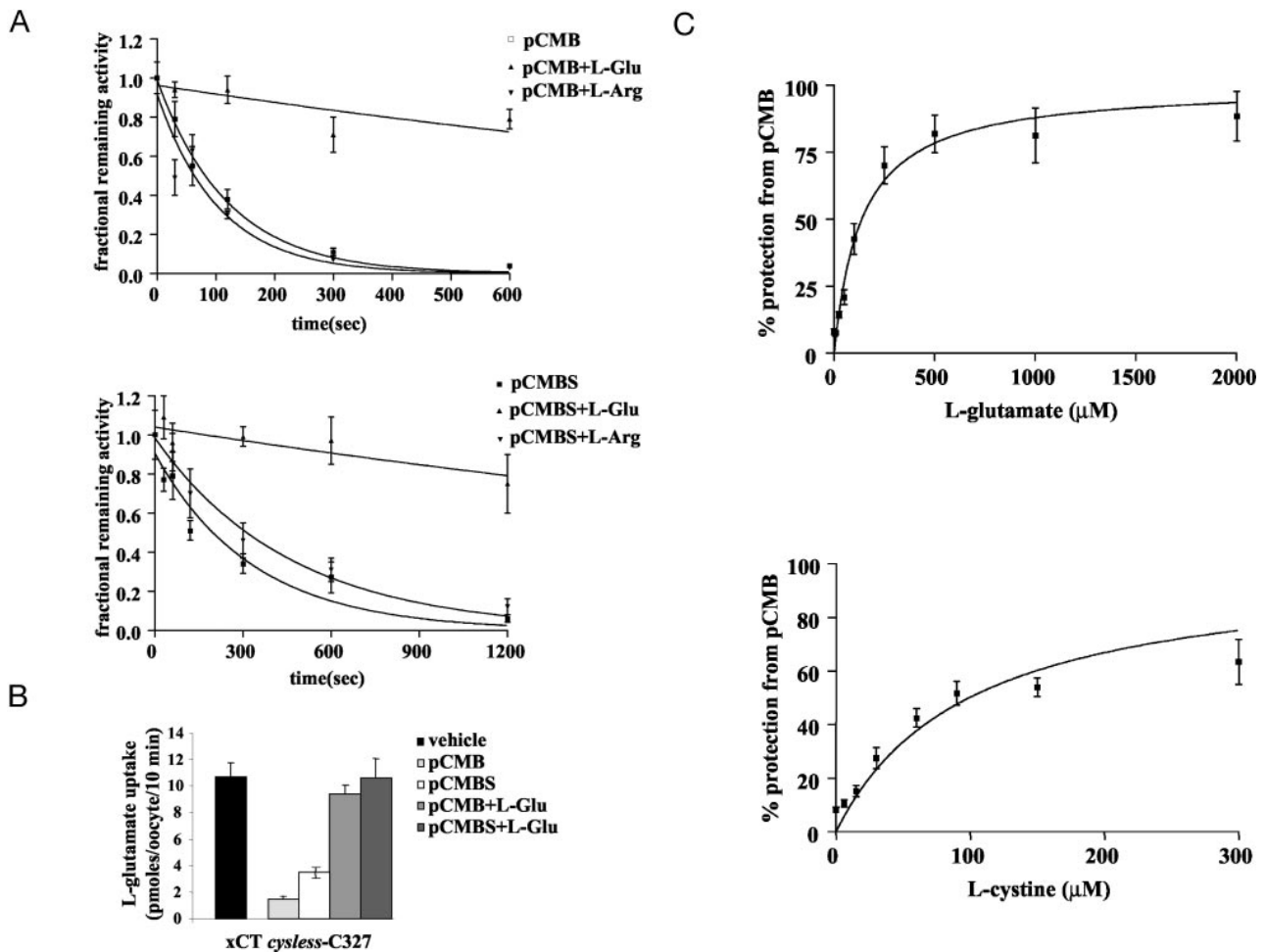


FIG. 3. Substrate protection from pCMB and pCMBS-mediated transport inactivation. **A**, time-dependent inactivation of L-glutamate transport measured in oocytes injected with 4F2hc and xCT cRNAs after the preincubation with either pCMB (*top*) or pCMBS (*bottom*) alone or in combination with L-glutamate 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  $72.5 \pm 21.7$  s in the presence of L-arginine; and for pCMBS,  $230.7 \pm 51.4$  s in the absence of amino acid,  $3081 \pm 959$  s in the presence of L-glutamate, and  $319.4 \pm 39$  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. 3B). Moreover, half-maximal protection (Fig. 3C) occurred at substrate concentrations similar to the  $K_m$  measured in *Xenopus* oocytes (in the presence of pCMB,  $IC_{50}$  was  $138 \pm 16.3$   $\mu M$  for L-glutamate and  $99.2 \pm 9.2$   $\mu M$  for L-cystine) (see Refs. 5 and 6 and Table I), suggesting that substrate protection of the Cys<sup>327</sup> 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 Cys<sup>327</sup>. 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  $\mu M$ ) 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  $436 \pm 110$  s at 4 °C). Glutamate equally protected from the inhibition both at 25 and 4 °C ( $t_{1/2} = 1272 \pm 455$  s<sup>-1</sup> at 25 °C and  $6932 \pm 4852$  s at 4 °C). Thus, glutamate protects the Cys<sup>327</sup> residue at a step in the transport cycle, most likely prior to temperature-sensitive substrate-induced conformational changes.

TABLE I  
Kinetic parameters of Cys<sup>327</sup> mutants

Oocytes were injected with 4F2hc cRNA together with cRNA from the wild type xCT or Cys<sup>327</sup> mutations to serine, alanine, leucine, or threonine. After 3 days, transport of 5 - 2000  $\mu M$  L-[<sup>3</sup>H]glutamate was measured and kinetic parameters determined. Values represent the means  $\pm$  S.E. of  $n = 2-4$  determinations. ND, not determined.

	$K_m$	$V_{max}$
	$\mu M$	pmol/oocyte/10 min
Wt	$173.7 \pm 15.3$	$131.4 \pm 9$
C327S	$359.8 \pm 62^a$	$125.6 \pm 7.2$
C327A	$267.6 \pm 19.9^a$	$112.8 \pm 2.6$
C327L	ND	ND
C327T	$186.3 \pm 31.2$	$71.3 \pm 3.4$

<sup>a</sup> Statistically significant (*F* test,  $p < 0.005$ ) compared with the wild type.

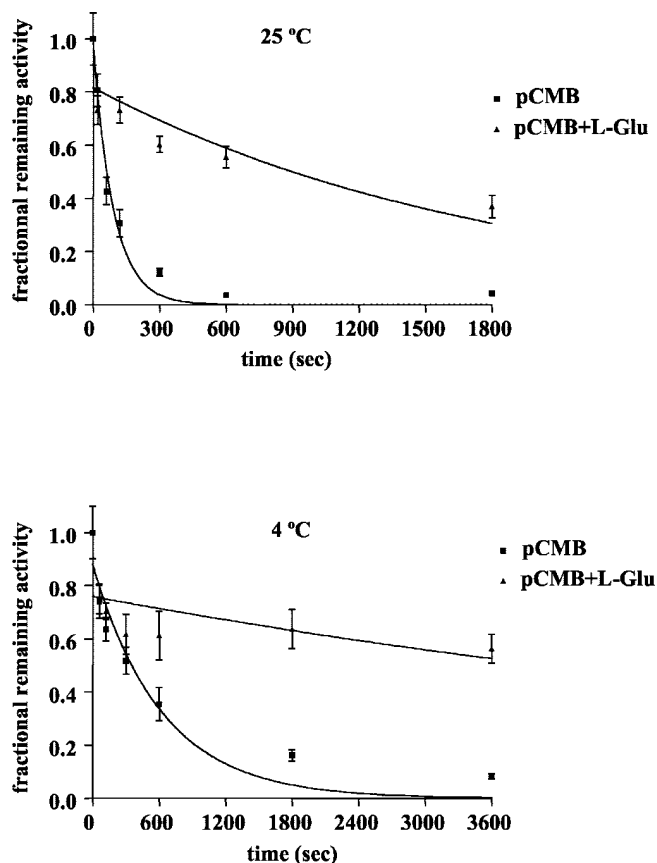


FIG. 4. Temperature dependence of substrate protection. The experiment described in Fig. 3A legend was repeated at 25 °C (top) and 4 °C (bottom). In the latter case, preincubations were made at 4 °C, and subsequent washes and transport assay were done at 25 °C. Note the different time scales in both 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 Cys<sup>327</sup> Mutants**—Cys<sup>327</sup> 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 Cys<sup>327</sup> 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  $\mu$ 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 Cys<sup>327</sup> 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 Cys<sup>327</sup> 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 Cys<sup>327</sup> was re-introduced in the Cysless background ( $K_{0.5}$  values were  $7 \pm 0.20$  and  $6.7 \pm 0.25$  for Cysless xCT and xCT Cysless-C327, respectively). On

A.

	TM VIII
b <sup>0</sup> -AT	VLYP <u>PASWIVPLFVAFSTIGA</u> NGTCFTAG
$\gamma$ +LAT1	IFGI <u>FNWIIPLSV</u> ALSCFGGLNASIVAAS
$\gamma$ +LAT2	TFGM <u>FSWTIPIA</u> VALSCFGGLNASIFASS
LAT1	HLG <u>VMSWIIPVF</u> VGLSCFGSVNGSLFTSS
LAT2	LLG <u>VMAWIMPI</u> SVALSTFGGVNGSLFTSS
xCT	LLGN <u>FLAVPIF</u> VALS <u>CFGSM</u> NGGVAFAVS
asc1	LLGY <u>FSWVMPV</u> SVALSTFGG <u>INGYL</u> FTYS

B.

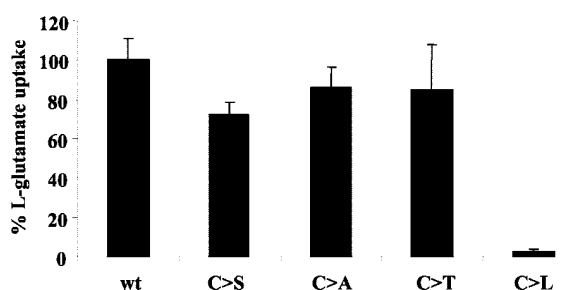


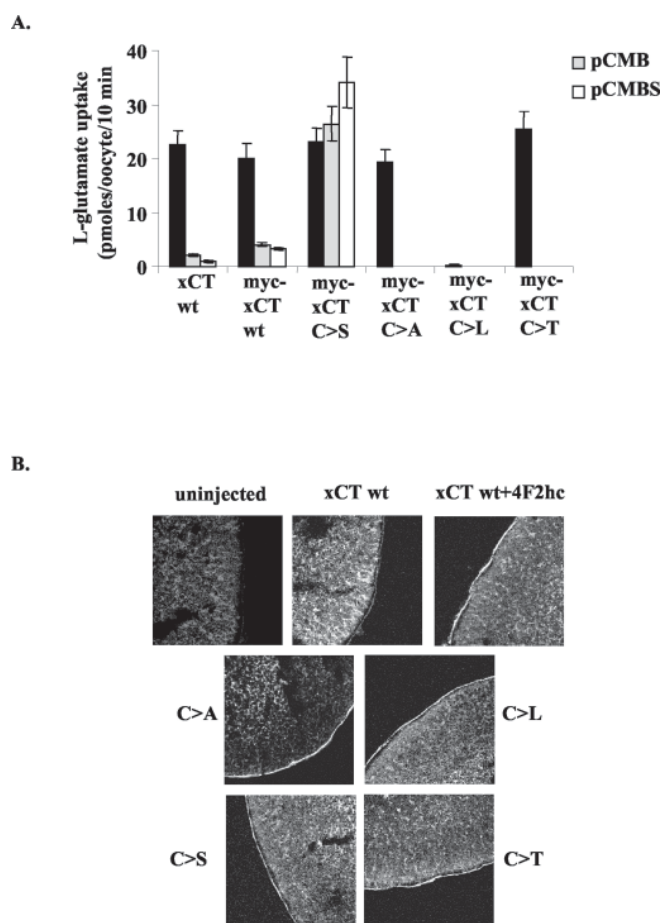
FIG. 5. Transport activity of Cys<sup>327</sup> mutants. A, LSHAT alignment of the transmembrane (TM) domain VIII (underlined) (only the human proteins are shown). The residue corresponding to xCT Cys<sup>327</sup> is **bolded**. ClustalW software was used for the alignment, and the HMMTOP algorithm was used for transmembrane domain assignment. Although the limits of the transmembrane domains slightly vary between different algorithms, Cys<sup>327</sup> 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 Cys<sup>327</sup> mutant cRNAs. After 3 days 100  $\mu$ 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  $6.3 \pm 0.25$ ), suggesting that other cysteines (but not Cys<sup>327</sup>) 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 Cys<sup>327</sup> 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 Cys<sup>327</sup> close to the substrate binding site.

## DISCUSSION

Here we provide evidence suggesting that Cys<sup>327</sup> 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). Cys<sup>327</sup> 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 Cys<sup>327</sup> mutants.** A, oocytes were injected with 4F2hc cRNA and the indicated xCT cRNAs. After 3 days, L-glutamate uptake (100  $\mu$ 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 Cys<sup>327</sup> 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<sup>+</sup>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 Cys<sup>327</sup> 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; Cys<sup>144</sup> 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) Cys<sup>148</sup> 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 Cys<sup>327</sup> 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<sup>+</sup>LAT1 abolishes transport (data not shown). Therefore, we favor a scenario in which Cys<sup>327</sup> 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 Cys<sup>148</sup> mutants (see above) are explained by steric hindrance of the substrate binding site.

Independent support for a link of the Cys<sup>327</sup> residue to the permeation pathway comes from our studies with pCMB and pCMBS. First, Cys<sup>327</sup>-dependent transport inactivation by pCMB and pCMBS is protected by substrates with an IC<sub>50</sub> 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, Cys<sup>327</sup> is targeted by the impermeant reagents pCMBS and cysteine, indicating that it is accessible to the aqueous environment (Fig. 2). Cys<sup>327</sup> 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 Cys<sup>327</sup>.

A striking feature of Cys<sup>327</sup> 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 Cys<sup>300</sup> in GABP (*Escherichia coli*  $\gamma$ -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 (Phe<sup>315</sup>, Phe<sup>322</sup>, and Phe<sup>328</sup>; see Figs. 5A and 7).

Amino acid residues surrounding Cys<sup>327</sup> 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<sup>+</sup>LAT1 (11, 12). The authors suggest three recognition subsites: one for the  $\alpha$ -carboxyl group, one for the  $\alpha$ -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. Cys<sup>327</sup> might be part of these subsites.

To gain more insight into the functional role of Cys<sup>327</sup>, we closely inspected the region including transmembrane domain

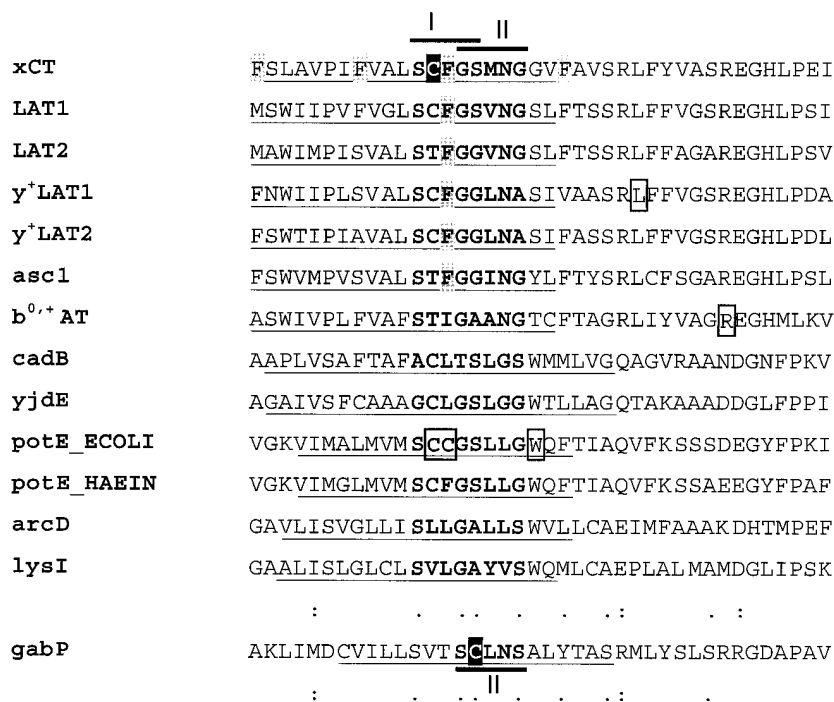


FIG. 7. Transmembrane domain 8 region in three different APC subfamilies. A ClustalW alignment was performed with the LSHAT mammalian proteins (only the human orthologues are shown) (subfamily 2.A.3.8), the APA proteins (subfamily 2.A.3.2), and gabP from *E. coli*, a member of the 2.A.3.1 subfamily. 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<sup>0,+</sup>AT). See "Discussion" for details. GenBank<sup>TM</sup> accession numbers for human LSHATs are: xCT, AB026891; LAT1, AF077866; LAT2, AF171669; y<sup>+</sup>LAT1, AF092032; y<sup>+</sup>LAT2, D87432; asc1, NM\_019849; b<sup>0,+</sup>AT, AF141289. GenBank<sup>TM</sup> 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)X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>(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 X<sub>1</sub> 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, Cys<sup>300</sup> in the GABP protein (see above) is also located in transmembrane domain 8, and is the X<sub>1</sub> of a (G/S/A)X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>(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). Cys<sup>300</sup> in GABP is targeted by sulfhydryl reagents in a manner similar to xCT Cys<sup>327</sup> (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 Cys<sup>300</sup> seems to initiate a 20-amino acid residue amphipathic  $\alpha$ -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<sup>0,+</sup>AT and human y<sup>+</sup>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 Cys<sup>327</sup> of xCT as the target of inactivation by mercurial reagents. Substrate protection experiments and analysis of Cys<sup>327</sup> 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 Cys<sup>327</sup> 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 Gelpi 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., Bartoccioni, 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., Shirahata, 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

## **Discusión**





## 1. Identificación de nuevos miembros de la familia LSHAT

Como se ha presentado en la Introducción de esta memoria, existen 9 miembros publicados de la familia de subunidades ligeras de transportadores de aminoácidos heteroméricos (LSHATs) (revisado en Verrey et al., 2004). Seis de estos miembros son subunidades de 4F2hc:  $y^+$ LAT-1 y  $y^+$ LAT-2, que inducen la actividad de transporte de sistema  $y^+$ L; LAT-1 y LAT-2, que inducen la actividad de tipo L; asc-1, que induce el sistema asc; y xCT, que induce la actividad correspondiente al sistema  $x^-$ . Uno de estos miembros, la subunidad  $b^{0,+}$ AT, se asocia con rBAT para inducir el sistema  $b^{0,+}$ . Y paralelamente, los miembros asc-2 y AGT-1 son subunidades de una cadena pesada desconocida hasta el momento e inducen, respectivamente, el sistema asc y un sistema no descrito previamente de transporte de aminoácidos aniónicos. Existe una décima subunidad ligera llamada apAT (*aromatic-prefering Amino acid Transporter*) pendiente de publicación (E. Fernández, J. Chillarón y M. Palacín, manuscrito en preparación).

En la presente tesis se ha descrito la clonación y caracterización funcional de la isoforma humana de xCT, así como la identificación e intento de caracterización de los dos miembros “huérfanos”, PK y PW, que posteriormente se conocerían como asc-2 y AGT-1, respectivamente.

### 1.1. Identificación y caracterización de xCT humano

La búsqueda por homología de secuencia en las bases de datos permitió aislar un nuevo cDNA humano cuyo producto proteico presentaba una elevada identidad de secuencia con una proteína de ratón recientemente identificada y llamada xCT.

La secuencia de aminoácidos, la actividad de transporte inducida y la distribución tisular que presentaba la nueva proteína demostraron que se trata del ortólogo humano de xCT de ratón (Sato et al., 1999).

Así, la co-expresión de 4F2hc y xCT humanos en oocitos de *X. laevis* resultó en la inducción de una actividad de transporte con las características del sistema  $x^-$  (Sato et al., 1999; Bannai, 1986; Bannai and Kitamura, 1981a; Bannai and Kitamura, 1980): intercambio equimolar 1:1 de cistina y glutamato de forma sodio-independiente (Artículo 1). xCT comparte una significativa similitud de secuencia con el resto de miembros de la familia LSHAT pertenecientes a los diferentes sistemas de transporte, como L,  $y^+$ L, asc y  $b^{0,+}$ AT, e incluso de distintas especies. Esta homología de secuencia, junto con la conservación del residuo de cisteína localizado en el *loop* entre el tercer y cuarto dominio transmembrana, implicado en la formación del puente disulfuro con la subunidad pesada, evidencia que la nueva proteína es un miembro adicional de la familia LSHAT. De hecho, constituía el séptimo miembro humano identificado hasta ese momento, después de LAT-1, LAT-2, asc-1,  $y^+$ LAT-1,  $y^+$ LAT-2 y  $b^{0,+}$ AT.

Por el análisis de la *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) parece improbable que el gen *SLC7A11*, mapado en el intervalo cromosómico 4q28-q32, esté implicado en la patogénesis de alguna de las enfermedades genéticas descritas. En este locus se localiza el gen de la glycophorin A (Sato et al., 2002), que anteriormente se había relacionado con la enfermedad de Alzheimer (Race, 1959). Análisis más estrechos de ligamiento, sin embargo, excluyeron esta asociación (Spence et al., 1986).

La inducción de la función de transporte de aminoácidos asociada a las LSHAT requiere la expresión de su correspondiente subunidad pesada (rBAT y 4F2hc, hasta el momento) (revisado en Palacín and Kanai, 2004; Chillarón et al., 2001).

Dentro de las familias de transportadores de aminoácidos eucariotas superiores, la familia HAT es la única que presenta una estructura heteromérica. El papel de la subunidad pesada está principalmente relacionado con el tráfico del holotransportador a la membrana plasmática (Introducción de esta memoria). La expresión de 4F2hc o rBAT determina la localización de los heterodímeros correspondientes en la membrana basolateral o apical de los epitelios, respectivamente (Bauch et al., 2003; Bauch and Verrey, 2002). La subunidad ligera, en cambio, parece determinar el tipo de transporte y la especificidad de sustrato (Introducción de esta memoria). Se ha demostrado que la subunidad ligera  $b^{0,+}AT$  es funcional en ausencia de rBAT en un sistema reconstituido, evidenciando su papel como subunidad catalítica del transportador  $b^{0,+}AT/rBAT$  (Reig et al., 2002).

Existen otros ejemplos de complejos de proteínas de membrana heterodiméricas en los que cada proteína posee un papel distinto en el complejo. 4F2hc y rBAT tienen una estructura de glicoproteína de membrana de tipo II muy similar a la subunidad  $\beta$  de la Na,K-ATPasa. Este enzima de membrana plasmática tiene una unidad funcional compuesta por un heterodímero de subunidades  $\alpha$ - $\beta$  no unidas covalentemente. En este caso, la subunidad  $\beta$ , además de ser necesaria para el transporte de la subunidad catalítica  $\alpha$  desde el retículo endoplasmático a la membrana, también es necesaria para su estabilidad y maduración funcional (Geering et al., 1989).

En la presente tesis se demuestra que xCT necesita a 4F2hc para su expresión en la membrana plasmática y para la inducción de la actividad de transporte de sistema  $\chi^-$ , tanto en oocitos de *X. laevis* como en células HeLa. Serían necesarios estudios de co-inmunoprecipitación para demostrar la heterodimerización de 4F2hc/xCT en tejidos nativos. De hecho, la heterodimerización en tejidos en la familia de los HATs sólo ha sido demostrada para 4F2hc/LAT-1 (Mannion et al., 1998), 4F2hc/LAT-2 (Merlin et al., 2001) y rBAT/ $b^{0,+}AT$  (Fernández et al., 2002). En cualquier caso, por estudios de hibridación *in situ* en cerebro de ratón se ha detectado presencia de

RNA<sub>m</sub> de 4F2hc en todas las regiones del cerebro donde se expresa RNA<sub>m</sub> de xCT (Sato et al., 2002).

Aparte de estos heterodímeros naturales, se han descrito interacciones promiscuas entre diferentes LSHAT y la no correspondiente subunidad pesada en sistemas de expresión heterólogos: formación de heterodímeros entre LAT-2 y rBAT (Rossier et al., 1999); tráfico a la membrana plasmática e inducción de transporte de aminoácidos con rBAT y  $y^+LAT-1$ , LAT-1 y LAT-2 (R. Estévez y M. Pineda, resultados sin publicar); y co-expresión de actividad de transporte en células HRPE de 4F2hc/ $b^{0,+}AT$  (Rajan et al., 2000a; Rajan et al., 1999). En la presente tesis, sin embargo, se muestra que rBAT humano no es capaz de llevar xCT humano a la membrana plasmática del oocito (Figura 6, Artículo 1) y, por tanto, expresar ninguna actividad de transporte (Figura 3, Artículo 1).

Hasta recientemente, esta falta de interacción promiscua de las LSHAT estaba restringida a xCT (para asc-1 no se ha publicado este estudio). El año pasado, el grupo de Bannai publicó un trabajo en el que mostraba que xCT de ratón puede asociarse con rBAT de ratón en oocitos de *X. laevis* y en células NIH3T3 para inducir la actividad de transporte de sistema  $\chi^-$  (Wang et al., 2003). Según ellos, la razón de esta discrepancia de resultados entre las dos isoformas de xCT podría deberse a una diferencia en la habilidad de rBAT de ratón y humano para interactuar con la subunidad  $b^{0,+}AT-like$  endógena presente en oocitos de *X. laevis*: si la afinidad de rBAT humano por  $b^{0,+}AT-like$  fuera significativamente más alta que la de rBAT de ratón, la posible expresión de la actividad del sistema  $\chi^-$  por xCT humano y rBAT humano quedaría enmascarada (Wang et al., 2003). Podría comprobarse si realmente existe interacción entre rBAT y xCT humanos en un sistema celular sin  $b^{0,+}AT$  o 4F2hc endógenos o mediante una estrategia similar a la usada para las células NIH3T3, en la que silenciaban la expresión endógena de 4F2hc.

La expresión de xCT humano se detectó por Northern blot en cerebro (Figura 7, Artículo 1), de acuerdo con los resultados publicados para la

isoforma de ratón (Sato et al., 1999). En concreto, todas las regiones del cerebro testadas (cerebelo, córtex, medula, putamen y cordón espinal) resultaron positivas para xCT humano, en concordancia con los trabajos que describen actividad del sistema  $x_c^-$  en las células de la glia junto con transporte sodio-independiente de alta afinidad asociado al sistema  $X_{AG}^-$  (Sagara et al., 1996; Sagara et al., 1993a; Sagara et al., 1993b). Estudios posteriores de la distribución de xCT en cerebro de ratón por hibridación *in situ* muestran expresión del RNAm en el área postrema, órgano subfornical, núcleo habenuar, área hipotalámica, células ependimales de la pared lateral del tercer ventrículo y meninges (Sato et al., 2002).

Aunque la baja expresión del gen *SLC7A11* permitiera detectar señal únicamente en cerebro, experimentos de RT-PCR demostraron que el RNAm de xCT humano se expresa también en células del epitelio intestinal e islotes pancreáticos, mientras que no lo hace en riñón o hígado (Figura 8, Artículo 1). Paralelamente, encontramos expresión de xCT de ratón en tejidos que aún no habían sido testados o que habían resultado negativos para Northern blot: intestino, ovario, bazo y riñón (Figura 8, Artículo 1). Consistente con estas observaciones, se ha descrito actividad del sistema  $x_c^-$  en páncreas humano (Sweiry et al., 1995) y de rata (Sato et al., 1998) y en células crípticas intestinales de rata (Mordrelle et al., 1997).

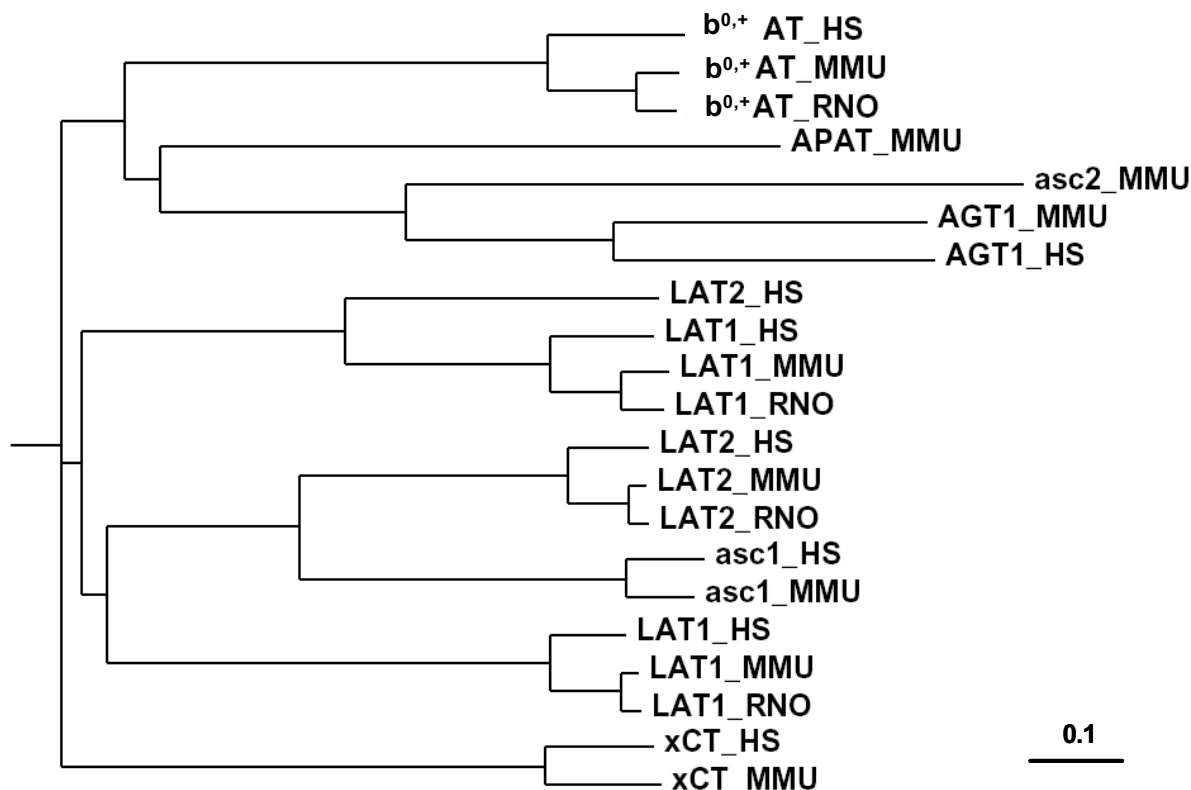
También se ha observado actividad del sistema  $x_c^-$  en numerosas líneas celulares tumorales: gliomas (Ye et al., 1999), linfomas de ratón (Hishinuma et al., 1986), hepatomas humanos y de ratón (Bannai, 1984b; Makowske and Christensen, 1982a) y en líneas de cáncer ovárico humano (Okuno et al., 2003). En esta tesis se muestra expresión del RNAm de *SLC7A11* humano en la línea celular tumoral de colon CaCo2 y en la línea tumoral hepática HepG2.

El papel fisiológico que puede desempeñar xCT se presenta en el apartado 2 de esta Discusión.

## 1.2. Identificación de dos subunidades ligeras “huérfanas”

La búsqueda en las bases de datos permitió identificar dos nuevos cDNAs (slc7aK y slc7aW) que, aunque presentaban homologías de secuencia inferiores a las establecidas entre los diferentes miembros de las LSHAT (~28%), mostraban características propias de sus integrantes que hacía incluirlas dentro de la familia: la secuencia proteica de PK y PW podía alinearse con el resto de subunidades ligeras de la familia HAT, presentaban la estructura de 12 putativos segmentos transmembrana y ambas conservaban la cisteína responsable de la formación del puente disulfuro con la subunidad pesada (Figura 11, Resultados). En el árbol filogenético de la Figura 34 se pueden apreciar las distancias genéticas entre las distintas LSHATs y la posición relativa de PK (asc-2) y PW (AGT-1).

Los patrones de expresión para PK y PW, ambas con una fuerte señal en riñón, las hacían candidatas, en un primer momento, a ser otra posible subunidad de rBAT. Por trabajos realizados en nuestro grupo se sabía que el 70% de rBAT que se expresa en las membranas *brush border* del túbulo proximal de ratón forma parte de un complejo con otra proteína (rBAT/X) unido por un puente disulfuro (Fernández et al., 2002). Pero los experimentos de co-expresión de estas dos nuevas proteínas con las subunidades pesadas 4F2hc y rBAT no indujeron ninguna actividad de transporte de los sustratos testados (Figuras 13 y 16, Resultados). De hecho, PK y PW ni siquiera conseguían llegar a la membrana plasmática de los oocitos de *X. laevis* ni de las células HeLa (Figura 18, Resultados). PK presentaba problemas de expresión, quizás por degradación celular al faltarle la subunidad pesada adecuada y, en el caso de PW, aunque existía algún tipo de interacción con rBAT (Figura 17, Resultados), ésta era de carácter inespecífico (seguramente a nivel de RE) ya que no llevaba a PW hasta la membrana celular. Estas fueron las primeras evidencias de la existencia de otra/s posibles subunidades pesadas aparte de 4F2hc y rBAT.



**Figura 34. Árbol filogenético de la familia LSHAT.** El árbol muestra los miembros mamíferos de la familia de subunidades ligeras, incluyendo la proteína APAT (E. Fernández, J. Chillarón y M. Palacín, manuscrito en preparación). El alineamiento se ha realizado con el programa CLUSTALW y para la representación del árbol se ha utilizado el programa Phylodendron. HS (*Homo sapiens*), MMU (*Mus musculus*), RNO (*Ratus norvegicus*). Para comparaciones con el resto de subfamilias APC ver Figura 5 de la Introducción.

Experimentos de localización en riñón de ratón por análisis inmunocitoquímico realizados por el grupo de Kanai revelaron que asc-2 se encuentra en los túbulos colectores, tanto en el córtex como en la medula (Chairoungdua et al., 2001), y AGT-1 se encuentra en la membrana basolateral de la medula exterior de los túbulos proximales y en el córtex de los túbulos distales contorneados (Matsuo et al., 2001).

Aunque asc-2 y AGT-1 no interaccionen *in vivo* con las subunidades pesadas conocidas hasta el momento, el grupo de Kanai utilizó la habilidad de 4F2hc y rBAT para llevar las subunidades ligeras de la familia HAT a la membrana plasmática para generar proteínas de fusión con asc-2 y AGT-1. De esta manera fue posible expresarlas en superficie y determinar su actividad de transporte (Chairoungdua et al., 2001; Matsuo et al., 2001): asc-2 (*asc type amino acid transporter-2*) expresa el sistema de transporte

sodio-independiente asc con una especificidad de sustratos más restrictiva que asc-1 (Fukasawa et al., 2000) ya que es estereoselectivo y no acepta ni AIB ni  $\beta$ -alanina, coincidiendo con la variante descrita en eritrocitos de trucha (Albi et al., 1994); AGT-1 (*Aspartate/Glutamate transporter-1*) expresa un sistema de transporte sodio-independiente de aminoácidos aniónicos que no había sido descrito anteriormente y que es diferente del sistema  $x^-$  en que no acepta cistina, homocisteato o L-aminoadipato pero presenta elevada afinidad por el aspartato y el glutamato.

Las proteínas de fusión hechas con rBAT y 4F2hc mostraron una especificidad de sustratos idéntica en cada caso, apoyando la hipótesis que la subunidad pesada no está implicada en la función de transporte del holotransportador correspondiente. Búsquedas por homología en las bases de datos de los genomas secuenciados no han resultado en la identificación de nuevos

miembros de la familia SLC3 (Palacín and Kanai, 2004). Será necesario abordar otras estrategias para identificar las subunidades pesadas de asc-2 y AGT-1 y evaluar si son homólogos lejanos de la familia SLC3 o pertenecen a una nueva familia de subunidades pesadas de la familia HAT (revisado en Palacín and Kanai, 2004).

### 1.3. ¿Quedan nuevos miembros LSHAT por identificar?

Como se ha presentado en la Introducción de esta memoria, estudios recientes realizados por los Drs. Josep Chillarón y Esperanza Fernández de nuestro grupo han identificado en el genoma de ratón una nueva subunidad ligera de la familia LSHAT. La han llamado APAT (*Aromatic Preferring Amino acid Transporter*) y 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, manuscrito en preparación). Podría representar una variante del sistema de transporte de aminoácidos T (Figura 3, 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 APAT se expresa sola como con rBAT o 4F2hc en células HeLa. El ortólogo humano de APAT parece estar silenciado en el genoma humano (E. Fernández y J. Chillarón, comunicación personal).

Como se ha comentado anteriormente, rBAT forma complejos en el túbulo proximal de riñón de ratón con otra proteína (rBAT/X), posiblemente de la familia LSHAT (Fernández 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”, *knock out* para  $b^{0,+}$ AT (Feliubadaló et al., 2003): en ratones *knock out* machos rBAT se acompleja con otra proteína pero esto no ocurre en las hembras *knock out* (L. Feliubadaló y M. Palacín, comunicación personal). Esperaríamos que esta nueva LSHAT no transportara cistina, ya que si fuera así cabría esperar que los pacientes cistinúricos de tipo B presentaran una excreción de cistina inferior a los de tipo A y esto no es así (Font et al., 2001; Crawhall and Segal, 1967).

Es atractivo pensar que la proteína APAT pudiera ser la subunidad X de rBAT. Experimentos de Northern blot presentan señal de APAT 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 APAT no se expresa en riñón (E. Fernández y J. Chillarón, comunicación personal). En este caso, cabría descartar la posibilidad de que APAT 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. En vertebrados se han descrito 34 secuencias de LSHATs correspondientes a 10 miembros parálogos. La identidad de secuencia de aminoácidos oscila entre el 21-70% para los diferentes parálogos en mamíferos y del 69-98% para los diferentes ortólogos de vertebrados. También han sido descritas LSHATs en invertebrados: SPRM-1 de *Schistosoma mansoni* (Mastroberardino et al., 1998), la permeasa de metionina MUP-1 y la hipotética MUP-3 de levadura (Isnard et al., 1996) y diversas secuencias de *Caenorhabditis elegans* (Veljkovic et al., 2004) y *Drosophila melanogaster* (Jack et al., 2000).

## 2. Papel fisiológico de xCT

El sistema de transporte  $x_c^-$  es un intercambiador de cistina y glutamato. En condiciones fisiológicas, debido a los elevados niveles intracelulares de glutamato, la direccionalidad de este intercambio consiste en la entrada de cistina a la célula y la salida de glutamato (revisado en Chillarón et al., 2001). La cistina intracelular es rápidamente reducida a cisteína y ésta es utilizada para la síntesis de proteínas y glutatión (GSH). El GSH es un tripéptido sintetizado intracelularmente a partir de glutamato, cisteína y glicina. El glutamato y la glicina son relativamente abundantes, por tanto, la disponibilidad de cisteína intracelular determina la capacidad de síntesis del GSH. La concentración extracelular de cisteína es muy baja porque típicamente se encuentra en forma de cistina, haciendo crucial el transporte de este aminoácido para mantener los niveles necesarios de GSH intracelular (Christensen, 1990; Bannai, 1984b).

Tradicionalmente, por su expresión relativamente ubicua en condiciones normales, aunque a bajos niveles, en diferentes tipos celulares (neuronas, astrocitos, gliomas, células retinales de Muller, fibroblastos, hepatocitos, células alveolares de tipo II, células pancreáticas y del túbulo renal, entre otras) (revisado en Ishii et al., 1992), el sistema de transporte  $x_c^-$  se ha considerado el principal responsable de la captación de cistina al interior celular para la síntesis del glutatión y su mantenimiento (Sagara et al., 1993b; Christensen, 1990; Bannai and Tateishi, 1986). Los niveles de GSH intracelular decrecen rápidamente con la inhibición del transporte de cistina o la depleción de la cistina en el medio extracelular (Cho and Bannai, 1990). El glutatión tiene funciones de defensa celular en contra de especies reactivas de oxígeno y otros electrófilos. En esta dirección, la actividad del sistema  $x_c^-$  es inducida por el oxígeno (Bannai et al., 1989) y por agentes electrofílicos, como el dietilmaleato (DEM) o el  $H_2O_2$  (Sato et al., 1998; Miura et al., 1992; Bannai et al., 1986; Bannai, 1984a). En macrófagos de ratón la actividad del

sistema  $x_c^-$  es activada por lipopolisacáridos (LPS) (Sato et al., 1995a). De esta manera puede compensarse la caída de la concentración de GSH provocada por estos agentes (revisado en Chillarón et al., 2001).

La identificación a nivel molecular de la entidad responsable del sistema  $x_c^-$ , es decir, xCT ((Sato et al., 1999) y presente tesis), ha permitido profundizar en la regulación del sistema  $x_c^-$  y en su papel en la síntesis del glutatión. En este sentido se ha identificado la presencia de elementos EpRE-like (*Electrophile Response Element*) en la región 5' flanqueante del gen de xCT, tanto de ratón (Sasaki et al., 2002) como humano (Sato et al., 2000). Cuando las células son tratadas con agentes electrofílicos, el factor de transcripción Nfr2 transloca al núcleo, se une a los sitios EpRE en presencia de Maf pequeña (otro factor de transcripción), y estimula la transcripción del gen (Itoh et al., 1999). En el trabajo de Sasaki (Sasaki et al., 2002) se identifica la secuencia de EpRE-1 del gen de xCT de ratón como la responsable del efecto provocado por el DEM y se comprueba que la respuesta desaparece en células deficientes en el factor Nfr2.

El RNAm de xCT se expresa fundamentalmente en cerebro ((Sato et al., 1999) y presente tesis). Se ha propuesto que en este tejido las células de la glia tienen la función de mantener los niveles de GSH neuronal aportando cisteína a las neuronas, ya que éstas tienen menos actividad de sistema  $x_c^-$  (Wang and Cynader, 2000; Sagara et al., 1993b). A la vez, los astrocitos pueden liberar parte de la producción de GSH al medio extracelular, en la cercanía de las neuronas (Sagara et al., 1996). En situaciones de estrés oxidativo en el cerebro, es necesaria la entrada de cistina o cisteína desde la sangre al cerebro a través de la barrera hematoencefálica (BBB, *Blood Brain Barrier*) (Meister and Anderson, 1983). La cisteína puede entrar vía sistema L (Boado et al., 1999) pero su concentración en el plasma es 100 veces inferior que la de cistina (Droge et al., 1991). En estos casos la inducción de xCT en la BBB es esencial para garantizar la entrada de cistina y mantener las concentraciones de GSH en el cerebro (Hosoya et al., 2002). La depleción de

glutación en el sistema nervioso central provoca importantes disfunciones cerebrales (Herrera et al., 2001; Skullerud et al., 1980). De hecho, enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, de Alzheimer, la Corea de Huntington y la esclerosis lateral amiotrópica están asociadas a situaciones de estrés oxidativo en el cerebro (Herrera et al., 2001; Karelson et al., 2001; Maksimovic et al., 2001; Serra et al., 2001).

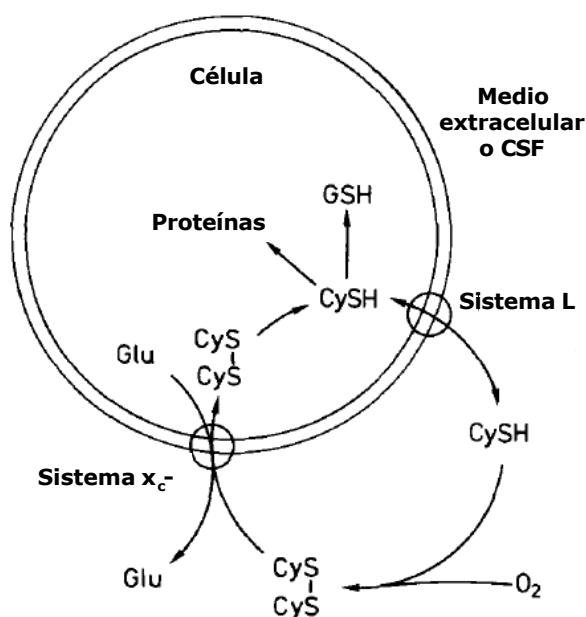
De esta manera se ha propuesto que xCT también contribuye a conducir el ciclo cistina/cisteína y, por tanto, el estado redox del fluido cerebro-espinal (CSF, *Cerebro Spinal Fluid*) (Sato et al., 2002). La expresión de xCT en zonas del cerebro en contacto con el CSF hacen pensar que, como se muestra en la Figura 35, la captación de cistina a través del sistema  $x_c^-$  y la liberación de cisteína a través de los transportadores de aminoácidos neutros puede contribuir al

mantenimiento del estado reducido en el CSF en contra del estrés oxidativo producido por el alto consumo de oxígeno en este tejido (Sato et al., 2002). En cualquier caso, el papel de xCT en las enfermedades neurodegenerativas merece estudios adicionales.

Hay que tener cuenta que la sobre-expresión de xCT puede implicar daño neuronal debido a un aumento en la concentración extracelular de glutamato (Espey et al., 1998; Piani and Fontana, 1994). Esto puede ser especialmente grave en situaciones de isquemia (Seki et al., 1999) y, de hecho, la multinacional Aventis está trabajando en un inhibidor de xCT para estos casos (M. Palacín, comunicación personal). Por otro lado, análogos que bloquean el sistema  $x_c^-$  también pueden exacerbar la excitotoxicidad como consecuencia de una atenuación en los niveles de GSH y una limitación en la protección del daño oxidativo, como puede ser el caso del Lactato (koyama et al 2000). Existen evidencias que sugieren que el daño oxidativo y la excitotoxicidad son procesos que interactúan (Schubert and Piasecki, 2001; Trotti et al., 1998; Zeevalk et al., 1998) y la demostración directa que la depleción del GSH en células corticales primarias de ratón incrementa la extensión de la excitotoxicidad mediada por los NMDA (Bridges et al., 1991).

Existe otra situación en que la actividad de xCT está asociada a un aumento en el glutamato extracelular: el efecto quisqualato (Chase et al., 2001; Harris et al., 1987; Robinson et al., 1986). Aunque no se conoce la relevancia fisiológica de este proceso, se ha descrito que el quisqualato provoca la liberación de glutamato, y éste puede activar receptores que despolarizan células neuronales (Harris et al., 1987). El L-quisqualato se ha demostrado capaz de actuar como sustrato de xCT y de provocar el intercambio de éste por glutamato intracelular (Patel et al., 2004).

Aparte del sistema nervioso central, xCT se expresa o se induce en otros tipos celulares (revisado en Chillarón et al., 2001; Wagner et al., 2001). Entre éstos se encuentra la retina, un tejido particularmente expuesto al estrés oxidativo y donde xCT ejercería funciones paralelas a las descritas en el SNC (Tomi et al., 2002; Bridges et



**Figura 35. Modelo del ciclo cistina/cisteína.**

La cisteína (Cys-Cys) es captada del medio extracelular o del fluido cerebroespinal (CSF) a través del sistema  $x_c^-$  y es reducida a cisteína (CySH), que es principalmente usada para la síntesis del glutatión (GSH). Alternativamente, parte de la cisteína (CySH) sale al exterior a través de los transportadores de aminoácidos neutros (sistema L). Aunque la cisteína es rápidamente oxidada a cistina en el medio extracelular o CSF, el sistema  $x_c^-$  es el encargado de recuperarla. Extraído de (Bannai et al. 1989) y adaptado de (Sato et al. 2002).

al., 2001), con especial relevancia en las células Müller (Tomi et al., 2003). Patologías como la retinopatía diabética (Baynes and Thorpe, 1999) y la degeneración macular de la edad (Winkler et al., 1999) están relacionadas con el daño oxidativo.

La expresión de *SLC7A11* en islotes pancreáticos (Sato et al., 1998; Sweiry et al., 1995 y presente tesis) ha llevado a hipotetizar un posible papel para el glutamato como mensajero intracelular en la exocitosis de la insulina (Maechler and Wollheim, 1999). El glutamato no inicia la respuesta secretora pero su captación haría competentes los gránulos de secreción, acoplado el metabolismo del glutamato con el de la glucosa (Maechler and Wollheim, 1999). Sería necesario hacer estudios más dirigidos para establecer si hay implicación de xCT en la ruta de secreción de la insulina.

También se ha observado actividad del sistema  $x_c^-$  en líneas celulares tumorales de glioma, linfoma y hepatoma (Ishii et al., 1992; Hishinuma et al., 1986; Bannai, 1984b y presente tesis). La activación de xCT en células proliferativas podría estar relacionada con el aumento de la disponibilidad de cistina para el crecimiento celular a través de su entrada o de la conversión del GSH por la estimulada gamma-glutamyltranspeptidasa (Hanigan, 1995; Hanigan and Ricketts, 1993; Ozono et al., 1985; Solt et al., 1985).

Es notable destacar el papel de xCT en la resistencia al cisplatino (CDDP), uno de los quimioterapéuticos más usados para el tratamiento del cáncer ovárico y otros tumores (Perez et al., 1993; Rosenberg, 1985). Se ha descrito que el incremento de la detoxificación celular mediante el aumento de GSH en las células tratadas es un factor clave de resistencia al CDDP (Godwin et al., 1992; Mistry et al., 1991; Behrens et al., 1987). Se ha demostrado que la exposición prolongada al CDDP provoca la adquisición de una expresión alta y estable de xCT, presentando una actividad del sistema  $x_c^-$  mucho más importante en las células resistentes que en las células sensibles, aunque se desconoce qué cambios genéticos provocan esta inducción (Okuno et al., 2003).

### 3. Topología de xCT

En esta tesis se describe la primera evidencia experimental de la topología de membrana del transportador xCT (Artículo 2), como modelo de subunidad ligera de la familia de transportadores heteroméricos de aminoácidos (LSHATs).

#### 3.1. Modelo de 12 segmentos TM

Siguiendo la estrategia de *cysteine-scanning mutagenesis* con biotilación, los resultados presentados revelan una topología compatible con el modelo de 12 segmentos transmembrana propuesto por los programas de predicción de estructura (p.ej. HMMTOP; Figura 4A, Artículo 2). También se muestran evidencias independientes, mediante inmunodetección, de la localización intracelular de los extremos N y C terminal (Figura 1, Artículo 2). La localización intracelular del extremo C-terminal está de acuerdo con los concatenámeros funcionales N-b<sup>0,+</sup>AT-rBAT-C (Pfeiffer et al., 1999a) y N-xCT-4F2hc-C (C. del Río, resultados no publicados). El extremo terminal de 4F2hc es intracelular (Fenczik et al., 2001) y, por tanto, sólo serían funcionales los concatenámeros con subunidades ligeras con el extremo C-terminal intracelular. De forma similar, la localización extracelular del residuo L163C (*loop* extracelular 3-4, EL3-4) (Figuras 3A y 4B, Artículo 2) 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 (Artículo 1). El modelo de 12 dominios transmembrana apoya estructuralmente la función de transporte de las LSHATs en ausencia de la subunidad pesada, como ha sido demostrado para b<sup>0,+</sup>AT (Reig et al., 2002).

Los estudios de biotilación después de la permeabilización con SLO en el *loop* intracelular IL4-5 resultaron difíciles. IL4-5 comprende los residuos 180 a 193 (Figura 9, Artículo 2; reproducida a continuación, Figura 36). Sólo se

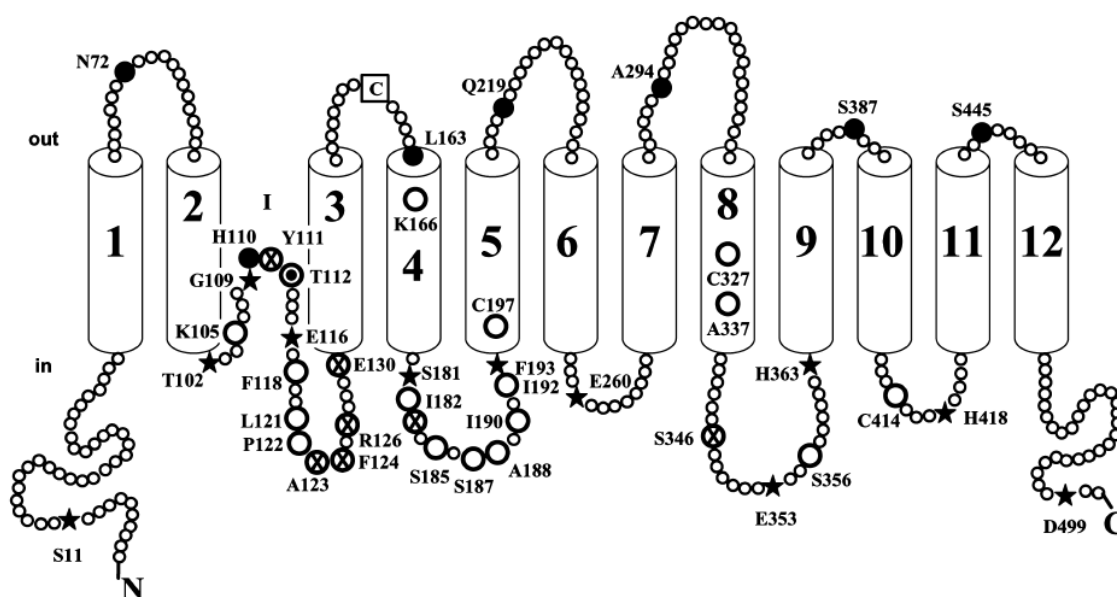


consiguió biotilinar los residuos de los extremos del *loop* (S181C Y F193C). La sustitución por cisteína de los residuos I182, S185, S187, A188, I190 y I192 no mostró biotilación después del tratamiento con SLO en ninguna de las ocasiones ensayadas (Figura 9, Artículo 2; reproducida en Figura 36). De forma similar, no tenemos información topológica de la mitad C-terminal del *loop* IL2-3: los residuos F118, L121 y P122 no mostraron ni biotilación ni inactivación por los reactivos MTS (Figura 6, Artículo 2); y los residuos A123, F124, R126 y E130 no toleran la sustitución por cisteína (Figura 2, Artículo 2). Esto sugiere que la mayor parte de IL4-5 y la parte C-terminal de IL2-3 están escondidas. Que esto se deba a una inserción en la membrana plasmática o a una interacción entre estos *loops* intracelulares o con el extremo N-terminal de la subunidad pesada 4F2hc se desconoce por el momento. Serían necesarios más experimentos para probar las distintas posibilidades.

### 3.2. Estructura *reentrant loop-like* en el *loop* citosólico IL2-3

Se habla de una estructura de *reentrant loop* cuando parte de un *loop* citoplasmático o extracelular atraviesa la membrana plasmática haciéndose accesible desde el exterior en el primer caso, o desde el interior en el segundo. Estas estructuras de *reentrant loop* han sido descritas en numerosos canales iónicos (MacKinnon, 1995) y se ha confirmado por cristalografía de Rayos X para el canal de potasio de *S. lividans* (Doyle et al., 1998). El primer *reentrant loop* descrito en un transportador fue por mutagénesis dirigida en el transportador de glutamato GLT-1 de rata por el grupo de B. Kanner (Grunewald et al., 1998).

En el caso de xCT, la biotilación de los residuos de la mitad N-terminal del *loop* IL2-3 sugiere la existencia de una estructura de *reentrant loop* (Figura 9, Artículo 2 reproducida en Figura 36). Los residuos T102, G109 y E116 presentan biotilación desde el interior, mientras el residuo H110 es biotilado desde el exterior (Figuras 4C y



**Figura 36. Modelo Topológico de xCT humano.** Los 12 dominios transmembrana están numerados y el *reentrant loop* está marcado (I). Los círculos negros indican biotilación desde el exterior y las estrellas, biotilación desde el interior. 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). El círculo que contiene un círculo negro (T112) indica accesibilidad desde el exterior al MTSES y MTSET pero no al BM. C158, señalado en un cuadrado) es el residuo implicado en la formación del puente disulfuro con 4F2hc. Extraído del Artículo 2, Figura 9 (Gasol et al., 2004).

5, Artículo 2). Además, los mutantes H110C y T112C en un entorno sin cisteínas son inactivados o estimulados, respectivamente, por el reactivo impermeable MTSES (Figura 6, Artículo 2). Por tanto, existen dos residuos (H110 y T112) con accesibilidad desde el exterior y flanqueados por tres residuos (T102, G109 y E116) accesibles desde el interior en un intervalo de 15 residuos (Figura 9, Artículo 2 reproducida en Figura 36). Esta disposición es reminiscente de los *pore loops* comentados anteriormente, presentes en canales iónicos (Doyle et al., 1998; MacKinnon, 1995), receptores de glutamato (Kuner et al., 1996) y más recientemente, descritos en transportadores (p.ej. transportadores de glutamato GLT-1, EAAT1 y GltT; el intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  NCX1, el transportador de citrato/malato CimH) (Krom and Lolkema, 2003; Shigekawa et al., 2002; Grunewald and Kanner, 2000; Iwamoto et al., 2000; Seal et al., 2000; Slotboom et al., 1999; Grunewald et al., 1998).

El *reentrant loop* de xCT comparte características comunes con los mencionados: i) sus sustratos (L-cistina y L-glutamato) y el inhibidor no transportable 4-S-CPG protegen de la inactivación del residuo clave H110 (Figuras 5, 7 y 8, Artículo 2); ii) el *reentrant loop* tiene accesibilidad exterior restringida, aparentemente a los residuos H110 y T112. La topología del residuo Y111 no pudo ser evaluada con la metodología disponible debido a un defecto de tráfico del mutante his-Y111C-Cysless (Figura 26, Resultados). H110C es, de los residuos estudiados en el IL2-3, el único con acceso exterior a La biotina-maleimida (BM) (Figuras 4C y 5, Artículo 2). Esto sugiere que este residuo está situado en el ápice del *reentrant loop*. Y iii) a partir de la resolución de la estructura de los canales de potasio parece que los ápices de los *reentrant pore loops* no alcanzan los niveles de las cabezas de fosfolípidos en el otro lado de la membrana plasmática (Doyle et al., 1998). El BM reacciona sólo con cisteínas expuestas a la fase acuosa. La clara biotilación de H110C desde el exterior sugiere que hay pocas restricciones estéricas en el canal de acceso exterior al ápice del *reentrant loop*. El residuo G109C, vecino al ápice externo, es

biotilado desde el interior y, por tanto, la cara interna del transportador debería ser suficientemente ancho como para permitir el acceso del voluminoso BM a esta posición.

### 3.3. Implicación del residuo H110

Los resultados de esta tesis aportan evidencias de que el residuo H110 se encuentra cercano al lugar de unión del sustrato / ruta de paso del mismo (*close to substrate binding/permeation pathway*): i) como se ha comentado anteriormente, la biotilación con BM de H110C se bloquea por los sustratos y el inhibidor no transportable 4-S-CPG (Figura 5, Artículo 2); ii) la inactivación provocada por MTSES en el transporte de H110C también es protegida por los sustratos con una  $\text{IC}_{50}$  similar a la de la  $K_m$  para cada sustrato (Figura 8, Artículo 2). Esta protección es independiente de la temperatura (Figura 7, Artículo 2), 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 2), no tuvo ningún efecto significativo en la  $K_m$  para los sustratos de xCT (Tabla 1, Artículo 2) ni para la especificidad del transportador. Así, his-H110C y his-H110D no indujeron ninguna actividad de transporte específica de otras LSHATs (p.ej. L-leucina, L-alanina y L-arginina) (Figura 32, Resultados). En cambio, la sustitución de H110 por una lisina (H110K) resultó en un transportador inactivado que llegó a la membrana plasmática (Figura E de Material Suplementario, Artículo 2), sugiriendo que la larga cadena lateral de la lisina no es tolerada en esta posición.

Estos resultados sugieren que el residuo H110, en el ápice del *reentrant loop*, se encuentra cercano al lugar de unión al sustrato / ruta de paso del mismo, pero probablemente no interacciona directamente con el sustrato en el ciclo del transporte. En el caso de un residuo implicado

directamente en la unión al sustrato esperaríamos que los valores de  $K_m$  para los sustratos variaran significativamente al ser sustituido por otro aminoácido o, incluso, que se anulara su función de transporte o alterara su especificidad (Dodd and Christie, 2001; Jung et al., 1994). Por otro lado, si fuera un residuo clave de la ruta de translocación (*gate residue*), su accesibilidad debería ser extremadamente sensible a los cambios conformacionales asociados al transporte (Chen and Rudnick, 2000). Podría ser que la modificación de H110C por los reactivos MTS provocara un impedimento estérico al sustrato para ocupar el lugar de unión al transportador o su ruta de paso. Alternativamente, H110 podría encontrarse en un entorno acuoso de la ruta de translocación que se extiende hasta la interfase citoplasma-membrana. Probablemente esta cuestión sólo podrá resolverse después de la cristalización y determinación estructural de las LSHATs. De hecho, N. Reig y M. Ratera de nuestro grupo, en colaboración con D. Fotiadis en Basilea, están trabajando en la obtención de la estructura de homólogos bacterianos de la familia.

### 3.4. Implicación del residuo C327

En el Artículo 3 que se incluye en esta tesis se presentan evidencias de otro residuo de xCT importante para el ciclo de transporte. El trabajo, desarrollado por M. Jiménez en nuestro grupo, muestra que la cisteína 327 (Cys327) está asociada al lugar de unión del sustrato / ruta de paso (*binding site/permeation pathway*) de xCT.

De acuerdo con otros estudios publicados sobre residuos implicados en la unión al sustrato (Dodd and Christie, 2001; Jung et al., 1994), y como se ha comentado anteriormente, se espera que su mutación implique una modificación de la  $K_m$  por los sustratos y/o en su especificidad. Así, la mutación de Cys327 a serina (C327S) o alanina (C327A) provoca un aumento en la  $K_m$  del transportador por el L-glutamato (Tabla 1, Artículo 3), aunque no es el caso de la mutación a treonina

(C327T), residuo presente en la misma posición en otras LSHAT (Figura 5A, Artículo 3). No se ha encontrado correlación alguna entre la especificidad de sustrato de los otros transportadores LSHAT (p.ej.  $y^+$ LAT-1,  $y^+$ LAT-2 y LAT-1) y el aminoácido presente en la posición correspondiente a C327 de xCT. Por tanto, no se esperaban variaciones de selectividad de sustrato entre los mutantes de C327 (M. Jiménez, Resultados Tesis Doctoral en preparación).

El análisis de los mutantes de Cys327 muestra que en esta posición se requiere un aminoácido de cadena lateral pequeña. Los aminoácidos voluminosos no son tolerados, aboliendo la actividad del transportador, hecho que refuerza la idea de que se trata de un residuo clave para la función de transporte (C327L; Figuras 5B y 6, Artículo 3). Aunque quizás Cys327 no participe directamente de la unión al sustrato, las cadenas laterales cortas permiten su unión pero las voluminosas imponen restricciones estéricas.

Existen otras observaciones que relacionan la Cys327 con la ruta de paso del sustrato: i) a pesar de su localización en el medio del segmento transmembrana 8 (TM8), la Cys327 es diana de inactivación del reactivo impermeable p-cloromercuriobencenosulfonato (PCMBS), indicando que es accesible al entorno acuoso (Figura 2, Artículo 3). Este residuo podría estar expuesto al exterior, aunque intentos por marcarlo con el reactivo BM en un entorno *cysless* no mostraron biotilación para C327 (Figura 24, Resultados). Y ii) la inactivación de Cys327 provocada por PCMBS, y también por el reactivo p-cloromercuriobenzoato (PCMB), es protegible por los sustratos de xCT con valores de  $IC_{50}$  similares a las  $K_m$  del transportador (Figura 3, Artículo 3). Esta protección también es independiente de temperatura, como en el caso de H110, sugiriendo que no son necesarios grandes cambios conformacionales para que tenga lugar (Chen and Rudnick, 2000; Seal and Amara, 1998).

Ensayos de inactivación con otros reactivos tiol-específicos muestran que la accesibilidad a la Cys327 se limita al PCMB y PCMBS. Puesto que no pueden establecerse paralelismos con los sustratos de xCT, como ocurre con otros residuos

de otros transportadores (Hu and King, 1999; Mueckler and Makepeace, 1997), quizás esta restricción es debida al anillo aromático presente en la molécula y su apilamiento con los anillos de fenilalaninas (Phe) y tirosinas (Tyr) cercanas: existen tres residuos de Phe en el segmento TM8 (Phe315, Phe322, Phe328; Figura 5A y 7, Artículo 3). Los aminoácidos que rodean la Cys327 en el segmento TM8 forman una región muy conservada dentro de la familia LSHAT (Figura 7, Artículo 3) y por este motivo no se espera que tengan un papel esencial en la determinación de la especificidad de sustrato. Por otro lado, esta zona podría ser relevante para algunos pasos generales del ciclo del transporte.

#### 4. Relaciones de estructura-función

El análisis de estructura-función de xCT ha revelado dos residuos críticos hasta ahora: H110 y C327. En resumen, ambos residuos muestran accesibilidad exterior y la inactivación del transporte por inhibidores MTS es protegible por los sustratos de xCT con una  $IC_{50}$  similar a la  $K_m$  y de forma temperatura-independiente. A pesar de estas similitudes, ambos residuos presentan claras diferencias: i) C327S y C327A, 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 H110 se encuentra en el ápice externo de un *reentrant loop* entre los dominios transmembrana 2 y 3, C327 se encuentra en un dominio transmembrana (TM8); iii) ambos residuos presentan diferencias sustanciales en cuanto a la naturaleza de los reactivos tiol-específicos que actúan sobre ellos: C327 reacciona con PCMB y PCMBS pero no es accesible a los reactivos MTS, NEM, iodocetamina, [4-(N-maleimido)benzil] trimetilamonio (MBTA) y ácido mersalilo. Se ha justificado 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 ( $MW$  de 278.24 Da y 236.15 Da, respectivamente) pero probablemente este argumento no pueda aplicarse ya que también es accesible al voluminoso BM ( $MW$  de 523.6 Da). Quizás la carga positiva permanente del MTSET impide el acceso al residuo H110 mientras la del MTSEA depende del pH del entorno ( $pK_a \sim 8.5$ ) (Karlin and Akabas, 1998). 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).

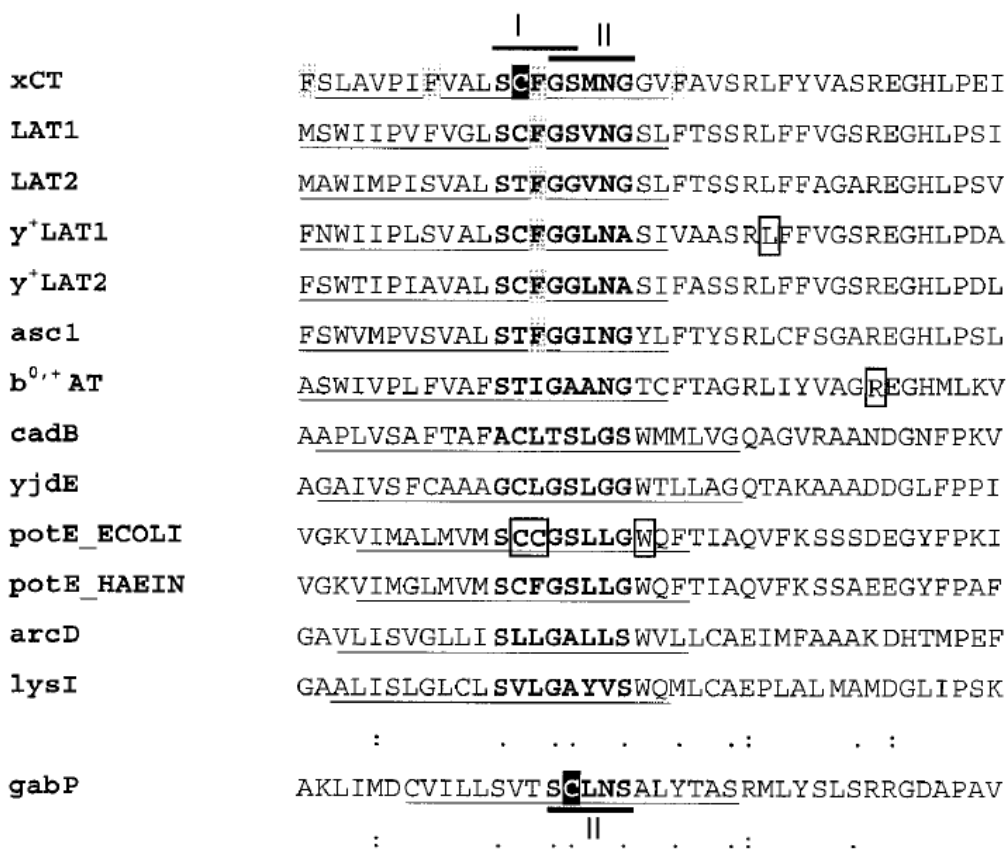
En conjunto, los resultados sugieren diferentes funciones para los residuos H110 y C327 de xCT. Como se ha comentado en la Introducción (Figura 7), se ha establecido un modelo teórico preliminar, un poco a *grosso modo*, del lugar de unión al sustrato para las LSHATs (Uchino et al., 2002; Kanai and Endou, 2001). Los autores sugieren tres sub-lugares de reconocimiento: uno para el carbono  $\alpha$  del grupo carboxilo, uno para el grupo  $\alpha$ -amino, y otro para la cadena lateral. Mientras este último podría ser divergente para cada miembro de la familia, los dos primeros podrían ser similares o conservados entre todos los miembros. 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  $\gamma^+$ LAT, de aminoácidos básicos; y Glu en  $b^{0,+}$ AT, de aminoácidos neutros y básicos) (Figura 25, Resultados); en cambio, C327 es un residuo conservado o sustituido sólo por Thr en las

otras LSHATs. De acuerdo con el modelo de sub-  
lugares de reconocimiento, C327 podría ser uno de  
los dos primeros, mientras H110 podría ser el de la  
cadena lateral. En cualquier caso, H110 no es  
suficiente para determinar la especificidad de  
sustrato como se deduce de los transportes con  
H110D (Figura 32, Resultados).

Para obtener mayor información del papel  
funcional que pueden desempeñar los residuos  
His110 y Cys327 se puede inspeccionar la región  
que los contiene y compararla con la de otras  
proteínas similares. Como se ha presentado en la  
Introducción de esta memoria, las proteínas  
LSHAT pertenecen a la superfamilia de  
transportadores APC (Amino acid /poly-

amine/organic Cation) (Jack et al., 2000). Dentro  
de la superfamilia APC, las LSHATs pueden  
alinearse a lo largo de toda su secuencia a pesar de  
su baja identidad (14-16%) con los transportadores  
procariotas de la subfamilia 2.A.3.2 (familia APA,  
*basic Amino acid Polyamine Antiporters*) (p.ej.  
PotE, YjdE, cadB y LysI).

En la Figura 7 del Artículo 3 (reproducida a  
continuación, Figura 37) se muestra el  
alineamiento de las secuencias de las LSHATs  
humanas con algunos de los miembros procariotas  
de la familia APC a lo largo del dominio TM8,  
donde se localiza C327, y parte del cuarto *loop*  
intracelular. Pueden observarse dos motivos  
(G/S/A)<sub>X</sub><sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>(G/S/A) solapados (motivos I y II),



**Figura 37. Dominio transmembrana 8 en tres familias APC diferentes.** Para el alineamiento se ha utilizado el programa CLUSTALW, cogiendo 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 putativo dominio transmembrana 8 se ha obtenido del 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 PCMS de xCT humano y gabP están recuadradas en negro. Los residuos recuadrados en blanco son importantes para la actividad del transportador. Los residuos de Phe en xCT en el dominio TM 8 o cercanos a él aparecen en gris. Paralelamente, el residuo de Phe conservado en las LSHAT también se muestra en gris (sólo en b<sup>0,+</sup>AT es sustituido por una Ile). Extraído de la Figura 7 del Artículo 3 (Jiménez-Vidal et al., 2004).

que han sido reconocidos como zonas de asociación entre hélices transmembrana (Russ and Engelman, 2000; Senes et al., 2000). X representa cualquier aminoácido. Es posible que en el contexto de xCT un residuo con cadena lateral voluminosa, por ejemplo leucina, en la posición  $X_1$  del motivo I produzca alteraciones en el empaquetamiento de las hélices, llevando a una inactivación de la función de transporte.

En PotE, tres residuos importantes para el transporte (Cys285, Cys286 y Trp292) se localizan en este dominio transmembrana, siendo uno de ellos la cisteína en la misma posición del alineamiento (Cys285) (Kashiwagi et al., 2000). También la Cys300 de gabP, presentada en la Introducción de esta memoria, se encuentra en el dominio TM8, constituyendo la  $X_1$  del motivo (G/S/A) $X_1X_2X_3$ (G/S/A) II correspondiente al alineamiento entre las LSHATs y las proteínas de la subfamilia 2.A.3.2. Este residuo está conservado entre los miembros de la subfamilia 2.A.3.1 AAT (*Amino Acid Transporter*), a la cual pertenece gabP, y los de la 2.A.3.10 YAT (*Yeast Amino acid Transporter*) (Hu and King, 1998a). La Cys300 de gabP es diana de los reactivos sulfidrilos de forma similar a la Cys327 de xCT (Hu and King, 1999). La mutación a alanina (C300A) deja una proteína con sólo un 5% de actividad respecto a la versión salvaje. Aunque el mutante retiene la capacidad de unión al sustrato, no se compara con la proteína salvaje y, por tanto, su papel en la unión al sustrato queda poco claro (Hu and King, 1998b). La Cys300 de gabP parece iniciar una  $\alpha$ -hélice anfipática de 20 aminoácidos que comprende la mitad C-terminal del dominio TM8 y que se extiende hacia el cuarto *loop* intracelular, que conecta los TM8 y TM9 (IL8-9). Los autores especulan que esta estructura podría estar conservada entre los miembros de las familias 2.A.3.1 y 2.A.3.10 (Hu and King, 1999; Hu and King, 1998a; Hu and King, 1998b; Hu and King, 1998c). Son necesarios más estudios para determinar si existe una estructura similar en otras familias de la superfamilia APC (p.ej. familia LSHAT, familia APA, etc.). En cualquier caso, tenemos evidencias que indican una función importante de esta región: la mutación de cistinuria

de tipo B, R333W; y de lisinuria con intolerancia a proteínas, L334R, afectan la función de transporte ( $b^{0,+}$ AT y  $y^+$ LAT-1 humanos, respectivamente) y se encuentran en el cuarto *loop* intracelular (Font et al., 2001; Mykkanen et al., 2000). En los transportadores CAT (*Cationic Amino acid Transporters*), familia 2.A.3.3 de los transportadores APC, este *loop* modula la afinidad por el sustrato (Habermeier et al., 2003; Closs et al., 1993).

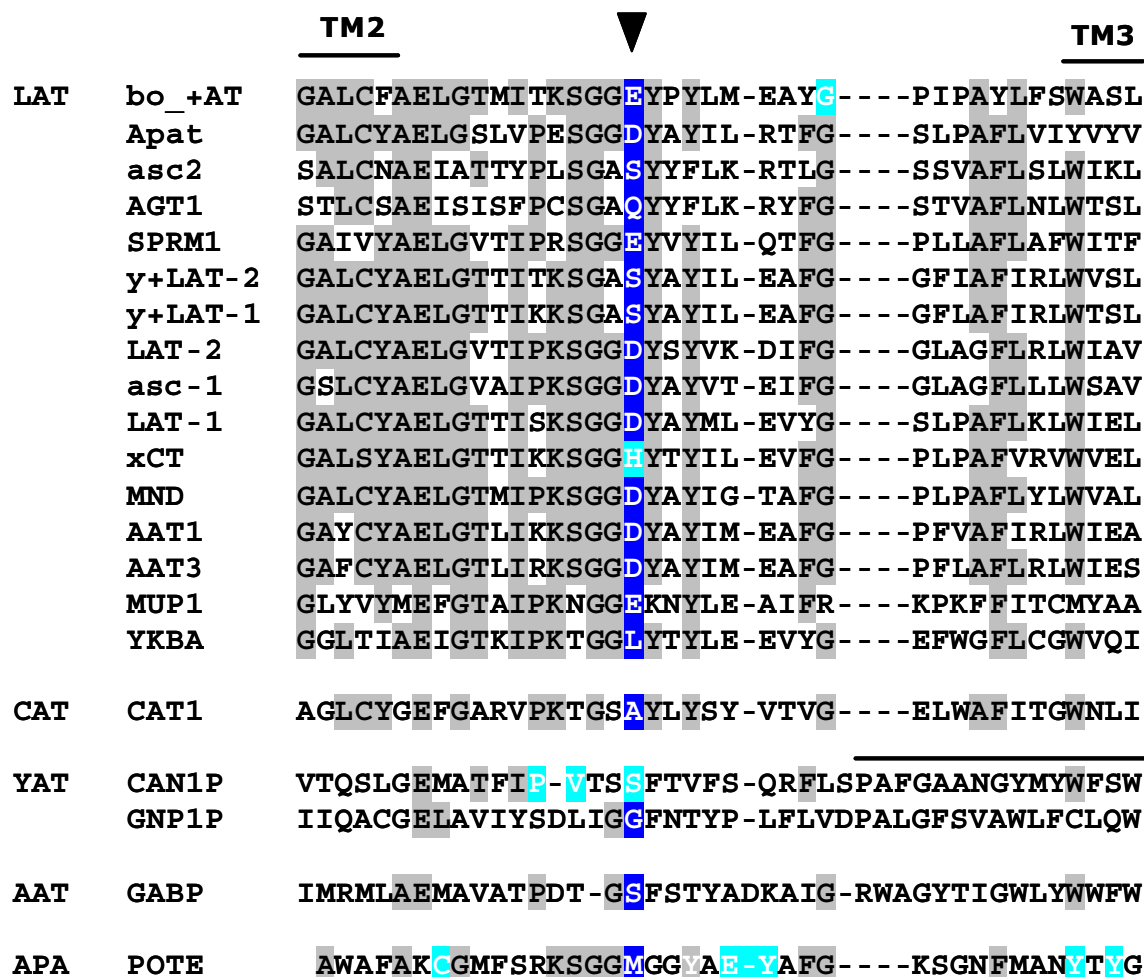
Podemos realizar un alineamiento similar al anterior con las secuencias de aminoácidos de las proteínas pertenecientes a la familia LAT (que incluye las LSHATs) junto con otros miembros de la superfamilia APC: los transportadores procariotas PotE (familia APA) y GabP (familia AAT); los de levadura, Can1p y Gnp1p (familia YAT); y CAT1 humano (Figura 38). La zona correspondiente al IL2-3, como se ha comentado en la Introducción de esta memoria, aparte del residuo H110 de xCT, contiene otros residuos relevantes para la función del transportador. En la posición 105 de  $b^{0,+}$ AT se encuentra la mutación más frecuente de cistinuria de tipo A, G105R, asociada a un fenotipo severo de la enfermedad. Estudios funcionales en células HeLa con este mutante muestran que la actividad de transporte se encuentra prácticamente anulada, probablemente debido a un problema de estabilidad de la proteína o del RNAm ya que los niveles de proteína mutante expresada son muy bajos (~10%) comparados con los de la versión salvaje (Font et al., 2001).

Los estudios realizados con PotE han revelado que la mutación del glutamato en la posición 77 (incluso por un aspartato) provoca una caída significativa de la captación y excreción de putrescina, atribuyéndole una contribución directa en la unión del sustrato (Kashiwagi et al., 1997). De forma similar, la mutación Y92L y C62A también afectó la función de captación y excreción de PotE, mientras la mutación de las tirosinas Y78 e Y90 provocó un mayor efecto en la captación que en la excreción (Kashiwagi et al., 2000). El importante aumento de la  $K_m$  para la putrescina en comparación con el de la  $V_{m\acute{a}x}$  en estos dos últimos residuos lleva a los autores a afirmar que éstos

deben estar implicados en la alta afinidad de captación de PotE (Kashiwagi et al., 2000).

En cuanto a los trabajos en levaduras, estudios de mutantes han revelado la existencia de 13 residuos clave, situándose tres de ellos en la zona homóloga correspondiente al IL2-3 de Can1p (P148, V149 y S152) (Regenberg and Kielland-Brandt, 2001). Las sustituciones P148L, V149F y

S152F amplían la especificidad de sustrato del transportador Can1p a L-citrulina, aunque manteniendo la capacidad de transportar L-arginina a unos valores de  $K_m$  dentro del rango del transportador salvaje (3-10  $\mu$ M), sugiriendo cierta implicación en el reconocimiento del sustrato o en el paso del mismo. Los autores señalan diferentes aspectos de interés: i) los tres residuos se



**Figura 38. Alineamiento múltiple del IL2-3 en miembros de la superfamilia APC.**

El alineamiento se ha realizado con el programa *tcoffee* utilizando todas las secuencias de la familia LAT (aunque sólo se muestran los ortólogos humanos de *b<sup>0</sup>+AT*, *y+LAT-1* y *2*, *LAT-1* y *2*, *asc-1* y *xCT*; el ortólogo de ratón para *asc-2* y *APAT*; el miembro de *S. mansoni* *SPRM1*; los miembros de *C. elegans* *AAT1* y *3*; *MND* (minidisks) de *D. melanogaster*; el miembro de *S.cerevisiae* *MUP1* y el procarionta *Ykba*), *CAT1* humano y *PotE* de *E.coli*. Para el alineamiento de las permeasas de *S. cerevisiae* *Can1p* y *Gnp1p* y *gabP* de *E. coli* se ha utilizado el programa *CLUSTALW* junto con las secuencias humanas de las *LSHAT* y se han incorporado al alineamiento anterior. Finalmente el alineamiento se ha modificado a mano. Se muestra el final del dominio *TM2* (para todas) y el principio del *TM3* (ligeramente diferente para las *LSHATs* y el resto de proteínas) según el programa de predicción *HMMTOP*. Los residuos conservados en más de la mitad de los miembros que se muestran aparecen resaltados en gris. En azul claro están marcados los residuos que tienen implicaciones en la función del transportador: G105 de *b<sup>0</sup>+AT* (Font et al., 2001); H110 de *xCT* (presente tesis); P148, V149 y S152 de *Can1p* (Regenberg and Kielland-Brandt, 2001) y C62, E77, Y90 y Y92 de *PotE* (Kashiwagi et al., 2000). Las proteínas están agrupadas por subfamilias APC a la que pertenecen, indicado a la izquierda de los nombres de cada proteína.

encuentran en un *cluster* en el segundo *loop*, enfatizando la importancia de este dominio; ii) P148 y S152 son residuos muy conservados dentro de la familia de permeasas: P148 está conservada en todos los miembros de levadura excepto en Gnp1p, Agp1p y Tat1p; siendo los dos primeros los únicos capaces de transportar L-glutamina y L-asparagina (During-Olsen et al., 1999; Schreve et al., 1998). Además, una prolina en esta posición podría suponer algún tipo de restricción estérica en la permeasa, impidiendo el transporte de determinados aminoácidos como L-asparagina, L-glutamina y L-citrulina (Regenberg and Kielland-Brandt, 2001). Y iii) S152 es interesante por el hecho que está conservada entre los transportadores catiónicos bacterianos, fúngicos e incluso entre los de mamífero (entre los que se encuentra CAT-1 humano). Según los autores, esta serina podría ser importante para el reconocimiento de la L-arginina como sustrato.

Hay que añadir en este punto que la posición homóloga de esta serina (S152) coincide con el residuo H110 de xCT (ampliamente discutido en el apartado anterior). Es interesante recordar que en la subfamilia LSHAT el aminoácido que se encuentra en esta posición no está conservado y que, aparentemente, parece ser específico de grupo de transportador: como se mostraba en la Figura 25 de Resultados (Material Suplementario del Artículo 2), las isoformas humanas que transportan aminoácidos neutros presentan una D (LAT-1 y 2 y asc-1); las que transportan aminoácidos neutros dependiente de sodio y básicos, una S (y<sup>+</sup>LAT-1 y 2); la que transporta básicos, neutros y cistina, una E (b<sup>0,+</sup>AT); y finalmente, xCT que transporta glutamato y cistina aniónicos, una H. Precisamente, que en las subunidades ligeras responsables del transporte de aminoácidos básicos (y<sup>+</sup>LAT-1 y y<sup>+</sup>LAT-2) se encuentre una serina en esta posición apoyaría la observación propuesta anteriormente como responsable de especificidad de sustrato y, en concreto, del transporte de arginina (Regenberg and Kielland-Brandt, 2001). Sin embargo, un alineamiento más extenso de diferentes miembros de la familia LAT, así como de otras familias APC, revela que esta afirmación podría ser un tanto arriesgada (Tabla 4).

**Tabla 4. Correlación sustrato-residuo**

Transportador	Sustratos	Residuo
LAT1	aa <sup>0</sup> grandes	D
LAT2	aa <sup>0</sup>	D
asc1	L- y D- aa <sup>0</sup> pequeños	D
AAT1	aa <sup>0</sup> pequeños	D
AAT3	aa <sup>0</sup> pequeños	D
APAT	aa <sup>0</sup> aromáticos	D
MND	?	D
YKBA	Ser, Thr	L
GNP1P	Gln, Asn	G
asc2	L-aa <sup>0</sup> pequeños	S
y <sup>+</sup> LAT1	aa <sup>+</sup> , aa <sup>0</sup> /Na	S
y <sup>+</sup> LAT2	aa <sup>+</sup> , aa <sup>0</sup> /Na	S
CAN1P	Arg	S
GABP	GABA	S
CAT1	aa <sup>+</sup>	A
POTE	Putrescina, aa <sup>+</sup>	M
b <sup>0,+</sup> AT	aa <sup>+</sup> , aa <sup>0</sup> , C <sub>5</sub> S <sub>5</sub> C	E
SPRM1	aa <sup>+</sup> , aa <sup>0</sup>	E
MUP1	Met	E
xCT	Glu, C <sub>5</sub> S <sub>5</sub> C aniónica	H
AGT1	Asp, Glu	G

aa<sup>0</sup>: aminoácidos neutros; aa<sup>0</sup>: aminácidos neutros con dependencia del ión sodio; aa<sup>+</sup>: aminoácidos básicos; ?: por determinar.

En la Figura 38 puede apreciarse: i) que el alineamiento del miembro humano CAT-1 desplaza la serina una posición a la izquierda de forma que la posición homóloga a H110 de xCT y S152 de Can1p es una alanina en CAT-1. El hecho que la secuencia se alinee correctamente con las otras zonas conservadas nos hace confiar en el alineamiento de *tcoffee* (Poirot et al., 2003)



mostrado en la en esta Figura. ii) transportadores de otras familias, como la AAT (p.ej., gabP en la figura, AroP, LysP, PheP, etc.), que no transportan arginina conservan una serina en esta posición (Hu and King, 1998c) y Figura 8 de la Introducción de esta memoria). iii) la especificidad de grupo entre las LSHAT de este residuo (marcado con una flecha, homólogo a H110 en xCT) parece perderse al incorporar el miembro “huérfano” de subunidad pesada asc-2 y el procariota Ykba (transporta serina y treonina; N. Reig y M. Palacín, resultados no publicados); y iv) los experimentos con los mutantes H110D y H110C no resultaron en una alteración de la especificidad del transportador (Figura 32, Resultados). Estas observaciones hacen dudar de la hipótesis que H110 sea un residuo implicado en la especificidad de sustrato de la familia LAT, de su subfamilia LSHAT o incluso parte de los miembros de la superfamilia APC. En cualquier caso, los resultados de inhibición y protección presentados en esta tesis, junto con el hecho que el mutante H110K inactive completamente la función del transportador aún encontrándose éste en la membrana plasmática de la célula, actúa a favor de tratarse de un residuo implicado en la unión al sustrato y/o en la ruta de paso del mismo. Hay que añadir, de todas formas, que es un poco simplista tratar de reducir la especificidad de sustrato de un transportador a un sólo residuo. Seguramente sea necesario identificar otros residuos cercanos físicamente en la estructura tridimensional del transportador que actúen coordinados con H110; C327 podría ser un candidato a tener en cuenta. Quizás entonces el paralelismo entre grupo de transportador y tipo de residuos que presentan cuadre exactamente. En este sentido, la cristalización de miembros bacterianos homólogos será de gran ayuda (N. Reig, C. del Río, M. Ratera, D. Fotiadis y M. Palacín; resultados en progreso).

A la espera de la obtención y resolución de cristales, otra estrategia para abordar estudios de estructura-función son los ensayos de competición con inhibidores o análogos de sustratos, que permiten delinear los requerimientos estructurales necesarios del lugar de unión del sustrato al transportador. Un trabajo publicado recientemente

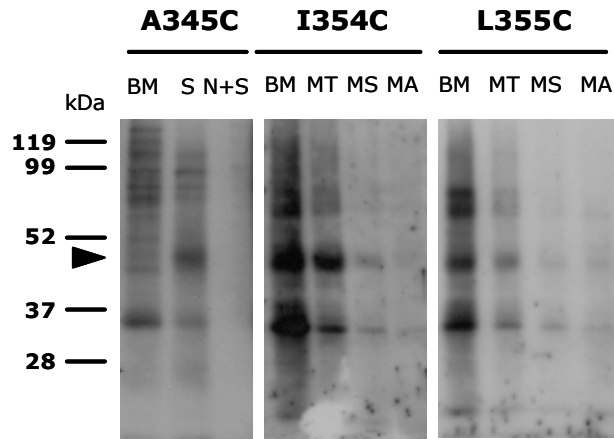
evalúa las características de los inhibidores de xCT y cuáles de ellos son transportables (Patel et al., 2004). Los inhibidores acíclicos más potentes son aquellos que contienen esqueletos carbonados comparables en longitud al glutamato, como son el L-homocisteato y el L-homocisteína sulfinato. Incluso el L-serina-O-sulfato resultó más potente que los propios sustratos. Estructuralmente, incrementos adicionales en la longitud de la cadena también fueron tolerados en el lugar de unión, como por ejemplo el L-a-aminoadipato y el S-carboximetil-L-cisteína. Según los autores, la habilidad de acomodar estas cadenas más largas no es sorprendente atendiendo que la L-cisteína es sustrato de xCT (Patel et al., 2004). Hay, sin embargo, un límite a esta relación de estructura-actividad: incrementar la longitud de la cadena hasta la de la homocistina o el L-djencolato resulta en pérdidas muy significativas de potencial inhibidor. Comparaciones de actividad entre el L-cistatión, el S-carboxietil-L-cisteína y la L-cistina, sugieren que las distancias entre grupos COOH no es el único factor determinante de la capacidad inhibidora de un compuesto y que la presencia de enlaces SS en la L-cistina puede tener efectos conformacionales que potencian la unión al lugar del sustrato comparado con otras moléculas en las que el átomo S se ha sustituido por un metileno (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 mediante la introducción de anillos aromáticos en el esqueleto carbonado del análogo (Chamberlin et al., 1998). Cuatro de estos compuestos inhiben más eficazmente que la propia L-cistina: ibotenato, (RS)-4-bromohomoibotenato, L-quisqualato y (S)-4-carboxifenilglicina (S-4-CPG).

Una limitación de los ensayos de competición es que no aportan información sobre las características que requiere la translocación del sustrato. Diferenciar inhibidores sustratos de los

no-sustratos y, por tanto, distinguir los compuestos que sólo se unen de los que se unen y se translocan, sí puede hacerlo. En este sentido, el grupo de Bridges concluye que los compuestos que resultan ser los mejores inhibidores competitivos (p.ej. L-quisqualato y 4S-CPG) han resultado ser 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).

## 5. Próximas direcciones

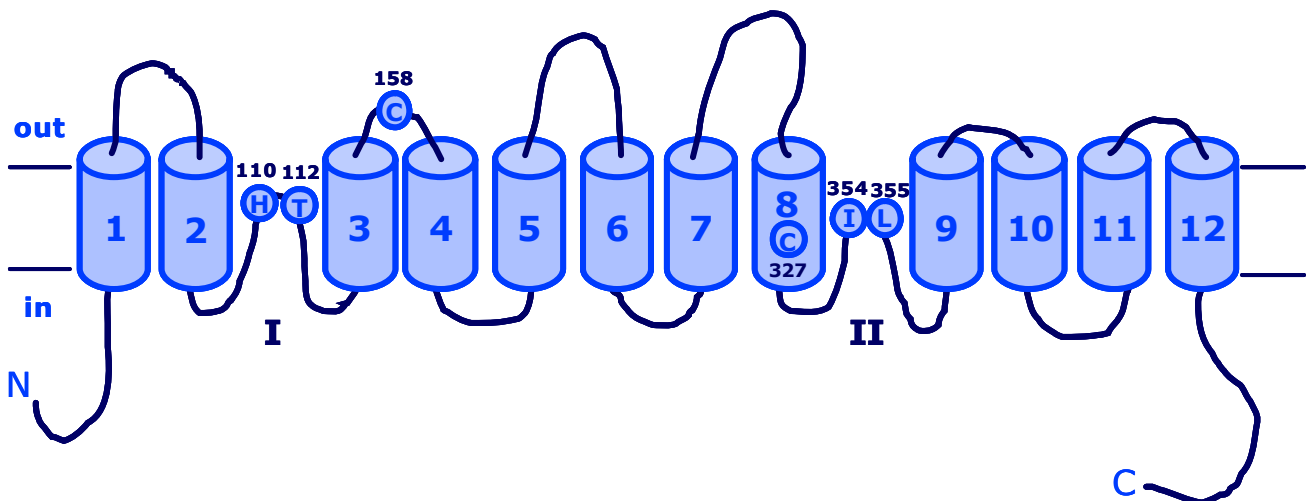
La localización de una estructura de *reentrant loop* durante la determinación de la topología de xCT nos animó a intentar analizar con más detalle algunas zonas que pudieran albergar nuevos *reentrants*. Las zonas candidatas eran los *loops* que tuvieran una longitud suficiente como para poder entrar en la membrana y luego volver a salir: el *loop* extracelular entre los TMs 1-2 (EL1-2), el también extracelular entre los TMs 7-8 (EL7-8) y el *loop* intracelular entre los TMs 8-9 (IL8-9). El análisis preliminar de los nuevos mutantes parecía indicar que el mutante I354C tenía acceso al BM



**Figura 39. Acceso extracelular a los residuos I354C y L355C.** La aplicación extracelular de BM es capaz de biotinilar los mutantes I354C y L355C (BM) pero no el mutante 345C, que sólo lo hace después de la permeabilización con SLO (S). La biotinilación extracelular es bloqueada por la pre-incubación de las células con los reactivos MTSES (MS) y MTSEA (MA), pero no por el MTSET. Geles de R. Brauner y L. Rodríguez.

desde el exterior. En esta zona se había definido que los residuos E353 y H363 tenían acceso intracelular (Figuras 4 y 9, Artículo 2) por lo que podríamos encontrarnos ante otra estructura de *reentrant loop* parecida a la descrita anteriormente: un residuo con accesibilidad exterior flanqueado por dos residuos intracelulares.

R. Brauner y L. Rodríguez, en nuestro



**Figura 40. Modelo de topología de xCT con dos *reentrant loops*.** En el esquema aparecen representados los 12 dominios TM, con extremos N y C-terminal intracelulares. La longitud de los *loops* está dibujada a escala. Se han señalado los residuos clave: H110 y T112 (*reentrant loop* I), I354 y L355 (*reentrant loop* II) y el residuo C327, localizado en el segmento TM8. La C158 está implicada en la formación del puente disulfuro con la subunidad pesada.

laboratorio, están realizando un estudio más pormenorizado de las diferentes zonas (EL1-2 y EL7-8) y, en concreto, del IL8-9 y se puede concluir de sus resultados que, efectivamente, existe un nuevo *reentrant loop* en esta región. En la Figura 39 se muestra la accesibilidad extracelular al BM de los mutantes I354C y L355C y cómo esta biotinylación es sensible al MTSES y al MTSEA, pero no al MTSET (como ocurría con H110C). Actualmente, R. Brauner y L. Rodríguez están realizando experimentos de inhibición del transporte y de protección de sustrato para caracterizar mejor estos residuos. Precisamente en la proteína PotE existen dos residuos en esta zona (K301 y Y308) que parecen estar implicados en el reconocimiento de la ornitina (Kashiwagi et al., 2000).

La existencia de dos *reentrants loops* en una misma proteína, a veces de orientación opuesta, está descrita en canales (Murata et al., 2000; Fu et al., 2000) y transportadores (Brocke et al., 2002). La proximidad física en el espacio de estas estructuras ha sido demostrada experimentalmente (Brocke et al., 2002; Murata et al., 2000; Fu et al., 2000), así como su implicación en la ruta de paso del sustrato. Serán necesarios estudios de *cross-linking* para poder afirmarlo de los dos *reentrants loops* de xCT. Probablemente el residuo C327 también pueda estar próximo a ellos dada su implicación en la ruta de paso/unión del sustrato al transportador. Serán los primeros datos de información tridimensional a la espera de la resolución de los cristales de un homólogo bacteriano de las LSHATs (N. Reig, M. Ratera y D. Fotiadis, resultados en progreso).



## **Conclusiones**



- I. El transportador humano xCT pertenece a la familia de subunidades ligeras de los transportadores heteroméricos de aminoácidos (LSHAT). La co-expresión de 4F2hc y xCT humanos en oocitos de *X. laevis* y en células HeLa induce un transporte sodio-independiente de cistina y glutamato, característico de la actividad del sistema  $x_c^-$ .
- II. La falta de heterodimerización funcional de las LSHAT asc-2 y AGT-1 con 4F2hc y rBAT soporta firmemente la hipótesis de la interacción de estos transportadores con subunidades pesadas todavía no identificadas.
- III. La determinación de la topología de xCT es compatible con un modelo de 12 segmentos transmembrana, con extremos N y C-terminal intracelulares.
- IV. El *loop* intracelular entre los dominios transmembrana 2 y 3 (IL2-3) presenta una accesibilidad que es compatible con una estructura de *reentrant loop*, con ápice extracelular en el residuo H110.
- V. El residuo H110 de xCT presenta accesibilidad restringida por la presencia de los sustratos glutamato y cistina y el inhibidor no transportable 4-S-carboxifenilglicina. Esta restricción es débilmente afectada por la disminución de temperatura. Esto sugiere que H110 se encuentra cercano al lugar de unión y/o de la ruta de paso de los sustratos en el transportador xCT.





## **Materiales y Métodos**



## 1. Herramientas bioinformáticas

### 1.1. Bases de datos

**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>.

**GenBank.** Es la base de datos de secuencias del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y dispone de las secuencias de DNA de todas las fuentes públicas disponibles (Benson et al., 1998). Las secuencias son enviadas directamente por los laboratorios que las han identificado o bien son adquiridas de las bases de datos públicas internacionales, como el European Molecular Biology Laboratory (EMBL) o el DNA Database of Japan (DDBJ). Cada secuencia de DNA se acompaña de la secuencia de proteína derivada de ella y de la información proporcionada por la fuente que la somete: publicación, localización cromosómica, localización de motivos funcionales, etc. Las secuencias disponibles se encuentran en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>. Las secuencias nuevas se someten mediante conexión on line a la dirección: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt/index.html>.

**Expressed Sequence Tag database (dbEST).** Las *Expressed Sequence Tags* (ESTs) son secuencias cortas correspondientes a genes expresados que se seleccionan al azar a partir de librerías de cDNA de diferentes tejidos y organismos (Boguski et al., 1993). Estas secuencias están incluidas en la base de datos Expressed Sequence Tag database (dbESTs), una división del GeneBank, y están disponibles en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/>. Además de las secuencias, aporta información sobre la procedencia de la librería, la longitud del clon en el que se encuentran y la localización cromosómica del gen. Las especies más representadas son la humana y la de ratón, aunque también pueden encontrarse secuencias correspondientes a otras especies. La disponibilidad comercial de los clones de cDNA de dbEST y la posibilidad de un fácil y rápido análisis *on line* de estas secuencias hacen de dbEST una poderosa fuente para la identificación de cDNAs. Sin embargo, cuando se trabaja con ESTs se deben tener en cuenta algunas consideraciones: i) algunas ESTs pueden contener errores ya que se secuencian a partir de una sola de las cadenas de cDNA; ii) los clones de cDNA en los que se incluye la secuencia de dbEST son generalmente fragmentos parciales de un cDNA completo. Sólo los cDNAs cortos (<2 kb) pueden estar completos en el clon; iii) la mayoría de librerías de cDNA se construyen utilizando un oligonucleótido poli-d(T) en el paso de la retrotranscripción. Esto favorece el enriquecimiento de clones parciales correspondientes al extremo 3' del cDNA e implica una escasa representación de ESTs que contienen secuencia codificante; iv) algunos cDNAs están representados por más de una EST. Cada clon se identifica con un número y cada EST por un código; v) algunas ESTs no están correctamente clasificadas y no corresponden a la información asociada por la base de datos, y vi) algunos clones contienen intrones, indicando contaminación por DNA genómico en las librerías de cDNA.

**Unigene.** Esta base de datos contiene más de 50000 *clusters* o alineamientos de secuencias humanas no redundantes, cada uno de ellos representando el producto de transcripción de un gen diferente. Los *clusters* son generados por comparación de ESTs entre sí para determinar cuáles de ellas provienen de la transcripción de un mismo gen y excluir aquéllas que, aún siendo similares, provienen de un gen diferente. Teóricamente, contiene el 100% del número estimado de genes humanos. Aunque inicialmente la base de datos fue creada para las especies humana, ratón y rata, actualmente se pueden encontrar clusters de otras especies como la vaca, el arroz, el maíz, etc. Además de las ESTs que forman un determinado *cluster*, Unigene también proporciona información sobre su localización cromosómica, la existencia de cDNAs completos relacionados que se encuentran disponibles, situdes con proteínas conocidas o el contenido de motivos funcionales. Unigene se encuentra en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unigene>.

**Ensembl.** Es una base de datos fundada inicialmente por la fundación privada The Wellcome Trust y que ahora forma parte de un proyecto común entre el Instituto Sanger y el EMBL-EBI. Dispone de secuencias de DNA genómico de humano, ratón, rata, mosquito, *D.melanogaster* y *C.elegans*, entre otras. Estas secuencias son proporcionadas por laboratorios que forman parte de los proyectos de secuenciación del genoma, de ESTs y del intercambio regular de información de secuencias del NCBI. Además, proporciona información sobre la localización de un gen conocido en el genoma y la predicción de su estructura. Las secuencias se hacen públicas cada semana y son sometidas en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/TraceArchiveRFC.html>. El acceso puede realizarse en <http://www.ensembl.org>.

## 1.2. Análisis de secuencias

### Basic Local Alignment Tools (BLAST).

Los programas BLAST se utilizan para encontrar en las bases de datos secuencias similares de DNA y proteínas. Estos programas comparan una secuencia “problema” de proteína o de DNA, con todas las secuencias de las bases de datos. El resultado se muestra como una lista de alineamientos, de más a menos calidad, entre las secuencias encontradas en la base de datos y la secuencia “problema”. El tiempo requerido para obtener el resultado es proporcional al tamaño de la secuencia y de la base de datos utilizada en la búsqueda. Los programas más recientes como el Gapped BLAST son más sensibles que el BLAST original, ya que dejan pequeños agujeros donde la homología de secuencia puede interrumpirse. De esta manera se pueden encontrar con más facilidad secuencias homólogas en zonas con pequeñas inserciones, deleciones o errores de secuencia. Gapped BLAST puede encontrarse en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Existen diferentes subprogramas que pueden utilizarse para buscar en diferentes bases de datos. Las bases de datos son las siguientes: i) non-redundant (nr), la cual recopila secuencias de DNA no redundantes que suelen ser cDNAs enteros (no ESTs), y secuencias de proteínas (a partir de bases de datos como el SwissProt, EMBL, Spupdate y secuencias de DNA traducidas que pertenecen al GeneBank); ii) genómico, que comprende todas las secuencias conocidas, más o menos ordenadas y localizadas, pertenecientes a una determinada especie y, iii) dbEST, descrita anteriormente. Los diferentes subprogramas BLAST son:

**BLASTn** compara una secuencia “problema” de DNA con las secuencias presentes en la base de datos de DNA.

**BLASTp** compara una secuencia “problema” de proteína con las secuencias presentes en la base de datos de proteína.

**BLASTx** traduce a proteína una secuencia “problema” de DNA según las seis pautas de lectura posibles y las compara con las secuencias presentes en la base de datos de proteína.

**tBLASTn** compara una secuencia peptídica “problema” con las secuencias peptídicas obtenidas de la traducción del DNA de la base de datos.

**tBLASTx** traduce tanto la secuencia de DNA “problema” como las secuencias de DNA de las bases de datos y compara todas las secuencias peptídicas resultantes.

**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.

### 1.3. Análisis de proteínas

**Hydrophobicity Search Server.** Es un servidor del Weizmann Institute of Science de Israel dirigido a la representación, comparación y búsqueda de perfiles de hidrofobicidad de proteínas. Asigna a cada aminoácido un valor numérico o índice de hidrofobicidad a medida que avanza por la cadena peptídica. Los valores asignados corresponden al método de Kyte-Doolittle (Kyte and Doolittle, 1982) o al de Hopp-Woods (Hopp and Woods, 1981). El resultado final es un gráfico con el perfil hidrofóbico de la proteína. Se encuentra en la dirección: <http://bioinformatics.weizmann.ac.il/hydroph/>.

**ExpASy (Expert Protein Analysis System) Proteomics Server.** Es un servidor del Instituto Suizo de Bioinformática (SIB) dedicado especialmente al análisis de secuencias de proteína

y estructuras. Fue creado en 1993 y ofrece acceso libre a un amplio espectro de bases de datos, programas y enlaces que permiten desde la identificación de proteínas hasta la predicción de su estructura y la creación de un modelo 3D. Se accede a través de la dirección: <http://us.expasy.org/>. A continuación se destacan los más relevantes para la realización de este trabajo:

**HMMTOP (Hidden Markov Model for Topology Prediction).** Es un programa desarrollado en The Institute of Enzymology, dentro de la Hungarian Academy of Biological Sciences Research Center en Budapest, para la predicción de hélices transmembrana 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 transmembrana, 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 transmembrana en 131 de ellas y, la topología, en 105. Se puede encontrar directamente en: <http://www.enzim.hu/hmmtop>.

**TMHMM.** Es un programa de predicción de hélices transmembrana del Center for Biological Sequence Analysis de Dinamarca (CBS). Aunque se basa en el mismo método que el HMMTOP (Moller et al., 2001), tiene varias ventajas: i) asocia un valor de probabilidad para la predicción de cada segmento, dando una idea de la fiabilidad de dicha predicción, ii) presenta el resultado también de forma gráfica y, iii) permite someter varias secuencias a la vez, como alineamientos de proteínas de una misma familia, aumentando la fiabilidad del resultado. Se puede encontrar en : <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>.

**TMpred.** Es un programa de predicción de segmentos transmembrana y de su orientación de la organización suiza independiente EMBnet. El resultado se presenta en forma de algoritmos, basándose en el análisis de la base de datos de proteínas de membrana TMbase (K.Hofmann and W.Stoffel, 1993). No es tan preciso como los anteriores pero da el perfil de hidrofobicidad de la proteína y es útil para tener una aproximación inicial del número de segmentos transmembrana que puede presentar y su orientación. Es parecido al Hydrophobicity Search Server. Se encuentra en [http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_for\\_m.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_for_m.html).

**Swiss-Prot Database.** Es una base de datos de proteínas desarrollada en el propio Instituto Suizo de Bioinformática (SIB) desde 1987. Ofrece información acerca de la función, dominios estructurales, modificaciones post-traduccionales, etc. de las proteínas que contiene. Se actualiza permanentemente y está integrada a una amplia red de bases de datos diferentes a la propia. Está disponible en: <http://us.expasy.org/spot/>.

**SWISS-MODEL.** Es un programa de modelaje molecular a partir de estructuras proteicas homólogas a la proteína de interés. Se inició en 1993 y está en evolución constante pero hay que tomar los resultados con mucha precaución ya que es un procedimiento no experimental. Se accede por: <http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>.

#### 1.4. Otras páginas web de interés

Radiation hybrid maps at the Stanford Human Genome Center (SHGC): útil para la localización cromosómica de secuencias. <http://www-shgc.stanford.edu/sitemap.html>

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>

HUGO Gene Nomenclature Committee: contiene la base de datos de los genes humanos descritos agrupados por familias. Muestra el nombre del gen, el símbolo aprobado, su localización y el número de acceso a la secuencia con el enlace correspondiente.

<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature>

Celera Genomics: página privada que, con suscripción, permite acceder a todas las secuencias disponibles de los proyectos de secuenciación de genomas.

<http://www.celera.com/>

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>

Universitat de Barcelona: tiene conexión electrónica a la mayoría de revistas de interés además de otros links y servicios.

<http://www.ub.es/>

## 2. Obtención y microinyección de oocitos de *Xenopus laevis*

Desde la demostración por el grupo de K. Sumikawa (Miledi et al., 1982) que los canales iónicos y los receptores podían expresarse funcionalmente en oocitos de *Xenopus*, este sistema ha pasado a ser 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) por la acumulación de proteínas de reserva, junto con el importante contenido de mRNAs y maquinaria celular de traducción (ribosomas, tRNAs, etc.) para su desarrollo embrionario, lo convierten en una útil y práctica herramienta para los estudios de expresión funcional de proteínas (Colman et al., 1984).

## 2.1 Adquisición de ranas *Xenopus laevis*

Esta especie de ranas es autóctona del sur de África. Actualmente en nuestro laboratorio se compran a la empresa sur-africana African Xenopus Facility (afxeno@mweb.co.za), aunque anteriormente se habían comprado a Nasco (Wisconsin, EUA) y a Hörst Kähler (Hamburgo, Alemania). En este trabajo aparecen resultados de oocitos de ranas de distinta procedencia. La ventaja de las ranas salvajes sur-africanas es que tienen oocitos de mejor calidad que las criadas en estabulario. Se trabaja con hembras, de 12 a 15 cm de longitud.

## 2.2. Condiciones de mantenimiento

El mantenimiento de las ranas durante la ejecución de este trabajo tuvo lugar en el estabulario de la Facultad de Biología (actualmente en las instalaciones del Parque Científico de Barcelona), siguiendo las recomendaciones del Dr. Bruno Hagenbush de la Universidad de Zurich. Se mantienen en una sala termostaticada a 19-21 °C, siguiendo ciclos continuos de 12 horas de luz y oscuridad. Se distribuyen en grupos de 10 a 12 animales en acuarios de 200 litros de capacidad, con una tapa para prevenir que salten y mueran de deshidratación. Para la identificación y seguimiento de cada animal, se implanta un chip interno en el tórax de la parte dorsal de cada rana con un número de identificación (Implantable Transponder ID 100; Trovan). Un lector

electrónico (Hand Held Reader LID500, Trovan) permite la lectura del número de cada chip.

Los pasos de instalación de los acuarios son los siguientes: i) forrar los acuarios con papel adhesivo azul hasta la mitad de su altura para evitar que los animales vean el movimiento de personas en la sala, ii) rellenar los acuarios con agua del grifo que previamente ha pasado un filtro de organoclorados, iii) instalar bombas filtrantes, con carbono activo y zeolita (2224 Professional Canister Filter, Eheim), iv) colocar un prefiltro cilíndrico poroso en el extremo anterior de cada bomba para evitar que se aspiren restos de comida o excrementos que podrían obturarla, v) instalar un compresor de aire en forma de piedra porosa en cada acuario para garantizar una correcta oxigenación, vi) previamente a la instalación de las ranas en los acuarios, inocular bacterias degradadoras de amonio (Tetra Bactozum, Tetra) en los filtros internos de las bombas y dejarlas en funcionamiento durante 2-3 días. Después de este tiempo, las bacterias han de ser capaces de degradar el amonio. En este momento, ya podemos introducir las ranas en los acuarios.

Para mantener a los animales en condiciones óptimas es necesario controlar la calidad del agua periódicamente (3 veces por semana) mediante distintos parámetros: i) pH: entre 6.5 y 7.5 (tiras de papel de pH, Merck), ii) amonio: inferior a 2.5 mg/l (Kit Ammonium-Test, Merck), iii) nitratos: inferior a 50 mg/l (Kit Nitrat-Test, Merck) y, iv) nitritos: inferior a 0.15 mg/l (Kit Nitrit-Test, Merck).

Si la calidad del agua no es la apropiada, se renueva parcialmente el agua del acuario o bien se cambia parcialmente el contenido de carbono activo y zeolita del interior de la bomba. Ésta se limpia una vez a la semana y el sistema de tubos, una vez al mes.

## 2.3. Alimentación

Los animales se alimentan dos veces por semana (lunes y jueves) con corazón de ternera cortado a pedazos y una vez al mes, con grillos

vivos. Aunque anteriormente las ranas habían sido alimentadas con pienso comercial, las *Xenopus* sur-africanas lo rechazan.

## 2.4. Extracción de los oocitos

Los oocitos se extraen de la rana un día antes de la inyección. La preparación de los oocitos se realiza según está descrito en (Goldin, 1992) con ligeras modificaciones.

### Materiales y Reactivos:

- Etil-ester del ácido 3aminobenzoico (A-5040, Sigma)
- Material de cirugía: tijeras, pinzas, seda trenzada.
- Placas de petri de 10 mm de diámetro (Sterilin)
- Colagenasa D de *Clostridium histolyticum* (1088866, Roche). Es preferible que tenga una actividad baja (<0.05 U/mg liofilizado) ya que actividades muy altas pueden lesionar los oocitos durante la digestión.
- Incubador HotCold-S (Selecta)
- Agua miliQ autoclavada para preparar todos los tampones.
- Tampón ORII 4x: 330mM NaCl, 8mM KCl, 4mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM HEPES ajustado a pH 7.5 con NaOH. Se autoclave y se mantiene a 4° C.
- Tampón OR 1x: dilución del tampón ORII 4x con agua Q estéril.
- Tampón BARTH: 88mM NaCl, 1mM KCl, 330μM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 410μM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 820μM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2.4mM NaHCO<sub>3</sub>, 10mM HEPES, pH 7.5. Para agilizar la preparación de este tampón pueden prepararse distintas soluciones estoc autoclavadas y guardadas a 4° C.
- BARTH suplementado: tampón BARTH con 50 mg/l de gentamicina (G-1397, Sigma) y 50 mg/l de tetraciclina (T-7660, Sigma; alicuotada a 50 g/l y guardada a -20° C), siguiendo las recomendaciones de (Elsner et al., 2000).

### Procedimiento:

Se anestesia a los animales por inmersión en una solución de 1 g/l de etil-ester del ácido 3-aminobenzoico en agua del grifo durante unos 20 minutos. A continuación se pone al animal tumbado dorsalmente sobre una superficie con hielo para que se mantenga el efecto del anestésico durante la operación (las ranas son animales poiquiloterms).

Los oocitos se extraen haciendo una incisión de 1 cm de largo en uno de los lados ventrales del abdomen. Primero se corta la piel y, debajo de ella, el músculo. Normalmente se extraen 3 ó 4 lóbulos del ovario y se dejan el resto para que se regenere y siga la producción de oocitos. La incisión se cierra haciendo 3-4 puntos de cirugía en el músculo y, a continuación, en la piel. Mientras la rana se despierta se mantiene húmeda pero no sumergida. Un mismo animal puede usarse para unas 8 extracciones, dejando el suficiente tiempo de recuperación para cada lado (unos 3 meses). Cuando los oocitos no son de suficiente calidad, la rana es sacrificada por sobredosis de anestésico (4 g/l).

Los lóbulos ováricos extraídos se ponen en una placa de petri con tampón ORII 1x y se cortan en fragmentos pequeños. Para separar las células foliculares de los oocitos se digieren con colagenasa. Para ello se prepara en un tubo Falcon de 15 ml una solución de 10 ml a 2 mg/ml de colagenasa D en tampón ORII 1x. Se introducen los oocitos con ayuda de unas pinzas hasta un volumen máximo de 3 ml, y se dejan en agitación orbital durante 45 minutos en un incubador a 18° C. Pasado este tiempo, se hacen tres lavados con ORII 1x y se inicia una segunda digestión con colagenasa fresca en las mismas condiciones que la anterior. Esta segunda digestión se controla a tiempos cortos, unos 10-15 minutos. Cuando la digestión es completa, se hacen 4 lavados con tampón ORII 1x y 4 más con tampón BARTH suplementado. Finalmente, los oocitos se ponen en una placa de petri con tampón BARTH suplementado y se mantienen en el incubador de 18° C.



## 2.5. Selección y mantenimiento de los oocitos

La ovogénesis en *Xenopus* es un proceso asincrónico, es decir, existen oocitos en todos los estadios de desarrollo a la vez. Por este motivo, es necesario seleccionar manualmente a la lupa binocular los oocitos maduros para ser inyectados. Éstos corresponden al estadio V-VI de desarrollo (Dumont, 1972), con un diámetro de 1.0-1.2 mm y los dos hemisferios claramente diferenciados.

Una vez hecha la selección (el mismo día de la extracción), los oocitos se mantienen en tampón BARTH suplementado dentro de viales de cristal (Liquid scintillation vials V-7130; Sigma) y en un incubador a 18° C en la oscuridad.

Cada día se observan los oocitos a la lupa binocular, se desechan los que no presentan un aspecto óptimo y se cambia la solución de BARTH por solución fresca.

## 2.6. Microinyección

En este trabajo, los oocitos se han inyectado con diferentes cRNAs, sintetizados por transcripción *in vitro* a partir del cDNA correspondiente (apartado 6.1).

Algunos vectores son diseñados para aumentar la expresión de proteínas exógenas en oocitos (Shih *et al.*, 1998). Estos vectores, aparte

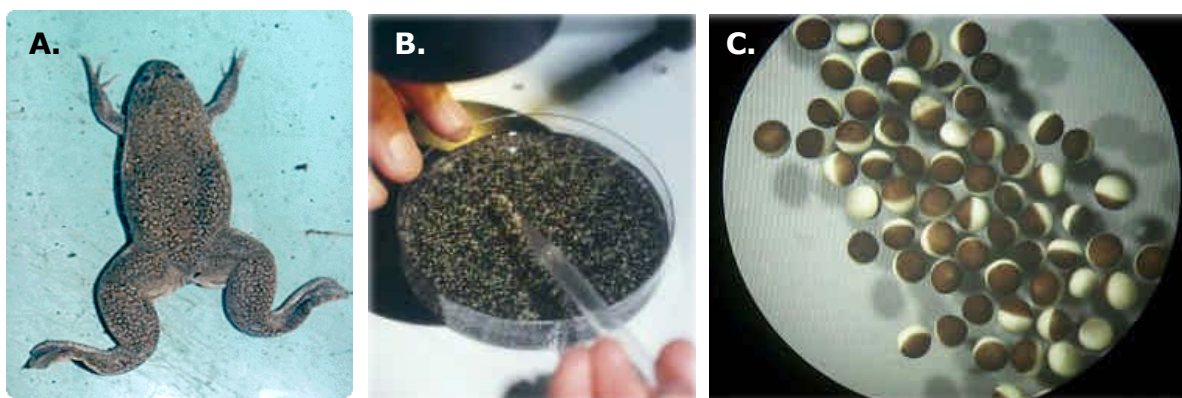
de presentar algún promotor de la RNA polimerasa esencial para la transcripción, añaden extremos 5' y 3' no traducidos de mensajeros muy estables en oocitos, como por ejemplo el de la  $\beta$ -globina. El vector pNKS2 utilizado en este trabajo incluye los extremos no traducidos del mRNA de la subunidad  $\beta_3$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa (Gloor *et al.*, 1995).

### Material:

- Incubador HotCold-S (Selecta)
- Lupa binocular (Nikon 546225)
- Inyector semi-automático (Inject+Matic, Gèneve)
- Aparato para hacer micropipetas (Inject+Matic Puller, Gèneve)
- Micromanipulador (Narishige MN-15)
- Capilares (Disponible micro-pipettes, Drummond)
- Fuente de luz (Intralux 5000, Volpi)

### Procedimiento:

La microinyección de los oocitos de *Xenopus* se realiza con un dispensador unido a un micromanipulador que permite el movimiento en tres dimensiones. El procedimiento es el siguiente: i) se construye una aguja o micropipeta mediante un aparato que estira capilares (ver material a continuación), ii) se calibra con agua con ayuda de una tira de papel metrado para que el volumen de inyección sea de 50 nl, iii) se centrifuga el cRNA que ha de inyectarse para precipitar cualquier impureza que pudiera obturar la aguja durante la



**Figura 41. Manipulación de los oocitos de *Xenopus laevis*.** A. Ejemplar hembra de *Xenopus laevis*, de las que se extraen los oocitos. B. Placa de petri con los oocitos extraídos y digeridos con colagenasa y mantenidos en medio BARTH. C. Visión a la lupa de los oocitos seleccionados y preparados para la inyección. Imágenes extraídas del buscador Google.

inyección, iv) se coloca un trozo de *parafilm* tensado sobre una placa de 35 mm y sobre él se pone el cRNA. Se aspira la gota, controlando el proceso con la lupa y evitando aspirar aire. v) se colocan los oocitos a inyectar (no más de 70) en una placa de 35 mm de diámetro con tampón BARTH. Para mantener los oocitos inmobilizados en la placa, previamente se engancha (con unas gotas de cloroformo) una rejilla de polipropileno; y finalmente, vi) se posiciona la aguja sobre el polo vegetal de cada oocito y se hace bajar lentamente hasta que lo atraviesa. Se inyectan los 50 nl de cRNA y se retira la aguja cuidadosamente para dirigirse al siguiente oocito.

### 3. Cultivos celulares

#### 3.1. Normas generales de manipulación

Cuando se manipulan células en cultivo se deben seguir unas normas muy estrictas de limpieza. Se trabaja siempre dentro de una campana de flujo laminar vertical que se limpia con etanol al 70% antes de empezar 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 0,22 µm de diámetro de poro o por otros métodos (autoclave, irradiación, etc.). Estas condiciones se mantienen cuando las botellas se abren y cierran sólo dentro de la campana. Además, estas soluciones se atemperan a 37° C antes de ser utilizadas. 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 CO<sub>2</sub>.

#### 3.2. Medios de cultivo

Los medios que se utilizan dependen de cada tipo celular. Estos medios se guardan a 4° C hasta la fecha de caducidad que indica la casa comercial y, una vez suplementados, se mantienen como máximo un mes a esta temperatura. La suplementación consiste en la adición de sustancias como L-glutamina, antibióticos o suero a partir de un stock que se mantiene a -20° C. Los antibióticos utilizados rutinariamente son la penicilina y la estreptomina: la primera es un agente bacteriostático que sólo elimina bacterias en crecimiento (inhibe la síntesis de peptidoglicanos de la pared bacteriana), y la segunda es un aminoglucósido que inhibe específicamente la síntesis proteica del ribosoma bacteriano 70S. La geneticina es un antibiótico análogo a la neomicina que actúa sobre las células eucariotas inhibiendo la síntesis proteica y se utiliza para seleccionar líneas celulares transfectadas de manera estable. El suero que se ha utilizado es *Fetal Bovine Serum* (FBS). Según la línea celular, el suero se somete a un tratamiento previo de inactivación (30 min. a 56° C) del sistema del complemento y de anticuerpos que pueden estar presentes. En algunos casos, si el medio sin suplementar no contiene HEPES, éste se añade para mantener el pH.

#### 3.3. Condiciones de cultivo de células HeLa

Durante la realización de esta tesis se ha trabajado con el tipo de línea celular llamado HeLa. Las células HeLa (ATCC CCL-2) proceden de adenocarcinoma de cérvix humano. Presentan un fenotipo epitelial y tienen incorporado secuencias del papilomavirus humano 18 (HPV-18). Estas células son ampliamente utilizadas para el estudio de diferentes proteínas expresadas de

manera transitoria. Proliferan muy rápido por lo que deben subcultivarse al menos dos veces por semana. El número de pases afecta a la transfección transitoria. A partir del pase 35-40 el porcentaje de células transfectadas decae considerablemente.

Las células HeLa se han mantenido en incubadores con 90% de humedad relativa, 5% de CO<sub>2</sub> y temperatura de 37 o 33°C, según indicado. Han crecido en el medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, 41966-029 GIBCO; con L-glutamina y D-glucosa y sin HEPES) suplementado con 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin (17-602A, BioWhittaker) y 10% (v/v) de FBS previamente inactivado (ver apartado 3.2).

### 3.3.1. Subcultivo

El subcultivo consiste en la separación de las células de la superficie donde están adheridas por acción de una proteasa y su redistribución posterior en placas para realizar experimentos o, simplemente, mantenerlas en crecimiento.

#### Material y reactivos:

- PBS (Sodium Phosphate Buffer) estéril
- Tripsina –EDTA (5% y 2%, respectivamente) (25300-062, GIBCO)
- Medio de cultivo suplementado

#### Procedimiento:

Normalmente se subcultivan células a partir de placas de 100 mm de diámetro que alcanzan el 100% de confluencia o incluso el 150%. Se elimina el medio que cubre las células y se hace 2 lavados con 10 ml de PBS. Se añade 1 ml de tripsina 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 9 ml de medio suplementado. Las células se resuspenden con una pipeta de 10 ml hasta conseguir una suspensión

que se plaquea diluida en función de la cantidad y del tiempo en el que necesitemos las células. Así, si una placa de 100 mm confluyente al 100% se tripsiniza y se siembra a un 10% de confluencia tardará 2-3 días en volver a un 100% de confluencia. En el caso de que se utilicen para una transfección transitoria, a partir de una placa confluyente al 100% se siembra a un 20% a primera hora de la mañana, de manera que si se transfecta por la tarde estará a un 30-40% de confluencia. No conviene hacer diluciones mayores ya que la homogeneidad de la población podría verse alterada.

### 3.3.2. Congelación y descongelación

Las células tripsinizadas se sedimentan a 1200 r.p.m. (200 g) durante 4 min. y se resuspenden en 10 ml de medio de cultivo DMEM (previamente en hielo) que contiene 20% de FBS y 10% de DMSO (D2650, Sigma) como agente crioprotector. La suspensión se distribuye en criotubos (tres por placa de 10 cm confluyente), enfriados previamente en hielo, que se colocan en un recipiente de isopropanol para congelar células y se congela a –80° C. Después de 24 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, en cambio, es un proceso que debe llevarse a cabo de manera muy rápida. El criotubo se saca del tanque de nitrógeno líquido y se descongela a 37° C. La suspensión de células se diluye en 10 ml de medio de cultivo que está a 37° C y se precipita a 200 g durante 3 min. a temperatura ambiente. Se elimina el sobrenadante, las células se resuspenden en 10 ml de medio de cultivo fresco y se siembran en una placa de 100 mm. Al día siguiente se cambia el medio para eliminar las células muertas no adheridas a la placa.

### 3.3.3. Detección de micoplasma

El micoplasma es un parásito intracelular que puede afectar a los cultivos celulares sin

indicios aparentes de contaminación. Por eso es aconsejable realizar un test de micoplasma periódicamente. En este trabajo se ha utilizado el EZ PCR Mycoplasma Test Kit (Biological Industries Co.) basado en la amplificación por PCR del genoma del parásito. Contiene oligonucleótidos degenerados capaces de amplificar un trozo de secuencia de las ocho especies más comunes del parásito. Para que el test sea fiable se utiliza 1 ml de medio de cultivo que haya estado en contacto con las células un mínimo de 48 horas.

### 3.4. 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; Wigler et al., 1979). 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, en este trabajo 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. Normalmente las eficiencias de transfección oscilan entre el 50-90%. Muestras con eficiencias inferiores al 40% son descartadas.

Un parámetro que puede ser importante en la formación del precipitado es la cantidad de DNA. En este trabajo se ha utilizado siempre la misma cantidad en función del número de células a transfectar: 20 µg de DNA en una placa de 100 mm; 40 µg de DNA en una placa de 150 mm, y 4 µg 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 de células HeLa se realizan sobre cultivos que se encuentran entre un 20% y un 40% de confluencia.

#### Material y reactivos:

- Solución de calcio: CaCl<sub>2</sub> 500 mM y BES 100 mM (Fluka). El pH se ajusta a 6.95, se filtra y se conserva a temperatura ambiente. Si se prepara más de 50 ml se hacen alícuotas que se mantienen a -20° C.
- Solución de fosfato: NaCl 50 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.75 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.75 mM y BES 50 mM. Se hacen alícuotas que oscilan entre sí 0.02 puntos de pH con NaOH. Se filtran y se guardan a temperatura ambiente.
- Agua inyectable de Braun (Aqua B. Braun, B. Braun Medical SA) o agua Q estéril.
- Preparaciones de DNA concentradas a 1mg/ml obtenidas a partir de un cultivo bacteriano de 500 ml por MaxiPrep (12163, Qiagen).
- PBS estéril.

#### Procedimiento:

Todo el proceso de transfección se lleva a cabo en una campana de flujo laminar ya que implica la manipulación de células en cultivo. Las células se siembran el día antes o el mismo día por la mañana teniendo en cuenta que deben alcanzar el 20-40 % de confluencia en el momento de la

transfección. El medio de cultivo se reemplaza por medio fresco antes de la transfección. La mezcla de DNAs<sup>1</sup> se prepara en un tubo estéril de 15 ml: 18 µg del DNA de interés, 2 µg de plásmido GFP y hasta 250 µl de agua. Si se trata de una 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 500 µl de la solución de fosfato gota a gota. 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 (p.ej. placas de 24 pocillos para experimentos de transporte y placas de 6 pocillos para experimentos de marcaje). Es conveniente que se reserve una alícuota de cada grupo (5-10%) para sembrar en un pocillo de una placa de 12 y se destine para saber el porcentaje de transfección en el citómetro de flujo. El método se basa en la distribución de las células según su fluorescencia. Las células transfectadas contienen el plásmido de GFP y, por tanto, emiten fluorescencia en comparación con el resto. Al cabo de 24-48 h de la transfección se puede realizar la monitorización de la transfección y el experimento.

Todos los porcentajes de transfección evaluados durante esta tesis se han realizado en la unidad de citometría de los Serveis Científico-

<sup>1</sup> Las cantidades de DNA y soluciones están indicadas para transfectar células crecidas en una placa de 100 mm de diámetro. Si se transfectan células en una placa de 150 mm las cantidades aumentan el doble mientras que si se transfectan en un pocillo de una placa de 6, las cantidades disminuyen a la quinta parte.

Tècnics de la Universitat de Barcelona. La eficiencia mínima necesaria para los experimentos de transporte está en el 50% y para los experimentos de marcaje, en el 75%. Generalmente, las transfecciones obtenidas oscilaban alrededor del 85%.

## 4. Ensayos de transporte

El análisis funcional de las proteínas de estudio de este trabajo se ha realizado mediante ensayos de transporte. Estos ensayos consisten en medir la cantidad de aminoácido marcado radiactivamente que entra o sale de las células después de la incubación de éstas con el medio de transporte. Los ensayos de transporte sobre células enteras es una manera de estudiar la actividad transportadora de proteínas que se encuentran en la membrana plasmática.

### 4.1. Ensayos de transporte en oocitos de *Xenopus laevis*

Los ensayos de transporte en oocitos se realizan a partir de las 48 horas de la inyección para garantizar un nivel suficiente de expresión de la proteína de estudio.

#### 4.1.1. Ensayos de entrada de sustratos

##### Material y Reactivos:

- Tampón de transporte Cho 2x (para ensayos en ausencia del ión sodio): 200 mM Cloruro de colina, 4 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 2 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 20 mM HEPES, 10 mM Tris Base, pH 7.4.
- Tampón de transporte Cho 1x: se prepara diluyendo el tampón Cho 2x con agua estéril.
- Tampón de transporte Na 2x (para ensayos en presencia del ión sodio): 200 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 2 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 20 mM HEPES, 10 mM Tris Base, pH 7.4.
- Tampón de transporte Na 1x: se prepara diluyendo el tampón Na 2x con agua estéril.

- Solución de Stop o parada: tampón de transporte (Cho ó Na 1x) en presencia de 10 mM de los aminoácidos que se transporten, a 4° C.
- Stocks de aminoácidos: generalmente disueltos en agua a 50 mM o bien a la máxima concentración posible. Se guardan a -20° C.
- Medio de transporte: tampón de transporte 1x en presencia de aminoácido radiactivo (10  $\mu$ Ci/ml) y aminoácido frío (sin marcar) hasta la concentración deseada. En experimentos de inhibición, se añade al medio de transporte una determinada concentración del inhibidor. Si el inhibidor es un aminoácido, éste se pone sin marcar (frío) y en exceso (generalmente 1000x).
- Solución de lisis: SDS 10%
- Líquido de centelleo (ICN).
- Contador beta (Beckman LS 6000TA).
- Tubos de transporte (5ml polypropilene tub 000-2053-001; Elkay)
- Pipetas Pasteur de plástico (Rubilabor)
- Viales de cristal (Liquid scintillation vials V-7130; SIGMA)

#### **Procedimiento:**

Cada grupo de transporte consta de 7 oocitos. Se ponen los 7 oocitos en un vial de cristal con tampón de transporte 1x (Cho o Na, según sea en presencia o en ausencia de sodio) y se mantienen en él durante unos 30 segundos. A continuación, se recogen con una pipeta pasteur de plástico y se pasan a un tubo de transporte. Se aspira el tampón sobrante cuidadosamente con una micropipeta (para no diluir el medio de transporte) y se añaden 100  $\mu$ l de medio de transporte radiactivo (10  $\mu$ Ci/ml). Se agita ligeramente el tubo (con el dedo índice) y se dejan los oocitos en incubación en este medio durante el tiempo deseado. Después de este tiempo, se aspira el medio radiactivo y se hacen tres lavados de 4 ml de solución de stop frío. El exceso de aminoácido no marcado de la solución de stop permite desplazar el aminoácido marcado que pudiera haberse unido a la superficie del oocito. Cada oocito por separado se pone en un vial de centelleo en presencia de 200  $\mu$ l de solución de lisis y se deja en agitación a temperatura ambiente hasta que el oocito está totalmente disuelto. Entonces se

añaden 3 ml de líquido de centelleo y se ponen a contar en un contador beta. Es necesario contar también (y por triplicado), 10  $\mu$ l del medio de transporte radiactivo sobrante para determinar su 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 en pmoles de aminoácido/unidad de tiempo y oocito.

#### **4.1.2. Ensayos de salida de sustratos**

Los ensayos de salida de sustratos requieren cargar el oocito con medio radiactivo. Este proceso puede realizarse por dos métodos diferentes: i) por preincubación de los oocitos en el medio de carga, o bien, ii) por microinyección del medio de carga en el oocito. A continuación se detalla el primero, que es el que se ha utilizado en este trabajo.

#### **Material y Reactivos:**

- Tampón de transporte Cho 1x ó Na 1x: se preparan diluyendo el tampón 2x respectivo con agua bidestilada estéril (ver composición en el apartado anterior).
- Stocks de aminoácidos: generalmente disueltos en agua a 50 mM o bien a la máxima concentración posible. Se guardan a -20° C.
- Medio de carga: tampón de transporte 1x en presencia de aminoácido radiactivo (30  $\mu$ Ci/ml) y aminoácido frío hasta la concentración deseada.
- Medio de salida: tampón de transporte 1x en ausencia o presencia de aminoácido frío (sin marcar) a una determinada concentración.
- Solución de lisis: SDS 10%
- Líquido de centelleo (ICN).
- Contador beta (Beckman LS 6000TA).
- Tubos de transporte (5ml polypropilene tub 000-2053-001; Elkay)
- Pipetas Pasteur de plástico (Rubilabor)

**Procedimiento:**

Cada grupo de transporte consta de 7 oocitos. Se ponen los 7 oocitos en un vial de cristal con tampón de transporte 1x (Cho o Na) durante unos 30 segundos. Se recogen con una pipeta pasteur de plástico y se pasan a un tubo de transporte. Se aspira el tampón sobrante. A continuación, se añaden al tubo 100  $\mu$ l de medio de carga (30  $\mu$ Ci/ml) y se incuban los oocitos en este medio durante una hora (tiempo necesario para cargar los oocitos). Transcurrido este tiempo, se aspira el medio radiactivo. 7 oocitos de cada grupo de inyección se usaran para el control de carga y, el resto, para el ensayo de salida.

Los oocitos usados para el ensayo de salida se lavan cuatro veces con 4 ml de tampón de transporte 1x a temperatura ambiente. De nuevo, se aspira el tampón sobrante y se añade el medio de salida. El volumen necesario de medio de salida va en función del número de alícuotas que se quieran sacar a distintos tiempos. Se sacan alícuotas de 200  $\mu$ l de medio, desde el tiempo cero (justo después de añadir el medio) en adelante. Cada una de las alícuotas se pone en un vial con 3 ml de líquido de centelleo y se cuenta en un contador beta.

Los oocitos de control de carga se lavan 3 veces con 4 ml de tampón de stop frío y se distribuyen en viales de centelleo en presencia de 200  $\mu$ l de solución de lisis. Se dejan en agitación a temperatura ambiente hasta que se disuelven completamente y se ponen a contar en un contador beta en presencia de 3 ml de líquido de centelleo. Esto nos permite determinar la radiactividad total cargada en el oocito.

A partir de los valores anteriores, se puede calcular la velocidad de salida del aminoácido radiactivo como porcentaje de radiactividad que sale a un tiempo determinado: radiactividad liberada al medio / radiactividad total en el oocito x 100.

**4.2. Ensayos de transporte en células HeLa**

En este trabajo se han utilizado células HeLa transfectadas transitoriamente y sembradas en placas de 24 pocillos. Cada pocillo corresponde a un punto de transporte. El valor de cada condición de transporte se determina por la media de los valores obtenidos en 4 - 6 pocillos  $\pm$  el error estándar. El experimento de transporte se realiza a partir de las 36 horas de la transfección si las células se han incubado a 37° C y, a partir de las 48 horas si se han incubado a 33° C. Las células transfectadas con los mutantes de xCT en el entorno sin cisteínas (cysless) se han incubado a 33° C. A esta temperatura se consigue incrementar la expresión en membrana de los mutantes (Pineda et al., 2004b).

**4.2.1. Ensayos de entrada de sustratos****Material y Reactivos:**

- Tampón de transporte MGA 1x: 137 mM N-metil-D-glucamina (MGA) (66930, FLUKA), reemplazado por 137 mM NaCl en los transportes dependientes de sodio; 5.4 mM KCl; 2.8 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 10 mM HEPES. El pH se lleva a 7.4 a temperatura ambiente con HCl si el tampón es MGA y con Tris Base si el tampón contiene NaCl. El tampón se puede preparar con anterioridad y mantenerlo a 4° C autoclavado. También puede prepararse una solución de MGA 2x y diluirla con agua Q cuando vaya a usarse.
- Solución de Stop: tampón de transporte MGA 1x a 4° C.
- Stock de aminoácidos 80 mM, excepto L-cistina 350  $\mu$ M (por su baja solubilidad). Se preparan en tampón de transporte MGA 1x y se congelan a -20° C.
- Medio de transporte: son soluciones radiactivas. Se preparan utilizando como base el tampón de transporte y a partir del stock, se añade la cantidad de aminoácido frío hasta la concentración deseada. Antes de iniciar el

transporte se añade el isótopo radiactivo, 0.5  $\mu$ Ci/ pocillo.

- Solución de lisis: SDS 0.1%, NaOH 100 mM.
- Líquido de centelleo EcoLite (ICN)
- Cabina termostatazada a 37° C.
- Baño de agua a 37° C.

#### **Procedimiento:**

Las células se mantienen en el incubador a 37° C o 33° C hasta el inicio del transporte. Se aspira el medio de cultivo y se hacen 2 lavados con 1 ml. de tampón de transporte a temperatura 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. Se añade 190  $\mu$ l de medio de transporte radiactivo (atemperado a 37° C) y se deja en contacto con las células durante el tiempo establecido de transporte. Transcurrido este tiempo, se aspira el medio radiactivo y se hacen 3 lavados con el tampón de transporte frío (solución de stop).

Para determinar la unión inespecífica del aminoácido marcado a la superficie de las células, se reservan dos pocillos de cada grupo de transfección y se lavan 3 veces con tampón de transporte frío, se añade 190  $\mu$ l de solución radiactiva fría, se aspira inmediatamente y se vuelve a lavar 3 veces con tampón de transporte frío (solución de stop).

Finalizado el transporte, se añade 250  $\mu$ l de solución de lisis a cada pocillo y se lisan las células con una micropipeta hasta que la solución quede totalmente fluida. Puede acelerarse este proceso dejando una breve incubación de las células a 37° C con el tampón de lisis. 100  $\mu$ l de este lisado se añaden a un vial que contiene 3 ml de líquido de centelleo y se cuenta la radiactividad en un contador beta. 20  $\mu$ l del lisado se utilizan para valorar la concentración de proteínas por el método BCA (apartado 7.3.2). Paralelamente, se añade 10  $\mu$ l de solución radiactiva a un vial de centelleo y se cuentan las c.p.m. totales para calcular la actividad específica del medio de transporte. El resultado del transporte se expresa en picomoles de aminoácido transportado por mg de proteína en un tiempo determinado.

#### **4.2.2. Ensayos de inhibición de entrada de sustratos o de inactivación**

Es una variante de los ensayos de entrada de sustratos. Los materiales y reactivos necesarios son los mismos, además del inhibidor/es en cuestión. En la realización de esta tesis la mayoría de los experimentos de inhibición se han hecho con reactivos del tipo MTS (MTSES, MTSEA, MTSET, Toronto Research Chemicals). Debido a su sensibilidad a ser hidrolizados a tiempos cortos, todas las soluciones se prepararon inmediatamente antes de su uso a partir de stocks congelados a -20 °C (1M en DMSO). La dilución a la concentración final deseada se realizó en tampón de transporte MGA1x (apartado anterior).

#### **Procedimiento:**

Igual que en los experimentos de entrada de sustratos, las células se mantienen en el incubador a 37° C o 33° C hasta el inicio del transporte. Se aspira el medio de cultivo y se hacen 2 lavados con 1 ml. de medio de transporte a temperatura a 37° C. Se añade 200  $\mu$ l del inhibidor (que está en hielo) a cada pocillo y se deja en incubación el tiempo correspondiente. Se aspira el inhibidor y se lavan las células 3 veces con tampón de transporte a temperatura a 37° C. A continuación se añade los 190  $\mu$ l de medio de transporte radiactivo y se procede igualmente que para los experimentos de entrada de sustratos, es decir, se aspira el medio pasado el tiempo establecido y se lava 3 veces con solución de stop (ver apartado anterior). Después del lisado, se cuenta la radiactividad y se corrige por la cantidad de proteína para expresar el resultado final.

#### **4.2.3. Ensayos de salida de sustratos**

##### **Material y Reactivos:**

- Tampón de transporte MGA 1x ó Na 1x, según si es en ausencia o presencia de sodio.
- Solución de Stop: tampón de transporte MGA 1x a 4° C.
- Stock de aminoácidos, generalmente a 80 mM y guardados a -20° C.



- Soluciones radiactivas. Se preparan utilizando como base el tampón de transporte y a partir del stock, se añade la cantidad de aminoácido frío hasta la concentración deseada. Para los ensayos de salida o eflujo se utiliza 1  $\mu\text{Ci}$ /pocillo de radiactividad.
- Medio de salida o eflujo: Tampón de transporte (NaCl o MGA) que contiene aminoácidos sin marcar capaces de transestimular la salida del aminoácido cargado dentro de la célula.
- Solución de lisis: SDS 0.1%, NaOH 100 mM.
- Líquido de centelleo EcoLite (ICN)
- Cabina termostaticada a 37° C.
- Baño de agua a 37° C.

#### **Procedimiento:**

Las células se mantienen en el incubador a 37° C o 33° C hasta el inicio del transporte. Se aspira el medio de cultivo y se hacen 3 lavados con 1 ml. de medio de transporte atemperado 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. Se añade 190  $\mu\text{l}$  de solución radiactiva (atemperada a 37° C) y se incuban durante el tiempo establecido de carga (p. ej. 20 minutos). Para determinar este punto es recomendable hacer pruebas de acumulación a distintos tiempos y escoger aquél que garantice una sensibilidad suficiente en el experimento sin comprometer la adherencia de las células a la placa.

Transcurrido el tiempo de carga, se aspira el medio y se hacen 3 lavados con el tampón de transporte a temperatura ambiente. Se aspira el último lavado y se añaden 500  $\mu\text{l}$  de medio de eflujo. Inmediatamente se sacan 50  $\mu\text{l}$  de este medio (considerado tiempo cero) y después se van sacando a diferentes tiempos establecidos. Se debe tener en cuenta que la cantidad de medio de eflujo que se añade inicialmente depende del número de tiempos a los que saquemos el medio. Transcurridos todos los tiempos, se lavan las células con el medio de transporte frío y se añaden 250  $\mu\text{l}$  de solución de lisis a cada pocillo. Se lisan las células y la radiactividad se cuenta en el contador de centelleo del mismo modo que para la entrada o influjo (apartado anterior). Los valores

de radiactividad en los 50  $\mu\text{l}$  del medio de eflujo se multiplican por el volumen total del medio que se encuentra en el pocillo y a este valor se le suman las c.p.m. contenidas en los 50  $\mu\text{l}$  sacados en los tiempos anteriores. La carga total de cada pocillo se calcula sumando la radiactividad del lisado celular y la radiactividad total del medio de eflujo (calculada en el último tiempo). El eflujo en cada tiempo se calcula como el porcentaje de radiactividad que sale en cada tiempo respecto a la carga total.

## **5. Técnicas de obtención, manipulación y detección de DNA**

El trabajo con DNA y bacterias requiere la utilización de material estéril para evitar contaminaciones con DNAsas, otras bacterias y DNAs ajenos. El material se esteriliza en un 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 Q de pore) y finalmente, se esterilizan en un autoclave o por filtración con filtros de 0.22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.

La manipulación del DNA ha sido esencial en la realización de esta tesis y las técnicas utilizadas son más o menos las comunes en todos los laboratorios de Biología Molecular.

### **5.1. Técnicas básicas generales**

A continuación se describen brevemente las técnicas básicas generales de manipulación del DNA. Toda esta metodología se puede encontrar ampliamente detallada en los manuales "Molecular Cloning. A Laboratory Manual" (Sambrook *et al.*, 1989) y "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel *et al.*, 1998).

### 5.1.1. Bacterias competentes

Para mantener y amplificar plásmidos, éstos se transforman en las cepas de *E. coli* DH5a y XLBlue desarrolladas por Stratagene. El protocolo de obtención de bacterias competentes que se ha utilizado en este trabajo es una adaptación del protocolo descrito por Cohen en 1972 en el que las bacterias se tratan con una solución de cloruro de calcio para alterar la pared bacteriana y facilitar la entrada de DNA exógeno (Cohen et al., 1972).

### 5.1.2. Transformación

Consiste en la incorporación de DNAs exógenos por parte de las bacterias. Estos DNAs circulares son plásmidos que pueden contener el DNA que nos interesa e incluyen en su secuencia un gen que garantiza la selección de las bacterias que incorporan el plásmido, generalmente un gen de resistencia a un antibiótico como la ampicilina o la kanamicina.

En este trabajo se han utilizado dos métodos de transformación: i) con una solución de  $\text{CaCl}_2$ , y ii) con un electroporador (*Cell Porator*, Gibco), cuyo protocolo se detalla en el manual de instrucciones del mismo. La elección de uno u otro método depende de la cantidad de plásmido a transformar y de la dificultad de la ligación. Cuando se dispone de poco DNA circular y/o la ligación incluye varios pasos de digestión y purificación, se suele elegir la electroporación porque su nivel de eficiencia es mayor (aunque es más costoso económicamente).

### 5.1.3. Recuperación del DNA plasmídico

Para purificar los plásmidos a partir de cultivos bacterianos se utilizan *kits* comerciales en función de la cantidad y de la calidad de DNA que se necesita: preparaciones a pequeña escala con fines analíticos (Miniprep Kit, 27106 Qiagen) y a gran escala para obtener del orden de 1-5 mg (Maxiprep Kit, 12163 Qiagen).

### 5.1.4. Análisis de DNA con enzimas de restricción

La digestión de DNA con enzimas de restricción se realiza siguiendo las instrucciones de las casas comerciales que los suministran. En general, se utiliza entre 1 y 5 unidades (U) de enzima por  $\mu\text{g}$  de DNA, en presencia del tampón comercial adecuado y a la temperatura indicada.

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. 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 (ver apartados siguientes).

### 5.1.5. Extracción de DNA con fenol-cloroformo y precipitación con etanol

Al volumen de digestión se añade agua destilada hasta llegar a un volumen final de 200-300  $\mu\text{l}$ . Se añade un volumen equivalente de fenol-cloroformo 1:1, se mezcla en un agitador vórtex durante 30 s 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 3 M, se mezcla y se añaden 2.5 volúmenes de etanol absoluto. La precipitación ocurre durante al menos 1 h. a  $-80^\circ\text{C}$  y se centrifuga a 14000 r.p.m. durante 30 min. a  $4^\circ\text{C}$ . El precipitado se lava dos veces con etanol al 70% previamente enfriado a  $-20^\circ\text{C}$  y se deja secar a temperatura ambiente. El DNA se resuspende en agua Q hasta el volumen deseado.

### 5.1.6. Electroforesis en geles de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa no desnaturizante 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 separar fragmentos más pequeños se recomienda un porcentaje superior o una electroforesis en un gel de acrilamida. En paralelo a las muestras, siempre se carga un patrón de marcadores de masa molecular (1 kb DNA; 15615-016 Gibco BRL).

### 5.1.7. Purificación de fragmentos de DNA a partir de un gel de agarosa

Los fragmentos de DNA separados en un gel de agarosa se pueden recuperar con el objetivo de ligarlos a otros fragmentos o utilizarlos como sondas, entre otras finalidades. Para su purificación se ha utilizado un *kit* comercial (*DNA and band gel purification kit*, 27-9602-9 Amersham,) siguiendo las instrucciones de la casa proveedora.

### 5.1.8. Otros enzimas utilizados

Cuando se hacen construcciones de fragmentos de DNA en plásmidos es necesario el uso de otras 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; la T4 DNA ligasa, que une fragmentos de DNA con extremos compatibles, y la subunidad Klenow de la DNA polimerasa, que transforma un extremo 3' protuberante de un fragmento de DNA en un extremo romo. Estas enzimas se utilizan como indica la casa comercial que los suministra.

## 5.2. 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 dos polimerasas diferentes en función de las características que ofrece cada una: i) la *Taq DNA*

*polimerase* (1430-000; Roche), altamente procesiva en dirección 5'-3', sin actividad exonucleasa 3'-5' y estable durante incubaciones prolongadas a elevadas temperaturas; y ii) la *Expand High Fidelity Taq polimerase* (1732650; Roche), que sí posee actividad exonucleasa 3'5' y que se utiliza para amplificar fragmentos de cDNA que deben mantener una elevada fidelidad 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.

En la mayor parte de las PCRs realizadas en esta tesis se ha utilizado la *Expand High Fidelity Taq polimerase*, siguiendo el programa que se detalla a continuación: 30 s de desnaturalización a 94° C, 30 s de anillamiento a 94° C y 3 min. de elongación a 68° C repetido durante 35 ciclos, y un paso de elongación final de 10 min. a 68° C seguido de una bajada de temperatura hasta 4° C.

## 5.3. Mutagénesis dirigida

Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en esta tesis. La eliminación de cisteínas endógenas para la construcción de xCT-Cysless (sin cisteínas) y su posterior introducción individualizada en las posiciones determinadas se realizó mediante mutagénesis dirigida. Existe un *kit* comercial (*QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit*, 200518 Stratagene) que permite la obtención rápida de los plásmidos mutantes a partir de DNA de doble cadena con una eficiencia de alrededor del 80%.

El método se basa en una amplificación del DNA por PCR con dos oligonucleótidos o *primers* complementarios a cada una de las

cadena de DNA parental y que contienen la mutación deseada. Se utiliza como polimerasa la Pfu Turbo, que replica ambas cadenas del plásmido con alta fidelidad sin desplazar el *primer* mutado. Después de la amplificación, un tratamiento con Dpn I (endonucleasa específica de DNA metilado) nos sirve para digerir la cadena parental y seleccionar las cadenas sintetizadas *in vitro*. A continuación se transforma el DNA en células *E.coli* XL1-Blue supercompetentes y se analizan por restricción y/o secuenciación los clones seleccionados.

Los mutantes generados durante esta tesis (excepto casos puntuales) han seguido el programa de PCR que se detalla a continuación, partiendo de 20 ng de DNA parental: 30 s de desnaturalización a 95° C, 1 min. de anillamiento a 55° C y 14 min. de elongación a 68° C, repetido por 16 ciclos; y una bajada final de temperatura hasta 15° C o 4° C.

En el apéndice I se encuentran detallados los oligonucleótidos de mutagenesis utilizados en la realización de esta tesis. En su diseño se tuvo en cuenta: i) situar la mutación en el centro del oligo, ii) cercano a los 30 pares de bases de longitud, y iii) asegurar un contenido de GC mínimo del 40%, procurando terminar en una o más G o C.

#### 5.4. Secuenciación

Es una reacción que se utiliza para conocer la secuencia de un fragmento de DNA después de una amplificación por PCR, una mutagénesis, una construcción, etc. En este trabajo se ha utilizado el *kit* comercial *ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction*. Esta reacción consiste en una PCR cuya amplificación es aritmética y en la que se incluyen dideoxinucleótidos fluorescentes. El programa de PCR utilizado se detalla a continuación: 30 s de desnaturalización a 96° C, 15 s de anillamiento a 37° C y 4 min. de elongación a 60° C, repetido durante 25 ciclos; y bajada final de temperatura hasta 15° C.

Finalizada la amplificación, se procede a la precipitación de la muestra con etanol y EDTA:

se añaden 10 µl de agua destilada, 63 µl de etanol 95% y 5 µl de EDTA 125mM, se agita con vórtex y se deja incubando durante 15 min. a RT. A continuación, se centrifuga 20 min. a 14000 rpm a 4° C, se aspira el sobrenadante y se lava el pellet dos veces con etanol 70%.

Las reacciones de secuencia de esta tesis han sido analizadas por los Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona. Con esta técnica se han confirmado todas las mutaciones introducidas por mutagénesis dirigida y la fidelidad del cDNA restante.

## 6. Técnicas de obtención y detección de RNA

El RNA es una molécula muy sensible a la acción de las RNAsas. Por tanto, para evitar su degradación durante su manipulación y almacenaje, es esencial que todo el material y las soluciones que entran en contacto con él sean *RNAsa-free* (libres de RNAsas). Algunas indicaciones son: uso constante de guantes, uso de material estéril, reservar reactivos para este propósito en los que no se introduzcan espátulas u otros y preparar las soluciones con agua Q previamente tratada con DEPC.

### 6.1. Transcripción *in vitro*

Este método consiste en la síntesis *in vitro* de cRNA a partir de cDNA plasmídico. Es necesario que el vector contenga un promotor para la RNA polimerasa del fago T7, T3 o SP6 y que el cDNA de interés presente una cola poli A y extremos 5' y 3' no traducidos (UTR) para asegurar la eficiencia de su traducción y la estabilidad de la molécula de cRNA.

El cDNA plasmídico se corta por digestión más allá del extremo 3' no codificante del cDNA de interés. Esta linearización asegura que los transcritos resultantes tengan un tamaño definido. Es preferible utilizar un enzima que deje

extremos 5' protuberantes o romos, ya que los extremos 3' protuberantes pueden actuar como cebadores para la síntesis de cRNA anti-sentido. El plásmido linearizado se purifica por extracción en fenol-cloroformo para que los elementos de la digestión no inhibían la transcripción. Se precipita con etanol y se resuspende en agua-DEPC.

Para la reacción de transcripción se ha utilizado el *kit mMessage mMachine* (Ambion, T7 RNA Polymerase 1334; T3 RNA Polymerase 1348; SP6 RNA Polymerase 1340), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Al finalizar el protocolo, se valora al espectrofotómetro la concentración del cRNA sintetizado y se carga una pequeña alícuota del mismo en un gel de agarosa-formaldehído (apartado 6.2.). Esto nos permite comprobar que el cRNA obtenido corresponde al tamaño esperado y no presenta degradación. Se guarda a -80° C, aunque frecuentes procesos de descongelación/congelación pueden provocar la degradación de la muestra.

El cRNA usado en la microinyección de los oocitos de *Xenopus* ha sido obtenido por esta técnica.

## 6.2. Electroforesis en gel de agarosa-formaldehído

Los geles de agarosa-formaldehído constituyen un sistema de electroforesis desnaturante que asegura la migración electroforética del RNA proporcionalmente a su tamaño. Con este tipo de geles se han visualizado los cRNAs sintetizados *in vitro*.

### Material y Reactivos:

- Tampón de electroforesis MOPS 10x: MOPS 400mM pH 7; acetato sódico 100mM y EDTA 10mM. Se guarda a temperatura ambiente y protegido de la luz.
- Gel de agarosa-formaldehído: agarosa 1% en tampón MOPS 1x y formaldehído 0.66M.
- Tampón de muestra 2x: se ha utilizado un tampón comercial (Ambion 1344).
- Bromuro de etidio a 400µg/ml en agua DEPC.

- Marcador de masas moleculares 0.24-9.5 Kb (Gibco 15620-016).

### Procedimiento:

El portageles, la pinta y la cubeta de electroforesis se lavan con etanol y se aclaran con agua DEPC. Se disuelve la agarosa en tampón MOPS 1x en el microondas. Se deja enfriar un poco (al menos 50° C) y, en la campana extractora, se añade el formaldehído hasta una concentración final de 0.66M (2.7ml de formaldehído 37% en 50 ml de agarosa). Se vierte la mezcla en el portageles con la pinta y se deja polimerizando en la campana. A continuación, se coloca en la cubeta cubierto de tampón MOPS 1x.

Para la preparación de las muestras, se pone en un tubo 1 µl de cRNA (proviniente de la síntesis *in vitro*), 1 µl de solución de bromuro de etidio, 3 µl de tampón de muestra y 5 µl de agua estéril. El marcador de masas moleculares también se prepara como una muestra más a partir de 1 µl del tubo comercial. A continuación se desnaturalizan durante 5 min. a 85° C y se cargan en el gel. La cubeta se conecta a 60V durante media hora aproximadamente y luego se visualiza la banda en la franja del UV.

## 7. Técnicas de obtención, manipulación y detección de proteínas

### 7.1. Obtención de proteínas de oocitos de *Xenopus laevis*

#### 7.1.2. Obtención de proteínas totales

##### Material y reactivos:

- Tampón de lisis: 120mM NaCl; 50mM Tris-HCl pH=8; 0.5% NP-40.
- Inhibidores de proteasas: aprotinina 10 U/ml; PMSF 0.1M; leupeptina 2mM; pepstatina 2mM.

- Homogenizador de teflón tamaño eppendorfs.

**Procedimiento:**

Después de 48 horas de la inyección, los oocitos se distribuyen en eppendorfs por grupos de 30-50 y se aspira cuidadosamente el medio con una pipeta. A continuación, se añade 20  $\mu$ l de tampón de lisis/oocito suplementado con los inhibidores de proteasas (aprotinina 1U/ml, PMSF 1 mM, pepstatina 5mg/ml y leupeptina 5mg/ml). Con ayuda del homogeneizador de teflón, efectuando suaves movimientos ascendentes y descendentes, se rompen los oocitos. Todo el proceso debe realizarse en hielo para mantener la integridad de las proteínas. El homogenado se centrifuga dos veces a 12000 rpm durante 10 min. a 4° C para eliminar el vitelo, recuperando el sobrenadante cada vez. El sobrenadante final se congela a -80° C. Para valorar la concentración resultante de proteína se utiliza el método de BCA (apartado 7.3.2). Si se quiere concentrar la muestra, pueden precipitarse las proteínas con TCA (ácido tricloroacético) (Sambrook *et al.*, 1989).

**7.1.2. Obtención de proteínas de membranas totales**

Este protocolo permite enriquecer la muestra con proteínas de membrana. Esto nos puede interesar si la proteína con la que estamos trabajando se expresa en la membrana del oocito, como es el caso de los transportadores.

**Material y reactivos:**

- Tampón de homogeneización: 250mM sacarosa; 2mM EDTA; 25mM Hepes, pH=7.4.
- Inhibidores de proteasas: aprotinina 10 U/ml; PMSF 0.1M; leupeptina 2mM; pepstatina 2mM.
- Homogenizador de teflón tamaño eppendorfs.
- Eppendorfs para ultracentrifuga (Beckam).

**Procedimiento:**

Igual que en el método anterior, después de 48 horas de la inyección, los oocitos se distribuyen en eppendorfs por grupos de 30-50 y se

aspira cuidadosamente el medio con una pipeta. Es muy importante que todo el proceso se realice en hielo para mantener la integridad de las proteínas. Se añade 5  $\mu$ l de tampón de homogeneización/oocito suplementado con los inhibidores de proteasas (aprotinina 1U/ml, PMSF 1 mM, pepstatina 5mg/ml y leupeptina 5mg/ml) y con ayuda del homogenizador de teflón se efectúan 20 movimientos suaves de ascenso y descenso para homogenizar la muestra. Se centrifuga 2 veces el contenido a 5000 rpm durante 5 min. a 4° C, recuperando el sobrenadante cada vez. A continuación, se vuelve a centrifugar a 15000 rpm durante 2 min. a 4° C y el sobrenadante resultante, se centrifuga en una ultra-centrífuga (equilibrando los eppendorfs) a 60000 rpm durante 2 horas a 4° C. En el pellet obtenido se encuentran las proteínas de membrana, que se resuspenden con 1  $\mu$ l de tampón de homogeneización por oocito. Para la valoración de las proteínas se utiliza el método de Bradford (apartado 7.3.1).

**7.2. Obtención de proteínas totales de células en cultivo**

Este método se ha utilizado para la obtención de muestras de proteína a partir de células HeLa transfectadas para analizarlas posteriormente por Western Blot. Para ello, se ha elegido un tampón de solubilización general (Immunomix). Para otras aplicaciones, como purificación de histidinas en *Ni-NTA beads*, el tampón de homogeneización o lisis presenta variaciones (apartado 7.7.).

**Material y Reactivos:**

- Células en cultivo (en pocillos de placa de 6 o en placa de 10 cm)
- NEM (*N-ethylmaleimide* E-1271, Sigma)
- Tampón Immunomix estoc: 0.2% TritónX-100; 0.2% SDS; deoxicolato sódico; 0.1% BSA (Albúmina Sérica Bovina) en PBS.

- Inhibidores de proteasas: aprotinina 10 U/ml; PMSF 0.1M; leupeptina 2mM; pepstatina 2mM.
- PBS

#### Procedimiento:

Se prepara el tampón de homogeneización o Immunomix diluyendo el estoc con PBS en una proporción de 3:7 y se añaden los inhibidores de proteasas, haciendo una dilución 1/100 de los estocs de aprotinina y PMSF y una dilución 1/1000 de los de pepstatina y leupeptina. Se colocan las células sobre hielo y se lavan dos veces con PBS. Si se quiere preservar el puente disulfuro entre las subunidades pesada y ligera del transportador (p.ej. 4F2hc/xCT) es recomendable hacer una preincubación con NEM 20mM en PBS frío durante 5 min. (Wang et al., 1994). Se aspira la solución de NEM y se añade 100 µl de Immunomix diluida a cada pocillo de 6 o 300 µl si se trata de una placa de 10. Se rascan las células con ayuda de un *scraper*, se recoge el contenido con una micropipeta y se pone en un eppendorf en agitación orbital durante 30 min. a temperatura ambiente para que se produzca una lisis homogénea. Para precipitar los restos celulares sin lisar, se centrifuga la muestra a 4° C durante 10 min. a 12000 rpm. El sobrenadante contiene las proteínas totales solubilizadas, que se guardan a -20° C.

### 7.3. Determinación de la concentración de proteínas

Existen distintos métodos para la valoración de la concentración de proteínas. En esta tesis se ha utilizado dos de ellos: el método de Bradford y el método de BCA. La elección de uno u otro depende de la presencia de detergentes en la muestra, en cuyo caso se recomienda el uso del método de BCA para evitar interferencias en la lectura de la absorbancia.

#### 7.3.1. Método de Bradford (1976)

El método se basa en el cambio del pico de absorbancia en una solución ácida de Coomassie Brilliant Blue G250 cuando se une a proteínas. El cambio del máximo de absorbancia es de 465 a 595 nm. No se aconseja para muestras que contengan concentraciones significativas de detergentes ya que pueden interferir en la lectura de la absorbancia.

#### Material y reactivos:

- Solución comercial “BioRad Protein Assay” (Coomassie Brilliant Blue, ácido fosfórico y metanol) diluida 1/5 con agua Q (BioRad, 500,0006)
- Solución de gama-globulinas bovinas (1mg/ml) en tampón fosfato (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM) pH 7.4. Se conserva a -20° C.
- Cubetas de plástico para espectrofotómetro de 1.5 ml de capacidad (aunque también puede hacerse en placas de 96 pocillos para un lector de ELISA).

#### Procedimiento:

Se prepara la cantidad necesaria de reactivo Bradford diluido teniendo en cuenta que se añade 1 ml por cubeta y que todas las muestras se hacen por duplicado (incluyendo la curva patrón). La curva patrón comprende de 0 a 20 µg de gama-globulinas. En las cubetas se depositan de 2 a 10 µl de las muestras. Se agitan las cubetas por inversión evitando siempre la formación de espuma y se mide la absorbancia a 595 nm. Cuando las proteínas están demasiado concentradas es necesario hacer diluciones en agua miliQ.

#### 7.3.2. Método de BCA (1951)

En el caso que la muestra contenga detergentes se utiliza el método de BCA, de la casa comercial Pierce (*Pierce BCA Protein Assay Reagent 23225*). Se basa en la reacción de Biuret. Las proteínas reaccionan con el cobre en la forma Cu<sup>2+</sup>, formando Cu<sup>1+</sup> en medio alcalino que reacciona con el reactivo BCA y forma un

compuesto de color púrpura. La lectura de la absorbancia se hace a 562 nm y se utiliza una solución de albúmina 2mg/ml para hacer la curva-patrón.

#### Material y reactivos:

- Pierce BCA Protein Assay Reagent (23225, Pierce)
- Albúmina 2 mg/ml (Pierce, 23225)
- Placas de plástico de 96 pocillos
- Lector de ELISA (*Biowhittaker Microplate Reader 2001*)

#### Procedimiento:

El reactivo que contiene el  $\text{Cu}^{2+}$  se diluye 1:50 con la solución de dilución y se añade 200  $\mu\text{l}$  de esta solución por cada 10 o 20  $\mu\text{l}$  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 10  $\mu\text{g}$  de proteína. Como indican las instrucciones del *kit*, se incuba durante 30 min. a 37° C y se procede a la lectura de la absorbancia.

### 7.4. Tratamiento con Enzimas

#### 7.4.1. N-Glicosidasa F (PNGasa F)

PNGasa F es una amidasa que hidroliza casi todo tipo de glúcidos unidos a péptidos o proteínas. El sitio de corte se encuentra entre el residuo de asparagina y el primer residuo de N-acetilglucosamina de la cadena de carbohidratos. La digestión con este enzima se realiza siguiendo las instrucciones de la casa comercial que lo suministra (704S, New England BioLabs): i) paso inicial de desnaturalización, ii) reacción de digestión a 37°C con el tampón indicado y, iii) parada de la reacción y almacenaje a -20°C hasta que se carguen en un gel de SDS-poliacrilamida.

#### 7.4.2. Endoglicosidasa H (Endo H)

En las células de mamífero, las glicoproteínas que aún no han salido del retículo endoplásmico hacia el Golgi son, en general,

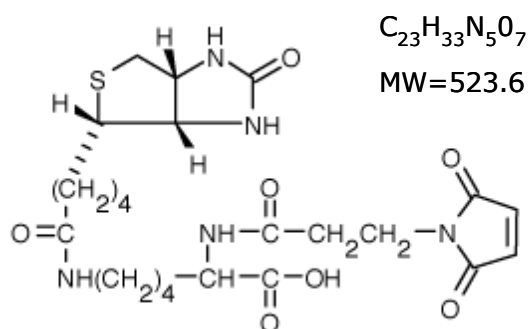
sensibles a Endo H. Una vez alcanzado el Golgi, sufren un proceso de maduración de la glicosilación por el que se vuelven insensibles a este enzima. El tratamiento con este enzima permite determinar si se ha producido el tráfico de una proteína desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi, donde la N-glicosilación ha sido modificada. La reacción de este enzima se realiza siguiendo las instrucciones de la casa comercial que lo suministra (702S, New England BioLabs), siguiendo un protocolo similar al de PNGasa F.

### 7.5. Ensayos de marcaje con 3-N-(maleimidilpropionil)biotina

Con la estrategia del *cysteine scanning mutagenesis* (SCAM, Akabas et al., 1994) se puede determinar la orientación (intra o extracelular) de un residuo concreto de una proteína inserida en la membrana plasmática. El método se basa en el uso de reactivos que únicamente reaccionan con el grupo sulfidrilo de la cisteína, combinando reactivos impermeables con reactivos unidos a biotina que luego son detectables en un gel (Seal et al., 1998). Para ello es necesario construir una versión de la proteína que no contenga cisteínas endógenas (*cysless*) y sustituir el residuo a analizar por una cisteína. Es importante que las mutaciones no comprometan la función de la proteína para poder asumir que su plegamiento en la membrana no está alterado. Aunque el proceso de selección de los residuos a estudiar es relativamente empírico, hay dos factores que pueden tenerse en cuenta: i) que presumiblemente se encuentre en un entorno acuoso, como sería esperable en residuos de *loops* extracelulares o citoplasmáticos, ii) que pueda tolerar el cambio a cisteína, bien porque es un residuo poco conservado en la familia o bien porque el aminoácido correspondiente se parece a la cisteína (alanina, serina).

En la determinación de la topología del transportador xCT, presentada en este trabajo, se ha utilizado esta técnica.





**Figura 42. Estructura molecular de 3-N-(maleimidilpropionil)biotina.**

Estructura del reactivo impermeable unido a un grupo de biotina utilizado en los marcajes para la localización intra o extracelular de los mutantes de cisteína.

#### Material y reactivos:

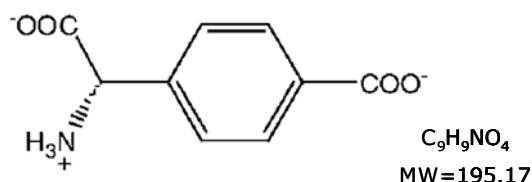
- Células en cultivo en pocillos de placa de 6.
- PBSCM: PBS suplementado con 1mM  $CaCl_2$  y 1mM  $CaCl_2$
- Solución de BM: 500 $\mu$ M 3-N-(maleimidilpropionil)biotina (M-1602, Molecular Probes) en PBSCM (alícuotas congeladas a  $-20^\circ C$ ).
- Estocs 1M en DMSO congelados a  $-20^\circ C$  de los reactivos tipo MTS: ([2-(trimethylammonium) ethyl]methanethiosulfonatebromide (MTSET); (Sodium(2-sulfonatoethyl)methanethiosulfonate (MTSES); (2-aminoethyl methanethiosulfonate (MTSEA); T795900; S672000; A6091000, respectivamente, Toronto Research Chemicals).
- Estoc 5mM en agua miliQ de S-4-CPG congelado a  $-20^\circ C$  (S-4-carboxifenilglicina; 0323 Tocris).
- Estocs de aminoácidos L-glutamato y L-arginina 80mM en MGA1x (tampón de transporte, apartado 4.2.) y congelados a  $-20^\circ C$ .
- Solución 1mM MTSET en PBSCM.
- Solución 10mM MTSES en PBSCM.
- Solución 2.5 mM MTSEA en PBSCM.
- Solución 1mM S-4-CPG diluido en solución de BM.
- Solución de L-glutamato y L-arginina 10mM diluidos en solución de BM.

- Solución de L-cistina 350 $\mu$ M con BM 500 $\mu$ M en PBSCM (se guarda congelada a  $-20^\circ C$ ).
- Solución de 2%  $\beta$ -mercaptoetanol en PBSCM.
- Solución de lisis: 300mM NaCl; 25mM imidazol; 1% TritónX-100; cóctel de inhibidores de proteasas (aprotinina 1U/ml, PMSF 1 mM, pepstatina 5mg/ml y leupeptina 5mg/ml); tampón fosfato 50mM, pH 7.4.
- Scraper (Cell lifter, Kultek).

#### Procedimiento:

Todos los experimentos se han llevado a cabo en células HeLa transfectadas con el plásmido de histidinas correspondiente al mutante/es a analizar, incubadas a  $33^\circ C$  y plaqueadas en pocillos de placa de 6. Después de 48 horas de transfección, se procede al ensayo de marcaje. Se lavan las células dos veces con 2 ml de PBSCM frío y se añade 1 ml de solución de [2-(trimetilamonio)etil]metanotiosulfonato (MTSET), sodio-(2-sulfonatoetil) metanotiosulfonato (MTSES) o (2-aminoetil)metanotiosulfonato (MTSEA) según corresponda. Estas soluciones se preparan justo antes de ser utilizadas y se mantienen en hielo debido a la rápida hidrólisis de los reactivos de tipo MTS. En los pocillos que no han de ser tratados, se añade 1 ml de PBSCM frío. Se dejan incubando a temperatura ambiente durante 10 min. Se aspira la solución y se lavan tres veces con PBSCM. A continuación, se procede a la biotilación o marcaje: se añade 900  $\mu$ l de solución de BM a cada pocillo y se deja en incubación durante 30 min. a temperatura ambiente.

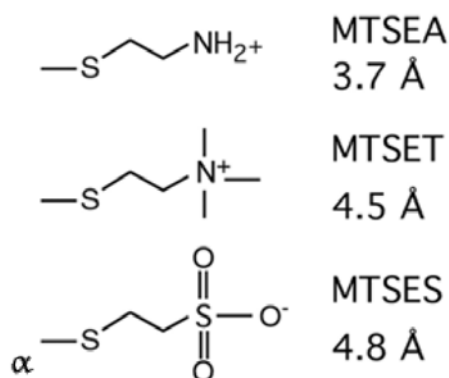
Cuando se desea hacer un ensayo de protección del marcaje, ya sea por los sustratos del



**Figura 43. Estructura molecular de 4-S-carboxifenilglicina.** Esta molécula ha sido descrita como un inhibidor no transportable del sistema  $x_c^-$  (Patel et al. 2004).

transportador o por algún otro reactivo (p.ej. inhibidores del mismo), se realiza en paralelo al paso de biotilación. En los pocillos destinados al ensayo de protección, se añade 900  $\mu\text{l}$  de la solución de L-glutamato, L-arginina, L-cistina o 4-S-CPG, según corresponda. Igualmente, se deja en incubación durante 30 min. a temperatura ambiente.

Finalizado este tiempo, se pone las células encima de una placa metálica sobre hielo para continuar el proceso en frío. Se aspira el medio y se lavan las células, primero con 3 ml de solución de  $\beta$ -mercaptoetanol para neutralizar el exceso de BM que ha quedado (*quenching*) y, luego, dos veces con 2 ml de PBSCM frío. A continuación, se procede a la lisis celular para obtener el extracto de proteínas que posteriormente se purificarán por histidinas en *Ni-NTA beads*. Por este motivo, el tampón de lisis utilizado no corresponde al descrito en el apartado de obtención de proteínas totales a partir de células en cultivo (apartado 7.1.2.). Para la lisis celular, se añade 100  $\mu\text{l}$  de solución de lisis a cada pocillo (con los inhibidores de proteasas añadidos al momento), con ayuda de un *scraper* se rascan las células y con una pipeta se transfieren a un tubo de 1.5 ml. clavado en hielo. Se dejan en agitación orbital a temperatura ambiente durante



**Figura 44. Estructura molecular de los reactivos MTS.**

El bloqueo del marcaje con BM de los residuos de cisteína con acceso extracelular se realiza mediante pre-incubación con reactivos de tipo MTS. El MTSET y MTSES son de naturaleza impermeable mientras que el MTSEA puede atravesar la membrana celular.

30 min. y se centrifugan a 12000 rpm durante 10 min. a 4° C. En el sobrenadante se encuentran las

proteínas extraídas para su purificación (apartado 7.6.). Si no van a utilizarse inmediatamente, se pueden guardar a -20° C.

## 7.6. Tratamiento con Streptolisina-O

La Streptolisina O (SLO) es una toxina que se libera al medio extracelular durante el crecimiento de algunas cepas de bacterias del grupo *Streptococcus* y se utiliza para la permeabilización de células o la hemólisis. Requiere un paso inicial de activación en presencia de agentes reductores (DTT o cisteína) previo a su incubación con las células; un segundo paso de unión al colesterol de la membrana; y un tercer paso de permeabilización en el que la SLO produce poros en la membrana de las células.

Aprovechando la propiedad de permeabilización, en este trabajo se ha utilizado para permitir la entrada en la célula del reactivo 3-N-(maleimidilpropionil)biocitina para el marcaje de residuos de cisteína de localización intracelular. Se ha adquirido de la casa comercial Sigma (*Streptolysin O*; S0149).

### Material y reactivos:

- Células en cultivo en pocillos de placa de 6.
- PBSCM (apartado anterior)
- Estoc de SLO resuspendida en agua Q (según las instrucciones de la casa comercial) en alícuotas de 20  $\mu\text{l}$  congeladas a -20°C.
- NEM (N-etilmaleimida)
- Estoc de tampón fosfato 10 mM, pH 7.4, autoclavado y guardado a 4°C.
- Tampón de SLO: tampón fosfato 10 mM suplementado con DTT 2mM, pH 7.4.
- Solución de SLO: dilución 1/100 del estoc de SLO en tampón de SLO.
- Cámara termostatizada a 37° C

### Procedimiento:

Se utilizan células HeLa transfectadas 48 h con el plásmido de histidinas correspondiente, incubadas a 33° C y plaqueadas en pocillos de placa de 6. Se empieza con el control negativo, que

son células preincubadas con NEM 1.5mM en PBSCM. Se lavan los pocillos del control dos veces con 2 ml de PBSCM, se añade 1 ml de solución de NEM (preparada justo antes de ser utilizada) y se deja 10 min. de incubación a temperatura ambiente. Se aspira la solución y se lava con 3 ml de PBSCM. A continuación, el resto de pocillos incluidos los controles negativos, se lavan 2 veces con 2 ml de tampón de SLO frío y se añade 1 ml de solución de SLO (previamente incubada durante 10 min. en hielo para activarla). Se ponen las células encima de una placa metálica sobre hielo y se dejan en incubación durante 15 min. Se aspira el exceso de SLO que no se ha adherido a las células y se hace un lavado con 2 ml de tampón de SLO frío. A continuación, se añade 2 ml/pocillo de tampón de SLO previamente atemperado a 37° C y se trasladan las células a una cabina termostatzada a esta temperatura. Se dejan en incubación durante 30 min., en los cuales la SLO actúa permeabilizando las membranas. Se lavan las células con 2 ml de tampón de SLO y dos veces con 3 ml de PBSCM. El siguiente paso consiste en la biotilación o marcaje, enlazando con el protocolo descrito en el apartado anterior.

### 7.7. Purificación de una His-proteína con agarosa de Ni-NTA

Se ha utilizado el *Ni-NTA Spin Kit* (Qiagen) para purificar proteínas con un *tag* de 6 residuos de histidinas situado en la región N-terminal de la proteína. El *kit* contiene una resina de agarosa de ácido níquel-nitrilotriacético con iones níquel inmovilizados en su superficie capaces de interaccionar fuertemente con estos residuos de histidinas. Este método permite la purificación de proteínas expresadas en diferentes sistemas celulares en condiciones tanto nativas como desnaturizantes. Las condiciones de purificación establecidas en este trabajo están basadas en las sugeridas por el libro de instrucciones de la casa comercial (Qiagen).

#### Material y reactivos:

- Ni-NTA Spin Kit (Agarose (50); 30230 Qiagen).
- Extractos de proteínas totales obtenidos de los ensayos de marcaje.
- Tampón de lisis (apartado 7.4.)
- Tampón de lavado: 500mM NaCl, 50mM imidazol, en PBS, pH 7.5 (con HCl).
- Tampón de elución: 500mM NaCl, 250mM imidazole, en PBS, pH 7.5 (con HCl).

#### Procedimiento:

Antes de la purificación, la resina se equilibra con el tampón de lisis utilizado para la obtención del extracto de proteínas. Para ello se pone por cada muestra un tubo eppendorf con 20 µl de resina y 150 µl de tampón en agitación orbital a 4° C. Una vez terminado el equilibrado (con un pulso se precipita la resina y se aspira el tampón), se añaden los 100 µl de extracto de proteínas. Estas proteínas son las obtenidas después del ensayo de marcaje, realizado el mismo día o en otro y congeladas a -20° C. La resina y las proteínas se dejan en agitación orbital a 4° C durante 1 h 30 min. Transcurrido este tiempo, la resina se precipita con un pulso, se aspira el sobrenadante (que contiene las proteínas que no se han unido a la resina) y se hacen dos lavados de 750 µl de tampón de lavado frío de 2 min. Las proteínas se eluyen con 45 µl de tampón de elución durante 15 min. a temperatura ambiente (25° C) en un termomixer. Este eluido, del que se recuperan 40 µl, después de añadirle 100mM DTT y tampón de carga (preparación de las muestras, apartado 7.7.) será posteriormente cargado en un gel de SDS-PAGE para visualizar la biotilación de los residuos de xCT.

### 7.8. Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis de proteínas en un gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) es uno de los sistemas más comúnmente utilizados para separar proteínas en función de su masa molecular

(Laemmli, 1970). Previo a la electroforesis, se añade a la muestra de proteínas tampón de carga que contiene una cantidad de SDS suficiente para desnaturalizarlas y conferirles carga negativa. De esta manera, se mantiene constante su relación carga/masa. Cuando estas muestras se someten a un campo eléctrico establecido sobre un gel que contiene una malla del polímero acrilamida-bisacrilamida, las proteínas se resuelven en función de su tamaño. En este tipo de electroforesis se preparan dos geles de diferente pH y concentración de acrilamida: 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 faa 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  $\mu$ l) y manipular fácilmente los geles. Una vez hecha la electroforesis, las proteínas pueden visualizarse directamente mediante una tinción con Coomassie Blue o Nitrato de plata. Si se quiere detectar una proteína concreta se hace un análisis Western-blot. Para detectar proteínas biotiniladas se utiliza la estreptavidina-peroxidasa.

#### 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  $-20^{\circ}$  C y cuando se descongela se mantiene en hielo.
- MiniProtean (BioRad)
- Jeringas Hamilton de 25, 50 y 100  $\mu$ 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  $\mu$ l en un peine de 10 pocillos de 1.5 mm. de grosor y 40  $\mu$ 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 puede teñir para visualizar las proteínas (apartado 7.9.) o transferirse a una membrana de PVDF para detectar proteínas biotiniladas (apartado 7.12.) o para un análisis de Western blot (apartado 7.11).

## 7.9. Métodos de tinción de geles

La detección de proteínas en geles de poliacrilamida es esencial para la purificación y el análisis de proteínas. Todos los protocolos implican la fijación de la proteína al gel. En esta tesis se han utilizado 2 métodos de tinción para monitorizar los pasos de purificación de xCT por histidinas: i) con Coomassie brilliant blue, que es un método barato, sencillo y capaz de detectar 0.1 µg de proteína, y ii) con plata, que es un método más sensible que el anterior capaz de detectar 1-10 ng de proteína.

### 7.9.1. Tinción Coomassie Brilliant Blue

#### Material y reactivos:

- Solución de tinción: ácido acético 7.5%, isopropanol 25%, Coomassie Brilliant Blue 0.05.
- Solución desteñidora: ácido acético 7.5%, isopropanol 7.5%.

#### Procedimiento:

Se sumerge el gel en una cubeta con solución de tinción y se deja aproximadamente dos horas a temperatura ambiente en agitación suave. Se hacen varios lavados de 15 min. a 37° C con la solución desteñidora hasta que se observan las proteínas fijadas teñidas en el gel. También se puede dejar destiñendo toda la noche a temperatura ambiente. De manera optativa, se puede secar el gel en un secador durante 2 h. a 80° C para conservarlo.

### 7.9.2. Tinción de plata

Existe un *kit* comercial de la casa Pierce (*GelCode SilverSNAP Stain Kit*, 24602) para la tinción con plata de proteínas. Incluye cinco pasos: fijación del gel, lavado, tinción, revelado y parada. Los volúmenes necesarios para teñir un gel del sistema Miniprotean son la mitad de los indicados en el manual de instrucciones. Todos los recipientes que se utilizan han de ser de vidrio y el que contiene el gel debe utilizarse exclusivamente para este tipo de tinción.

## 7.10. Electrotransferencia

Cuando las proteínas separadas por electroforesis se quieren destinar a análisis por Western blot o otros revelados como detección de proteínas biotiniladas, es necesario transferirlas a una membrana de PVDF o nitrocelulosa, de forma que quedan inmobilizadas por adsorción.

#### Material y reactivos:

- Tampón de transferencia pH 8.3: Tris-base 25mM, glicina 192 mM, metanol 20%.
- Membrana PVDF (Immobilon<sup>TM</sup>-P; pore,

IPVH00010).

- papel Whatmann 3MM
- Mini-Protean TransBlot Cell (BioRad)

#### **Procedimiento:**

Después de la electroforesis se descarta el *stacking gel* y el *running gel* se sumerge en el tampón de transferencia. Se corta un trozo de membrana del mismo tamaño que el gel, se activa en metanol durante 1 min. y después se hidrata en agua destilada durante 1 min. Se cortan dos trozos de papel Whatmann del mismo tamaño. Se prepara una bandeja que contiene 500 ml de tampón de transferencia en la que se hace el montaje. Sobre la parte negra del sistema y en el siguiente orden se colocan una esponja, un papel Whatmann, el gel, la membrana, un papel Whatmann y una esponja. La membrana se puede marcar con lápiz en la parte superior izquierda para controlar la orientación con respecto al gel y saber el orden de carga de las muestras o hacer un pequeño corte con la tijeras como punto de referencia. Es muy importante que no queden burbujas entre el gel y la membrana porque eso impide la transferencia de las proteínas. Finalmente, se cierra el sistema procurando que no se muevan los elementos que hay en el interior. Se coloca en una cubeta de transferencia orientado hacia el polo negativo de manera que las proteínas migren del gel a la membrana al desplazarse hacia al polo positivo. El sistema dispone de un bloque de hielo que evita un calentamiento excesivo. Se llena la cubeta con tampón de transferencia y se aplica una corriente constante de 250 mA durante 1h. Si las proteínas que se quieren detectar tienen un peso molecular superior a 200 kDa, es conveniente resolverlas en un *running gel* con un 6% de acrilamida. En este caso, la transferencia se hace a 100 mA durante 16 h a 4° C. Una vez acabada la transferencia se desmonta el sistema procurando que la membrana no se seque.

### **7.11. 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 Chemoluminescence*) 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 500 µl 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 autoradiográfico.

## 7.12. Revelado de los geles SDS-PAGE con estreptavidina-peroxidasa

El conjugado de estreptavidina-peroxidasa permite la detección de sustancias, proteínas y anticuerpos marcados con biotina. En esta tesis se ha utilizado para visualizar los residuos de xCT biotinilados después de los ensayos de marcaje con el reactivo 3-N-(maleimidilpropionil)biotina.

**Material y Reactivos:**

- Estoc de estreptavidina-peroxidasa (Streptavidin-POD conjugate, 1089153 Roche), resuspendida en agua Q y mantenida a 4° C, siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

- Membranas transferidas de los geles SDS-PAGE con las proteínas de los ensayos de marcaje.
- Solución de bloqueo: 1.5% BSA (Albúmina Bovina Sérica) en PBS.
- Solución de estreptavidina-POD: dilución 1/5000 del estoc en PBS, 2% BSA, 0.1% TritonX-100.
- Solución de lavado: 0.1% TritonX-100 en PBS.
- Baño a 37° C.
- ECL (Amersham)
- Papel fotográfico para autoradiografía (Agfa)

**Procedimiento:**

El primer paso consiste en el bloqueo de la membrana para intentar evitar al máximo uniones inespecíficas de la estreptavidina. Al desmontar el sistema de la transferencia (apartado 7.9.) se incuba la membrana con la solución de bloqueo durante 1 h en agitación en un baño a 37° C. Después de este tiempo, se descarta la solución de bloqueo y se añade la solución de estreptavidina-POD (preparada justo antes de ser utilizada), que se deja incubando a temperatura ambiente durante 1 h. Para eliminar el exceso de estreptavidina que haya quedado, se hacen tres lavados generosos en volumen (unos 100 ml por membrana) de 10 min. cada uno en agitación a 37° C. Después del último lavado se aclara la membrana con PBS y se hace la reacción ECL durante 1 min. El revelado del film se hace de igual manera que en los análisis por Western blot, aunque los tiempos de exposición suelen ser muy cortos (30 s a 5 min.).

## 7.13. Estudios de inmunolocalización

En este trabajo se ha utilizado esta técnica para detectar la expresión de proteínas en cortes de oocitos o en células HeLa en cultivo transfectadas transitoriamente. La inmunolocalización se basa en el reconocimiento de las cadenas pesadas del anticuerpo primario por un anticuerpo secundario que está conjugado a un fluorocromo. La

combinación de anticuerpos secundarios conjugados a distintos fluorocromos facilita la localización simultánea de al menos dos proteínas diferentes.

### 7.13.1. Inmunolocalización en cortes de oocito de *Xenopus*

#### Material y reactivos:

- Criomoldes (Cryomold 4565; Tissue Tek)
- OCT (Agar Scientific Ltd., Essex, England)
- Criostato (Criocut 2800 E, Reichert-Jung)
- Portaobjetos previamente tratados con gelatina 0.5%.
- PBS
- Rotulador PapPen (de grasa)
- Solución de fijación: paraformaldehído 3% en PBS.
- Glicina 100mM en PBS
- Solución de permeabilización: Tritón X-100 1% en PBS.
- Solución de bloqueo: FBS 10% en PBS.
- Anticuerpo primario anti-myc diluido 1/500 en 10% FBS-PBS. Cada anticuerpo se utiliza a una concentración determinada. Si se desconoce, puede empezarse provando una dilución 10 veces más concentrada que la que se utiliza para Western blot con el mismo anticuerpo.
- 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.
- Medio de montaje para inmunofluorescencia (ICN 622701).
- Cubreobjetos
- Microscopio confocal (Leica TCS NT, Serveis Científic-Tècnics, Universitat de Barcelona).

#### Procedimiento:

**a) Preparación de los cortes de oocito:** Se pone a enfriar una placa metálica sobre una superficie de nieve carbónica. Cuando ya está fría, se ponen los criomoldes encima y también se espera que se enfríen. Se les añade una gota de OCT y, rápidamente, depositamos con cuidado un grupo de

5-10 oocitos/molde. Intentamos que queden separados entre ellos (podemos ayudarnos con una punta de pipeta para posicionarlos bien) y los cubrimos con OCT. Dejamos que el OCT se congele completamente y guardamos los moldes a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de hacer los cortes. Para hacer los cortes es necesario pre-enfriar la cámara del criostato, los moldes y la cuchilla a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 10 horas. Luego se hacen secciones de  $15\ \mu\text{m}$  siguiendo las instrucciones de (Shih *et al.*, 1998). Es fácil que los cortes se adhieran fácilmente al portaobjetos debido a la diferencia de temperatura entre ambos. Hechos los cortes, se guardan en una caja a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de hacer la inmunocitoquímica.

#### **b) Inmunolocalización en secciones de oocito:**

Los portaobjetos con las secciones de los oocitos se atemperan a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 10 min. sobre una placa calefactora. Para evitar que se escape por los lados del portaobjetos volumen de las soluciones a utilizar, se dibuja un óvalo con el rotulador PapPen alrededor de las secciones. A partir de aquí todo el proceso se realiza a temperatura ambiente. Se incuban los cortes en solución de fijación durante 10 min. Para disminuir la autofluorescencia de las células debido al proceso de fijación con paraformaldehído, se incuban los cortes con glicina 100 mM en PBS durante 10 min. A continuación, se incuban en solución de permeabilización también durante 10 min. y se hacen tres lavados con PBS. Después del último lavado se bloquean los cortes durante 30 min. en la solución de bloqueo. Mientras, se puede preparar la dilución de los anticuerpos en FBS 10% en PBS. Se utiliza un volumen de  $200\ \mu\text{l}$  de anticuerpo diluido para cada portaobjetos. Se preparan las diluciones y se centrifugan a máxima velocidad a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 5 min. para precipitar cualquier posible impureza. Los sobrenadantes se transfieren a nuevos tubos y se mantienen en hielo hasta su uso. Finalizado el bloqueo, se hace la incubación con el anticuerpo primario durante 1 hora, seguido de tres lavados con PBS. A continuación, se incuban los cortes (protegidos de la luz) durante 1 hora con la dilución del anticuerpo secundario. Es importante decir que algunas de las proteínas de reserva del oocito son fluorescentes a la misma longitud de



onda que la fluoresceína. Por este motivo se recomienda utilizar anticuerpos secundarios conjugados a otros fluorocromos, como la rodamina y el *Texas Red* (Molecular Probes). Después del secundario, se lavan los cortes tres veces con PBS, se secan a 37°C y, finalmente, se les añade el medio de montaje y se cubren con el cubreobjetos. Las preparaciones se dejan secar 12 h a temperatura ambiente y protegidas de la luz, aunque luego se mantienen a 4°C hasta la observación en el microscopio confocal.

### 7.13.2. Inmunolocalización sobre células en cultivo

#### Material y reactivos:

- PBS
- Solución de fijación: paraformaldehído 3% en PBS (puede suplementarse con sacarosa 60mM para asegurarse que las células no se permeabilizan por cambios de osmolaridad).
- NH<sub>4</sub>Cl 50 mM en PBS.
- Glicina 20 mM en PBS.
- Solución de permeabilización: Tritón X-100 0.1% en PBS-Glicina 20 mM.
- Solución de bloqueo: BSA 1% en PBS-Glicina 20 mM. Alternativamente, también puede usarse FBS (*Fetal Bovine Serum*) 10% en PBS.
- Anticuerpos primarios anti-*myc* diluido 1/500 y anti-*Xpress* y anti-*His* diluidos 1/100 en 1% BSA PBS-Glicina 20mM o, alternativamente, 10% FBS en PBS. Si se desconoce la concentración se puede empezar probando una dilución 10 veces más concentrada que la que se utiliza para Western blot con el mismo anticuerpo.
- Anticuerpo secundario *Goat anti-mouse Texas Red* (Molecular Probes) diluido 1/100 en PBS en 1% BSA PBS-Glicina 20mM o, alternativamente, 10% FBS en PBS. Es fotosensible y se guarda protegido de la luz.
- Medio de montaje para inmunofluorescencia (ICN 622701) o *mo wiol*.
- Cubreobjetos de vidrio de 10 mm de diámetro esterilizados por calor seco en la estufa a 90°C o por rayos UV durante 12 h.

- Placa de cultivo celular de 24 pocillos como cámara húmeda.
- Pinzas quirúrgicas de precisión (para manipular los cubres).

#### Procedimiento:

Para este tipo de ensayos, las células se siembran en placas de 10 mm que contienen cubreobjetos distribuidos homogéneamente. De esta manera las células crecen sobre los cubreobjetos. Se transfectan así y después de 48 h se sacan de la placa con ayuda de las pinzas y se sumergen de uno en uno, con la cara de las células orientada hacia arriba, en los pocillos de una placa de 24 a la que previamente se ha añadido PBS. Es importante controlar durante todo el proceso la orientación de los cubreobjetos y evitar aplicar las soluciones directamente sobre las células. Se aspira el PBS de los pocillos, se lavan 2 veces con PBS y se añade la solución de fijación durante 20 min. Para disminuir la autofluorescencia del proceso de fijación, las células se incuban con NH<sub>4</sub>Cl y glicina durante 10 min. En el caso que no vayan a permeabilizarse, este paso puede obviarse ya que a veces produce la rotura de las membranas. Se retira la solución, se hacen dos lavados de 5 min. con PBS-Glicina y se permeabilizan durante 10 min. Se repiten los dos lavados de PBS-Glicina y se bloquean las células con la solución de bloqueo durante 30 min. Durante este tiempo se pueden preparar las diluciones de los anticuerpos. Se calcula 25 µl de solución de anticuerpo por cada cubreobjeto, se prepara en tubos eppendorf y se mantienen en hielo hasta su utilización. Una vez acabado el bloqueo, se colocan sobre un trozo de *parafilm* 25 µl de solución de anticuerpo por cada cubre. Con las pinzas de precisión, se sacan los cubres de la solución de bloqueo, se absorben los restos apoyándolos verticalmente sobre papel de celulosa y se colocan sobre la gota de anticuerpo de manera que esté en contacto con la cara de las células. Se incuba durante 1 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se vuelven a colocar los cubres en la placa de 24 pocillos con las células orientadas hacia arriba y se hacen tres lavados con PBS-Glicina de 5 min. cada uno. A continuación, sobre otro trozo de *parafilm*, se

depositan 25  $\mu$ l de solución de anticuerpo secundario preparada de la misma manera que que la solución de anticuerpo primario y sobre la que se colocan los cubreobjetos con las células orientadas hacia la solución durante 45 min. Debido a la fotosensibilidad del anticuerpo, los cubres se tapan de la luz con papel de aluminio. Transcurrido el tiempo de incubación, se colocan de nuevo en la placa de 24 pocillos y se lavan dos veces con PBS. Finalmente, se secan sobre un papel de celulosa y se colocan con medio de montaje sobre un portaobjetos. Se dejan secar a temperatura ambiente y después se mantienen a 4°C en la oscuridad hasta la observación de las preparaciones en el microscopio confocal de los Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona. Debe tenerse en cuenta la vida media de los fluorocromos y no dejar las preparaciones demasiado tiempo antes de ser observadas para que no decaiga la señal.

## **Apéndices**



## APÉNDICE A. Constructos de DNA

### A.1. Constructos de xCT humano

#### xCT humano en Bluescript

El cDNA codificante para la proteína humana xCT se obtuvo a partir de un fragmento de 1.2 kb, producto de la amplificación de un *pool* de DNAs de la línea celular NT2 (teratocarcinoma humano indiferenciado) utilizando los *primers* HCYSG1 5'-ATGGTCAGAAAGCCTGTTTG-3' y HCYSG2 5'-TCTTCTGGGTACAACCTCCAGTATTA-3', y del clon de IMAGE 290903 (extremo 3'). Se clonó en Bluescript utilizando la diana *EcoRV* (sin que ésta se mantuviera). Este trabajo fue realizado por la Dra. M.T. Bassi en el Telethon Institute de Milán.

#### xCT humano en pNKS2

Para hacer la caracterización de la proteína en oocitos de *Xenopus* se clonó el cDNA de xCT en el vector de expresión pNKS2, que añade los extremos 5' y 3' no traducidos del mensajero de la  $\beta$ -globina y una cola poliA. Esto permite incrementar la expresión de la proteína ya que aumenta la estabilidad del cRNA al ser inyectado en el oocito. Este vector fue cedido por el Dr. Schmalzing (Gloor et al., 1995).

Se partió del plásmido de xCT en Bluescript, que se digirió con el enzima *EcoRI*. El inserto purificado se trató con Klenow para rellenar los extremos protuberantes (extremos romos) y se ligó (utilizando DNA ligasa) con el fragmento del vector vacío pNKS2 cortado con *NcoI* y *Sall* y también tratado con Klenow (extremos romos). Tratar el vector con fosfatasa alcalina evita, en parte, la religación provocada por los extremos romos. La ligación se precipita y luego se transforma en bacterias competentes preparadas para heat shock o electroporador. La orientación del inserto subclonado fue comprobada

por digestión y posterior secuenciación completa del cDNA de xCT.

#### N-myc xCT humano en pNKS2

A partir de xCT-pNKS2, se amplificó por PCR el cDNA de xCT utilizando los *primers* xCTAccI 5'-CAAGCGGTCGACATGGTCAGAAAGCCTGTTGTG-3' (que contiene la diana *AccI*) y xCTmyc 3'-CGGACTTACCGCTTACCCTG-5'. Hay que tener en cuenta que la secuencia del epítipo myc debe estar en pauta de lectura con el ATG del cDNA de xCT. El fragmento obtenido de la PCR purificado y el vector vacío pNKS2-myc se digirieron con *AccI* y *NotI*. Ambos se purificaron y precipitaron y se montó la ligación con DNA ligasa. El constructo resultante fue comprobado por digestión y secuenciación completa del inserto.

#### N-his xCT humano en pcDNA4/HisMAX

La metodología para la determinación de la topología de xCT requería la purificación de la proteína y se eligió clonarlo en este vector por sus características. El vector pcDNA4/HisMax (Invitrogen) 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.

Para su construcción, a partir de xCT-pNKS2, se amplificó por PCR el cDNA de xCT utilizando los *primers* xCTAsp718 5'-GAGCTGGGTACCGATGGTCAGAAAGCCTGTTGTGTC -3' (que contiene la diana *Asp718*) y xCTmyc 3'-5' (descrito anteriormente). En este caso también es esencial que la cola de histidinas y

el epítipo Xpress estén en pauta de lectura con el ORF de xCT. El fragmento purificado y el vector vacío pcDNA4/HisMax (en la versión A) se digirieron con *Asp718* y *NotI*. Ambos se purificaron y precipitaron y se montó la ligación. El constructo resultante fue comprobado por digestión y secuenciación completa del inserto.

#### xCT humano en pcDNA3

El vector pcDNA3 (Invitrogen) contiene el promotor pCMV, que permite la expresión constitutiva en células de mamífero; el promotor T7, los genes de resistencia a geneticina o G418 y ampicilina; y regiones que permiten su replicación en bacterias. Para construir xCT-pcDNA3 se cortaron tanto el plásmido xCT-pNKS2 como el vector vacío pcDNA3 con *HindIII* y *NotI*. Se purificaron ambos fragmentos y se ligaron con DNA ligasa. El constructo resultante fue comprobado por digestión y secuenciación completa del inserto.

#### C-myc xCT humano en pCMV-Tag5

La gama de vectores pCMV (Invitrogen) ofrece la opción de generar proteínas de fusión con diferentes epítipos de anticuerpos comerciales. Son vectores de expresión en células de mamífero (promotor CMV) y con genes de resistencia a kanamicina (50mg/l) y G418. En este caso se eligió pCMV-tag5, por su opción de unir el epítipo myc en el extremo Cterminal de la proteína. A partir del plásmido xCT-pcDNA3, se amplificó por PCR el fragmento del cDNA de xCT utilizando los *primers* T7 5'-3' y xCTAccI 3'-GGTCTTCTTCTATTCAATTCAGCTGAACGGTC-5' (que elimina el codón STOP de xCT e introduce una diana *AccI*). Se purificó el fragmento amplificado de la PCR y se digirió, paralelamente al vector pCMV5 (versión C), con los enzimas de restricción *HindIII* y *AccI*. Se purificaron y precipitaron ambos fragmentos y se ligaron con DNA ligasa. El constructo resultante fue comprobado por digestión y secuenciación completa del inserto.

## A.2. Mutantes de xCT humano

### xCT-Cysless humano en pNKS2

La construcción de xCT sin las 7 cisteínas endógenas se hizo sustituyendo cada una de ellas por mutagénesis dirigida (C? S) y subclonando el fragmento en el plásmido original de forma secuencial. A continuación se presentan los oligonucleótidos directos (5'-3') utilizados para la generación de cada respectivo mutante. El cambio de nucleótido/os aparece resaltado en negrita. El oligonucleótido reverso (3'-5') utilizado es el complementario al directo:

#### C86S:

CATCTGGACGGTGTCCGGGGTCCTG

#### C158S:

GGAACCATTTTTATTCAATCCGAAATCCC

#### C197S:

CTTAACCTTTTCCAAGCTCACAGC

#### C271S:

TCCCCTTGCAATATCCATATCCATGGCC

#### C327C:

TGCCCTCTCCTCCTTTGGCTCC

#### C414C:

CTTCGATACAAATCCCCAGATATGCTCC

#### C435CS:

TCCTCACATCCCTCTTCATGGTTGCC

En todos los casos, tanto las mutaciones como las ligaciones de los constructos intermedios fueron comprobados por secuenciación. Igualmente, se monitorizó las actividades en oocitos de *Xenopus* para controlar que no perdiáramos completamente la función del transportador en alguno de los pasos intermedios.

En primer lugar, se digirieron los mutantes C86S y C158C con *EcoRV* y *XhoI*. El fragmento de ~600 pb purificado de C158S se ligó con el de ~3900 pb de C86S para formar el doble mutante C86S-C158S, y sobre éste, se mutó C197S. El triple mutante C86S-C158S-C197S y el mutante C271S se digirieron con *BsgI* y *NdeI*. El fragmento purificado de ~600 pb del primero se ligó con el de ~3900 pb del segundo para formar el mutante C86S-C158S-C197S-C271S.

Paralelamente, sobre el mutante C435S se hizo mutagénesis dirigida para añadir C414S. El doble mutante C414S-C435S y el mutante C327S se digirieron con *XhoI* y *NotI*. El fragmento purificado de ~550 pb del doble mutante se ligó con el de ~4000 pb de C327S para formar C327S-C414S-435S.

Finalmente, se digirieron los mutantes C86S-C158S-C197S-C271S y C327S-C414S-435S con *BsgI* y *NotI* y se montó la ligación entre los fragmentos de ~3500 pb del primero con el de ~1000 pb del segundo. Así quedó construida la versión sin cisteínas de xCT o el llamado xCT-Cysless.

#### **N-his xCT-Cysless humano en pcDNA4HisMAX**

Se partió de los constructos xCT-Cysless pNKS2 y N-his xCT pcDNA4HisMax. Ambos se digirieron con los enzimas de restricción *BsgI* y *NotI* y se montó la ligación con el fragmento de ~1,8 kb del primero con el de ~5,5 kb del segundo. El constructo resultante se comprobó por digestión y secuenciación completa del ORF (*Open Reading Frame*). Este plásmido ha sido la base para la introducción de cisteínas individuales en el estudio de la topología de xCT.

#### **Constructos de introducción de cisteínas individuales en xCT-Cysless pcDNA4/HisMax**

A continuación se presentan los oligonucleótidos directos (5'-3') utilizados para la generación de cada respectivo mutante. El cambio de nucleótido/os aparece resaltado en negrita. El oligonucleótido reverso (3'-5') utilizado es el complementario al directo:

##### **S11C**

GTGTCCACCATCTGCAAAGGAGGTTACC

##### **N72C**

AAGGGCGTGCTCCAGTGCACGGGCAGCGT

##### **S79C**

AGCGTGGGCATGTGTCTGACCATCTGGAC

##### **T102C**

GCTGAATTGGGATGTACTATAAAGAAATC

##### **K105C**

GGGAACAACATATGTAAATCTGGAAGG

##### **G109C**

GAAATCTGGATGTCATTACACATATATTTTG

##### **H110C**

GAAATCTGGAGGTTGTTACACATATATTTTG

##### **Y111C**

CTGGAGGTCATTGCACATATATTTTGG

##### **T112C**

ATCTGGAGGTCATTACTGCTATATTTTGG

##### **E116C**

CACATATATTTTGTGTGTCTTTGGTCC

##### **V117C**

CATATATTTTGGAAATGCTTTGGTCCATTAC

##### **F118C**

TGGAAGTCTGTGGTCCATTACCAGC

##### **L121C**

GTCTTTGGTCCATGTCCAGCTTTGTACG

##### **P122C**

GGTCCATTA TGTGCTTTTGTACGAG

##### **A123C**

GGTCCATTACCATGTTTTGTACGAGTCTG

##### **F124C**

GGTCCATTACCAGCTTGTGTACGAGTCTG

##### **R126C**

CCAGCTTTTGTA TGTGTCTGGGTGGAAC

##### **E130C**

CGAGTCTGGGTGTGTCTCCTCATAATAC

##### **L163C**

TGAAATCCCTGAATGTGCGATCAAGCTC

##### **K166C**

CCTGAACTTGCGATCTGCCTCATTACAG

##### **S181C**

GATGGTCCTAAATTGCATGAGTGTGAGCTG

##### **M182C**

GGTCCTAAATAGCTGTAGTGTGAGCTGG

##### **S183C**

GTCTAAATAGCATGTGTGTGAGCTGGAG

##### **S185C**

GCATGAGTGTCTGCTGGAGCGCCCGGATC

##### **S187C**

GTGTGAGCTGGT GCGCCCGGATCCAGA

##### **A188C**

GTCAGCTGGAGCTGCCGGATCCAGA

##### **R189C**

CAGCTGGAGCGCCTGTATCCAGATTTTC

##### **I190C**

GGAGCGCCCGGTGCCAGATTTTCTTAAC

##### **I192C**

AGCGCCCGGATCCAGTGTCTTCTTAACC

**F193C**  
GGATCCAGATTTGCTTAACCTTTTCCAAGC

**L194C**  
CCAGATTTTCTGTACCTTTTCCAAGCTC

**F196C**  
CCAGATTTTCTTAACCTGTTCCAAGCTCAC

**S197C**  
CTTAACCTTTTGCAAGCTCACAGC

**Q219C**  
AGGTCAAACGTGCAACTTTAAAGACGCC

**E260C**  
TACTGAAGAAGTA TGCAACCCTGAA

**N293C:**  
TTACGACCATTGTGTGCTGAGGAGCT

**A294C**  
CGACCATTAATTGTGAGGAGCTGCTGC

**N301C**  
GAGCTGCTGCTTTCATGTGTCAGTGGCAGTGA

**E309C**  
GCAGTGACCTTTTCTTGCCGGCTACTGG

**A337C**  
GTGGTGTGTTTGTGTCTCCAGGTTATTC

**S342C**  
GCTGTCTCCAGGTTATTGCTATGTTGCGTCTC

**A345C**  
GGTTATTCTATGTTGTTTCTCGAGAGGGTCA

**S346C**  
TCTATGTTGCGTCGCGAGAGGGTCACC

**E353C**  
GGTCACCTTCCA TGTATCCTCTCCATG

**I354C**  
GTCACCTTCCAGAATGCCTCTCCATGATTC

**S356C**  
TCCAGAAATCCTCTGCATGATTCATGT

**H363C**  
CATGTCCGCAAGTGCACTCCTCTACCAGC

**S387C**  
GGAGACCTCGACTGTCTTTTGAATTTCC

**S414C**  
CTTCGATACAAATGCCAGATATGCTCC

**H418C**  
CCAGATATGTGTCGTCTTTCAAGGTG

**S445C**  
TTCCCTCTATTGTGACCCATTTAGT

**K472C**  
TATGGGACTGTAAACCCAGGTGG

**R478C**

CCAGGTGGTTTTGTATAATGTCCG

**S481C**  
GGTTAGAATAATGTGTGAGAAAATAACC

**I484C**  
GTCGGAGAAATGTACCAGAAC

**L492C**  
CAAATAATATGTGAAGTTGTACCAG

**E497C**  
GAAGTTGTACCATGTGAAGATAAGTTATG

**D499C**  
TGTACCAGAAGAA TGTAAGTTATGA

**K500C**  
CCAGAAGAAGATTGTTTATGAACTAATGG

#### Mutantes individuales de xCT salvaje en pcDNA4/HisMax

Igualmente, a continuación se presentan los oligonucleótidos directos (5'-3') utilizados para la generación de cada respectivo mutante. El cambio de nucleótido/os aparece resaltado en negrita:

**H110K**  
GAAATCTGGAGGTAATACACATATATTTTG

**H110D**  
GAAATCTGGAGGTGATTACACATATATTTTG

### A.3. Constructos de PW de ratón

#### PW de ratón en pNKS2

Para intentar hacer la caracterización de la proteína en oocitos de *Xenopus* se clonó el cDNA de PW en el vector de expresión pNKS2, descrito anteriormente. A partir del plásmido PW-Bluescript (construido por la Dra. M.T.Bassi), se amplificó por PCR el fragmento del cDNA de PK utilizando los *primers* PWNcoI5'-GAGCTCCATGGTGAATGTAACTTCTCTCATG-3' (que introduce la diana *NcoI*) y PWSalI 3'-

GTAAAGTGTCCGGGGTGAATCTCAGCTGGA CTT-5' (que introduce una diana *SalI*). Se purificó el fragmento amplificado de la PCR. Se digirieron el fragmento purificado y el vector pNKS2 con los enzimas de restricción *NcoI* y *SalI*. Se purificaron y precipitaron ambos fragmentos y se ligaron con DNA ligasa. El constructo resultante fue



comprobado por digestión y secuenciación completa del inserto.

### **PW de ratón en *myc*-pNKS2**

Para introducir el epítipo *myc* en el extremo N-terminal de PW en pNKS2, también se partió del plásmido PW-Bluescript. Se amplificó el cDNA de PW con los *primers* PWSalI 5'-TCTCGGTCGACATGGCAATGGATTCAAAGAAGG-3' y PWSalI 3'-5' (descrito anteriormente). El fragmento amplificado de la PCR purificado y el vector pNKS2 se digirieron con *Sall*. El vector se trató con fosfatasa alcalina para minimizar la religación. Los fragmentos se purificaron, precipitaron y ligaron con DNA ligasa. La orientación del inserto se comprobó por restricción y la fidelidad de la secuencia, por secuenciación.

### **PW de ratón en pCMV-Tag3**

Las características de estos vectores, descritas anteriormente, permitían el estudio de PW en células de mamífero (p.ej. HeLa) con el valor añadido de la unión del epítipo *myc* en el extremo N-terminal de la secuencia de PW. Esto es muy útil cuando no se dispone de anticuerpo específico. Para su subclonación, se partió del plásmido PW-pNKS2. Se amplificó el cDNA de PW con los *primers* PWBamHI 5'-CAGTCGCATCCATGGCAATGGATTCAAAGAAGG-3' (que introduce la diana de restricción *BamHI* en el extremo 5') y PWPstI 3'-GATCACGAGAGTTCTCAACGTAGACGTCAGGCG-5' (que introduce la diana *PstI* en el extremo 3'). El fragmento se purificó y se digirió con los enzimas *BamHI* y *PstI*, paralelamente al vector. Ambos se purificaron, precipitaron y ligaron con DNA ligasa. El constructo resultante se comprobó por restricción y se secuenció.

### **Concatenámoro *myc*PW-4F2hcSPORT**

El concatenámoro PW-4F2hc es una proteína de fusión que contiene la proteína PW en el extremo N-terminal seguida de un péptido de 10 aminoácidos para darle flexibilidad, y la proteína 4F2hc. Para su construcción nos basamos en la

estrategia publicada por el grupo de Verrey (Pfeiffer et al., 1999a).

En primer lugar se diseñaron oligonucleótidos de mutagénesis para introducir una diana *XhoI* en pauta con el ATG de inicio de transcripción de 4F2hc (5'-TCGTGTCGCCGGTTCTGCACTCGAGATGAGCCAGGACACCGAGGT-3'). Paralelamente, se amplificó por PCR el cDNA de *myc*PW a partir del plásmido *myc*PW -pCMV. Se usaron los *primers* *myc*SmaI 5'-AGACTACCCGGGAATTAACCCTCACTAAA-3' (que introduce una diana *SmaI*) y el mPWXhoIR 3'-TGGTGTATGTACTTCTTTACCACGACGAGGACTACCACGAGGAGAGCTCTAAGTT-5' (que contiene el final de secuencia de PW, con el *linker* y una diana *XhoI*). Se digirió el mutante de rBAT y el fragmento amplificado de PW con *SmaI* y *XhoI* y se ligaron con DNA ligasa. Se comprobó el constructo resultante por secuencia.

## **A.4. Constructos de PK de ratón**

### **PK de ratón en pCMV-Tag3**

Esta versión de los vectores tipo pCMV (descritos en A.1) fusiona el epítipo *myc* con el extremo N-terminal de la proteína de interés. Es importante recordar que confiere resistencia a kanamicina a las bacterias que lo adquieran. A partir del plásmido PK-Bluescript (construido por la Dra. M.T.Bassi), se amplificó por PCR el fragmento del cDNA de PK utilizando los *primers* PKPstI5'-

GCGGACTGCAGATGCAACTCTTGAGAGCACTAG-3' (que introduce la diana *PstI*) y PKHindIII 3'-

GTACGAACGAGTGTAATATTCGAAGCCTG-5' (que introduce una diana *HindIII*). Se purificó el fragmento amplificado de la PCR y se digirió, paralelamente al vector pCMV3 (versión B), con los enzimas de restricción *PstI* y *HindIII*. Se purificaron y precipitaron ambos fragmentos y se ligaron con DNA ligasa. El constructo resultante

## Apéndices

fue comprobado por digestión y secuenciación completa del inserto.

## APÉNDICE B. 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 autoclarlo. 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

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 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

### 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.

### H<sub>2</sub>O-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.

### Paraformaldehído 3%

La preparación se hace bajo la campana extractora. El paraformaldehído se disuelve en medio básico, por este motivo se calienta agua bidestilada con unas gotas de NaOH en una placa calefactora. Se añade el paraformaldehído y se deja en agitación. Una vez disuelto, se hacen alícuotas y se guardan a -20°C.

### Solución estoc de L-[<sup>35</sup>S]-cistina

La cistina radiactiva (SJ126, Amersham) se entrega en polvo y es necesario disolverla para preparar la solución estoc 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 µM. 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 µl de la solución en el contador beta. Se hacen tres réplicas

## Apéndices

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  $\mu$ l en tubos eppendorf, bajo una corriente de N<sub>2</sub> gas, y se guarda a -80°C.

## **Referencias Bibliográficas**



## Referencias bibliográficas

- Abramson, J., I. Smirnova, V. Kasho, G. Verner, S. Iwata, and H. R. Kaback. 2003. The lactose permease of *Escherichia coli*: overall structure, the sugar-binding site and the alternating access model for transport. *FEBS Lett.* 555:96-101.
- Akabas, M.H., C. Kaufmann, P. Archdeacon, and A. Karlin. 1994. Identification of acetylcholine receptor channel-lining residues in the entire M2 segment of the alpha subunit. *Neuron* 13:919-927.
- Akabas, M.H., D.A. Stauffer, M. Xu, and A. Karlin. 1992. Acetylcholine receptor channel structure probed in cysteine-substitution mutants. *Science* 258:307-310.
- Albi, J.L., P. Canals, M.A. Gallardo, and J. Sánchez. 1994. Na<sup>+</sup>-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.
- Anand, R. 2000. Probing the topology of the glutamate receptor GluR1 subunit using epitope-Tag insertions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276:157-161.
- Androutsellis-Theotokis, A., F. Ghassemi, and G. Rudnick. 2001. A conformationally sensitive residue on the cytoplasmic surface of serotonin transporter. *J. Biol. Chem.* 276:45933-45938.
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., and Struhl K. 1998. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons (USA).
- 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.
- Bannai, S. 1984b. Transport of cystine and cysteine in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* 779:289-306.
- Bannai, S. 1986. Exchange of cystine and glutamate across plasma membrane of human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 261:2256-2263.
- Bannai, S., H.N. Christensen, J.V. Vadgama, J.C. Ellory, E. Englesberg, G.G. Guidotti, G.C. Gazzola, M.S. Kilberg, A. Lajtha, B. Sacktor, and . 1984. Amino acid transport systems. *Nature* 311:308.
- Bannai, S. and E. Kitamura. 1980. Transport interaction of L-cystine and L-glutamate in human diploid fibroblasts in culture. *J. Biol. Chem.* 255:2372-2376.
- Bannai, S. and E. Kitamura. 1981b. Role of proton dissociation in the transport of cystine and glutamate in human diploid fibroblasts in culture. *J Biol Chem* 256:5770-5772.
- Bannai, S. and E. Kitamura. 1981a. Role of proton dissociation in the transport of cystine and glutamate in human diploid fibroblasts in culture. *J. Biol Chem.* 256:5770-5772.
- Bannai, S., H. Sato, T. Ishii, and Y. Sugita. 1989. Induction of cystine transport activity in human fibroblasts by oxygen. *J. Biol. Chem.* 264:18480-18484.
- Bannai, S., A. Takada, H. Kasuga, and N. Tateishi. 1986. Induction of cystine transport activity in isolated rat hepatocytes by sulfobromophthalein and other electrophilic agents. *Hepatology* 6:1361-1368.
- Bannai, S. and N. Tateishi. 1986. Role of membrane transport in metabolism and function of glutathione in mammals. *J. Membr. Biol.* 89:1-8.
- Bass, R.B., P. Strop, M. Barclay, and D.C. Rees. 2002. Crystal structure of *Escherichia coli* MscS, a voltage-modulated and mechanosensitive channel. *Science* 298:1582-1587.
- Bauch, C., N. Forster, D. Löffing-Cueni, V. Summa, and F. Verrey. 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 F. Verrey. 2002. Apical heterodimeric cystine and cationic amino acid transporter expressed in MDCK cells. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 283:F181-F189.
- Baynes, J.W. and S.R. Thorpe. 1999. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 48:1-9.

- Behrens, B.C., T.C. Hamilton, H. Masuda, K.R. Grotzinger, J. Whang-Peng, K.G. Louie, T. Knutsen, W.M. McKoy, R.C. Young, and R.F. Ozols. 1987. Characterization of a cis-diamminedichloroplatinum(II)-resistant human ovarian cancer cell line and its use in evaluation of platinum analogues. *Cancer Res.* 47:414-418.
- Bennett, J.A. and R. Dingleline. 1995. Topology profile for a glutamate receptor: three transmembrane domains and a channel-lining reentrant membrane loop. *Neuron* 14:373-384.
- Benson, D.A., M.S. Boguski, D.J. Lipman, J. Ostell, and B.F. Ouellette. 1998. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 26:1-7.
- Bertran, J., S. Magagnin, A. Werner, D. Markovich, J. Biber, X. Testar, A. Zorzano, L.C. Kuhn, M. Palacin, and H. Murer. 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., A. Werner, J. Chillaron, V. Nunes, J. Biber, X. Testar, A. Zorzano, X. Estivill, H. Murer, and M. Palacin. 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., A. Werner, M.L. Moore, G. Stange, D. Markovich, J. Biber, X. Testar, A. Zorzano, M. Palacin, and H. Murer. 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.
- Bibi, E. and O. Beja. 1994. Membrane topology of multidrug resistance protein expressed in *Escherichia coli*. N-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 269:19910-19915.
- Boado, R.J., J.Y. Li, M. Nagaya, C. Zhang, and W.M. Pardridge. 1999. Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96:12079-12084.
- Boguski, M.S., T.M. Lowe, and C.M. Tolstoshev. 1993. dbEST--database for "expressed sequence tags". *Nat. Genet.* 4:332-333.
- Borsani, G., M.T. Bassi, M.P. Sperandeo, A. De Grandi, A. Buoninconti, M. Riboni, M. Manzoni, B. Incerti, A. Pepe, G. Andria, A. Ballabio, and G. Sebastio. 1999. SLC7A7, encoding a putative permease-related protein, is mutated in patients with lysinuric protein intolerance. *Nat. Genet.* 21:297-301.
- Bridges, C.C., R. Kekuda, H. Wang, P.D. Prasad, P. Mehta, W. Huang, S.B. Smith, and V. Ganapathy. 2001. Structure, function, and regulation of human cystine/glutamate transporter in retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 42:47-54.
- Bridges, R.J., J.Y. Koh, C.G. Hatalski, and C.W. Cotman. 1991. Increased excitotoxic vulnerability of cortical cultures with reduced levels of glutathione. *Eur. J. Pharmacol.* 192:199-200.
- Brocke, L., A. Bendahan, M. Grunewald, and B.I. Kanner. 2002. Proximity of two oppositely oriented reentrant loops in the glutamate transporter GLT-1 identified by paired cysteine mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 277:3985-3992.
- Broer, A., B. Friedrich, C.A. Wagner, S. Fillon, V. Ganapathy, F. Lang, and S. Broer. 2001. Association of 4F2hc with light chains LAT1, LAT2 or y+LAT2 requires different domains. *Biochem. J.* 355:725-731.
- Broer, A., C.A. Wagner, F. Lang, and S. Broer. 2000. The heterodimeric amino acid transporter 4F2hc/y+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. *Pflügers Arch.* 444:457-466.
- Buhr, A. and B. Erni. 1993. Membrane topology of the glucose transporter of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 268:11599-11603.
- Calonge, M.J., P. Gasparini, J. Chillaron, M. Chillon, M. Gallucci, F. Rousaud, L. Zelante, X. Testar, B. Dallapiccola, F. Di Silverio, and . 1994. Cystinuria caused by mutations in rBAT, a gene involved in the transport of cystine. *Nat. Genet.* 6:420-425.
- Calonge, M.J., V. Volpini, L. Bisceglia, F. Rousaud, L. de Sanctis, E. Beccia, L. Zelante, X. Testar, A. Zorzano, X. Estivill, 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 N.L. Thompson. 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.
- Carpenter, T.O., H.L. Levy, M.E. Holtrop, V.E. Shih, and C.S. Anast. 1985. Lysinuric protein intolerance presenting as childhood osteoporosis. Clinical and skeletal response to citrulline therapy. *N. Engl. J. Med* 312:290-294.
- Cartwright, C.P. and D.J. Tipper. 1991. In vivo topological analysis of Ste2, a yeast plasma membrane protein, by using beta-lactamase gene fusions. *Mol. Cell Biol* 11:2620-2628.
- Chairoungdua, A., Y. Kanai, H. Matsuo, J. Inatomi, D.K. Kim, and H. Endou. 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., H. Segawa, J. Y. Kim, K. Miyamoto, H. Haga, Y. Fukui, K. Mizoguchi, H. Ito, E. Takeda, H. Endou, and Y. Kanai. 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., H.P. Koch, and R.J. Bridges. 1998. Design and synthesis of conformationally constrained inhibitors of high-affinity, sodium-dependent glutamate transporters. *Methods Enzymol.* 296:175-189.
- Chang, G. and C.B. Roth. 2001. Structure of MsbA from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science* 293:1793-1800.
- Chang, G., R.H. Spencer, A. T. Lee, M.T. Barclay, and D.C. Rees. 1998. Structure of the MscL homolog from *Mycobacterium tuberculosis*: a gated mechanosensitive ion channel. *Science* 282:2220-2226.
- Chase, L.A., R.J. Roon, L. Wellman, A.J. Beitz, and J.F. Koerner. 2001. L-Quisqualic acid transport into hippocampal neurons by a cystine-sensitive carrier is required for the induction of quisqualate sensitization. *Neuroscience* 106:287-301.
- Chavez, R.A. and Z.W. Hall. 1992. Expression of fusion proteins of the nicotinic acetylcholine receptor from mammalian muscle identifies the membrane-spanning regions in the alpha and delta subunits. *J. Cell Biol* 116:385-393.
- Chen, C.P., A. Kernytsky, and B. Rost. 2002. Transmembrane helix predictions revisited. *Protein Sci.* 11:2774-2791.
- Chen, J.G. and G. Rudnick. 2000. Permeation and gating residues in serotonin transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97:1044-1049.
- Chillarón, J., R. Estévez, I. Samarzija, S. Waldegger, X. Testar, F. Lang, A. Zorzano, A. Busch, and M. Palacín. 1997. An intracellular trafficking defect in type I cystinuria rBAT mutants M467T and M467K. *J. Biol Chem.* 272:9543-9549.
- Chillarón, J., R. Roca, A. Valencia, A. Zorzano, and M. Palacín. 2001. Heteromeric amino acid transporters: biochemistry, genetics, and physiology. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 281:F995-1018.
- Cho, Y. and S. Bannai. 1990. Uptake of glutamate and cysteine in C-6 glioma cells and in cultured astrocytes. *J. Neurochem.* 55:2091-2097.
- 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., L.M. Albritton, D.K. Kakuda, and C.L. MacLeod. 1994. Gene-product designations for amino acid transporters. *J. Exp. Biol.* 196:51-57.
- Clark, J.A. 1997. Analysis of the transmembrane topology and membrane assembly of the GAT-1 gamma-aminobutyric acid transporter. *J. Biol Chem.* 272:14695-14704.
- Clark, J.A. 1998. Analysis of transporter topology using deletion and epitope tagging. *Methods Enzymol.* 296:293-307.
- Closs, E.I., P. Graf, A. Habermeier, J.M. Cunningham, and U. Forstermann. 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., C.R. Lyons, C. Kelly, and J.M. Cunningham. 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.
- Cohen, S.N., A.C. Chang, and L. Hsu. 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.
- Colman, A., S. Bhamra, and G. Valle. 1984. Post-translational modification of exogenous proteins in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem. Soc. Trans.* 12:932-937.
- Cosgriff, A.J. and A.J. Pittard. 1997. A topological model for the general aromatic amino acid permease, AroP, of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179:3317-3323.
- Coutre, J. and H.R. Kaback. 2000. Structure-function relationships of integral membrane proteins: membrane transporters vs channels. *Biopolymers* 55:297-307.
- Crane, R.K. 1965. Na<sup>+</sup>-dependent transport in the intestine and other animal tissues. *Fed Proc* 25:1000-1006.
- Crawhall, Scowen, and R. Watts. 1963. Effect of penicillamine on cystinuria. *Br. Med. J.* 5330:588-590.
- Crawhall and S. Segal. 1967. The intracellular ratio of cysteine and cystine in various tissues. *Biochem. J.* 105:891-896.
- Dahl, S.G., I. Sylte, and A.W. Ravna. 2004. Structures and Models of Transporter Proteins. *Am. Soc. Pharma. Exp. Ther.* in press.
- Dello St rologo, L., E. Pras, C. Pontesilli, E. Beccia, V. Ricci-Barbini, L. de Sanctis, A. Ponzzone, M. Gallucci, L. Bisceglia, L. Zelante, M. Jimenez-Vidal, M. Font, A. Zorzano, F. Rousaud, V. Nunes, P. Gasparini, M. Palacin, and G. Rizzoni. 2002. Comparison between SLC3A1 and SLC7A9 cystinuria patients and carriers: a need for a new classification. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13:2547-2553.
- Dent and Senior. 1955. Studies on the treatment of cystinuria. *Br. J. Urol.* 27:317.
- Deora, A.B., R.N. Ghosh, and S.S. Tate. 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.
- Devés, R. and C.A. Boyd. 1998. Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. *Physiol. Rev.* 78:487-545.
- Devés, R. and C.A. Boyd. 2000. Surface antigen CD98(4F2): not a single membrane protein, but a family of proteins with multiple functions. *J. Membr. Biol.* 173:165-177.
- Diallinas, G., J. Valdez, V. Sophianopoulou, A. Rosa, and C. Scazzocchio. 1998. Chimeric purine transporters of *Aspergillus nidulans* define a domain critical for function and specificity conserved in bacterial, plant and metazoan homologues. *EMBO J.* 17:3827-3837.
- Dierks, T., E. Riemer, and R. Kramer. 1988. Reaction mechanism of the reconstituted aspartate/glutamate carrier from bovine heart mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 943:231-244.
- Dodd, J.R. and D.L. Christie. 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.
- Doi, N. and H. Yanagawa. 1999. Insertional gene fusion technology. *FEBS Lett.* 457:1-4.
- Doyle, D.A. 2004. Structural themes in ion channels. *European Biophysics Journal* in press.
- Doyle, D.A., C.J. Morais, R.A. Pfuetzner, A. Kuo, J.M. Gulbis, S.L. Cohen, B.T. Chait, and R. MacKinnon. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* 280:69-77.
- Droge, W., H.P. Eck, H. Gmunder, and S. Mihm. 1991. Modulation of lymphocyte functions and immune responses by cysteine and cysteine derivatives. *Am. J. Med.* 91:140S-144S.
- Dumont, J.N. 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in

- laboratory maintained animals. *J. Morphol.* 136:153-179.
- During-Olsen,L., B.Regenberg, C.Gjermansen, M.C.Kielland-Brandt, and J.Hansen. 1999. Cysteine uptake by *Saccharomyces cerevisiae* is accomplished by multiple permeases. *Curr. Genet.* 35:609-617.
- Dutzler,R., E.B.Campbell, M.Cadene, B.T.Chait, and R.MacKinnon. 2002. X-ray structure of a Cl<sup>-</sup> channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* 415:287-294.
- Ehrmann,M., D.Boyd, and J.Beckwith. 1990. Genetic analysis of membrane protein topology by a sandwich gene fusion approach. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87:7574-7578.
- Ellis,J., A.Carlin, C.Steffes, J.Wu, J.Liu, and B.P.Rosen. 1995. Topological analysis of the lysine-specific permease of *Escherichia coli*. *Microbiology* 141 ( Pt 8):1927-1935.
- Elsner,H.A., H.H.Honck, F.Willmann, H.J.Kreienkamp, and F.Iglauer. 2000. Poor quality of oocytes from *Xenopus laevis* used in laboratory experiments: prevention by use of antiseptic surgical technique and antibiotic supplementation. *Comp Med.* 50:206-211.
- Espey,M.G., Y.Kustova, Y.Sei, and A.S.Basile. 1998. Extracellular glutamate levels are chronically elevated in the brains of LP-BM5-infected mice: a mechanism of retrovirus-induced encephalopathy. *J. Neurochem.* 71:2079-2087.
- Estévez,R., M.Camps, A.M.Rojas, X.Testar, R.Deves, M.A.Hediger, A.Zorzano, and M.Palacín. 1998. The amino acid transport system y<sup>+</sup>L/4F2hc is a heteromultimeric complex. *FASEB J.* 12:1319-1329.
- Feliubadaló,L., M.L.Arbones, S.Manas, J.Chillarón, J.Visa, M.Rodes, F.Rousaud, A.Zorzano, M.Palacín, and V.Nunes. 2003. Slc7a9-deficient mice develop cystinuria non-I and cystine urolithiasis. *Hum. Mol. Genet.* 12:2097-2108.
- Feliubadaló,L., M.Font, J.Purroy, F.Rousaud, X.Estivill, V.Nunes, E.Golomb, M.Centola, I.Aksentjevich, Y.Kreiss, B.Goldman, M.Pras, D.L.Kastner, E.Pras, P.Gasparini, L.Bisceglia, E.Beccia, M.Gallucci, L.de Sanctis, A.Ponzone, G.F.Rizzoni, L.Zelante, M.T.Bassi, A.L.George, Jr., M.Palacín, 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., R.Zent, M.Dellos, D.A.Calderwood, J.Satriano, C.Kelly, and M.H.Ginsberg. 2001. Distinct domains of CD98hc regulate integrins and amino acid transport. *J. Biol. Chem.* 276:8746-8752.
- Fernández,E., M.Carrascal, F.Rousaud, J.Abian, A.Zorzano, M.Palacín, and J.Chillarón. 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.
- Fernández,E., D.Torrents, J.Chillarón, D.R.Martin, A.Zorzano, and M.Palacín. 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.
- Fleming,K.G. 2000. Riding the wave: structural and energetic principles of helical membrane proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11:67-71.
- Font,M.A., L.Feliubadaló, X.Estivill, V.Nunes, E.Golomb, Y.Kreiss, E.Pras, L.Bisceglia, A.P.d'Adamo, L.Zelante, P.Gasparini, M.T.Bassi, A.L.George, Jr., M.Manconi, M.Riboni, A.Ballabio, G.Borsani, N.Reig, E.Fernandez, A.Zorzano, J.Bertran, and M.Palacín. 2001. Functional analysis of mutations in SLC7A9, and genotype-phenotype correlation in non-Type I cystinuria. *Hum. Mol. Genet.* 10:305-316.
- Fu,D., A.Libson, L.J.Miercke, C.Weitzman, P.Nollert, J.Krucinski, and R.M.Stroud. 2000. Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science* 290:481-486.
- Fukasawa,Y., H.Segawa, J.Y.Kim, A.Chairoungdua, D.K.Kim, H.Matsuo, S.H.Cha, H.Endou, and Y.Kanai. 2000. Identification and characterization of a Na<sup>+</sup>-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.
- Furriols,M., J.Chillarón, C.Mora, A.Castello, J.Bertran, M.Camps, X.Testar, S.Vilaro, A.Zorzano, and M.Palacín. 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.
- Geering, K., I. Theulaz, F. Verrey, M. T. Hauptle, and B. C. Rossier. 1989. A role for the beta-subunit in the expression of functional Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in *Xenopus* oocytes. *Am. J. Physiol* 257:C851-C858.
- Gilstring, C. F. and P. O. Ljungdahl. 2000. A method for determining the in vivo topology of yeast polytopic membrane proteins demonstrates that Gap1p fully integrates into the membrane independently of Shr3p. *J. Biol Chem.* 275:31488-31495.
- Gloor, S., O. Pongs, and G. Schmalzing. 1995. A vector for the synthesis of cRNAs encoding Myc epitope-tagged proteins in *Xenopus laevis* oocytes. *Gene* 160:213-217.
- Godwin, A. K., A. Meister, P. J. O'Dwyer, C. S. Huang, T. C. Hamilton, and M. E. Anderson. 1992. High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89:3070-3074.
- Goldin, A. L. 1992. Maintenance of *Xenopus laevis* and oocyte injection. *Methods Enzymol.* 207:266-279.
- Golovanevsky, V. and B. I. Kanner. 1999. The reactivity of the gamma-aminobutyric acid transporter GAT-1 toward sulfhydryl reagents is conformationally sensitive. Identification of a major target residue. *J. Biol Chem.* 274:23020-23026.
- Grunewald, M., A. Bendahan, and B. I. Kanner. 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. and B. I. Kanner. 2000. The accessibility of a novel reentrant loop of the glutamate transporter GLT-1 is restricted by its substrate. *J. Biol. Chem.* 275:9684-9689.
- Habermeier, A., S. Wolf, U. Martine, P. Graf, and E. I. Closs. 2003. Two amino acid residues determine the low substrate affinity of human cationic amino acid transporter-2A. *J. Biol. Chem.* 278:19492-19499.
- Handler, J. S. and H. M. Kwon. 2001. Transcriptional regulation by changes in tonicity. *Kidney Int.* 60:408-411.
- Hanigan, M. H. 1995. Expression of gamma-glutamyl transpeptidase provides tumor cells with a selective growth advantage at physiologic concentrations of cyst(e)ine. *Carcinogenesis* 16:181-185.
- Hanigan, M. H. and W. A. Ricketts. 1993. Extracellular glutathione is a source of cysteine for cells that express gamma-glutamyl transpeptidase. *Biochemistry* 32:6302-6306.
- Harris, E. W., D. R. Stevens, and C. W. Cotman. 1987. Hippocampal cells primed with quisqualate are depolarized by AP4 and AP6, ligands for a putative glutamate uptake site. *Brain Res.* 418:361-365.
- Haynes, B. F., M. E. Hemler, D. L. Mann, G. S. Eisenbarth, J. Shelhamer, H. S. Mostowski, C. A. Thomas, J. L. Strominger, and A. S. Fauci. 1981. Characterization of a monoclonal antibody (4F2) that binds to human monocytes and to a subset of activated lymphocytes. *J. Immunol.* 126:1409-1414.
- Hediger, M. A., M. F. Romero, J. Peng, A. Rolfs, H. Takanaga, and E. A. Bruford. 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 J. L. Strominger. 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.
- Herrera, F., R. M. Sainz, J. C. Mayo, V. Martin, I. Antolin, and C. Rodriguez. 2001. Glutamate induces oxidative stress not mediated by glutamate receptors or cystine transporters: protective effect of melatonin and other antioxidants. *J. Pineal Res.* 31:356-362.
- Heuberger, E. H., L. M. Veenhoff, R. H. Duurkens, R. H. Friesen, and B. Poolman. 2002. Oligomeric state of membrane transport proteins analyzed with blue native electrophoresis and analytical ultracentrifugation. *J. Mol. Biol* 317:591-600.

- Hirai, T., J.A. Heymann, D. Shi, R. Sarker, P.C. Maloney, and S. Subramaniam. 2002. Three-dimensional structure of a bacterial oxalate transporter. *Nat. Struct. Biol.* 9:597-600.
- Hirokawa, T., S. Boon-Chieng, and S. Mitaku. 1998. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics.* 14:378-379.
- Hishinuma, I., T. Ishii, H. Watanabe, and S. Bannai. 1986. Mouse lymphoma L1210 cells acquire a new cystine transport activity upon adaptation in vitro. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 22:127-134.
- Hopp, T.P. and K.R. Woods. 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78:3824-3828.
- Hosoya, K., M. Tomi, S. Ohtsuki, H. Takanaga, S. Saeki, Y. Kanai, H. Endou, M. Naito, T. Tsuruo, and T. Terasaki. 2002. Enhancement of L-cystine transport activity and its relation to xCT gene induction at the blood-brain barrier by diethyl maleate treatment. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302:225-231.
- Hu, L.A. and S.C. King. 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 S.C. King. 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 S.C. King. 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 S.C. King. 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, Y., M.J. Lemieux, J. Song, M. Auer, and D.N. Wang. 2003. Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from Escherichia coli. *Science* 301:616-620.
- Ikeda, M., M. Arai, D.M. Lao, and T. Shimizu. 2002. Transmembrane topology prediction methods: a re-assessment and improvement by a consensus method using a dataset of experimentally-characterized transmembrane topologies. *In Silico. Biol* 2:19-33.
- Ikeda, M., M. Arai, T. Okuno, and T. Shimizu. 2003. TMPDB: a database of experimentally-characterized transmembrane topologies. *Nucleic Acids Res.* 31:406-409.
- Ishii, T., H. Sato, K. Miura, J. Sagara, and S. Bannai. 1992. Induction of cystine transport activity by stress. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 663:497-498.
- Isnard, A.D., D. Thomas, and Y. Surdin-Kerjan. 1996. The study of methionine uptake in Saccharomyces cerevisiae reveals a new family of amino acid permeases. *J. Mol. Biol.* 262:473-484.
- Itoh, K., N. Wakabayashi, Y. Katoh, T. Ishii, K. Igarashi, J.D. Engel, and M. Yamamoto. 1999. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 13:76-86.
- Iwamoto, T., A. Uehara, I. Imanaga, and M. Shigekawa. 2000. The Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger NCX1 has oppositely oriented reentrant loop domains that contain conserved aspartic acids whose mutation alters its apparent Ca<sup>2+</sup> affinity. *J. Biol. Chem.* 275:38571-38580.
- Jack, D.L., I.T. Paulsen, and M.H. Saier. 2000. The amino acid/polyamine/organocation (APC) superfamily of transporters specific for amino acids, polyamines and organocations. *Microbiology* 146:1797-1814.
- Janecek, S., B. Svensson, and B. Henrissat. 1997. Domain evolution in the alpha-amylase family. *J. Mol. Evol.* 45:322-331.
- Jiang, Y., A. Lee, J. Chen, M. Cadene, B.T. Chait, and R. MacKinnon. 2002. Crystal structure and

- mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* 417:515-522.
- Jiang, Y., A. Lee, J. Chen, V. Ruta, M. Cadene, B. T. Chait, and R. MacKinnon. 2003a. X-ray structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature* 423:33-41.
- Jiang, Y., V. Ruta, J. Chen, A. Lee, and R. MacKinnon. 2003b. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature* 423:42-48.
- Jiménez-Vidal, M., E. Gasol, A. Zorzano, V. Nunes, M. Palacín, and J. Chillarón. 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.*
- Joly, D., P. Rieu, A. Mejean, M. F. Gagnadoux, M. Daudon, and P. Jungers. 1999. Treatment of cystinuria. *Pediatr. Nephrol.* 13:945-950.
- Jung, H., K. Jung, and H. R. Kaback. 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.
- K. Hofmann and W. Stoffel. 1993. TMbase - A database of membrane spanning protein segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 166.
- 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. 1996. Handbook of Biological Physics. Elsevier, Amsterdam.
- Kaback, H. R., M. Sahin-Toth, and A. B. Weinglass. 2001. The kamikaze approach to membrane transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 2:610-620.
- Kamada, Y., H. Nagaretani, S. Tamura, T. Ohama, T. Maruyama, H. Hiraoka, S. Yamashita, A. Yamada, S. Kiso, Y. Inui, N. Ito, Y. Kayanoki, S. Kawata, and Y. Matsuzawa. 2001. Vascular endothelial dysfunction resulting from L-arginine deficiency in a patient with lysinuric protein intolerance. *J. Clin. Invest* 108:717-724.
- Kanai, Y. and H. Endou. 2001. Heterodimeric amino acid transporters: molecular biology and pathological and pharmacological relevance. *Curr. Drug Metab* 2:339-354.
- Kanai, Y., Y. Fukasawa, S. H. Cha, H. Segawa, A. Chairoungdua, D. K. Kim, H. Matsuo, J. Y. Kim, K. Miyamoto, E. Takeda, and H. Endou. 2000. Transport properties of a system y<sup>+</sup>L neutral and basic amino acid transporter. Insights into the mechanisms of substrate recognition. *J. Biol. Chem.* 275:20787-20793.
- Kanai, Y., H. Segawa, K. Miyamoto, H. Uchino, E. Takeda, and H. Endou. 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.
- Karelson, E., N. Bogdanovic, A. Garlind, B. Winblad, K. Zilmer, T. Kullisaar, T. Vihalemm, C. Kairane, and M. Zilmer. 2001. The cerebrocortical areas in normal brain aging and in Alzheimer's disease: noticeable differences in the lipid peroxidation level and in antioxidant defense. *Neurochem. Res.* 26:353-361.
- Karlin, A. and M. H. Akabas. 1998. Substituted-cysteine accessibility method. *Methods Enzymol.* 293:123-145.
- Kawahara, M., E. Shimoda, and M. Maeda. 1996. Transmembrane segment 10 is important for substrate recognition in Ga12 and Hxt2 sugar transporters in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 389:174-178.
- Kashiwagi, K., A. Kuraishi, H. Tomitori, A. Igarashi, K. Nishimura, A. Shirahata, and K. Igarashi. 2000. Identification of the putrescine recognition site on polyamine transport protein PotE. *J. Biol Chem.* 275:36007-36012.
- Kashiwagi, K., S. Shibuya, H. Tomitori, A. Kuraishi, and K. Igarashi. 1997. Excretion and uptake of putrescine by the PotE protein in *Escherichia coli*. *J. Biol Chem.* 272:6318-6323.
- Kim, H., K. Melen, and G. von Heijne. 2003. Topology models for 37 *Saccharomyces cerevisiae* membrane proteins based on C-terminal reporter fusions and predictions. *J. Biol Chem.* 278:10208-10213.
- King, J. S. Jr. 1968. Treatment of cystinuria with alpha-mercaptopropionylglycine: a preliminary report with some notes on

- column chromatography of mercaptans. *Proc Soc Exp Biol Med* 129:927-932.
- Koyama, Y., Y. Kimura, Hashimoto H., T. Matsuda, and A. Baba. 2000. L-lactate inhibits L-cystine/L-glutamate exchange transport and decreases glutathione content in rat cultured astrocytes. *J Neurosci Res* 59:685-691.
- Krogh, A., B. Larsson, G. von Heijne, and E. L. Sonnhammer. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol* 305:567-580.
- Krom, B.P. and J.S. Lolkema. 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.
- Kuner, T., L.P. Wollmuth, A. Karlin, P.H. Seeburg, and B. Sakmann. 1996. Structure of the NMDA receptor channel M2 segment inferred from the accessibility of substituted cysteines. *Neuron* 17:343-352.
- Kuo, A., J.M. Gulbis, J.F. Antcliff, T. Rahman, E.D. Lowe, J. Zimmer, J. Cuthbertson, F.M. Ashcroft, T. Ezaki, and D.A. Doyle. 2003. Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science* 300:1922-1926.
- Kyte, J. and R.F. Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157:105-132.
- Lacatena, R.M., A. Cellini, F. Scavizzi, and G.P. Tocchini-Valentini. 1994. Topological analysis of the human beta 2-adrenergic receptor expressed in *Escherichia coli*. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91:10521-10525.
- Leclerc, D., Q. Wu, J.R. Ellis, P. Goodyer, and R. Rozen. 2001. Is the SLC7A10 gene on chromosome 19 a candidate locus for cystinuria? *Mol. Genet. Metab* 73:333-339.
- Lee, W.S., R.G. Wells, R.V. Sabbag, T.K. Mohandas, and M.A. Hediger. 1993. Cloning and chromosomal localization of a human kidney cDNA involved in cystine, dibasic, and neutral amino acid transport. *J. Clin. Invest* 91:1959-1963.
- Locher, K.P., A.T. Lee, and D.C. Rees. 2002. The *E. coli* BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* 296:1091-1098.
- López-Corcuera, B., E. Nunez, R. Martinez-Maza, A. Geerlings, and C. Aragon. 2001. Substrate-induced conformational changes of extracellular loop 1 in the glycine transporter GLYT2. *J. Biol. Chem.* 276:43463-43470.
- MacKinnon, R. 1995. Pore loops: an emerging theme in ion channel structure. *Neuron* 14:889-892.
- Maechler, P. and C.B. Wollheim. 1999. Mitochondrial glutamate acts as a messenger in glucose-induced insulin exocytosis. *Nature* 402:685-689.
- Makowske, M. and H.N. Christensen. 1982a. Contrasts in transport systems for anionic amino acids in hepatocytes and a hepatoma cell line HTC. *J. Biol. Chem.* 257:5663-5670.
- Makowske, M. and H.N. Christensen. 1982b. Hepatic transport system interconverted by protonation from service for neutral to service for anionic amino acids. *J. Biol. Chem.* 257:14635-14638.
- Maksimovic, I.D., M.D. Jovanovic, M. Colic, R. Mihajlovic, D. Micic, V. Selakovic, M. Ninkovic, Z. Malicevic, M. Rusic-Stojiljkovic, and A. Jovicic. 2001. Oxidative damage and metabolic dysfunction in experimental Huntington's disease: selective vulnerability of the striatum and hippocampus. *Vojnosanit. Pregl.* 58:237-242.
- Mannion, B.A., T.V. Kolesnikova, S.H. Lin, S. Wang, N.L. Thompson, and M.E. Hemler. 1998. The light chain of CD98 is identified as E16/TA1 protein. *J. Biol. Chem.* 273:33127-33129.
- Manoil, C. and J. Bailey. 1997. A simple screen for permissive sites in proteins: analysis of *Escherichia coli* lac permease. *J. Mol. Biol* 267:250-263.
- Mardones, G. and A. Gonzalez. 2003. Selective plasma membrane permeabilization by freeze-thawing and immunofluorescence epitope access to determine the topology of intracellular membrane proteins. *J. Immunol. Methods* 275:169-177.
- Markovich, D., G. Stange, J. Bertran, M. Palacin, A. Werner, J. Biber, and H. Murer. 1993. Two mRNA transcripts (rBAT-1 and rBAT-2) are

- involved in system b<sub>0</sub>(+)-related amino acid transport. *J. Biol. Chem.* 268:1362-1367.
- Mastroberardino, L., B. Spindler, R. Pfeiffer, P. J. Skelly, J. Loffing, C. B. Shoemaker, and F. Verrey. 1998. Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family. *Nature* 395:288-291.
- Matsuo, H., Kanai Y, J. Y. Kim, A. Chairoungdua, D. K. Kim, J. Inatomi, Y. Shigeta, H. Ishimine, S. Chaekuntode, K. Tachampa, H. W. Choi, E. Babu, J. Fukuda, and H. Endou. 2001. Identification of a novel Na<sup>+</sup>-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.
- Meier, C., Z. Ristic, S. Klauser, and F. Verrey. 2002. Activation of system L heterodimeric amino acid exchangers by intracellular substrates. *EMBO J.* 21:580-589.
- Meister, A. and M. E. Anderson. 1983. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52:711-760.
- Merlin, D., S. Sitaraman, X. Liu, K. Eastburn, J. Sun, T. Kucharzik, B. Lewis, and J. L. Madara. 2001. CD98-mediated links between amino acid transport and beta 1 integrin distribution in polarized columnar epithelia. *J. Biol. Chem.* 276:39282-39289.
- Miledi, R., I. Parker, and K. Sumikawa. 1982. Synthesis of chick brain GABA receptors by frog oocytes. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 216:509-515.
- Minchin, R. F. and J. E. McCoubrie. 2004. Mutational analysis of the large periplasmic loop 7-8 of the putrescine transporter PotE in *Escherichia coli*. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 36:271-280.
- Mistry, P., L. R. Kelland, G. Abel, S. Sidhar, and K. R. Harrap. 1991. The relationships between glutathione, glutathione-S-transferase and cytotoxicity of platinum drugs and melphalan in eight human ovarian carcinoma cell lines. *Br. J. Cancer* 64:215-220.
- Miura, K., T. Ishii, Y. Sugita, and S. Bannai. 1992. Cystine uptake and glutathione level in endothelial cells exposed to oxidative stress. *Am. J. Physiol* 262:C50-C58.
- Miyamoto, K., H. Segawa, S. Tatsumi, K. Katai, H. Yamamoto, Y. Taketani, H. Haga, K. Morita, and E. Takeda. 1996. Effects of truncation of the COOH-terminal region of a Na<sup>+</sup>-independent neutral and basic amino acid transporter on amino acid transport in *Xenopus* oocytes. *J. Biol Chem.* 271:16758-16763.
- Mizoguchi, K., S. H. Cha, A. Chairoungdua, D. K. Kim, Y. Shigeta, H. Matsuo, J. Fukushima, Y. Awa, K. Akakura, T. Goya, H. Ito, H. Endou, and Y. Kanai. 2001. Human cystinuria-related transporter: localization and functional characterization. *Kidney Int.* 59:1821-1833.
- Moller, S., M. D. Croning, and R. Apweiler. 2001. Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics.* 17:646-653.
- Mordrelle, A., J. F. Huneau, and D. Tome. 1997. Sodium-dependent and -independent transport of L-glutamate in the rat intestinal crypt-like cell line IEC-17. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233:244-247.
- Mueckler, M. and C. Makepeace. 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.
- Murakami, S., R. Nakashima, E. Yamashita, and A. Yamaguchi. 2002. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* 419:587-593.
- Murata, K., K. Mitsuoka, T. Hirai, T. Walz, P. Agre, J. B. Heymann, A. Engel, and Y. Fujiyoshi. 2000. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* 407:599-605.
- Mykkanen, J., D. Torrents, M. Pineda, M. Camps, M. E. Yoldi, N. Horelli-Kuitunen, K. Huoponen, M. Heinonen, J. Oksanen, O. Simell, M. L. Savontaus, A. Zorzano, M. Palacin, and P. Aula. 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., N. Seki, K. Ishikawa, M. Ohira, Y. Kawarabayasi, O. Ohara, A. Tanaka, H. Kotani, N. Miyajima, and N. Nomura. 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., M.Sato, H.Yang, F.Miyagawa, M.Harasaki, K.Tomita, S.Matsuoka, A.Noma, K.Iwai, and N.Minato. 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., H.Matsuo, D.K.Kim, A.Goto, A.Chairoungdua, S.H.Cha, J.Inatomi, Y.Shiokawa, K.Yamaguchi, I.Saito, H.Endou, and Y.Kanai. 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.
- Novak,D.A., M.S.Kilberg, and M.J.Beveridge. 1994. Ontogeny and plasma-membrane domain localization of amino acid transport system L in rat liver. *Biochem. J.* 301 ( Pt 3):671-674.
- Okuno,S., H.Sato, K.Kuriyama-Matsumura, M.Tamba, H.Wang, S.Sohda, H.Hamada, H.Yoshikawa, T.Kondo, and S.Bannai. 2003. Role of cystine transport in intracellular glutathione level and cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines. *Br. J. Cancer* 88:951-956.
- Olivares,L., C.Aragon, C.Gimenez, and F.Zafra. 1997. Analysis of the transmembrane topology of the glycine transporter GLYT1. *J. Biol Chem.* 272:1211-1217.
- Ostermeier,C. and H.Michel. 2004. Crystallization of membrane proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:697-701.
- Oxender and Christensen. 1963. Distinct mediating systems for the transport of neutral amino acids by the Ehrlich cell. *J. Biol. Chem.* 238:3686-3698.
- Ozono,S., Y.Homma, and R.Oyasu. 1985. Gamma glutamyl transpeptidase activity in rat urothelium treated with bladder carcinogens. *Cancer Lett.* 29:49-57.
- Palacín,M., J.Bertran, J.Chillarón, R.Estévez, and A.Zorzano. 2004. Lysinuric protein intolerance: mechanisms of pathophysiology. *Mol. Genet. Metab* 81 Suppl:27-37.
- Palacín,M., J.Bertran, and A.Zorzano. 2000. Heteromeric amino acid transporters explain inherited aminoacidurias. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 9:547-553.
- Palacín,M., G.Borsani, and G.Sebastio. 2001a. The molecular bases of cystinuria and lysinuric protein intolerance. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11:328-335.
- Palacín,M., J.Chillarón, and C.Mora. 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.
- Palacín,M., R.Estévez, J.Bertran, and A.Zorzano. 1998. Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol Rev.* 78:969-1054.
- Palacín,M., Goodyer P., Nunes V., and P.Gasparini. 2001b. Metabolic and molecular bases of inherited diseases. McGraw-Hill, New York.
- Palacín,M. and Y.Kanai. 2004. The ancillary proteins of HATs: SLC3 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch.* 447:490-494.
- Parmacek,M.S., B.A.Karpinski, K.M.Gottesdiener, C.B.Thompson, and J.M.Leiden. 1989. Structure, expression and regulation of the murine 4F2 heavy chain. *Nucleic Acids Res.* 17:1915-1931.
- Pascual,J.M., C.C.Shieh, G.E.Kirsch, and A.M.Brown. 1995. Multiple residues specify external tetraethylammonium blockade in voltage-gated potassium channels. *Biophys. J.* 69:428-434.
- Patel,S.A., B.A.Warren, J.F.Rhoderick, and R.J.Bridges. 2004. Differentiation of substrate and non-substrate inhibitors of transport system x(c)(-): an obligate exchanger of L-glutamate and L-cystine. *Neuropharmacology* 46:273-284.
- Perez,R.P., T.C.Hamilton, R.F.Ozols, and R.C.Young. 1993. Mechanisms and modulation of resistance to chemotherapy in ovarian cancer. *Cancer* 71:1571-1580.
- Persson,B. and P.Argos. 1997. Prediction of membrane protein topology utilizing multiple sequence alignments. *J. Protein Chem.* 16:453-457.

- Peter, G.J., T.B. Panova, G.R. Christie, and P.M. Taylor. 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.
- Pfeiffer, R., J. Loffing, G. Rossier, C. Bauch, C. Meier, T. Eggemann, D. Loffing-Cueni, L.C. Kuhn, and F. Verrey. 1999a. Luminal heterodimeric amino acid transporter defective in cystinuria. *Mol. Biol. Cell* 10:4135-4147.
- Pfeiffer, R., G. Rossier, B. Spindler, C. Meier, L. Kuhn, and F. Verrey. 1999b. Amino acid transport of  $\gamma$ -L-type by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of the glycoprotein-associated amino acid transporter family. *EMBO J.* 18:49-57.
- Pfeiffer, R., B. Spindler, J. Loffing, P.J. Skelly, C.B. Shoemaker, and F. Verrey. 1998. Functional heterodimeric amino acid transporters lacking cysteine residues involved in disulfide bond. *FEBS Lett.* 439:157-162.
- Pi, J., C. Dogovski, and A.J. Pittard. 1998. Functional consequences of changing proline residues in the phenylalanine-specific permease of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180:5515-5519.
- Pi, J. and A.J. Pittard. 1996. Topology of the phenylalanine-specific permease of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178:2650-2655.
- Pi, J., P.J. Wooley, and A.J. Pittard. 1993. Site-directed mutagenesis reveals the importance of conserved charged residues for the transport activity of the PheP permease of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175:7500-7504.
- Piani, D. and A. Fontana. 1994. Involvement of the cystine transport system xc<sup>-</sup> in the macrophage-induced glutamate-dependent cytotoxicity to neurons. *J. Immunol.* 152:3578-3585.
- Pickel, V.M., M.J. Nirenberg, J. Chan, R. Mosckovitz, S. Udenfriend, and S.S. Tate. 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.
- Pigeon, R.P. and R.P. Silver. 1994. Topological and mutational analysis of KpsM, the hydrophobic component of the ABC-transporter involved in the export of polysialic acid in *Escherichia coli* K1. *Mol. Microbiol.* 14:871-881.
- Pineda, M., E. Fernández, D. Torrents, R. Estévez, C. López, M. Camps, J. Lloberas, A. Zorzano, and M. Palacín. 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., M. Font, M.T. Bassi, M. Manzoni, G. Borsani, V. Marigo, E. Fernández, D.R. Martín, J. Purroy, A. Zorzano, V. Nunes, and M. Palacín. 2004a. The amino acid transporter asc-1 is not involved in cystinuria. *Kidney Int.* (in press).
- Pineda, M., C.A. Wagner, A. Broer, P.A. Stehberger, S. Kaltenbach, J.L. Gelpi, D.R. Martin, A. Zorzano, M. Palacín, F. Lang, and S. Broer. 2004b. Cystinuria-specific rBAT(R365W) mutation reveals two translocation pathways in the amino acid transporter rBAT-b<sub>0</sub>+AT. *Biochem. J.* 377:665-674.
- Poirot, O., E.O'Toole, and C. Notredame. 2003. Tcoffee@igs: A web server for computing, evaluating and combining multiple sequence alignments. *Nucleic Acids Res.* 31:3503-3506.
- Poolman, B., R. Modderman, and J. Reizer. 1992. Lactose transport system of *Streptococcus thermophilus*. The role of histidine residues. *J. Biol Chem.* 267:9150-9157.
- Prasad, P.D., H. Wang, W. Huang, R. Kekuda, D.P. Rajan, F.H. Leibach, and V. Ganapathy. 1999. Human LAT1, a subunit of system L amino acid transporter: molecular cloning and transport function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255:283-288.
- Qiu, X.Q., K.S. Jakes, A. Finkelstein, and S.L. Slatin. 1994. Site-specific biotinylation of colicin Ia. A probe for protein conformation in the membrane. *J. Biol Chem.* 269:7483-7488.
- Quackenbush, E., M. Clabby, K.M. Gottesdiener, J. Barbosa, N.H. Jones, J.L. Strominger, S. Speck, and J.M. Leiden. 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.

- Race, R.R. 1959. Familial Alzheimer's disease: note on the linkage data. *Ann Hum Genet* 23:310.
- Rajan, D.P., W.Huang, R.Kekuda, R.L.George, J.Wang, S.J.Conway, L.D.Devoe, F.H.Leibach, P.D.Prasad, and V.Ganapathy. 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., R.Kekuda, W.Huang, L.D.Devoe, F.H.Leibach, P.D.Prasad, and V.Ganapathy. 2000b. Cloning and functional characterization of a Na(+)-independent, broad-specific neutral amino acid transporter from mammalian intestine. *Biochim. Biophys. Acta* 1463:6-14.
- Rajan, D.P., R.Kekuda, W.Huang, H.Wang, L.D.Devoe, F.H.Leibach, P.D.Prasad, and V.Ganapathy. 1999. Cloning and expression of a b(0,+)-like amino acid transporter functioning as a heterodimer with 4F2hc instead of rBAT. A new candidate gene for cystinuria. *J. Biol. Chem.* 274:29005-29010.
- Rajantie, J., O.Simell, and J.Perheentupa. 1983. Oral administration of epsilon N-acetyllysine and homocitrulline in lysinuric protein intolerance. *J. Pediatr.* 102:388-390.
- Regenberg, B. and M.C.Kielland-Brandt. 2001. Amino acid residues important for substrate specificity of the amino acid permeases Can1p and Gnp1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 18:1429-1440.
- Reig, N., J.Chillarón, P.Bartoccioni, E.Fernández, A.Bendahan, A.Zorzano, B.Kanner, M.Palacín, and J.Bertran. 2002. The light subunit of system b(0,+)- is fully functional in the absence of the heavy subunit. *EMBO J.* 21:4906-4914.
- Reizer, J., K.Finley, D.Kakuda, C.L.MacLeod, A.Reizer, and M.H.Saier, Jr. 1993. Mammalian integral membrane receptors are homologous to facilitators and antiporters of yeast, fungi, and eubacteria. *Protein Sci.* 2:20-30.
- Ren, G., V.S.Reddy, A.Cheng, P.Melnyk, and A.K.Mitra. 2001. Visualization of a water-selective pore by electron crystallography in vitreous ice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98:1398-1403.
- Robinson, M.B., E.R.Whittemore, R.L.Marks, and J.F.Koerner. 1986. Exposure of hippocampal slices to quisqualate sensitizes synaptic responses to phosphonate-containing analogues of glutamate. *Brain Res.* 381:187-190.
- Romero, M.F., Y.Kanai, H.Gunshin, and M.A.Hediger. 1998. Expression cloning using *Xenopus laevis* oocytes. *Methods Enzymol.* 296:17-52.
- Rosenberg, B. 1985. Fundamental studies with cisplatin. *Cancer* 55:2303-2316.
- Rosenberg, M.F., Q.Mao, A.Holzenburg, R.C.Ford, R.G.Deeley, and S.P.Cole. 2001. The structure of the multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). crystallization and single-particle analysis. *J. Biol. Chem.* 276:16076-16082.
- Rossier, G., C.Meier, C.Bauch, V.Summa, B.Sordat, F.Verrey, and L.C.Kuhn. 1999. LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine. *J. Biol. Chem.* 274:34948-34954.
- Russ, W.P. and D.M.Engelman. 2000. The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association. *J. Mol. Biol* 296:911-919.
- Saadi, I., X.Z.Chen, M.Hediger, P.Ong, P.Pereira, P.Goodyer, and R.Rozen. 1998. Molecular genetics of cystinuria: mutation analysis of SLC3A1 and evidence for another gene in type I (silent) phenotype. *Kidney Int.* 54:48-55.
- Sagara, J., N.Makino, and S.Bannai. 1996. Glutathione efflux from cultured astrocytes. *J. Neurochem.* 66:1876-1881.
- Sagara, J., K.Miura, and S.Bannai. 1993a. Cystine uptake and glutathione level in fetal brain cells in primary culture and in suspension. *Journal of Neurochemistry* 61:1667-1671.
- Sagara, J.I., K.Miura, and S.Bannai. 1993b. Maintenance of neuronal glutathione by glial cells. *J. Neurochem.* 61:1672-1676.
- Sambrook J., Fritsch E.F., and Maniatis T. 1989. Molecular cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Santamaria, F., G.Parenti, G.Guidi, A.Rotondo, G.Grillo, M.R.Larocca, L.Celentano,

- P.Strisciuglio, G.Sebastio, and G.Andria. 1996. Early detection of lung involvement in lysinuric protein intolerance: role of high-resolution computed tomography and radioisotopic methods. *Am. J. Respir. Crit Care Med* 153:731-735.
- Sarsero,J.P. and A.J.Pittard. 1995. Membrane topology analysis of Escherichia coli K-12 Mtr permease by alkaline phosphatase and beta-galactosidase fusions. *J. Bacteriol.* 177:297-306.
- Sasaki,H., H.Sato, K.Kuriyama-Matsumura, K.Sato, K.Maebara, H.Wang, M.Tamba, K.Itoh, M.Yamamoto, and S.Bannai. 2002. Electrophile response element-mediated induction of the cystine/glutamate exchange transporter gene expression. *J. Biol. Chem.* 277:44765-44771.
- Sato,H., K.Fujiwara, J.Sagara, and S.Bannai. 1995a. Induction of cystine transport activity in mouse peritoneal macrophages by bacterial lipopolysaccharide. *Biochem. J.* 310:547-551.
- Sato,H., K.Kuriyama-Matsumura, R.C.Siow, T.Ishii, S.Bannai, and G.E.Mann. 1998. Induction of cystine transport via system x-c and maintenance of intracellular glutathione levels in pancreatic acinar and islet cell lines. *Biochim. Biophys. Acta* 1414:85-94.
- Sato,H., Y.Takenaka, K.Fujiwara, M.Yamaguchi, K.Abe, and S.Bannai. 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., M.Tamba, T.Ishii, and S.Bannai. 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., M.Tamba, K.Kuriyama-Matsumura, S.Okuno, and S.Bannai. 2000. Molecular cloning and expression of human xCT, the light chain of amino acid transport system xc-. *Antioxid. Redox. Signal.* 2:665-671.
- Sato,H., M.Tamba, S.Okuno, K.Sato, K.Keino-Masu, M.Masu, and S.Bannai. 2002. Distribution of cystine/glutamate exchange transporter, system x(c)-, in the mouse brain. *J. Neurosci.* 22:8028-8033.
- Savage,D.F., P.F.Egea, Y.Robles-Colmenares, J.D.Iii, and R.M.Stroud. 2003. Architecture and selectivity in aquaporins: 2.5 a x-ray structure of aquaporin z. *PLoS. Biol.* 1:E72.
- Schreve,J.L., J.K.Sin, and J.M.Garrett. 1998. The Saccharomyces cerevisiae YCC5 (YCL025c) gene encodes an amino acid permease, Agp1, which transports asparagine and glutamine. *J. Bacteriol.* 180:2556-2559.
- Schubert,D. and D.Piasecki. 2001. Oxidative glutamate toxicity can be a component of the excitotoxicity cascade. *J. Neurosci.* 21:7455-7462.
- Schulein,R., C.Rutz, and W.Rosenthal. 1996. Membrane targeting and determination of transmembrane topology of the human vasopressin V2 receptor. *J. Biol Chem.* 271:28844-28852.
- Seal,R.P. and S.G.Amara. 1998. A reentrant loop domain in the glutamate carrier EAAT1 participates in substrate binding and translocation. *Neuron* 21:1487-1498.
- Seal,R.P., B.H.Leighton, and S.G.Amara. 1998. Transmembrane topology mapping using biotin-containing sulfhydryl reagents. *Methods Enzymol.* 296:318-331.
- Seal,R.P., B.H.Leighton, and S.G.Amara. 2000. A model for the topology of excitatory amino acid transporters determined by the extracellular accessibility of substituted cysteines. *Neuron* 25:695-706.
- Segawa,H., Y.Fukasawa, K.Miyamoto, E.Takeda, H.Endou, and Y.Kanai. 1999. Identification and functional characterization of a Na+-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J. Biol. Chem.* 274:19745-19751.
- Seki,Y., P.J.Feustel, R.W.Keller, Jr., B.I.Tranmer, and H.K.Kimelberg. 1999. Inhibition of ischemia-induced glutamate release in rat striatum by dihydrokinate and an anion channel blocker. *Stroke* 30:433-440.
- Senes,A., M.Gerstein, and D.M.Engelman. 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.
- Serra,J.A., R.O.Dominguez, E.S.de Lustig, E.M.Guareschi, A.L.Famulari,

- E.L.Bartolome, and E.R.Marschoff. 2001. Parkinson's disease is associated with oxidative stress: comparison of peripheral antioxidant profiles in living Parkinson's, Alzheimer's and vascular dementia patients. *J. Neural Transm.* 108:1135-1148.
- Shigekawa,M., T.Iwamoto, A.Uehara, and S.Kita. 2002. Probing ion binding sites in the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 976:19-30.
- Shih,T.M., R.D.Smith, L.Toro, and A.L.Goldin. 1998. High-level expression and detection of ion channels in *Xenopus* oocytes. *Methods Enzymol.* 293:529-556.
- Shoji,Y., A.Noguchi, Y.Shoji, M.Matsumori, Y.Takasago, M.Takayanagi, Y.Yoshida, K.Ihara, T.Hara, S.Yamaguchi, M.Yoshino, M.Kaji, S.Yamamoto, A.Nakai, A.Koizumi, Y.Hokezu, K.Nagamatsu, H.Mikami, I.Kitajima, and G.Takada. 2002. Five novel SLC7A7 variants and  $\gamma$ -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.
- Silbernagl,S. 1988. The renal handling of amino acids and oligopeptides. *Physiol Rev.* 68:911-1007.
- Simell,O. 2001. Lysinuric protein intolerance and other actionic aminoacidurias. In *Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*. McGraw-Hill, New York. 4933-56.
- Skach,W.R. and V.R.Lingappa. 1994. Transmembrane orientation and topogenesis of the third and fourth membrane-spanning regions of human P-glycoprotein (MDR1). *Cancer Res.* 54:3202-3209.
- Skullerud,K., S.Marstein, H.Schrader, P.J.Brundel, and E.Jellum. 1980. The cerebral lesions in a patient with generalized glutathione deficiency and pyroglutamic aciduria (5-oxoprolinuria). *Acta Neuropathol. (Berl)* 52:235-238.
- Slatin,S.L., X.Q.Qiu, K.S.Jakes, and A.Finkelstein. 1994. Identification of a translocated protein segment in a voltage-dependent channel. *Nature* 371:158-161.
- Slotboom,D.J., I.Sobczak, W.N.Konings, and J.S.Lolkema. 1999. A conserved serine-rich stretch in the glutamate transporter family forms a substrate-sensitive reentrant loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96:14282-14287.
- Solt,D.B., L.Calderon-Solt, and T.Odajima. 1985. Rapid induction of carcinomas and gamma-glutamyl transpeptidase-rich clones in N-methyl-N-benzyl nitrosamine-treated hamster buccal pouch. *J. Natl. Cancer Inst.* 74:437-445.
- Sorgen,P.L., Y.Hu, L.Guan, H.R.Kaback, and M.E.Girvin. 2002. An approach to membrane protein structure without crystals. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99:14037-14040.
- Spence,M.A., A.Heyman, M.L.Marazita, R.S.Sparkes, and T.Weinberg. 1986. Genetic linkage studies in Alzheimer's disease. *Neurology* 36:581-584.
- Stevens,T.J. and I.T.Arkin. 2000. Do more complex organisms have a greater proportion of membrane proteins in their genomes? *Proteins* 39:417-420.
- Sui,H., B.G.Han, J.K.Lee, P.Walian, and B.K.Jap. 2001. Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature* 414:872-878.
- Sweiry,J.H., J.Sastre, J.Vina, H.P.Elsasser, and G.E.Mann. 1995. A role for gamma-glutamyl transpeptidase and the amino acid transport system xc<sup>-</sup> in cystine transport by a human pancreatic duct cell line. *J. Physiol* 485 ( Pt 1):167-177.
- Tamura,S., H.Nelson, A.Tamura, and N.Nelson. 1995. Short external loops as potential substrate binding site of gamma-aminobutyric acid transporters. *J. Biol Chem.* 270:28712-28715.
- Tate,C.G. 2001. Overexpression of mammalian integral membrane proteins for structural studies. *FEBS Lett.* 504:94-98.
- Tate,S.S., N.Yan, and S.Udenfriend. 1992. Expression cloning of a Na<sup>(+)</sup>-independent neutral amino acid transporter from rat kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89:1-5.
- Tavoularis,S.N., U.H.Tazebay, G.Diallinas, M.Sideridou, A.Rosa, C.Scazzocchio, and V.Sophianopoulou. 2003. Mutational analysis of the major proline transporter (Prn B) of

- Aspergillus nidulans. *Mol. Membr. Biol* 20:285-297.
- Teixeira,S., S.Di Grandi, and L.C.Kuhn. 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.
- Tomi,M., T.Funaki, H.Abukawa, K.Katayama, T.Kondo, S.Ohtsuki, M.Ueda, M.Obinata, T.Terasaki, and K.Hosoya. 2003. Expression and regulation of L-cystine transporter, system xc-, in the newly developed rat retinal Muller cell line (TR-MUL). *Glia* 43:208-217.
- Tomi,M., K.Hosoya, H.Takanaga, S.Ohtsuki, and T.Terasaki. 2002. Induction of xCT gene expression and L-cystine transport activity by diethyl maleate at the inner blood-retinal barrier. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 43:774-779.
- Torrás-Llort,M., D.Torrents, J.F.Soriano-Garcia, J.L.Gelpi, R.Estevez, R.Ferrer, M.Palacin, and M.Moreto. 2001. Sequential amino acid exchange across b(0,+)-like system in chicken brush border jejunum. *J. Membr. Biol* 180:213-220.
- Torrents,D., R.Estévez, M.Pineda, E.Fernández, J.Lloberas, Y.B.Shi, A.Zorzano, and M.Palacín. 1998. Identification and characterization of a membrane protein ( $\gamma$ +L amino acid transporter-1) that associates with 4F2hc to encode the amino acid transport activity  $\gamma$ +L. A candidate gene for lysinuric protein intolerance. *J. Biol. Chem.* 273:32437-32445.
- Torrents,D., J.Mykkanen, M.Pineda, L.Feliubadaló, R.Estévez, R.de Cid, P.Sanjurjo, A.Zorzano, V.Nunes, K.Huoponen, A.Reinikainen, O.Simell, M.L.Savontaus, P.Aula, and M.Palacín. 1999. Identification of SLC7A7, encoding  $\gamma$ +LAT-1, as the lysinuric protein intolerance gene. *Nat. Genet.* 21:293-296.
- Trotti,D., N.C.Danbolt, and A.Volterra. 1998. Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends Pharmacol. Sci.* 19:328-334.
- Tusnady,G.E. and I.Simon. 1998. Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. *J. Mol. Biol.* 283:489-506.
- Tusnady,G.E. and I.Simon. 2001. The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics.* 17:849-850.
- Ubarretxena-Belandia,I., J.M.Baldwin, S.Schuldiner, and C.G.Tate. 2003. Three-dimensional structure of the bacterial multidrug transporter EmrE shows it is an asymmetric homodimer. *EMBO J.* 22:6175-6181.
- Uchino,H., Y.Kanai, d.K.Kim, M.F.Wempe, A.Chairoungdua, E.Morimoto, M.W.Anders, and H.Endou. 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 Winkle,L.J., A.L.Campione, and J.M.Gorman. 1988. Na<sup>+</sup>-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.
- Varela,M.F., R.J.Brooker, and T.H.Wilson. 1997. Lactose carrier mutants of Escherichia coli with changes in sugar recognition (lactose versus melibiose). *J. Bacteriol.* 179:5570-5573.
- Veljkovic,E., Stasiuk S., P.J.Skelly, C.B.Shoemaker, and F.Verrey. 2004. Functional Characterization of *Caenorhabditis elegans* Heteromeric Amino acid Transporters. *J. Biol. Chem.* 279:7655-7662.
- Venkatesan,P. and H.R.Kaback. 1998. The substrate-binding site in the lactose permease of Escherichia coli. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:9802-9807.
- Verrey,F. 2003. System L: heteromeric exchangers of large, neutral amino acids involved in directional transport. *Pflugers Arch.* 445:529-533.
- Verrey,F., E.I.Closs, C.A.Wagner, M.Palacín, H.Endou, and Y.Kanai. 2004. CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch.* 447:532-542.
- Verrey,F., D.L.Jack, I.T.Paulsen, M.H.Saier, and R.Pfeiffer. 1999. New Glycoprotein-Associated Amino Acid Transporters. *J. Membr. Biol* 172:181-192.

- Wagner, C.A., F.Lang, and S.Broer. 2001. Function and structure of heterodimeric amino acid transporters. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 281:C1077-C1093.
- Wallin, E. and G.von Heijne. 1998. Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci.* 7:1029-1038.
- Wang, D.N., V.E.Sarabia, R.A.Reithmeier, and W.Kuhlbrandt. 1994. Three-dimensional map of the dimeric membrane domain of the human erythrocyte anion exchanger, Band 3. *EMBO J.* 13:3230-3235.
- Wang, H., M.Tamba, M.Kimata, K.Sakamoto, S.Bannai, and H.Sato. 2003. Expression of the activity of cystine/glutamate exchange transporter, system x(c)(-), by xCT and rBAT. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305:611-618.
- Wang, X.F. and M.S.Cynader. 2000. Astrocytes provide cysteine to neurons by releasing glutathione. *J. Neurochem.* 74:1434-1442.
- Wang, Y. and S.S.Tate. 1995. Oligomeric structure of a renal cystine transporter: implications in cystinuria. *FEBS Lett.* 368:389-392.
- Weissbach, L., M.E.Handlogten, H.N.Christensen, and M.S.Kilberg. 1982. Evidence for two Na<sup>+</sup>-independent neutral amino acid transport systems in primary cultures of rat hepatocytes. Time-dependent changes in activity. *J. Biol. Chem.* 257:12006-12011.
- Wells, R.G. and M.A.Hediger. 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.
- Wells, R.G., W.S.Lee, Y.Kanai, J.M.Leiden, and M.A.Hediger. 1992. The 4F2 antigen heavy chain induces uptake of neutral and dibasic amino acids in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 267:15285-15288.
- Wigler, M., R.Sweet, G.K.Sim, B.Wold, A.Pellicer, E.Lacy, T.Maniatis, S.Silverstein, and R.Axel. 1979. Transformation of mammalian cells with genes from procaryotes and eucaryotes. *Cell* 16:777-785.
- Williams, K.A. 2000. Three-dimensional structure of the ion-coupled transport protein NhaA. *Nature* 403:112-115.
- Winkler, B.S., M.E.Boulton, J.D.Gottsch, and P.Sternberg. 1999. Oxidative damage and age-related macular degeneration. *Mol. Vis.* 5:32.
- Wolf, D.A., S.Wang, M.A.Panzica, N.H.Bassily, and N.L.Thompson. 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 J.R.Yates. 2003. The application of mass spectrometry to membrane proteomics. *Nat. Biotechnol.* 21:262-267.
- Xie, Y., S.A.Langhans-Rajasekaran, D.Bellovino, and T.Morimoto. 1996. Only the first and the last hydrophobic segments in the COOH-terminal third of Na,K-ATPase alpha subunit initiate and halt, respectively, membrane translocation of the newly synthesized polypeptide. Implications for the membrane topology. *J. Biol Chem.* 271:2563-2573.
- Yamaguchi, A., M.Nakatani, and T.Sawai. 1992. Aspartic acid-66 is the only essential negatively charged residue in the putative hydrophilic loop region of the metal-tetracycline/H<sup>+</sup> antiporter encoded by transposon Tn10 of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 31:8344-8348.
- Yanagida, O., Y.Kanai, A.Chairoungdua, D.K.Kim, H.Segawa, T.Nii, S.H.Cha, H.Matsuo, J.Fukushima, Y.Fukasawa, Y.Tani, Y.Taketani, H.Uchino, J.Y.Kim, J.Inatomi, I.Okayasu, K.Miyamoto, E.Takeda, T.Goya, and H.Endou. 2001. Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim. Biophys. Acta* 1514:291-302.
- Ye, Z.C., J.D.Rothstein, and H.Sontheimer. 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.
- Yu, E.W., G.McDermott, H.I.Zgurskaya, H.Nikaido, and D.E.Koshland, Jr. 2003. Structural basis of multiple drug-binding capacity of the AcrB multidrug efflux pump. *Science* 300:976-980.
- Zeevalk, G.D., L.P.Bernard, C.Sinha, J.Ehrhart, and W.J.Nicklas. 1998. Excitotoxicity and

## Referencias Bibliográficas

oxidative stress during inhibition of energy metabolism. *Dev. Neurosci.* 20:444-453.



