



UNIVERSITAT DE BARCELONA



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

Caracterització de LAT4 i EEG1, dos membres de la família de transportadors d'aminoàcids SLC43

Susanna Bodoy i Salvans

TESI DOCTORAL
Barcelona, 2008

Programa de Doctorat de Biomedicina, Bienni 2002-2004,
del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona

**Memòria per a optar al grau de
Doctora per la Universitat de Barcelona**

Presentada per:

SUSANNA BODOY I SALVANS

Vist i plau del director:

L'interessada,

Dr. Manuel Palacín Prieto

Susanna Bodoy Salvans

Barcelona, 2008

Als meus pares,

*"Posem-nos dempeus altra vegada i que se sentí
la veu de tots solemnement i clara.
Cridem qui som i que tothom ho escolti.
I en acabat, que cadascú es vesteixi
com bonament li plagui, i via fora!,
que tot està per fer i tot és possible".*

*Fragment del poema "Ara mateix" de "L'Àmbit de tots els Àmbits".
Miquel Martí i Pol*

Índex de continguts

ÍNDIX DE CONTINGUTS	1
Índex de Figures.....	5
Índex de Taules	9
Llista d'abreviacions	11
INTRODUCCIÓ	13
SISTEMES DE TRANSPORT D'AMINOÀCIDS EN MAMÍFERS	15
Sistemes de transport d'aminoàcids neutres	18
Sistema L	18
Transportadors heteromèrics d'aminoàcids (HAT).....	21
Subunitats pesades (HSHATs).....	22
<i>rBAT (SLC3A1).....</i>	23
<i>4F2hc (SLC3A2)</i>	23
Subunitats lleugeres (LSHATs)	25
<i>LAT1 (SLC7A5).....</i>	25
<i>LAT2 (SLC7A8).....</i>	26
Reabsorció renal i intestinal d'aminoàcids. Aminoacidúries.....	27
<i>Cistinúria.....</i>	29
<i>Lisinúria amb intolerància a proteïnes</i>	29
<i>Malaltia de Hartnup</i>	30
<i>Altres.....</i>	31
Família de transportadors SLC43	32
LAT3 (SLC43A1).....	32
LAT4 (SLC43A2).....	34
EEG1 (SLC43A3)	34
MODELS ANIMALS	36
El ratolí com a animal d'experimentació	36
Models murins mutants ENU	37
Models murins mutants per transportadors d'aminoàcids.....	39
<i>Transportadors de la família HAT.....</i>	39
<i>Transportadors de la família Cat.....</i>	40
<i>Transportadors del sistema X_{AG}</i>	41
<i>Altres.....</i>	42
OBJECTIUS.....	45
MATERIALS I MÈTODES	49
Contingut de materials i mètodes	51

RESULTATS	109
1. IDENTIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DE LAT4.....	111
1.1. Identificació de LAT4	111
<i>Entorn genòmic.....</i>	<i>112</i>
<i>Generació de plasmidis amb LAT4</i>	<i>113</i>
<i>Anàlisi de la seqüència de LAT4.....</i>	<i>113</i>
<i>Localització tissular i subcel·lular.....</i>	<i>116</i>
1.2. Caracterització funcional	118
<i>Expressió funcional.....</i>	<i>118</i>
<i>Estudi cinètic de LAT4.....</i>	<i>121</i>
<i>Mecanisme de transport</i>	<i>122</i>
<i>Model cel·lular per LAT4</i>	<i>126</i>
2. CARACTERITZACIÓ DE EEG1 I ESTUDI DEL RATOLÍ MUTANT EEG1-Y221*	130
2.1. Caracterització de EEG1	130
<i>Generació de plasmidis amb EEG1.....</i>	<i>130</i>
<i>EEG1, tercer membre de la família SLC43.....</i>	<i>131</i>
<i>Entorn genòmic de SLC43A3- Genoma Homo Sapiens.....</i>	<i>131</i>
<i>Entorn genòmic de SLC43A3- Genoma Mus Musculus.....</i>	<i>133</i>
<i>Anàlisi de la seqüència de EEG1.</i>	<i>134</i>
<i>Localització tissular.....</i>	<i>136</i>
<i>Estudi de la possible funció com a transportador d'aminoàcids</i>	<i>137</i>
<i>Generació d'un anticòs contra mEEG1</i>	<i>138</i>
<i>Detecció de la proteïna.....</i>	<i>140</i>
2.2. Generació i fenotipació de la colònia mutant per EEG1.	144
<i>Fenotipació.....</i>	<i>145</i>
<i>Histologia bàsica</i>	<i>147</i>
<i>Anàlisi d'aminoàcids en l'orina i el plasma.....</i>	<i>152</i>
<i>Valoració d'aminoàcids intracel·lulars en hepatòcits</i>	<i>153</i>
DISCUSSIÓ	155
Identificació de nous transportadors d'aminoàcids	157
Identificació i caracterització funcional de LAT4.....	157
Paper de LAT4 en el sistema L	160
Possibles papers fisiològics de LAT4.....	161
EEG1, tercer membre de la família SLC43	163
EEG1, un transportador d'aminoàcids?.....	163
Necessita una altre proteïna?.....	164
Paper en la reabsorció?	166
EEG1 un transportador, però no d'aminoàcids?	167
EEG1 no és un transportador?.....	168

Model murí EEG1-Y221*	168
CONCLUSIONS	171
APÈNDIXS	175
Apèndix 1- Generació d'anticossos contra la proteïna LAT4.....	177
<i>Anticòs policlonal anti-pèptid</i>	<i>177</i>
<i>Anticòs policlonal anti-proteïna.....</i>	<i>179</i>
Apèndix 2: Anàlisi de mutacions en LAT4	183
Apèndix 3: Article: Bodoy et al., J. Biol. Chem., 2005.....	185
Apèndix 4: Article: Ristic et al., Am. J. Physiol. Renal Physiol., 2006 ...	197
Apèndix 5: Plasmidis generats.....	207
Apèndix 6: Llistat d'encebadors.....	209
BIBLIOGRAFIA.....	211

Índex de Figures

Introducció

Fig. 1 Representació esquemàtica dels transportadors heteromèrics d'aminoàcids (HAT).....	21
Fig. 2 Esquema dels transportadors implicats en la (re)absorció renal i intestinal d'aminoàcids..	28
Fig. 3 Esquema simplificat de les proteïnes/gens implicats en les aminoacidúries indicades..	30

Materials i mètodes

Fig. 4 <i>N</i> -Etil- <i>N</i> -nitrosoourea..	37
Fig. 5 Extracció d'òcits de <i>Xenopus Laevis</i> .	61
Fig. 6 Mecanisme de síntesi de cDNA amb l'oligonucleòtid SMART	76
Fig. 7 Esquema de SOE-PCR.	78
Fig. 8 Esquema i estructura general de la reacció del lligand amb el gel Sulfolink....	92
Fig. 9 Vector pGEX4T2 amb l'insert "6è loop mLAT4"	96
Fig. 10 Esquema de la proteïna EEG1 truncada a la tirosina 221 (Y221).	102
Fig. 11 Cromatograma de la seqüència de genotipació dels ratolins EEG1-Y221*.....	104
Fig. 12 Gàbia metabòlica per a un sol ratolí.....	105
Fig. 13 Aminograma patró i d'orina de ratolí	107
Fig. 14 Aminograma de plasma de ratolí.....	108

Resultats

Fig. 15 Entorn genòmic de SLC43A2 humà.....	112
Fig. 16 Entorn genòmic de SLC43A2 murí.	112
Fig. 17 Anàlisi filogenètic.....	113
Fig. 18 Multialineament de la família de transportadors SLC43..	114
Fig. 19 Detecció de <i>NHA</i> -LAT4 per western blot i immunofluorescència.....	115
Fig. 20 Northern blot humà i de ratolí del mRNA de LAT4.....	116
Fig. 21 Hibridació in situ del mRNA de LAT4 en ronyó i intestí.	117
Fig. 22 Expressió funcional de LAT4 en oòcits de <i>Xenopus Laevis</i>	118
Fig. 23 Dependència iònica del transport de L-[³ H]Phe en l'activitat de transport induït per LAT4.....	119
Fig. 24 Perfil d'inhibició de LAT4	120

Fig. 25 Efecte de la preincubació amb NEM en l'activitat de transport induïda per LAT4.....	121
Fig. 26 Anàlisi cinètic de l'activitat de transport induïda per LAT4.....	122
Fig. 27 Sortida de $L[{}^3H]Phe$ per LAT4	123
Fig. 28 Cinètica del transport de Phe via LAT4 i l'efecte del NEM	124
Fig. 29 Anàlisi de l'efecte del NEM en l'activitat de transport induïda per LAT4S297.. ..	125
Fig. 30 Efecte del NEM en els mutants de LAT4.	125
Fig. 31 Northern blot per LAT4 de diferents línies cel·lulars de placenta i ronyó	126
Fig. 32 Expressió de mRNA dels transportadors del sistema L.....	127
Fig. 33 Cinètica del transport de Phe en les cèl·lules PCT.	128
Fig. 34 Patró d'inhibicions en el transport de Phe i efecte del NEM a la cinètica transformada al gràfic d'Eadie-Hofstee	129
Fig. 35 Entorn genòmic de SLC43A3 humà.....	131
Fig. 36 Entorn genòmic de SLC43A3 murí	133
Fig. 37 Multialineament de 6 seqüències de EEG1 de diferents espècies.....	135
Fig. 38 Anàlisi del mRNA de EEG1 per northern blot.....	136
Fig. 39 Anàlisi del mRNA de EEG1 per RT-PCR.....	137
Fig. 40 Localització de la proteïna de fusió hEEG1HA a la membrana d'oòcits de <i>Xenopus</i>	137
Fig. 41 Assaig de transport de EEG1 en oòcits de <i>Xenopus</i>	138
Fig. 42 Predicció topològica d'EEG1 murí i localització dels pèptid antigènics.. ..	139
Fig. 43 Western blot de mostres que sobreexpressen mEEG1.	140
Fig. 44 Detecció de la proteïna mEEG1 endògena de teixits de ratolí per western blot amb l'anticòs α 2963 purificat.	142
Fig. 45 Detecció de la proteïna mEEG1 sobreexpressada en cèl·lules HeLa.	143
Fig. 46 Localització de hEEG1 en el ronyó humà	144
Fig. 47 Corba de creixement.. ..	146
Fig. 48 Dades metabòliques per sexes.....	147
Fig. 49 Tinció d'hematoxilina-eosina de diferents teixits de ratolins EEG1Y221*..	148
Fig. 50 Estudi histopatològic hepàtic.	149
Fig. 51 Estudi histopatològic renal.	151
Fig. 52 Valoració d'aminoàcids en orina	152
Fig. 53 Valoració d'aminoàcids en plasma.	153
Fig. 54 Contingut intracel·lular d'aminoàcids en hepatòcits	154

Discussió

Fig. 55 Arbre filogenètic de membres de diferents famílies de transportadors de soluts (SLC).....	158
Fig. 56 Esquema topològic predit per la proteïna LAT4 humana	159
Fig. 57 Esquema dels transportadors d'aminoàcids neutres implicats en la (re)absorció renal i intestinal d'aminoàcids.....	166

Apèndixs

Fig. 58 Diagrames d'hidrofobicitat, antigenicitat, flexibilitat i accessibilitat per LAT4.....	177
Fig. 59 Western blot amb α SP76 i α SP77 purificats.	178
Fig. 60 Esquema dels fragments fusionats amb la GST.	179
Fig. 61 Gel tenyit amb blau de Coomassie que mostra la purificació de GST-Ntal.....	180
Fig. 62 Gel tenyit amb blau de Coomassie i western blot de la part soluble i insoluble d'expressió del fragment de LAT4..	181
Fig. 63 Activitat de transport induïda per els mutants de LAT4..	184

Índex de Taules

Taula 1.	Sistemes de transport d'aminoàcids.....	17
Taula 2.	Resum de models murins mutants per transportadors d'aminoàcids ...	43
Taula 3.	Reaccions de RACE PCR.. ..	77
Taula 4.	Esquema dels dies d'injecció i sagnies dels conills immunitzats.	100
Taula 5.	Encebadors utilitzats per la genotipació de la colònia d'animals EEG1	103
Taula 6.	Cicles i temperatura de la PCR de genotipació per EEG1.....	103
Taula 7.	Número d'accés a diferents bases de dades per hEEG1.	132
Taula 8.	Entrades a diferents bases de dades per mEEG1.	134
Taula 9.	Herència Mendeliana i anàlisi χ^2	145
Taula 10.	Semiquantificació de lesions hepàtiques en animals EEG1Y221*.....	150
Taula 11.	Semiquantificació de lesions renals en animals EEG1Y221*	151
Taula 12.	Mutacions ENU per LAT4.	183

Llista d'abreviacions

- BCH:** àcid 2-aminobiciclo-[2.2.1]heptan-2-carboxílic
- BLAT:** *BLAST- Like Alignment Tool*
- BLAST:** *Basic Local Alignment Search Tool*
- BSA:** *Bovine Serum Albumine.*
- CCDS:** Consensus Coding DNA Sequence project
- cDNA:** DNA complementari a una seqüència de RNA sintetitzada a partir d'una reacció de retrotranscripció.
- cpm:** comptes per minut
- cRNA:** RNA complementari a una seqüència de DNA sintetitzada a partir d'una reacció de transcripció.
- DDBJ:** *DNA Data Bank of Japan*
- DEPC:** Dietilpirocarbonat
- DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
- DMSO:** *Dimetilsulfòxid*
- DNA:** Acrònim anglès d'àcid desoxirribonucleic
- dNTP:** Abreviatura que designa qualsevol desoxinucleòtid o barreja de dATP, dCTP, dGTP i dTTP a parts iguals.
- DTT:** Ditiotreitòl. Agent reductor i antioxidant, capaç de trencar els ponts disulfur
- EEG1:** *Embryonic epithelia gene 1*
- ENSEMBL:** Un projecte de EMBL-European Bioinformatics Institute i Wellcome Trust Sanger Institute (WTSI)
- ENU:** *N-etil-N-nitrosurea*
- ESTs:** *Expressed Sequence Tag*
- et al.:** Llatíisme abreviat que significa "i col·laboradors"
- ExpASY:** *Expert Protein Analysis System*
- FBS:** *Fetal Bovine Serum*
- GABA:** Àcid γ -aminobutíric
- GFP:** *Green Fluorescent Protein*
- HA:** Hemaglutinina
- HGNC:** *HUGO Gene Nomenclature Committee*
- HSNAT:** *Heavy Subunit of Heteromeric Amino acid Transporter*
- Kb:** Kilobases
- KDa:** kilodaltons
- KLH:** *Keyhole Limpet Hemocyanin*
- Km:** Constant de Michaelis
- LAT1:** *L-type Amino acid Transporter-1*

LAT2: *L-type Amino acid Transporter-2*
LAT3: *L-type Amino acid Transporter-3*
LAT4: *L-type Amino acid Transporter-4*
LB: *Medi Luria Broth o Luria-Bertani broth*
LSB: *Laemmli Sample Buffer*
MCS: *Multicloning site*
MGA: *N-metil-D-glucamina*
MGC: *Mamalian Gene Collection*
MGI: *Mouse Genome Informatics*
NEM: *N-etil maleimida*
mRNA: *àcid desoxiribonucleic missatger*
NCBI: *National Center for Biotechnology Information*
OK: *Opossum Kidney*
ORF: *Open Reading Frame*
PBS: *Phosphate Buffered Saline*
PCR: *Polimerase chain reaction*
PCT: *Proximal Convolutad Tubule*
PMSF: *Phenylmethylsulfonyl fluoride*
POV1: *Prostate Cancer Overexpressed gene 1*
PRG2: *Proteoglicà 2*
PRG3: *Proteoglicà 3*
rBAT: *related to b⁰⁺-amino acid transporter*
RefSeq: *Reference Sequence from NCBI*
RTN4RL2 : *Reticulon 4 receptor-like 2*
SDS: *Sodium dodecil sulfate*
SLC: *Solut Carrier Family*
SPF: *Specific Pathogen Free*
Vmax: *velocitat màxima*
UCSC: *University of California, Santa Cruz*

Introducció

La memòria d'aquesta tesi recull els resultats que han permès la identificació i caracterització dels dos membres de la família de transportadors d'aminoàcids SLC43, LAT4 i EEG1. El treball pretén avançar en el coneixement dels transportadors de soluts.

SISTEMES DE TRANSPORT D'AMINOÀCIDS EN MAMÍFERS

En la societat occidental, l'home pot arribar a incorporar fins un 30% de proteïnes a la seva dieta. Després de la digestió, els pèptids i aminoàcids resultants s'han d'absorbir eficientment als enteròcits de l'intestí prim. Dins les cèl·lules epitelials de l'intestí, els pèptids s'hidrolitzen formant els aminoàcids que posteriorment s'alliberaran al torrent sanguini mitjançant transportadors d'aminoàcids. Des de la sang, els aminoàcids es distribueixen a la resta de teixits de l'organisme, on serveixen per la síntesis de noves proteïnes, com a precursors d'una gran varietat de molècules bioactives i com a font d'energia metabòlica. En el ronyó, els aminoàcids lliures es filtren i es reabsorbeixen per evitar el malbaratament de metabòlits valuosos.

El transport dels aminoàcids a través de la membrana plasmàtica, ha estat àmpliament estudiat en diferents tipus de cèl·lules epitelials i no epitelials de diferents teixits. En la placenta, els transportadors d'aminoàcids subministren nutrients provinents de la sang materna a la sang fetal i ajuden a destoxificar-la. En el sistema nerviós central controlen selectivament el tràfic d'aminoàcids per tal de regular l'homeòstasi i participar en la transmissió nerviosa (Wagner *et al.* 2001). En el fetge tenen un paper clau en el cicle de la urea i és on té lloc la degradació dels aminoàcids a partir de transaminacions per donar lloc a la síntesi d'intermediaris de la gluconeogènesi, de cossos cetònics, de proteïnes del plasma sanguini, i moltes altres substàncies biològicament actives. Perquè aquestes funcions es puguin realitzar correctament, els aminoàcids han de ser transportats eficientment i específicament a través de les membranes cel·lulars mitjançant transportadors d'aminoàcids que els reconeguin, uneixin i transportin de l'interior a l'espai extracel·lular a la cèl·lula o viceversa (revisat a McGivan i Pastor-Anglada 1994; Palacín *et al.* 1998).

Estudis realitzats als anys 50 i 60 revelen que cada dia, per persona, s'absorbeixen en forma de pèptids i aminoàcids uns 300 g de proteïnes procedents de fonts endògenes i exògenes, i que només l'equivalent a 10 g apareix com a nitrogen fecal (Freeman i Kim 1978). Al jejúnum proximal de l'intestí és on s'absorbeixen la major part de pèptids i aminoàcids, i a la nefrona renal, concretament als túbuls proximals contornejats, és on té lloc la major part de la

reabsorció d'aquests nutrients. Al voltant del 95-99% dels aminoàcids són reabsorbits mitjançant transportadors d'aminoàcids. Basant-se en estudis funcionals i en perfils d'aminoàcids d'orina de pacients amb diferents aminoacidúries, es van proposar cinc activitats de transport diferents (Milne 1964; Young i Freedman 1971):

- 1) El sistema "neutre" o "sistema preferent per la metionina", per transportadors d'aminoàcids neutres.
- 2) El sistema "bàsic", per transportadors d'aminoàcids catiónics juntament amb cistina.
- 3) El sistema "àcid", per transportadors d'aspartat i glutamat.
- 4) El sistema "iminoglicina" pels transportadors de prolina, hidroxiprolina i glicina.
- 5) El sistema per " β -aminoàcids".

La denominació de "sistemes" per indicar activitats de transport d'aminoàcids s'utilitza per tal de classificar els transportadors d'aminoàcids indicant la seva especificitat de substrat i les seves propietats termodinàmiques. Els primers estudis en aquest sentit, els va realitzar Halvor N. Christensen (revisat a Christensen 1990) en cèl·lules no epitelials (principalment eritròcits, hepatòcits i fibroblast), on va descriure que cada sistema de transport reconeixia a grups d'aminoàcids enlloc d'aminoàcids individuals i que es tractava d'un transport estereoespecífic. A partir dels estudis de Christensen, es van descriure grups de transportadors que reconeixien aminoàcids neutres però preferentment la Leucina i altres aminoàcids grans, hidrofòbics i neutres: **Sistema L** (Oxender i Christensen 1963); un altre grup que reconeixia preferentment Alanina i altres aminoàcids petits, polars i neutres i es van anomenar: **Sistema A**; o Alanina, Serina i Cisteïna: **Sistema ASC** (Christensen 1975). Una nomenclatura especial (x per aniónics i y per catiónic) es va utilitzar per designar els sistemes de transport d'aminoàcids catiónics com a **Sistema y⁺**, i els aniónics com a **Sistema x_{AG}⁻**. Només amb algunes excepcions (Sistema L i T), es designa els sistemes Na⁺ dependents amb majúscules i amb la lletra i els acrònims indicatius de l'especificitat de substrat; i es representa amb minúscula els sistemes independents del ió Na⁺ (Bannai *et al.* 1984).

SISTEMA	cDNA	GEN	SUBSTRATS	ANÀLEGS	MECANISME
A	SNAT1	SLC38A1	G,A,C,N,H,S	MeAIB	Cotransport 1Na ⁺ /AA
	SNAT2	SLC38A2	G,P,A,S,C,Q,N,H,M		
	SNAT4	SLC38A4	G,A,S,C,Q,N,M		
ASC	ASCT1	SLC1A4	A,S,C	Àc.Cisteic	Antiport Na ⁺ - dependent
	ASCT2	SLC1A5	A,S,C,T,Q		
asc	4F2 hc/asc1	SLC3A2/SLC7A10	G,A,S,C,T	D-AA ^o , AIB	Antiport
	asc-2/?	SLC7A12	G,A,S,T		
B^o	B ^o AT1	SLC6A19	AA ^o	BCH	Cotransport Na ⁺
	B ^o AT2	SLC6A15	P,L,V,I,M		
B^{o,+}	ATB ^{o,+}	SLC6A14	AA ^o ,AA ⁺ ,β-Ala	BCH	Cotransport Na ⁺
b^{o,+}	rBAT/b ^{o,+} AT	SLC3A1/SLC7A9	AA ⁺ ,AA ^o ,O,Cistina		Antiport
β (beta)	GAT1	SLC6A1	GABA		Cotransport 2-3Na ⁺ /1Cl ⁻ /AA
	GAT2	SLC6A12	GABA,bet,P,β-Ala		
	GAT3	SLC6A13	GABA,bet,Tau		
	GAT4	SLC6A11	GABA, bet		
	TauT	SLC6A6	Tau, β-Ala		
Gly	GlyT1	SLC6A9	G		Cotransport 2-3Na ⁺ /1Cl ⁻ /AA
	GlyT2	SLC6A5			Desc.
	XT2	SLC6A18			
IMINO	SIT1	SLC6A20	P, HO-P	MeAIB	Na ⁺ , Cl ⁻
L	4F2hc/LAT1	SLC3A2/SLC7A5	H,M,L,I,V,F,Y,W	BCH	Antiport
	4F2hc/LAT2	SLC3A2/SLC7A8	AA ^o excepte P		Uniport
	LAT3	SLC43A1	L,I,M,F		
	LAT4	SLC43A2	L,I,M,F		
N	SNAT3	SLC38A3	Q,N,H		Cotransport Na ⁺ /AA acoplat antiport-H ⁺
	SNAT5	SLC38A5	Q,N,H,S,G		
PAT	PAT1	SLC36A1	P,G,A GABA, β-Ala	MeAIB	Simport H ⁺ /AA
	PAT2	SLC36A2	P,G,A		
	PAT3	SLC36A3	Desconegut	Desconegut	Desconegut
	PAT4	SLC36A4			
T	TAT1	SLC16A10	F,Y,W		Uniport
X⁻_{AG}	EAAT1	SLC1A3	E,D	D-Asp	Cotransport 3Na ⁺ /1H ⁺ /AA acoplat a K ⁺ -antiport
	EAAT2	SLC1A2			
	EAAT3	SLC1A1			
	EAAT4	SLC1A6			
	EAAT5	SLC1A7			
X⁻_c	4F2 hc/xCT	SLC3A2/SLC7A11	E, cistina,(D)		Antiport
y⁺	CAT-1	SLC7A1	R,K,O,H		Uniport
	CAT-2 (A/B)	SLC7A2	R,K,O,H		
	CAT-3	SLC7A3	R,L		
	CAT-4 (?)	SLC7A4	?		
y⁺L	4F2hc/y ⁺ LAT1	SLC3A2/SLC7A7	K,R,Q,H,M,L		Antiport 1Na ⁺ /AA
	4F2hc/y ⁺ LAT2	SLC3A2/SLC7A6	K,R,Q,H,M,L,A,C		

Taula 1. Sistemes de transport d'aminoàcids. O:ornitina, AA^o: aminoàcids neutres, OH-P: hidroxiprolina, bet: betaïna, AIB: àcid aminoisobutíric, MeAIB: àcid metil-aminoisobutíric, rBAT: related to b^{o,+}-aminoàcid transporter, 4F2hc: 4F2 heavy chain, PAT: Proton-coupled amino acid transporter, SLC: SoLute Carrier. Adaptada de (Palacín *et al.* 1998; Bröer 2008).

En la dècada dels 90, el desenvolupament de tècniques d'expressió funcional juntament amb l'impuls de la bioinformàtica, va permetre identificar gran nombre de transportadors d'aminoàcids per homologia d'ESTs i productes gènics. La seva caracterització funcional en sistemes d'expressió heteròlegs (majoritàriament oòcits de *Xenopus*) va facilitar l'associació als diferents sistemes de transport prèviament descrits, i se'ls va anomenar intentant mantenir la nomenclatura adoptada per cada sistema (Christensen *et al.* 1994).

A la Taula 1 apareixen els diferents sistemes i les isoformes clonades associades a cadascun d'ells. S'especifica el gen responsable, l'especificitat de substrat, si accepten algun anàleg d'aminoàcid i el mecanisme de transport.

La identificació molecular dels transportadors d'aminoàcids i de les proteïnes relacionades va seguir amb els estudis basats en la relació estructura-funció, amb les patologies genètiques moleculars associades a la manca o mal funcionament d'aquests transportadors i a la generació de diferents models animals per aquestes patologies.

Sistemes de transport d'aminoàcids neutres

Tal com es pot veure a la Taula 1, hi ha diferents sistemes de transport d'aminoàcids neutres (A, ASC, asc, B^o, L, T, N, Gly, β i IMINO). Part d'aquesta tesi està dedicada a la caracterització d'una proteïna que forma part del sistema de transport L. Per aquest motiu, a continuació, es descriu més àmpliament aquest sistema en particular.

Sistema L

El transport d'aminoàcids neutres a través de la membrana plasmàtica de la cèl·lula es va començar a estudiar en *Escherichia coli* (Cohen i Rickenberg 1956), llevats (Halvorson i Cohen 1958) i cèl·lules de tumor ascític d'Ehrlich (Tenenhouse i Quastel 1960). En aquest últim tipus cel·lular, va ser on es van descriure per primera vegada les característiques del sistema L: una activitat de transport d'aminoàcids neutres, sodi independent i inhibible per l'anàleg d'aminoàcids no metabolitzable BCH (*2-aminobicyclo(2,2,1) heptane-2-carboxylic acid*) (Oxender i Christensen 1963). En aquest mateix model cel·lular, es va observar que l'activitat del sistema L augmentava en incrementar la concentració de protons (Garcia-Sancho *et al.* 1977), i fins i tot es va arribar a postular un mecanisme de cotransport de leucina amb protons en un model de cèl·lules de fetge (Mitsumoto *et al.* 1986). Referent al mecanisme de transport d'aquest sistema, s'observà que la

presència de substrats a l'altre costat de la membrana estimulava el transport, fenomen conegut com a trans-estimulació (Oxender i Christensen 1963). S'ha descrit una àmplia especificitat de substrats pel sistema L, transportant fins i tot compostos farmacològics amb estructures similars als aminoàcids, com són la L-dopamina, melfalan, gabapentina i pregabalina (Uchino *et al.* 2002; Su *et al.* 2005).

El sistema L és ubic, identificat en multitud de cèl·lules i teixits com per exemple en intestí prim (Hidalgo i Borchardt 1990), còrnia (Jain-Vakkalagadda *et al.* 2003), placenta (Kudo i Boyd 2001), barrera hematoencefàlica (Omidi *et al.* 2008) i en els túbuls proximals del ronyó (Christensen 1990). En cèl·lules epitelials s'ha localitzat preferentment a la membrana basolateral, com per exemple en les originàries del túbul distal de ronyó de gos anomenades MDCK (Madin-Darby canine kidney) (Boerner *et al.* 1986), les cèl·lules procedents del túbul proximal de ronyó de porc, LLC-PK (Rabito i Karish 1982), biòpsies de jejú de rata perfós (Taylor *et al.* 1989), epiteli pancreàtic exocrí (Mann i Peran 1986) i de vesícules de membrana basolateral d'intestí (Wright *et al.* 1981; Lash i Jones 1984; Wilde i Kilberg 1991). Pel que fa a la membrana apical, l'activitat del sistema L només s'ha descrit en vesícules de membranes apicals de jejú de pollastre (Soriano-Garcia *et al.* 1998).

Des d'un punt de vista fisiològic, l'expressió del sistema augmenta per la confluència cel·lular, la proliferació, la depleció de sèrum i addició d'inhibidors de la síntesi proteica en cèl·lules 3T3 (Oxender *et al.* 1977; Petronini *et al.* 1982).

Inicialment, el sistema L es va descriure com un transport d'alta afinitat (rang micromolar), però posteriorment es van separar 3 variants en funció de la diferent afinitat pels aminoàcids neutres. En cultius primaris d'hepatòcits de rata adulta, es van descriure les variants L₁, que presentava una afinitat elevada (rang micromolar) i L₂, amb una afinitat per aminoàcids neutres més baixa (rang milimolar) (Weissbach *et al.* 1982). La variant L₃ s'ha descrit en cèl·lules 3T3 amb una afinitat intermitja entre les dues anteriorment comentades (Gandolfi *et al.* 1987).

Des de la identificació del sistema L (Oxender i Christensen 1963), els primers intents per clonar la proteïna responsable del transport van ésser fallits (Cecchini *et al.* 1977; Segel *et al.* 1984). La història va donar un gir, quan el grup de S. Bröer va clonar la proteïna 4F2hc (CD98) com a responsable de l'activitat del sistema L mitjançant l'expressió en oòcits de *Xenopus Laevis* d'una llibreria de cDNAs derivada de cèl·lules C6-BU-1 de glioma de rata (Bröer *et al.* 1995). A part d'aïllar el mRNA responsable de la inducció de l'activitat L, també van demostrar que s'inhibia amb oligonucleòtids antisentit específics per el cDNA d'aquesta proteïna. En el seu moment, aquests resultats semblaven contradir els publicats

anteriorment sobre la inducció d'activitat γ^+ L amb l'expressió de 4F2hc, també en oòcits de *Xenopus* (Bertran *et al.* 1992).

No va ser fins el 1998 amb la clonació de la permeasa LAT1 (inicialment anomenada ASUR4), que es va identificar el primer complex heterodimèric format per 4F2 de cadena pesada (4F2hc) i LAT1 de cadena lleugera, com a responsables d'una activitat de transport compatible amb el sistema L (Kanai *et al.* 1998; Mastroberardino *et al.* 1998). Aquesta permeasa va ser el primer membre d'una nova família de transportadors d'aminoàcids que formaven heterodímers amb una glicoproteïna integral de membrana plasmàtica (4F2hc o rBAT). Es va demostrar bioquímicament que la unió de les dues proteïnes era covalent mitjançant un pont disulfur, i que calia la co-expressió de les dues proteïnes per una correcta expressió funcional a la membrana de la cèl·lula (Mastroberardino *et al.* 1998).

La segona permeasa que es va caracteritzar, que s'associava a 4F2hc i induïa una activitat de transport de tipus L va ser LAT2 (Pineda *et al.* 1999; Rossier *et al.* 1999; Segawa *et al.* 1999). Més endavant de la introducció es detallen les característiques funcionals de LAT1 i LAT2, però cal destacar que en els dos casos, es tracta d'heterodímers que funcionen com a bescanviadors obligatoris d'aminoàcids neutres i que pertanyen a la família HAT (*Heteromeric Amino acid Transporter*).

A partir de l'any 2000, amb el gran augment de transportadors molecularment identificats, va ser necessari homogeneïtzar la nomenclatura d'aquests transportadors. Des de l'Organització del Genoma Humà (HUGO) es va consensuar una nomenclatura basada en els gens codificants de proteïnes pertanyents a famílies de transportadors de soluts. S'utilitza l'arrel SLC (de SoLute Carrier), seguit del número corresponent a la família "genètica" a la que pertany, la lletra A, que actua de separador, i finalment el número del transportador (Hediger *et al.* 2004). Seguint la nova nomenclatura, la subunitat pesada 4F2hc pertany a la família SLC3 i s'anomena SLC3A2, i les subunitats lleugeres a la família SLC7, concretament, LAT1 i LAT2 s'anomenen respectivament, SLC7A5 i SLC7A8.

El 2003, es va identificar una segona i nova família de transportadors d'aminoàcids anomenada SLC43, que també transportava aminoàcids neutres amb característiques compatibles amb les descrites pel sistema L (Babu *et al.* 2003). El primer membre clonat de la família fou LAT3 (SLC43A1) i a diferència de LAT1 i LAT2 que actuen de bescanviadors obligatoris, LAT3 media un transport uniport amb la capacitat de generar un flux net d'entrada o de sortida d'aminoàcids.

La identificació i caracterització del segon membre de la família, SLC43A2 anomenat LAT4, així com la caracterització i estudi d'un model mutant en ratolí per

el tercer membre, SLC43A3, es descriuen en els capítols de Resultats i Discussió d'aquesta memòria.

A continuació es descriuen les dues famílies de transportadors d'aminoàcids responsables de l'activitat del sistema L: la família de transportadors heteromèrics d'aminoàcids (HAT), la qual inclou dues famílies gèniques diferents (SLC3 i SLC7) i la família SLC43.

Transportadors heteromèrics d'aminoàcids (HAT)

Com ja s'ha comentat anteriorment, els transportadors d'aminoàcids es classifiquen en sistemes en funció de la seva homologia de seqüència i de les seves propietats funcionals, com l'especificitat de substrat, el mecanisme de transport i la dependència de ions. La família a la qual pertanyen els transportadors d'aminoàcids neutres LAT1 i LAT2 es caracteritza per la seva estructura heteromèrica i per això, també s'anomena família de Transportadors Heteromèrics d'Aminoàcids (HAT, *Heteromeric Amino acid Transporter*).

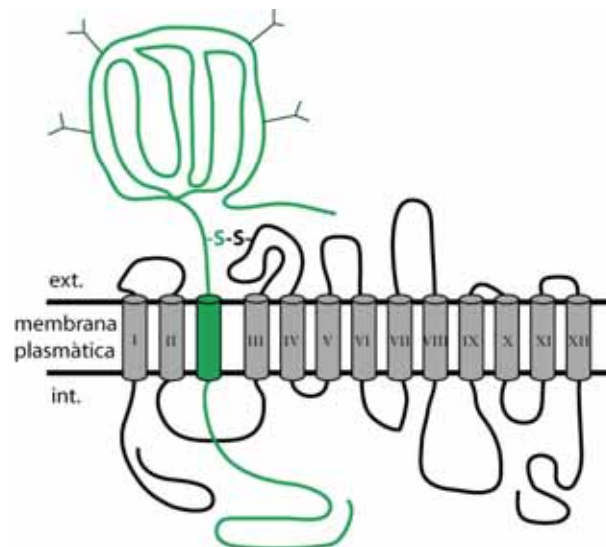


Fig. 1 Representació esquemàtica dels transportadors heteromèrics d'aminoàcids (HAT). La subunitat pesada (HSHAT, de color verd) està unida per un pont disulfur a la subunitat lleugera (LSHAT, de color gris i negre). Les cisteïnes implicades a la unió mitjançant el pont disulfur es localitzen a l'espai extracel·lular (ext), després del segment transmembrana de la HSHAT i en el segon domini extracel·lular de la subunitat lleugera. El domini extracel·lular de la HSHAT és homòleg a les glucosidases i s'indiquen possibles llocs de glicosilació (Y).

La unitat funcional està formada, com a mínim, per una subunitat pesada (*Heavy Subunit Heteromeric Amino acid Transporter*, HSHAT de la família SLC3) i una subunitat lleugera (*Light Subunit Heteromeric Amino acid Transporter*, LSHAT

de la família SLC7) unides per un pont disulfur conservat en tots els membres de la família (Fig.1) (Chillarón *et al.* 2001; Wagner *et al.* 2001; Verrey *et al.* 2004)

L'estructura heteromèrica d'aquesta família i les activitats de transport induïdes per aquesta, s'han conservat al llarg de l'evolució. S'ha identificat l'homòleg a LAT1 (SPRM1) de *Schistosoma mansoni* (40% homòleg a l'humà), s'ha comprovat que s'associa a 4F2hc i que té activitat de transport de tipus L (Mastroberardino *et al.* 1998). També s'han caracteritzat dos homòlegs (AAT-1 i AAT-3) de LSHAT i un homòleg (ATG-2) de HSHAT, del genoma del nematode *C. elegans*, com a primers membres invertebrats de la família HAT (Veljkovic *et al.* 2004). L'expressió en oòcits de *X. Laevis* d'aquests homòlegs, indueix una activitat de transport sodi independent similar a la del sistema L caracteritzada en mamífers.

Actualment, la família HAT consta de 2 membres de la família HSHAT i 10 membres per la família de cadenes lleugeres LSHAT (revisada a (Palacín *et al.* 2005). A continuació es detallen les característiques dels membres implicats en el transport d'aminoàcids neutres tipus L, així com de rBAT, per la rellevància de la proteïna en els processos de (re)absorció renal i intestinal que també s'expliquen en aquesta tesi.

Subunitats pesades (HSHATs)

Les subunitats pesades formen la família SLC3 representada per només 2 membres: SLC3A1, que codifica per la proteïna rBAT (*related to b⁰⁺ Amino acid Transporter*) i SLC3A2, que codifica per 4F2hc (*heavy chain of the surface antigen 4F2 o CD98 o fusion regulatory protein 1 (FRP1)*).

Les dues proteïnes comparteixen característiques estructurals i funcionals. Es tracta de *N*-glicoproteïnes de membrana de tipus II, amb l'extrem NH₂ terminal intracel·lular, un domini *trans*-membrana i l'extrem COOH terminal extracel·lular (Fig. 1) (Hemler i Strominger 1982; Bertran *et al.* 1992). El residu de cisteïna que participa en la formació del pont disulfur es troba situat a 4-5 posicions de l'extrem de l'únic domini transmembrana en direcció a l'extrem COOH terminal. Presenten un domini voluminós extracel·lular similar a les α -amilases i en el cas de 4F2hc, s'ha observat que és capaç d'homodimeritzar, a part d'heterodimeritzar amb les cadenes lleugeres (Fort *et al.* 2007).

El paper fisiològic de la subunitat pesada sembla estar relacionat amb el reconeixement de la subunitat lleugera i la seva conducció cap a la membrana plasmàtica, de fet, la subunitat lleugera no arriba a la membrana plasmàtica si no interactua amb la pesada (Feliubadaló *et al.* 1999; Nakamura *et al.* 1999; Bartoccioni *et al.* 2008). La substitució a serina de la cisteïna (C103S) implicada en

el pont disulfur d'unió de 4F2hc amb la subunitat lleugera, no altera l'expressió de l'heterodímer a la membrana. Aquest fet indica que existeixen altres interaccions importants no covalents entre les dues proteïnes (Estevez *et al.* 1998; Pfeiffer *et al.* 1998).

rBAT (SLC3A1)

Al 1992, es va identificar el primer membre de la família de transportadors HAT anomenat rBAT o també NBAT o D2 (Bertran *et al.* 1992; Tate *et al.* 1992; Wells i Hediger 1992). L'expressió de la proteïna en oòcits de *Xenopus laevis* induïa una activitat de transport d'aminoàcids similar a la descrita anteriorment pel sistema $b^{0,+}$ (Van Winkle *et al.* 1988), o sigui, d'aminoàcids dibàsics, neutres i de cistina, sodi independent. rBAT s'expressa principalment al ronyó i a l'intestí prim, tot i que també es detecta el missatger en fetge, pàncrees i cervell (Bertran *et al.* 1993; Lee 1993). Per estudis d'immunocitoquímica es va mostrar que rBAT es localitza a la membrana apical de les cèl·lules epitelials d'intestí i de túbul proximal de ronyó (Kanai *et al.* 1992; Furriols *et al.* 1993).

Per la seva funció de transport i el patró d'expressió, rBAT es va relacionar amb la malaltia hereditària cistinúria, provocada per un defecte en la reabsorció de cistina i aminoàcids dibàsics a la nefrona renal. Efectivament, es van trobar mutacions en el gen SLC3A1 causants de la cistinúria (Calonge *et al.* 1994). Actualment, es classifica com a cistinúria de tipus A, la que prové de mutacions en el gen SLC3A1, i cistinúria tipus B la que és causada per mutacions en el gen SLC7A9 ($b^{0,+}AT$, subunitat lleugera de rBAT) (Dello Strologo *et al.* 2002).

S'han identificat diversos models animals per la cistinúria (revisat a Segal i Thier 1995). El primer en aparèixer ja al 1983, i el més estudiat, és el model caní on s'han identificat diferents mutacions naturals en el gen SLC3A1 (Henthorn *et al.* 2000) i en SLC7A9, tot i que no es descarta la implicació d'altres gens en la cistinúria en gossos (Harnevik *et al.* 2006). Posteriorment, s'han generat dos models murins tant pel que fa a la cistinúria de tipus A com B (Feliubadaló *et al.* 2003), més adequats per estudis bioquímics i genètics i que es detalla més endavant a la introducció.

4F2hc (SLC3A2)

El cDNA de 4F2hc va ser clonat a partir de l'ús d'un anticòs monoclonal dissenyat contra un antígen de superfície de cèl·lules de limfoblastoma (Hemler i Strominger 1982), però després de la identificació de rBAT i gràcies a la seva alta identitat de seqüència, es va plantejar si 4F2hc també podia induir activitat de transport en oòcits de *Xenopus*. Efectivament, l'expressió de 4F2hc va provocar un

augment en el transport d'aminoàcids simulant una activitat prèviament descrita en eritròcits i coneguda com a sistema y^+L (Bertran *et al.* 1992; Wells i Hediger 1992). Estudis posteriors, van demostrar que el responsable del transport no era la introducció exògena de la cadena pesada sinó l'expressió endògena en *Xenopus* de la cadena lleugera (Estevez *et al.* 1998) identificada posteriorment com a SLC7A7 (y^+LAT1), i que el paper de 4F2 en aquest entorn, és el d'augmentar l'arribada a la superfície cel·lular de la cadena lleugera, així com incrementar l'activitat de transport (Torrents *et al.* 1998).

Actualment, es coneixen 6 subunitats lleugeres que s'uneixen a 4F2hc per formar l'heterodímer capaç d'induir activitat de transport d'aminoàcids. Aquestes són LAT1, LAT2, y^+LAT1 , y^+LAT2 , asc-1 i xCT (revisat a Palacín *et al.* 2005). Concretament, la unió de 4F2hc amb LAT1 i LAT2 indueix una activitat tipus L de transport d'aminoàcids neutres. L'heterodimerització amb y^+LAT1 i y^+LAT2 provoca l'activitat de transport d'aminoàcids del sistema y^+L , o sigui un intercanvi obligatori d'aminoàcids bàsics sodi independent per aminoàcids neutres dependents de sodi amb elevada afinitat. Cal destacar la importància del transportador SLC7A7/SLC3A2 (y^+LAT1 /4F2hc) en l'intestí, ronyó, pulmons i leucòcits, perquè mutacions en la subunitat lleugera causen la patologia autosòmica recessiva multisistèmica anomenada Lisinúria amb Intolerància a les Proteïnes (LPI) (Torrents *et al.* 1998; Borsani *et al.* 1999).

L'expressió de 4F2hc, a diferència de rBAT, és ubiqua i sembla estar present en totes les cèl·lules i en línies cel·lulars tumorals (Parmacek *et al.* 1989; Nakamura *et al.* 1999). Una segona diferència es troba en la localització subcel·lular de la proteïna, a la cara basolateral de les cèl·lules epitelials del túbul proximal del ronyó (Quackenbush *et al.* 1987; Rossier *et al.* 1999).

4F2hc és una proteïna multifuncional. És ja evident, que 4F2 té altres funcions apart del seu paper en el tràfic de les LSHAT a la membrana plasmàtica (revisat a Deves i Boyd 2000; Boyd 2008). S'ha demostrat que els dominis citolasmàtic i transmembrana de 4F2 estan implicants en funcions de les integrines i que el domini extracel·lular és el responsable de l'activitat de transport d'aminoàcids (Fenczik *et al.* 2001). També s'ha descrit l'expressió de 4F2 en diferents teixits marcadament proliferatius, i se l'ha involucrat en processos de senyalització depenent d'integrines que provoquen la formació de tumors (Feral *et al.* 2005). S'ha descrit la seva interacció amb el domini citoplasmàtic de la integrina $\beta 1A$ (Fenczik *et al.* 1997) i la seva implicació en la senyalització d'adhesió cel·lular (Prager *et al.* 2007). Aquest fet pren especial rellevància al relacionar el paper de 4F2 en metastasi de tumors epitelials (carcinoma) (Boyd 2008). Altres processos en què s'ha implicat 4F2, és en l'activació immunològica de macròfags per la via

alternativa via galectina-3 (MacKinnon *et al.* 2008) i en processos d'adhesió i fusió cel·lular també per la seva unió a galectina-3, especialment en la placenta (Dalton *et al.* 2007).

Subunitats lleugeres (LSHATs)

Les subunitats lleugeres de la família HAT pertanyen a la gran superfamília de transportadors coneguda amb el nom d'APC (transportadors d'Aminoàcids, Poliamines i organoCations) que inclou més de 250 membres tant eucariotes com procariotes (Jack *et al.* 2000). Pel que fa a la classificació gènica, comparteixen la família SLC7 amb els transportadors d'aminoàcids catiónics CATs (Verrey *et al.* 2004). Fins el moment s'han identificat 10 LSHATs (*Light Subunit Heteromeric Amino acid Transporter*), 6 de les quals (LAT1, LAT2, γ^+ LAT1, γ^+ LAT2, asc-1 i xCT) s'uneixen a 4F2hc per donar lloc al transportador heteromèric funcional. Sols un membre de les cadenes lleugeres s'uneix a rBAT (b^{0+} AT) i a diferència de les anteriors es localitza a la cara apical de les cèl·lules epitelials del ronyó i l'intestí prim (Feliubadaló *et al.* 1999). Finalment, els tres membres restants, asc-2, arpAT i AGT1, mitjançant la co-expressió o la formació de proteïnes de fusió amb una de les cadenes pesades (rBAT o 4F2hc), s'ha demostrat que indueixen activitat de transport, tot i no identificar-se fins el moment la proteïna que l'acompanya en condicions fisiològiques (Chairoungdua *et al.* 2001; Matsuo *et al.* 2002). Cal destacar que arpAT s'ha identificat en ronyó de ratolí i es un dels gens silenciats durant l'evolució dels primats i per tant no s'expressa en humans (Fernández *et al.* 2005).

L'estructura de les LSHAT (SLC7A5-14) consta de 12 segments transmembrana, no són proteïnes glicosilades i conserven una cisteïna a la posició correcta per la formació de la unió covalent amb la subunitat pesada. Necessiten una glicoproteïna de la família SLC3 per arribar a la membrana, i elles són la subunitat catalítica, tal com es demostra en la reconstitució de la proteïna b^{0+} AT en proteoliposomes, la qual és capaç d'induir activitat de transport sense la subunitat pesada (Reig *et al.* 2002).

LAT1 (SLC7A5)

LAT1, com ja s'ha comentat anteriorment, va ser el primer membre de les LSHAT identificat. Paral·lelament en dos grups es va clonar per expressió funcional en oòcits de *X. Laevis* el cDNA d'una proteïna que presentava la capacitat de transportar aminoàcids neutres i grans, quan s'expressava amb 4F2hc (Kanai *et al.* 1998; Mastroberardino *et al.* 1998). Tal com s'havia descrit per l'activitat del sistema L (Oxender i Christensen 1963) el transport induït era sodi i clorur

independent i inhibible per BCH. La seva selectivitat de substrats és relativament àmplia: aminoàcids neutres de cadena ramificada i aromàtica, amb constants d'afinitat aparents bastant altes, en el rang micromolar (Kanai *et al.* 1998; Meier *et al.* 2002), tot i que els valors de K_m varien en funció del cantó de la membrana estudiat (Verrey *et al.* 2000). Les característiques de LAT1, el classifiquen dins el subsistema L_1 (Weissbach *et al.* 1982; Novak *et al.* 1994).

L'heterodímer LAT1/4F2hc funciona mitjançant un mecanisme d'intercanvi obligatori, o sigui, que no permet la sortida d'aminoàcid en absència d'aminoàcid extracel·lular. La funció de captació és altament *trans*-estimulada per aminoàcids intracel·lulars amb una estequiometria d'intercanvi de 1:1 (Meier *et al.* 2002). Aquest mecanisme indica que LAT1/4F2hc té una funció més destinada a equilibrar les concentracions relatives de diferents aminoàcids, que no pas de captació o sortida neta a través de la membrana (Meier *et al.* 2002; Verrey 2003).

LAT1 s'expressa en gran diversitat de teixits i en cèl·lules no epitelials com ara el cervell (a la barrera hematoencefàlica), placenta, ovari, pulmó, melsa, testicles, fetge, múscul esquelètic, estómac i colon (Kanai *et al.* 1998; Nakamura *et al.* 1999; Prasad *et al.* 1999), i més recentment s'ha estudiat el seu paper a la retina (Atluri *et al.* 2008). LAT1 també s'expressa en moltes línies cel·lulars tumorals, en cèl·lules en proliferació i en tumors primaris humans (Wolf *et al.* 1996; Yanagida *et al.* 2001; Fuchs i Bode 2005); i per aquest motiu, s'ha senyalat a LAT1 com a possible marcador tumoral i diana terapèutica (Campbell i Thompson 2001; Storey *et al.* 2005; Kaira *et al.* 2008). Un altre tret destacable és la capacitat de reconèixer i transportar drogues: L-dopa, fàrmac utilitzat en Parkinson; hormones tiroïdals; gabapentina, droga anticonvulsiva; melfalan, agent anticancerós; S-nitrosotiols, etc... i en aquest sentit s'han realitzat diversos estudis farmacocinètics (Li i Whorton 2005; Kuhne *et al.* 2007).

LAT2 (SLC7A8)

La segona isoforma identificada del sistema L, va ser LAT2, una proteïna de 535 aminoàcids, altament expressada a la membrana basolateral de cèl·lules epitelials polaritzades de ronyó i d'intestí prim (Pineda *et al.* 1999; Rossier *et al.* 1999; Segawa *et al.* 1999). LAT2 s'associa a 4F2hc i té una activitat de transport de tipus L amb un rang de selectivitat de substrats encara major que LAT1, ja que engloba tots els aminoàcids neutres, inclosos els petits i l'inhibidor específic del sistema L, BCH. A diferència de LAT-1 amb una activitat de transport independent de pH (Prasad *et al.* 1999), LAT-2 mostra un augment d'afinitat pels seus substrats a pH àcid (Segawa *et al.* 1999; Rajan *et al.* 2000). Aquesta dependència de pH ja havia estat descrita pel sistema L (Garcia-Sancho *et al.* 1977; Mitsumoto *et al.*

1986). L'heterodímer actua com a bescanviador obligatori d'aminoàcids neutres sodi independent amb unes constants d'afinitat aparents asimètriques a les dues bandes de la membrana (Meier *et al.* 2002). La concentració d'aminoàcids intracel·lulars controlen l'activitat amb una afinitat citosòlica d'entre 3-30 mM i una afinitat en el rang micromolar per la unió dels substrats a la cara extracel·lular (Segawa *et al.* 1999).

El mRNA s'expressa majoritàriament en òrgans amb barreres epitelials, com el ronyó, intestí prim i placenta. En menor quantitat, també s'ha detectat transcrit a testicles, pròstata, ovaris, cervell, múscul esquelètic (Pineda *et al.* 1999; Segawa *et al.* 1999) i també en astròcits de rata (Kim *et al.* 2004). Immunolocalitzacions mostren la proteïna de ratolí a la cara basolateral de les cèl·lules del túbul proximal de ronyó i a les epitelials de l'intestí prim, colocalitzant amb 4F2hc (Rossier *et al.* 1999). Precisament per aquesta localització basolateral en cèl·lules epitelials polaritzades, la principal funció descrita per LAT2 és la contribució al flux trans-epitelial i a la (re)absorció d'aminoàcids (Fernández *et al.* 2003). En la placenta, s'ha descrit la localització de LAT1 a la membrana apical i de LAT2 a la membrana basolateral dels sincitiotrofoblasts permeten un flux net transplacentari i implicant LAT2 en la regulació de l'activitat enzimàtica de la indolamina 2,3-dioxigenasa mitjançant el transport de triptòfan (Kudo i Boyd 2001).

La (re)absorció a nivell renal i intestinal es descriu amb més detall al següent apartat, ja que part d'aquesta tesi ha estat encarada a la identificació de nous transportadors que poguessin tenir un paper rellevant en aquest procés.

Reabsorció renal i intestinal d'aminoàcids. Aminoacidúries

Els epitelis intestinal i renal estan formats per cèl·lules polaritzades, amb diferents proteïnes de membrana diferencialment distribuïdes a les cares apical i basolateral de la membrana. Els transportadors d'aminoàcids localitzats específicament a aquestes dues membranes són capaços de generar un transport vectorial, contra el gradient de concentració i a favor del gradient electroquímic de sodi, del lumen a l'espai extracel·lular de la sang. Aquest transport net és molt eficient i concretament als túbuls proximals del ronyó, el 99% dels aminoàcids lliures filtrats pel glomèrul són reabsorbits, i per tant, retinguts a l'organisme (Ullrich *et al.* 1974).

A la Fig. 2 es mostra un esquema dels transportadors responsables de la reabsorció d'aminoàcids, els quals, en la majoria dels casos són els mateixos al ronyó i a l'intestí. Una diferència la trobem en l'expressió de les isoformes PepT1 i PepT2 a l'intestí prim i al ronyó, respectivament, que reconeixen substrats

essencialment iguals però amb afinitats diferents (revisat a Daniel i Kottra 2004). Aquests transportadors són els responsables de l'entrada de di- i tripèptids, així com de drogues amb estructures similars, per la cara apical de la cèl·lula on posteriorment tindrà lloc una hidròlisi intracel·lular. Una segona diferència es localitza en l'expressió de PAT1 i PAT2 en el ronyó, mentre que a l'intestí només s'hi troba present el transportador PAT1 (revisat a Bröer 2008) .

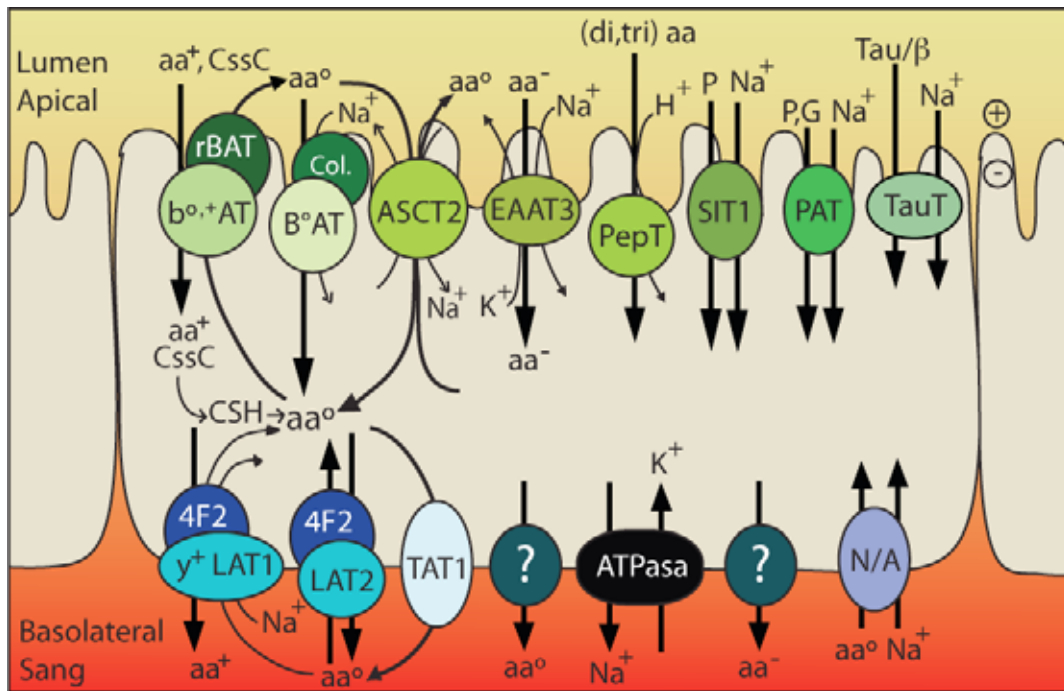


Fig. 2 Esquema dels transportadors implicats en la (re)absorció renal i intestinal d'aminoàcids. Es mostra el flux transepitelial de diferents grups d'aminoàcids: aa⁰: neutres, aa⁺: catiónics, aa⁻: aniònics, P: prolina, G: glicina, (di,tri)aa: di-, tripèptids, CysC: cistina i CSH: cisteïna. A la cara apical es mostra l'heterodímer b⁰+AT amb rBAT, B⁰AT amb la col·lectrina, ASCT2 (transportador del sistema ASC), EAAT3 (transportador del sistema X_{AG}), PepT (PeptT1/2, transportador de pèptids 1 o 2), SIT1 (transportador del sistema IMINO), PAT (PAT1/2, transportador de protons i aminoàcids) i TauT (transportador de taurina i β-aminoàcids). A la cara basolateral es mostra l'heterodímer y⁺LAT1 amb 4F2 i el format per LAT2 i 4F2, TAT1 (Transportador d'aminoàcids aromàtics), dos transportadors no identificats (?) i els transportadors de la família SNAT (N/A). (Adaptada de (Palacín *et al.* 2005).

L'estudi de la reabsorció renal i l'absorció intestinal d'aminoàcids, està directament relacionat a les patologies associades a alteracions en els transportadors responsables d'aquesta funció (Fig. 3). La patofisiologia de les aminoacidúries ens ha ensenyat molt sobre la fisiologia del transport epitelial i les seves bases moleculars han avançat paral·lelament a la identificació dels gens responsables d'aquestes patologies.

Cistinúria

Mutacions en el bescanviador apical del sistema b^{0+} (l'heterodímer rBAT- b^{0+} AT) condueixen a una hiperecreció de cistina i d'aminoàcids dibàsics en humans, patologia coneguda com a cistinúria (Calonge *et al.* 1994; Feliubadaló *et al.* 1999). S'han descrit casos de cistinúria en diferents espècies com són els llops (Bové *et al.* 1981), gats (DiBartola *et al.* 1991) i gossos (Henthorn *et al.* 2000). Aquesta patologia es caracteritza per la presència de quantitats excessives d'arginina, lisina, ornitina i cistina a l'orina. L'únic símptoma de la malaltia és la formació de cristalls de cistina al tracte urinari (urolitiasi) degut a la baixa solubilitat de l'aminoàcid en aquest medi. Tornant a l'esquema de la (re)absorció, mutacions en els dos membres responsables de l'activitat b^{0+} (rBAT i b^{0+} AT) provoquen un defecte en l'absorció d'aminoàcids dibàsics a l'intestí i una acumulació d'aquests i de cistina a l'orina, tal com s'ha observat en pacients cistinúrics. Com es pot observar en la Fig. 2, el transport d'aminoàcids dibàsics i cistina per la cara apical de la cèl·lula, és un transport electrogènic d'intercanvi d'aminoàcids bàsics (d'entrada) per aminoàcids neutres (sortida). Aquest intercanvi està afavorit pel potencial de membrana (negatiu dins la cèl·lula), per l'alta concentració intracel·lular d'aminoàcids neutres degut probablement a l'entrada per B⁰AT1, i per la reducció de cistina a cisteïna (revisat a Palacín *et al.* 2005). Cal destacar que la cistinúria no va acompanyada de malnutrició, possiblement degut a l'entrada de di- i tripèptids per PepT1 (Daniel 2004).

Lisinúria amb intolerància a proteïnes

Mutacions en el gen SLC7A7 (y^{+} LAT1) provoquen la lisinúria amb intolerància a proteïna (LPI)(Fig. 3)(Torrens *et al.* 1998; Borsani *et al.* 1999). El transport basolateral mediat per y^{+} LAT1-4F2hc és d'alta afinitat (μ M) per aminoàcids dibàsics (sortida) bescanviats per aminoàcids neutres i sodi (entrada), i representa juntament amb l'acció de b^{0+} AT/rBAT a la cara apical, la reabsorció neta total d'aminoàcids dibàsics a la cèl·lula (Fig. 2). La LPI és una patologia caracteritzada per l'excreció massiva d'aminoàcids dibàsics (sobretot lisina), intolerància a proteïnes, nivells baixos d'aminoàcids bàsics en plasma, desordres multisistèmics greus com la proteïnosi alveolar, glomerulonefritis, hiperamonèmia, hepatoesplenomegàlia, osteoporosis, etc... (Simell *et al.* 1975). Es coneix que el cicle de la urea està alterat degut a la reduïda disponibilitat d'arginina i ornitina, dos intermediaris del cicle. Per aquest motiu, el tractament que s'ofereix a pacients de LPI és una dieta baixa en proteïnes i suplementada amb citrul·lina, un precursor d'arginina i ornitina (Lukkarinen *et al.* 2003).

Malaltia de Hartnup

Mutacions en el gen SLC6A19 (B⁰AT1) provoquen la malaltia de Hartnup (Fig. 3)(Kleta *et al.* 2004; Seow *et al.* 2004). El transportador apical B⁰AT1 és el responsable de l'entrada apical d'aminoàcids neutres a la cèl·lula epitelial renal i intestinal, de manera depenent de sodi i amb baixa afinitat (mM), corresponent al sistema B⁰ (Bröer *et al.* 2004). Els pacients de la malaltia de Hartnup presenten hiperexcreció i mala absorció d'aminoàcids neutres, i en alguns casos mostren signes i símptomes de la pel·lagra, com són atàxia cerebral intermitent, erupcions cutànies fotosensibles i comportament psicòtic entre d'altres. Aquests símptomes, generalment considerats com a resultat de la deficiència de niacina, es postula que poden ser deguts a la deficiència de triptòfan com a precursor de la niacina i la serotonina (revisat a Levy 2001). En el cas de B⁰AT1 mutat, l'entrada d'aminoàcids neutres es redueix, però més especialment els neutres aromàtics i de cadena llarga per la incapacitat de ser transportats per ASCT2 (Fig. 2).

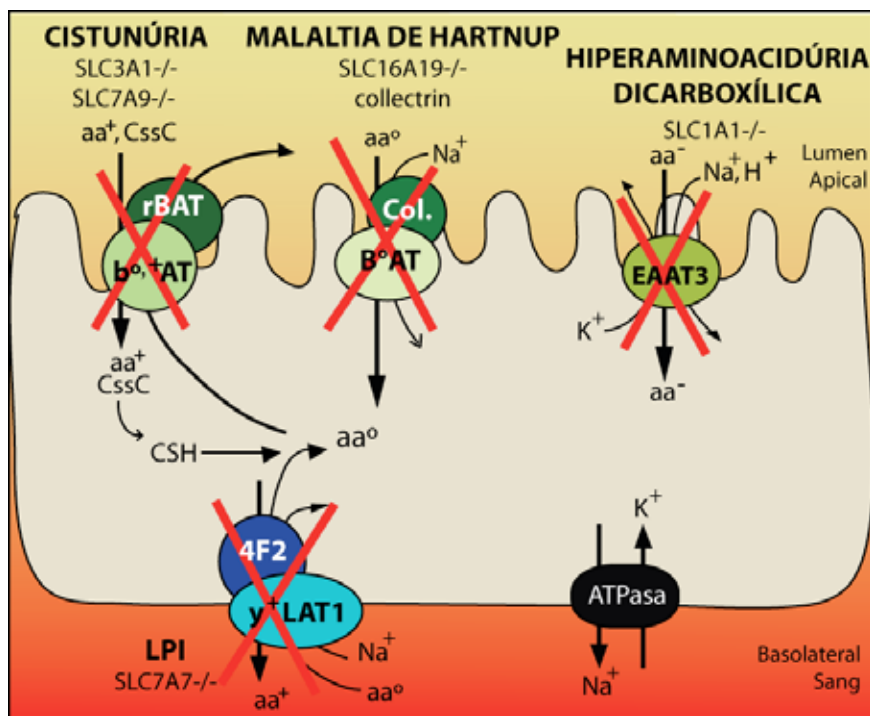


Fig. 3 Esquema simplificat de les proteïnes/gens implicats en les aminoacidúries indicades. Es mostra una cèl·lula epitelial amb la cara apical i basolateral diferenciades. Es representen els transportadors d'aminoàcids amb boles de colors, els gen mutats (SLC_A^{-/-}) i les patologies associades. Fins el moment, només per la cistinúria, la lisinúria amb intolerància a proteïnes (LPI) i la malaltia de Hartnup s'han trobat mutacions als gens responsables de causar la malaltia en humans. Mitjançant l'aproximació d'animals mutants s'ha generat un model EAAT3^{-/-} que causa una aminoacidúria dicarboxílica en ratolí. aa⁰: aminoàcids neutres, aa⁻: aminoàcids àcids, aa⁺: aminoàcids bàsics, C5sC: cistina, CSH: cisteïna. Amb una bola negra es representa la sodi-potassi ATPasa.

El diagnòstic de la malaltia de Hartnup és la presència d'elevats nivells d'aminoàcids neutres a l'orina i la femta, però interessantment, també mostren una moderada hiperexcreció de cistina i aminoàcids dibàsics, suggerint una relació amb el sistema b^{0+} . Fixant-nos en la figura 2, podem observar que la $Na^+-K^+-ATPase$ basolateral genera un gradient electroquímic de Na^+ que s'utilitza a les dues cares de la membrana per generar una alta concentració intraepitelial d'aminoàcids neutres. La reducció de l'entrada d'aminoàcids zwitteriònics quan B^0AT1 està mutat, reduiria la quantitat de substrats neutres per intercanviar amb cistina i aminoàcids bàsics via el sistema b^{0+} (Seow *et al.* 2004).

Altres

A part dels transportadors responsables de les patologies anteriorment descrites, en la (re)absorció d'aminoàcids renal i intestinal hi intervien altres proteïnes. Pel que fa als aminoàcids aniònics, s'havia descrit que el sistema responsable de l'entrada d'aminoàcids àcids havia de ser X^-_{AG} (Kanai i Hediger 2003), i posteriorment es va identificar a nivell molecular el transportador apical de glutamat i aspartat en el ronyó i l'intestí, anomenat EAAT3 (SLC1A1). Resta per identificar el transportador responsable de la sortida d'aminoàcids aniònics de la cèl·lula (Fig. 2).

Els aminoàcids prolina, hidroxiprolina i glicina, formen un grup apart de la resta. En primer lloc perquè s'ha descrit una iminoglicinúria benigne caracteritzada per els nivells elevats dels 3 aminoàcids en orina i en segon lloc, per la presència de transportadors específics per a aquests 3 aminoàcids (Chesney 2001). A la cara apical de les cèl·lules epitelials de ronyó i intestí hi trobem l'activitat del sistema IMINO representada per els transportadors SIT1 (SLC6A20) i PAT1/2 (SLC36A1/2). Actualment, encara no es coneixen els gens responsables de la iminoglicinúria, tot i que s'intueix que hi poden estar implicats diversos transportadors (p.ex. SIT1, PAT1/2 i B^0AT1) (Bröer *et al.* 2006).

També cal mencionar el transport epitelial de taurina, GABA i altres β -aminoàcids que té lloc mitjançant PAT1 i TauT, i la presència de diferents isoformes de la família de transportadors SLC38 (indicats com a N/A a la figura) que són responsables de les activitats N i A a la cèl·lula. Aquesta última família té un paper important en l'acidosi crònica ja que transporta glutamina en antiport amb protons (Karinch *et al.* 2002).

L'heterodímer LAT2/4F2hc situat a la cara basolateral de la cèl·lula és un bescanviador amb un ampli rang d'especificitat de substrats per aminoàcids neutres petits i grans, característica del sistema L. Aquest fet li confereix un paper molt important en la (re)absorció d'aminoàcids zwitteriònics. De fet, en un treball del

2003 (Fernández *et al.* 2003) amb una línia cel·lular polaritzada de ronyó d'opòssum (OK), es demostra el paper de LAT2 (SLC7A8) en el flux transepitelial de cistina, i en la sortida de cisteïna de la cèl·lula. Fins el moment, no s'ha identificat cap aminoacidúria relacionada amb mutacions a LAT2.

El transportador d'aminoàcids ASCT2 (SLC1A5) s'expressa a la cara apical de la membrana plasmàtica i intercanvia aminoàcids neutres juntament amb sodi. Valorant el conjunt de transportadors d'aminoàcids neutres identificats, es pot observar que els situats a la cara apical són capaços de generar una entrada neta d'aminoàcids a diferència del que passa a la cara basolateral, on tot i que LAT2 és una sortida d'aminoàcids neutres, al tractar-se d'un bescanviador no produeix una sortida neta. L'únic transportador que és capaç de treure aminoàcids neutres és TAT1 (SLC16A10) però la seva especificitat de substrat restringeix la sortida només a aminoàcids aromàtics. Per aquest motiu, es postula que ha d'existir una altre via de sortida d'aminoàcids neutres per la cara basolateral de la cèl·lula epitelial tant del ronyó, intestí o placenta (Palacín *et al.* 2005; Cleal *et al.* 2007).

En l'inici d'aquesta tesi es va plantejar com a objectiu la identificació de nous transportadors d'aminoàcids responsables de les activitats conegudes en la (re)absorció d'aminoàcids al ronyó i a l'intestí, però fins el moment no relacionades amb cap proteïna. Concretament, estàvem interessats en identificar els transportadors d'aminoàcids neutres que facilitaven la sortida d'aquests per la cara basolateral de la cèl·lula.

Família de transportadors SLC43

Tot i la identificació de LAT1 i LAT2, els dos transportadors del sistema L prèviament descrits, s'havia proposat que encara quedaven transportadors d'aquest sistema per conèixer. Per exemple, el subsistema L₂ caracteritzat en cultiu primari d'hepatòcits (Weissbach *et al.* 1982). El 2003 va aparèixer la família SLC43 amb la identificació de LAT3, un nou transportador d'aminoàcids del sistema L. A mamífers, la família està formada per 3 membres: LAT3, LAT4 i EEG1.

LAT3 (SLC43A1)

LAT3 es va identificar per expressió funcional a partir de poli(A⁺)RNAs de la línia cel·lular FLC4 d'hepatocarcinoma humà en oòcits de *Xenopus Laevis*. Van observar que una fracció de RNAs de 2,2 a 2,7 Kb induïa l'entrada de L-[¹⁴C]Leu i van aconseguir aïllar un cDNA de 2,5 kb responsable d'aquesta activitat, que van anomenar LAT3 (L-type Amino acid Transporter 3) (Babu *et al.* 2003).

Posteriorment, es va observar que LAT3 era el producte del gen *POV1* anteriorment descrit com a gen sobreexpressat en càncer de pròstata (Cole *et al.* 1998). S'havia seqüenciat i analitzat el gen *POV1* (o PB39) localitzat a la regió del cromosoma 11p11.1-p11.2 i que dóna lloc a un cDNA humà de 2317 nucleòtids i a una proteïna de 559 aminoàcids. En l'anàlisi d'expressió de *POV1* en teixits humans es va observar l'associació a teixits fetals i tumorals, concretament a un teixit neoplàsic intraepitelial prostàtic. En 10 pacients amb neoplàsia a la pròstata es va observar que *POV1* estava augmentat en el 50% dels casos. L'anàlisi per northern blot mostrava la presència de dos transcrits d'aproximadament 2,6 i 5 kb molt expressats en fetge i pàncrees, i en menor expressió a colon, intestí prim, pròstata, melsa i ovari adult. També es detectava presència del transcrit en fetge i pulmó fetal (Cole *et al.* 1998).

L'expressió de LAT3 en oòcits de *Xenopus* va permetre la caracterització del transportador. LAT3 indueix un transport de L -[^{14}C]Leu, Na^+ i Cl^- independent, i inhibible per BCH, mostrant les característiques descrites pel sistema L (Christensen 1990). A diferència dels dos membres de la família SLC7, LAT1 i LAT2, LAT3 no necessita de 4F2hc per una correcta expressió funcional a la membrana plasmàtica.

La selectivitat per substrats de LAT3 és més restringida que la dels transportadors heteromèrics, ja que es limita a aminoàcids neutres de cadena llarga com la Leu, Ile, Val i Met, i la Phe. A diferència de LAT1 no reconeix triiodotironina ni α -metiltirosina (Friesema *et al.* 2001), i a diferència de TAT1 (transportador d'aminoàcids del sistema T) el transport tampoc s'inhibeix per *N*-acetil- ni *N*-metil-derivats d'aminoàcids (Kim *et al.* 2001). Curiosament, L -leucinol, 1,3-dimetil-*n*-butilamina, L -valinol i L -fenilalaninol exerceixen una forta inhibició en el transport induït per LAT3, mostrant que el transportador accepta el canvi del grup α -carboxílic per l'hidroximetil o per un grup metil i sembla indispensable el grup α -amino per una correcta interacció del substrat al seu lloc d'unió. A més a més, com que els aminoalcohols estan carregats positivament, s'ha comprovat que generen entrades de corrent i per tant són transportats activament via LAT3 de fora a dins la membrana de l'oòcit.

S'havia descrit prèviament, que en cultius primaris d'hepatòcits, predominava una activitat de transport de baixa afinitat (mM) i amb una especificitat de substrat reduïda designada sistema L_2 (Christensen *et al.* 1969). Aquest sistema era substituït per un altre subsistema L (L_1) de major afinitat (μM) i major rang d'especificitat de substrat durant les 24-48 h de cultiu (Gallardo *et al.* 1996). A més, l'entrada per sistema L_2 s'inhibia per isoleucina, leucina, fenilalanina, BCH i era sensible a *N*-etilmaleïmida (NEM), a diferència del sistema L_1 (Salter *et*

al. 1986; Novak *et al.* 1994). Totes aquestes dades apunten a què LAT3 sigui el responsable de l'activitat del sistema L₂ (Babu *et al.* 2003).

Una altre característica destacable és la cinètica de transport multicomponent de LAT3. En l'estudi cinètic d'entrada de L-[¹⁴C]Leu via LAT3, s'obtenen gràfics d'Eadie-Hofstee no lineals, els valors s'ajusten a una equació de dos components cinètics, però s'assumeix que a concentracions fisiològiques predomina el component de baixa afinitat (Babu *et al.* 2003). A diferència de LAT1 i LAT2, dos bescanviadors d'aminoàcids, el transport induït per LAT3 és per difusió facilitada.

Anàlisis de northern blot va revelar que LAT3 s'expressava com un transcrit de 2,5 kb majoritàriament a pàncrees, fetge, múscul esquelètic i fetge fetal. També es va detectar un transcrit de 4,4 kb al pàncrees, confirmant les dades obtingudes prèviament per Cole i col·laboradors (Cole *et al.* 1998).

En l'intent de trobar un paper fisiològic a la proteïna murina de LAT3 es van sotmetre ratolins a dejunis de 24 h i es va analitzar els nivells de LAT3 al fetge, al múscul esquelètic i al pàncrees. Els nivells de mRNA de LAT3 durant el dejuni van augmentar en el fetge i el múscul esquelètic, però no en el pàncrees. Es suggereix que el dejuni causa una deficiència d'energia al cos, que mobilitza glicogen al fetge i accelera el catabolisme d'aminoàcids de cadena ramificada (BCAA, Branched-Chain Amino Acids) a cetoàcids de cadena ramificada (BCKA, branched-chain keto acids) al múscul. Aquests BCKAs excretats pel múscul són captats pel fetge que re-sintetitza BCAA. Com que el BCAA augmenten en sang durant processos de dejuni en humans, es postula que LAT3 pot tenir un paper en l'excreció de BCAA de la cèl·lula hepàtica i muscular a la sang en processos de falta d'aliment (Fukuhara *et al.* 2007).

LAT4 (SLC43A2)

La identificació i caracterització de la proteïna LAT4, així com l'anàlisi de transport i patró d'expressió, es tractaran a l'apartat de Resultats i Discussió d'aquesta tesi.

EEG1 (SLC43A3)

EEG1 es va identificar en un cribatge de gens diferencialment regulats en models cel·lulars de desenvolupament de ronyó. En l'estudi es van analitzar 65 gens codificants per membres de famílies de transportadors de soluts (SLC) en el desenvolupament del ronyó mitjançant "arrays" de DNA. EEG1 i POV1 (posteriorment anomenat LAT3), juntament amb transportadors de glucosa, van mostrar una expressió molt alta en els primers estadis del desenvolupament a

diferència de la resta de gens SLC analitzats. Per aquest motiu es va decidir anomenar el gen EEG1 (Embrionic Epithelia gene 1) (Stuart *et al.* 2001).

L'anàlisi genòmic va revelar que existia una seqüència que es solapava parcialment amb EEG1 anomenada proteoglicà 2 (PRG2). PRG2 s'ha descrit que és una isoforma llarga o immadura del *eosinophil major basic protein* (MBP, Major Basic Protein) i que es produeix per una transcripció alternativa a partir d'un segon promotor (Li *et al.* 1995). PRG2 conté els exons codificants de MBP i 8 exons alternatius no codificants dels quals 7 els comparteix amb EEG1 i el 8è es troba situat entre el gen EEG1 i MBP. Els autors del treball suggereixen que la seqüència de PRG2 és extremadament rara i que s'observa només en circumstàncies particulars, ja que no està ben representada per dbESTs (Stuart *et al.* 2001).

EEG1 es detecta per northern blot en forma de dos transcrits de 2,4 i 3,5 kb en RNAs de ratolí. La major expressió la trobem en embrions de dia 7 i en cor, pulmó, fetge, melsa i ronyó de teixits adults. L'hibridació *in situ* mostra un senyal molt intens a la placenta i a la regió mesenquimal d'embrions de dia 9.5, als pulmons, fetge i una expressió més dèbil al còrtex del ronyó en embrions de dia 16,5. Cal destacar la baixa senyal del cor obtinguda per hibridació *in situ* en comparació amb el northern blot (Stuart *et al.* 2001).

No es coneix cap dada pel que fa a la funció de la proteïna, però Stuart i col·laboradors, al 2001 va suggerir que tant POV1 com EEG1 podrien estar implicats en transport de nutrients i/o metabolits amb una important rellevància en estadis primerencs del desenvolupament i el creixement.

MODELS ANIMALS

El ratolí com a animal d'experimentació

El ratolí va començar a tenir un paper important en els primers estudis genètics immediatament després del redescobriment de les lleis de Mendel al 1900. Els primers estudis per demostrar l'aplicabilitat de les lleis de Mendel en mamífers, i per tant en humans, van venir de la mà del genetista francès Cuénot (Cuénot 1902). Al 1907, Little i col·laboradors, van començar estudis pel que fa a l'herència del color del pelatge del ratolí i al 1918 van desenvolupar les famoses primeres línies endogàmiques que inclouen les *B6*, *B10*, *C3H*, *CBA* i *BALB/c* (Staats 1964). Aquestes línies han jugat un paper important en moltes àrees de la ciència permeten que investigadors independents poguessin portar a terme experiments amb el mateix material genètic i per tant, guanyar en reproductibilitat i fiabilitat (Russel 1978). Aquests ratolins es varen utilitzar com a model genètic per investigar el càncer i l'existència de factors genètics que influencien la seva incidència, l'efecte de la radiació com a conseqüència de pluja radioactiva durant la segona guerra mundial, etc... (Silver 1995)

Durant els primers 80 anys del segle 20, el ratolí com a model genètic va estar eclipsat per la utilització de la mosca *Drosophila melanogaster* (Castle *et al.* 1906). Les mosques són extremadament petites, es reproduïxen ràpidament, amb un nombre elevat de cries i són molt adequades per estudis de mutagènesi. A partir de la dècada dels 70, també es va utilitzar molt el nematode *Caenorhabditis elegans*, el qual és molt útil en anàlisis genètics de desenvolupament i neurobiologia (Brenner 1974). Tot i això, amb l'objectiu d'estudiar la biologia dels éssers humans, es va optar per la utilització d'un model mamífer com són els rosegadors i en especial el ratolí.

El ratolí reuneix una sèrie de característiques que l'han convertit en el vertebrat més utilitzat en l'experimentació dels últims anys. Cal destacar-ne el curt interval de temps entre el naixement i la maduresa sexual (8 setmanes), que s'obtenen ventrades grosses amb una mitjana de 5-10 cries per part, que les femelles poden començar a gestar de nou immediatament després del part, que tenen una mida petita d'entre 25-40 g en edat adulta, que permet l'estabulació i manutenció de gran nombre d'animals en condicions relativament econòmiques i en espai relativament reduït. Actualment es disposa d'un gran ventall de soques altament homogènies i genèticament estandarditzades, essent la majoria d'elles fàcils de manejar i dòcils (Silver 1995).

A part de tots aquests avantatges, la seqüenciació completa del diversos genomes com són el d'*Homo sapiens*, *C. Elegans*, *Xenopus Laevis*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, etc... ha permès estudis d'homologies comparant la diferent expressió gènica en models animals (Fang *et al.* 2005) i confirmar que els genomes humà i murí són molt semblants i que l'organització genòmica està força conservada ja que els mapes de sintènia testimonien grans regions cromosòmiques on s'ha conservat l'ordre del gens (Mural R. J. *et al.* 2002). Aquest fet no és d'estranyar veient en els arbres filogenètics que la mosca (*Drosophila melanogaster*) i els nematodes (*Caenorhabditis elegans*) van divergir evolutivament dels mamífers fa aproximadament 570 milions d'anys i que els ratolins dels humans ho van fer fa només 65 milions d'anys (Silver 1995).

Per tots aquest motius els models animals i concretament el ratolí, s'han utilitzat extensament per tal d'imitar patologies humanes i aprofundir en el mecanisme patogènic, testar drogues terapèutiques i millorar els tractaments. En el desenvolupament d'aquesta tesi, s'ha utilitzat un model murí generat per l'agent mutagènic ENU per tal d'esbrinar la funció d'una proteïna mitjançant l'estratègia de "pèrdua-de-funció" fenotípica.

Models murins mutants ENU

La mutagènesi induïda per l'agent ENU és una metodologia ben establerta per introduir mutacions puntuals a l'atzar al llarg del genoma (Balling 2001). ENU ha estat descrit com l'agent mutagènic més potent per a ratolí (Russell *et al.* 1979) i és un compost sintètic alquilant que a diferència de la radiació i altres agents mutàgens, indueix mutacions puntuals i en un gran nombre (Fig. 4).

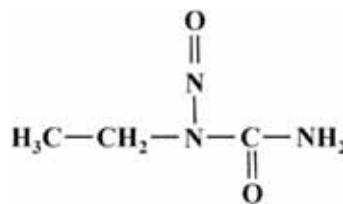


Fig. 4 N-Etil-N-nitrosourea. Estructura química de l'agent mutagènic ENU.

Molts centres arreu del món utilitzen ENU per induir mutacions tant en ratolí, com en peix zebra, en el trematode *Oryzias latipes* i recentment en rata (Hrabe de Angelis *et al.* 2000; Furutani-Seiki *et al.* 2004; Keays *et al.* 2007; Olivier *et al.* 2008). Els cribatges ENU es poden classificar en dues categories principals: 1) dirigides al fenotip i 2) dirigides al genotip.

En cribatges ENU fenotípics, els mascles s'exposen a l'ENU i se'ls genera mutacions a l'atzar en l'espermatogònia. Les cries del mascle mutagenitzat són

analitzades pel fenotip d'interès i posteriorment, les mutacions s'identifiquen per clonació posicional. Normalment, es creua el mutant amb un animal de diferent soca consanguínia i s'identifiquen els marcadors genètics que cosegreguen amb el fenotip anormal. Després es seqüencien els gens candidats dins l'interval genètic fins a trobar la mutació rellevant (Peters *et al.* 2003; Aigner *et al.* 2008; Pawlak *et al.* 2008).

Els cribratges genotípics es diferencien dels anteriors en què l'objectiu principal és detectar mutacions en un gen particular enlloc de trobar un fenotip hereditari. En aquest cas, es necessita documentar i conservar en paral·lel els animals exposats a l'ENU i mostres del seu DNA. La informació de cada animal exposat es guarda en forma d'esperma, de cèl·lules mare (ES) o d'animals vius (Chen *et al.* 2000; Coghill *et al.* 2002). En el primer cas, cal disposar de l'esperma i de DNA de les cries de l'animal mutagenitzat; en el segon, cal guardar les cèl·lules mare mutades; i en el tercer cas, cal mantenir un estoc d'animals mutats vius. En els tres casos, el pas limitant és la identificació de la mutació en el gen d'interès d'entre una gran població d'animals mutats. S'han utilitzat moltes tècniques per tal de cribar aquests arxius: el sistema WAVE mitjançant HPLC desnaturalitzant, l'assaig del reporter truncat (Zan *et al.* 2003) i el trencament d'heterodúplex CEL-I (TILLING) (Wienholds *et al.* 2003).

La freqüència de mutacions induïdes per l'agent ENU és proporcional a la dosi d'ENU administrada (Hitotsumachi *et al.* 1985). És molt important controlar la freqüència de mutacions induïdes per dues raons: en primer lloc, en el cas de trobar una característica fenotípica i identificar la mutació per clonació posicional, quedaria la possibilitat de què una altra mutació propera fos la responsable del fenotip observat. En segon lloc, si per aproximació genotípica s'identifica un animal amb la mutació d'interès, podria ser que ocultés moltes altres mutacions. En el nostre cas, s'han utilitzar creuaments amb animals no mutats per tal d'eliminar l'efecte de les altres mutacions abans de fenotipar. En diferents treballs s'ha intentat quantificar el número de mutacions per regió genòmica (Quwailid *et al.* 2004). La freqüència depèn de la soca i de la dosi de ENU, però assumint que la quantitat de DNA codificant en el conjunt de cromosomes del ratolí és de 54,89 Mb (Ensembl) i que la freqüència de mutacions funcionals es considera en el rang d'entre 1 cada 1,82 a 2,69 Mb (Augustin *et al.* 2005; Keays *et al.* 2006), s'estima que els ratolins F₁ tindran entre 25-31 mutacions en aquestes regions, en funció de la soca i la dosi d'ENU aplicada. Un estudi més concret amb la soca C3HeB/FeJ (utilitzada en aquesta tesi) i una dosi de 3 x 90 mg/kg d'ENU, la qual permet un bon rang de mutacions i una bona revitalització de l'esperma, analitzen 17000 mostres on detecta una mitjana de 20 mutacions funcionals per mostra individual

(Augustin *et al.* 2005). Per tal d'eliminar les mutacions no desitjades es calcula que amb 4 creuaments, s'haurà substituït el 94% del genoma i només quedarà 1,25 mutacions. Aquesta estratègia aconseguirà eliminar mutacions en cromosomes diferents, però no les que puguin estar enllaçades físicament (desequilibri de lligament). Tot i això, si considerem que l'animal fundador poseeix 20 mutacions funcionals i que el genoma es recombinava cada 1.453 cM (Silver 1995), la mitjana de la distància genètica entre dues mutacions seria de 72 cM (o físicament de 120 Mbp a nivell de DNA), o el que és aproximadament, una mutació per cromosoma. Per la gran distància genètica entre mutacions, s'assumeix que hi ha una lliure segregació.

Actualment, es troben molts treballs basats en models murins generats per l'agent ENU, per exemple: el model murí mutant per els receptors de proteïnes G (Grosse *et al.* 2006), per la α -tubulina (Keays *et al.* 2007), per Foxc1 que desenvolupa una displàsia cortical (Zarbalis *et al.* 2007), pel transportador de serotonina (Homberg *et al.* 2007), etc...

Models murins mutants per transportadors d'aminoàcids

Fins a l'actualitat, s'han generat a partir de diferents metodologies, diversos models murins amb transportadors d'aminoàcids alterats. Alguns d'ells són bons models per les aminoacidúries anteriorment descrites i d'altres ajuden a entendre la funció i el paper del transportador en el context fisiològic.

Transportadors de la família HAT

Mitjançant la disrupció del gen SLC7A9 i aconseguint per tant, l'eliminació del sistema $b^{0,+}$ (heterodímer rBAT/ $b^{0,+}$ AT), s'ha generat un model murí amb un fenotip litiàsic que imita la cistinúria clàssica de tipus B humana. Els animals desenvolupen una hiperexcreció massiva de cistina i aminoàcids dibàsic, i en un 40% presenten cristalls de cistina al sistema urinari (Feliubadaló *et al.* 2003). Fins i tot s'ha demostrat que és un model adequat per portar a terme estudis farmacològics contra la litiasi, ja que com en humans, el tractament oral amb D-penicil·lamina redueix la mida i el número de cristalls (Font-Llitjós *et al.* 2007).

En un estudi fenotípic a gran escala de ratolins mutants generats mitjançant l'agent mutagènic ENU, es va identificar un animal que presentava nivells elevats de lisina, arginina i ornitina a l'orina. Es va mapar i identificar la mutació causant d'aquesta disfunció en un canvi de A a G en la posició 464 (D140G) de la proteïna rBAT (SLC3A1). Igual que en la cistinúria en humans, aquest model murí produeix

microcristalls hexagonals de cistina en l'orina, elevats nivells de lisina, arginina i ornitina en orina i alteracions histopatològiques al ronyó (Peters *et al.* 2003).

La inactivació del gen SLC7A7 (sistema y⁺L) en ratolí ha produït un model per la lisinúria amb intolerància a proteïnes (LPI). El ratolí SLC7A7^{-/-} desenvolupa una parada en el creixement intrauterí provocant letalitat neonatal. Només han aconseguit sobreviure a les primeres 24 hores, 2 cries de les 606 nascudes. S'han mantingut en vida gràcies a una dieta baixa en proteïnes i suplementada amb citrul·lina. Una de les causes d'aquesta mortalitat és la baixa expressió del factor de creixement Igf1 (*Insulin-like growth factor 1*) (Sperandeo *et al.* 2007).

4F2hc és una proteïna important pel desenvolupament, la diferenciació, proliferació i regulació cel·lular. S'ha intentat generar una colònia murina amb el gen SLC3A2 (4F2hc o CD98) alterat via recombinació homòloga amb cèl·lules mare. Tot i que els heterozigots aparentment són sans i fèrtils, cap dels ratolins F2 va resultar ser homozigot per la mutació a CD98. Aquesta dada ens indica que la falta de 4F2hc causa letalitat embrionària, i es creu que moren entre el dia 3,5 i 9,5 després de la post implantació (Tsumura *et al.* 2003).

El fenotip de pigmentació gris suau (*subtle gray, Sut*) trobat en ratolins per una mutació natural que trunca el gen SLC7A11 (gen que codifica per la cadena lleugera del transportador xCT), ha permès disposar d'un model murí amb la proteïna xCT no funcional (Chintala *et al.* 2005). Aquest model demostra que el transportador xCT juga un paper important en el control de la pigmentació, ja que el transport de cistina en els melanòcits és essencial per la síntesi de feomelanina. Estudis *in vitro* havien suggerit un paper de xCT en la proliferació cel·lular en fibroblasts, astròcits i altres tipus cel·lulars. Fibroblasts embrionics derivats del ratolí xCT^{-/-}, no sobreviuen ni creixen sense l'addició de 2-mercaptoetanol, suggerint que el sistema xCT contribueix en el manteniment del balanç redox en plasma (Sato *et al.* 2005). Contràriament als estudis *in vitro*, la pèrdua natural de xCT en ratolins *sut*, demostra una proliferació cel·lular en regions cerebrals normals i que l'absència de transport de cistina no és essencial per el bon funcionament del cervell adult (Liu *et al.* 2007).

Transportadors de la família Cat

S'han generat dos models murins deficientes per proteïnes que transporten aminoàcids bàsics: Cat1^{-/-} i Cat2^{-/-}. L'absència de Cat1 en els ratolins provoca la mort durant les primeres 12 h de vida a causa d'una anèmica severa que provoca la reducció en un ~25% del pes dels nounats (Perkins *et al.* 1997). Els homozigots presenten un 50% menys d'eritròcits a la sang, així com nivells d'hemoglobina reduïts. Els fibroblasts de l'embrió primari d'animals mutants són resistents a la

infecció per retrovirus ecotròpics, la qual cosa demostra que Cat1 és l'únic receptor d'aquest virus en ratolins i que juga un paper crític en l'hematopoesis i en el creixement durant el desenvolupament del ratolí. Tot i l'aparent semblança funcional entre els transportadors Cat, la funció de Cat1 és essencial per la supervivència dels animals. També s'ha descrit que Cat3 compensa funcionalment a Cat1 pel que fa al transport d'aminoàcids catiónics en fibroblasts embrionaris procedents d'animals Cat1^{-/-} (Nicholson *et al.* 1998). Igual que a la família de transportadors de glutamat (revisat a Kanai 1997) la família gènica dels Cat sembla que codifica per proteïnes transportadores d'arginina funcionalment redundants (MacLeod 1996).

Els ratolins Cat2^{-/-}, a diferència dels Cat1^{-/-} són viables i fèrtils. Analitzant els seus macròfags activats per citoquines, es va observar que produïen un 92% menys d'òxid nítric (NO) així com una reducció del 95% en l'entrada d'arginina. Concentracions aberrants de NO contribueixen a la patogènesi de moltes malalties. S'ha demostrat que la producció de NO via l'enzim induïble sintasa d'òxid nítric (iNOS) necessita de l'entrada d'arginina extracel·lular a la cèl·lula via CAT2 (Nicholson *et al.* 2001). També s'ha observat una disminució en un 84% de l'activitat iNOS en astròcits de Cat2^{-/-}, així com en la producció NO (Manner *et al.* 2003). Aquests dos treballs proposen la manipulació de CAT2 com a possible diana terapèutica via la modulació de l'activitat de iNOS.

Transportadors del sistema X_{AG}

De la família de transportadors de glutamat Na⁺-dependents representants del sistema X_{AG}⁻, se n'han descrit cinc membres: EAAT1 (GLAST1), EAAT2 (GLT1), EAAT3 (EAAC1), EAAT4 i EAAT5. S'han generat models murins deficientes per els tres primers membres, així com un doble mutant del primer i el tercer (Stoffel *et al.* 2004): *glast1*^{-/-}, *glt1*^{-/-} i *eaac1*^{-/-}. La neurotransmissió en sinapsis glutamatèrgiques del sistema nerviós central (SNC) es regulen per la concentració del principal neurotransmissor L-glutamat, per l'activitat dels receptors de glutamat a la membrana postsinàptica i per l'afinitat dels transportadors de neurotransmissors que envolten l'àrea sinàptica. Els nivells de glutamat extracel·lular al sistema nerviós central es mantenen per sota els valors neurotòxics gràcies als transportadors de glutamat que actuen traient activament el glutamat fora de l'espai sinàptic (Kanner i Schuldiner 1987). Es creu que aquests transportadors tenen un paper principal en la plasticitat sinàptica (Bliss i Collingridge 1993) i en el desenvolupament (Choi 1987), de fet, un transport alterat s'ha proposat com a causa principal o secundària de malalties neurodegeneratives com són la malaltia de Huntington (Olney i De Gubareff 1978), esclerosi lateral amiotròfica (Plaitakis *et*

al. 1988) i la malaltia d'Alzheimer (Rothstein *et al.* 1992). Amb l'objectiu d'aclarir el paper dels transportadors es va optar per l'estratègia de pèrdua de funció i es van generar els models murins que es detallen a continuació. El ratolí homozigot deficient per *GLT1*, un transportador de glutamat astrocític, presenta un transport de glutamat reduït al 5.8% en els sinaptosomes corticals, una major disposició a patir dany cerebral i que tot i que són viables, moren prematurament a causa d'atacs epilèptics espontanis (Tanaka *et al.* 1997). Els ratolins mutants *glast1*^{-/-} també són viables però presenten una major susceptibilitat al dany cerebral, una anatomia cerebelar normal, però amb una anormal enervació múltiple de les fibres grimpadores, que pot ser la responsable de la lleugera descoordinació motora que pateixen (Watase *et al.* 1998). Els ratolins mutants *eaac1*^{-/-} no presenten cap tipus de neurodegeneració ni cap alteració en el SNC, però a diferència dels altres membres de la família, EAAC1 s'expressa als teixits perifèrics ronyó i intestí, i és al ronyó on s'ha trobat un fenotip clar i esperat, ja que manifesta un important hiperaminoacidúria dicarboxílica (Peghini *et al.* 1997). Els ratolins *eaac1*^{-/-} excreten 1400 vegades més de glutamat i 10 vegades més d'aspartat que els ratolins control, per tant, sembla que no hi ha cap altre transportador d'aminoàcids al ronyó que pugui compensar la pèrdua de EAAC1. Aquest model reproduïx el fenotip renal dels malalts humans amb aminoacidúria dicarboxílica, si bé no imita el retard mental que experimenten alguns pacients (Swarna *et al.* 1989) ni s'han trobat encara mutacions en el gen humà SLC1A1 en els pacients amb aminoacidúria dicarboxílica.

La caracterització dels 3 ratolins mutants i la del doble mutant *glast*^{-/-} i *eaac1*^{-/-} ens mostren la complexitat de la regulació en l'àrea sinàptica de les concentracions de glutamat, ja que cap dels 3 models per separat és capaç de reproduir el fenotip neuropatològic esperat i es suggereix una compensació entre els membres de la mateixa família (Ghijssen *et al.* 1999; Stoffel *et al.* 2004).

Altres

Ratolins amb el gen *collectrin* anul·lat són fèrtils i no pateixen alteracions morfològiques fins els 6 mesos d'edat. Sorprenentment, en orina d'aquests animals emmagatzemada a 4°C apareixen cristalls en forma d'agulla formats per un 10% de Phe i un 90% de Tyr. Els animals mutants *collectrin*^{-/-} orinen més que els animals control degut a un defecte renal sever en la reabsorció d'aminoàcids. A partir d'aquest model animal es va identificar un nou grup de transportadors apicals d'aminoàcids activats per la col·lectrina, com és B⁰AT1, i que pot ser un bon model per l'aminoacidúria de la malaltia de Hartnup i el síndrome de Falconi (Danilczyk *et al.* 2006). S'ha generat un segon model mutant on també s'observa que els animals

collectrin^{-/-} són incapaços de concentrar l'orina degut a un augment de soluts excretats i defineixen la col·lectrina com un nou regulador de transportadors d'aminoàcids, ja que és capaç d'alterar la població de transportadors d'aminoàcids presents a la membrana plasmàtica de la cèl·lula (Malakauskas *et al.* 2007).

En el cas de XT2, un transportador orfe relacionat estructuralment amb la família SLC6, es va generar un ratolí deficient en l'expressió d'aquesta proteïna per tal d'esbrinar la seva funció fisiològica (Quan *et al.* 2004). Per intentar buscar possibles substrats de XT2, es va analitzar l'orina dels animals XT2^{-/-} per cromatografia HPLC acoplat a espectrometria de masses, i es va trobar nivells de glicina significativament elevats. També es va observar que els animals mutants tenien la pressió sanguínia alta i que desapareixia al suplementar la dieta amb glicina. Es suggereix que el transportador XT2 està involucrat en la reabsorció de glicina i l'absència de la proteïna és suficient per causar hipertensió.

Gen mutat	Transportador	Fenotip	Tipus
SLC7A9 ^{-/-}	b^o+AT-rBAT	Cistinúria	<i>Null knockout</i>
SLC3A1 ^{-/-}	b^o+AT-rBAT	Cistinúria	ENU
SLC7A7 ^{-/-}	Y⁺LAT1-4F2hc	LPI	<i>Null knockout</i>
SLC7A11 ^{-/-}	xCT-4F2hc	Pigmentació gris suau	Natural
SLC3A2 ^{-/-}	4F2hc	Letalitat embrionària	<i>Null knockout</i>
SLC7A1 ^{-/-}	CAT1	Anèmia i mort perinatal	<i>Null knockout</i>
SLC7A2 ^{-/-}	CAT2	Alteració producció NO	<i>Null knockout</i>
SLC1A3 ^{-/-}	<i>glst1</i>	Lleugera descoordinació motora	<i>Null knockout</i>
SLC1A2 ^{-/-}	<i>glt1</i>	Atacs epilèptics espontanis	<i>Null knockout</i>
SL1A1 ^{-/-}	<i>eaac1</i>	Hiperaminoacidúria dicarboxílica	<i>Null knockout</i>
SLC1A1 ^{-/-} i A3 ^{-/-}	<i>glst1</i> i <i>eaac1</i>	Hiperaminoacidúria dicarboxílica	<i>Null knockout</i>
<i>Tmem</i> ^{-/-}	B^oAT1/collectrin	Malaltia de Hartnup/Falconi	<i>Null knockout</i>
SLC6A18 ^{-/-}	XT2	Hipertensió, hiperexcreció Gly	<i>Null knockout</i>

Taula 2. Resum de models murins mutants per transportadors d'aminoàcids. Es mostra el gen mutat, el transportador per el qual codifica o la unitat funcional (en negreta la proteïna mutada), el fenotip que mostra el model i el tipus del model del qual es tracta: generació per l'agent etilnitrosura (ENU), el model de generació natural i els *knockouts* totals (*null*).

Objectius

Antecedents:

Durant els últims anys, s'han identificat diferents transportadors d'aminoàcids implicats en la (re)absorció d'aminoàcids a les cèl·lules epitelials de ronyó i intestí (B⁰AT1, TAT1, SIT1...). A l'inici d'aquesta tesi, estàvem especialment interessats en descriure les activitats de transport que creiem que faltaven per un coneixement complet del flux trans-epitelial d'aminoàcids a la cèl·lula epitelial. Ens vam centrar en buscar transportadors d'aminoàcids neutres a la cara basolateral de la cèl·lula, ja que preveiem que a part de l'intercanviador obligatori LAT2/4F2hc, havia d'existir una proteïna que actués per difusió facilitada permetent un flux net de sortida d'aminoàcids de la cèl·lula.

Objectius:

Per tant, l'objectiu inicial d'aquesta tesi, va ser la cerca de nous transportadors d'aminoàcids. Més concretament, buscàvem un transportador d'aminoàcids neutres que s'expressés al túbul proximal del ronyó i que pogués estar implicat en la reabsorció renal d'aminoàcids. Per aquest motiu, vam utilitzar un model cel·lular capaç de formar monocapes i imitar la cèl·lula epitelial polaritzada, les cèl·lules OK (Opossum Kidney). L'estratègia consistia en identificar nous transportadors i avaluar el possible impacte de la proteïna en el flux transepitelial mitjançant la sobreexpressió o manca d'expressió d'aquest en el model cel·lular. Cal destacar que a l'inici d'aquesta tesi no es coneixia la seqüència del genoma d'opòssum i per tant, previament a l'estudi de la possible contribució del transportador a la reabsorció d'aminoàcids, calia clonar per RT-PCR els transportadors ortòlegs d'opòssum.

En una primera fase de la tesi, es van clonar diferents transportadors d'aminoàcids d'opòssum com per exemple, XT2, XT3 i SN1 entre d'altres. La clonació de XT2 i XT3, van donar lloc a una col·laboració amb el grup del Dr. Verrey i a la publicació de l'article que es descriu a l'annex 4.

Al veure que cap de les activitats dels transportadors identificats fins el moment s'expressava a la cara basolateral de la cèl·lula epitelial i que no érem capaços de detectar l'activitat del transportador en el model cel·lular de ronyó d'opòssum (resultats no mostrats), vam ampliar els nostres objectius a la identificació de nous transportadors en altres famílies aparegudes en aquells moments, com per exemple la nova família SLC43.

Això va definir finalment els objectius de la present tesi.

1. Identificació i caracterització funcional de LAT4 (SLC43A2)

A l'inici d'aquesta tesi només es coneixia un membre de la família SLC43, LAT3 (Babu *et al.* 2003). Ens vam plantejar com a objectiu la identificació de nous membres de la família SLC43 a través de la cerca informàtica en bases de dades, per homologia a LAT3. Una vegada obtingut el clon de cDNA d'interès (posteriorment anomenat LAT4), el següent pas seria l'estudi de la seva funció en sistemes d'expressió heteròlegs i la cerca del seu possible paper fisiològic.

2. Estudi del tercer membre de la família SLC43, EEG1

Es coneixia l'existència d'un gen expressat preferencialment en epitelis embrionaris de ratolí (Stuart *et al.* 2001), de funció desconeguda i homòleg a LAT3 i LAT4. L'objectiu que ens vàrem plantejar va ser l'estudi de la proteïna mitjançant les dues estratègies següents:

- Caracterització funcional en un sistema d'expressió heteròleg

L'objectiu va ser la caracterització funcional d'EEG1 en sistemes d'expressió heteròlegs per comprovar la seva possible funció com a transportador d'aminoàcids i la seva localització subcel·lular. També es pretenia estudiar la distribució tissular de EEG1 tant a nivell de RNA com de proteïna.

- Generació d'un model murí d'EEG1 de pèrdua de funció

A partir d'un model murí generat per una mutació puntual amb l'agent alquilant ENU, es pretenia esbrinar la funció fisiològica de EEG1.

Materials i mètodes

Contingut de materials i mètodes

I. EINES BIOINFORMÀTIQUES.....	55
Base de dades	55
<i>National Center for Biotechnology Information (NCBI)</i>	55
<i>Ensembl</i>	55
<i>Swiss-Prot</i>	56
<i>MGC: Mammalian Gene Collection.</i>	56
Anàlisi de seqüències.....	56
<i>University of California Santa Cruz Genome Browser (UCSC)</i>	56
<i>Alineament de seqüències amb el BLAST</i>	56
<i>Alineament de seqüències amb l'algoritme Clustalw</i>	56
<i>Alineament de seqüències de DNA</i>	57
Disseny d'encebadors	57
Gestor de vectors.....	57
Anàlisi estadístic	57
Anàlisi de proteïnes	58
<i>ExpASy Proteomics Server</i>	58
<i>SOSUI v. 1.11</i>	58
<i>HMMTOP (Hidden Markov Model for Topology Prediction) v.2.0</i>	58
Altres pàgines d'interès.....	58
II. OBTENCIÓ I MICROINJECCIÓ D'OÒCITS DE XENOPUS LAEVIS	59
Adquisició i estabulació de granotes <i>Xenopus Laevis</i>	59
Extracció del oòcits.....	60
Tria i manteniment del oòcits.....	62
Microinjecció.....	62
III. CULTIUS CEL·LULARS.....	63
Consideracions generals.....	63
<i>Subcultiu</i>	63
<i>Congelació i descongelació</i>	64
Transfecció cel·lular transitòria.....	64
Condicions de cultiu de la línia cel·lular HeLa	65
<i>Medi de cultiu</i>	65
<i>Condicions de cultiu</i>	65
Condicions de cultiu de la línia cel·lular OK	66
<i>Medi de cultiu</i>	66
<i>Condicions de cultiu</i>	66
Condicions de cultiu de la línia cel·lular PCT.....	66
<i>Medi de cultiu</i>	67
<i>Condicions de cultiu</i>	67
Condicions de cultiu de les línies cel·lular de placenta: BeWo, JAR i Jeg-3.....	67

<i>Medi i condicions de cultiu de cèl·lules BeWo</i>	68
<i>Medi de cultiu de cèl·lules JAR</i>	68
<i>Medi i condicions de cultiu de cèl·lules JEG-3</i>	68
IV. ASSAJOS DE TRANSPORT	68
Assaig de transport en oòcits de <i>Xenopus Laevis</i>	68
Assaig de transport en cèl·lules PCT.....	70
V. TÈCNiques D'OBTEncIÓ, MANIPULACIÓ I DETECCIÓ DE DNA	71
Obtenció de DNA plasmídic.....	71
Electroforesi i purificació de DNA en gel d'agarosa	72
Clonació de productes de PCR en el vector pGEM-T Easy	72
Seqüenciació de DNA	72
Obtenció de cDNA	73
Obtenció de DNA genòmic	73
Amplificació de DNA per PCR	74
<i>Disseny d'encebadors</i>	74
<i>Selecció de la DNA polimerasa</i>	75
Mutagènesi dirigida	75
RACE-PCR (5' and 3'-Rapid Amplification of CDNA Ends)	75
SOE-PCR (Splicing by Overlap Extension PCR)	78
VI. TÈCNiques D'OBTEncIÓ I DETECCIÓ DE RNA	79
Obtenció de RNA total.....	79
Aïllament de RNA total mitjançant el reactiu "TRIZol"	79
Aïllament de RNA total mitjançant el kit "RNeasy" (Quiagen)	80
Tractament de l'RNA amb DNAsa.....	80
Síntesi de cRNA: Transcripció <i>in vitro</i>	80
Northern blot.....	81
<i>Electroforesi de RNA</i>	81
<i>Síntesi de la sonda marcada</i>	81
<i>Transferència, hibridació i revelat</i>	82
Hibridació <i>in situ</i>	83
<i>Síntesi i marcatge de la sonda:</i>	83
<i>Preparació dels teixits i dels portaobjectes:</i>	84
<i>Hibridació de la sonda:</i>	85
VII. TÈCNiques D'OBTEncIÓ, MANIPULACIÓ I DETECCIÓ DE PROTEÏNES	86
Obtenció de proteïnes totals	86

Obtenció de membranes totals.....	87
Determinació de la concentració de proteïnes	87
PNGasa F: Peptide N-glicosilasa F.....	88
Estudis d'immunolocalització.....	88
<i>Estudis d'immunolocalització en talls d'òcit</i>	<i>88</i>
<i>Estudis d'immunolocalització sobre cèl·lules en cultiu.....</i>	<i>89</i>
Assaig de Western Blot	90
<i>Electrofores en gel desnaturalitzant (SDS/PAGE):.....</i>	<i>90</i>
<i>Electrotransferència.....</i>	<i>91</i>
<i>Immunodetecció</i>	<i>91</i>
Tinció Coomassie Blue	92
Purificació d'anticossos.....	92
<i>Columna d'afinitat (Sulfolink).....</i>	<i>92</i>
<i>Proteïna A</i>	<i>94</i>
Producció de proteïnes recombinants en <i>E.Coli</i>	95
<i>Expressió i purificació de proteïnes de fusió amb GST.</i>	<i>95</i>
<i>Expressió i purificació de proteïnes de fusió amb Histidines.....</i>	<i>97</i>
VIII. TÈCNiques D'HISTOLOGIA	98
Hematoxilina-Eosina	98
IX. GENERACIÓ D'ANTICOSSOS.....	99
Producció estàndard d'anticòs policlonal antipeptid.	99
Producció estàndard d'anticòs policlonal amb proteïna de fusió.	100
Producció amb protocol de co-injecció.....	100
X. ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ	101
Generació de la colònia EEG1-Y221*.....	101
Genotipació ratolins EEG1-Y221*	102
<i>PCR de genotipació.....</i>	<i>103</i>
Gàbies metabòliques.....	104
Extracció de sang	105
Extracció de teixits	106
Anàlisi d'aminoàcids en l'orina per autoanalitzador d'aminoàcids	106
Anàlisi d'aminoàcids en plasma per autoanalitzador d'aminoàcids.....	107

I. EINES BIOINFORMÀTIQUES

El suport informàtic ha estat molt important en la realització d'aquesta tesi. Actualment la xarxa aporta gran quantitat de continguts per compartir informació i sobretot disposar d'informació actualitzada, que és totalment imprescindible en el món de la biomedicina. En aquesta tesi s'han utilitzat eines bioinformàtiques alhora de dissenyar encebadors, en el disseny de clonacions *in silico*, en la cerca de nous gens, en l'anàlisi estadístic, etc... A continuació es descriuen algunes de les moltes eines que s'han utilitzat.

Base de dades

National Center for Biotechnology Information (NCBI)

(<http://www.ncbi.nih.gov>)

NCBI inclou recursos molt útils i diversos com són el Pubmed, recull d'articles científics; el GenBank, base de dades de totes les seqüències de DNA públiques; informació del projecte genoma humà, de taxonomia, de bases de dades amb col·leccions de SNP, ESTs, estructures, etc...

El GenBank de NCBI és una de les bases de dades públiques més completes que existeixen a la xarxa, i inclou tot tipus de seqüències genòmiques, de mRNA i de proteïna. El mateix NCBI, ha creat una segona base de dades, anomenada RefSeq, on s'ha pretès elaborar una selecció de seqüències de manera que cada molècula només tingui una entrada per DNA genòmic, una per gen transcrit i una per proteïna, de cada organisme. Aquesta base de dades és molt útil alhora de saber si una seqüència té informació suficient per considerar-la referenciada o no, i per tant, la diferència entre les dues bases de dades, és simplement el cribatge que es fa de les seqüències, essent la RefSeq molt més restrictiva que la del GenBank.

Ensembl

(<http://www.ensembl.org/index.html>)

És un projecte conjunt entre EMBL-European Bioinformatics Institute (EBI) i la fundació privada The Wellcome Trust i l'Institut Sanger (WTSI) per desenvolupar un software que produeixi i mantingui anotacions automàtiques de genomes eucariotes. Tot i que Ensembl s'ha concentrat en els genomes de vertebrats, també s'hi poden trobar genomes de plantes i fongs. Proporciona informació sobre la localització del gen en el genoma, la seva estructura predita i una dada molt útil sobre possibles homòlegs identificats.

Swiss-Prot

(<http://www.ebi.ac.uk/swissprot/>)

És una base de dades de proteïnes creada per l'Institut Suís de Bioinformàtica (SIB). Ofereix un recull d'informació molt completa i actualitzada sobre proteïnes i inclou funció, modificacions post-traduccionals, possibles dominis estructurals, productes alternatius, etc... També està disponible des de l'enllaç de ExPASy (<http://www.expasy.ch/sprot/>).

MGC: Mammalian Gene Collection.

(<http://mgc.nci.nih.gov/>)

L'objectiu de MGC és oferir clons humans, de ratolí, de rata i de vaca amb la pauta de lectura completa (FL-ORF). Totes les seqüències del MGC estan dipositades al GenBank i els clons es poden comprar a través de distribuïdors de IMAGE.

Anàlisi de seqüències

University of California Santa Cruz Genome Browser (UCSC)

(<http://genome.ucsc.edu/>)

La Universitat de Sta.Cruz de California ofereix un recurs anomenat BLAT que permet la cerca de seqüències homòlogues a genomes seqüenciats. Ofereix la situació cromosòmica i tot tipus d'informació a tots els nivells enllaçant amb el Pubmed, Ensembl, Swiss-Prot i altres bases de dades. Resulta molt útil per conèixer qualsevol entrada en una zona genòmica concreta.

Alineament de seqüències amb el BLAST

(<http://www.ncbi.nih.gov/blast>)

Blast permet la cerca de seqüències homòlogues a les bases de dades de seqüències de DNA o proteïna del GenBank. El programa compara la seqüència esquer amb totes les seqüències de la base de dades mostrant com a resultat final aquelles amb un grau d'homologia superior.

Alineament de seqüències amb l'algoritme Clustalw

(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>)

L'algoritme *Clustalw* permet obtenir el millor alineament entre múltiples seqüències de DNA o proteïna. Aquest anàlisi es pot realitzar des de diferents pàgines d'internet com la indicada i des de programes que faciliten l'anàlisi amb el posterior tractament de les dades. En aquesta tesi s'ha usat el programa *AlignX* del paquet *Vector NTI Advance 9* (Invitrogen) i *MegAlign* del paquet *Lasergene*

(DNASar), que a més de facilitar l'alineament entre les seqüències, t'ofereix l'arbre filogenètic en el cas de proteïnes.

Alineament de seqüències de DNA

Per l'alineament de seqüències de DNA s'han utilitzat els programes *ContigExpress* del paquet *Vector NTI Advance 9* (Invitrogen) i *Seqman* del paquet *Lasergene* (DNASar). S'han utilitzat per alinear múltiples seqüències solapades parcialment per obtenir una seqüència única anomenada *contig*. És molt útil alhora de seqüenciar regions àmplies de DNA. Aquestes cal seqüenciar-les per etapes i fragments d'uns 500 a 700 parells de bases que es solapen formant un sol *contig*. Aquests programes permeten introduir seqüències en diferents formats, entre ells el cromatograma que s'obté del seqüenciador. Això facilita enormement l'anàlisi de les seqüències ja que a més de veure-les alineades, et permet veure en detall qualsevol conflicte a nivell de nucleòtid en la seqüència i modificar-lo.

Disseny d'encebadors

El programa que s'ha utilitzat en aquesta tesi per el disseny d'encebadors és el *Primer Select* del paquet de programes *Lasergene* (DNASar). Aquest programa cerca encebadors sobre la seqüència d'interès, permetent fixar certs paràmetres relacionats amb els encebadors o la PCR, com la temperatura d'hibridació dels encebadors, la longitud del producte de PCR, etc...

Gestor de vectors

Per la construcció del conjunt de plasmidis utilitzats en aquesta tesi i per la seva correcta gestió s'ha utilitzat el *Clone Manager Professional Suite v.7.10* (*Sci Ed Central*). El programa resulta senzill i molt útil per planificar clonacions *in silico* i analitzar patrons de digestió.

Anàlisi estadístic

Per l'anàlisi de significació de diferències en la cerca de diferències entre animals control i EEG1Y2211* s'ha utilitzat el programa *GraphPad v.4.0*. El programa permet l'anàlisi de diferents tests estadístics com el test *t*, la prova ANOVA, etc...

Per l'anàlisi cinètic s'ha utilitzat el programa *KaleidaGraph v.3.6*, ja que permet obtenir valors de Km i Vmàx, ajustant els valors a una regressió no lineal i a qualsevol equació que se li defineix prèviament, com la de Michaelis Menten per dos components.

Anàlisi de proteïnes

ExPASy Proteomics Server

(<http://us.expasy.org/>)

ExPASy (Expert Protein Analysis System) és un servidor que ofereix diversos recursos dedicats especialment a l'anàlisi de seqüències de proteïnes i estructures. Ofereix enllaços gratuïts a programes que permeten des de la identificació de proteïnes fins a la predicció de l'estructura i la creació de models 3D. Alguns dels programes més rellevants d'aquesta pàgina web que s'han utilitzat en el transcurs d'aquesta tesi són els que es detallen a continuació:

SOSUI v. 1.11

(<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>)

És un programa desenvolupat per la Universitat de Nagoya (Japó) que facilita la classificació i predicció d'estructura secundària de proteïnes de membrana a partir d'una seqüència determinada, així com el perfil d'hidrofobicitat i diagrames de roda d'hèlix en els segments predits. També ofereix un esquema molt útil dels segments transmembrana de la proteïna que permet visualitzar la posició dels nucleòtids individuals.

HMMTOP (Hidden Markov Model for Topology Prediction) v.2.0

(<http://www.enzim.hu/hmmtop/>)

És un altre programa de predicció topològica, en aquest cas, desenvolupat per l'Institut d'Enzimologia de la Hungarian Academy of Biological Sciences Research Center de Budapest. El mètode es basa en el principi de la màxima divergència en la composició del segments d'aminoàcids (Tusnády i Simon 1998; Tusnády i Simon 2001). Al sotmetre la seqüència proteica, el programa fa la predicció del número de segments transmembrana especificant l'interval de residus de cada segment, indica la localització dels extrems de la proteïna i l'entropia del model.

Altres pàgines d'interès

HOWDY: Human Organized Whole genome Database: És un bon compendi de diferents bases de dades molt útil alhora de contrastar diferències entre elles.

(<http://www-alis.tokyo.jst.go.jp/HOWDY/>)

HUGO Gene Nomenclature Committee: Mostra el nom del gen i el símbol adequat per a cada gen humà. També dona informació sobre la localització cromosòmica i l'enllaç de la seqüència al NCBI.

(<http://www.genenames.org/index.html>)

La pàgina web de la Universitat de Barcelona permet l'accés a la majoria de revistes en format electrònic, a tesis doctorals i altres serveis.

(<http://www.ub.cat>)

La pàgina web del diccionari de l'Enciclopèdia Catalana és molt útil tan com a diccionari amb conjugacions verbals incloses, com a enciclopèdia. És l'adaptació tecnològica de la *Gran Enciclopèdia Catalana* en català i anglès.

<http://www.enciclopedia.cat/>

La pàgina web del centre de terminologia és un recurs molt útil per dubtes terminològics en llengua catalana. Concretament el cercaterm ofereix alternatives en la traducció de paraules en diferents idiomes.

<http://www.termcat.cat/>

II. OBTENCIÓ I MICROINJECCIÓ D'OÒCITS DE *XENOPUS LAEVIS*

Al 1982, el grup de Sumikawa va ser el primer en demostrar que es podien expressar funcionalment canals iònics i receptors en oòcits de *Xenopus* (Miledi *et al.* 1982). A partir d'aquest moment, aquest sistema ha passat a ser un mètode estàndard per expressar proteïnes heteròlogues i per la clonació funcional de canals i transportadors (Sigel 1990; Wang *et al.* 2000; Parker *et al.* 2008).

El fet que l'oòcit madur sigui gran (1-1,3 mm) degut a la gran acumulació de proteïnes de reserva, gran quantitat de mRNA i maquinària de traducció (ribosomes, tRNAs...), fa que sigui un sistema fàcil de manipular i molt útil per estudis de desenvolupament embrionari i d'expressió funcional de proteïnes (Colman *et al.* 1984).

Adquisició i estabulació de granotes *Xenopus Laevis*

Aquesta espècie de granotes és autòctona del sud d'Àfrica. Actualment al nostre laboratori es compren a l'empresa African Xenopus Facility (Noordhoek, South Africa) (afxeno@mweb.co.za). Les granotes *Xenopus Laevis* són totalment aquàtiques, les femelles amb les quals es treballa mesuren entre 12 i 15 cm de llargada i en concret les sud africanes autòctones, produeixen oòcits de molt bona qualitat un cop estan estabulades.

Les granotes utilitzades al llarg d'aquesta tesi, s'han mantingut a l'estabulari de la Facultat de Biologia. Les granotes han estat establades en una sala amb termòstat entre 19 i 21°C seguint cicles continus de 12 hores de llum i 12 de foscor. S'han distribuït en grups de 10 a 12 animals per aquari de 200 litres de capacitat, amb una tapa de vidre per evitar que saltin i morin a fora per deshidratació. Per la identificació i seguiment individual de cada animal, s'implanta un xip intern en el tòrax de la part dorsal de cada granota, que permet associar un número a cada granota (Implantable Transponder ID 100; Trovan). Un lector electrònic (Hand Held Reader LID500, Trovan) permet la lectura del número de cada xip.

L'aigua dels aquaris ha d'estar sempre en òptimes condicions, per això és necessari controlar els següents paràmetres periòdicament: pH (entre 6.5 - 7.5), concentració d'amoni (inferior a 2.5 mg/l), de nitrats (inferior a 50 mg/l) i de nitrits (inferior a 0.15 mg/l). A part, els aquaris han d'estar correctament oxigenats i els filtres, bombes de carbó actiu i zeolita (2224 Professional Canister Filter, Eheim) en bon estat.

Les granotes s'alimenten dos cops per setmana amb cor de vedella trossejat.

Extracció del oòcits

L'extracció d'òocits es realitza seguint el protocol descrit per Goldin (Goldin 1992) i es porta a terme el dia abans de l'injecció.

Materials i reactius:

- Etiléster de l'àcid 3-aminobenzoic (A-5040, Sigma).
- Material de cirurgia: tisores, pinces i seda trenada per sutura.
- Plaques de Petri de 10 mm de diàmetre (Sterilin)
- Col·lagenasa D de *Clostridium Histolyticum* (10888866, Roche).
- Incubador HotCold-S (Selecta)
- Aigua miliQ autoclavada per preparar tots els reactius
- Tampó ORII 4X¹
- Tampó BARTH²

¹ Composició del tampó ORII 4x: 330 mM NaCl, 8 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 20 mM HEPES ajustat a pH 7.5 amb NaOH. S'autoclava i es guarda a 4° C.

² Composició del tampó BARTH: 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 330 µM Ca(NO₃)₂·4H₂O, 410 µM CaCl₂·2 H₂O, 820 µM MgSO₄·7H₂O, 2.4 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES, pH 7.5

Procediment:

S'anestesia la granota per immersió en una solució de 1 g/l de l'etilèster de l'àcid 3-aminobenzoic amb aigua de l'aixeta durant uns 20 minuts. Després es col·loca l'animal sobre una superfície de gel perquè es mantingui adormida durant l'operació (ja que és un animal poiquiloterm) (Fig. 5, A i B).

Els oòcits s'extreuen fent una incisió d'1 cm de llargada a un dels costats ventrals de l'abdomen de la granota. Es fa primer un tall a la pell i després al múscul. S'extreuen els oòcits amb l'ajuda d'unes pinces i normalment es treuen entre 3 i 4 lòbuls. Cada granota és operada com a màxim cada tres mesos i és capaç de produir oòcits de qualitat durant 8-10 extraccions.

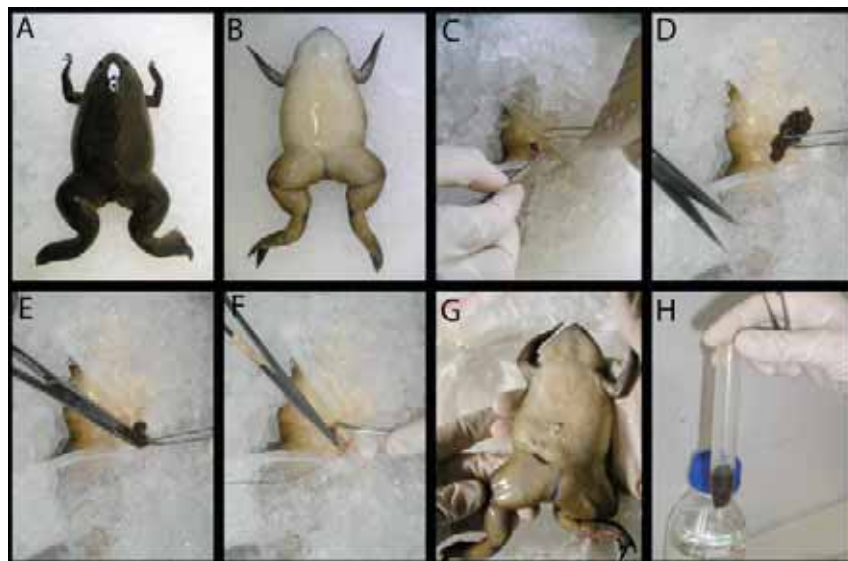


Fig. 5 Extracció d'oòcits de *Xenopus Laevis*. Metodologia per l'extracció d'oòcits de *X.Laevis*: **A i B**, es col·loca la granota cara amunt sobre un llit de gel un cop anestesiada. **C**. Es cobreix amb un paper humit i més gel. Es procedeix a la incisió a la part abdominal ventral, en primer lloc fent un petit tall a la pell i després al múscul. **D**. S'extreuen els lòbuls de l'ovari amb l'ajuda d'unes pinces. **E**. Es tallen per començar la separació. **F**. Es sutura la incisió. **G**. Es treu la granota del gel i es deixa recuperar en contacte amb una mica d'aigua. **H**. Es procedeix a la digestió de les cèl·lules fol·liculars.

Els lòbuls ovàrics extrets es guarden en tubs de plàstic en tampó ORII 1x i es tallen en fragments petits. La incisió es tanca fent punts de cirurgia: normalment es fan 4-5 punt al múscul i 4-5 punts a la pell (Fig. 5, F). Mentre es desperta, la granota es manté humida però no submergida completament en l'aigua.

Per separar les cèl·lules fol·licular de l'oòcit es digereixen amb col·lagenasa D. Per cada lot de col·lagenasa nou, cal posar a punt la quantitat i el temps de digestió ja que cada activitat tripsina és lleugerament diferent i hem d'evitar fer malbé els oòcits. S'afegeix una solució de 10 ml amb col·lagenasa D a 2 mg/l en tampó ORII 1x al tub dels oòcits i la digestió té lloc en un agitador orbital durant 45 minuts dins l'incubador a 18°C. Es repeteix el procediment però durant temps més

curt (15 a 45 min). A continuació es fan 4 rentats amb tampó ORII 1x, 4 amb tampó BARTH'S i es guarden en tampó BARTH'S a l'incubador de 18°C.

Tria i manteniment del òocits

L'oogènesi en *Xenopus* és assincrònica (és a dir, existeixen òocits en tots els estadis de desenvolupament alhora), i per tant, cal seleccionar manualment a la lupa binocular els òocits madurs per ser injectats. Es seleccionen els òocits en estadi V-VI de desenvolupament (Dumont 1972) que es diferencien pel seu diàmetre d'entre 1,0-1,3 mm, pels dos hemisferis clarament diferenciats i pel pol animal lleugerament més clar que en els òocits d'estadi IV. Els òocits es mantenen en tampó BARTH, dins de vials de vidre (*Liquid scintillation* vials V-7130; SIGMA) i en un incubador a 18°C a la foscor. Cada dia, amb l'ajuda de la lupa binocular i una pipeta de plàstic, es seleccionen i descarten els òocits que no tenen bon aspecte i es guarden els òptims en solució BARTH nova.

Microinjecció

En aquest treball els òocits s'han injectat amb diferents cRNAs, sintetitzats per transcripció *in vitro* a partir del cDNA corresponent (veure pàgina 82). Els vectors utilitzats per la transcripció de cRNA necessiten la presència d'un promotor de la RNA polimerasa del fag T7, T3 o SP6. S'han dissenyat vectors per augmentar els nivells d'expressió de les proteïnes exògenes expressades en l'òocit (Shih *et al.* 1998). Per aquest motiu, s'han afegit extrems 5' i 3' no traduïts de missatgers molt estables en òocits, com per exemple el de la β -globina.

Material:

- Incubador HotCold-S (*Selecta*)
- Lupa binocular (Nikon 546225)
- Injector semiautomàtic (Inject+Matic; Genève)
- Aparell per fer micropipetes (Inject⁺Matic Puller; Genève)
- Micromanipulador (Narishige MN-15)
- Capil·lars (*Disposable micro-pipettes*; Drummond)
- Font de llum (Intralux 5000; Volpi)

Procediment:

La microinjecció d'òocits de *Xenopus* es realitza amb l'ajuda d'un dispensador unit a un micromanipulador que permet el moviment en tres dimensions. En primer lloc cal fer la micropipeta a partir d'estirar un capil·lar en un aparell que escalfa el vidre. Cal calibrar la micropipeta amb aigua perquè injecti un

volum de 50 nl, i s'aconsegueix amb l'ajuda d'una tira de paper mil·limetrat. El cRNA a injectar es centrifuga per separar possibles impureses presents. Això disminueix la probabilitat de què l'agulla s'obturi durant el procés d'injecció. A continuació es posa un tros de *parafilm* damunt d'una placa de 35 mm i a sobre el cRNA. S'aspira la gota, controlant el procés a la lupa i evitant que entri aire. Es col·loquen els oòcits a injectar en una placa de 35 mm de diàmetre amb tampó BARTH on es mantenen immobilitzats gràcies a una reixeta de polipropilè enganxada al fons de la placa. Es posiciona l'agulla amb el cRNA damunt del pol vegetal de cada oòcit i es fa baixar lentament fins que l'agulla travessa l'oòcit. Aleshores s'injecten els 50 nl de cRNA, s'observa que l'oòcit s'infla lleugerament, es retira l'agulla curosament i es busca el següent oòcit.

III. CULTIUS CEL·LULARS

Consideracions generals

Tots els cultius cel·lulars emprats al llarg d'aquesta tesi s'han manipulat sota una campana de flux laminar vertical. Tot el material i solucions han de ser estèrils (autoclau, radiació UV, filtració per porus de 0,22 µm, etc...) per evitar el risc de contaminacions en el cultiu. Els medis de cultiu específics per a cada tipus cel·lular es guarden a 4°C i es temperen a 37°C abans d'entrar en contacte amb les cèl·lules. Tots els tipus cel·lulars utilitzats s'han mantingut en incubadors en condicions de 37°C, 90% d'humitat relativa i 5% de CO₂.

Subcultiu

Els cultius cel·lulars utilitzats en aquest treball s'han crescut sobre un suport de plàstic tractat. En aquest sistema, les cèl·lules creixen fins arribar a confluència, moment en que és necessari diluir-les i sembrar-les en una altre placa perquè puguin continuar creixent. Per desenganxar les cèl·lules s'ha utilitzat la tripsina, una proteasa que hidrolitza les proteïnes de la membrana cel·lular permeten l'alliberament de les cèl·lules de la placa. És important controlar el temps per evitar danyar excessivament les cèl·lules.

El procediment consisteix en aspirar el medi de cultiu, fer 2 rentats amb PBS³ estèril i afegir la tripsina (1ml per flascó de 75 cm²). Es deixa actuar controlant el temps (2-10 min) i quan observes les cèl·lules desenganxades i

³ Composició PBS: NaCl 136 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM. El pH s'ajusta a 7,4 amb HCl. Si s'ha d'utilitzar per cultius cel·lulars, s'autoclava la solució.

separades, s'hi afegeixen 4ml de medi de cultiu (ja que el sèrum que conté inactiva la tripsina) i es resuspenen les cèl·lules. La suspensió es centrifuga a 200 g durant 3 min i el *pellet* es resuspèn en el volum adequat per tornar a sembrar.

Congelació i descongelació

La conservació de les cèl·lules es fa en tancs amb nitrogen líquid. Per tal de congelar-les s'usa dimetilsulfòxid (DMSO) com a criopreservant juntament amb sèrum fetal boví (FBS).

El procediment consisteix en tripsinitzar les cèl·lules, centrifugar-les a 200 g 3 min i resuspendre-les en una solució de FBS amb un 10% de DMSO (D2650, Sigma). Es fan alíquotes en criotubs i es guarden a un tanc envoltat d'isopropanol que refreda les mostres a una velocitat de 1°C per minut, prèviament temperat a 4°C. Es guarda el tanc a -80°C i l'endemà es disposen els criotubs al tanc de nitrogen líquid.

Transfecció cel·lular transitòria

Per l'estudi funcional d'una proteïna en molts casos és útil l'expressió transitòria en una línia cel·lular. En aquest treball s'ha utilitzat el mètode de coprecipitació de DNA exogen amb fosfat càlcic (Sambrook *et al.* 1989). Es desconeix el mecanisme exacte del procés d'entrada de DNA a la cèl·lula, però en primer lloc, el precipitat d'adhereix a la superfície cel·lular i posteriorment és endocitat. El precipitat es forma al barrejar una solució que conté clorur de calci amb una altre que conté fosfat. Un dels paràmetres més importants en aquest mètode és el pH de la solució de fosfat, per tant, cal preparar una bateria de solucions de diferents pH i testar-los en cada tipus cel·lular que es desitgi utilitzar. Un segon paràmetre a considerar és la quantitat de DNA. En aquest treball s'han utilitzat 20 µg de DNA per placa de 10 cm de diàmetre. Finalment, cal tenir en compte la densitat del cultiu cel·lular, essent el 40% la confluència òptima.

Reactius:

- Solució de clorur càlcic⁴
- Solució de fosfat⁵
- Aigua de Braun (*Aqua B. Braun* de *B Braun Medical S.A.*)
- PBS estèril
- Preparacions de DNA a una concentració superior a 1 µg/ µl

⁴ Composició de la solució de clorur càlcic: CaCl₂ 500 mM i BES 100 mM (Fluka) a pH 6.95

⁵ Composició de la solució de fosfat: NaCl 50 mM, Na₂HPO₄ 0.75 mM, NaH₂PO₄ 0.75 mM i BES 50 mM. Es poden fer alíquotes que oscil·lin entre sí 0,02 punts de pH

Procediment:

Tot el procés es porta a terme sota la campana de flux. Les cèl·lules es sembren el dia abans perquè en el moment de la transfecció estiguin aproximadament al 20-40% (optimitzar per cada tipus cel·lular). Es canvia el medi per medi de cultiu fresc abans de començar i es desen a l'incubador. Es prepara la barreja de DNA en un tub estèril de 15 ml: 18 µg del DNA d'interès + 2 µg de GFP + aigua fins a 250 µl (quantitats per una placa de 10 cm de diàmetre). S'afegeixen gota a gota 250 µl de la solució de calci i s'agita vigorosament. S'afegeixen gota a gota 500 µl de la solució de fosfat, mentre es barreja la mescla bombollejant a través d'una pipeta de 2 ml de cultius i el pipetejador automàtic. Es deixa reposar 15 minuts a temperatura ambient per afavorir la formació de precipitats, és important que la temperatura de la campana no sigui elevada. Transcorregut aquest temps, es torna a barrejar fent bombolles amb el pipetejador per tal d'homogeneïtzar la solució i s'afegeix a les cèl·lules gota a gota i lentament mentre s'agiten les plaques suaument. Es deixen les plaques a l'incubador entre 12 i 20 hores per tal que incorporin el precipitat. Passat aquest temps s'aspira el medi que conté el precipitat (que es pot observar al microscopi), es renten les plaques dues vegades amb PBS i s'hi afegeix medi de cultiu fresc. Al cap de 24 o 48 hores més, es pot realitzar l'experiment i la monitorització de l'eficiència de transfecció es pot seguir gràcies a la fluorescència de la GFP.

Condicions de cultiu de la línia cel·lular HeLa

Les cèl·lules HeLa procedeixen d'adenocarcinoma de cèrvix humà. Presenten un fenotip epitelial i tenen incorporades seqüències del papilomavirus humà 18 (HPV-18). Aquestes cèl·lules són àmpliament utilitzades per l'estudi de diferents proteïnes expressades de manera transitòria.

Medi de cultiu

500 ml. de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, 41966-029 GIBCO)

5,5 ml. de penicil·lina/streptomicina (100X)

55 ml. de FBS

Condicions de cultiu

Són cèl·lules que proliferen molt ràpid i per tant, cal subcultivar-les com a mínim dos cops per setmana. Es tripsinitzen amb menys de 2 minuts i es poden sembrar diluint-les en una relació de 1:4 fins a 1:10. És una línia cel·lular molt senzilla d'utilitzar.

Condicions de cultiu de la línia cel·lular OK

Les cèl·lules OK (*Opossum Kidney*) procedeixen del ronyó d'una femella adulta d'opòssum nord americà (*Didelphis marsupialis virginiana*). Presenten un fenotip epitelial i són capaces de formar una monocapa polaritzada arribant a formar cúpules o doms. És un model àmpliament utilitzat per estudiar el flux transepitelial del ronyó i per l'estudi dels nombrosos receptors que expressa.

Medi de cultiu

500 ml. de DMEM/Nutrition Mix F-12 amb glutamax i piridoxina (GibcoBRL, Life Technologies #31331-018)

5,5 ml. de penicil·lina/streptomicina (100X)

55 ml de FBS no inactivat

5,5 ml glutamina 2 mM

HEPES 25 mM

Condicions de cultiu

El cultiu es sol fer en flascons de 75 cm² i quan arriben a confluència es sembren diluïdes entre una 1:3 i una 1:8. Creixen formant illes i com més diluïdes es sembren, més lent és el seu creixement. La tripsina s'ha de deixar actuar de 5 a 10 minuts a 37°C i per acabar de separar les cèl·lules cal resuspendre amb el pipetejador automàtic unes 10-20 vegades.

Per aconseguir una monocapa impermeable es poden sembrar les cèl·lules en cistelletes amb una base de filtres permeables de policarbonat anomenades "Transwells" (Corning Costar, #3402, 3 mm de porus). Abans de sembrar les cèl·lules en els *transwells* cal aplicar un recobriment de col·lagen de tipus I (Upstate Biotechnology, #08-115) a una concentració de 10 µM (200 µl/pou) en medi de cultiu sense FBS a 37°C durant 3 hores abans de la sembra. Les cèl·lules s'han de tripsinitzar bé i contar per tal de sembrar 5·10⁵ cèl·lules/pou (en una placa de 12 pous) en un volum de sols 150-200 µl. La gota de cèl·lules es reparteix bé i es deixa que les cèl·lules s'enganxin durant dues hores. Passat aquest temps s'afegeix medi a dalt i a baix del transwell i es canvia el medi cada 48 hores. La formació de la monocapa s'aconsegueix al cap de 19 dies de cultiu i es pot comprovar perquè arriba a una resistència de 300 Ω/cm² (Millicell-Electrical Resistance System, Millipore. Cedit amablement per el Dr. Ricardo Casaroli).

Condicions de cultiu de la línia cel·lular PCT

Les cèl·lules PCT (PKSV-PCT) procedeixen de la microdissecció de la part contornejada dels túbuls proximals superficials de ronyó de ratolins mascles

transgènics L-PK/Tag. Presenten l'expressió estable de l'antigen T gran del SV40 sota el control del promotor de la piruvat quinasa de rata (Cartier *et al.* 1993; Lacave *et al.* 1993). Els cultius confluents, igual que en el cas de les cèl·lules OK, crescudes en plaques o filtres porosos, estan organitzats en monocapes de cèl·lules cuboïdals polaritzades amb microvil·lis apicals desenvolupats i formen doms.

Les cèl·lules PCT van ser cedides molt amablement pel Dr. Alain Vandewalle de l'Institut Fédératif de Recherche de París i la Dra. Anna Meseguer del Centre d'Investigacions en Bioquímica i Biologia Molecular (CIBBIM) de l'Hospital de la Vall d'Hebron de Barcelona.

Medi de cultiu

250 ml de HAM's F12 (Invitrogen, #21765-029)

250 ml de DMEM

5 µg/ml Insulina (Sigma, #I 1882): en 100 mg d'insulina afegir 9,9 ml d'aigua estèril i 0,1 ml d'àcid acètic. Guardar a 4°C.

50 nM de dexametasona (Sigma, #D8893): en 1 mg afegir 2,5 ml d'etanol al 95%.

60 nM de selenat de sodi (Sigma #S9133): dissoldre en d'aigua estèril

5 µg/ml de transferrina (Sigma #T1428): dissoldre en d'aigua estèril

50 nM de triiodotironina (T3, Sigma #T5516): dissoldre en etanol al 95%

10 ng/ml d'EGF de ratolí (Sigma, #E4127): dissoldre en aigua estèril

20 mM de HEPES

200 mM de Glutamina

10% de Sèrum fetal de vedella inactivat

2% de D-glucosa (Sigma #G-8644)

Condicions de cultiu

Aquestes cèl·lules es cultiven rutinàriament en flascons de 75 cm² a 37°C amb 5% de CO₂ i 95% d'humitat. La confluència s'aconsegueix al cap de 7 dies de la sembra al 20%. Aquest tipus cel·lular també s'ha crescut sobre filtres porosos per aconseguir una monocapa seguint el mateix protocol utilitzat per les cèl·lules OK. L'única diferència és que les cèl·lules PCT aconseguixen la màxima resistència elèctrica transepitelial de la monocapa a partir del dia 16, arribant a uns valors de 300 a 500 Ω/cm².

Condicions de cultiu de les línies cel·lular de placenta: BeWo, JAR i Jeg-3

Les tres línies cel·lulars provenen de coriocarcinomes humans i tenen una morfologia epitelial imitant les cèl·lules trofoblàstiques de la placenta (Hertz 1959;

Kohler i Bridson 1971; Story *et al.* 1974). Són capaces de formar monocapes. En aquest treball només s'han cultivat per obtenir RNA.

Les tres línies cel·lulars van ser cedides molt amablement per la Dra. M^aÁngeles Serrano de la Facultat de Medicina de la Universidad de Salamanca.

Medi i condicions de cultiu de cèl·lules BeWo

500 ml Ham's F12K (Kaighn's modification, #21127-022)

2 mM glutamina

10% FBS inactivat

Subcultivar-les cada 3-4 dies a partir d'una dilució 1:6 utilitzant tripsina.

Medi de cultiu de cèl·lules JAR

500 ml medi RPMI 1640 (Sigma #R8755)

2 mM L-glutamina

1,5 g/l NaHCO₃

4,5 g/l glucosa

10 mM HEPES

1 mM piruvat sòdic

10% FBS inactivat

Medi i condicions de cultiu de cèl·lules JEG-3

500 ml Eagle's Minimum Essential Medium (Sigma, #M0643)

2 mM L-glutamina

1,5 g/l NaHCO₃

0,1 mM aminoàcids no essencials

1 mM piruvat sòdic

10% FBS inactivat

Subcultivar amb dilucions de 1:4 a 1:6 i canviar el medi 2 o 3 cops per setmana.

IV. ASSAJOS DE TRANSPORT

Assaig de transport en oòcits de *Xenopus Laevis*

Els assajos de transport en oòcits es realitzen 48 h després de la injecció per garantir un bon nivell d'expressió de la proteïna d'estudi.

Reactius:

- Clorur de colina 1 M (per assajos en absència del ió sodi, serà 10x)
- Tampó sals 10x⁶
- Clorur de sodi 1 M (per assajos amb sodi, serà 10x)
- Tampó de transport 1x: tampó sals 1x i clorur de colina o sodi 100 mM, 1x.
- Solució de parada: tampó de transport 1x en presència de 10 mM de l'aminoàcid que es transporti, refredat a 4°C.
- Tampó de sortida: tampó de transport 1x, en absència o presència de l'aminoàcid fred a 5mM
- Estoc d'aminoàcids: Si la seva solubilitat ho permet estan dissolts en aigua a 50 mM i es guarden a -20°C
- Medi de transport: tampó de transport 1x en presència d'aminoàcid radioactiu (10 µCi/ml per ³H i 2 µCi/ml per ¹⁴C) i aminoàcid fred (no radioactiu) fins a la concentració desitjada. En experiments d'inhibició s'afegeix al medi de transport generalment 100 o 1000 vegades més d'inhibidor (aminoàcid) fred en excés.
- Solució de lisi: SDS 10%
- Cabina amb termòstat a 16°C
- Líquid de centelleig (ICN)
- Comptador beta (Beckman LS 6000TA)
- Tubs de transport (5 ml *polypropilene tub* 000-2053-001; Elkay)
- Pipetes Pasteur de plàstic (Rubilabor)
- Vials de vidre (*Liquid scintillation vials* V-7130; SIGMA)

Procediment en l'assaig d'entrada de substrat:

Cada grup de transport consta de 7 oòcits, que es posen amb l'ajuda d'una pipeta Pasteur de plàstic, en un vial de vidre amb tampó de transport 1X i s'hi mantenen durant 30 segons. A continuació, es recullen i es passen a un tub de transport. S'aspira el medi curosament amb una micropipeta (per no diluir el medi de transport i vigilant de no danyar els oòcits) i s'afegeixen 100 µl de medi de transport. S'agita lleugerament el tub i s'incuben els oòcits en aquest medi durant un període de temps determinat. Transcorregut aquest temps, s'aspira el medi radioactiu amb una micropipeta i es fan tres rentats amb 4 ml de solució de parada fred. L'excés d'aminoàcid no marcat del solució de parada permet desplaçar l'aminoàcid marcat que pugui haver-se unit a la superfície de l'oòcit.

Cadascun dels oòcits es posa per separat en un vial de centelleig en presència de 200 µl de solució de lisi, i es deixa en agitació forta a temperatura

⁶ Composició del tampó sals 10x: 20 mM KCl, 10 mM CaCl₂·2H₂O, 10 mM MgCl₂·6H₂O, 100 mM HEPES portar-ho a pH 7.4 amb Tris Base.

ambient fins que l'òocit es dissol completament. S'afegeixen a cada vial 3 ml de líquid de centelleig i es compta la radioactivitat en un comptador beta. És necessari comptar (per triplicat), 10 µl del medi de transport sobrant per tal de determinar-ne l'activitat específica. L'entrada de substrats induïda en els oòcits injectats es calcula restant l'entrada que es produeix en oòcits no injectats. Els resultats s'expressen com a pmols d'aminoàcid/unitat de temps i per oòcit.

Procediment en l'assaig de sortida (*efflux*) de substrat:

Els assajos de sortida de substrat requereixen la pre-incubació amb el medi radioactiu abans de realitzar el transport, per tal de què l'òocit acumuli radioactivitat a dins.

Grups de 3 a 5 oòcits es mantenen 30 s en un vial de vidre amb tampó de transport 1x. Es passen a un tub de transport i s'aspira el medi. S'afegeixen 100 µl de medi de transport (1 µCi/100 µl) i s'incuba durant una hora. Alguns oòcits s'utilitzen com a control de càrrega, per exemple en l'experiment de sortida de ¹⁴C Phe per LAT4, els oòcits van acumular abans del transport 3000 i 10000 cpm/oòcit en els no injectats i els injectats amb LAT4, respectivament.

La resta d'oòcits s'utilitzen per l'assaig de sortida. Després de l'hora d'incubació, es fan 4 rentats amb 4 ml de tampó de transport 1x a temperatura ambient. S'aspira el medi amb cura i s'afegeixen 500 µl de tampó de sortida. Es van traient alíquotes de 100 µl de tampó de sortida a temps zero i a diferents temps. Cadascuna de les alíquotes es posa en un vial en presència de 3 ml de líquid de centelleig i es compten les cpm en un comptador beta.

A partir dels valors anteriors es pot calcular la velocitat de sortida i comprovar si hi ha *trans*-estimulació del transport degut a la presència d'aminoàcid fred a fora o no.

Assaig de transport en cèl·lules PCT

Pels assajos de transport en cèl·lules PCT polaritzades s'han utilitzats plaques de 12 pous amb els filtres porosos de *Costar*, "*Transwells*". A partir del 16è dia després de la sembra, com s'ha comentat anteriorment, és el moment en què la monocapa aconsegueix màxima resistència elèctrica.

Reactius:

- Tampó de transport⁷
- Tampó de parada: tampó de transport a 4°C amb 100 vegades de substrat fred

⁷ Composició del tampó de transport: 137 mM *N*-metil-D-glucamina (MGA, Fluka #66930) que es substitueix per 127 mM de NaCl en transports depenents de sodi; 5,4 mM KCl; 2,8 mM CaCl₂·2H₂O; 1,2 mM MgSO₄·7H₂O; 10 mM HEPES a pH 7,4.

- Estocs d'aminoàcids 50 mM en tampó de transport i es guarden a -20°C
- Solucions radioactives: Es preparen amb el tampó de transport, l'aminoàcid fred i el radioactiu (2 µCi/ml)
- Solució de lisi: Tritó-X100 0,5% i NaOH 100 mM
- Cabina amb termòstat a 37°C.
- Líquid de centelleig (ICN).
- Comptador beta (Beckman LS 6000TA).
- Bisturí

Procediment per l'entrada basolateral de substrat:

Es canvia el medi de cultiu dels *transwells* el mateix dia abans del transport. Cada punt de transport es fa per triplicat. S'aspira el medi apical i basal dels tres *transwells* i la cistella es col·loca a una placa de 12 pous nova. Es renten les dues superfícies (apical i basal) del filtre amb tampó de transport a 37°C (0,5 ml aprox.) tres vegades i s'inicia el transport afegint 500 µl de solució radioactiva també a 37°C a la superfície basal del filtre mentres que la superfície apical s'hi manté el tampó de transport. Passat el temps de transport desitjat, s'aspira la solució radioactiva i es renta tres vegades el filtre per la cara basal amb tampó de parada. Els zeros es mesuren afegint la solució radioactiva a la cara basal i aspirant-la immediatament. Un cop finalitzat l'assaig, es renta el filtre amb tampó de parada i es deixa assecar a 37°C. Cada filtre es separa del *transwell* o cistella amb l'ajuda d'un bisturí i es col·loca en un tub *ependorf* amb 200 µl de solució de lisi. Passats 30 min d'homogeneïtzar la solució i s'agafa una alíquota de 20 µl per valorar (per duplicat) la concentració de proteïna pel mètode BCA (*BiCinchoninic Acid*). De la resta, se n'introdueixen 100 µl en un microvial amb 3 ml de líquid de centelleig per quantificar l'entrada d'aminoàcid. També cal comptar la radioactivitat de 10 µl de la solució radioactiva per conèixer les cpm totals de la solució i poder expressar el resultat en nmols/mg proteïna · min.

V. TÈCNIQUES D'OBTENCIÓ, MANIPULACIÓ I DETECCIÓ DE DNA

Obtenció de DNA plasmídic

La clonació d'una determinada seqüència de DNA en un vector plasmídic permet l'amplificació d'aquesta seqüència per a diferents aplicacions. En funció de la quantitat de DNA que es vol produir existeixen diferents sistemes amb rangs de purificació diferents. En la realització d'aquesta tesi, per obtenir entre 5 i 15 µg de

DNA plasmídic s'ha emprat les miniprep (Sigma) i entre 300 i 500 µg les maxipreps (QUIAgen).

El procediment s'ha realitzat seguint les instruccions del fabricant:
<http://www.sigmaaldrich.com/>

Electroforesi i purificació de DNA en gel d'agarosa

L'electroforesi en gels d'agarosa és el mètode estàndard per separar fragments de DNA. Aquests migren en el gel de manera inversament proporcional al logaritme del seu pes molecular. En funció de la mida del fragment de DNA que es vulgui separar es prepara amb un percentatge d'agarosa o altre (1% d'agarosa per separar fragments d'entre 0,4-6 Kb).

Per purificar els fragments de DNA continguts en un gel d'agarosa o provinents d'una PCR, s'han utilitzat dos sistemes comercials: "*GFX PCR and gel band extraction kit*" d'Amersham i "*Agarose Gel DNA Extraction Kit*" de Roche. El segon sistema permet obtenir DNA de major puresa. Tots dos kits utilitzen una solució amb alt contingut de sal caotrópica que combinada amb escalfament (50-60°C) solubilitza l'agarosa i allibera el DNA. Aquest DNA és retingut a una matriu on posteriorment es renta i s'acaba eluint.

El procediment s'ha realitzat seguint les instruccions del fabricant:
<https://www.roche-applied-science.com/> i <http://www.amersham.com/>

Clonació de productes de PCR en el vector pGEM-T Easy

En alguns casos ha estat necessari clonar productes amplificats per PCR en un vector. L'opció escollida ha estat la clonació en el vector pGEM-T Easy (Promega). Aquest vector té la peculiaritat d'estar obert enmig d'una diana EcorV (enzim rom) al qual s'ha afegit dues timidines als extrems 3' convertint-los en protuberants. Això permet lligar al mig productes de PCR amplificats amb DNA polimerases que afegeixin una adenina als extrems 3' (activitat desoxiadenina terminal transferasa). En cas de voler clonar productes provinents d'una amplifcació amb una DNA polimerasa sense aquesta activitat (p.e. *Pfu* polimerasa) es poden afegir adenines fàcilment. Cal incubar la mescla de PCR amb 1µl de dATP 2 mM i 1U de Taq polimerasa durant 5 min a 96°C seguit de 20 min a 72°C.

El procediment s'ha realitzat seguint les instruccions del fabricant:
<http://www.promega.es/>

Seqüenciació de DNA

En aquesta tesi, per seqüenciar el DNA s'ha usat el kit de seqüenciació comercial de "BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit". Les mostres s'han

processat en un analitzador "ABI3730" dels Serveis Científico-Tècnics del Parc Científic de Barcelona. Seguint el procediment de PCR i precipitació del fabricant, es poden obtenir seqüències d'elevada qualitat i de fins a 800 nucleòtids.

Obtenció de cDNA

Per diferents aplicacions resulta necessari convertir RNA en DNA. És el cas d'aplicacions com la quantificació de RNA missatger determinat per PCR a temps real, PCR semiquantitativa, o quan es vol amplificar una determinada seqüència de RNA amb la finalitat de clonar-la, seqüenciar-la, etc... El pas de RNA en DNA s'aconsegueix per acció d'una retrotranscriptasa, enzim capaç de sintetitzar una cadena de DNA usant RNA com a motlle, en presència d'un encebador, que pot ser específic en cas de voler una seqüència concreta, inespecífic, quan és un oligonucleòtid *poli*dT, que hibrida amb les seqüències poliA dels RNA missatger; o bé oligonucleòtids degenerats que idealment permetran la retrotranscripció de tot el RNA.

En aquesta tesi s'ha utilitzat la retrotranscriptasa de la casa comercial Invitrogen i s'ha seguit el procediment tal com indica el fabricant.

Obtenció de DNA genòmic

Per genotipar la colònia d'animals EEG1-Y221* utilitzats en aquesta tesi, s'ha extret el DNA d'un tros (1-5 mm) de cua del ratolí. Aquest procediment es realitza amb un bisturí i si la ferida sagna, es cicatritza amb un cauteritzador (HTC model F7244 *High temperature cautery*).

Per l'extracció del DNA genòmic a partir de cues de ratolí, cal digerir el teixit amb proteïnasa K, precipitar el DNA i resuspendre'l en un tampó adequat per les aplicacions que es necessiti. Per exemple, en aquesta tesi, s'ha usat per la PCR de genotipació de la colònia EEG1-Y221* i posterior seqüenciació.

Materials i reactius:

- Tampó de lisi: 100 mM Tris/HCl pH 8.5-9, 200 mM NaCl, 0.2 % SDS, 5 mM EDTA en aigua.
- Proteïnasa K 20 mg/ml
- Isopropanol pur
- Etanol 70%
- Tampó TE: 10 mM Tris pH 7.5 i 1 mM EDTA

Procediment:

- Afegir 490 µl de tampó de lisi i 10 µl de proteïnasa K a cada tros de cua

- Incubar tota la nit a 55°C amb agitació
- Centrifugar 15 min a 16000 g.
- Recollir el sobrenedant en un tub nou i afegir-hi 500 µl d'isopropanol
- Invertir el tub diverses vegades fins veure aparèixer el DNA
- Centrifugar 3 minuts a 16000 g.
- Descartar el sobrenedant
- Afegir 500 µl d'etanol 70% i vortejar els tubs per rentar el pellet
- Centrifugar 2 min a 16000 g.
- Eliminar el sobrenedant i deixar evaporar les traces d'etanol que quedin al tub
- Resuspendre el DNA amb tampó TE (uns 300 µl aprox.)
- Guardar a -20°C

Amplificació de DNA per PCR

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) és l'amplificació específica de DNA. Perquè tingui lloc aquesta reacció s'utilitzen DNA polimerases aïllades de procariotes que catalitzen la síntesis de DNA a partir d'un motlle, encebadors, desoxinucleòtids (dNTPs) i sal de magnesi entre d'altres reactius. La reacció consisteix en la repetició de diversos cicles de desnaturalització a alta temperatura, hibridació dels encebadors amb el DNA i amplificació del DNA.

Per tal d'aconseguir una amplificació eficient, cal posar a punt diferents variables com la DNA polimerasa, la concentració del ió magnesi, la longitud dels encebadors, etc... En aquesta tesi, pel que fa a disseny d'encebadors i a la selecció de DNA polimerasa s'han seguit els criteris que segueixen a continuació; i pel que fa a la quantitat de dNTPs, tampó, concentració del ió magnesi, temperatura d'hibridació dels encebadors i d'extensió s'ha posat a punt per cada PCR seguint les instruccions del manual del reactiu.

Disseny d'encebadors

Per la selecció i disseny dels encebadors necessaris per les PCRs, s'ha utilitzat el programa *PrimerSelect* del paquet de programes "*Lasergene*" (DNA Star).

Els criteris generals que s'han utilitzat alhora d'escollir els encebadors són: una longitud d'entre 17-25 nucleòtids, contingut de G/C entre 40-60%, que no formin estructures secundàries internes (*hairpins*), ni dímers amb si mateix o amb l'encebador de la cadena complementaria, tenir una temperatura de fusió que permeti la hibridació entre 55 i 65°C, que no contingui repeticions de nucleòtids i que sigui només específica del fragment a amplificar (comprovar per BLAST).

Selecció de la DNA polimerasa

Tot i que hi ha gran quantitat de polimerases, en aquesta tesi se n'ha emprat dues. La Taq polimerasa de *Biotoools* s'ha usat per genotipar ja que té baix cost i un elevat rendiment; la Pfu polimerasa, s'ha utilitzat per la clonació de fragments i per mutagènesi, ja que té l'activitat 3'-5' exonucleasa que proporciona major fidelitat en la copia del DNA.

Mutagènesi dirigida

Aquesta aplicació s'ha utilitzat en aquesta tesi per d'introduir mutacions puntuals a la proteïna d'interès i analitzar-ne l'efecte en la funció. S'ha utilitzat el kit de mutagènesi *QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene), que permet l'obtenció ràpida de plasmidis mutants partint de DNA de cadena doble. El mètode es basa en l'amplificació de DNA per PCR amb la DNA polimerasa *Pfu*, a partir de dos oligonucleòtids complementaris que contenen la mutació que es vol introduir. El producte de PCR es digereix amb l'enzim Dpn I, que només talla el DNA que està metilat i per tant permet eliminar el DNA parental no mutat. Després es transforma el DNA en bacteris *E. coli* competents, on només s'introduirà el DNA no tallat i mutat. S'analitzen per seqüenciació els clons obtinguts.

El procediment s'ha realitzat seguint les instruccions del fabricant: <http://www.stratagene.com>

RACE-PCR (5' and 3'-Rapid Amplification of cDNA Ends)

Aquesta aplicació permet amplificar de manera ràpida extrems 3' i 5' de cDNAs. La tècnica constiteix en la síntesi de cDNA amb la introducció d'un oligonucleòtid que s'uneix a un dels extrems de la cadena de cDNA sintetitzada. Aquesta cadena de cDNA amb l'oligonucleòtid a l'extrem, juntament amb un encebador específic per anellar-se a aquest extrem i un segon encebador específic per el gen, s'amplifica des de l'extrem (1a. PCR) i s'obté un motlle per a la segona PCR, "Nested PCR" (Siebert *et al.* 1995).

Reactius:

Per la síntesi de la primera cadena de cDNA:

- 1 µl oligonucleòtid **SMART** (10 µM):
5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3'
- 1 µl encebador **3'-RACE CDS** (3'-CDS, 10 µM):
5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)₃₀N₋₁N-3' (N=A,C,G o T; N₋₁=A,G o C)
- 1 µl encebador **5'-RACE CDS** (5'-CDS, 10 µM): 5'-(T)₂₅N₋₁N-3'
- 1 µl SuperScript II

- 4 µl tampó 5x de l'enzim
- 2 µl DTT (0,1 M)
- 1 µl de mescla de dNTPs (10 mM)
- Fins a 20 µl d'aigua desionitzada

Per la 5' o 3' RACE-PCR:

- Mescla d'encebadors Universals a 10x (Universal Primer Mix: **UPM**)
Llarg (0.4 µM):
5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'
Curt (2 µM):
5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
- Encebador *Nested* Universal (**NUP**, 10 µM):
5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'
- Taq polimerasa, dNTPs, tampó de la Taq, encebadors específics del teu gen, DMSO optatiu i aigua desionitzada.

Procediment:

La síntesi de cDNA introdueix un oligonucleòtid SMART (Switching Mechanism At 5' end of RNA Transcript) en el cas d'amplificació de l'extrem 5' que permet afegir un fragment a l'extrem 5' que en la RACE-PCR serà reconegut per l'encebador UPM (Chenchik *et al.* 1996).

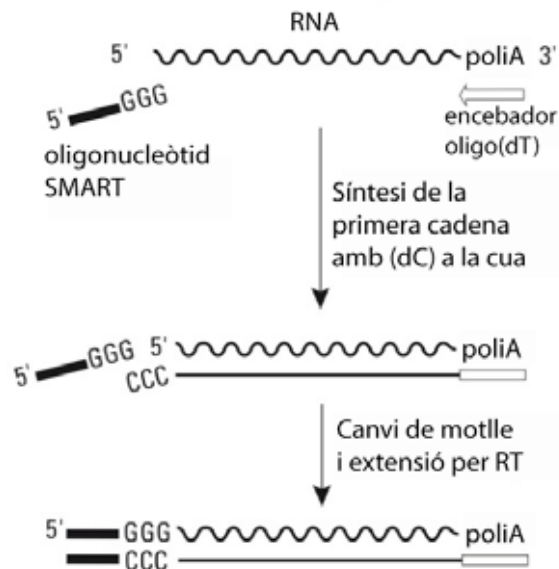


Fig. 6 Mecanisme de síntesi de cDNA amb l'oligonucleòtid SMART. La síntesi de la primera cadena està encebada per el oligo(dT). Quan la transcriptasa reversa arriba al final afegeix alguns residus dC. L'oligonucleòtid SMART s'anella a la cua del cDNA i serveix de motlle per la SuperScript II RT.

Es parteix de 5 µg de RNA total i en la síntesi de la primera cadena de cDNA, l'oligonucleòtid SMART aprofita l'activitat transferasa terminal de la retrotranscriptasa (*Superscript II*, Invitrogen) que afegeix de 3 a 5 residus (predominant dC) a l'extrem 3' terminal de la primera cadena de cDNA i permet l'enllaç de l'oligonucleòtid per les tres Gs de l'extrem 3' (Fig. 6). En el cas de voler amplificar per l'extrem 5' cal afegir a la reacció de retrotranscripció un encebador oligo(dT), en el nostre cas el 5'-CDS, i en el cas de pretendre amplificar l'extrem 3' cal afegir el 3'-CDS sense l'oligonucleòtid SMART. A part dels encebadors específics, el protocol de síntesi de la primera cadena de cDNA és el mateix que s'ha detallat prèviament.

mostra	1a. RACE PCR		2a.ronda RACE PCR	
	5'RACE	3'RACE	5'RACE	3'RACE
5'RACE cDNA	2,5 µl	-	-	-
3'RACE cDNA	-	2,5 µl	-	-
1/10 de 1a. RACE PCR	-	-	5 µl	5 µl
UPM (10X)	5 µl	5 µl	-	-
NUP (10X)	-	-	1,5 µl	1,5 µl
EGE-F1 (10 mM)	-	1,5 µl	-	-
EGE-R1 (10mM)	1,5 µl	-	-	-
EGE-F2 (10 mM)	-	-	-	1,5 µl
EGE-R2 (10mM)	-	-	1,5 µl	-
MIX	41 µl	41 µl	41 µl	41 µl
Volum final	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

Taula 3. Reaccions de RACE PCR. Es mostren els volums utilitzats per cada ronda de PCR. La Mix conté la Taq polimerasa, el seu tampó, dNTPs i aigua a la concentració i volums indicats pel fabricant. Les caselles en blanc indiquen que en aquest tub no s'hi afegeix el component corresponent (-). A més dels tubs de PCR indicats a la taula, com en totes les amplificacions, es convenient afegir controls positius i negatius. EGE-F1: Encebador Gen Específic-Forward1, EGE-R1: Encebador Gen Específic-Reverse1.

Després de la retrotranscripció, el cDNA s'utilitza directament a la reacció de 5' o 3'-RACE PCR. Per portar a terme la RACE PCR és necessari conèixer una part de la seqüència del gen a amplificar per tal de dissenyar dos parells d'encebadors específics (EGE-F1/R1 i F2/R2, Encebadors Gen Específics). La primera RACE PCR s'amplifica a partir del motlle de cDNA 3' o 5' i amb els encebadors UPM (que s'anella al fragment que ha introduït l'oligonucleòtid SMART) i l'específic del gen d'interès (EGE-F1 o R1). En la segona ronda de RACE PCR (o *Nested* PCR) s'utilitza de motlle una dilució 1/10 de la PCR de la 1a ronda i els encebadors NUP (que

s'anella al fragment que ha introduït UPM i els encebadors específics (EGE-2) que s'anellen dins el fragment generat a la 1a ronda (Taula 2). Aquesta 2a ronda sol tenir més garanties d'èxit degut a què en la 1a ronda s'enriqueix la mostra amb el DNA d'interès.

SOE-PCR (Splicing by Overlap Extension PCR)

Aquesta aplicació de la PCR permet fusionar dos fragments de PCR amb extrems complementaris mitjançant una PCR de solapament (Ho *et al.* 1989). Aquesta tècnica té gran varietat d'utilitats, com per exemple la introducció de canvis en la seqüència nucleotídica, la mutagènesi dirigida, la unió de seqüències complementaries, etc... En aquesta tesi s'ha usat per introduir fragments de DNA curts (epítip HA) en el fragment de DNA d'interès.

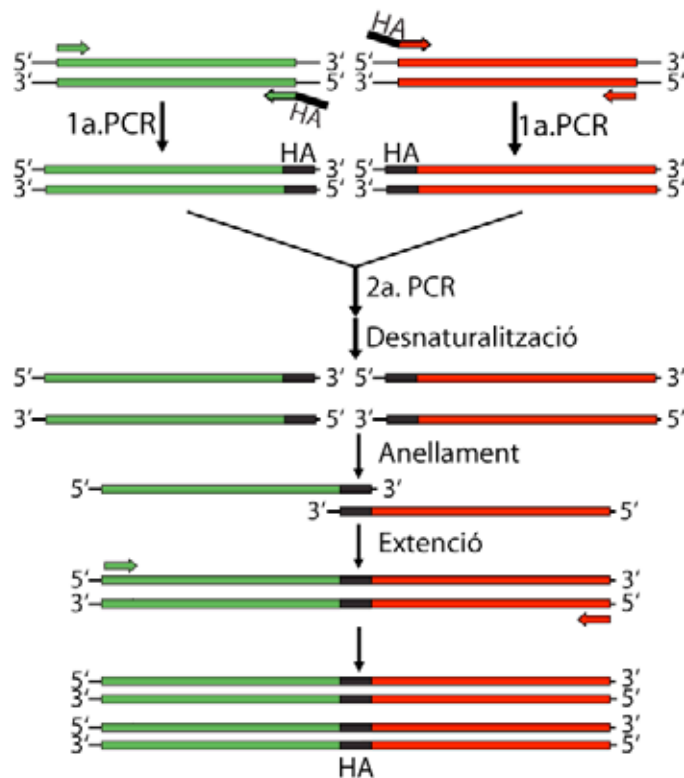


Fig. 7 Esquema de SOE-PCR. Es mostren de forma esquemàtica dos fragments de DNA, l'un verd i l'altre vermell, on mitjançant un encebador que porta la seqüència d'hemaglutinina (HA, negra) i dues PCR successives s'ha pogut generar una nova seqüència. Com es pot veure, en la primera PCR s'utilitza un encebador específic (verd) i un segon que conté una part específica (verda) de la seqüència i una cua amb la seqüència exògena penjant (part negra). Una vegada els fragments tenen incorporada la seqüència exògena (HA, en aquest cas), es porta a terme la segona PCR de solapament de les zones complementaries, i s'amplifiquen amb els encebadors més externs.

El procediment consta de dues PCRs, a la primera s'introdueix el fragment exogen a partir dels encebadors, generant un excés de la nova cadena amb

l'epítot integrat. A la segona PCR s'anellen les zones exògenes introduïdes i l'extensió té lloc pel solapament dels fragments amplificats en la primera PCR (Fig. 7).

VI. TÈCNiques D'ObTENCIÓ I DETECCIÓ DE RNA

El RNA és una molècula molt sensible a l'acció de les RNAses, per tant, cal tenir especial cura alhora de treballar amb ell. Per evitar la seva degradació cal que tot el material i les solucions que hagin d'entrar en contacte amb ell estiguin lliures de RNAses (*RNAse-free*). També és necessari treballar amb guants, utilitzar material estèril i fer servir aigua miliQ prèviament tractada amb DEPC⁸.

Obtenció de RNA total

Per l'extracció de RNA tant de teixits de ratolí, com de línies cel·lulars s'ha utilitzat el mètode d'aïllament de RNA amb "*TRIzol*" (Invitrogen, #74104). L'avantatge del "*TRIzol*", és l'alt rendiment que se n'obté en detriment de la seva puresa, per aquest motiu, per obtenir RNA amb major grau de puresa, s'han utilitzat les columnes de "*RNeasy Mini Kit*" (Quiagen, #74104). La valoració del RNA s'ha realitzat amb el *NanoDrop* ND-1000, que permet determinar espectrofotomètricament la concentració d'àcids nucleics amb un sol microlitre de mostra. Finalment, es comprova la integritat de la mostra mitjançant un gel d'agarosa-formaldehid.

Aïllament de RNA total mitjançant el reactiu "*TRIzol*"

El "*TRIzol*" és un reactiu comercial que permet l'obtenció de RNA a partir de teixits o cultius cel·lulars. Consisteix en una solució de fenol i isotiocianat de guanidini que preserva la integritat del RNA (a l'inactivar les RNAses) alhora que trenca les cèl·lules i en dissol els seus components. L'addició posterior de cloroform seguida de centrifugació, permet la separació de la solució en dues fases, una aquosa i una orgànica. El RNA es manté soluble a la fase aquosa, de la qual es precipita amb isopropanol.

El procediment s'ha realitzat seguint les instruccions del fabricant: <http://www.invitrogen.com/>

⁸ Aigua desionitzada (Milli-Q, Millipore), DEPC (dietilpirocarbonat) 0,01%. Incubem l'aigua desionitzada amb el DEPC durant 12 h a 37°C i amb agitació. Ho autoclavem per inactivar el DEPC que podria modificar químicament les purines de l'RNA.

Aïllament de RNA total mitjançant el kit "RNeasy" (Quiagen)

L'avantatge d'aquest kit és la rapidesa en el procediment i que no utilitza fenol. Permet obtenir preparacions de RNA total de fins a 100 µg a partir de cèl·lules i teixits, llevats i bacteris.

El protocol consisteix bàsicament en una lisi i homogeneïtzació de les mostres en presència d'isotiocianat de guanidini. L'ús d'una columna de gel de sílice permet la separació del RNA total (de llargada superior a 200 bases). A més, el protocol inclou un pas alternatiu de tractament amb DNAsa que permet la digestió del DNA durant el procediment de purificació.

El procediment s'ha realitzat seguint les instruccions del fabricant: <http://www1.qiagen.com/>

Tractament de l'RNA amb DNAsa

Per certes aplicacions, cal eliminar el DNA de les mostres de RNA. En aquests casos, s'utilitza la DNAsa lliure de RNAses, com per exemple la DNAsa I (*Ambion*).

Procediment:

Afegir 2U de DNAsa I per cada 10 µg de RNA, el tampó i aigua necessaris per arribar a un volum d'entre 20 i 50 µl. És important no vortejar, ja que l'enzim és sensible al tractament mecànic.

La incubació a 37°C durant 30 minuts normalment és suficient per degradar el DNA contaminant.

Síntesi de cRNA: Transcripció *in vitro*

En aquesta tesi ha estat necessària la síntesi de cRNA *in vitro* per poder expressar proteïnes en oòcits de *Xenopus* i per la síntesi de sondes "sense" i "antisense" per la hibridació *in situ*. La síntesi de cRNA es realitza a partir d'un plasmidi que conté el promotor de l'RNA polimerasa del fag T7, T3 o SP6 (o un a cada costat per poder sintetitzar cRNA en sentit i en sentit contrari).

El primer pas és tallar el plasmidi que conté el cDNA per linealitzar-lo més enllà de la regió 3' codificant. Es purifica el producte mitjançant el kit "*High Pure PCR Product Purification Kit*" (Roche). Per a la reacció de transcripció s'ha utilitzat el kit *mMessage mMachine* (Ambion; *T7 RNA Polymerase*, 1344 o *SP6 RNA Polymerase*, 1340), seguint les instruccions d'ús del fabricant. Al finalitzar el procés, es valora el cRNA sintetitzat espectrofotomètricament i es comprova la seva integritat i la mida adequada en un gel d'agarosa-formaldehid. El cRNA es guarda a -80°C fins el moment de ser utilitzat.

Northern blot

Aquesta aplicació permet detectar entre una mescla de RNAs, la presència d'un RNA particular, determinar-ne la mida i quantificar-ne l'abundàcia. Breument, el procediment consisteix en separar l'RNA total aïllat en una electroforesi desnaturalitzant, transferir-lo a una membrana de niló i unir-li covalentment. Aquesta membrana s'incuba amb una sonda específica per l'RNA que es desitgi detectar. En el cas del northern blot amb RNA humà, s'ha utilitzat una membrana comercial amb 12 poli(A⁺)RNA diferents (BD Biosciences, #636818).

Electroforesi de RNA

L'electroforesi desnaturalitzant es porta a terme en un gel d'agarosa-formaldehid. Aquesta tècnica s'utilitza tant per visualitzar RNA, com per posteriorment transferir l'RNA a una membrana i realitzar el northern blot.

Reactius:

- Tampó d'electroforesi de RNA 10X⁹
- Tampó de càrrega desnaturalitzant¹⁰
- Gel d'agarosa/formaldehid: el percentatge d'agarosa es pot modificar en funció de la mida del RNA que es vol detectar. En aquesta tesi s'ha utilitzat un 1% d'agarosa dissolta en tampó d'electroforesi 1x. Es deixa baixar la temperatura sense que polimeritzi i s'afegeix el formaldehid 0,66 M
- Bromur d'etili 440 µg/ml en aigua DEPC
- Marcador de pes molecular

Procediment:

La polimerització del gel es porta a terme sota la campana extractora. Als 25 µg d'RNA, s'hi afegeix el mateix volum de tampó de càrrega desnaturalitzant i 1 µl de bromur d'etidi per visualitzar l'RNA en el transil·luminador. La mescla es desnaturalitza durant 10 min a 65°C. Les mostres es carreguen al gel d'agarosa/formaldehid polimeritzat i es deixen avançar durant 4-5h amb un voltatge de 60 V o durant tota la nit a 20 V.

Síntesi de la sonda marcada

Reactius:

- Kit de marcatge de sondes radioactives (*RediprimeTM II, Amersham, #RPN1633*)

⁹ Composició tampó electroforèsi RNA 10x: MOPS 400 mM a pH 7, acetat sòdic 100 mM i EDTA 10 mM. S'autoclava i es guarda a temperatura ambient protegit de la llum.

¹⁰ Composició del tampó de càrrega desnaturalitzat: formamida desionitzada 48% (v/v), formaldehid 6,4% (2,1 M), blau de bromofenol 0,53%, glicerol 5,3% en tampó d'electroforesi 1x. Es guarda a -20°C.

- Columnes MicroSpin G-50 (Amersham, #27-5120-01)
- $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP Redivue (Amersham): 3000 Ci/mmol (#AA005)

Procediment:

Les sondes utilitzades s'han obtingut de fragments de cDNA recuperats d'una digestió amb enzims de restricció i purificació de la banda d'interès del gel d'agarosa.

El marcatge de la sonda es realitza per el mètode de *random priming*, que consisteix en l'elongació d'hexanucleòtids que hibriden amb la cadena de cDNA motlle per la subunitat *Klenow* de la DNA polimerasa d'*E.coli*. La mescla d'hexanucleòtids conté totes les combinacions possibles de les quatre bases nucleotídiques en grups de 6. A la reacció s'hi afegeix 25 ng de DNA (sonda), la barreja de reacció del kit de marcatge (que conté els dNTPs excepte el dCTP, l'enzim Klenow a 2 U/ μl i el tampó adequat), el nucleòtid radioactiu (en aquest cas $\gamma^{32}\text{P}$ -dCTP) i aigua fins a 50 μl . La reacció s'incuba a 37°C durant 1 hora. Es separa una alíquota de 2 μl per valorar l'eficiència d'incorporació i de síntesi. La resta de la sonda es passa per una columna de gel-filtració G-50 a 735 g durant 2min per eliminar els nucleòtids no incorporats. Ara es pot tornar a mesurar la radioactivitat incorporada a la síntesi i calcular l'eficiència de la reacció de marcatge.

Transferència, hibridació i revelat

Reactius:

- Tampó de transferència SSC 20x¹¹
- Solució comercial d'hibridació i pre-hibridació (Clontech #8015-1)
- Solució de rentat: SSC 2x, SSC 1x, SSC 0,5x i SSC 0,1x, totes amb SDS al 0,1%.
- Paper Whatmann 3 MM
- Membrana de niló (*Hybond N*, Amersham #RPN303B)
- Paper de filtre
- Tubs d'hibridació (*Hybond*)

Procediment:

Una vegada separat l'RNA per electroforesi es comprova, en una font de llum UV, que hagi migrat correctament i que la intensitat dels RNAs ribosòmics sigui la mateixa per a tots els RNAs.

La transferència es munta en una safata de vidre amb tampó de transferència 10x. El gel es col·loca sobre paper de filtre Whatmann situat sobre un vidre aguantat per la safata i que posa en contacte la solució de la safata amb el

¹¹ Composició SSC 20x: 0,3 M citrat sòdic a pH 7 i 3 M de NaCl en aigua DEPC.

gel fent de pont. Sobre el gel s'hi situa la membrana de nitrocel·lulosa de la mateixa mida que el gel. És important no deixar cap bombolla entre el paper, el gel i la membrana. Sobre la membrana, s'hi col·loquen papers de filtre de la mateixa mida (uns 10 cm d'alçada) i un pes a sobre per afavorir la pressió i el pas de tampó de la safata a través del gel i cap a la membrana. Per capil·laritat l'RNA es transfereix del gel a la membrana. Aquest procés dura unes 24h aproximadament.

El dia següent es desfà el muntatge, es renta breument la membrana amb tampó SSC 2x i es fixa covalentment l'RNA amb la irradiació a 254 nm en una càmera *BioRad GS Gene linkerTM* a 150 mJ durant 1 min.

El següent pas és la hibridació de la membrana amb la sonda radioactiva. Dos paràmetres importants en aquest procés són la temperatura i l'astringència dels rentats. En primer lloc es pre-hibrida la membrana amb la solució de pre-hibridació dins els tubs en agitació orbital a 65°C durant 1 hora. A continuació, es canvia la solució per la que incorpora la sonda radioactiva i s'hibrida d'una a tres hores a 42°C. Es descarta convenientment la solució i es comencen els rentats. En aquest treball s'han utilitzat les següents condicions: 20 min a temperatura ambient en un tampó de rentat SSC 2x i el mateix per el SSC1x; segueixen 2 rentats de 15 min a 65°C amb SSC 0,5x i SSC 0,1x, tots els tampons amb SDS 0,1%.

S'ha revelat amb una pantalla *PhosphorImager (Molecular Dynamics)*

Hibridació *in situ*

La hibridació *in situ* és una tècnica basada en la hibridació de fragments marcats de DNA o RNA d'una sola cadena (sondes) amb seqüències complementaries de DNA o RNA de la cèl·lula. Es poden utilitzar marcatges radioactius o colorimètrics. Els segons, són més ràpids, estables, barats i no cal exposició a la radioactivitat. En el cas de l'aplicació d'hibridació *in situ* la sonda marcada amb digoxigenina s'ha revelat amb els substrats NBT/BCIP (*nitroblue tetrazolium i 5-bromo-4-chloro-3-ondolyl phosphate*).

Aquesta tècnica s'ha utilitzat per la detecció de l'RNA de LAT4 en talls de ronyó i intestí. S'ha portat a terme en els laboratoris dels Serveis Científico-Tècnics del Parc Científic de Barcelona.

Síntesi i marcatge de la sonda:

Reactius per la síntesi de la sonda:

- DNA motlle (linealitzat)
- Digoxigenona-11-UTP (1209256, Roche)
- Kit de transcripció *in vitro* (Ambion)

- Columna G-25 (*MicroSpin™ G-25 Columns*; Amersham)
- LiCl 4M
- Etanol absolut
- Aigua DEPC

Procediment:

En primer lloc es sintetitza la sonda i es marca amb digoxigenina. En el nostre cas, vam construir un plasmidi amb cadascun dels fragments del cDNA de LAT4. Per generar el plasmidi amb la sonda de ratolí es va digerir el vector pTLNmLAT4 amb els enzims *PvuII* i *XbaI* (fragment del nucleòtids 1-322), es va incubar amb l'enzim *Klenow* i es va relligar. Per generar la sonda murina "sense" es digereix amb l'enzim *XhoI* i es sintetitza amb la RNA polimerasa SP6, i per l'"antisense" cal digerir amb *EcorV* i sintetitzar amb la RNA polimerasa T7. Per generar el plasmidi de la sonda humana cal digerir el vector pTLNhLAT4 amb *PvuII* i *XbaI*, incubar el producte amb l'enzim *Klenow* i relligar-ho. Per linealitzar el vector s'ha utilitzat els enzims *XhoI* i *EcorV* per a l'extrem *sense* i *antisense*, respectivament. Es linealitza el cDNA a un extrem o a l'altre en funció de la sonda que es vulgui obtenir (*sense* o *antisense*), i es procedeix a la reacció de marcatge amb el mateix kit de la síntesi de cRNA introduint les següents modificacions: i) Afegir 1 µl de dUTP-digoxigenina i ii) la precipitació de la sonda s'ha fet amb 2.5 µl de LiCl 4 M i 75 µl d'etanol fred (adequat per fragments de DNA petits, ja que la mida de les sondes ha estat d'aproximadament uns 300 nucleòtids). Al finalitzar el procés de síntesi, s'eliminen els nucleòtids no incorporats passant la sonda per una columna d gel-filtració de sefarosa G-25.

Una vegada s'ha sintetitzat la sonda es comprova el marcatge per dot-blot, es valora la concentració especrofotomètricament i comprova el bon estat de la sonda en un gel d'agarosa-formaldehid.

Preparació dels teixits i dels portaobjectes:

Reactius:

- Paraformaldehid 4%
- Alcohol
- Xilè
- Parafina
- Acetona
- 3-aminopropiltriètoxilà (#A3648, Sigma-Aldrich)
- Proteinasa K (Roche) (1 µg/ml) en Tris-EDTA pH 8.0.

Procediment:

Els fragments de ronyó i intestí es fixen amb paraformaldehyd al 4%. A continuació es deixen 2 hores en tampó fosfat 0,1 M a pH 8 a temperatura ambient, es deshidraten amb 70, 90 i 100% d'alcohol, la barreja d'alcohol/xilè (50/50; v/v) i xilè durant 2 hores en cada solució. Els fragments s'inclouen en parafina, es deixen refredar, es tallen seccions de 5 µm amb el micròtom Leica RM 2135 i es munten en portaobjectes prèviament silanitzats.

Els portaobjectes s'han de silanitzar per augmentar l'adherència del teixit a la superfície de vidre. També es poden utilitzar altres compostos com la gelatina, albúmina, poli-L-lisines, etc... en aquest cas, vam optar per l'aminoalquilsilà (Richardson i Dym 1994). Cal netejar bé el portaobjectes amb alcohol i tenir-los (recomanablement en *couplings*) durant 5 min en acetona pura, 2 min en una solució al 2% de silà en acetona, i 2 vegades en acetona pura durant 5 min. Es deixen assecar i ja estan a punt per utilitzar.

Es procedeix a desparafinar les seccions muntades al portaobjectes (3 rentats de 7 min amb xilol a temperatura ambient) i a hidratar el teixit (2 x 3 min etanol 100%, 3 min etanol 90% i 3 min etanol 70%, 3 min aigua DEPC, 20 min amb solució de rentat i finalment 2 x 5 min amb PBS). A continuació cal permeabilitzar el teixit amb una digestió amb proteasa (proteïnasa K).

Hibridació de la sonda:**Reactius:**

- Solució d'hibridació: formamida 50%, sulfat de dextrà 10%, 300 mM NaCl, 10 mM Tris HCl pH8, 5 mM EDTA a pH8, 10 mM NaH₂PO₄, solució de Denhardt¹², 400 ng/µl de DNA d'esperma de salmó desnaturalitzat i 5 ng/ml de sonda sentit o antisentit desnaturalitzada. Per a la desnaturalització, el DNA d'esperma de salmó i les sondes s'incuben a 70°C durant 4 minuts.
- Solució de rentat: 4% paraformaldehyd en PBS.
- RNasa A (Roche)
- Tampó RNasa: 500 mM NaCl, 10 mM Tris HCl pH 7.5, 5 mM EDTA
- Tampó Tris-HCl 10 mM pH 7.5
- NBT/BCIP (nitroblue tetrazolium i 5-bromo-4-chloro-3-ondolyl phosphate; Roche): 22,5 µl NBT i 17,5 µl de BCIP en 5 ml de tampó 2.
- Tampó 1: 100 mM Tris-HCl pH 7,5 i 150 mM NaCl
- Tampó 2: 100 mM Tris-HCl pH 9.5, 150 mM NaCl i 50 mM MgCl₂
- Solució de bloqueig: BSA 1% amb 0,1% de tritó en tampó 1

¹² Composició solució de Denhardt: 0.02% albúmina sèrica bovina, 0.02% ficoll i 0.02% polivinilpirrolidona. Es guarda aliquotat a -20°C.

Procediment:

Abans d'hibridar cal pre-hibridar la membrana durant 5 min en una solució de rentat, rentar 2 vegades durant 5 min en PBS, acetil·lar de 15 a 30 s a 4°C amb acètic glacial al 20% en aigua DEPC, rentar 2 vegades durant 5 min en PBS, incubar 10 min amb 100 mM trietanolamina pH 8 +0,25% fosfatassa alcalina, fer 2 rentats de 5 min en PBS, 1 min etanol 70%, 1 min etanol 90%, 1 min etanol 100% i deixar assecar a l'aire entre 30 min i una hora.

La hibridació de la mostra es realitza durant 16 h a 42°C amb la solució d'hibridació que conté 5 ng/µl de la sonda. Tot el procés té lloc en una cambra humida. A continuació es fan unes reaccions a 37°C de post-hibridació per eliminar unions inespecífiques amb: 15-20 min SSC 2x, 5 min amb SSC 2x+50% formamida, 3x 15 min amb tampó de RNAsa, 30 min RNAsa 10 µg/ml en tampó RNAsa, 15 min SSC 2x i 15 min SSC 0,1x.

Finalment, la detecció dels híbrids es realitza mitjançant 3 rentats de 10 min en tampó 1, seguit de 30 min en la solució de bloqueig i s'incuba tota la nit a 4°C amb anticòs anti-digoxigenina conjugat a la fosfatassa alcalina (dilució 1: 500 en solució de bloqueig). L'endemà es fan 2 rentats de 15 min en tampó 1 i un de 10 min en tampó 2. Finalment es revela amb el substrat NBT/BCIP.

Els talls s'han examinat en un microscopi òptic Olympus.

VII. TÈCNIQUES D'OBTENCIÓ, MANIPULACIÓ I DETECCIÓ DE PROTEÏNES

Obtenció de proteïnes totals

Per l'obtenció de proteïnes s'ha utilitzat un mètode basat en la lisi amb detergent. L'objectiu és permeabilitzar la membrana cel·lular per solubilitzar-ne el seu contingut, incloent els complexos de la membrana plasmàtica. Tot i que s'han utilitzat diferents tampons de lisi, els més utilitzats han estat el tampó RIPA¹³ i el més complet per totes les aplicacions que s'han realitzat ha estat el que conté NP-40¹⁴.

Just en el moment d'utilitzar-lo s'hi afegeixen els inhibidors de proteases a les següents concentracions finals: Pepstatin A 1µg / ml, Leupeptin 1µg / ml, aprotinina 1 U/ml i PMSF 1 mM.

¹³ Composició del tampó RIPA: Tris-HCl 50 mM a pH 8,0, NaCl 50 mM, Tritó X-100 0,5 %, deoxicolat sòdic 0,5 %, SDS 0,1 %.

¹⁴ Composició del tampó d'homogeneïtzació amb NP40: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Na₄P₂O₇ 5 mM, Na₃VO₄ 1 mM, NaF 50 mM, NP-40 1% (v/v).

Procediment:

Tot el procés es porta a terme en fred per minimitzar la degradació proteica.

En el cas de voler obtenir les proteïnes totals d'un cultiu cel·lular cal rentar les cèl·lules amb PBS fred, afegir el volum de tampó de lisi adequat, arrossegar les cèl·lules amb l'ajuda d'un rascador i completar la lisi passant la suspensió de cèl·lules per una agulla de 25G. Es fa una centrifugació a 16000 g. durant 10 min a 4°C per eliminar restes cel·lulars no trencades i es guarda el sobrenedant a -20°C.

En el cas de voler obtenir les proteïnes totals d'un extracte de teixit, és necessari disgregar i trencar el teixit utilitzant un homogeneïtzador amb ganivetes (*polytron*). Es fa una centrifugació prèvia a unes 16000 g. durant 10 min a 4°C per descartar restes no trencades. Es recull el sobrenedant i es passa per l'agulla de 25G. Es repeteix la centrifugació i es guarda el sobrenedant a -20°C.

Obtenció de membranes totals

En alguns estudis és important enriquir la mostra en membranes totals per tal de detectar una proteïna expressada en les membrana cel·lulars. En aquests casos s'ha utilitzat un tampó amb sacarosa i una centrifugació a alta velocitat.

Procediment:

En el cas de voler obtenir membranes totals d'un cultiu cel·lular, es renten les cèl·lules amb PBS, s'afegeix el tampó, es rasquen i es recullen les cèl·lules en el volum desitjat de tampó d'homogeneïtzació¹⁵.

En el cas de partir de teixits, s'ha de disgregar prèviament amb l'ajuda del "*polytron*" (ajustar el temps en funció del teixit). S'ha utilitzat una relació aproximada de 1 g de teixit per 10 ml de tampó d'homogeneïtzació.

En aquest punt els dos procediments convergeixen en una primera centrifugació a 15.000 g durant 20 min a 4°C per descartar restes cel·lulars no trencades. Per precipitar les membranes totals es centrifuga el sobrenedant anterior a 200.000 g durant 1 h 30 min a 4°C. El precipitat (*pellet*) es resuspèn en tampó d'homogeneïtzació en el volum (0,5-1 ml) adequat segons la concentració que es vulgui obtenir de proteïnes amb l'ajuda d'una xeringa amb agulla de 25G amb la precaució de no fer gaires bombolles. Les mostres es guarden a -20°C.

Determinació de la concentració de proteïnes

Per valorar les proteïnes presents en una mostra, s'ha utilitzat el mètode de BCA. Aquesta aplicació es basa en la reducció del Cu^{2+} a Cu^+ en la reacció de les

¹⁵ Composició del tampó d'homogeneïtzació: 250 mM de sacarosa; 25 mM Hepes; 4 mM d'EDTA, i la mateixa concentració d'inhibidors de proteases que en el cas d'extracte de proteïnes totals.

proteïnes i l'àcid bicinonític. Aquesta reacció s'anomena clàssicament "reacció del Biuret".

És necessari acompanyar la mostra d'un estàndard (BSA) a diferents concentracions (0-20 µg), per tal d'interpol·lar la concentració desconeguda al mig de la corba patró. L'absorbància es llegeix a 562 nm (a 550 nm en el nostre lector d'Elisa).

El procediment s'ha realitzat seguint les instruccions del fabricant: (Pierce BCA Protein Assay Reagent (Pierce, #23225). <http://www.pierce.com/>

PNGasa F: Peptide N-glicosilasa F

PNGasa F és una amidasa que hidrolitza quasi qualsevol tipus de glúcids units a pèptids o proteïnes. Reconeix com a lloc de tall l'espai entre l'asparagina i el primer residu de *N*-acetilglucosamina de la cadena de carbohidrats. Al llarg d'aquesta memòria també s'ha anomenat a l'enzim EndoF. Totes les incubacions s'han portat a terme durant 3 hores.

El procediment s'ha realitzat seguint les instruccions del fabricant: (New England BioLabs): <http://www.neb.com/>

Estudis d'immunolocalització

La immunolocalització s'ha utilitzat per detectar l'expressió de proteïnes en cèl·lules en cultiu i en talls d'òcit. Aquesta aplicació es basa en l'ús d'anticossos conjugats a un fluorocrom (rodamina, Texas Red...) que reconeixen les cadenes pesades de l'anticòs primari específic. Al no disposar d'anticossos contra la proteïna LAT4, s'ha utilitzat per la seva detecció en immunolocalitzacions l'anticòs contra l'epítot HA (Hemaglutinina, CYPYDVPDYASL) de ratolí per detectar la proteïna de fusió LAT4-HA.

Estudis d'immunolocalització en talls d'òcit

Reactius:

- Criomotlles d'un cm² (*Cryomold* 4565; Tissue-Tek)
- OCT (*Agar Scientific Ltd*, Essex, England)
- Criostat (Criocut 2800 E, Reichert-Jung)
- Portaobjectes prèviament tractats amb gelatina 0.5%
- PBS
- Retolador PapPen (#71312, Aname)
- Glicina 100 mM en PBS
- Solució de bloqueig: FBS 10% en PBS
- Solució de permeabilització: TritóX100 1% en PBS

- Solució de fixació: paraformaldehid 3%¹⁶ en PBS
- Anticòs primari anti-HA (de ratolí, #MMS-101P-0200, Covance) diluït 1/100 en 10% FBS-PBS. Per sèrums que es desconeix la dilució òptima, es pot començar provant una dilució 10 vegades més concentrada que la que s'utilitza per Western blot amb el mateix anticòs
- Anticòs secundari *Goat anti-mouse Texas Red (Molecular Probes)* diluït 1/100 en 10% FBS-PBS. És fotosensible i per aquest motiu es guarda protegit de la llum.
- Medi de muntatge *Mowiol*

Procediment:

Oòcits injectats amb el cRNA d'interès i transcorregut el temps adequat d'expressió proteica, s'han inclòs en OCT dins de criomotlles prèviament refredats amb neu carbònica. Un cop congelats es fan seccions de l'oòcit inclòs en el bloc d'entre 10-15 µm amb l'ajuda del criòstat (Shih *et al.* 1998). Els talls s'adhereixen fàcilment al portaobjectes (prèviament gelatinitzats) per la diferència de temperatura entre ells. Els talls es poden guardar a -20°C fins el moment de la immunocitoquímica.

Abans de realitzar la immunolocalització cal temperar el portaobjectes amb els talls. Un cop sec, es marquen les seccions amb el *PapPen*, un retolador d'una solució hidrofòbica que permet fer una barrera al voltant del teixit i minimitzar els volums alhora de fer la immunolocalització en l'oòcit. En primer lloc es fixen els talls amb la solució de fixació durant 10 min. A continuació per disminuir l'autofluorescència s'incuben els talls amb glicina 100 mM, després es solubilitzen amb una solució de Tritó X-100 al 1% durant 10 min. Es renta 3 vegades amb PBS i es bloquegen els talls amb FBS al 10% durant 30 min.

Mentrestant, es dilueixen els anticòsos en FBS al 10%. S'utilitza un volum de 200 µl d'anticòs diluït per cada portaobjectes. Després del bloqueig, la incubació amb l'anticòs primari es fa durant 1 hora. Es renta 3 vegades amb PBS i s'incuba 1 hora amb la dilució d'anticòs secundari protegit de la llum. Es renta altre cop amb PBS per triplicat i s'assequen a 37°C. Finalment es munta la preparació amb *Mowiol*. Es deixa assecar i es guarda a 4°C protegit de la llum fins el moment de l'anàlisi al microscopi de fluorescència.

Estudis d'immunolocalització sobre cèl·lules en cultiu

Per aquesta aplicació cal haver sembrat les cèl·lules prèviament en una placa de cultiu amb cobreobjectes (circulars de 10 mm de diàmetre) distribuïts per

¹⁶ El paraformaldehid es prepara sota la campana extractora. Per a 500 ml, es pesen 15 g de paraformaldehid, s'afageixen 100 ml de PBSx5 i s'ajusta a 500 ml amb l'aigua bidestil·lada calenta que conté NaOH.

la superfície, de manera que les cèl·lules creixin a sobre. Es transfecten amb la construcció desitjada i 48 h després, amb l'ajuda d'unes pinces, es retiren els cobreobjectes (amb la cara de les cèl·lules orientada cap amunt) i es col·loquen en pous individuals en una placa de 24 pous amb PBS. Se'ls fa 2 rentats amb PBS i es fixen amb paraformaldehid 3% (com en el cas anterior) durant 20 min. Per disminuir l'autofluorescència de les cèl·lules deguda a la fixació, es tracten 10 min amb NH_4Cl 50 mM i 10 min amb glicina 20 mM. La permeabilització es porta a terme amb TritóX100 0,1% durant 5 min i el bloqueig amb FBS 10% durant 20 min. Mentrestant, cal diluir els anticossos en solució de bloqueig (utilitzar 25 μl d'anticòs diluït per cada cobreobjectes). Acabat el bloqueig, es col·loquen gotes de 25 μl de l'anticòs diluït sobre un tros de *parafilm* i es deixa caure lentament el cobreobjectes amb la cara de les cèl·lules en contacte amb la gota. S'incuba durant una hora. Es retornen els cobreobjectes a la placa i es fan 3 rentats amb PBS. Es repeteix el procés d'incubació amb l'anticòs secundari però durant mitja hora i tapat de la llum. A continuació es fan 3 rentats amb PBS i s'assequen els cobreobjectes abans i després de muntar amb *Mowiol*. Es mantenen a 4°C fins el moment de l'anàlisi microscòpic.

Assaig de Western Blot

La detecció de proteïnes mitjançant Western blot és una tècnica molt utilitzada per detectar específicament proteïnes que han estat separades mitjançant una electroforesi i transferides a una membrana. El protocol de Western blot emprat en aquest treball consta dels següents passos:

Electrofores en gel desnaturalitzant (SDS/PAGE):

L'electroforesi desnaturalitzant en un gel d'acrilamida amb SDS (SDS-PAGE, o *SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*), és el mètode més comú de separació de proteïnes en funció de la massa molecular (Laemmli 1970). Consisteix en la desnaturalització de les proteïnes de la mostra amb el detergent SDS, que a la vegada confereix càrrega negativa al complex i permet la separació de les proteïnes en la matriu de poliacrilamida-bisacrilamida aplicant un camp elèctric. S'ha utilitzat el sistema *Mini-Protean III* de BioRad, que permet treballar amb volums de mostra de fins a 100 μl per càrrega. Per l'electroforesi, es preparen dos tipus de gels diferents pel que fa a la concentració d'acrilamida i el pH: el gel d'apilament¹⁷ (*stacking gel*) i el gel separador¹⁸ (*running gel*). El gel d'apilament té com a funció

¹⁷ Composició del gel d'apilament: acrilamida 3.3%; bis-N,N'-metilen-bis-acrilamida 0.088%; Tris-HCl 0.125 M a pH 6,8; SDS 0.1%; persulfat amònic (APS) 0.1%; TEMED (BioRad) 0.14%.

¹⁸ Composició del gel separador: acrilamida 7.5% o 10% (segons el rang de resolució); bis-N,N'-metilenbisacrilamida 0.2% o 0.26%; Tris-HCl 0.375 M pH 8.8; SDS 0.1%; APS 0.1%; TEMED 0.1%.

alinejar les proteïnes abans d'entrar al gel separador, on es separen segons la massa molecular. El percentatge d'acrilamida del gel separador varia en funció de la mida de les proteïnes que volem separar. En paral·lel a les mostres es separen estàndards pretenyits de diferents pesos moleculars, que ens permeten visualitzar la separació de les proteïnes i calcular-ne el seu massa molecular.

Les mostres analitzades per western blot al llarg d'aquesta tesi, s'han diluït en tampó de càrrega¹⁹ (en condicions reductores) i s'han incubat a temperatura ambient durant 15 minuts. L'electroforesi es desenvolupa en tampó d'electroforesi²⁰ 1x, durant 1 aproximadament hora amb un voltatge fix de 150 V i una intensitat variable d'entre 30-80 mA.

Electrotransferència

Un cop les proteïnes s'han separat per mida en un gel d'acrilamida, aquestes són transferides a una membrana sintètica²¹, on hi quedaran fixades a la mateixa posició relativa en què es trobaven en el gel. El sistema utilitzat consta d'un tanc ple de tampó de transferència²², en el qual es situa el sandwich amb la membrana en contacte amb el gel, envoltat de esponges i paper Whatmann (*Mini-Protean TransBlot Cell*, BioRad). La transferència de les proteïnes a la membrana es realitza durant una hora i mitja sota un voltatge de 250 mA o durant tota la nit a 4°C amb agitació i a 30 V.

Immunodetecció

Finalment, la immunodetecció consisteix en a) el bloqueig de la membrana, per incubació en una solució rica en proteïnes per tal d'evitar la unió inespecífica de l'anticòs (en el nostre cas majoritàriament 5% amb llet descremada, però també s'han fet proves amb BSA al 1 i 5%); b) la incubació de la membrana amb l'anticòs primari específic contra la proteïna d'interès (normalment a 4°C durant una nit, un cap de setmana, o durant 1 h a temperatura ambient); c) la incubació amb l'anticòs secundari adequat conjugat a peroxidasa de rave (1 h a temperatura ambient); i d) la detecció d'aquesta activitat enzimàtica a la membrana utilitzant el sistema ECL (*Enhanced Chemiluminescence*, #RPN 2209, Amersham) i la imatge es revela a la *Intelligent dark box* Fujifilm LAS-3000.

¹⁹ Composició del tampó de càrrega *Laemmli*: (LSB x3): Per 20 ml: 4 ml de Tris-HCl 1.5 M pH 6.8; 12 ml de glicerol 87%; 1.2 g SDS; 1 mg de blau de bromofenol i aigua bidestil·lada fins a 20 ml. Es conserva a temperatura ambient.

²⁰ Composició del tampó d'electroforesi 10x: Tris-base 250 mM; glicina 1.9 M; SDS 1%.

²¹ Per una correcta transferència la membrana s'ha d'activar prèviament durant 5 min amb metanol.

²² Composició del tampó de transferència: Tris-Base 25 mM a pH 8.3, glicina 192 mM i metanol a l 20%.

Per cada cas s'han posat a punt les condicions de rentat, d'incubació d'anticossos 1i i 2i, així com el temps, la temperatura i la dilució òptima. Es detallen més endavant les condicions per a cada cas en concret.

Tinció Coomassie Blue

El mètode es basa en la detecció de proteïnes fixades al gel de poliacrilamida a partir de la tinció amb blau brillant de *Coomassie*. Aquest colorant és capaç d'unir-se a la majoria de proteïnes permeten la detecció de les bandes proteiques. Després de la incubació d'unes 2 hores amb agitació del gel amb la solució de tinció²³ cal eliminar el color de fons amb una solució destenyidora²⁴ que elimina l'excés de colorant retenint el color blau de les bandes proteiques (15 min a 37°C o tota la nit a temperatura ambient). Si es vol conservar el gel, es pot assecar en un assecador de gels durant 2h a 80°C.

Purificació d'anticossos

La purificació cromatogràfica d'anticossos s'ha realitzat per dues estratègies diferents: la columna d'afinitat (*Sulfolink*) amb el pèptid antigènic unit i la columna d'afinitat amb proteïna A unida. S'han utilitzat els dos procediments per enriquir en anticossos específics els sèrums obtinguts dels conills immunitzats contra LAT4 i EEG1.

Columna d'afinitat (*Sulfolink*)

El gel *Sulfolink Coupling Gel* (Pierce) és una matriu d'agarosa que permet la immobilització per enllaç covalent de pèptids, proteïnes o altres lligands que continguin un grup sulfhidril. Els grups iodoacetats del gel reaccionen específicament amb els grups sulfhidrils lliures (Fig. 8).



Fig. 8 Esquema i estructura general de la reacció del lligand amb el gel Sulfolink.

Els pèptids antigènics utilitzats per la immunització dels conills per la producció d'anticossos contenen una cisteïna a l'extrem 5'. Això permet la unió d'aquests pèptids a la matriu d'agarosa del Sulfolink. És molt important que els

²³ Solució de tinció: àcid acètic 7,5%, isopropanol 25%, Coomassie Blue 0,05.

²⁴ Solució destenyidora: Àcid acètic 7,5% i isopropanol 7,5%.

pèptids estiguin reduïts, ja que cal una reacció d'oxidació per formar l'enllaç sulfhidril.

Reactius per la unió del pèptid a la columna:

- Columna de plàstic
- Gel Coupling Sulfolink
- Tampó d'unió: Tris 50 mM, EDTA-Na⁺ 5 mM a pH 8,5
- Tampó de rentat: NaCl 1M
- Tampó de bloqueig: L- cisteïna·HCl 50mM en tampó d'unió
- Tampó d'emmagatzematge: PBS amb 0,05% d'azida sòdica

Procediment:

El procediment d'unió del pèptid a la matriu consta dels següents passos: Equilibrar el gel a la columna, unir el pèptid a la matriu mitjançant una reacció a temperatura ambient, bloquejar possibles unions inespecífiques a la matriu amb el tampó de bloqueig i finalment rentar la matriu. Es pot quantificar l'eficiència de la unió quantificant el pèptid no unit a la columna.

Reactius per la purificació del sèrum:

- Tampó d'unió i de rentat: PBS
- Tampó d'elució ²⁵
- Tampó de neutralització ²⁶

Procediment:

Cal equilibrar la columna a temperatura ambient i rentar la columna amb el tampó de rentat. Afegir el sèrum a la columna i incubar durant una hora. Recollir el que no s'ha unit (*flow through*) i rentar la columna. L'elució de la proteïna d'interès es porta a terme amb l'addició del tampó d'elució a la columna i la recol·lecció de l'elució sobre tubs amb 50 µl de tampó de neutralització. Es recullen fraccions de 1 ml per tub. La columna es renta, s'equilibra i es guarda a 4°C.

S'analitza la concentració de proteïna present a cada fracció amb la mesura de la densitat òptica a una longitud d'ona de 280 nm. Les fraccions amb més proteïna es comprovaran per western blot.

Per un procediment més detallat es pot consultar les instruccions del fabricant.

²⁵ Composició del tampó d'elució: Glicina·HCl 0,1-0,2 M a pH 2.5-3.0

²⁶ Composició del tampó de neutralització: Tris·HCl 1M a pH 8.5-9.0

Proteïna A

La purificació en una columna amb proteïna A unida, permet la separació de proteïnes immunoglobulines IgG del sèrum. El sèrum conté moltes altres proteïnes com l'albumina, que poden interferir en la immunodetecció. L'objectiu és separar aquestes proteïnes no desitjades i presents al sèrum, de les IgG. Aquest mètode permet aïllar totes les IgGs presents al sèrum gràcies a l'afinitat de la cadena pesada (F2) de les IgG a la proteïna A. Aquest mètode és menys específic que l'anterior on s'utilitzava una columna d'afinitat amb el pèptid unit, ja que la proteïna A uneix totes les IgGs i el pèptid només a les específiques contra la proteïna.

Reactius:

- Proteïna A Sepharose CL-4B (Pharmacia, #17-0780-01)
- Columnes de polipropilè (#731-1550, BioRad)
- Tampó de rentat: tris 100 mM a pH 8
- Bosses de diàlisi de mida de porus adequat (Sigma)
- Tampó per activar les bosses de diàlisi²⁷
- Tampó de neutralització: tris 1 mM pH 9
- Tampó de rentat: tris 10 mM
- Tampó d'elució: glicina 100 mM pH 2,7

Procediment:

El primer pas és hidratar la sefarosa unida a la proteïna A. 0,4 mg de matriu seca (volum final de 2 ml) s'hidraten amb 3 rentats de 40 ml d'aigua destil·lada. S'ha de tenir present que s'obté un rendiment aproximat de 10-20 mg de IgG per ml de matriu de sefarosa- proteïna A. En l'últim rentat s'empaqueta el gel a la columna i s'equilibra amb Tris 100 mM. Abans d'afegir el sèrum a la columna s'ha d'ajustar a pH 8.5 amb Tris 1 M pH 9 o glicina 100 mM pH 2,7. Per la unió de les IgG a la matriu es passa de 3 a 4 vegades el sèrum per la columna i es manté una hora a 4°C en agitació. Es renta amb volums de 20 ml de Tris 100 mM i 10 mM successivament. L'elució es fa en tubs amb 50 µl de Tris 1 M pH 9 per tal de neutralitzar l'acidesa del tampó d'elució. En el nostre cas vam recollir de 10-12 fraccions d'uns 500 µl. Totes les fraccions s'analitzen espectrofotomètricament i les que contenen més quantitat de proteïna s'unifiquen i es dialitzen amb PBS a pH 7,4 durant tota la nit. Per preparar les bosses de diàlisi es submergeixen en tampó d'EDTA i NaHCO₃ i es bullen durant 5 min i a continuació es renten amb aigua miliQ, es repeteix el procediment 2 vegades. Ja estan a punt per utilitzar.

²⁷ Composició del tampó per activar les bosses de diàlisi: EDTA 5 mM i NaHCO₃ 200mM

Producció de proteïnes recombinants en *E.Coli*

En aquesta tesi s'han produït i purificat 4 proteïnes de fusió per tal d'utilitzar-les com a antígens per a la immunització de conills i obtenir així, anticossos contra la proteïna LAT4. Es van utilitzar dues estratègies: proteïnes de fusió amb GST i un fragment de la proteïna unit a una cua de 6 histidines.

Expressió i purificació de proteïnes de fusió amb GST.

Per a l'expressió, purificació i detecció de la proteïna de fusió amb Glutatió-S-Transferasa (GST) i el nostre fragment d'interès, es va utilitzar un sistema de producció en *E.coli* basat en el manual "*GST Gene Fusion System*" d' Amersham.

La fusió dels fragments a GST ajuda a millorar la solubilitat dels fragments petits units, en el cas de no ser-ho. La GST també és una proteïna adequada per la seva mida (26KDa) alhora d'utilitzar-la com a antígen i permet una purificació senzilla en una cromatografia d'afinitat amb glutatió immobilitzat. El procés de purificació preserva l'antigenicitat i la funció de la proteïna ja que es poden utilitzar condicions d'elució suaus i no-desnaturalitzants. El sistema utilitzat també permet separar la GST del fragment d'interès mitjançant la digestió amb la trombina.

A. Producció de les proteïnes de fusió.

Reactius:

- Tampó de lisi: lisozim 0.04 mg/ml, Igepal al 0.2%, EDTA 1 mM, DNAsa I 1 mg/ml, DTT 5 mM i inhibidors de proteases: Aprotinina 1 U/ml, PMSF 1 mM, Leupeptina 1 µM, Pepstatina A 1 µM en PBS (NaCl 136 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM a pH 7.4)
- Tampó d'elució: Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Glutatió reduït 10 mM
- Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosid (IPTG)
- Ampicil·lina²⁸
- Bacteris competents DH5α
- Medi LB²⁹

Procediment:

El primer pas va ser subclonar 3 fragments de la proteïna mLAT4 (aminoàcids 1-20 de la cua amino terminal, aminoàcids 224-321 del 6è loop. i els aminoàcids 537-568 de la cua carboxi terminal) en el vector d'expressió pGEX4T-2

²⁸ Ampicil·lina: Es dissol en aigua MiliQ a 100 mg/ml. La solució es filtra amb filtres de 0.22 mm de diàmetre, s'aliqota i es guarda a -20°C. Un cop descongelada es manté en gel. Cal tenir en compte que a temperatures superiors als 55°C l'ampicil·lina s'inactiva.

²⁹ Composició LB: Triptona 1%, extracte de llevat 0,5%, NaCl 0,5%. El pH s'ajusta a pH 7.5 amb NaOH i s'autoclava. En el cas de preparar LB-agar, s'afegeix l'agar a 1,5% (p/v), a l'ampolla que conté l'LB just abans d'autoclavar-ho. Un cop autoclavat, es deixa atemperar fins a 50°C. En aquest moment s'hi afegeix l'antibiòtic, si s'escau. S'aboca el medi sobre les plaques i es deixen refredar a temperatura ambient. Es guarden a 4°C en posició invertida.

(Amersham-Pharmacia Biotech.) que permet generar la fusió dels fragments a l'extrem amino-terminal de la GST. L'expressió de la proteïna quimèrica està sota el control del promotor *tac*, que s'indueix per l'anàleg de la lactosa, isopropil- β -D-tiogalactòsid (IPTG). El vector també disposa del gen *lacI^q* per tal de que s'expressi la proteïna repressora necessària per un correcte funcionament del sistema induïble per IPTG, el promotor *tac* i el gen de resistència a l'ampicil·lina (Fig. 9).

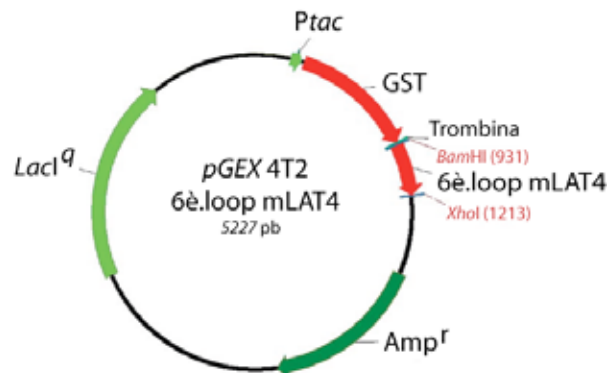


Fig. 9 Vector pGEX4T2 amb l'insert "6è loop mLAT4".

El vector utilitzat per l'expressió de proteïnes de fusió en *E. coli* és pGEX4T2 i l'insert es va clonar entre les dianes BamHI i XhoI. El promotor *tac* regula l'expressió del gen de la GST seguit d'un lloc de trencament per la Trombina, i de l'insert d'interès. El plasmidi generat consta de 5227 pb.

A partir d'una estria fresca en LB amb ampicil·lina d'*E. coli* BL21 transformada amb el plasmidi d'interès (pGEX4T2-Ntal, 6è loop o Ctal), s'inocula una colònia en 5 ml de medi LB i es deixa créixer tota la nit a 37°C en agitació. Aquest minicultiu, s'inocula en 500 ml de LB fins aconseguir que el creixement arribi a una OD₆₀₀ d'entre 0,5-0,7. En aquest moment s'indueix l'expressió de la proteïna d'interès afegint IPTG a una concentració, temps i temperatura que s'ha d'ajustar per a cada proteïna (de 0,1-0,8 mM d'IPTG, de 26-37°C i de 3h a tota la nit). Després del creixement es recullen les cèl·lules per centrifugació, es resuspenen en 25 ml de tampó de lisi i es sonica la mostra en gel durant 2 minuts amb cicles de mig minut. Es centrifuga durant 10 min a 10.000 g a 4°C per eliminar restes no trencades i es recull el sobrenedant.

B. Purificació de les proteïnes de fusió amb GST

Es preparen 5 ml (aproximadament per cada 500 ml de medi de cultiu inicial) de matriu Glutatió-Sefarosa 4B en un tub de 15 ml (també es pot fer en una columna). Es centrifuga 5 min a 500 g a 4°C per eliminar el medi de la matriu. S'equilibra passant 4 vegades uns 5 ml de tampó de lisi per la matriu i s'incuba

amb el sobrenedant obtingut de la lisi bacteriana durant 40 min en agitació a temperatura ambient. Passat aquest temps, es centrifuga a 500 g durant 5 min a 4°C i es guarda una alíquota per valorar la proteïna no unida a la matriu. Es renta 4 vegades amb 10 ml de tampó de lisi i es comença l'elució amb el tampó corresponent.

Es valora per espectrofotometria la fracció on s'ha eluït la proteïna i s'analitza en un gel tenyit amb Coomassie.

Expressió i purificació de proteïnes de fusió amb Histidines.

Aquest segon mètode de producció i purificació de proteïnes recombinants es basa en la clonació del fragment o proteïna d'interès en un vector que incorpori una cua de 6 histidines i permeti la purificació per una matriu de NTA-Ni²⁺ (Quiagen). El plasmidi escollit per a l'expressió en bacteris va ser pTrcHis (Invitrogen). Aquest incorpora la cua de sis histidines a NH₂-terminal de la proteïna, l'epítop *Xpress* i un lloc de tall per enteroquinasa. Un dels grans avantatges d'aquesta tècnica és la versatilitat i senzillesa de la purificació, ja que es porta a terme en un sol pas i sota condicions natives o desnaturalitzants, permetent el treball tant de proteïnes solubles com insolubles. Un segon avantatge és la mida petita i la poca immunogeneïtat de les 6 His, que evita interferències alhora de generar anticossos contra la proteïna recombinant. La detecció de la proteïna es pot realitzar per la tinció del gel d'acrilamida amb blau de Coomassie o d'una manera molt més sensible amb HisProbeTM-HRP (Pierce, #15165) o amb l'anticòs Anti-XpressTM-HRP (Invitrogen, R910-25).

La clonació i expressió de les proteïnes recombinants es porta a terme com en el cas anterior. Cal posar a punt les condicions òptimes de temperatura, temps, concentració d'IPTG, etc... Per la purificació s'utilitza una cromatografia d'afinitat on a la columna d'agarosa hi ha unit àcid nitrilotriacètic i níquel (NTA-Ni, Quiagen). El Ni²⁺ és capaç de formar enllaços de coordinació amb el N de les histidines i permetre la purificació del fragment de la proteïna amb la cua de 6 histidines. Aquest procés es pot portar a terme tant en condicions natives, com en un medi amb urea a 8 M o clorur de guanidini 6 M. Per l'elució s'empren gradients d'imidazole (50-300 mM), molècula que competeix pel lloc d'unió amb les histidines, o augments de força iònica (normalment NaCl).

Per un procediment detallat es pot consultar el manual de "*The QIAexpressionist*" de Quiagen.

VIII. TÈCNIQUES D'HISTOLOGIA

Hematoxilina-Eosina

Per a l'anàlisi histopatològic dels teixits dels animals EEG1-Y221* s'ha utilitzat la tinció amb hematoxilina-eosina. Aquest mètode de tinció aconsegueix tenyir les estructures basòfiles de color blau-porpra amb el colorant catiònic hematoxilina i els components eosinòfils de color rosa brillant amb el colorant àcid eosina. Les estructures cel·lulars bàsiques són els que contenen àcids nucleics (ribosomes, nuclis rics en cromatina...). L'eosina degut a la seva càrrega negativa s'uneix a constituents cel·lulars de càrrega positiva, com proteïnes intra i extracel·lulars, glòbuls vermells, cossos de Lewy, etc...

Reactius:

- Paraformaldehid al 4%
- Cassettes per guardar el teixit
- Portaobjectes
- Parafina
- Xilol
- Etanol
- Suavitant per a roba
- Hematoxilina
- Eosina
- Medi de muntatge (Mowiol)

Procediment:

Els teixits analitzats per tinció d'hematoxilina-eosina al llarg d'aquesta tesi, han estat obtinguts de ratolins perfosos intracardialment o simplement extrets i fixats amb paraformaldehid al 4%. Els teixits es deixen fixant durant tota la nit amb paraformaldehid a 4°C. En cas de què es vulguin conservar durant un temps més llarg és recomanable deixar-los amb paraformaldehid al 2%.

A continuació, es tallen adequadament els teixits amb bisturí per una correcta orientació en el posterior tall. El procés de deshidratació (alcohols) i parafinització es va realitzar automàticament en el laboratori de UTOX del PCB. Per incloure en parafina es posa una mica de parafina calenta al motlle metàl·lic, s'afegeixen els teixits i es col·loquen separats i ben orientats. Es refreda en una placa freda perquè s'enganxin una mica els teixits i no es moguin. S'acaba d'afegir la parafina calenta fins a cobrir els teixits. Es deixa a la placa refrigerada durant 2 hores.

En teixits problemàtics alhora de tallar (p.ex. el fetge) s'han submergits durant tota la nit (o unes hores) en suavitzant per tal d'hidratar-los i evitar que al tallar-los es descomposin. A continuació, es talla i poleix el bloc de parafina per tenir el teixit ben encarat per el tall. La zona inferior, va bé tallar-la esbiaixada perquè no es cargoli al fer el tall.

En el cas de voler realitzar només la tinció no cal recobrir els portaobjectes ni amb silà ni gelatina. Només afegim un polsim de gelatina al bany d'aigua que tenim a 42-45°C.

Es fan talls de 5 µm de gruix, es posen al bany prèviament escalfat a 42-45°C i es pesquen amb un portaobjectes intentant que quedin estirats i sense plecs. Es deixa assecar un mínim de dues hores i es guarda durant tota la nit a temperatura ambient.

El procés de desparafinització (amb xilè), hidratació (alcohols), tinció (hematoxilina i eosina) i deshidratació (alcohol i xilè) es va realitzar de manera automàtica a la Unitat de Toxicologia Experimental i Ecotoxicologia (UTOX-PCB) Parc Científic de Barcelona amb l'ajuda d'en Javier González i en Joan Serret.

Una vegada tenyit es munta amb Mowiol o medi de muntatge DPX. Es deixa assecar i es pot analitzar al microscopi.

IX. GENERACIÓ D'ANTICOSSOS

Els anticossos generats en aquesta tesi han estat encarregats a l'empresa Eurogentec. En el cas de LAT4 es van seguir dos procediments estàndards d'injecció d'un pèptid i d'una proteïna de fusió, i per EEG1 el "DoubleX protocol".

Producció estàndard d'anticòs policlonal antipèptid.

Després d'un estudi de zones immunogèniques de la proteïna vam escollir l'extrem Carboxi terminal per la seva flexibilitat i accessibilitat. El pèptid escollit va ser:

LAT4, ratolí # 552-568aa: **CSKLFLKINGSSNREAFV**- amide.....17 residus

La Cisteïna (C) s'afegeix al pèptid per tal de permetre la conjugació dirigida de la proteïna KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*). A continuació, durant uns 3 mesos es realitzen 4 injeccions per conill (d'utilitzen 2 conills d'entre 3 i 9 mesos d'edat i en condicions de SPF) i 4 sagnies de diferents volums seguint el següent protocol:

Dia	0	14	28	38	56	66	87
Injecció	1a.	2a.	3a.		4a.		
Sagnia	pre-immune (3-5ml.)			2ml.		2+20ml.	60ml.

Taula 4. Esquema dels dies d'injecció i sagnies dels conills immunitzats.

S'injecta subcutàniament 0,2 mg de pèptid conjugat en cada injecció i conill (SP76 i SP77).

Producció estàndard d'anticòs policlonal amb proteïna de fusió.

En aquest cas, la producció de la proteïna de fusió GST-Ntal (Glutatió-S-Transferasa amb la cua NH₂ terminal de LAT4) va ser propia, tal com es detalla a l'apartat de producció de proteïnes de fusió en els materials i mètodes.

La proteïna de fusió consta de la proteïna GST unida a un fragment de la proteïna murina de LAT4 (de l'aminoàcid 1 al 20 de la cua amino terminal: 5'-MAPTLATAHRRRWWMACTAV-3'). Es va tenir en compte que el fragment no estigués altament conservat en mamífers i ortòlegs, particularment en conill perquè no es produeixi una reacció auto-immune. La proteïna de fusió generada s'aconsella que sigui superior als 10-12 KDa i s'ha de poder produir per aconseguir un total d'aproximadament uns 3mg. a una concentració de 1 mg/ml En el nostre cas vam enviar la proteïna de fusió en una solució en PBS de 1,3 mg/ml i un total de 2 ml. Un altre punt molt important és la puresa i solubilitat de la mostra, imprescindibles per una immunització específica i viable.

El protocol d'immunització dels conills (1069 i 1070) va ser el mateix que l'anterior, a diferència de què es va injectar la proteïna de fusió enlloc del pèptid conjugat.

Producció amb protocol de co-injecció.

Vam escollir el protocol de la co-injecció de dos pèptids per augmentar les probabilitats d'èxit segons ens va recomanar la casa comercial i l'experiència d'altres col·laboradors.

El procediment "DoubleX protocol" inclou la síntesis de 15-25 mg de cadascun dels dos pèptids seleccionats (18 aminoàcids de llargada), la conjugació de 5 mg dels pèptids a la proteïna KLH per tal de què es puguin transportar correctament, i la manipulació i estabulació de dos conills (2963 i 2964). Els criteris per la selecció dels pèptids i el protocol seguit amb els animals és el mateix descrit en l'apartat anterior. Els dos pèptids seleccionats varen ser:

EEG1, ratolí # 57-71aa: **CVTGPSDLKAQDEKFS** – CONH₂.....15 residus

EEG1, ratolí # 360-374aa: **CQKHQKAAKRTGSSE** – CONH₂.....15 residus

X. ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ

Els animals utilitzats en el transcurs d'aquesta tesi són ratolins de la soca C3HeB/FeJ, provinents de la empresa Ingenium i dels laboratoris Jackson (soca #000658). L'estabulació dels animals ha tingut lloc a l'estabulari del Parc Científic de Barcelona, on han rebut unes condicions òptimes de temperatura, humitat i llum (cicles de llum-fosc de 12 hores) i han estat alimentats *ad libitum* amb una dieta estàndard.

Generació de la colònia EEG1-Y221*

La generació del model mutant la va portar a terme l'empresa Ingenium Pharmaceuticals amb la tecnologia INGENOtyping gràcies al projecte europeu EUGINDAT. La tecnologia que utilitza aquesta empresa a grans trets consisteix en tres passos:

- El tractament de cèl·lules espermatogòniques amb l'agent mutagènic químic N-etil-N-nitrosurea (ENU) que produeix mutacions puntuals.
- Un cribatge de les cèl·lules germinals per identificar variants al·lèliques pel gen diana mitjançant electroforesi en gradient de temperatura (TGGE) seguit d'un Anàlisi d'Heteroduplex (Culiat *et al.* 2005).
- Fecundació *in vitro* de l'esperma que conté la mutació i la generació de la colònia a partir dels primers heterozigots G1.

El gran avantatge en la utilització del mutagen ENU per l'obtenció d'animals mutants és la rapidesa en què es pot disposar de l'animal en comparació amb el mètode clàssic basat en cèl·lules mare (*stem cells*). El punt limitant és que a la base de dades de DNA de cèl·lules germinals es trobi alguna mutació en el gen d'interès capaç de truncar o modificar la proteïna per tal d'abolir-ne la funció.

Pel que fa al gen EEG1 es van trobar 4 mutacions: dues d'error de sentit (missense), concretament F192L i S197R a l'exó 7, una intrònica i una mutació que introdueix un codó de terminació a la tirosina 221 (Y221*). La millor opció per la generació d'un model amb pèrdua de funció de EEG1 va estar Y221*, ja que hauria de produir una proteïna truncada a partir del 6è. loop tal com es veu a la Fig. 10.

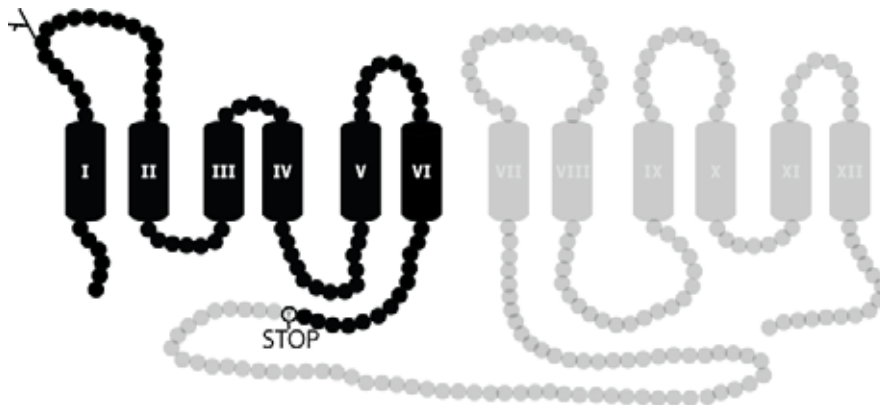


Fig. 10 Esquema de la proteïna EEG1 truncada a la tirosina 221 (Y221). Amb boles negres es mostren els aminoàcids situats abans de la mutació Y221STOP i que per tant, es codificaran, i en gris clar, la part de la proteïna que no tindrà lloc. Es poden apreciar els 12 possibles segments transmembrana de la proteïna EEG1 i la *N*-glicosilació de la proteïna a l'aminoàcid Asn 56.

El desavantatge de la tècnica o simplement el que s'ha de tenir en compte, és que tot i la baixa taxa de mutacions induïdes per l'ENU que acompanyen a la mutació d'interès, no es recomana treballar amb les generacions G1 i G2. Aquest inconvenient però, no té efecte pràctic a partir de la generació G3 ja que en cada creuament es selecciona la mutació diana i la resta es dilueixen i es segreguen de manera lliure en cada creuament. ENU causa mutacions de 6×10^{-3} a $1,5 \times 10^{-3}$ per locus/genoma (Hitotsumachi *et al.* 1985) en funció de la dosis utilitzada (Justice *et al.* 2000). Es calcula que el primer ratolí (generació 1, G1) fundador de la colònia posseeix una mutació somàtica gen-específica per cromosoma i per tant, 10 mutacions de l'esperma seran transmeses a la G2 via fecundació *in vitro*. A la G3 n'hi seran transmeses 5 i a la G4 2,5, una de coneguda i 1,5 de desconegudes, però que s'hauran segregat lliurement i que per tant, és molt improbable que es tracti de la mateixa en qualsevol cria de la G4 (Augustin *et al.* 2005). Per aquest motiu, els resultats que s'exposen en aquesta tesi han estat obtinguts a partir de la generació G4.

Genotipació ratolins EEG1-Y221*

Els ratolins EEG1-Y221* tenen una mutació puntual (C a A) a la posició del nucleòtid 663 del cDNA, això produeix un canvi en la proteïna que converteix la tirosina de la posició 221 en un codó stop (Y221*) i per tant, trunca la proteïna.

El procediment que s'ha seguit en aquesta tesi consta d'una PCR a partir del DNA genòmic extret de la cua de l'animal i la posterior seqüència del producte de PCR per tal d'analitzar si hi ha la mutació a un al·lel, a tots dos o a cap, podent distingir així animals heterozigots, mutants per la proteïna o control.

Una segona opció alhora de genotipar aquesta colònia, seria la digestió del producte de la PCR de genotipació amb l'enzim de restricció *SfcI*. Aquesta opció es va descartar per dues raons. En primer lloc, la diferència a observar en el patró de digestió era molt petit, ja que s'havia de detectar la desaparició de dues bandes de 74 i 75 pb i l'aparició d'una de 149 pb. Tot i que la separació i visualització de les bandes és possible en un gel d'alt percentatge d'agarosa, és difícil la distinció entre els tres genotips. En segon lloc, l'elevat cost de l'enzim i el gran nombre de genotipacions que s'han de realitzar per mantenir una colònia ens va fer decantar per l'opció de la seqüenciació.

PCR de genotipació

Per les PCR de genotipació es va utilitzar la Taq DNA polimerase de la casa comercial Biotools. Els encebadors dissenyats per l'amplificació del fragment que inclou la mutació són:

NOM	SEQÜÈNCIA
EEG1 6-7F	GCTCCTGGGAGTACTGCTGTT
EEG1 6-8 R	CATGCTCGTTATGCAGGAGT

Taula 5. Encebadors utilitzats per la genotipació de la colònia d'animals EEG1.

Les condicions de PCR que s'han utilitzat són:

94 °C 5 min											
94 °C	30 s		94 °C	30 s		94 °C	30 s		94 °C	30 s	
61 °C	30 s	x2	59 °C	30 s	x2	57 °C	30 s	x2	55 °C	30 s	x28
72 °C	90 s		72 °C	90 s		72 °C	90 s		72 °C	90 s	
72 °C 10 min											

Taula 6. Cicles i temperatura de la PCR de genotipació per EEG1.

A la Taula anterior, s'indiquen les temperatures, el temps i el número de vegades que es repeteix cada cicle (X). El producte resultant d'aquesta PCR és de 300 pb on la mutació està situada a la posició del nucleòtid 182 (C a A). Es comprova que la PCR ha funcionat correctament en un gel d'agarosa al 2% amb un 10% del volum de la PCR. Si la PCR ha tingut èxit el volum restant es purifica (veure apartat purificació de DNA) i es seqüència.

Com es pot veure a la Fig. 11, en el cromatograma resultant es pot distingir clarament el genotip control (+/+) amb una C, l'heterozigot (+/Y221*) amb dos pics solapats de C i A, i el ratolí mutant (Y221*/Y221*) amb una A.

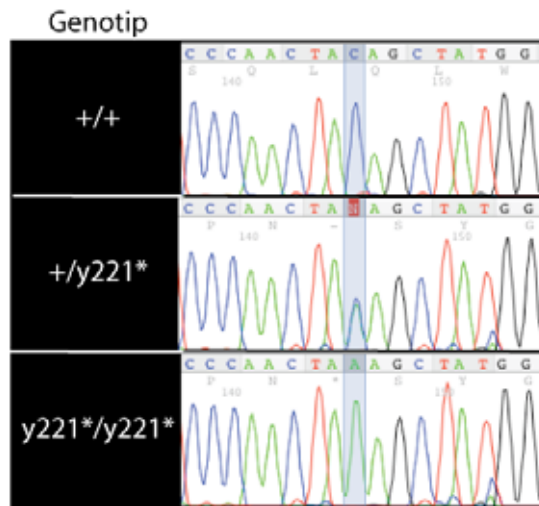


Fig. 11 Cromatograma de la seqüència de genotipació dels ratolins EEG1-Y221*. Es mostra la part del cromatograma on es pot apreciar la mutació puntual d'interès (senyalada amb un ombrejat blau) (Veure Seqüenciació de DNA). En la primera fila es mostra el cromatograma d'un animal control (+/+), a la segona d'un animals heterozigot (+/Y221*) i a la tercera d'un mutant per els dos al·lells (Y221*/Y221*). En el cromatograma, els àcids nucleics apareixen en blau la citosina, en verd l'adenina, en negre la guanina i en vermell la timina.

Gàbies metabòliques

Les gàbies metabòliques per ratolí permeten, tal com el seu nom indica, l'estudi de les funcions metabòliques de l'animal. Això inclou, el control d'ingesta, d'aigua consumida i la total separació de l'orina i de les femtes produïdes. En el nostres cas, vam utilitzar les gàbies metabòliques per separar i recollir l'orina produïda per cada ratolí en 24 h i realitzar posteriorment l'anàlisi d'aminoàcids o àcids orgànics.

El disseny de les gàbies permet la total separació de l'orina i la femta gràcies a una peça cònica que surt de la reixa on està situat el ratolí i que aboca les femtes directament per gravetat a un recipient (10) i l'orina rellisca pel conus i va a parar a un anell que desvia el líquid cap a un segon recipient diferent al de les femtes. (Fig. 12).

Al llarg d'aquesta tesi s'han utilitzat gàbies metabòliques per un sol ratolí (*Tecniplast*, #3M01D100). Els experiments s'han realitzat al llarg de 5 dies consecutius, on les primeres 48 hores han permès d'aclimatació del ratolí a la nova reixa per on s'ha de moure i a les noves ubicacions de menjar i beguda. Durant tot el procés es porta un control del pes de l'animal i cada dia s'afegeix menjar i

beguda sense restriccions. El 3er i 4t dia te lloc la recol·lecció de les 2 mostres d'orina de cada 24 hores, i per tant, a partir del 3er dia s'ha de canviar o netejar totes les peces per on ha de passar l'orina per tal d'evitar contaminacions. A més a més, per evitar l'evaporació de la mostra s'afegeix al recipient on es recull l'orina 200 µl d'oli mineral.



Fig. 12 Gàbia metabòlica per a un sol ratolí. Imatge de la gàbia metabòlica on es pot observar l'habitacle (4) on es situa el ratolí i on te accés al menjar (2) i a l'aigua (1). L'aigua que no es beu, però que cau del biberó es recull en el recipient 3 i es resta de la que ha desaparegut del recipient 1. El terra de l'habitacle és una reixa (5) suficientment ampla perquè no hi quedi retingut ni l'orina ni les femtes, les quals passen en direcció el conus invertit (6) que distribueix la orina per les parets de la peça 7 de forma cònica fins a l'anell (8) i el recipient final (9) i la femta per gravetat i pel mig de l'anell cap al seu recipient (10).

Extracció de sang

Per a l'obtenció de plasma de ratolí per a un posterior anàlisi d'aminoàcids s'ha extret sang mitjançant punció cardíaca.

Reactius:

- Agulla i xeringa de 25G
- Heparina sòdica (5%, Mayne)

Procediment:

S'extreu sang per punció cardíaca del ratolí anestesià amb isofluorà. Tant la xeringa com el tub on es recull la sang si ha passat una solució d'heparina (5000 UI /1 ml) per evitar la coagulació. En tot moment es manipula amb cura per tal d'evitar l'eritrolisi. Es centrifuga a 800 g durant 15 min a 4°C i es guarda el sobrenedant, que és el plasma.

Extracció de teixits

Tant per l'obtenció de proteïnes, com DNA, com RNA de teixits de ratolins control com mutants EEG1-Y221*, s'han extrets els teixits d'animals anestesiats amb isofluorà gasós (dissolt en oxigen al 3% amb un volum d'entre 1-1,5 l/min, aparell *New Generation Black MK-TC III High performances for III milenium*) normalment després d'haver-los realitzat la punció cardial per l'extracció de sang.

Els teixits immediatament després de ser extrets s'han introduït en un tub apte per aguantar temperatures baixes, s'han pesat i s'ha congelat ràpidament en nitrogen líquid. Fins el moment de la seva utilització s'ha emmagatzemat a -80°C.

Anàlisi d'aminoàcids en l'orina per autoanalitzador d'aminoàcids

L'orina recollida durant 24 hores en les gàbies metabòliques procedent d'un sol ratolí alimentat sense restricció de menjar ni beguda, es guarda congelada fins el moment de l'anàlisi. A 100 µl d'orina se li afegeixen 100 µl de norleucina com a patró intern del procés. Aquesta mescla es desproteïnitza amb 500 µl d'àcid clorhídric 6 M i dos cicles de congelació i descongelació per aconseguir que les proteïnes, pèptids o altres macromolècules de la mostra s'agreguin i precipitin. A continuació s'evapora a sequedat per tal d'eliminar una part d'urea i d'amoni. El residu sec es resuspèn en 1 ml de tampó de citrat de liti a pH 2,2 adequat per el pas per la columna i es filtra a través d'una membrana de 10 KDa de diàmetre de porus (*Ultrafree-MC* cat.nº UFC3LGCNB, *Amicon*) per evitar l'obturació de la columna cromatogràfica.

En aquest moment la mostra es pot guardar a -20°C fins el moment d'injectar-la a l'autoanalitzador d'aminoàcids. El volum injectat de mostra és de 50 µl i 25 µl de patró. El mètode usat per la determinació d'aminoàcids és la cromatografia líquida d'intercanvi iònic i el sistema de detecció és a través de la reacció dels aminoàcids lliures amb la ninhidrina, un potent agent oxidant que ens permet detectar amines primàries, secundaries i l'amoni. Al reaccionar les amines lliures amb la ninhidrina es produeix un compost colorejat que permet quantificar colorimètricament (a 570 i 440 nm) els aminoàcids després de la separació.

Per identificar els pics en funció dels diferents temps de retenció en la columna i quantificar-los, s'utilitza un patró estàndard fisiològic comercial injectat a la columna cada 10 mostres i en les mateixes condicions. Per processar les dades i integrar-les correctament s'ha utilitzat el programa *EZ Chrom Elite* (*Biochrom Ltd.*). Aquesta tècnica s'ha portat a terme a la Unitat d'anàlisi elemental orgànica i d'aminoàcids dels Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

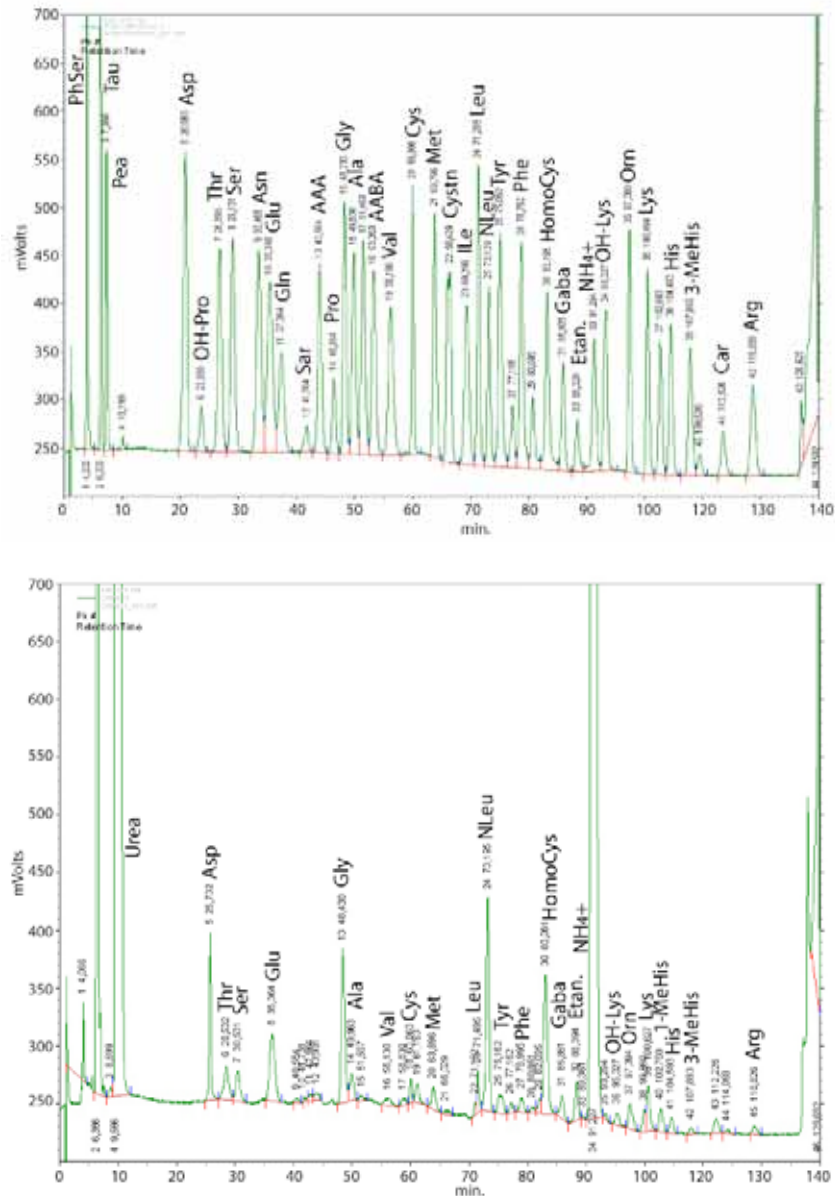


Fig. 13 Aminograma patró i d'orina de ratolí. En els aminogrames es representen els diferents pics corresponents a cada aminoàcid en l'ordre d'elució de la columna (milivolts/minuts). A cada pic (en verd) es mostra el seu temps de retenció en minuts i la majoria dels pics estan identificats per l'aminoàcid que representen. La línia vermella a la base del pic, és la línia base que s'ha utilitzat per integrar. El primer aminograma correspon al patró i està compost per aminoàcids coneguts que es troben majoritàriament en mostres fisiològiques. El segon és un exemple del perfil obtingut per l'orina de ratolí en l'aminograma que s'obté de l'autoanalitzador d'aminoàcids.

Anàlisi d'aminoàcids en plasma per autoanalitzador d'aminoàcids

El plasma s'ha obtingut d'animals anestesiats amb isofluorà i per punció cardíaca. La sang heparinitzada s'ha centrifugat 5 minuts a 2000 g. per tal de separar el plasma de les cèl·lules sanguínies. S'ha intentat en tot moment evitar la

hemòlisi, tot i això, en alguns casos petits percentatges d'eritrolisi es van produir en les mostres. El plasma es va guardar congelat fins el moment de l'anàlisi.

El pretractament de la mostra consisteix en afegir a 100 µl de plasma, 25 µl de Norleucina com a patró intern del procés i 100 µl d'àcid trifluoroacètic (TFA) al 10%. El TFA desproteïnitza la mostra i al ser altament volàtic, ens permet eliminar-lo posteriorment per evaporació al buit. La mescla anterior es sotmet a 2 cicles de congelació i descongelació per afavorir una millor desproteïnització. A continuació, es centrifuga 30 minuts a a 16000 g per separar el compostos que han precipitat, del sobrenedant que conté els aminoàcids lliures. Es descarta el pellet i el sobrenedant es filtra a través d'una membrana de diàmetre de porus de 10 KDa. Últim pas, és evaporar fins a sequedat la mostra filtrada i a continuació resuspendre-la amb 500 µl de tampó de citrat de liti pH 2,2.

El patró comercial que ens servirà per identificar els pics és el mateix que en el cas de l'orina (Fig. 13).

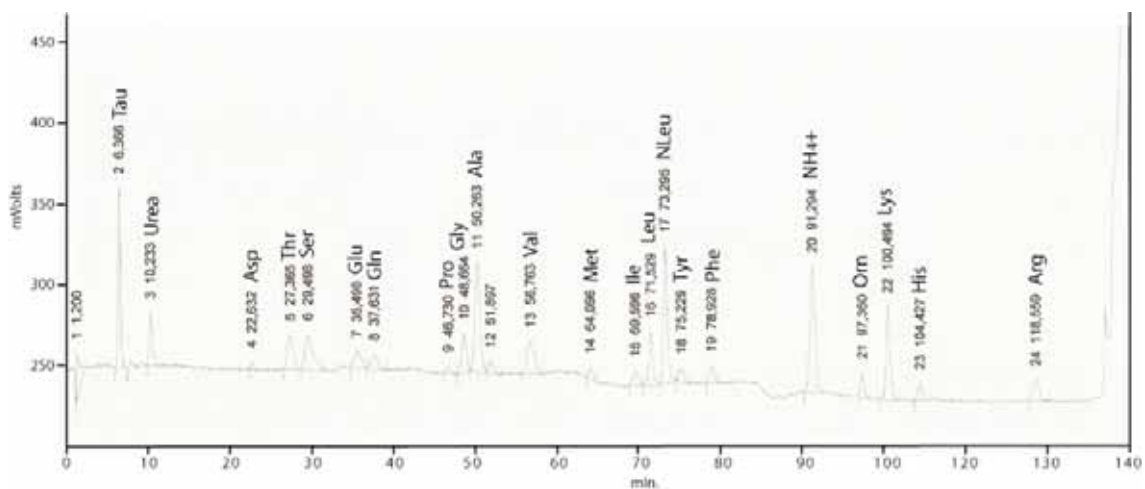


Fig. 14 Aminograma de plasma de ratolí. Plasma de ratolí mutant analitzat per autoanalitzador d'aminoàcids (Biochrom 30) després de desproteïnitzar. Es representen en verd els pics dels aminoàcids en milivolts per minut. En vermell la línia base utilitzada per la integració i quantificació de cada aminoàcid. Sobre cada pic es mostra el temps de retenció en la columna i l'aminoàcid que correspon segons el patró comercial prèviament i paral·lelament injectat.

Resultats

La majoria dels resultats que es presenten en aquest apartat es recullen a l'article de l'annex 3.

1. IDENTIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DE LAT4

Al 2003, moment en què es va començar aquest treball es coneixia que el sistema L de transport d'aminoàcids, estava format per LAT1 (Kanai *et al.* 1998) i LAT2 (Pineda *et al.* 1999; Rossier *et al.* 1999), dos membres de la família SLC7, i per LAT3 (Babu *et al.* 2003) també anomenat POV1 (Cole *et al.* 1998), una proteïna que formava una nova família de transportadors d'aminoàcids anomenada SLC43 (*Solute Carriers family 43*).

LAT3 presenta una activitat que concorda amb la que s'havia descrit per la variant L₂ (Weissbach *et al.* 1982) del sistema L, s'expressa majoritàriament al fetge i es diferencia clarament de la resta de transportadors d'aminoàcids. Per aquests motius, vam decidir realitzar una cerca bioinformàtica per trobar algun altre membre que pogués pertànyer de la família SLC43 i que representés a la variant L₂ en els teixits on LAT3 no s'expressa.

1.1. Identificació de LAT4

Al realitzar una cerca a nivell de nucleòtid (BLASTn) utilitzant com a esquer LAT3 contra tot el genoma, es van trobar 2 seqüències que compartien alt grau de similitud: EEG1 (Stuart *et al.* 2001) i un cDNA predit amb el nom de MGC34680 (IMAGE:5309751), el qual vam anomenar LAT4.

El cDNA humà de LAT4 (3024 pb) conté un únic ORF que codifica per una proteïna de 569 aminoàcids amb un pes molecular teòric de 62,7 KDa. La seqüència està referenciada amb número d'accés a RefSeq a nivell de nucleòtid NM_152346 i de proteïna NP_689559. També forma part de la base de dades *UniProtKB/Swiss-Prot* amb el número d'entrada Q8N370.

El primer codó ATG (posició 90) del cDNA està situat en pauta de lectura amb la seqüència d'iniciació (5'-CACCATGG) (Kozak 1991) i continua fins el primer codó stop (TAG) a la base 1799. El cDNA conté una cua de *polyA* de 25 adenines que comencen 17 bases després del senyal típic de poliadenilació AATAAA (2977 pb).

Pel que fa a la proteïna murina de LAT4 (mLAT4) consta de 568 aminoàcids amb un pes teòric de 62,4 KDa i prové d'un mRNA de 4389 pb amb una pauta oberta de lectura de 1707 pb.

Entorn genòmic

El gen que codifica per LAT4 s'anomena SLC43A2, ja que es considera el segon membre de la família de transportadors de soluts 43. En el genoma humà ocupa 54 Kb en el cromosoma 17 a la regió p13.3. Consta de 14 exons, 13 dels quals són codificants. Com es pot veure a la Fig. 15, està flanquejat a 3' pel gen de la "Phosphatidylinositol Transfer Protein, Alpha" (PITPNA) i pel de la "Skeletal muscle and Kidney enriched Inositol Phosphatase" (SKIP), i a la regió 5' del gen pel gen de la isoforma 1 del "Scavenger Receptor class F" (SCARF1), el de la proteïna lisosomal que interacciona amb Rab (RILP) i pel de la "pre-mRNA processing factor 8 homolog" (PRPF8).

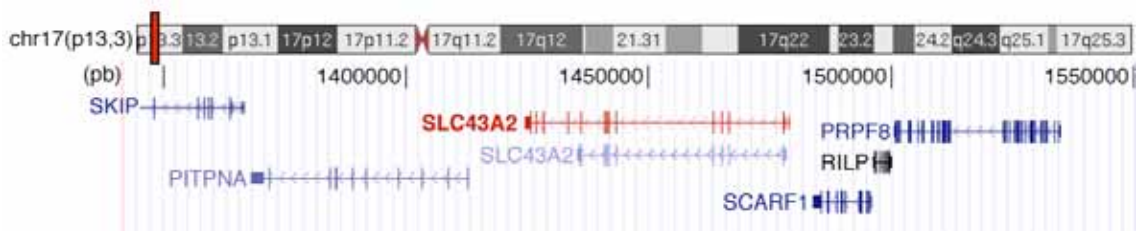


Fig. 15 Entorn genòmic de SLC43A2 humà. Imatge obtinguda del cercador genòmic de UCSC amb l'assemblatge del genoma humà del març del 2006. Es pot observar el cromosoma 17 i la línia vertical vermella ens indica la posició dels gens ampliat a sota que comprèn la zona d'entre 1350000-1550000 pb. En vermell es mostra el nostre gen d'interès (SLC43A2), en negre les seqüències que corresponen a una entrada a *Protein DataBank* (PDB), en blau fosc els transcrits que han estat revisats i validats per personal de *RefSeq* o *SwissProt*, en blau clar possibles transcrits no referenciats per *RefSeq*. Les caixes simbolitzen els exons i les fletxes els introns

El gen SLC43A2 murí està situat al cromosoma 11 al llarg de 43 Kb i consta de 14 exons, 13 dels quals codifiquen per la proteïna. A la Fig. 16 es pot observar el seu entorn genòmic.

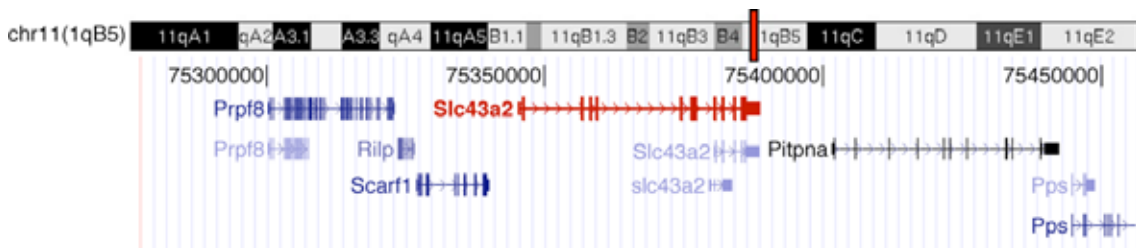


Fig. 16 Entorn genòmic de SLC43A2 murí. Imatge obtinguda del cercador genòmic UCSC utilitzant l'assemblatge del genoma murí del juliol del 2007. Es pot observar el cromosoma 11 i una línia vermella a la regió 1qB5 que indica la zona ampliada a sota. La situació del gen d'interès es marca en vermell, les caixes simbolitzen els exons i les fletxes els introns. En negre es mostren els transcrits referenciats, en blau fosc els revisats i en blau cel els que només són possibles gens.

Generació de plasmidis amb LAT4

Els clons de LAT4 es van aconseguir de la llibreria de clons de RZPD, "Deutsches Ressourcenzentrum fuer Genomforschung GmbH", actualment anomenat *ImaGenes* (<http://www.imagenes-bio.de/>). El cDNA de hLAT4 (LAT4 humà) procedeix del clon RZPD: IRATp970D0844D (MGC34680) disponible en el vector pCMV-SPORT6 i el cDNA de mLAT4 (LAT4 murí) del clon RZPD: IRAVp968B0287D (MGC 28931) en el mateix vector. Tots dos clons després de comprovar-se per digestió enzimàtica i seqüència es van subclonar en vectors adequats per l'expressió en sistemes heteròlegs.

A partir del clon comercial pCMV-SPORT6-hLAT4 i per PCR es van introduir les dianes *NcoI-XhoI* per tal de subclonar-ho al vector pTLN adequat per expressar el cRNA en oòcits de *Xenopus Laevis*. A partir d'aquesta construcció, es va afegir per PCR la diana *HindIII* a l'extrem 5' del cDNA i es va subclonar a pCNA3 amb les dianes *Hind III-XhoI*.

A partir del clon comercial pCMV-SPORT6-mLAT4 i per PCR es van introduir les dianes *NcoI-EcoRI* al cDNA mLAT4 i es va subclonar al vector pTLN. A partir d'aquesta construcció es va subclonar directament a pCDNA3.

Anàlisi de la seqüència de LAT4

LAT4 presenta un 57% d'identitat amb LAT3 i un 30% amb EEG1. L'anàlisi filogenètic ens indica que les 3 proteïnes formen part de la mateixa família SLC43 i que LAT4 guarda una homologia al voltant d'un 10% amb membres de famílies de transportadors de soluts com SLC7, SLC2 i SLC22 (Fig. 17).

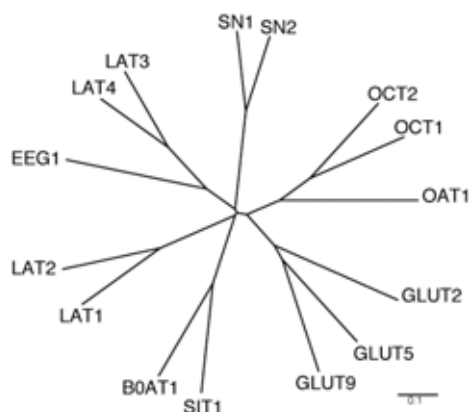


Fig. 17 Anàlisi filogenètic. Arbre realitzat a partir de les dades del mutialineament del Clustalw, utilitzant el *Phylo dendron v.0.8d* de la University of Indiana. S'han utilitzat diferents seqüències proteïques de membres representatius de les famílies SLC2 (GLUT2, GLUT5 i GLUT9), SLC6 (SIT1 i B⁰AT1), SLC7 (LAT1 i LAT2), SLC22 (OAT1, OCT1 i OCT2), SLC38 (SN1 i SN2) i SLC43 (LAT3, LAT4 i EEG1).

El gen SLC43A2 el trobem conservat en mamífers, peixos, amfibis i urocordats. La proteïna humana amb la murina conserven un 91,5 % d'identitat i amb la de rata un 93,7%. La predicció topològica per hLAT4 descriu 12 dominis transmembrana amb els dos extrems NH₂ i COOH intracel·lulars (Fig. 18).

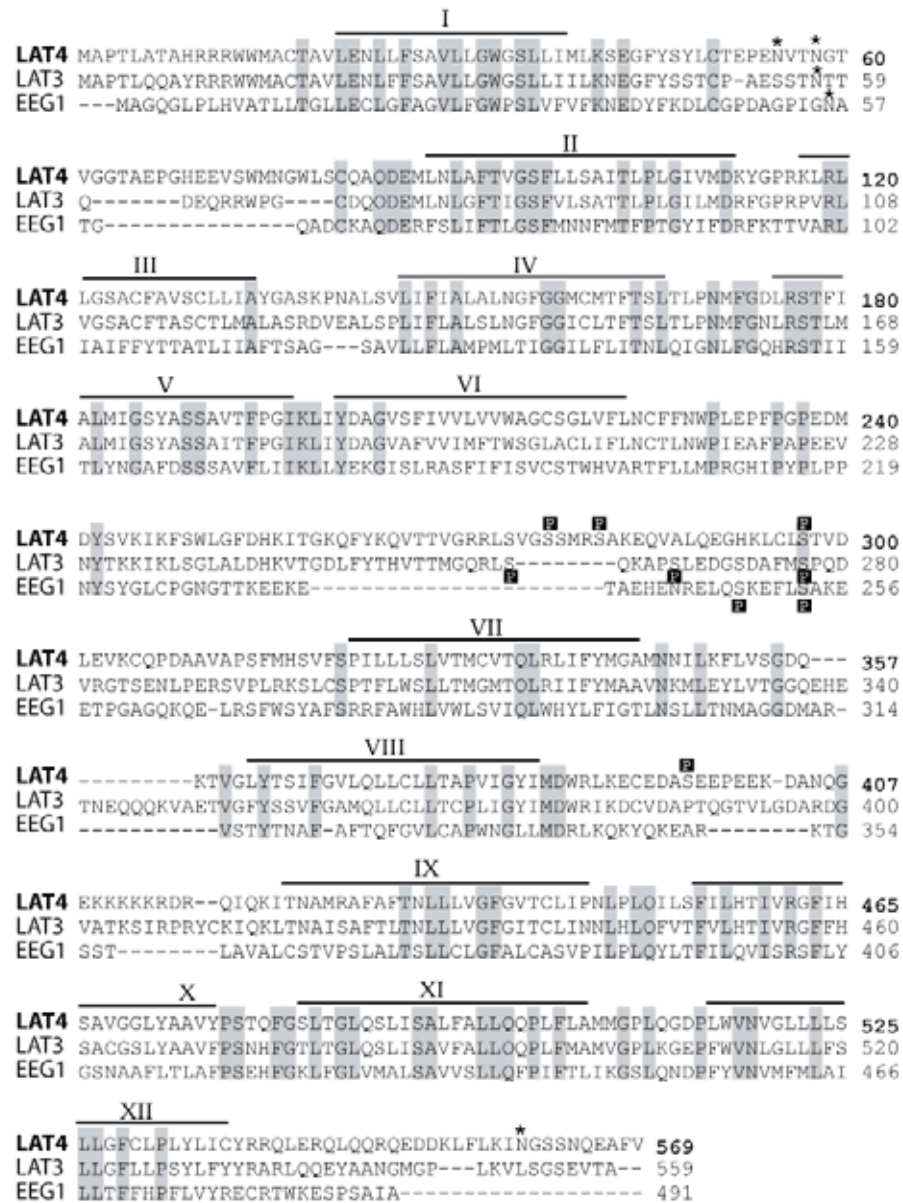


Fig. 18 Multialineament de la família de transportadors SLC43. Multialineament de les seqüències proteiques humanes de LAT4, LAT3 i EEG1 utilitzant l'algoritme de *ClustalW* de l'anàlisi de seqüències del EMBL-EBI. Amb una línia horitzontal s'indiquen els 12 dominis transmembrana possibles. Els residus aminoacídics idèntics en les 3 proteïnes estan senyalats amb una caixa gris. Els asteriscs marquen els residus amb possible N-glicosilació. Una caixa negra amb la P a dins, ens indica els llocs de possible fosforilació pels 3 membres de la família SLC43.

L'algoritme *NetNGlyc 1.0* (Blom *et al.* 2004) prediu tres llocs de possible *N*-glicosilació, dos al primer *loop* extracel·lular (Asn55 i Asn58) i un altre a l'extrem COOH terminal (Asn 560). Per comprovar si realment es tractava d'una proteïna glicosilada, vam introduir l'epítip de l'hemaglutinina (*HA*) just després del primer codó ATG del cDNA de LAT4 (*N-HA-LAT4*) per poder detectar la proteïna amb l'anticòs monoclonal 3F10 (*anti-HA*) per western blot i immunofluorescència.

Es van transfectar cèl·lules HeLa amb el plasmidi que expressava *NHA-LAT4* i l'extracte de proteïna total resultant es va tractar o no amb l'endoglicosidasa F (Endo F o PNGase F), la qual és capaç d'hidrolitzar *N*-glicosilacions. Per western blot vam detectar una banda ampla, típica de proteïnes glicosilades, situada entre 66 i 99 KDa corresponen a *N-HA-LAT4*. El tractament de l'extracte proteic amb Endo F convertia la banda ampla en una de més concreta amb un pes aproximat de 66 KDa, demostrant l'existència de *N*-glicosilacions en aquesta proteïna (Fig. 19).

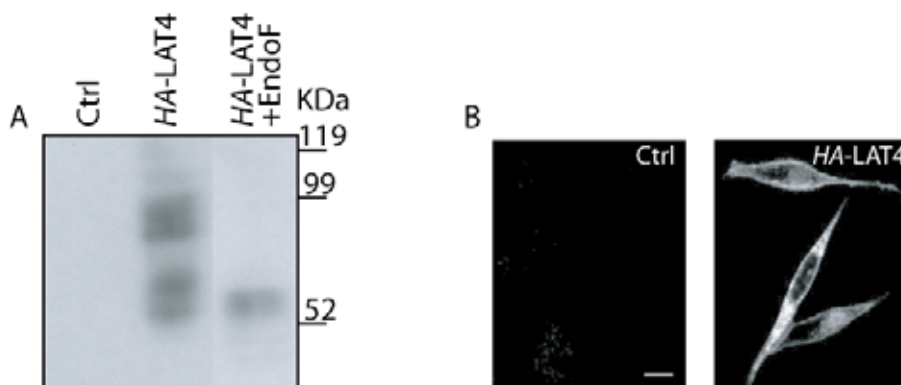


Fig. 19 Detecció de *NHA-LAT4* per western blot i immunofluorescència. **A.** Western blot on es detecta la proteïna *NHA-LAT4* amb l'anticòs 3F10 (*anti-HA*). Es mostren els carrils corresponents a l'extracte total de cèl·lules HeLa sense transfectar (ctrl), transfectades amb la proteïna d'interès (*HA-LAT4*) i transfectades i tractades amb EndoF (*HA-LAT4+EndoF*). LAT4 es detecta com a una banda ampla d'entre 66-99 KDa i després del tractament amb EndoF s'aprecia un canvi de mobilitat, confirmant-nos que LAT4 està *N*-glicosilat. **B.** La localització de *N-HA-LAT4* en cèl·lules HeLa es pot observar en cèl·lules sense transfectar (Ctrl) i en cèl·lules transfectades amb *N-HA-LAT4* (*HA-LAT4*). El senyal immunodetectat de l'epítip HA (blanc) es localitza majoritàriament a la membrana plasmàtica de la cèl·lula i en menor proporció en una senyal intracel·lular probablement del reticle endoplasmàtic. Barra: 10µm. Imatges obtingudes per la Dra. Lorena Martín.

Les mateixes cèl·lules transfectades amb *NHA-LAT4* es van utilitzar per comprovar la localització subcel·lular de la proteïna en aquest model cel·lular mitjançant immunofluorescència (Fig. 19). No es va observar senyal a les cèl·lules sense transfectar, en canvi va aparèixer una clara senyal de marcatge específic localitzada a la membrana plasmàtica de les cèl·lules transfectades amb *NHA-LAT4*, indicant que l'epítip introduït a la proteïna LAT4 arribava a la membrana. A més a més, aquest resultat ens indica que no hi ha processament de l'extrem NH₂

terminal de la proteïna per l'existència d'un pèptid senyal. També vam comprovar que la proteïna amb l'epítot *HA* a l'extrem era funcional i induïa transport d'aminoàcids (resultats no mostrats).

Continuant amb l'anàlisi de la seqüència de LAT4, l'algoritme *NetPhosK 2.0* (Blom *et al.* 1999) prediu 4 llocs possibles de fosforilació, però cal destacar el de la posició Ser274, situat en el *loop* intracel·lular entre els dominis transmembrana 6 i 7, conservat en tota la família SLC43 (Fig. 18). Recentment, s'ha comprovat que LAT4 està fosforilat "*in vivo*" per un nou mètode d'anàlisi de fosfopèptids a gran escala mitjançant cromatografia líquida associada a espectrometria de masses i amb un nou *software* anomenat PhosphoPIC (Hoffert *et al.* 2007).

Localització tissular i subcel·lular

L'anàlisi per northern blot per LAT4 revela l'existència de dos transcrits, un d'aproximadament 3,1 Kb i un altre d'unes 8-9 Kb, tant en els teixits procedents de mostres humanes com de ratolí. El mRNA de LAT4 humà s'expressa en diversos teixits (Fig. 20A), però en major proporció a placenta>>>ronyó i leucòcits procedents de sang perifèrica. El mRNA de LAT4 murí es detecta principalment a intestí>>ronyó, i en menor expressió a cervell, teixit adipós i testicle (Fig. 20B). A diferència de LAT3, no s'observa expressió de LAT4 al fetge humà ni al de ratolí. Cal destacar una expressió dèbil de mLAT4 en les cèl·lules PCT, provinents del túbul proximal contornejat de ronyó de ratolí (Cartier *et al.* 1993; Soler *et al.* 2002).

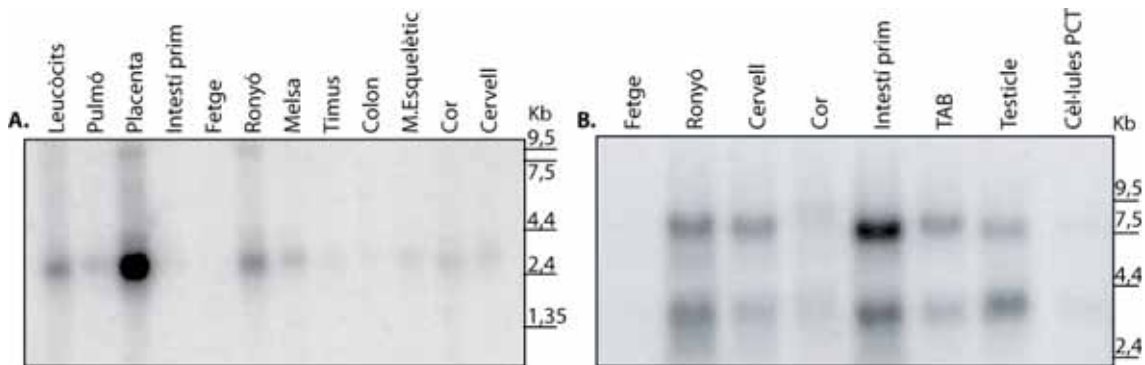


Fig. 20 Northern blot humà i de ratolí del mRNA de LAT4. **A.** Membrana amb 2 µg de poli(A⁺) RNA per carril procedents de diferents teixits humans adults (*BD Biosciences*). Es va hibridar amb una sonda marcada radioactivament (³²P) procedent d'un fragment del cDNA humà de LAT4 (nucleòtids 1 al 984). El mRNA de LAT4 humà s'expressa majoritàriament a placenta, i en menor grau a ronyó i leucòcits de sang perifèrica. **B.** Membrana amb 25 µg de RNA total per carril extret de diferents teixits de ratolí i de la línia cel·lular de ronyó PCT. L'RNA es va separar amb un gel d'agarosa, transferir a una membrana de niló, fixar irradiant a 254 nm i hibridar amb un fragment del cDNA de LAT4 marcat amb ³²P (nucleòtids 1 al 776). Després dels rentats a diferents condicions d'astringència, les membranes es van exposar a la pantalla de *PhosphorImager* per la detecció. El mRNA de LAT4 murí s'expressa majoritàriament a intestí prim i en menor grau a ronyó, testicle, cervell i teixit adipós blanc (TAB).

Per aprofundir en el possible paper de LAT4 en la (re)absorció, es va estudiar la seva expressió en intestí i ronyó per hibridació *in situ* de seccions de teixits humans i de ratolí incloses en parafina. Als talls de ronyó humà (Fig. 21 A i B) es detecta el mRNA de LAT4 a les cèl·lules epitelials del túbul distal i dels conductes col·lectors. No s'observa marcatge en el glomèrul ni en les cèl·lules epitelials del túbul contornejat proximal.

Pel que fa a les seccions d'intestí prim, el missatger de LAT4 s'expressa principalment a les cèl·lules de la cripta del microvil·li intestinal i a la base de les cèl·lules epitelials de les vellositats intestinals (*villus*) (Fig. 21 C i D). No s'observa marcatge a la làmina muscular de la mucosa (*Muscularis Mucosae*, *MM*).

No apareix senyal a cap tall de ronyó o intestí hibridat amb la sonda sense de LAT4, confirmant l'especificitat del marcatge.

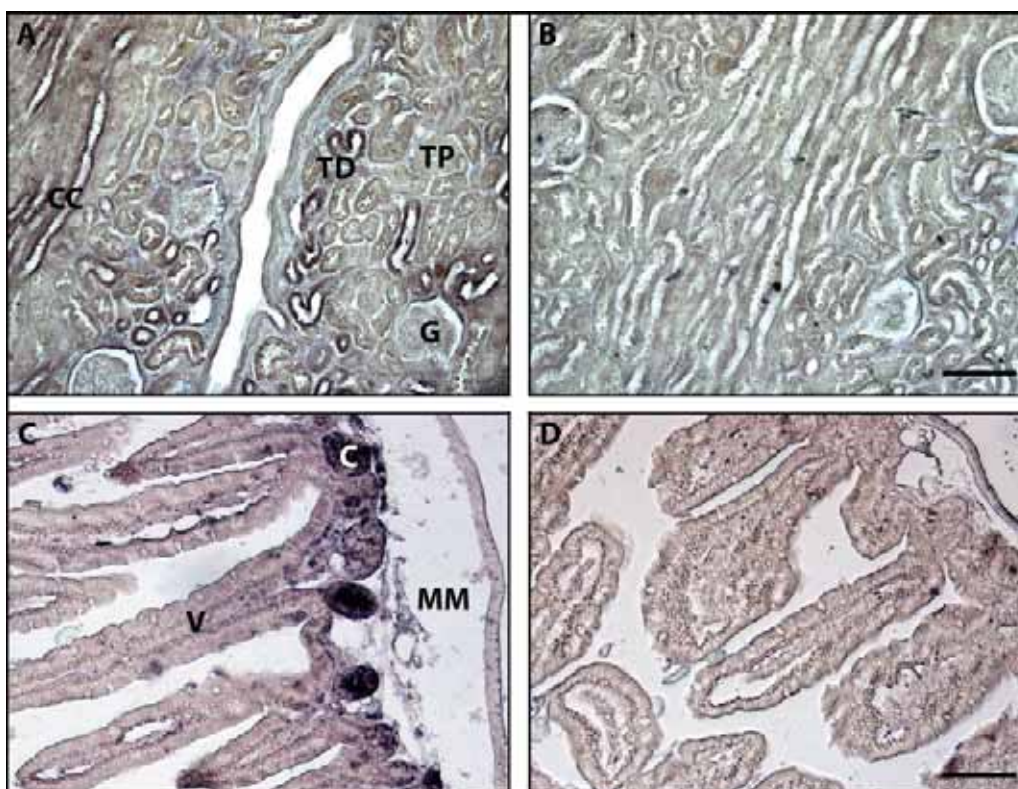


Fig. 21 Hibridació *in situ* del mRNA de LAT4 en ronyó i intestí. Seccions seriades de còrtex de ronyó humà (A i B) i d'intestí prim de ratolí (C i D) es van incubar amb sondes *sense* (B i D) i *antisense* (A i C) obtingudes a partir del cRNA de LAT4. Les seccions es van obtenir a partir de teixits fixats en formol i inclosos en parafina. **A** Al ronyó humà, LAT4 s'expressa majoritàriament als túbuls distals (TD) i als conductes col·lectors (CC), mentre que no s'observa senyal als glomèruls (G), ni als túbuls contornejats proximals (TP). **C**. A l'intestí de ratolí la senyal apareix a les cèl·lules de les criptes (C) i un marcatge menys intens s'observa a les cèl·lules de l'epiteli de les vellositats intestinals (V). LAT4 no s'expressa a la làmina muscular de la mucosa (MM). Als panells B i D no s'observa senyal ja que ha estat hibridat amb la sonda *sense*, la qual cosa ens indica l'especificitat del marcatge amb la sonda *antisense*. Barres de 0,1 mm (A i B) i de 0,04 mm. (C i D).

1.2. Caracterització funcional

Expressió funcional

Per comprovar la hipòtesis de si LAT4 podia ser un transportador d'aminoàcids per la seva similitud estructural amb LAT3, es van injectar oòcits de *X. laevis* amb el cRNA de LAT4 i es va mesurar l'entrada d'aminoàcids marcats radioactivament. Els oòcits injectats amb LAT4 mostren una augment en l'entrada de L-fenilalanina, L-leucina, L-isoleucina i L-metionina (Fig. 22).

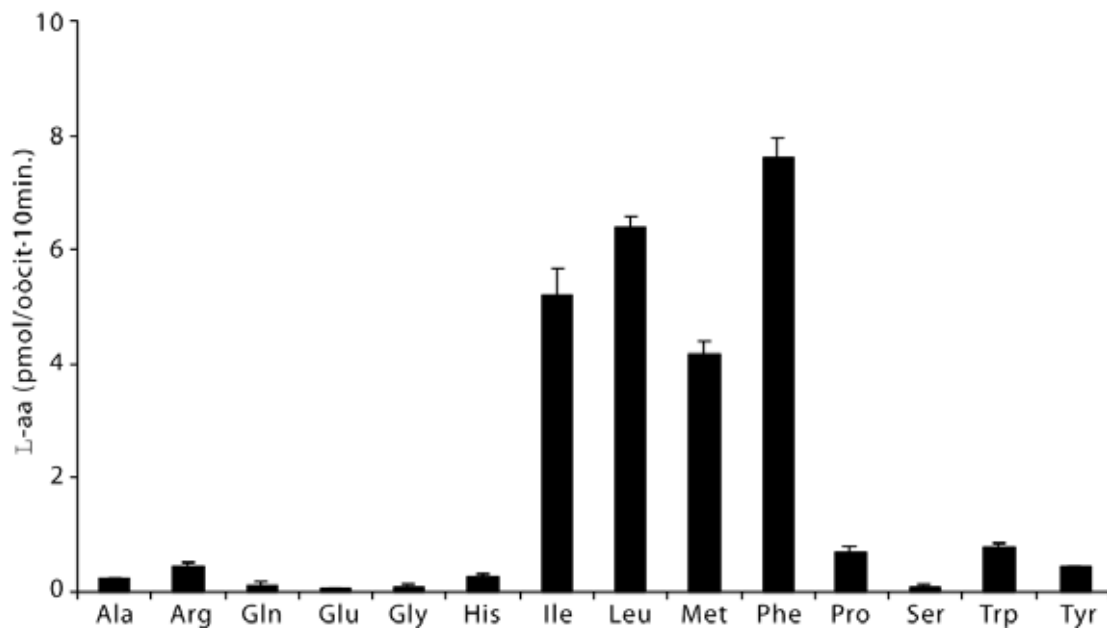


Fig. 22 Expressió funcional de LAT4 en oòcits de *Xenopus laevis*. Oòcits injectats amb 25 ng/oòcit cRNA de LAT4, dos dies després de la injecció, se'ls va mesurar l'entrada d'aminoàcids tritiats a 10 μ M durant 10 minuts. L'assaig de transport es va fer en un medi amb 100 mM de clorur de colina i sense sodi. El transport induït pels oòcits injectats amb aigua es va restar del provocat pels oòcits que expressen LAT4. Els aminoàcids capaços d'induir activitat de transport per LAT4 són els neutres de cadena lateral gran i ramificada, com la Leucina, Isoleucina, Fenilalanina i Metionina. Les dades (mitjana \pm S.E.) corresponen a un mínim de 3 experiments independents amb 7 oòcits per grup.

Seguidament, vam analitzar la dependència del pH i dels ions Na^+ o Cl^- en el transport induït per LAT4. L'activitat de transport utilitzant L-Phe com a substrat, és sodi-, clorur- i pH-independent (Fig. 23).

Continuant amb la caracterització funcional de l'activitat de transport induïda per LAT4, vam mesurar la inhibició de l'entrada de L-[^3H]Phe independent de Na^+ , per la presència de diferents aminoàcids no radioactius al medi a una concentració 200 vegades superior (100 μ M versus 20 mM). D'aquesta manera, es pot observar com els aminoàcids que també es transporten per LAT4 són capaços d'inhibir l'entrada de la L-[^3H]Phe en funció de l'afinitat de LAT4 pel substrat (Fig. 24).

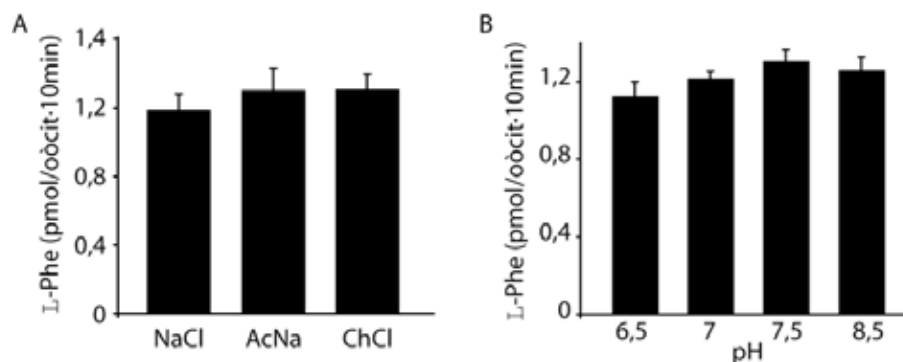


Fig. 23 Dependència iònica del transport de L-[³H]Phe en l'activitat de transport induït per LAT4. A. Oòcits injectats amb el cRNA de LAT4 o amb aigua, es van incubar amb 10 μM de L-[³H]Phe en una solució 100 mM de clorur sodi (NaCl), acetat sòdic (AcNa) o clorur de colina (ChCl) durant 10 minuts (en condicions de velocitat inicial). El transport de L-[³H]Phe no depèn de la presència o absència de ions Na⁺ o Cl⁻. **B.** L'entrada de L-[³H]Phe en oòcits injectats amb aigua o amb el cRNA de LAT4, es va mesurar en medis amb diferent pH (a 6.5, 7, 7.5 i 8.5). El transport de L-[³H]Phe no depèn de la quantitat de protons al medi. En els dos casos, els valors d'entrada d'aminoàcids expressats en picomols per oòcit en 10 minuts, es van obtenir restant-los dels valors obtinguts en el mateix transport d'oòcits injectats amb aigua. Les dades (mitjana ± S.E.) corresponen a un experiment representatiu de 3 experiments independents on s'han utilitzat 7 oòcits per grup.

Ni els aminoàcids àcids ni els bàsics són capaços d'inhibir el transport de L-[³H]Phe a diferència dels aminoàcids neutres i grans com són la L-leucina, L-isoleucina, L-metionina i L-valina, els quals considerem inhibidors forts (entre un 60-85% d'inhibició). Es tracta d'un transport estereoespecífic, ja que els anàlegs d'aminoàcid com els D-isòmers de la leucina, fenilalanina i valina són menys eficients alhora d'inhibir l'entrada de L-[³H]Phe. L'inhibidor específic del sistema L, l'anàleg d'aminoàcids BCH (àcid 2-aminobiciclo [2.2.1]heptà-2-carboxílic) inhibeix un 70% l'entrada de L-[³H]Phe per LAT4, confirmant així que l'activitat de transport induïda per LAT4 pertany al sistema L. També s'ha comprovat l'eficiència en la inhibició d'entrada de L-[³H]Phe del leucinol i valinol, els quals en comparació amb la Leu i Val posseeixen un grup alcohol enlloc de l'àcid carboxílic. Tal com succeeix amb LAT3, aquests derivats d'aminoàcid són capaços d'inhibir l'activitat de transport aproximadament un 40%. Per últim, la metiltirosina, un inhibidor específic de LAT1 (Shikano *et al.* 2003), es pot considerar un inhibidor pobre de l'activitat de transport induïda per LAT4.

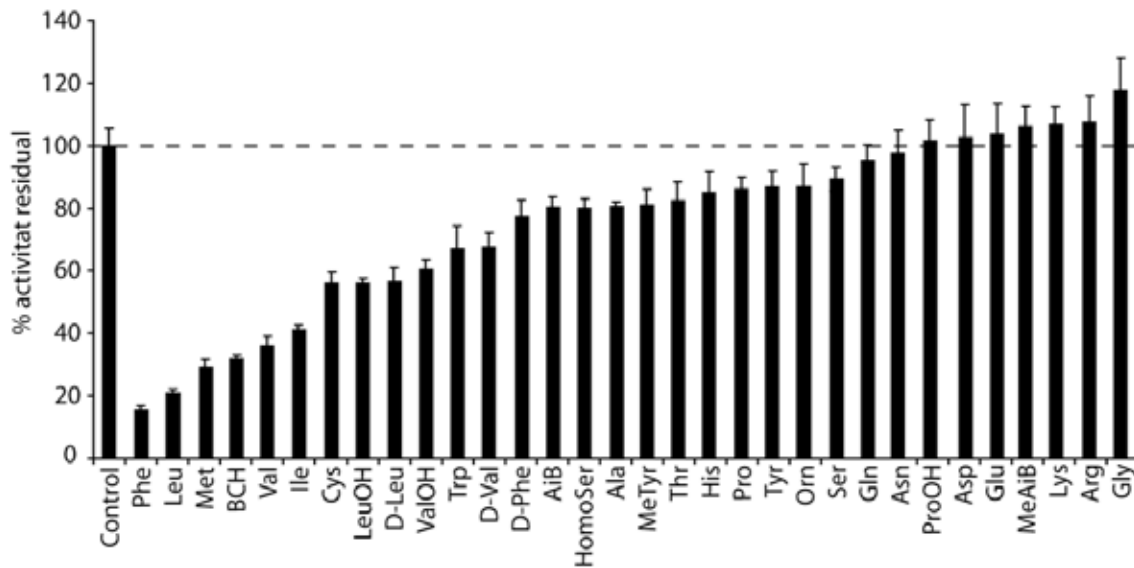


Fig. 24 Perfil d'inhibició de LAT4. Oòcits injectats amb aigua i amb el crNA de LAT4 es van incubar amb $100\mu\text{M}$ de $\text{L-}[^3\text{H}]\text{Phe}$ en un medi sense sodi i en absència (control) o presència dels aminoàcids indicats a les abscisses a 20 mM durant 10 minuts. Degut a la poca solubilitat en aigua de la metiltirosina (MeTyr), s'ha utilitzat a 2 mM enfront als $20\mu\text{M}$ de $\text{L-}[^3\text{H}]\text{Phe}$. L'activitat de transport en el grup control amb $100\mu\text{M}$ de $\text{L-}[^3\text{H}]\text{Phe}$ és de $11,22 \pm 0,6\text{ pmol/oòcit}\cdot 10\text{ min}$ pels oòcits injectats amb el crNA de LAT4 i de $1,48 \pm 0,07\text{ pmols/oòcit}\cdot 10\text{ min}$ amb aigua. A $20\mu\text{M}$ els valors són de $2,4 \pm 0,2\text{ pmol/oòcit}\cdot 10\text{ min}$ i $0,3 \pm 0,02\text{ pmol/oòcit}\cdot 10\text{ min}$ per oòcits injectats amb LAT4 i sense injectar, respectivament. Observem que els aminoàcids neutres de cadena llarga i ramificada, juntament amb l'inhibidor específic del sistema L, són els millors inhibidors del transport de $\text{L-}[^3\text{H}]\text{Phe}$. Els valors (mitjana \pm S.E.) del gràfic són el percentatge de transport d'aminoàcids en presència d'inhibidors en funció del transport induït sense inhibidors (control). Els valors són representatius de quatre experiments independents, on s'han utilitzat 7 oòcits per condició. Amb una línia discontinua s'indica el 100% d'activitat. MeAiB, àcid metil aminoisobutíric. BCH, àcid 2-aminobiciclo[2.2.1]heptà-2-carboxílic. LeuOH, leucinol. ValOH, valinol. AiB, aminoisobutíric. ProOH, hidroxiprolina.

Ja s'havia descrit que el tractament amb NEM (*N-etilmaleimida*), un agent alquilant de grups sulfhidril, afectava en alguns casos totalment i d'altres en part, a la funció dels transportadors del sistema L (Novak *et al.* 1994; Babu *et al.* 2003). Per això, vam examinar l'efecte inhibidor del NEM en el transport de $\text{L-}[^3\text{H}]\text{Phe}$ mediat per LAT4 i vam comparar-lo amb la resta de transportadors del sistema L.

Com a control positiu es va utilitzar CAT2, un transportador d'aminoàcids bàsics del sistema γ^+ i de la família gènica SLC7, molt sensible al tractament amb NEM (Deves *et al.* 1993). Com es pot veure a la Fig. 25, LAT1 és quasi insensible, LAT2 i LAT4 mostren una sensibilitat intermitja i LAT3 és el transportador del sistema L més afectat per l'agent sulfidril.

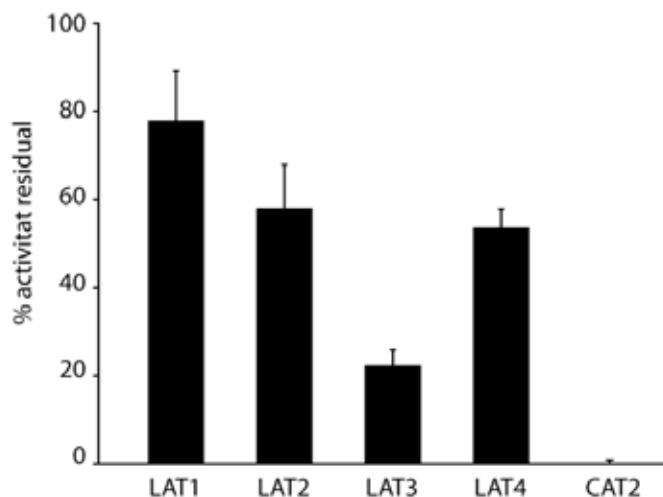


Fig. 25 Efecte de la preincubació amb NEM en l'activitat de transport induïda per LAT4. Es va mesurar l'entrada de $L[^3H]Phe$ ($100 \mu M$) en oòcits que expressaven LAT4, i l'entrada de $L[^3H]Arg$ ($100 \mu M$) en oòcits que expressaven CAT2, en un medi sense sodi preincubats amb $5 mM$ de NEM durant 15 minuts. Per mesurar l'activitat de transport de LAT1 i LAT2 es va coinjectar el cRNA de LAT1 o LAT2 juntament amb el de 4F2hc. Es representa el % d'activitat residual obtingut del transport d'entrada d'aminoàcid sotmès al pretractament amb NEM respecte a l'entrada sense el pretractament. L'activitat es va mesurar en pmols d'aminoàcid per oòcit i minut. S'observa la total inhibició del transport d'entrada d'arginina per CAT2, la inhibició de l'entrada de fenilalanina per LAT3, la parcial inhibició per LAT2 i LAT4 i la quasi no inhibició del transport per LAT1. Es mostra un experiment representatiu de 3 independents.

Estudi cinètic de LAT4

L'anàlisi cinètic de l'activitat de transport induïda per LAT4 es va realitzar amb dos substrats diferents, L -fenilalanina i L -leucina. Sorprenentment, igual que la cinètica de LAT3 (Babu *et al.* 2003), l'expressió de LAT4 en oòcits de *Xenopus Laevis*, mostra una entrada d'aminoàcid saturable i una representació d'Eadie-Hofstee no lineal, suggerint l'existència de més d'un component cinètic per l'entrada d'aminoàcids via LAT4 (Fig. 26). Les dues pendents del diagrama d'Eadie-Hofstee, ens indiquen una cinètica amb dues components i que s'ajusta a la següent equació: $v = [V_{max1} \times s / (K_{m1} + s)] + [V_{max2} \times s / (K_{m2} + s)]$, on v és la velocitat, V_{max} és la velocitat màxima i K_m és la constant de Michaelis-Menten dels components 1 i 2. El component de baixa afinitat té una K_m de $4694 \pm 510 \mu M$ per la L -Phe i $3733 \pm 1019 \mu M$ per la L -Leu, i el component d'alta afinitat té una K_m de $178 \pm 29 \mu M$ per la L -Phe i de $103 \pm 62 \mu M$ per la L -Leu. Pel que fa a les velocitats màximes de la cinètica amb L -Phe com a substrat, la V_{max1} és de 586 ± 86 pmols/oòcit·10 min i la V_{max2} de 34 ± 6 pmols/oòcit·10 min; i per la cinètica amb L -Leu, la V_{max1} és de 353 ± 30 pmols/oòcit·10 min i la V_{max2} és de 34 ± 6 pmols/oòcit·10 min.

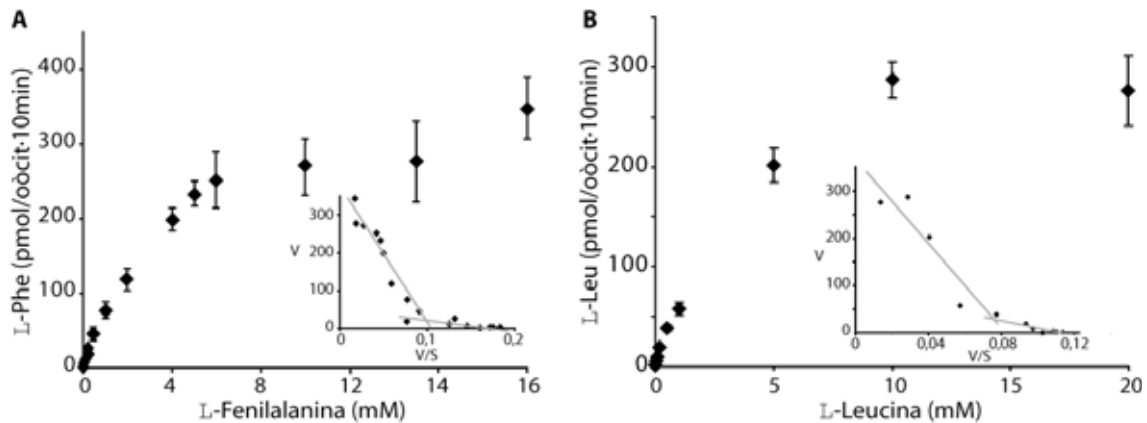


Fig. 26 Anàlisi cinètic de l'activitat de transport induïda per LAT4. Dos dies després d'injectar oòcits amb 25 ng del cRNA de LAT4, es va mesura l'entrada de L - $[^3H]$ Phe (**A**) i L - $[^3H]$ Leu (**B**) en un medi sense sodi a diferents concentracions de substrat durant 10 minuts. L'activitat de transport dels oòcits no injectats està restada de la dels oòcits que expressen LAT4. Les concentracions del substrat usades són 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 4000, 5000, 6000, 10000, 15000 i 20000 μ M en el cas de la L - $[^3H]$ Phe i de 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000, 10000, 15000 i 20000 μ M per la L - $[^3H]$ Leu. Els gràfics petits corresponen a la representació de Eadie-Hofstee on es mostra la velocitat (V) en funció del quocient de la velocitat per la concentració de substrat (V/S). En la cinètica representada en segons el gràfic de Michaelis-Menten s'observen dues cinètiques saturables, i segons el diagrama d'Eadie-Hofstee, observem dues pendents que ens indiquen a presència de dues components cinètiques de transport tan per el transport de L - $[^3H]$ Phe com de L - $[^3H]$ Leu. Els valors (mitjana \pm S.E.) corresponen a un experiment representatiu d'un mínim de 4 i cada punt s'ha obtingut d'un grup de 7 oòcits.

Mecanisme de transport

Per estudiar el mecanisme de transport mediat per LAT4, es va mesurar la sortida de radioactivitat en oòcits prèviament incubats amb L - $[^3H]$ Phe (50 μ M, 1 μ Ci/100 μ l) durant una hora. Tal com es pot veure a la Fig. 27, els oòcits que expressen LAT4 mostren una sortida d'aminoàcid radioactiu dependent del temps i independent de la presència o absència de fenilalanina en el medi de transport. Que el flux de sortida d'aminoàcid radioactiu sigui idèntic amb presència o absència d'aminoàcid al medi exterior, ens indica que el transport de L - $[^3H]$ Phe no es trans-estimula per la presència d'aminoàcid a l'altre banda de la membrana. Per tant, aquesta dada, juntament amb la independència iònica del transport, ens suggereixen que LAT4 funciona amb un mecanisme de transport de difusió facilitada.

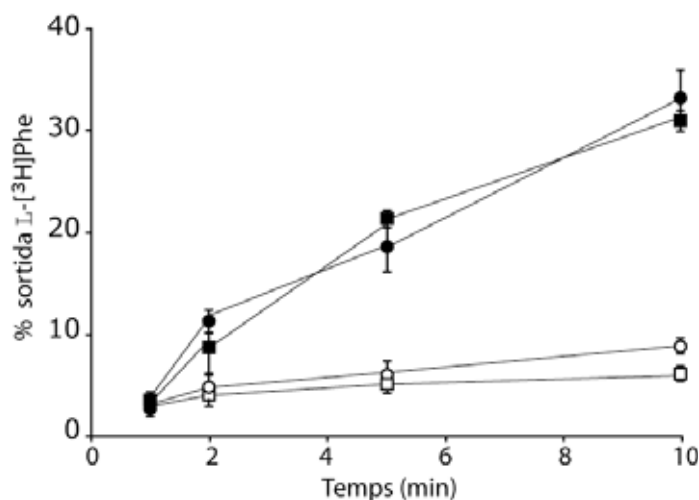


Fig. 27 Sortida de L-[³H]Phe per LAT4. Oòcits injectats amb el cRNA de LAT4 (símbols plens) o amb aigua (símbols buits) se'ls va determinar la sortida de radioactivitat en funció del temps (minuts) via LAT4. Dos dies després de la injecció, els oòcits es van carregar amb 50 μM de L-[³H]Fenilalanina durant 60 min (la radioactivitat acumulada en aquest experiment representatiu, va ésser de 8750 ± 315 cpm i 3269 ± 276 cpm per oòcit injectat amb LAT4 i amb aigua, respectivament). Després es van incubar en 500 μl d'un medi sense aminoàcids (cercles) o amb 5 mM de L-Phe (quadrats), i es van treure alíquotes de 100 μl als temps indicats per comptar la radioactivitat alliberada. Després d'haver recollit totes les alíquotes, els oòcits es van lisar per valorar la quantitat de radioactivitat incorporada. La sortida de radioactivitat es representa en percentatge (%) de sortida de L-[³H]Phe. S'observa que la sortida de L-[³H]Phe de l'oòcit no es transestimula amb presència d'aminoàcid a l'altre banda de la membrana. Les dades (mitjana ± S.E.) provenen d'un experiment representatiu de 3 i cada punt es va obtenir de 3 oòcits.

Per intentar aprofundir en el mecanisme de transport de LAT4, vam voler analitzar si l'efecte del NEM podia tenir alguna relació amb la cinètica de dos components. Per això, vam assajar a diferents concentracions de substrats l'efecte de l'agent alquilant (Fig. 28). Interessantment, només el component de baixa afinitat és sensible al pretractament amb NEM. Amb el programa *Kaleida Graph v.3.6*, vam ajustar els valors obtinguts a l'equació de Michaelis-Menten per dos components cinètics. Les constants d'afinitat obtingudes dels oòcits tractats amb NEM va ser de K_{m1} 3103 ± 442 i de K_{m2} 177 ± 30 μM; i les velocitats màximes van reduir-se un 64 ± 4 % pel que fa a la del component de baixa afinitat i es va conservar un 90 ± 18 % en el cas del component d'alta afinitat.

En el mateix sentit, vam voler comprovar si la fosforilació estava implicada d'alguna manera en el comportament cinètic de LAT4. S'ha suggerit que en alguns receptors transmembrana, la fosforilació pot alterar l'afinitat de la unió pel lligand i produir una aparent cinètica multicomponent (Leeb-Lundberg *et al.* 1985; Kubar i Rochet 1990; Babu *et al.* 2003). La serina 297 de LAT4 està conservada en els tres membres de la família, i les prediccions apunten a què podria estar fosforilada *in vivo* (Hoffert *et al.* 2007). Per esbrinar si aquesta serina és important i si la

fosforilació pot tenir algun impacte en l'activitat de transport de LAT4, vam mutar la serina 297 a alanina (S297A), un aminoàcid també sense càrrega i de mida similar, i vam assajar una cinètica de transport via LAT4. La mutació va provocar una molt lleugera inhibició del transport, passant d'uns valors de K_{m1} $4694 \pm 510 \mu\text{M}$ a $3323 \pm 596 \mu\text{M}$ i pel component d'alta afinitat de $178 \pm 29 \mu\text{M}$ a $158 \pm 32 \mu\text{M}$ (Fig. 29).

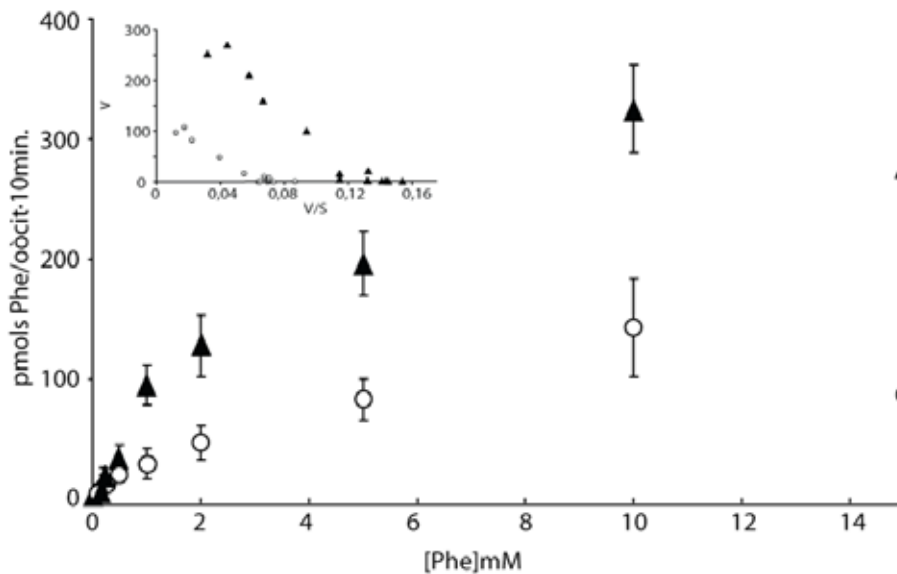


Fig. 28 Cinètica del transport de Phe via LAT4 i l'efecte del NEM. Oòcits que expressaven LAT4 es van pretractar o no (cercles blancs) amb NEM a 5 mM durant 15 minuts (triangles negres), i després es van incubar amb diferents concentracions de $[^3\text{H}]\text{Phe}$ (de 0,5 a 15000 μM) durant 10 minuts. El transport dels oòcits injectats amb aigua es va restar dels injectats amb el cRNA de LAT4. El gràfic representa les cinètiques de Michaelis-Menten, la velocitat d'entrada en picomols de fenilalanina per oòcit i deu minuts en funció de la concentració de substrat ($[\text{Phe}] \text{ mM}$). Al gràfic petit, es pot observar el diagrama d'Eadie-Hofstee, on la velocitat (V) es representa en funció del quocient de la velocitat per la concentració de substrat (V/S). L'efecte del NEM altera el component de baixa afinitat, com es pot veure en les dues representacions. Els valors (mitjana \pm S.E.) corresponen a un experiment representatiu d'un conjunt de 4 i cada punt d'obté d'un grup de 7 oòcits.

Per caracteritzar el mutant vam repetir la cinètica tractant prèviament amb NEM. Sorprenentment, el mutant S297A va resultar insensible a l'agent sulfidril a totes les concentracions de substrat testades (Fig. 29).

A diferència de la inhibició que havíem observat en el cas del LAT4 salvatge, el NEM no altera l'activitat a nivell de K_m ni V_{max} del mutant. El transportador LAT4 S297A és un mutant resistent al tractament amb NEM, ja sigui per un canvi de conformació de la proteïna provocat per la fosforilació o qualsevol altre modificació, que provoqui que la cisteïna diana quedi tapada i impedeixi l'accés del NEM.

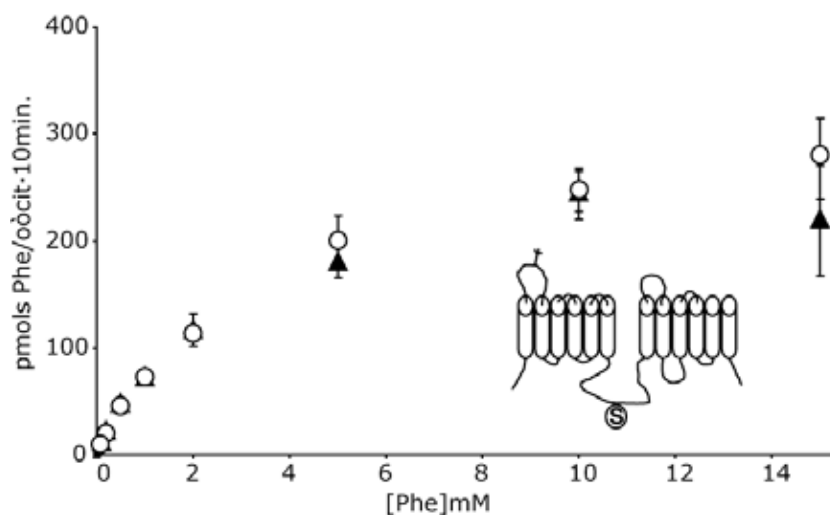


Fig. 29 Anàlisi de l'efecte del NEM en l'activitat de transport induïda per LAT4S297A. Per mutagènesi dirigida es va substituir la serina 297 per una alanina. Oòcits injectats amb 25 ng del cRNA de LAT4S297A, es van incubar amb NEM 5 mM durant 15 minuts (triangles negres) o sense pretractament (cerques blancs), i seguidament es va assajar l'entrada de L^3H Phe. L'activitat de transport dels oòcits no injectats es va restar de la dels oòcits que expressaven la LAT4. També es mostra dins del gràfic, una representació esquemàtica de la proteïna i la posició de la serina 297 mutada situada en el 6è loop intracel·lular. S'observa que el NEM no efecte la cinètica del mutant LAT4S297A. Les dades (mitjana \pm S.E.) corresponen a un experiment representatiu amb 7 oòcits per grup.

Per intentar identificar la cisteïna responsable de l'acció del NEM es van mutar les dues cisteïnes més properes a la serina 297, ja que la mutació d'aquesta inactiva l'efecte del NEM. El canvi de la cisteïna 295 a alanina (C295A) i el de la Cys 305 a Ala (C305A) no va tenir cap efecte sobre l'acció del NEM en l'activitat de transport de Phe via LAT4 (Fig. 30). Com a control positiu vam comprovar que el transportador salvatge s'inhibia parcialment amb el pretractament amb l'agent NEM i que el mutant LAT4S297A era insensible a l'agent alquilant sulfídril.

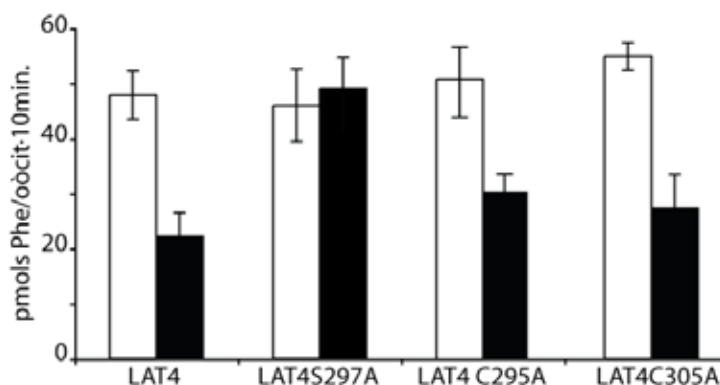


Fig. 30 Efecte del NEM en els mutants de LAT4. Dos dies després de la injecció de 25ng dels cRNA de LAT4, i dels mutants LAT4S297A (serina 297 alanina), LAT4C295A (cisteïna 295 alanina) i LAT4C305 en oòcits, es va assajar l'entrada de L^3H Phe en un medi sense sodi i amb un tractament previ amb 5mM de NEM durant 15 minuts (barres negres) o sense pre-tractament (barres blanques). Els mutants LAT4C295A i LAT4C305 es comporten igual que LAT4 salvatge, per tant, aquestes dues cisteïnes no són dianes del NEM.

Model cel·lular per LAT4

Per intentant entendre el paper fisiològic de LAT4, ens vam plantejar buscar un model cel·lular que expressés el transportador i on poguéssim detectar la seva activitat. Per tal d'escollir una línia cel·lular ens vam basar en l'anàlisi per northern blot (Fig. 31), i vam estudiar línies cel·lulars procedents dels teixits amb major expressió de LAT4 i de les quals poguéssim disposar. Vam escollir tres línies cel·lulars procedents de placenta: JAR (Story *et al.* 1974), JEG-3 (Kohler i Bridson 1971; Lieblich *et al.* 1976) i BeWo (Hertz 1959; Pattillo *et al.* 1968); i dues línies procedents de ronyó: cèl·lules OK (Koyama *et al.* 1978) i PCT (Cartier *et al.* 1993).

Les línies cel·lulars de placenta JAR, JEG i BeWo, procedeixen de coriocarcinomes gestacionals humans i morfològicament s'assemblen al citotrofoblasts. Les tres línies cel·lulars són capaces de polaritzar-se i es pot distingir tant morfològicament com bioquímicament, la membrana apical de la basolateral (Olli *et al.* 1993; Liu *et al.* 1997).

Pel que fa a les línies cel·lulars de ronyó, les cèl·lules OK i les PCT procedeixen del túbul proximals contornejat d'opòssum i de ratolí, respectivament. Totes dues són capaces de polaritzar-se i formar una monocapa (Fernández *et al.* 2003).

Vam analitzar l'expressió del mRNA de LAT4 per northern blot (Fig. 31) de les 5 línies cel·lulars juntament amb l'expressió a ronyó com a control positiu.

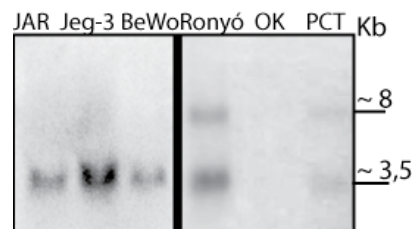


Fig. 31 Northern blot per LAT4 de diferents línies cel·lulars de placenta i ronyó. 25 µg. de RNA total extret de les línies cel·lulars es va carregar en un gel d'agarosa i formaldehid. Una vegada transferit a la membrana, es va hibridar amb una sonda radioactiva d'un fragment del cDNA humà (nucleòtid 1-984) en el cas de les cèl·lules BeWo, JAR i JEG-3 i amb un fragment del cDNA murí (nucleòtid 1-776) en el cas del ronyó, cèl·lules OK i PCT. La membrana amb l'RNA de les cèl·lules de placenta es va haver d'exposar més temps per obtenir la imatge. Es va observar expressió del mRNA de LAT4 a les tres línies cel·lulars de placenta (JAR, JEG-3 i BeWo), al control positiu (ronyó) i a les cèl·lules de ronyó (PCT).

Les úniques cèl·lules on no vam detectar el missatger van ser en les OK amb una sonda de ratolí. Aquest fet pot ser degut a què no expressin LAT4 o a què la seqüència de ratolí no sigui suficientment homòloga a la d'opòssum. En el moment en què es va realitzar el northern blot no es coneixia el genoma d'opòssum (*Didelphis virginiana*) i per tant, no disposàvem de la seqüència. Una altra línia

cel·lular que vam considerar i analitzar per northern blot va ser les cèl·lules MDCK (*Madin-Darby canine kidney*) que provenen de túbuls distals del ronyó, però es va descartar per la dificultat de no disposar de la seqüència de gos i perquè igual que en el cas de les cèl·lules OK, els resultats del northern blot van ser negatius (dades no mostrades).

Vam valorar els diferents models cel·lulars mesurant l'activitat de transport de $L[^3H]Phe$ en cada tipus cel·lular i el model que millor s'adequava a l'estudi, com es descriu més endavant, va ser la línia cel·lular PCT.

Amb el propòsit d'aprofundir en el coneixement de les cèl·lules PCT vam analitzar quins dels transportadors del sistema L s'expressaven en aquesta línia cel·lular per RT-PCR (Fig. 32). Vam confirmar l'expressió de LAT4, i vam observar que en aquestes cèl·lules només podíem detectar un altre transportador del sistema L, LAT1.

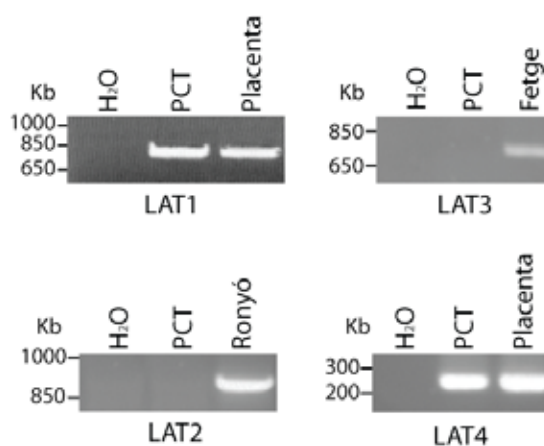


Fig. 32 Expressió de mRNA dels transportadors del sistema L. L'RNA extret de les cèl·lules PCT polaritzades es va retrotranscriure. El cDNA resultant es va amplificar amb encebadors específics per les seqüències de LAT1, LAT2, LAT3 i LAT4. Com a control negatiu es va substituir el cDNA provinent de les cèl·lules PCT per aigua. Com a controls positius es va utilitzar placenta per LAT1 i LAT4, ronyó per LAT2 i fetge per LAT3. La mida de les bandes obtingudes en el gel coincideix amb el producte esperat per a cada parella d'encebadors. A la línia cel·lular PCT som capaços de detectar l'expressió de LAT1 i LAT4.

El segon pas, va ser estudiar si l'activitat present a les cèl·lules de ronyó era compatible amb LAT4. Per això, les PCT es van sembrar i polaritzar sobre unes cistelles amb una membrana permeable suspeses sobre un pou anomenades *Transwell*[®] (*Costar*). L'entrada de $L[^3H]Phe$ per la cara basolateral de les cèl·lules mostrava dos components cinètics amb una K_m de $217 \pm 19 \mu M$ i una V_{max} de $4,1 \pm 0,1$ nmol/mg de proteïna·min per el component d'alta afinitat i una K_m de $13,2 \pm 3,6$ mM i una V_{max} de $4,1 \pm 0,1$ nmol/mg de proteïna·min per el component de baixa afinitat (Fig. 33).

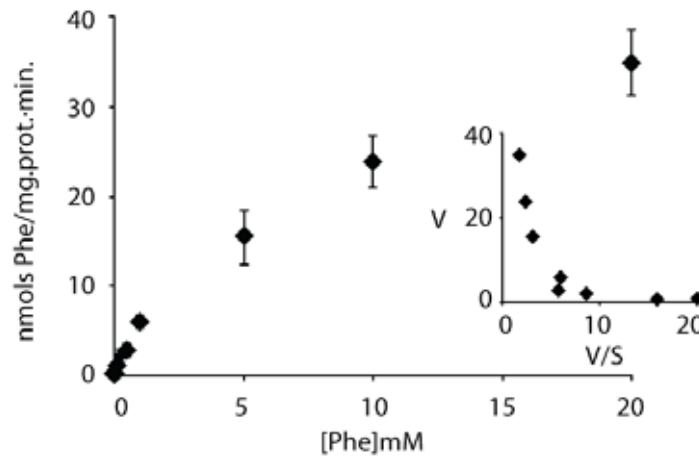


Fig. 33 Cinètica del transport de Phe en les cèl·lules PCT. Es van créixer les cèl·lules PCT en *Transwell* fins arribar a formar una monocapa impermeable. Es va mesurar l'entrada de L - $[^3H]$ Phe per la cara basolateral de les cèl·lules a diferents concentracions de substrat (10, 50, 250, 500, 1000, 5000, 10000 i 20000 μ M). El transport es representa en nmols de Phe incorporats a la cèl·lula per mg. de proteïna per minut. El subgràfic ens mostra la representació d'Eadie-Hofstee de les dades. Cada punt correspon a la mitjana \pm l'error estàndard d'un mínim de 3 filtres d'un experiment representatiu.

Per identificar els dos components vam realitzar estudis d'inhibició per tal de discernir entre els dos possibles transportadors que s'expressen en aquest tipus cel·lular (Fig. 34). Hi ha una activitat de transport de Phe per la cara basolateral de les cèl·lules que no s'inhibeix per L -Ala, substrat típic de LAT2, i que s'inhibeix quasi completament per metiltirosina, un substrat específic de LAT1, confirmant la seva presència. Aquestes dades ens indiquen que possiblement, el responsable del component d'alta afinitat sigui LAT1.

El pretractament de les cèl·lules amb NEM, ens va revelar que només el component de baixa afinitat era sensible al NEM (Fig. 34). Sabent que LAT1 és pràcticament insensible a NEM, suggerim que LAT4 pot ser el responsable del component de baixa afinitat en l'entrada de Phe per la cara basolateral de les cèl·lules PCT.

Durant la identificació i caracterització de LAT4 vam intentar generar anticossos contra la proteïna, ja que és una eina molt important alhora d'aprofundir en el seu estudi. Aquest objectiu el vam abordar mitjançant dues estratègies: generació de sèrums per immunització contra un pèptid o contra una proteïna de fusió. Aquests resultats s'han inclòs en l'annex 1 d'aquesta tesi.

Al no aconseguir anticossos contra LAT4, ens vàrem plantejar abordar l'estudi del tercer membre de la família de transportadors d'aminoàcids SLC43, EEG1.

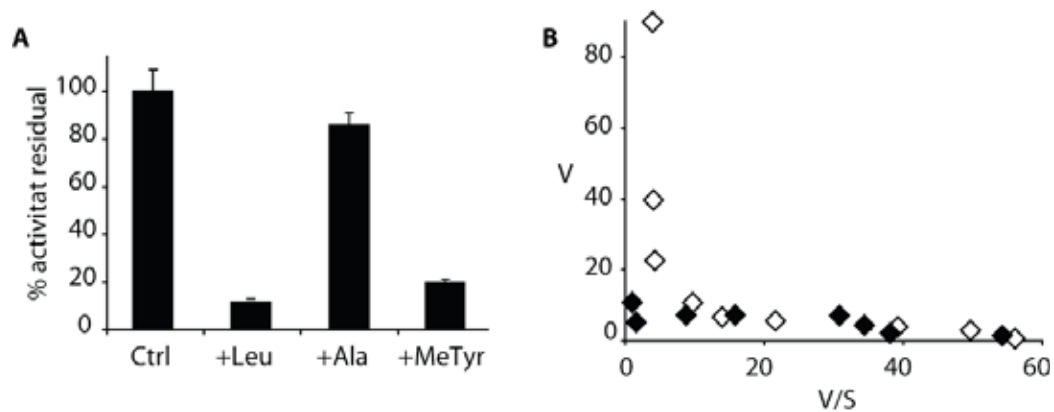


Fig. 34 Patró d'inhibicions en el transport de Phe i efecte del NEM a la cinètica transformada al gràfic d'Eadie-Hofstee. **A.** Es va mesurar l'entrada de $L[{}^3H]Phe$ ($100 \mu M$ i $20 \mu M$ quan s'inhibeix amb MeTyr) en presència dels següents inhibidors: L -Ala i L -Leu a 10 mM i metiltirosina a 2 mM . La inhibició amb alanina no és estadísticament significativa. Cada punt correspon a la mitjana \pm l'error estàndard d'un mínim de 3 filtres d'un experiment representatiu. **B.** Representació d'Eadie-Hofstee per la cinètica d'entrada de $L[{}^3H]Phe$ per la cara basolateral de les cèl·lules PCT. Les cèl·lules pre-tractades amb NEM 5 mM durant 15 minuts (rombes negres) o sense tractar (rombes blancs), es van incubar en un medi sense sodi i es va assajar el transport de $L[{}^3H]Phe$. Les dades corresponen a la mitjana de triplicats per cada punt individual i l'error estàndard en tots els casos era inferior al 10%.

2. CARACTERITZACIÓ DE EEG1 I ESTUDI DEL RATOLÍ MUTANT EEG1-Y221*

Com s'ha comentat anteriorment, l'any 2003 es va identificar i clonar LAT3, el primer membre de la nova família de transportadors d'aminoàcids SLC43 (Babu *et al.* 2003) i tal com havia succeït amb LAT4, també ens vam interessar pel tercer membre d'aquesta família: EEG1 (*Embryonic Epithelia Gene 1*).

Previ a la descripció de la família SLC43, en un treball del 2001, s'havia identificat la proteïna mitjançant un estudi de cerca de gens regulats diferencialment en un model de desenvolupament del ronyó. Al veure que el RNA missatger s'expressava durant la nefrogènesi epitelial se'l va anomenar gen d'epitelis embrionaris: EEG1 (Stuart *et al.* 2001).

Al 2003, quan ens vàrem plantejar l'estudi de la proteïna i la generació d'un model animal mutant per EEG1, només se'n coneixia la informació genètica disponible a les bases de dades i la hipòtesis de què EEG1 i POV-1 (posteriorment anomenat LAT3) podien tenir un paper rellevant en el transport de nutrients o metabòlits en estadis molt primerencs del desenvolupament o en teixits en creixement. S'ha de comentar també, que més tard, EEG1 en algunes bases de dades apareixia com a transportador putatiu per similitud als altres dos membres de la família.

2.1. Caracterització de EEG1

Generació de plasmidis amb EEG1

Els clons de EEG1 es van obtenir de la llibreria de clons de RZPD, "*Deutsches Ressourcenzentrum fuer Genomforschung GmbH*". El cDNA de hEEG1 (EEG1 humà) procedeix del clon RZPD: IRAUp969D0919D disponible en el vector pOTB7, i el cDNA de mEEG1 (EEG1 murí) del clon RZPD: IRCLp5011E091D en el vector pDONR201. Tots dos clons després de comprovar-se per digestió enzimàtica i seqüència es van subclonar en vectors adequats per l'expressió en sistemes heteròlegs.

El cDNA humà, a partir del clon comercial IRAUp969D0919D i per PCR es van introduir les dianes *NcoI-XhoI* per tal de subclonar-ho al vector pTLN adequat per l'expressió en oòcits de *Xenopus laevis*. A partir d'aquest plasmidi, es va afegir per PCR la diana *EcoRI* a l'extrem 5' del cDNA i es va subclonar a pCNA3 amb les dianes *EcoRI-XhoI*.

A partir del clon comercial IRCLp5011E091D i per PCR es van introduir les dianes *XhoI-EcoRI* al cDNA mEEG1 i es va subclonar al vector pTLB (pTLN amb el

MCS invertit). A partir d'aquesta construcció es va afegir per PCR la diana *HindIII* a l'extrem 5', i es va subclonar a pCDNA3.

EEG1, tercer membre de la família SLC43

Les 2 proteïnes que s'assemblen més a EEG1 són amb una identitat del 28% i 30%, LAT3 i LAT4 respectivament. Com es mostra a l'arbre filogenètic (Fig. 17) aquestes 3 proteïnes formen part de la mateixa família i es diferencien clarament de la resta de transportadors de soluts (SLC). Dins la família SLC43, EEG1 és la més diferent de les 3, ja que LAT3 i LAT4 conserven un 57% d'identitat entre elles.

Entorn genòmic de SLC43A3- Genoma *Homo Sapiens*

El gen SLC43A3 (Solute carrier family 43 member 3) en el genoma humà està localitzat a la regió del cromosoma 11q12.1 al llarg de 20 kilobases i està format per 14 exons, 12 dels quals són codificants i donen lloc a un mRNA de 2867 bp i a una proteïna de 491 aminoàcids amb un pes molecular teòric de 54,5 KDa. El missatger conté un ORF de 1476 pb que comença al tercer ATG (posició 411) i acaba al codó STOP (posició 1886).

Tal com es pot observar en la Fig. 35, SLC43A3 en el genoma humà està flanquejat a l'extrem 3' pel gen PRG2 o MBP2 (Proteoglicà 2 o Major Basic Protein 2) i pel PRG3 (Proteoglicà 3), i a l'extrem 5' pel gen RTN4RL2 (Reticulon 4 receptor-like 2) i el SLC43A1, que codifica per la proteïna LAT3.



Fig. 35 Entorn genòmic de SLC43A3 humà. Imatge obtinguda del cercador genòmic UCSC amb l'assemblatge del genoma humà del març del 2006. Es pot observar el cromosoma 11 i la línia vertical vermella ens indica la posició dels gens ampliatos a sota, que inclou la zona d'entre 56850000-5750000 pb. En vermell es mostra el nostre gen d'interès (SLC43A3), en negre les seqüències que corresponen a una entrada a *Protein DataBank* (PDB), en blau fosc els transcrits que han estat revisats i validats pel personal de *RefSeq* o *SwissProt*, en blau clar possibles transcrits que no estan referenciats per *RefSeq*.

De la figura cal destacar la presència d'un possible gen reconegut per les prediccions gèniques del UCSC que inclouria la seqüència *foap-13*. Apareix com a gen putatiu amb 13 exons, un mRNA de 1637bp i un ORF complet de 1509 bp en el genoma d' *Homo Sapiens*. Si fem una cerca de possibles ESTs que enllacin els

gens SLC43A3 i *foap-13*, només en trobem 3: BU146216, DA832497 i H70271. Les 3 ESTs, tenen una identitat de seqüència amb *foap-13* del 58, el 75 i el 91 % respectivament. Això ens indica, que molt probablement només la última, sigui la responsable de què es pugui considerar *foap-13* com a possible gen. Si analitzem la seqüència de *foap-13*, veiem que és híbrida entre SLC43A3 i PRG2, i que el primer gen aporta 7 exons i el segon 5. D'altra banda, a la base de dades del GenBank, trobem una seqüència altament homòloga (99,4% d'identitat) a *foap-13* amb número d'accés Z26248. Aquesta seqüència, segons una publicació del 1995 (Li *et al.* 1995), és un possible mRNA provinent d'una llibreria de cDNAs construïda a partir de la línia cel·lular HL-60 (leucèmia promielocítica) i dona lloc a un possible segon transcrit del gen PRG2 degut a un *splicing* alternatiu provocat per l'existència d'un segon promotor.

La diferència entre les dues seqüències és petita, però justament la inserció d'una citosina a la posició 493 de *foap-13*, és suficient perquè hi hagi un canvi en la pauta de lectura i això doni lloc a dos cDNAs diferents amb unes mides de 1509 bp, en el cas de *foap-13* i de només 669bp per Z26248, coincidint amb el cDNA de PRG2.

Base de dades	nucleòtid	proteïna	gen
RefSeq	NM_017611	NP_0600081	
	NM_014096	NP_054815	
	NM_199329	NP_955361	
UniProt		A2AVZ9	
SwissProt/		Q9NSS4	
UniProtKB		Q8NBI5	
Ensembl	ENST00000352187	ENSP00000337561	ENSG00000134802
GeneID			29015
HGNC			17466
UniGene			Hs.99962
CCDS			CCDS7956.1
DDBJ	CR457391	CAG33672	
EMBL	BC003163	AAH03163	
ESTs (5 de 405)	CB120199.1		
	AA961674.1		
	AI673440.1		
	AI094295.1		
	BE273848.1		
MGC	BC003163		

Taula 7. Número d'accés a diferents bases de dades per hEEG1.

Si ens tornem a centrar en el gen SLC43A3, a les bases de dades podem veure que consta, a diferència de la seqüència de *foap-13*, com a seqüència referenciada (RefSeq) tant de nucleòtid, com de proteïna; se'n troben unes 400 ESTs, i apareix a diverses bases de dades, com són SwissProt, DDBJ, PubMed, MGC, ENSEMBL, etc..., com a gen completament reconegut i contrastat. A la Taula 7 es mostren els números d'entrada a diverses bases de dades per SLC43A3.

Cal destacar que en diferents bases de dades *foap-13* apareix com a sinònim del gen EEG1, juntament amb SEEEG-1, DKFZp762A227 i PRO1659.

El fet que només es trobi una EST que sigui compatible amb el RNA missatger de *foap-13* i que aquesta contingui un error de seqüència que provoqui l'existència d'aquests transcrit, ens fan pensar que es pot tractar d'una seqüència artefactual. A diferència de SLC43A3, de *foap-13* no se'n troben homòlegs a altres espècies.

Entorn genòmic de SLC43A3- Genoma *Mus Musculus*

L'entorn genòmic de SLC43A3 murí al cercador genòmic UCSC, com es pot observar a la Fig. 36, mostra la presència a 5' dels gens *Rtn4rl2* i SLC43A1 (LAT3), igual que en el genoma humà, i a 3', podem observar els gens *Prg2*, *Prg3* i *P2rx3*.

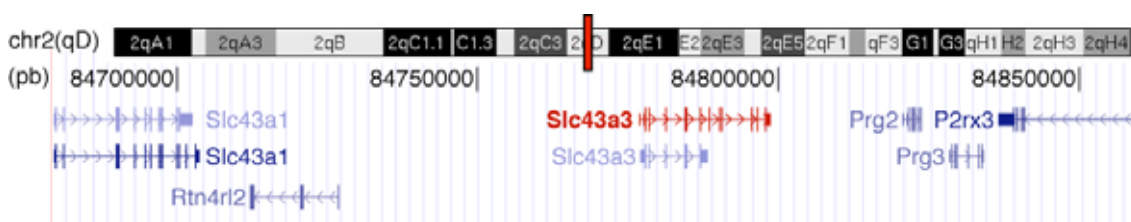


Fig. 36 Entorn genòmic de SLC43A3 murí. Imatge obtinguda del cercador genòmic UCSC amb l'assemlatge del genoma murí del juliol del 2007. Es pot observar el cromosoma 2 i la línia vertical vermella ens indica la posició dels gens ampliat a sota que comprèn la zona d'entre 84700000-84850000 pb. En vermell es mostra el nostre gen d'interès (SLC43A3), en blau fosc els transcrits que han estat revisats i validats pel personal de *RefSeq* o *SwissProt* i en blau clar transcrits que no estan referenciats per *RefSeq*.

El gen SLC43A3 de ratolí està localitzat a la regió del cromosoma 2qD i té una mida de 21846 bases. Al cercador genòmic UCSC apareixen dos transcrits, el referenciat consta de 2591 pb amb 13 exons, 12 dels quals són codificants i generen una proteïna de 502 aminoàcids amb un pes teòric de 56 KDa; i un segon, de 2621 pb i 6 exons, tots codificants. Analitzant a nivell de seqüència, podem veure que el segon transcrit comença amb un exó molt llarg, que es situa en el primer intró de la seqüència del primer (transcrit vermell, Fig. 36), segueix amb els mateixos 6 primers exons codificants i just després del 6è exó no es produeix l'*splicing* i continua el transcrit amb un codó STOP. Això, produeix un transcrit

truncat amb una pauta de lectura de 676 pb i una hipotètica proteïna de 224 aminoàcids.

Com es pot comprovar a la Taula 8 la seqüència referenciada i acceptada a totes les bases de dades és la del transcrit que codifica per la proteïna de 502 aminoàcids. La seqüència truncada, només apareix a la base de dades USCS, com a possible transcrit, i només hi ha una EST (BB663853), que enllaci amb l'extrem 5' i 2 ESTs que no cobreixen tot l'extrem 3', però que hi enllacen. Per aquest motiu, pensem que es tracta d'una seqüència artefactual ja que no està confirmada bioquímicament ni bioinformàticament.

Base de dades	nucleòtid	proteïna	gen
RefSeq	NM_021398	NP_067373	
SwissProt		A2AVZ9	
Ensembl	ENSMUST00000090726	ENSMUSP00000088227	ENSMUSG00000027074
	ENSMUST00000028468	ENSMUSP00000028468	
NCBI	BC089603		
GeneID			58207
HGNC	AF188622		
UniGene			Mm.290729
MGI	1931054		
EMBL	AF188622		
ESTs (4 de 85)	CK331348		
	BU516072		
	CN714038		
	AA220528		

Taula 8. Entrades a diferents bases de dades per mEEG1.

Anàlisi de la seqüència de EEG1.

El gen humà SLC43A3 codifica per una proteïna de 491 aminoàcids i els gens de ratolí i rata per unes de 502 i 499 aminoàcids, respectivament. Les tres proteïnes conserven un alt grau d'homologia entre elles (Fig. 37), concretament, un 76% d'identitat entre la proteïna humana i la de ratolí o rata. El tret diferencial més important és una regió de 17 glutamines seguides, només interrompudes per 2 glutamats, presents en la seqüència murina i de rata.

	1	I	65
<i>Homo sapiens</i> (1)	---MAGQGLPLHVATLLTGLLECLGFAGVLFQWPSLVFVFKNEDYFKDLCGPDAGPIENATGQA		●
<i>Mus musculus</i> (1)	---MASKGFLPYLATLLTGLLECLGFAGVLFQWTSLLVVFKAENYFSEFCEQDCLLQSNVGTGS		
<i>Rattus norvegicus</i> (1)	----MASQLPLLYLATFLTGLLECLGFAGVLFQWTSLLVVFKAENYFLKPCQDCVLLGGNTTGLP		
<i>Bos taurus</i> (1)	----MGRSLPFRVATLVFGLLECLGFAGVLFQWTSLVFVFKKHQHYFEECLDAGSLGNATGLD		
<i>Monodelphis domestica</i> (1)	----MARSQLLLRVATFLTGLLECLGFAGVLFQWTSLVFVFKSDHYFQDLCEQPLNLTGNATGKA		
<i>Takifugu</i> (1)	-MVLFGKNSLVQRCLTFVFGVLECLCFAGAVFGWASLVFVFKSENYFSSLVNTTTS--SNGTQVL		
<i>Dario rerio</i> (1)	MFGCCQDGLRVRSMFLISGLVECLGFAGVFGWASLVFVFKNEGYFSSLCVNTT---INGTAVE		
	66	II	III
<i>Homo sapiens</i> (62)	DGKAQDERFSLIFTLGSFMNNFMTFPTGYIFDRFKTTVARLIAIFFYTCATIIIAFTSAGSAVLL		130
<i>Mus musculus</i> (62)	DLKAQDEKFSLIPTLASFMNNFMTFPTGYIFDRFKTTVARLIAIFFYTCATIIIAFTSANTAMLL		
<i>Rattus norvegicus</i> (61)	DLKAQDEKFSLIPTLASFMNNFMTFPTGYIFDRFKTTVARLIAIFFYTCATIIIAFTSADTAMLL		
<i>Bos taurus</i> (62)	EGRARDERFSLIFTLASFTINFMTFPTGYIFDRFKTTVARLIAIFFYTCATIIIAFTSADSAVLL		
<i>Monodelphis domestica</i> (62)	EGSAQDSKFSLIPTLASFANNFMTFPTGYIFDRFGTTVARLIAIFFYTCATIIIAFTSAGTAPML		
<i>Takifugu</i> (63)	DGSRQDEQFSLVFTTASFMNNFMTLLSGFLFDHFGTMVTRFCAVSYTTATLMLAIGNVGGIMF		
<i>Dario rerio</i> (63)	DGSRQDEQFSLIFTTASFMNNFMTLLSNGFLFDRECGTTVARLLGIVSYSTGMLLIAESTTASSILL		
	131	IV	V
<i>Homo sapiens</i> (127)	FLAMPMLTIG-----GILFLITNLQIGNLFGQHRSTIITLYNGAFDSSSAVFLII		195
<i>Mus musculus</i> (127)	FLAMPMLAVG-----GILFLITNLQIGNLFGKHRSTIITLYNGAFDSSSAVFLVI		
<i>Rattus norvegicus</i> (126)	FLAMPMLAVG-----GILFLITNLQIGNLFGKHRSTIITLYNGAFDSSSAVFLII		
<i>Bos taurus</i> (127)	FLAMPMLAVG-----GILFLITNLQIGNLFGKHRSTIITLYNGAFDSSSAVFLII		
<i>Monodelphis domestica</i> (127)	FAPFPLAVG-----GILFLITNLQIGNLFGKHRSTIITLYNGAFDSSSAVFLII		
<i>Takifugu</i> (128)	LITNNQVWFRHRSRKNKFTDTIWEVTSNVVHTDVTMVGNLFGSRRSTIITLYNGAFDSSALLVI		
<i>Dario rerio</i> (128)	FAPLSFISVIG-----GILFLITNLQIGNLFGTHRSTIITLYNGAFDSSSAVFLII		
	196	VI	★
<i>Homo sapiens</i> (177)	KLLYEKGISLRASEFISVCSVWHIARTFLLMPRGHIPYPLPNYSYGL--CPGNGTTKEEKETA		260
<i>Mus musculus</i> (177)	KLLYEQGISLRSSPISVCSVWHIARTFLLMPRGHIPYPLPNYSYGL--CSRFGASKKENKAA		
<i>Rattus norvegicus</i> (176)	KLLYEQGISLRHSFISVCSVWHIARTFLLMPRGHIPYPLPNYSYGL--CSRFCRKEENAAA		
<i>Bos taurus</i> (177)	KLLYEQGVTIKASFLISVCSVWHIARTFLLMPRGHIPYPLPNYSYGL--CSRDSFPPEEDKKEA		
<i>Monodelphis domestica</i> (177)	KLLYERGLPLRVSFFILCAFSIFHLIRTFFLLMPRGHIPYPLPNYSYGVGYCCKKTKDCALGLDG		
<i>Takifugu</i> (193)	KLLYEGSISLRASFLISLACGVIRLLRTFPLPKKFIYPLPDDTYTGOFFSIVFS-----		
<i>Dario rerio</i> (178)	KLLFEDGVSLQCCFLMACCSVIHLFRTEVLMRTHIRYPLPENYTYGINCGGTQDYTTIAKVEEK		
	261	VII	325
<i>Homo sapiens</i> (240)	EHENRELQSKFPLSAKETPFGAQGK-----ELRSFWSYAFSRPFAHLLVMLSVI		
<i>Mus musculus</i> (240)	EHETKELRSKELPPKEENSGPEQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ--QHSFRRCVSRPFAHLLVMLSI		
<i>Rattus norvegicus</i> (239)	EHETKELQSRQCSPKEENSGPEQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ--QHSFRRCVSRPFAHLLVMLSI		
<i>Bos taurus</i> (240)	ESEKLELQSKFPLSPKKTTPG-----QGG-----APGSFWSHTFSPRFAHLLVMLSVI		
<i>Monodelphis domestica</i> (242)	AISFLSISCSRGAANGSQGKGVVRKEEELRQESSG---AQVSRSCILSRPFAHLLVMLSVI		
<i>Takifugu</i> (249)	-----		
<i>Dario rerio</i> (243)	NIQTSQAREEVAFTESSPQQGQNTNKME-----RSEKSCPLSWPFLWHLLVLSVM		
	326	VIII	390
<i>Homo sapiens</i> (290)	QLWHYLFIGTLNLSLITNMAGGEMARVSTYTNAPAF-TQFGVLCAPWNGLLMDRLKQKQKAEARKT		
<i>Mus musculus</i> (305)	QLWHYLFIGTLNLSLITKESGGDKVEVSAYTNAPAITQFFGVLCAPWNGLLMDRLKQKQKAAKRT		
<i>Rattus norvegicus</i> (302)	QLWHYLFIGTLNLSLITKLAGESVSVKVSAYTNAPAITQFFGVLCAPWNGLLMDRLKQKQKAEARKT		
<i>Bos taurus</i> (288)	QLWHYLFIGTLNLSLITNLASRDSIAVSTYTNAPAVTQFFGVLCAPWNGLLMDRLKHHKQYQAEARKT		
<i>Monodelphis domestica</i> (303)	QLWHYLFIGTLNPMNLQNSNGNQDHVSSPTNAPAITQLFGVLCAPWNGPMLDRLKHHKQYQAEARKT		
<i>Takifugu</i> (249)	-----VLVPLAYVS--R-----YTNAFAITOLCGVLCAPWNGLLMDRHHKGPRAAGE--		
<i>Dario rerio</i> (292)	QLWHYLFIGTLNPMNHETAGDPSLVSRYTNAPAFQLCGIILCAPWNGLLMDRHHKQYQAEARKT		
	391	IX	X
<i>Homo sapiens</i> (354)	GSSRLAVALCSVPSLALTSLLCLGFALCASVPIPLQVLTPILOVIRSFLYGCNAAPFLTLAFL		455
<i>Mus musculus</i> (370)	GSSSEAVALCSMVPSLALTSLLSLGFLALCASIPVMLOYATPILOVVSRSFLYGCNAAPFLTLAFL		
<i>Rattus norvegicus</i> (367)	GLSSEAVALCSMVPSLALTSLLSLGFTLICASIPVIELOYATPILOVVSRSFLYGCNAAPFLTLAFL		
<i>Bos taurus</i> (353)	GAVAKAAALRSVPSLALTSLLSLGFAVCASIPVIELOYATPILOVVSRSFLYGCNAAPFLTLAFL		
<i>Monodelphis domestica</i> (368)	GPPESMADLHCTFPSLALTSLLCLAFSICASIPVIELOYATPILOVIRSFLYGCNAAPFLTLAFL		
<i>Takifugu</i> (295)	--SEREADLRASVLSLFLTALOCVFFSVCATTAYLFOYLTPILOVINRSFLYGCNAAPFISVAFP		
<i>Dario rerio</i> (355)	--SEREADLRASVLSLFLTALOCVLSVCAATPIPLQVLTPILOVLRNRSFLYGCNAAPFISVAFP		
	456	XI	XII
<i>Homo sapiens</i> (419)	SEHFGKLFGLVMALSAVVSLLOFPPIITLIGKSEQNDPFLYVVMIMLAILLTFHPFLVYRECRW		520
<i>Mus musculus</i> (435)	SEHFGKLFGLVMALSIAVSLLOFPFLKVSF-----ESNAVYVSMGLAIFLTLVHPFLVYRECRAE		
<i>Rattus norvegicus</i> (432)	SEHFGKLFGLVMALSIAVSLLOFPFLKVSF-----ESKAVYVSMGLAIFLTLVHPFLVYRECRVE		
<i>Bos taurus</i> (418)	SEHFGKLFGLVMALSAVVSLLOFPPIITLIGKSEQNDPFLYVVMIMLAILLTFHPFLVYRECRK		
<i>Monodelphis domestica</i> (433)	SEHFGKLFGLVMALSALVTLLOFPPIITLIGKPLQGNFLYVVMIMLAILLTFHPFLVYRECRK		
<i>Takifugu</i> (358)	SCHFGKLYGMVLAALSAPVLLQYPCFALVKGALNGDPLVYVNIATLTVSLAIFHPFLVYVYLCRKL		
<i>Dario rerio</i> (418)	SVHEGKLYGTVMALSAVVSLLOFPPIITLIGKSEQNDPFLYVVMIMLAILLTFHPFLVYVYVYLCRRO		
	521	533	
<i>Homo sapiens</i> (404)	KESPSAIA-----		
<i>Mus musculus</i> (495)	KTKSSVDA-----		
<i>Rattus norvegicus</i> (492)	KTKPSVDA-----		
<i>Bos taurus</i> (483)	ESPREVA-----		
<i>Monodelphis domestica</i> (493)	-----		
<i>Takifugu</i> (423)	SSQRGASGSY---		
<i>Dario rerio</i> (403)	AAQRRAAKKTSSS		

Fig. 37 Multialineament de 6 seqüències de EEG1 de diferents espècies. Alineament realitzat amb el programa *AlignX* (Vector *NTI Advance 9*, Invitrogen) i l'algoritme *ClustalW*. Les línies horitzontals indiquen la posició dels 12 segments transmembrana predits per la proteïna EEG1. Els aminoàcids idèntics estan marcats amb caixes grises. També s'assenyalen els possibles llocs de *N*-glicosilació amb un cercle negre, els de fosforilació amb una P dins una caixa negra i amb un asterisc s'indica la posició del codó STOP prematur del ratolí Y221STOP (Y221*, detallat a l'apartat de resultats 2.2).

Pel que fa a altres homòlegs, a les bases de dades en trobem de la majoria de mamífers i peixos. Buscant en el genoma de llevats (*S.cerevisiae*) sols es troba una seqüència amb un 28% d'identitat amb els 3 membres de la família SLC43.

Seguint amb l'anàlisi de seqüència, la proteïna EEG1 segons les prediccions de topologia està composta per 12 segments transmembrana amb els extrems NH₂ i COOH terminals intracel·lulars. Vam analitzar els possibles llocs de glicosilació mitjançant els algorismes *NetNGlyc 1.0* i *NetOGlyc 3.1*, que ofereix la Universitat de Denmark, i vam observar que hi ha dos llocs putatius de *N*-glicosilació (N56 i N220 en mEEG1) i cap de *O*-glicosilació. Utilitzant *NetPhosK 2.0*, es prediuen dos possibles llocs de fosforilació a les posicions S248 i S253 tal com estan indicats a la Fig. 37.

Localització tissular

Una vegada identificat i analitzat el gen a nivell de seqüència, vam voler avaluar on s'expressava el mRNA de EEG1 en teixits humans i de ratolí.

L'anàlisi de northern blot de EEG1 humà, revela l'existència d'un sol transcrit d'aproximadament 2,8 Kb (Fig. 38A) que s'expressa principalment en fetge i cor, i en menor grau a pulmó, placenta, melsa, ronyó, colon, intestí prim i leucòcits de sang perifèrica.

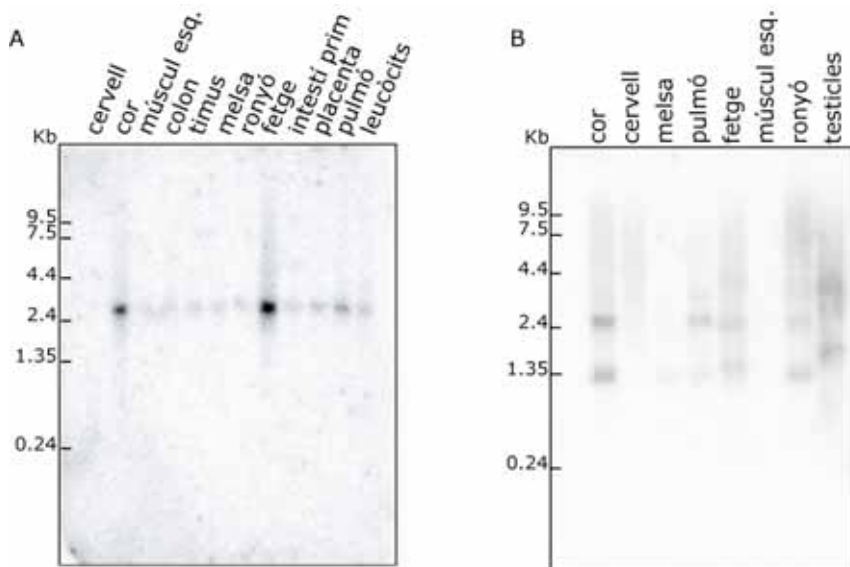


Fig. 38 Anàlisi del mRNA de EEG1 per northern blot. **A)** Membrana que conté 12 poli(A)⁺RNAs de diferents teixits humans. La hibridació es va realitzar amb una sonda del fragment de cDNA humà que comprèn els nucleòtids 1 al 600. **B)** Membrana que conté RNA provinent de 8 teixits de ratolí diferents, i que es va hibridar amb una sonda generada a partir del cDNA de EEG1 de ratolí (683-1603 bp). El procediment es va realitzar tal com es descriu al peu de la Fig. 20.

El northern blot de RNA de teixits de ratolí, mostra l'existència de dos transcrits de 1,3 i 2,5 Kb, aproximadament (Fig. 38B). Els teixits que presenten major expressió són cor, fetge, pulmó, ronyó i testicle. També s'ha comprovat aquest resultat per RT-PCR semiquantitativa revelant un patró d'expressió semblant a l'obtingut per northern blot (Fig. 39).

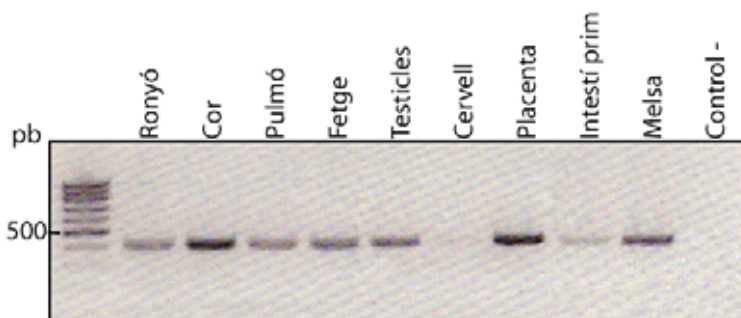


Fig. 39 Anàlisi del mRNA de EEG1 per RT-PCR. A partir del RNA de diferents teixits de ratolí s'ha sintetitzat cDNA per tal de portar a terme una RT-PCR. S'han utilitzat els encebadors F2 (nucleòtids 254-277) i R5 (nucleòtids 643-663) de mEEG1, i s'ha valorat l'aparició del producte de 409 bp. Els dos teixits on més s'expressa són cor i placenta, en menor grau a ronyó, pulmó, fetge, testicles i melsa. No s'observa expressió a cervell ni al control negatiu (on a la reacció de PCR s'ha substituït el cDNA per aigua).

Estudi de la possible funció com a transportador d'aminoàcids

Com ja s'ha comentat, el fet que els altres dos membres de la família SLC43, LAT3 i LAT4, siguin transportadors d'aminoàcids, ens va fer partir de la idea de què EEG1 també ho fos.

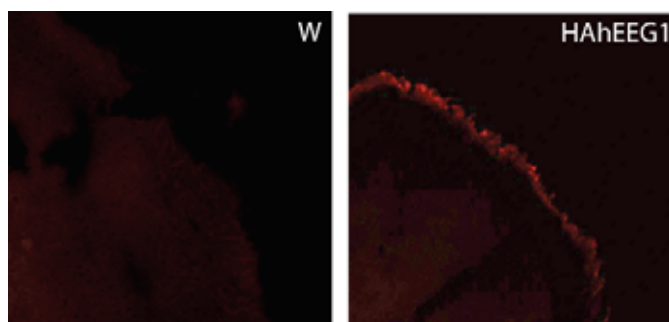


Fig. 40 Localització de la proteïna de fusió hEEG1HA a la membrana d'oòcits de *Xenopus*. Els panells mostren la immunocitoquímica d'oòcits injectats amb aigua (W) i amb la proteïna de fusió HAhEEG1. Dos dies després de la injecció, es va realitzar la immunofluorescència utilitzant anti-HA com a anticòs primari i un anticòs secundari conjugat a *Texas Red* per donar la fluorescència vermella. La immunodetecció ens mostra senyal específica a la membrana plasmàtica dels oòcits injectats amb la proteïna de fusió.

Per aquest motiu, vam expressar la proteïna humana fusionada a l'epítip de l'hemaglutinina del virus de la grip (HA), en oòcits de *Xenopus Laevis* per tal de

comprovar en primer lloc, si era capaç d'arribar a la membrana plasmàtica i en segon lloc, saber si transportava algun dels aminoàcids radioactius dels quals disposàvem. Com es pot veure en la Fig. 40, la immunocitoquímica d'oòcits injectats amb aigua, no mostren marcatge fluorescent al contorn de l'oòcit i sí que es detecta senyal en els oòcits injectats amb la proteïna EEG1-HA.

Com que la proteïna és capaç d'arribar a la membrana plasmàtica de l'oòcit, continuava essent possible que estiguéssim davant d'un nou transportador d'aminoàcids de la membrana plasmàtica. Per aquest motiu, vam assajar l'entrada d'aminoàcids marcats radioactivament a través de la membrana de l'oòcit. Com es pot veure en la Fig. 41, no hi ha cap aminoàcid que indueixi activitat de transport.

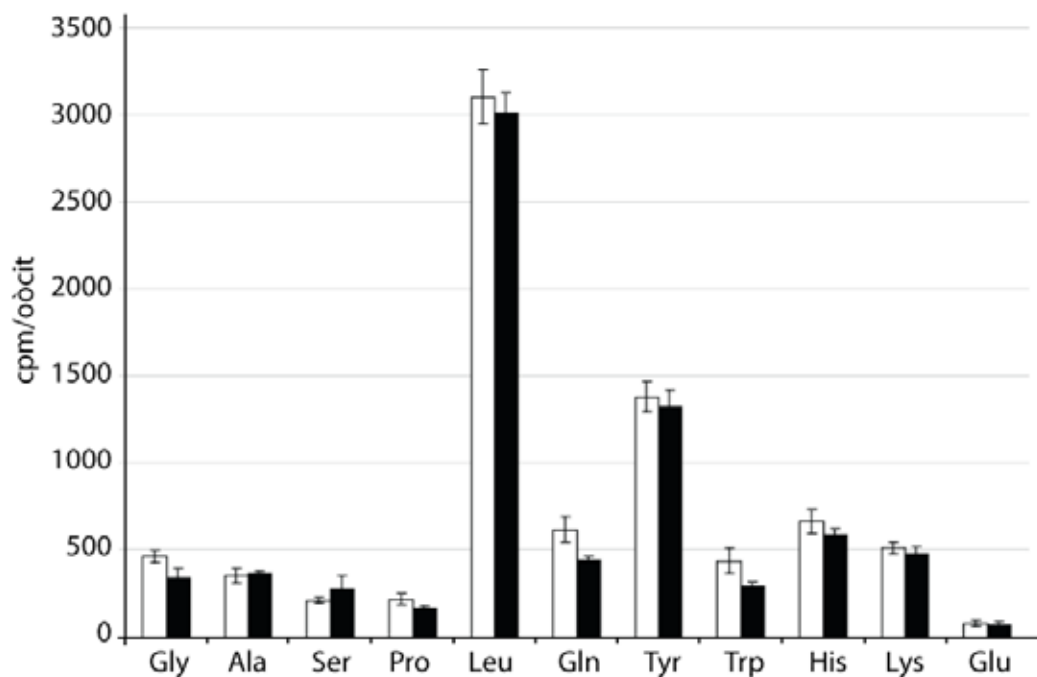


Fig. 41 Assaig de transport de EEG1 en oòcits de *Xenopus*. Els oòcits es van injectar amb aigua (barres blanques) o amb el cRNA humà de EEG1 (barres negres). Dos dies després de la injecció es va mesurar l'entrada de ^3H -aminoàcid a una concentració de $10 \mu\text{M}$ durant 10 minuts. No s'observa inducció de transport amb cap dels substrats radioactius testats. Les dades (mitjana \pm S.E.) corresponen a un mínim de 4 experiments.

Generació d'un anticòs contra mEEG1

Per continuar la caracterització de EEG1, ens vam plantejar la generació d'un anticòs contra la proteïna. Es va optar per la producció d'un anticòs policlonal contra una mescla de dos pèptids immunogènics injectats en conill. Es va escollir el procediment "*DoubleX protocol*" de l'empresa Eurogentec (veure Generació d'anticossos a l'apartat de materials i mètodes, pàgina 102) que consisteix en la co-injecció dels dos pèptids degut perquè les probabilitats d'èxit augmenten. En

aquest cas també es va variar el protocol introduint una injecció addicional de pèptid amb la finalitat de millorar la resposta obtinguda.

Els pèptids es van dissenyar sotmetent la seqüència proteica murina de EEG1 a diferents algoritmes accessibles des de pàgines web com la d'*Alpha Diagnostics* (www.4adi.com) i consultant a diferents cases comercials com EvoQuest (Eurogentec). Els criteris utilitzats per la identificació de les zones més immunogèniques de la proteïna són principalment d'hidrofobicitat, d'antigenicitat i d'accessibilitat. També és important comprovar que els pèptids escollits siguin específics per la proteïna d'interès i no enllacin amb altres proteïnes.

En el nostre cas, vam escollir dos pèptids de 15 aminoàcids que es mostren a la Fig. 42. A la seqüència específica del EEG1, es va introduir una cisteïna a la part amino terminal perquè es pogués conjuguar químicament a la proteïna de grans dimensions KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin). Al no tractar-se de l'extrem carboxi terminal de la proteïna es va optar per acabar els pèptids amb CONH₂ i no COOH.

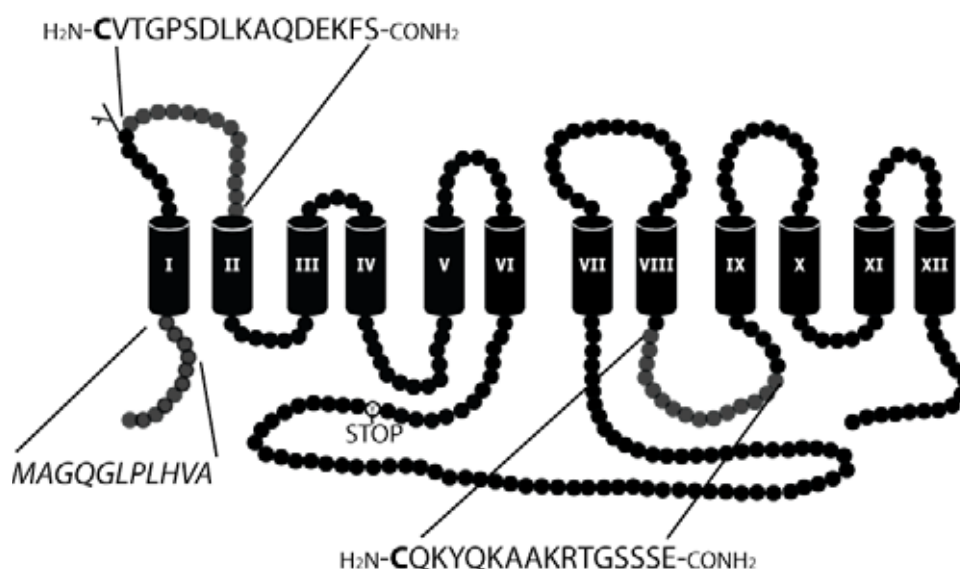


Fig. 42 Predicció topològica d'EEG1 murí i localització dels pèptid antigènics. Es mostren els 12 segments transmembrana predits i amb boles els aminoàcids dels bucles que connecten aquests segments. Les boles grises representen els aminoàcids contra els que s'han generat els sèrums. En lletres cursives es mostra la seqüència del pèptid de l'anticòs contra la proteïna humana (cedit pel Dr.Kanai) i en normal els dos pèptids corresponents a la proteïna murina. En aquest últim cas, a l'extrem amino terminal, es marca en negreta la cisteïna afegida. S'indica amb una bola blanca i un STOP, la tirosina que trunca la proteïna en el model murí EEG1-Y221* (descriu més endavant).

En aquesta tesi també s'ha disposat d'un anticòs cedit pel Dr. Yosikatsu Kanai que han utilitzat per la immunohistoquímica de ronyó. L'anticòs utilitzat s'ha generat contra un pèptid de la regió NH₂ terminal de la proteïna EEG1 humana (Fig. 42).

Detecció de la proteïna

Els sèrums obtinguts dels conills 2963 i 2964, van ésser testats i posats a punt per comprovar l'especificitat per reconèixer la proteïna mitjançant la tècnica de western blot.

Per a les primeres proves, vam utilitzar mostres d'extractes de proteïnes totals de cèl·lules HeLa que sobreexpressaven mEEG1. Vam testar les mostres en diferents condicions de dilució de sèrum, temperatura, temps d'incubació dels sèrums, concentració de detergents i temperatura dels rentats, etc...

Les proves amb el sèrum de la primera sagnia revelaven l'existència de moltes bandes inespecífiques. El segon bloc de proves amb el sèrum procedent de la segona sagnia, ja ens van permetre detectar la proteïna sobreexpressada en la línia cel·lular HeLa. Com podem veure en la Fig. 43, mEEG1 apareix com una banda ample d'uns 65 KDa al carril de l'extracte de proteïnes totals de cèl·lules HeLa que sobreexpressen mEEG1. Podem observar que la mateixa membrana incubada amb el sèrum pre-immune del mateix conill (2963) no revela cap banda a la mateixa zona i que una mostra d'extracte de proteïnes totals de cèl·lules HeLa que sobreexpressen mEEG1HA incubada amb l'anticòs primari anti-HA revela una banda a la mateixa alçada que la de l'anticòs α 2963. Els sèrums del conill 2964 no van revelar cap banda específica.

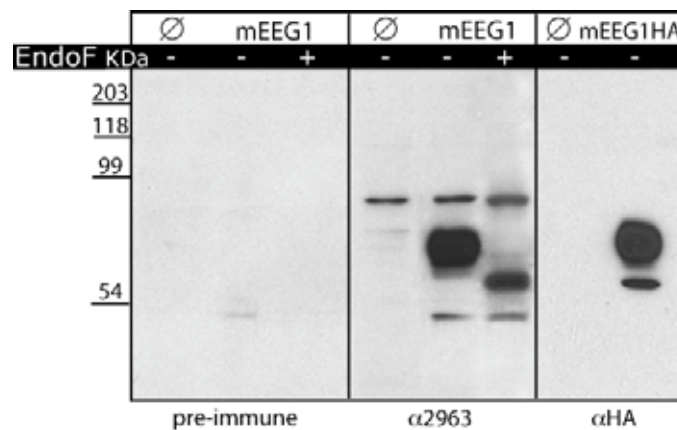


Fig. 43 Western blot de mostres que sobreexpressen mEEG1. Es mostren 3 membranes que contenen 30 μ g d'extracte de proteïnes totals de cèl·lules HeLa sense transfectar (\emptyset), cèl·lules transfectades amb mEEG1 (mEEG1) i mEEG1 amb l'epítol HA (mEEG1HA), per carril. Les mostres han estat tractades (+) o no (-) amb Endo F. Cada membrana ha estat incubada amb diferents anticossos : la primera amb el sèrum pre-immune, la segona amb el sèrum de la 2ona. sagnia del conill 2963 (α 2963) i la tercera amb l'anticòs anti-HA (α HA). La incubació de la membrana amb el sèrum α 2963 ens permet detectar una banda ample específica sense el tractament amb endoF i que es converteix en una banda discreta d'uns 56 KDa amb el tractament amb la endoglicosidasa. La membrana incubada amb l'anticòs anti-HA revela una banda a la mateixa alçada que l'anterior, confirmant que es tracta de la mateixa proteïna.

La mostra d'extracte total de proteïnes que sobreexpressa mEEG1 tractada amb l'enzim PNGase (EndoF) que desglicosila la proteïna, provoca la desaparició de la banda ample i l'aparició d'una nova banda de 56 KDa aproximadament. L'amplitud de la banda sense el tractament enzimàtic i la caiguda d'aquesta amb la digestió amb EndoF, ens indiquen que mEEG1 és una proteïna *N*-glicosilada tal com s'havia predit en els estudis "*in silico*".

Les condicions òptimes que es van establir per la detecció de la proteïna per western blot amb aquest sèrum han estat les següents:

Extracció proteica amb solubilització amb el tampó RIPA, incubació de les mostres a 37°C durant 10 minuts abans de carregar-les al gel d'acrilamida, dilució del sèrum a 1/500 amb tampó PBS i llet en pols descremada al 5%. La incubació del sèrum ha estat durant 1 h a temperatura ambient (la solució d'anticòs es suplementa amb azida sòdica al 0,02 % per tal d'endarrerir el creixement bacterià). Pels rentats es va escollir *Tween*-20 al 0,1% en PBS, la incubació amb anticòs secundari anti-conill a una dilució de 1/25000 i revelat amb detecció quimioluminiscent utilitzant ECLTM a *Fujifilm* LAS-3000.

El següent pas va ser intentar detectar la proteïna endògena en diferents teixits de ratolí. El disposar dels animals EEG1Y221* (Tirosina 221 convertida en STOP, Fig. 10), els quals es descriuran més endavant, que no han d'expressar la proteïna, ens va facilitar la posada a punt ja que disposàvem de control negatiu.

Altra vegada es van realitzar diverses proves amb els sèrums de què disposàvem, tant pel que fa a dilucions d'anticòs, com tots els altres paràmetres que s'han comentat anteriorment. Al no obtenir senyal específica en cap condició, es va optar per enriquir la mostra en la fracció on sabíem que es localitzava la proteïna, les membranes; i també per purificar els sèrums mitjançant dues estratègies: cromatografia d'afinitat on a la resina hi ha unit el pèptid o la proteïna A. En el nostre cas, el millor resultat el vàrem obtenir amb la purificació de l'anticòs contra el pèptid.

Les condicions òptimes per la detecció de la proteïna mEEG1 endògena, són una dilució 1/1000 en PBS i llet descremada en pols al 5% de l'anticòs α 2963 purificat per el pèptid (57-71 aa) i una incubació durant tota la nit a 4°C.

Es va intentar detectar la proteïna en tots els teixits, i especialment als que havíem vist per Northern blot que expressaven el missatger de EEG1. Només ha estat possible detectar la proteïna mEEG1 endògena a ronyó, fetge i pulmó (Fig. 44). En el cas de cor i melsa hi havia gran nombre de bandes inespecífiques a la zona d'entre 40-60 KDa que impedièren distingir la proteïna d'interès.

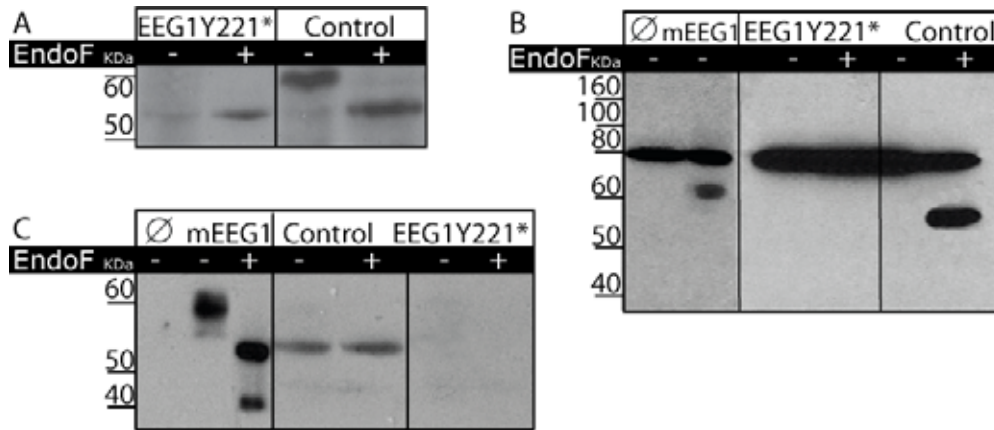


Fig. 44 Detecció de la proteïna mEEG1 endògena de teixits de ratolí per western blot amb l'anticòs α 2963 purificat. A) Pulmó. Western blot amb 100 µg de membranes totals de pulmó d'animal mutant (EEG1Y221*) o control, tractades (+) o no (-) amb Endo F, per carril. **B) Fetge.** Els 2 primers carrils contenen 5 µg d'extractes totals de proteïnes de cèl·lules HeLa sense transfectar (Ø) i que sobreexpressen mEEG1 sense pre-tractament amb EndoF. Els següents carrils corresponen a 100 µg de membranes totals de fetge d'animals mutants (EEG1Y221*) o control, tractades amb (+) o sense (-) Endo F. **C) Ronyó.** Western blot on es mostren 3 panells. Els tres primers carrils corresponen a 5 µg d'extractes totals de proteïnes de cèl·lules HeLa sense transfectar (Ø) i que sobreexpressen mEEG1 tractats (+) o no (-) amb EndoF. Els 4 següents carrils corresponen a 100 µg de membranes totals de ronyó d'animals Control o Mutants (EEG1Y221*) tractades amb (+) o sense (-) Endo F. Som capaços de detectar la proteïna glicosilada a membranes de pulmó i la proteïna desglicosilada a membranes de fetge i ronyó. Les bandes no s'observen a l'animal mutant EEG1Y221* i l'alçada de la banda correspon a la mateixa que es detecta en cèl·lules HeLa que sobreexpressen mEEG1.

En els 3 teixits que es va aconseguir detectar la proteïna, vam comprovar que en cap cas apareixia la proteïna a l'animal mutant (EEG1Y221*) i sí que ho feia a l'animal control. Tot i això, cal mencionar una banda d'uns 54 KDa en el western de pulmó de l'animal EEG1Y221*, que coincideix amb la de l'animal control. Creiem que ha de ser deguda a una banda inespecífica, ja que s'intensifica a l'animal control i només s'observa a la posició de la proteïna desglicosilada i no a la proteïna glicosilada.

Una diferència interessant entre els 3 teixits és el diferent comportament de la proteïna al tractament amb PNGase F. Mentre que en el pulmó es diferencia clarament la desaparició i aparició de la banda glicosilada i desglicosilada amb el tractament amb l'enzim, en el cas del ronyó la proteïna apareix desglicosilada independentment del tractament enzimàtic. Finalment, en el cas del fetge, només som capaços de detectar la proteïna sense glicosilacions.

Una vegada caracteritzada l'expressió de la proteïna per Western blot, ens vam plantejar testar l'anticòs generat per tal de ser utilitzat en immunofluorescència. En primer lloc, volíem confirmar que la proteïna arribés a la membrana plasmàtica en cèl·lules HeLa. Per tant, es van posar a punt les

condicions per obtenir la millor detecció en la localització de la proteïna ajustant la dilució d'anticòs. Tal com es pot apreciar a la Fig. 45 la proteïna es localitza principalment a la membrana plasmàtica de la cèl·lula i tot i que també hi ha un acumul de fluorescència a un espai proper al nucli, on es podria localitzar el reticle endoplasmàtic. Aquest últim fenomen pot ser degut a la sobreexpressió de la proteïna.

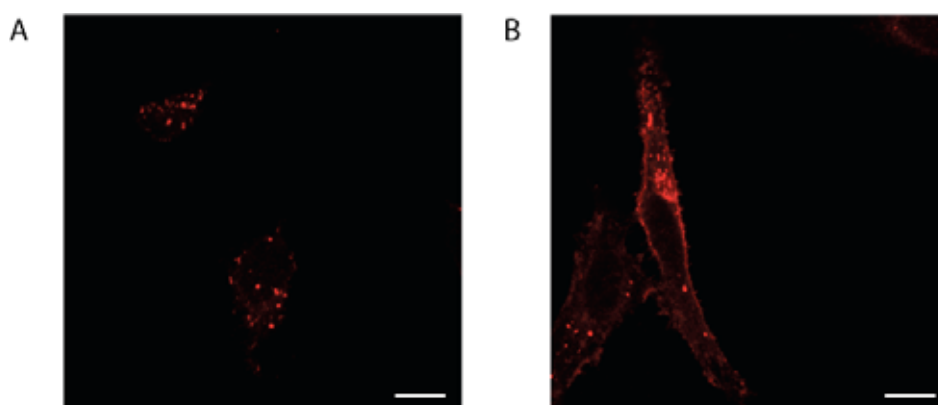


Fig. 45 Detecció de la proteïna mEEG1 sobreexpressada en cèl·lules HeLa. L'anàlisi de microscòpia de fluorescència confocal es va realitzar amb cèl·lules HeLa sense transfectar (A) i amb cèl·lules HeLa que sobreexpressaven mEEG1 (B). Les cèl·lules es van transfectar per el mètode del fosfat càlcic, fixar, bloquejar, permeabilitzar i incubar amb una dilució 1:200 de l'anticòs purificat amb el pèptid α 2963, i posteriorment amb un anticòs secundari unit al fluorocrom *Texas Red*. Es pot observar un marcatge fluorescent específic a la membrana plasmàtica de les cèl·lules HeLa que sobreexpressen mEEG1. Barra d'escala: 10 μ m.

També es va testar l'eficàcia de l'anticòs per detectar la proteïna en teixits de ratolí, però els resultats van ser negatius. L'única imatge de què disposem, pel que fa a immunohistoquímica de la proteïna, és la cedida pel laboratori del Dr. Yosikatsu Kanai. A la Fig. 46, es mostra la localització subcel·lular de hEEG1 a les cèl·lules del ronyó humà obtinguda utilitzant un anticòs generat per el grup del Dr. Kanai contra el pèptid de la regió amino terminal de la proteïna (Fig. 42). La proteïna en el còrtex del ronyó humà es localitza als túbuls proximals contornejats i no en els glomèruls ni els túbuls distals. En la imatge a més augments, es pot apreciar la localització subcel·lular de la proteïna a la membrana basolateral dels túbuls proximals.

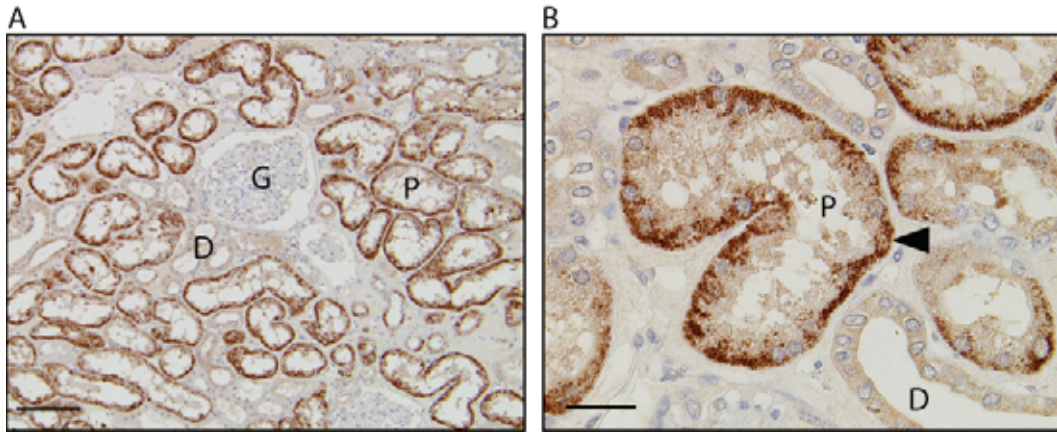


Fig. 46 Localització de hEEG1 en el ronyó humà. El resultat de la immunohistoquímica de còrtex de ronyó es mostra a baixos (A) i alts (B) augments. Es poden apreciar els glomèruls (G), els túbuls distals (D) i els proximals contornejats (P). Seccions parafinades de 3 µm de ronyó humà es van tenyir incubant amb la solució d'anticòs anti-NhEEG1 a 1 µg/ml durant 2 dies a 4°C i posteriorment durant 30 minuts amb peroxidasa de conill Envision-(+). La immunoreacció es va detectar amb diaminobenzidina 0.8 mM. Es pot observar marcatge als túbuls proximals del còrtex de ronyó humà i a nivell subcel·lular a la cara basolateral d'aquests indicat amb una fletxa. Resultats no publicats i cedits pel Dr. Kanai. Barra A: 100 µm i barra B: 25 µm.

2.2. Generació i fenotipació de la colònia mutant per EEG1.

Des de què al 2003 es completés el Projecte del Genoma Humà, s'ha generat tal quantitat d'informació a nivell genòmic que ha provocat un canvi en l'enfocament de la biomedicina en general. A l'actualitat, per tal d'esbrinar la funció de gens desconeguts, una de les eines més eficients és la generació de models murins defectius per un gen.

En el nostre cas, sabent que EEG1 forma part de la família transportadors d'aminoàcids SLC43, que tant el seu missatger com la proteïna s'expressen i es localitzen a ronyó, vam partir de la idea de què EEG1 també podia ser un transportador d'aminoàcids i estar involucrat en la reabsorció renal d'aminoàcids. Vam tenir en compte que l'assaig de transport en oòcits de *X. Laevis* amb els aminoàcids radioactius de què disposàvem al laboratori havia estat negatiu, però això no ens descartava una possible funció com a transportador, ja que podia faltar una segona proteïna o un activador necessari per a la correcta expressió funcional en sistemes heteròlegs. Amb l'objectiu d'esbrinar quin paper fisiològic tenia EEG1, ens vam plantejar la creació d'un model murí mutant per EEG1.

La generació del model mutant la va portar a terme l'empresa *Ingenium Pharmaceuticals* amb la tecnologia *INGENOTYPING* gràcies a la participació en el projecte europeu EUGINDAT. La metodologia utilitzada es basa en l'exposició d'un ratolí a l'agent químic altament mutagènic *N*-etil-*N*-nitrosurea (ENU) i el posterior anàlisi de les mutacions generades a l'atzar. Afortunadament, en l'anàlisi de

mutacions per els membres de la família SLC43, es va detectar la mutació d'una C a una A en el gen SLC43A3 que en la proteïna provocava el canvi de la tirosina de la posició 221 a un codó Stop, truncant la proteïna entre els segments transmembrana VI i VIII (Veure generació de la colònia EEG1Y221* a materials i mètodes i Fig. 10). Pel que fa a SLC43A2, es van detectar 4 mutacions que no van provocar la desaparició de l'activitat de transport associada a la LAT4 i per tant, es va descartar la generació del model murí (Apèndix 2).

Fenotipació

La soca escollida per la generació de la colònia va ser la C3HeB/FeJ. En primer lloc per la bona reproductibilitat amb el tractament mutagènic i en segon lloc, perquè permet una revitalització eficient de l'esperma congelat del ratolí exposat (Augustin *et al.* 2005). Els ratolins C3HeB/FeJ tenen un pelatge de color marró clar (*agouti*), en general tenen un nombre alt de cries per part (mitjana de 6,7) i també tenen un pes una mica superior a la mitjana.

El primer pas en rebre els animals G2 (generació 2) heterozigots (+/Y221*), va ser creuar-los entre si per saber si els homozigots eren capaços de sobreviure, ja que tal com indica el seu nom, EEG1 (Embryonic Epithelia Gene 1) podria tenir un paper important en l'embriogènesi i fer que els homozigots (Y221*/Y221*) no fossin viables.

Els homozigots són viables i fèrtils, indistingibles dels heterozigots i salvatges d'una mateixa ventrada. No hi ha mortalitat embrionària i el nombre de cries per part provinent del creuament d'animals homozigots, heterozigots o control, és d'una mitjana de 6 en tots els casos.

	C3HeB/FeJ(+/Y221*) x (+/Y221*)			
Genotip	+/+	+/-	-/-	TOTAL
Observat	13	30	12	55
Esperat	14	28	15	55
	25%	50%	25%	100%
χ^2	0,491 amb 2 graus de llibertat			

Taula 9. Herència Mendeliana i anàlisi χ^2 . Dades dels diferents genotips de les cries de 10 creuaments d'heterozigots (+/Y221* X +/Y221*). Es mostra els resultats observats, els esperats i el càlcul de χ^2 obtingut. El valor de P amb 2 cues és de 0,7823 per tant, es pot dir que la diferència entre els valors observats i esperats no és estadísticament significativa.

Si ens fixem en la distribució de genotips en els casos de creuaments entre heterozigots, observem que segueixen una herència Mendeliana (Taula 9) i que segons el test de χ^2 la diferència entre els resultats observats i els esperats no és estadísticament significativa.

La segon punt que vam analitzar va ser el seu pes, ja que ens podria indicar algun desordre metabòlic. Tal com es veu en la Fig. 47, en totes les franges d'edat, els animals no pesen significativament diferent. El que sí podem observar és un lleuger augment de pes en les femelles de major edat respecte les mutants (Y221*), tot i que cal tenir en compte que els últims punts s'han obtingut amb un baix nombre d'animals.

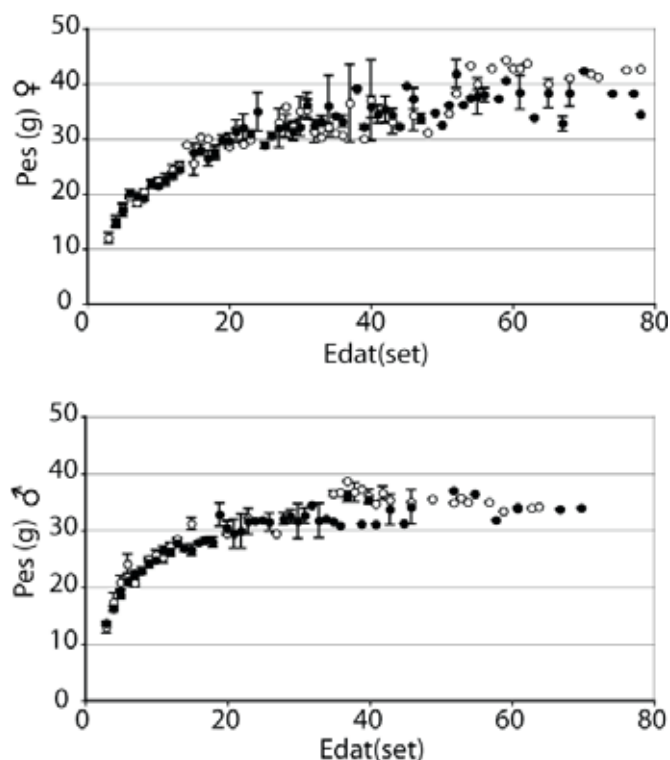


Fig. 47 Corba de creixement. Es mostren dos gràfics corresponents a les representacions de l'evolució dels pesos en grams dels ratolins en funció de l'edat en setmanes. Les dues corbes de creixement estan separades per sexes (femelles ♀ i mascles ♂) i a cadascun, els cercles buits representen els animals control i els cercles negres als animals mutants Y221*. S'han realitzat les corbes amb un número d'entre 35 a 40 animals per grup (mascle o femella i control o Y221*).

Seguint amb l'anàlisi general i amb la hipòtesis de què la proteïna EEG1, podria tenir un paper en la reabsorció d'aminoàcids, ens vam plantejar la utilització de gàbies metabòliques per tal d'obtenir orina per l'anàlisi d'aminoàcids. Això però, també ens va permetre analitzar els paràmetres d'ingesta d'aliment, aigua beguda, quantitat d'excrement i d'orina durant 24 hores. Les dades que es mostren a la Fig. 48, s'han obtingut d'un conjunt de 115 ratolins, entre controls i mutants EEG1-

Y221* dels dos sexes i en una franja d'edat d'entre 8 i 20 setmanes, que s'han tingut en una gàbia metabòlica individual durant una setmana. Les primeres 48 hores són d'aclimatació de l'animal al nou entorn i a les següents 48 h s'han recollit les dades mostrades en dues rondes successives de 24 hores cadascuna. Per cada ratolí s'ha calculat la mitjana dels dos dies per obtenir el punt representat a la gràfica.

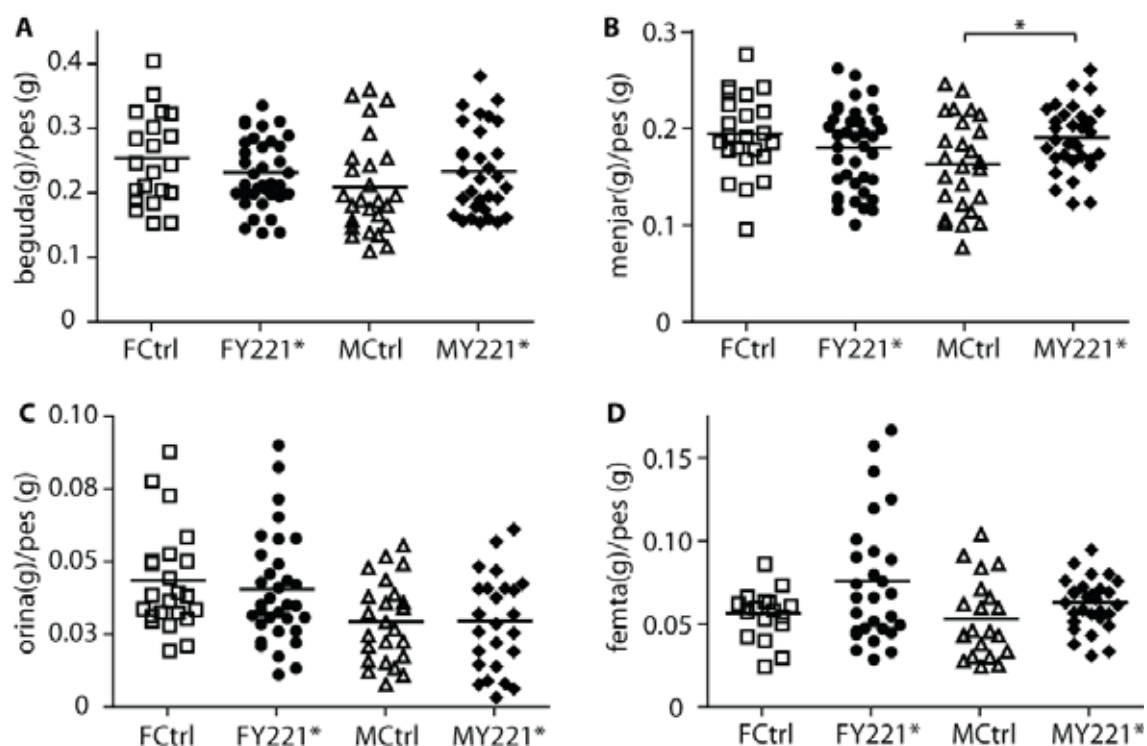


Fig. 48 Dades metabòliques per sexes. Valors obtinguts per els quatre paràmetres mesurats, separat per sexes i per genotip dels animals. Les femelles control (FCtrl) es representen amb quadrats buits, les femelles mutants (FY221*) amb cercles plens, els mascles control (MCtrl) amb triangles buits i els mascles mutants (MY221*) amb rombes plens. Una línia horitzontal indica la mitjana dels valors. En la gràfica A es mostra la quantitat d'aigua beguda per cada animal en funció del seu pes en grams, en la gràfica B la quantitat de menjar ingerit, en la gràfica C l'orina i en la gràfica D la femta excretada. Els valors s'han obtingut d'un promig d'entre 18 i 38 ratolins per grup.

Com es pot observar no hi ha diferències significatives pel que fa a cap dels paràmetres mesurats separat per sexes, excepte en el menjar ingerit pels mascles. Els mascles control han ingerit $0,162 \pm 0,009$ g ($n=26$) i els mutants $0,190 \pm 0,006$ g ($n=32$), valors significativament diferents amb un valor de $p < 0,05$ en un test t de dues cues.

Histologia bàsica

Per tal d'avaluar l'estat dels òrgans dels diferents animals de la colònia EEG1Y221* es van realitzar tincions d'hematoxilina-eosina en preparacions de talls

de teixits prèviament inclosos en parafina. La histologia s'ha portat a terme amb animals perfosos transcordialment. S'han analitzat teixits d'animals en una àmplia franja d'edat (6-28 setmanes) i tant mascles com femelles, per tal d'intentar detectar qualsevol alteració independentment de l'edat o al sexe de l'animal.

De tots els teixits que s'han analitzat, no s'han trobat lesions o alteracions significatives a nivell histològic al cervell, pulmó, teixit adipós blanc, bufeta, estómac, testicles, cor ni intestí (Fig. 49).

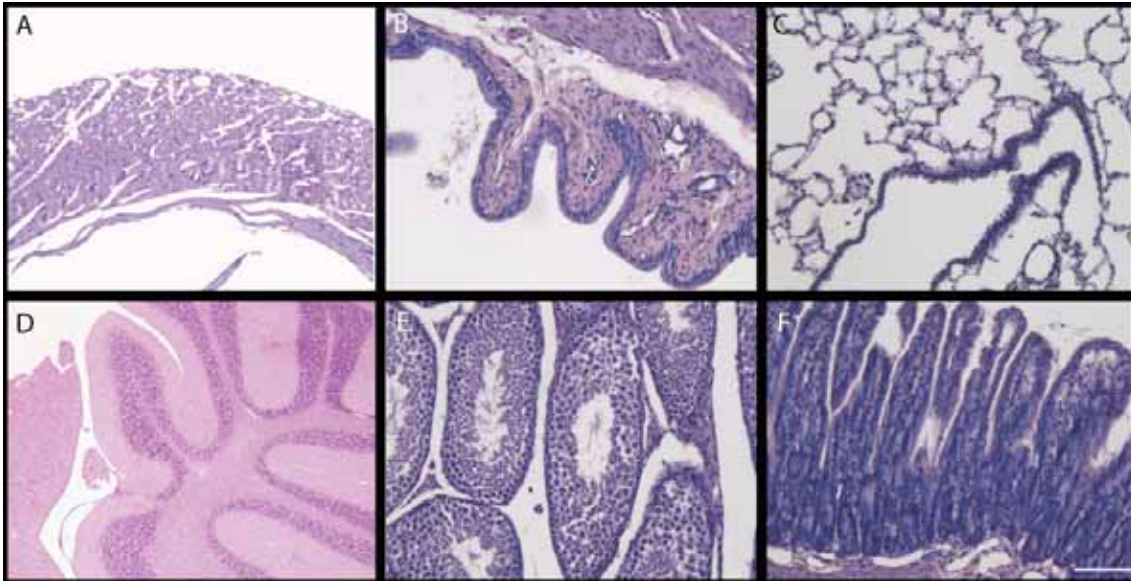


Fig. 49 Tinció d'hematoxilina-eosina de diferents teixits de ratolins EEG1Y221*. Seccions de 5 µm de teixit inclosos en parafina s'han tenyit amb hematoxilina i eosina. Els panells corresponen a cor (A), bufeta (B), pulmó (C), cervell (D), testicle (E) i intestí (F) d'animals mutants EEG1Y221*. No s'observa cap alteració patològica en els teixits mostrats. Barra 100 µm.

Pel diagnòstic histopatològic s'ha comptat amb l'ajuda d'experts com la Dra. Joana Visa responsable del servei d'Estabulari del l'IDIBELL, el Dr. Miquel Borràs, cap d'àrea i en Joaquim de Lapuente, experimentador de la Unitat de Toxicologia Experimental i Ecotoxicologia del Parc Científic de Barcelona.

Pel que fa a la melsa, en dos (de 10) animals, el teixit esplènic presentava una marcada reactivitat del parènquima limfoide. En un dels 10 animals analitzats, es va observar esplenomegàlia degut a una hipertròfia de la polpa roja i apoptosi limfocitària (*starry sky*)(resultats no mostrats).

El teixit hepàtic presenta en casos puntuals congestió, hiperplàsia a la zona periportal, desorganització dels cordons d'hepatòcits i focus inflamatoris lleus a les zones periportals i sota la càpsula de Glisson. Cal destacar, la marcada anisocariosi, la vacuolització i la proliferació o gran nombre de cèl·lules d'Ito presents a la majoria de mostres (Fig. 50, Taula 10).

Les cèl·lules d'Ito es van descriure per primera vegada per Carl von Kupffer com a cèl·lules hepàtiques estrellades (HSC) (Geerts 2001) i posteriorment es va observar que emmagatzemen lípids al seu interior (Ito i Nemoto 1952) i que acumulen el 80% de la vitamina A de tot el cos humà en gotes lipídiques al citoplasma. Recentment, s'han descrit com a cèl·lules presentadores d'antigen en el fetge (Unanue 2007; Winau *et al.* 2007). Aquestes cèl·lules situades a l'espai perisinosoidal (espai de Disse) s'activen (diferenciant a miofibroblasts) per contribuir a la fibrosi hepàtica segregant components de la matriu extracel·lular com el col·lagen i desencadenant en la majoria de casos, en un procés de cirrosi hepàtica (Henderson i Iredale 2007). És rellevant destacar que és un procés irreversible, a diferència de la vacuolització, la qual cosa ens posa de manifest que alguna anomalia està tenint lloc en el ratolí.

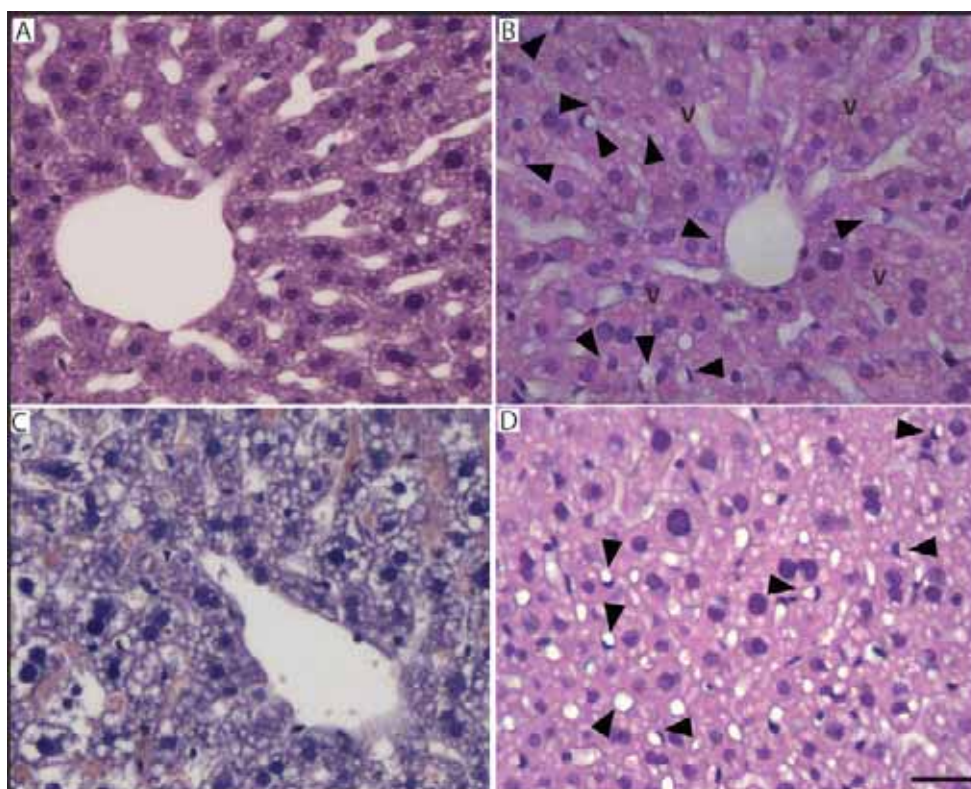


Fig. 50 Estudi histopatològic hepàtic. Seccions de 5 µm de teixit procedents d'animals control (A) i mutants EEG1Y221* (B,C i D) inclosos en parafina s'han tenyit amb hematoxilina i eosina. En el panell B i D podem observar cèl·lules vacuolades (V), gran nombre de cèl·lules d'Ito (marcades amb una fletxa), nuclis de diferents mides (anisocariosi) i gran nombre de cèl·lules binucleades, símbol de regeneració hepàtica. En el panell C podem veure que el teixit hepàtic presenta un quadre molt marcat de congestió subaguda amb una severa degeneració vacuolar del citoplasma dels hepatòcits. Barra de 30 µm.

S'han valorat semiquantitativament les lesions trobades en fetge i ronyó de 15 animals, 5 ratolins control i 10 mutants per EEG1 (Y221*). Els 5 animals sense la mutació, no presentaven cap alteració en els teixits observats: cervell, melsa,

ronyó, pulmó, testicles, cor, bufeta, intestí i fetge. En la següent taula es mostra la semiquantificació obtinguda pels 10 animals EEG1Y221* pel que fa a alteracions hepàtiques.

Fetge							
Animal	Vacuolit-zació	Proliferació cèl·lules d'Ito	Aniso-cariosi	Congestió	Focus inflamatoris	Hiper-plàsia	Desorga-nització
M1	+++++	0	0	+++	0	0	+++
M2	0	0	++++	0	++	++	0
M3	++	++	+++	0	0	0	++
F4	++	+++	+	0	0	0	0
M5	++++	0	0	+	++	0	0
F6	++++	++	+	0	0	0	0
M7	++++	++	0	0	0	0	0
F8	+	0	+	0	0	0	0
F9	++	+++	+	0	0	0	0
M10	+	++	++++	0	0	0	0

Taula 10. Semiquantificació de lesions hepàtiques en animals EEG1Y221*. Dels 10 ratolins 6 eren mascles (M) i 4 femelles (F). S'ha semiquantificat la congestió, l'anisocariosi, la vacuolit-zació, la proliferació de cèl·lules d'Ito, la presència de focus inflamatoris, d'hiperplàsia i desorganització. S'ha puntuat de 1 a 5 símbols +, en funció de si l'alteració era nul·la (0), molt lleugera (+), lleugera (++), moderada (+++), greu (+++++) i molt greu (+++++).

En el fetge de 9/10 animals analitzats s'han trobat hepatòcits vacuolitzats en més o menys grau, 2/10 patien inflamació lleu i 1/10 presentava un quadre molt marcat de congestió subaguda amb una severa degeneració vacuolar del citoplasma dels hepatòcits. En 3/10 es va observar una important anisocariosi i en 6/10 es detectà una proliferació de cèl·lules d'Ito (Fig. 50).

Referent al ronyó, en tots els ratolins EEG1Y221* analitzats s'observa dilatació dels túbuls en diverses zones, indicant que les cèl·lules epitelials dels túbuls estan acumulant alguna o algunes substàncies al seu interior. També s'observa vacuolit-zació, que en el ronyó s'ha descrit que en alguns casos, pot ser deguda a la dilatació del reticle endoplasmàtic (Gopinath *et al.* 1988). S'observen cèl·lules dels túbuls contornejats proximals edematoses i possiblement hipertròfiques, alhora que una acumulació de material aparentment proteic, semblant a la fibrina, a les llums tubulars, i a vegades als espais de Bowman dels glomèruls. En alguns túbuls s'observa la presència de *casts* hialins, eosinòfils (probablement proteics), que poden provenir de restes cel·lulars (Taula 11, Fig. 51).

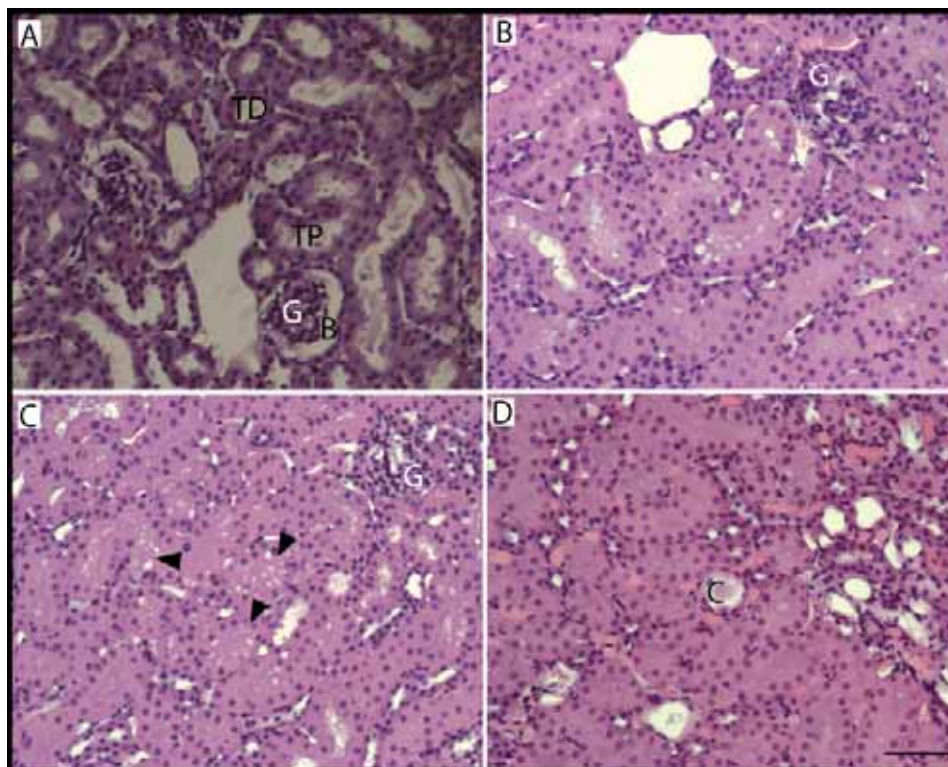


Fig. 51 Estudi histopatològic renal. Seccions de 5 µm de ronyó procedents d'animals control (A) i mutants EEG1Y221* (B,C i D) inclosos en parafina s'han tenyit amb hematoxilina i eosina. En el panell A es poden observar els túbuls distals (TD), túbuls contornejats proximals (TP) i els glomèruls (G) amb el seu espai de Bowman (B) d'un animal control. En el panell B la presència de material proteic a la poca llum que mostren els túbuls dilatats i un glomèrul desestructurat. En el panell C, es mostren túbuls dilatats amb vacúols intracel·lulars (fletxa) i finalment, en el panell D es poden veure túbuls dilatats i congestionats i la presència de casts hialins (C). Barra de 50 µm.

Ronyó					
Animal	dilatació tubular	material proteic	casts proteics	cèl·lules hipertròfiques	cèl·lules vacuolades
M1	++	++	++	0	0
M2	+++	++	++	+++	++
M3	+++	++	++	+++	++
F4	+++	+++	+	+++	0
M5	+++	+++	0	++	++
F6	++	+	0	++	0
M7	+++	++	0	++	+++
F8	+++	++	0	++	++
F9	+++	++	0	++	++
M10	++	++	++	+++	++

Taula 11. Semiquantificació de lesions renals en animals EEG1Y221*. Dels 10 ratolins 6 eren mascles (M) i 4 femelles (F). S'han avaluat els següents paràmetres: dilatació tubular, presència de material proteic i casts proteics, la hipertròfia i la vacuolització. S'ha puntuat de 1 a 5 símbols +, en funció de si l'alteració era nul·la (0), molt lleugera (+), lleugera (++), moderada (+++), greu (+++++) i molt greu (+++++).

Anàlisi d'aminoàcids en l'orina i el plasma

Per saber si EEG1 té un paper rellevant en la reabsorció renal d'aminoàcids, ens vam plantejar la valoració d'aminoàcids presents a l'orina a partir del mètode de cromatografia líquida d'intercanvi de cations: l'autoanalitzador d'aminoàcids (*Biochrom 30*). L'anàlisi es duu a terme, en primer lloc, per la separació dels aminoàcids en la columna cromatogràfica gràcies a les diferències en els seus punts isoelèctrics i una reacció post-columna amb ninhidrina que fa possible la detecció de les molècules colorimètricament. Les mesures es van realitzar al laboratori d'anàlisi elemental orgànica i d'aminoàcids dels Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

Després d'identificar els pics i d'integrar-los correctament, es va procedir a comparar la concentració dels diferents aminoàcids presents a l'orina dels ratolins control i els mutants (Fig. 52).

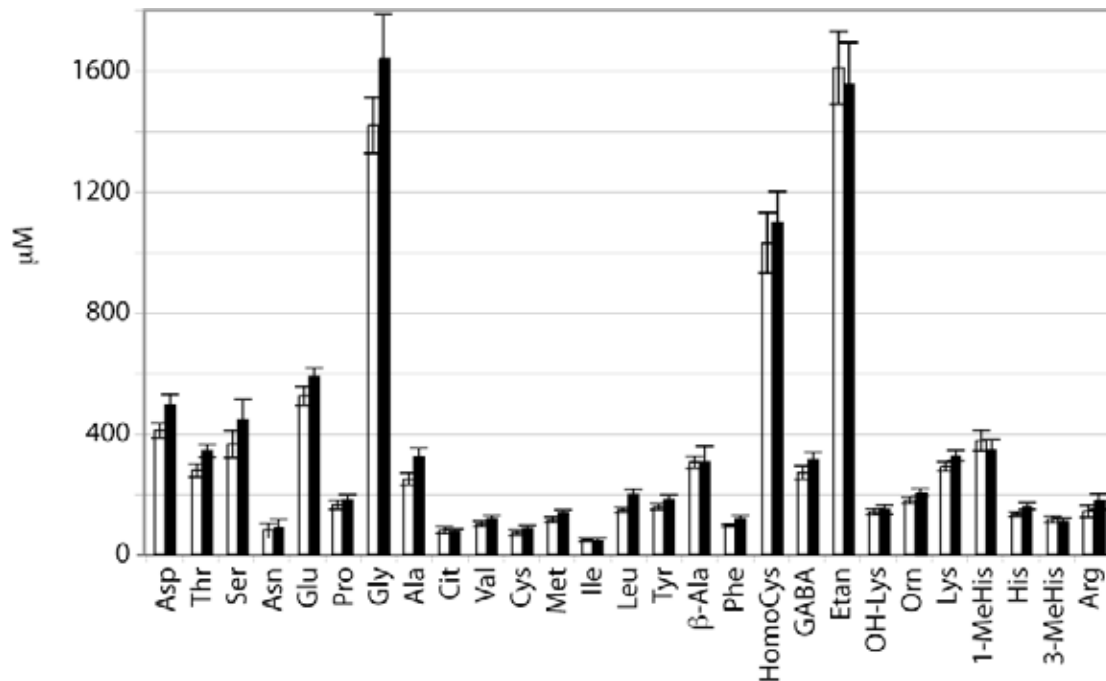


Fig. 52 Valoració d'aminoàcids en orina. Les barres indiquen la concentració en µM d'aminoàcids en orina de ratolins control (barres blanques) i de ratolins mutants Y221* (barres negres). Els valors s'han obtingut utilitzant les integracions dels pics del patró de referència i les de cada mostra individual. Els resultats són les mitjanes de 22 animals controls (12 mascles i 10 femelles) i 23 mutants (11 mascles i 12 femelles), tots ells amb edats d'entre 11 i 20 setmanes.

Com es pot veure en la Fig. 52 no hi ha canvis significatius en la concentració de cap aminoàcid o derivat d'aminoàcid entre animals control i mutants. Per aquest motiu, la implicació de EEG1 en la reabsorció renal d'aminoàcids només s'explicaria en el cas de què existís compensació de la funció per algun altre transportador.

Aquests resultats també es van comprovar per HPLC per tal de valorar els mateixos aminoàcids per un altre mètode analític i alhora ampliar l'espectre de substrats valorats. Mitjançant aquesta tècnica també es van valorar els àcids orgànics presents a l'orina, però en cap cas es van observar canvis significatius (dades preliminars i no mostrades).

En segon lloc i tenint present que EEG1 pertany a una família de transportadors d'aminoàcids i que per tant podria tenir una funció relacionada amb aquests, vam voler analitzar si en el plasma hi podia haver alguna alteració a nivell d'aminoàcids. Per això, utilitzant l'autoanalitzador d'aminoàcids vam avaluar la concentració d'aminoàcids lliures en sang.

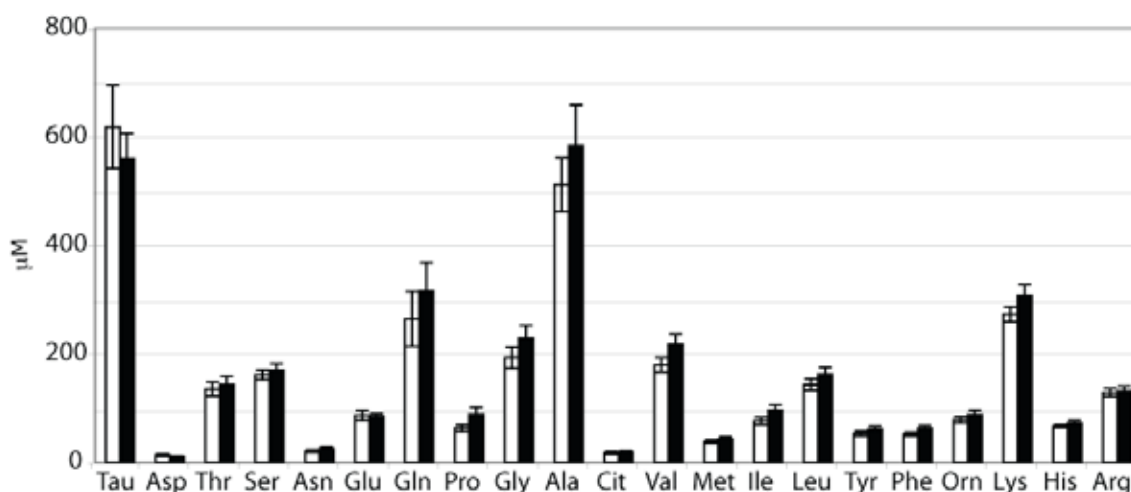


Fig. 53 Valoració d'aminoàcids en plasma. Les barres indiquen la concentració en μM d'aminoàcids en plasma de ratolins control (barres blanques) i de ratolins mutants Y221* (barres negres). Els valors s'han obtingut utilitzant les integracions dels pics del patró de referència i les de cada mostra individual. Els resultats són les mitjanes de 18 animals controls (9 mascles i 9 femelles) i 22 mutants (12 mascles i 10 femelles), tots ells amb edats d'entre 11 i 24 setmanes.

A la Fig. 53 es pot apreciar que no existeixen diferències significatives entre animals control i mutants pel que fa al contingut d'aminoàcids que vam ser capaços de detectar en plasma. El que sí s'observa, és una lleugera tendència a l'alça en els aminoàcids glicina, valina i lisina en la majoria d'experiments. Aquest resultat, com en el cas de l'orina, també es va comprovar per la tècnica d'anàlisi d'aminoàcids amb HPLC. Per tant, tampoc en aquest anàlisi podem obtenir cap pista clara de la funció de la proteïna.

Valoració d'aminoàcids intracel·lulars en hepatòcits

El fetge juga un paper central en el metabolisme d'aminoàcids, síntesi de proteïnes i també en la seva degradació per contribuir a la detoxificació de molts

processos. Concretament, el catabolisme de lisina, un aminoàcid essencial, té lloc principalment al fetge. Les tendències observades d'hiperlisinèmia, juntament amb l'alteració histològica hepàtica, que ens va portar a analitzar el contingut intracel·lular d'aminoàcids del fetge. No es van observar diferències significatives en el contingut d'aminoàcids intracel·lulars d'hepatòcits d'animals control i mutants per EEG1.

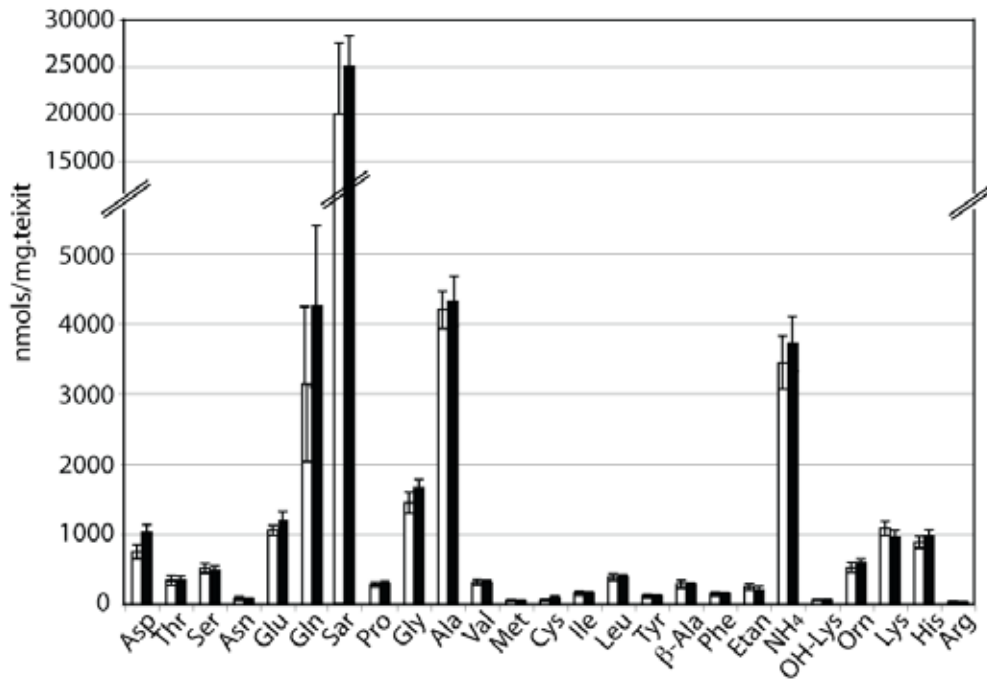


Fig. 54 Contingut intracel·lular d'aminoàcids en hepatòcits. Les barres indiquen la concentració en nmols d'aminoàcids per mg de teixit hepàtic inicial de ratolins control (barres blanques) i de ratolins mutants Y221* (barres negres). Els valors s'han obtingut utilitzant les integracions dels pics del patró de referència i les de cada mostra individual. No s'observen diferències significatives per a cap aminoàcid analitzat.

Discussió

Identificació de nous transportadors d'aminoàcids

Com s'ha presentat a la introducció d'aquesta memòria, en l'esquema de (re)absorció renal i intestinal d'aminoàcids existeixen encara algunes activitats de transport d'aminoàcids per identificar. Amb la seqüenciació de diversos genomes diaris, s'està generant gran quantitat d'informació que ens posa a l'abast multitud de seqüències de possibles proteïnes pendents de caracteritzar. Actualment s'han identificat fins a 47 famílies de transportadors de soluts (SLC47) que estan formades per més de 370 membres humans, alguns d'ells encara orfes i sense funció descrita (<http://www.genenames.org/aboutHGNC.html>).

En la present tesi s'ha descrit la clonació i caracterització de LAT4, un nou transportador d'aminoàcids i segon membre de la família SLC43.

Identificació i caracterització funcional de LAT4

El 2003 es va identificar LAT3 per clonació d'expressió funcional en la línia cel·lular d'hepatocarcinoma humà FLC4 (Babu *et al.* 2003). A partir d'aquesta seqüència, es va fer una cerca d'homòlegs a LAT3 a les bases de dades i amb un 57% d'identitat vam identificar LAT4. LAT3 i LAT4 també mostren una alta homologia (30% identitat) amb una tercera proteïna, EEG1, fins el moment de funció desconeguda però caracteritzada i estudiada en un model murí en el segon apartat dels resultats d'aquesta tesi.

LAT3, LAT4 i EEG1 es diferencien clarament de la resta de transportadors coneguts i per la seva similitud de seqüència i estructura, formen una família d'aminoàcids pròpia (SLC43). Si analitzem la similitud d'aquesta família amb altres famílies de transportadors de soluts (SLC), com es pot veure en l'arbre filogenètic (Fig. 55), aquestes 3 proteïnes s'assemblen més a la família de transportadors de cations i anions orgànics (SLC22), als membres de la família de transportadors de glucosa (SLC2), a la família de monocarboxilats i aminoàcids aromàtics (SLC16) i a la família de transportadors de cations divalents (SLC41), que a la resta de famílies analitzades i representatives del conjunt de transportadors de soluts.

A part de la relativa homologia de seqüència entre aquestes famílies de transportadors, també conserven propietats estructurals comuns. Membres de les famílies SLC22, SLC2, SLC16 i SLC43 mostren una topologia transmembrana similar amb 12 segments transmembrana predits, amb els extrems NH₂ i COOH citoplasmàtics, amb prediccions de *N*-glicosilació en el bucle d'entre el primer i segon domini transmembrana i un gran *loop* intracel·lular entre els segments transmembrana 6 i 7 amb la predicció de diversos residus fosforilables.

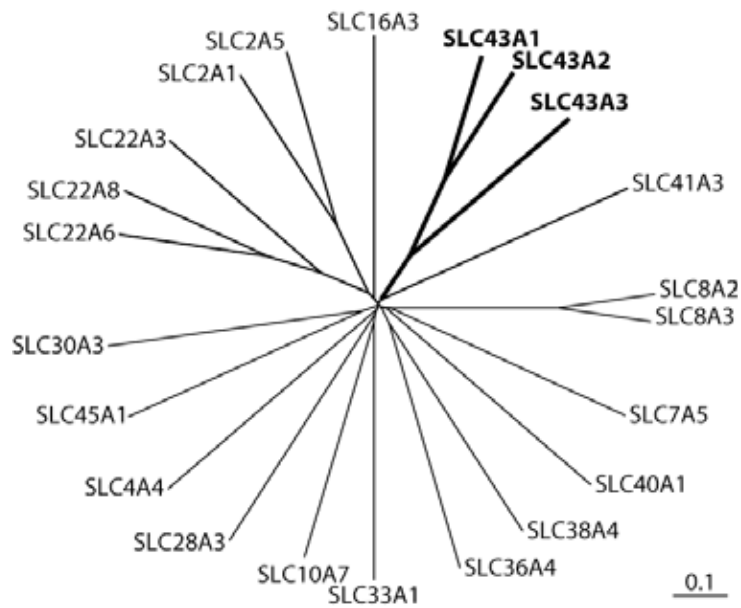


Fig. 55 Arbre filogenètic de membres de diferents famílies de transportadors de soluts (SLC).

Arbre filogenètic realitzat a partir d'un alineament amb l'algoritme ClustalW i posterior tractament de les dades amb el programa *Phylo dendron*. Es mostra l'homologia de 22 seqüències humanes, que pertanyen a 16 famílies de transportadors diferents representatives del conjunt de famílies de transportadors de soluts (procedent d'un arbre amb com a mínim un membre de cada família). Es pretén mostrar que la família SLC43, marcada en negreta, forma una família d'aminoàcids independent i que guarda una similitud tant de seqüència com estructural (no mostrada) amb les famílies SLC22, 2 i 16. La longitud de les branques és proporcional a la identitat de seqüència aminoacídica i a la distància filogenètica.

LAT3 i LAT4 comparteixen gran part de les característiques funcionals (Babu *et al.* 2003; Bodoy *et al.* 2005): independència dels ions sodi, clorur i protons, una limitada especificitat de substrat, dos components cinètics, una activitat de transport que no es *trans*-estimula, estereoespecificitat, sensibilitat a la inhibició per l'anàleg d'aminoàcids BCH i la propietat d'acceptar la substitució del grup α -carboxílic per el grup hidroximetil en els substrats que transporta.

Tot i això, els dos transportadors d'aminoàcids es poden distingir per una diferent sensibilitat a l'agent reductor NEM. El transport induït per LAT3 en oòcits de *Xenopus*, s'inhibeix totalment amb el pretractament amb NEM i el de LAT4 només es bloqueja parcialment.

Una propietat a destacar de LAT3 i LAT4, és el comportament cinètic de dos components que es pot apreciar en els gràfics d'Eadie-Hofstee. Ja s'havia descrit pel cas del transportador murí CAT1, més d'un component cinètic de transport en l'expressió del transportador en oòcits de *Xenopus* (Van Winkle *et al.* 1995). També s'ha descrit en alguns receptors transmembrana, com l' α 1 adrenèrgic, que la fosforilació de la proteïna pot alterar l'afinitat pel seu substrat (Leeb-Lundberg *et al.* 1985). Aquest fet pot produir una població heterogènia de receptors en funció de la seva afinitat i del seu estat de fosforilació, com és el cas dels receptors de

dopamina D_{1A} i el d'insulina (Kubar i Rochet 1990; Asghar *et al.* 2002). També s'ha descrit la regulació de diferents transportadors de glutamina (sistema ASC/B^o i N) amb èsters de forbol mitjançant mecanismes que podrien implicar la proteïna quinasa C (PKC) i per tant la fosforilació dels transportadors (Bode *et al.* 1998; Pawlik *et al.* 2000; Bode 2001). Aquestes dades ens indiquen que la possible fosforilació de LAT4 podria tenir un paper important tant en la regulació, com en la cinètica de dos components del transportador. Com ja s'ha comentat a la introducció, diferents algorismes i programes informàtics, prediuen la fosforilació de LAT4 (Hoffert *et al.* 2007). En l'intent de comprovar bioquímicament la fosforilació del transportador, es van assajar diferents condicions per tal de detectar LAT4 fosforilat mitjançant anticossos anti-fosfoserina, però la impossibilitat de disposar d'anticossos contra LAT4 per tal d'enriquir la mostra per exemple a partir d'una immunoprecipitació prèvia, va impedir una correcta detecció (resultats no mostrats).

Curiosament, només el component de baixa afinitat de LAT4 és sensible a l'agent sulfhidril NEM, i la mutació d'un possible lloc de fosforilació conservat en els tres membres de la família SLC43 (Ser 297), porta a la desaparició de l'inhibició del pretractament amb NEM en l'activitat de transport de LAT4. La serina 297 està situada en el gran bucle intracel·lular del mig de la proteïna (Fig. 56).

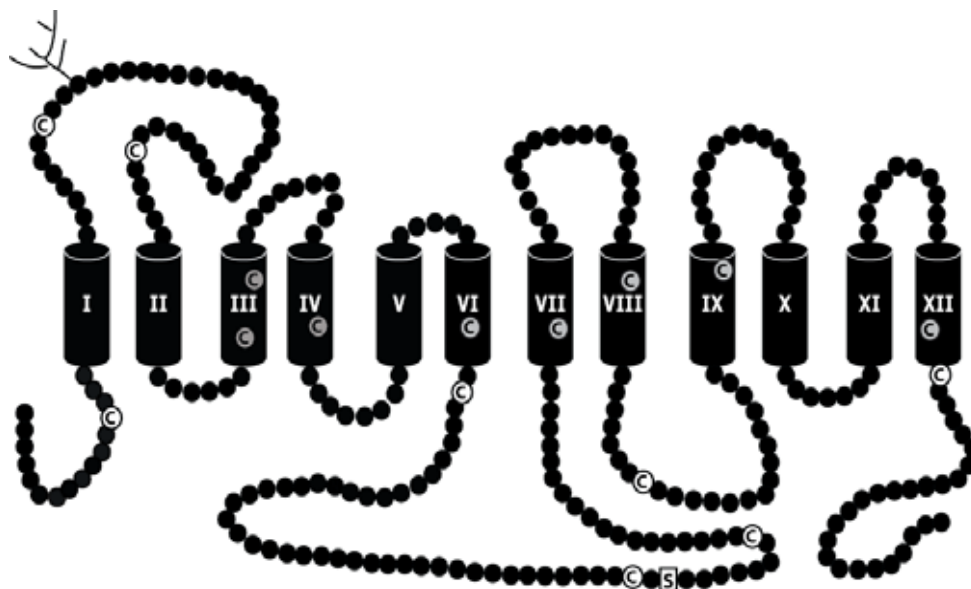


Fig. 56 Esquema topològic predit per la proteïna LAT4 humana. Es mostren els 12 segments transmembrana predits per l'algoritme *TMHMM* v.2.0 i els aminoàcids representats en forma de boles negres. La serina 297 es marca amb una quadrat, les cisteïnes amb una bola blanca si està situada als bucles i grisa si està dins el segment transmembrana. També s'indiquen els possibles llocs de glicosilació amb una branca en forma de Y.

Pensem que aquesta gran zona intracel·lular entre el segment transmembrana 6 i 7, podria ser el lloc d'unió de diferents reguladors de l'activitat de LAT4 i que impedissin l'acció del NEM a cisteïnes situades en aquesta zona. També és possible que la mutació de la serina 297 a alanina provoqui un canvi conformacional a la proteïna, que impossibiliti l'accés del NEM al seu lloc d'acció. S'han realitzat esforços per esbrinar quina cisteïna podria o podrien ser les responsables de l'acció del NEM mutant les dues cisteïnes que flanquegen la serina 297, ja que per proximitat eren unes bones candidates (Fig. 56). Els assajos de transport en presència de NEM amb LAT4 mutat a la C295 i a la C305 no van presentar canvis respecte la proteïna salvatge, indicant-nos que cap d'aquestes dues cisteïnes és diana del NEM. Degut al gran nombre de cisteïnes (16) presents a la proteïna, es va descartar aprofundir en la investigació. Per tant, caldrien més estudis per clarificar el mecanisme de transport de dos components de LAT4, així com del possible efecte de la fosforilació i l'acció diferencial del NEM en la proteïna mutada i salvatge.

Paper de LAT4 en el sistema L

Com s'ha presentat a la introducció d'aquesta tesi, el sistema L és un sistema de transport d'aminoàcids neutres, sodi independent i inhibible per BCH (Oxender i Christensen 1963). El sistema de transport de tipus L, és ubic i en molts tipus cel·lulars és l'única via eficient per l'entrada d'aminoàcids neutres, aromàtics o de cadena llarga. D'altra banda, molts tipus cel·lulars expressen diferents sistemes de transport que accepten aminoàcids neutres i petits, concretament sistemes dependents de sodi, com el sistema A (electrogènic i inhibible per MeAIB), el sistema N i el sistema ASC (electroneutre) (Christensen 1990; Palacín *et al.* 1998; Bröer 2002).

S'han descrit 3 variants del sistema L en funció de la seva afinitat i selectivitat de substrat. La variant L₁ presenta una afinitat de substrat en el rang micromolar i s'inhibeix principalment per cisteïna, valina, isoleucina, leucina, metionina, histidina, triptòfan, tirosina, fenilalanina i BCH. El subsistema L₂, té una afinitat pels seus substrats del rang milimolar i una especificitat de substrat més reduïda inhibint-se per isoleucina, leucina, fenilalanina i BCH (Weissbach *et al.* 1982; Christensen 1990). Una altre diferència entre els dos subsistemes és el diferent efecte que provoca el NEM (agent reductor) en la seva activitat de transport. El sistema L₂ és sensible a la inhibició per NEM a diferència del sistema L₁ (Novak *et al.* 1994). Posteriorment, es va identificar en fibroblasts, un tercer subsistema anomenat L₃, amb una afinitat intermitja entre els dos subsistemes L₁ i L₂ (Gandolfi *et al.* 1987).

El primer transportador del sistema L identificat molecularment va ser LAT1 (Kanai *et al.* 1998; Mastroberardino *et al.* 1998). LAT1, juntament amb LAT2 (Pineda *et al.* 1999; Rossier *et al.* 1999; Segawa *et al.* 1999), van representar molecularment l'activitat del sistema L fins que al 2003 es va identificar LAT3 (Babu *et al.* 2003). LAT3 és un transportador amb característiques estructurals diferents a qualsevol altre membre de les famílies SLC prèviament descrits i que per tant generava la creació d'una nova família de transportadors d'aminoàcids, SLC43. LAT4, el segon membre de la família SLC43 s'ha identificat i caracteritzat en la present tesi.

LAT1 i LAT2 pertanyen a la família de transportadors d'aminoàcids SLC7 i es caracteritzen per la formació d'heterodímers. Són dues proteïnes de 12 segments transmembrana predits, que necessiten de la glicoproteïna 4F2hc per arribar a la membrana plasmàtica de la cèl·lula. Transporten aminoàcids grans i neutres, independentment del ió sodi, amb alta afinitat i per un mecanisme d'intercanvi obligatori amb estequiometria 1:1 (Verrey 2003). Les característiques d'aquests dos transportadors concorden amb les descrites prèviament pel subsistema L₁, essent LAT1 important en el transport d'aminoàcids en les cèl·lules en creixement i tumorals (Sang *et al.* 1995; Yanagida *et al.* 2001) i LAT2 en el transport transepitelial d'aminoàcids des de la cara basolateral en teixits que contenen barreres epitelials com són el ronyó, l'intestí, la placenta i el cervell (Pineda *et al.* 1999).

LAT3 i LAT4 (família SLC43) transporten els aminoàcids neutres: Leu, Ile, Phe, Met i Val de manera sodi independent i amb una afinitat en el rang milimolar, i no necessiten de cap altre proteïna per ser funcionals (Babu *et al.* 2003; Bodoy *et al.* 2005). Les característiques d'aquests dos transportadors concorden amb les prèviament descrites per el subsistema L₂, tant per l'especificitat i afinitat per els substrats, com per la sensibilitat al NEM. La diferent expressió tissular de LAT3 i LAT4, ens fan pensar que LAT4 podria contribuir a l'activitat del sistema L₂ en els teixits on no s'expressa LAT3, com per exemple, ronyó i intestí.

Possibles papers fisiològics de LAT4

Hem observat expressió del RNA missatge de LAT4 a ronyó i més concretament, gràcies a la tècnica d'hibridació *in situ*, als túbuls distals i conductes col·lectors. Al no detectar expressió de LAT4 als túbuls proximals on té lloc el 90% de la reabsorció d'aminoàcids, ens fa descartar que LAT4 tingui un paper important en la reabsorció d'aminoàcids. S'ha descrit però, que existeix un reciclatge d'aminoàcids del bucle de Henle, situat entre els túbuls proximals i distals, a la sang en la *vasa recta* de nefrones juxtamedul·lars de ronyó de rata (Dantzier i

Silbernagl 1988). Aquest intercanvi d'aminoàcids entre la cèl·lula i la sang, s'ha descrit que pot estar implicat en la regulació osmòtica i sobretot durant els passos inicials d'adaptació de la cèl·lula a un estrés osmòtic (Beck *et al.* 1998). Per tant, podem pensar que LAT4 podria contribuir a la sortida basolateral d'aminoàcids neutres de la cèl·lula i tenir un paper en el reciclatge d'aminoàcids de la cèl·lula epitelial a la sang.

L'expressió del mRNA de LAT4 a les cèl·lules PCT (*proximal convoluted tubule*) va fer que ens plantejàssim buscar una activitat compatible amb la de LAT4 en aquest model cel·lular, tot i pertànyer a una zona renal on per hibridació *in situ* no vam ser capaços de detectar-ne l'expressió. Efectivament vam trobar una activitat de transport de $^{14}\text{C-L-}[\text{Phe}]$ a la cara basolateral de les cèl·lules, gràcies a què aquests model cel·lular té la capacitat de polaritzar-se i formar una monocapa si creix sobre filtres de polièster i policarbonat tractats. L'entrada de $^{14}\text{C-L-}[\text{Phe}]$ per la cara basolateral, a diferents concentracions de substrat, mostrava una cinètica amb dos components. Creiem que LAT4, pot ser el responsable del component de baixa afinitat, ja que en aquest tipus cel·lular només s'hi expressa LAT1 i LAT4, com a representants del sistema L i per tant, LAT1 podria ser el responsable del component d'alta afinitat. Aquesta hipòtesi es va confirmar a partir d'assajar la inhibició d'aquesta activitat mitjançant aminoàcids o inhibidors específics per a cada transportador juntament amb el pretractament amb NEM. La metiltirosina, inhibidor específic de LAT1 (Kim *et al.* 2002), va inhibir el transport de $^{14}\text{C-L-}[\text{Phe}]$ en un 80%, indicant-nos que LAT1 és responsable d'aquesta activitat. La alanina, pràcticament no va inhibir el transport, per tant, es pot descartar la presència de LAT2. El pretractament amb NEM, va revelar que el transport de baixa afinitat era sensible a l'agent sulfhidril, tal com passa en l'activitat induïda per LAT4 en oòcits de *Xenopus Laevis*. Per una confirmació definitiva, ens caldria detectar la proteïna per western blot o immunofluorescència, però desgraciadament no disposem d'un anticòs específic per LAT4; o intentar eliminar l'activitat descrita mitjançant siRNA dissenyats contra LAT4. Tot i això, si pensem que es troba situat a la cara basolateral de les cèl·lules epitelials i que té un mecanisme de difusió facilitada, podria tenir un paper en la sortida d'aminoàcids de la cèl·lula i per tant, en el flux transepitelial.

Un altre teixit on s'ha observat expressió del mRNA de LAT4 ha estat a l'intestí. La hibridació *in situ* revelava que LAT4 s'expressa majoritàriament a les criptes, on podria tenir un paper en la regulació de l'homeòstasi de l'enteròcit. També es detecta alta expressió del missatge a placenta. A la cara basolateral del trofoblast, s'ha descrit una entrada de fenilalanina cap a la cara fetal, de baixa

afinitat (Km aparent de 17 mM). La localització basolateral i la alta Km descrita per aquesta activitat a la placenta, ens fa pensar que podria ser deguda a LAT4.

Són necessaris més estudis per esbrinar el paper fisiològic de LAT4. En aquest sentit es va intentar generar anticossos contra LAT4 per diverses estratègies detallades a l'annex 1, però malauradament no es va obtenir cap sèrum capaç de detectar la proteïna. Per continuar en la cerca de nous transportadors d'aminoàcids, ens vam centrar en l'estudi del tercer membre de la família SLC43, EEG1. Per intentar esbrinar la funció de la proteïna vam propiciar la generació d'un model murí amb EEG1 mutat. En aquest sentit hem disposat d'un model murí amb EEG1 truncat a la posició Y221STOP (Y221*).

EEG1, tercer membre de la família SLC43

Per homologia de seqüència i similituds estructurals, EEG1 forma part de la família de transportadors d'aminoàcids formada per LAT3 i LAT4, amb els que manté una homologia d'identitat del 28-30%, respectivament.

Per intentar determinar la funció del nou membre de la família SLC43, s'ha clonat el cDNA, s'ha analitzat l'expressió del transcrit i de la proteïna, i s'ha expressat EEG1 en un sistema d'expressió heteròleg on s'ha comprovat que arriba a la membrana. A continuació s'exposen les hipòtesis de treball que s'han analitzat.

EEG1, un transportador d'aminoàcids?

La nostra primera hipòtesi va ser que es tractés d'un transportador d'aminoàcids que pogués estar involucrat en la reabsorció d'aminoàcids al ronyó, ja que disposàvem de la dada prèvia del laboratori del Dr. Kanai, que ens mostrava la localització basolateral de la proteïna en els túbuls proximals del ronyó humà (Fig. 46), i sabíem que EEG1 és homòleg a LAT3 i LAT4, dos transportadors d'aminoàcids neutres.

Vam assajar el transport d'aminoàcids en oòcits de *Xenopus Laevis* que expressaven EEG1 i no vam observar que s'induí cap activitat de transport amb els aminoàcids radioactius provats (Fig. 41). L'oportunitat de generar un model murí deficient amb la proteïna (Y221*), ens va oferir la possibilitat d'analitzar l'orina d'aquests animals per comprovar si l'absència de la proteïna provocava hiperexcreció d'algun aminoàcid. Tant en l'anàlisi d'aminoàcids en sang, com en orina, no es van observar diferències significatives entre animals control i mutants per EEG1. Aquestes dues dades, suggereixen que EEG1 no intervé en la reabsorció renal d'aminoàcids, tot i que en el model animal, no es pot descartar una compensació per alguna altre proteïna que emmascari la pèrdua de EEG1.

L'activació de mecanismes compensatoris en model animals està àmpliament descrita en la bibliografia, ja que la depleció del gen responsable d'una patologia coneguda, no sempre ens mostra el fenotip complert del pacient. Per exemple, una possible compensació funcional la trobem en els models murins que s'han generat per a membres de la família SLC1, on es pot observar que en 3 models per separat, i en un model doble mutant de *glst*^{-/-} i *eaac1*^{-/-}, no és possible detectar el fenotip neuropatològic esperat (Ghijsen *et al.* 1999; Stoffel *et al.* 2004). En el cas del model murí amb el síndrome de Bartter (tubulopaties amb pèrdues renals d'aigua i sal), aconseguit per la deleció del canal ROMK, no s'observa una excessiva pèrdua d'aigua ni de sal ja que és compensat per la combinació d'hipertròfia en la nefrona distal i una activació dels transportadors involucrats en la reabsorció de NaCl (Wagner *et al.* 2008).

Necessita una altre proteïna?

Una altre possibilitat a considerar és que EEG1 necessiti d'alguna altre proteïna per ser funcional. Podria ser que no fóssim capaços de detectar transport d'aminoàcids injectant la proteïna sola en oòcits de *Xenopus* perquè EEG1 fos només una part del transportador o necessités activar-se. A la bibliografia trobem diferents exemples, com la família de transportadors HAT prèviament descrits i la col·lectrina amb membres de la família de transportadors SLC6 (Chillarón *et al.* 2001; Danilczyk *et al.* 2006).

La família de transportadors heteromèrics d'aminoàcids (HATs) està composta per una subunitat pesada (HSHAT) i per una lleugera (LSHAT) unides per un pont disulfur conservat en tots els membres de la família (Fig.1). S'han identificat fins el moment dues subunitats pesades homòlogues de la família SLC3: rBAT (related to b⁰⁺AT amino acid transporter) i 4F2hc (heavy chain of the surface antigen 4F2 o també anomenada CD98) (Hemler i Strominger 1982; Bertran *et al.* 1992) i 10 subunitats lleugeres de la família SLC7 (Verrey *et al.* 2004; Fernández *et al.* 2005). En aquesta família, la formació de l'heterodímer és fonamental perquè la subunitat lleugera arribi a la membrana plasmàtica. Una vegada a la membrana de la cèl·lula, la subunitat lleugera per si sola és capaç d'induir transport (Reig *et al.* 2002).

La col·lectrina, una proteïna homòloga a ACE2 (*angiotensin converting enzyme II*) que s'expressa al conducte col·lector (Zhang *et al.* 2001), s'ha demostrat mitjançant estudis realitzats en diferents models murins deficientes en col·lectrina que té un paper en el transport d'aminoàcids (Danilczyk *et al.* 2006; Malakauskas *et al.* 2007). La col·lectrina segons les prediccions, és una proteïna transmembrana de tipus I, amb un sol segment transmembrana i per tant, era

difícil pensar que ella sola fos capaç de formar un porus per transportar aminoàcids. S'ha observat que la col·lectrina s'associa amb diferents transportadors d'aminoàcids de la família SLC6 (B⁰AT1, XT2, SIT1/XT3s1 i XT3), que augmenta l'expressió d'aquests a la membrana plasmàtica i que alhora incrementa la seva funció com a transportadors d'aminoàcids. S'hipotetitzava que la col·lectrina podria tenir un paper similar a les cadenes pesades de la família dels HAT (HSHAT) portant B⁰AT1 (i altres membres de la família) a la membrana plasmàtica. S'ha detectat la unió física de col·lectrina amb B⁰AT1, XT2 i XT3, però a diferència de 4F2hc amb les seves subunitats catalítiques, no sembla que la unió sigui deguda a una unió covalent (Danilczyk *et al.* 2006).

En el cas d'EEG1, en els resultats d'aquesta tesi s'ha descrit que la proteïna en oòcits de *Xenopus* (Fig. 40) i en cèl·lules HeLa (Fig. 45) arriba a la membrana plasmàtica, però no podem descartar que amb l'associació o coexpressió amb una altre proteïna augmentés la seva activitat de transport o s'activés, de manera que ens permetés detectar la seva funció.

Un altre tret destacable de EEG1, és la diferent detecció per western blot, de la proteïna glicosilada i desglicosilada en els teixits. S'ha observat la proteïna mEEG1 en mostres de membranes totals procedents de fetge, ronyó i pulmó de ratolí (Fig. 44). La fracció de sèrum amb la qual s'ha detectat millor la proteïna, ha estat l'obtinguda a partir de la purificació d'anticossos mitjançant la columna d'afinitat amb el pèptid (57-71 aa) unit. Aquest pèptid està molt proper al possible lloc de N-glicosilació (Asn 56), fet que podria influir en la detecció de la proteïna glicosilada. S'ha descrit que les N-glicosilacions poden tenir estructures de carbohidrats heterogènies en funció del teixit i del residu glicosilat (Medzihradzsky 2008). Cada teixit crea les seves glicoformes úniques, i s'ha demostrat que diferents glicosilacions poden provocar canvis funcionals i alterar les propietats físiques i bioquímiques a la proteïna (Parekh *et al.* 1987; Gao *et al.* 2008). En el cas de la pannexina 1 i 3, proteïnes implicades en la unió entre cèl·lules, s'ha observat que presenten diferents patrons de glicosilacions en funció del teixit on s'expressin, i que la glicosilació de les proteïnes està involucrada amb la seva arribada a la membrana plasmàtica (Penuela *et al.* 2007). En el cas de EEG1, les diferències observades en la detecció de la proteïna glicosilada, es podria explicar per l'heterogeneïtat descrita per les N-glicosilacions en funció del teixit i que aquestes diferències intervinguessin en l'accés de l'anticòs per reconèixer la proteïna. Calen més estudis sobre les modificacions post-traduccionals per els membres de la família SLC43 per saber l'impacte que poden arribar N-glicosilacions o fosforilacions en les proteïnes.

Paper en la reabsorció?

Segons l'esquema de la Fig. 57, la sortida d'aminoàcids neutres de la cèl·lula epitelial no queda explicada.

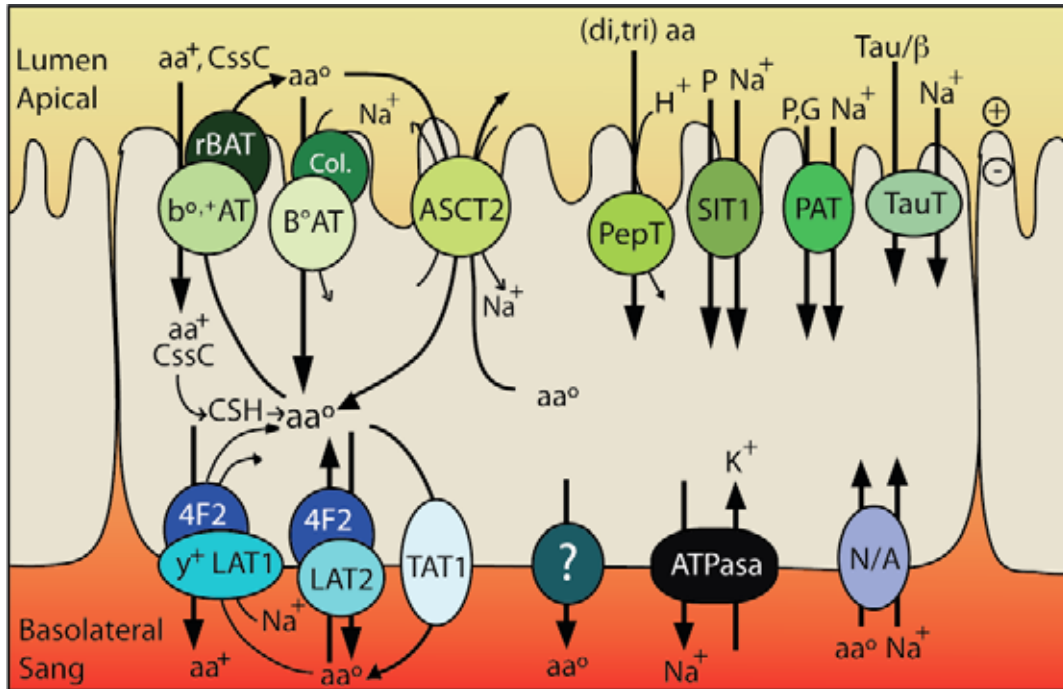


Fig. 57 Esquema dels transportadors d'aminoàcids neutres implicats en la (re)absorció renal i intestinal d'aminoàcids. Es mostra el flux transepitelial de diferents grups d'aminoàcids neutres (aa^o). A la cara apical es mostra l'heterodímer b^{o,+}AT amb rBAT, B^oAT amb la col·lectrina, ASCT2 (transportador del sistema ASC), PepT (PeptT1/2, transportador de peptidus 1 o 2), SIT1 (transportador del sistema IMINO), PAT (PAT1/2, transportador de protons i aminoàcids) i TauT (transportador de taurina i β-aminoàcids). A la cara basolateral es mostra l'heterodímer y⁺LAT1 amb 4F2 i el format per LAT2 i 4F2, TAT1 (Transportador d'aminoàcids aromàtics), dos transportadors no identificats (?) i els transportadors de la família SNAT (N/A). P: prolina, G: glicina, (di,tri)aa: di-, tripèptids, CysC: cistina i CSH: cisteïna (Adaptada de (Palacín *et al.* 2005).

A la cara basolateral s'ha descrit la presència de LAT2/4F2hc, com a bescanviador d'aminoàcids neutres (Pineda *et al.* 1999; Rossier *et al.* 1999), excepte en un treball on es descriu com a transportador que actua per difusió facilitada. Aquest fet, ens fa pensar en la possibilitat de què LAT2 pogués actuar en funció de diferents condicions fisiològiques com a bescanviador o com a transportador capaç de generar una sortida neta d'aminoàcids neutres. En estudis amb models cel·lulars polaritzables com les MDCK i les OK (Bauch i Verrey 2002; Fernández *et al.* 2003) s'ha mostrat que LAT2 té un paper important en la sortida de cisteïna de la cèl·lula després de la seva reducció per el glutatió en el citosol. Aquesta sortida es realitza bescanviant la cisteïna (sortida) per aminoàcids neutres

(entrada), per tant, sembla que LAT2 no tindrà un paper principal en la sortida d'aminoàcids de la cèl·lula epitelial. Un projecte que ens permetrà aprofundir en el paper de LAT2 en la reabsorció d'aminoàcids és la generació del model murí knock-out de LAT2. Actualment s'estant creuant els heterozigots de la primera generació per obtenir els primers homozigots. Aquest model ens hauria de permetre aclarir el mecanisme de transport i també l'impacte real de LAT2 en la reabsorció d'aminoàcids.

A part de LAT2 i γ^+ LAT1, l'altre únic transportador d'aminoàcids neutres descrit en membranes basolaterals i que per tant, pot tenir un paper en la sortida d'aquests aminoàcids de la cèl·lula, és el transportador d'aminoàcids aromàtics, TAT1 (Kim *et al.* 2001). A diferència dels dos transportadors prèviament esmentats, TAT1 actua com a uniport i per tant permet una entrada i una sortida neta d'aminoàcids aromàtics de la cèl·lula. Aquest fet, juntament amb què s'expressa a l'intestí i amb menys intensitat als túbuls proximals contornejats del ronyó ens fa pensar que pot tenir un paper en la (re)absorció d'aminoàcids (Kim *et al.* 2001; Ramadan *et al.* 2006). En aquest cas el model mutant de TAT1 generat per una mutació puntual provocada per l'agent ENU i que trunca la proteïna a l'aminoàcid 88, ens revela una hiperecreció molt moderada d'aminoàcids aromàtics i un augment significatiu de Tyr i Trp a la sang (comunicació personal del Dr. Verrey, EUGINDAT). Per tant, sembla que el responsable final de sortida d'aminoàcids neutres de la cèl·lula no és TAT1, ja que s'hauria d'observar una augment en l'excreció d'aminoàcids neutres l'orina de l'animal *tat1*^{-/-}.

Aquestes dades deixen oberta la identificació d'un transportador que porti a terme la sortida d'aminoàcids netres de la cèl·lula. EEG1 al pertànyer a una família de transportadors d'aminoàcids neutres i que funcionen per difusió facilitada, semblava un bon candidat per tenir aquest paper en el flux transepitelial.

EEG1 un transportador, però no d'aminoàcids?

EEG1, dels 3 membres de la família SLC43, és el menys conservat amb una identitat d'aminoàcids del 28-30 % amb els altres dos membres (57% entre LAT3 i LAT4). Aquest motiu ens pot fer pensar que tingui característiques una mica diferents a les dels transportadors d'aminoàcids, com per exemple que sigui un transportador d'altre tipus de soluts o de derivats d'aminoàcids. A la literatura trobem diverses famílies de transportadors de soluts formades per membres que reconeixen diferent tipus de substrat i tenen mecanismes de transport diferents. Per exemple, la família SLC5, està formada per membres que transporten glucosa (SLC5A1-A2), inositol (SLC5A3), diverses vitamines (SLC5A6) i iodur de les hormones tiroidees (Wright i Turk 2004). A la família SLC16, el primer membre

SLC16A1 transporta lactat, piruvat i cossos cetònics amb un cotransport amb protons, en canvi, SLC16A10 transporta aminoàcids aromàtics per difusió facilitada (Halestrap i Meredith 2004). Un altre exemple, és la família SLC6, on hi ha membres que transporten creatina (SLC6A8), d'altres taurina (SLC6A6), prolina (SLC6A7), glicina (SLC6A5), serotonina (SLC6A4), etc...

Això ens ensenya que calen evidències experimentals i no es poden assumir funcions per similitud de seqüència, ja que el sol canvi d'un nombre limitat de residus, pot alterar l'especificitat de substrat i el mecanisme de transport. Una identitat de seqüència del 90% entre dos transportadors d'uns 400-500 aminoàcids de mitjana, permet el canvi d'entre 40-50 aminoàcids, molt més del que és necessari per alterar les propietats mencionades (Bröer 2002). Per això, ens hem proposat en un futur, fer un estudi de metabolòmica per comparar l'orina i el plasma dels animals normals i els animals mutants per HPLC-EM, i així poder detectar canvis en un espectre més ampli de metabolits.

EEG1 no és un transportador?

La literatura ens ensenya que petites modificacions en la seqüència d'una proteïna, poden portar a grans canvis en la funció, com per exemple passar d'un co-transport a un canal; i canvis de localització en l'expressió del gen poden resultar en un canvi en el paper fisiològic de la proteïna, pot passar d'un transportador en l'epiteli a un glucosensor en neurones. Aquest és el cas del membre SLC5A4 (SGLT3) de la família de cotransportadors de sodi/glucosa. SGLT3 s'ha descrit com un sensor de glucosa dins una família de transportadors tot i que, el seu homòleg en porc és capaç de transportar glucosa (Diez-Sampedro *et al.* 2003). Aquesta família d'onze membres s'ha demostrat que té múltiples funcions, des de transportar activament soluts, ions i aigua, canals d'urea i aigua, a sensors de glucosa en neurones colinèrgiques (Wright *et al.* 2004).

Aquest fet, ens fa reflexionar sobre la necessitat de ser prudents alhora d'extrapolar funcions entre gens homòlegs. Per tant, si amb un 82% d'identitat entre la seqüència humana i de porc de SGLT3 pot variar la funció de la proteïna, cal valorar la possibilitat de què EEG1 no sigui un transportador sinó un receptor o un sensor.

Model murí EEG1-Y221*

El model murí amb la proteïna EEG1 truncada en la posició tirosina 221 (C663A) es va generar a partir de l'agent mutagènic ENU. La primera observació important va ser que els ratolins homozigots per la mutació Y221*, eren viables i fèrtils, ja que calia contemplar la possibilitat de què al ser un gen que s'expressa en

epitelis embrionaris (Stuart *et al.* 2001), fos important en l'embriogènesi i causés letalitat als homozigots. Aquest no és el cas, ja que es compleix la proporció d'herència mendeliana en les cries provinents de creuaments heterozigots (Taula 9). En el fenotipatge tampoc vam observar cap alteració en el pes dels animals, en el nombre de cries, en la quantitat de beguda ingerida i tampoc en la quantitat d'orina ni de femta excretats. La quantitat d'ingesta dels mascles control i mutants ha resultat significativament diferent, menjant més els animals Y221* (Fig. 48). Aquesta petita diferència per si sola no ens permet saber la valorar la importància de la dada.

En l'anàlisi del contingut d'aminoàcids en orina i en plasma, no es van observar diferències entre els animals control i mutants. Aquesta dada ens fa descartar la idea de què EEG1 pugui estar involucrat en la reabsorció d'aminoàcids al ronyó, a no ser que hi hagi un procés de compensació que ens emmascari l'efecte.

Per tal d'analitzar l'estat dels teixits del ratolí mutant, vam realitzar tincions d'hematoxilina-eosina a partir de talls de diversos teixits. Tant el cor, com la bufeta, el pulmó, el cervell, testicle i intestí, no presenten alteracions histològiques detectables mitjançant la tinció realitzada. Pel que fa al fetge, s'ha observat vacuolització i proliferació de cèl·lules d'Ito en la majoria d'animals analitzats (Fig. 50, Taula 10). En menor grau, també s'ha detectat anisocariosi, congestió, algun focus inflamatori, hiperplàsia i desorganització. Pel que fa al ronyó s'ha observat dilatació tubular en tots els animals analitzats, acumulació de material proteic a la llum del túbul, i alguna cèl·lula hipertròfica i vacuolada (Fig. 51, Taula 11). La vacuolització a nivell renal pot ser hidròpica i juntament amb la dilatació tubular podria ser deguda a alteracions de tipus hidroelectrolític.

La tendència a la hiperlisinèmia que observem en l'anàlisi d'aminoàcids en plasma, ens fa pensar que la falta d'EEG1 podria comprometre el catabolisme de lisina al fetge. En aquest sentit vam valorar el contingut intracel·lular d'aminoàcids en hepatòcits procedents d'animals control i Y221*. Tot i tractar-se d'estudis preliminars, de moment, no s'han observat diferències significatives entre els dos grups d'animals. Aquesta tendència a l'augment de lisina en sang també podria estar relacionada amb les alteracions observades a ronyó, ja que s'ha observat que la lisina és nefrotòxica en gossos i que provoca obstrucció tubular sobretot del túbul proximal contornejat (Asanuma *et al.* 2006).

També es van portar a terme estudis inicials per analitzar bioquímicament el plasma dels ratolins control i mutat, pel que fa a enzims que denoten dany hepàtic i renal. No es van observar canvis significatius en l'alanina aminotransferasa (ALT o SGPT), l'aspartat aminotransferasa (AST o SGOT), en proteïnes totals, urea i creatinina. Aquestes dades són només inicials (n=6) i cal repetir l'anàlisi amb major nombre d'animals per tal de reduir l'error entre grups (dades no mostrades).

La manca de fenotip clar en els ratolins EEG1-Y221*, ens fa pensar que potser és necessari estressar l'animal amb algun canvi dirigit, per tal de forçar un fenotip més marcat en l'animal. S'ha descrit que LAT3 augmenta la seva expressió en alguns teixits després de sotmetre ratolins a dejunis de 24h. Potser seria interessant dejunar els ratolins Y221* per observar si l'expressió de LAT4 canvia o si hi han alteracions a nivell hepàtic. També es podria suplementar la dieta dels animals amb lisina per tal d'aclarir si aquesta tendència no significativa a la hiperlisinèmia es confirma o no. Tot i això, queda clar que calen més estudis per definir el fenotip dels animals EEG1-Y221*, ja que només s'han observat canvis en la histologia renal i hepàtica.

Conclusions

- I. S'ha identificat LAT4, un nou transportador d'aminoàcids de la família SLC43. L'expressió de LAT4 en oòcits de *Xenopus* indueix una activitat de transport d'aminoàcids neutres i grans, independent del lío sodi i no transestimulable. Aquestes propietats concorden amb el subsistema prèviament descrit L₂ i afegixen un quart transportador responsable de l'activitat del sistema L, juntament amb LAT1, LAT2 i LAT3.
- II. El transport induït per LAT4 mostra una cinètica de dos components, essent la de baixa afinitat sensible al pretractament amb NEM. El RNA missatger de LAT4 s'expressa majoritàriament a placenta, intestí i ronyó. Al model cel·lular de ronyó (PCT) es detecta una activitat de transport de baixa afinitat a la cara basolateral compatible amb la descrita per LAT4.
- III. EEG1, el tercer membre de la família SLC43, es glicosila i expressat en sistemes heteròlegs arriba a la membrana plasmàtica de la cèl·lula, però no indueix activitat de transport pels aminoàcids assajats.
- IV. El RNA missatger de EEG1 es detecta majoritàriament a cor, fetge, i en menor grau a ronyó, pulmó i placenta, tant en teixits humans com de ratolí. S'ha generat un anticòs contra la proteïna que permet la seva detecció a ronyó, intestí i pulmó.
- V. El model murí d'EEG1 trunca la proteïna a la tirosina 221. Els ratolins homozigots per la mutació són viables, fèrtils i segueixen una herència mendeliana. No hiperexcreten aminoàcids en orina, ni tenen nivells elevats d'aminoàcids en sang. Suggestim que EEG1 no té un paper rellevant en la reabsorció renal d'aminoàcids sense descartar una possible compensació per altres transportadors.

Apèndixs

Apèndix 1- Generació d'anticossos contra la proteïna LAT4.

Per tal d'aprofundir en l'estudi del possible paper fisiològic de LAT4, ens vam plantejar la producció d'anticossos que reconeguessin a la proteïna. Vam abordar l'objectiu amb dues estratègies diferents: la generació de l'anticòs contra un pèptid d'una regió antigènica de la proteïna i contra una proteïna de fusió generada a partir d'un fragment de LAT4 fusionat a GST o a una cua d'histidines.

Anticòs policlonal anti-pèptid

En primer lloc, es va fer un estudi de les regions antigèniques de la proteïna segons criteris d'hidrofobicitat, antigenicitat, mobilitat i accessibilitat. Mitjançant un programa de l'empresa EvoQuest vam obtenir tres regions candidates mostrades a la Fig. 58.

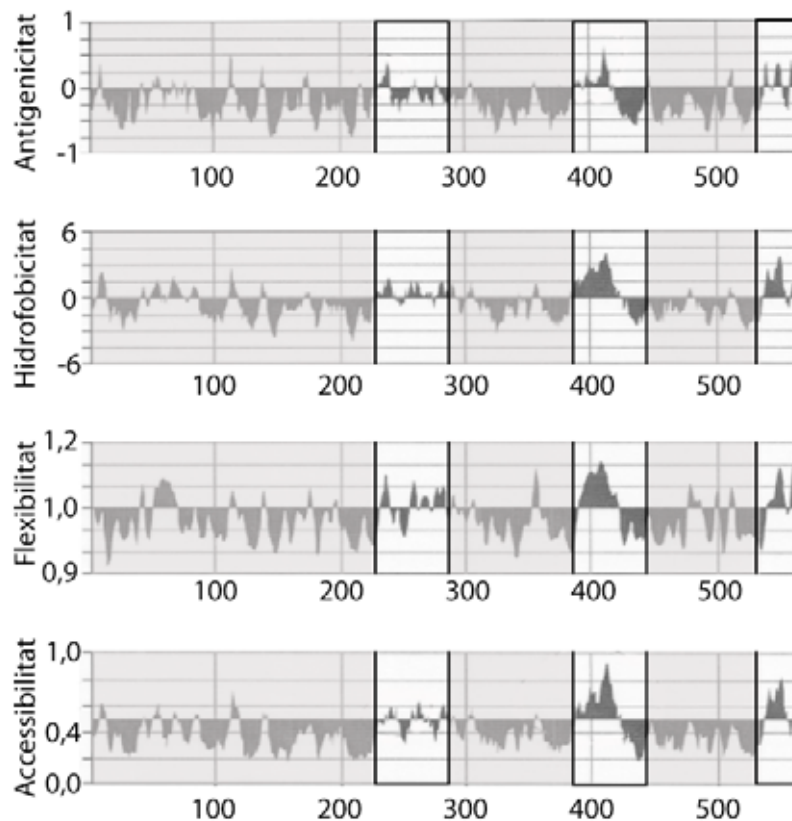


Fig. 58 Diagrames d'hidrofobicitat, antigenicitat, flexibilitat i accessibilitat per LAT4. Es mostren els patrons obtinguts pels 4 paràmetres mesurats (valors superiors a zero indiquen les zones favorables) per la proteïna LAT4 murina de 568 aminoàcids. Les 3 regions assenyalades en camp clar, entre els aminoàcids 230-290, 390-450 i 540-568, mostren les millors zones per dissenyar un pèptid antigènic.

Comparant aquest anàlisi de regions antigèniques amb d'altres (d'*Alpha Diagnostics, Open Biosystems, Princeton BioMolecules* ...) finalment es va escollir un pèptid de la regió carboxi terminal (posicions 552-568). Es va encarregar a l'empresa Eurogentec la síntesi del pèptid, la seva conjugació a KLH i la immunització de dos conills (Veure materials i mètodes, pàg. 101). Els sèrums dels dos conills (SP76 i SP77) que vàrem rebre es van testar per western blot en diferents condicions de dilució de sèrum, tampó de dilució (PBS, PBS-T, amb 1% llet, 5% llet...), amb mostres provinents de cèl·lules HeLa i OK transfectades amb LAT4 i oòcits que expressen LAT4, diferents condicions de bloqueig i de rentat (T^a, temps, detergent...), etc..

En totes les proves, es va utilitzar la proteïna LAT4 murina fusionada a l'epítip HA (mL4HA) com a control positiu d'expressió de la proteïna i per tenir una referència de l'alçada on s'havia de detectar la proteïna a la membrana de western blot. En tots els casos LAT4 es detecta, amb l'anticòs comercial 3F10 (anti-HA, *Babco*), com una banda ample de 65 a 90 KDa aproximadament.

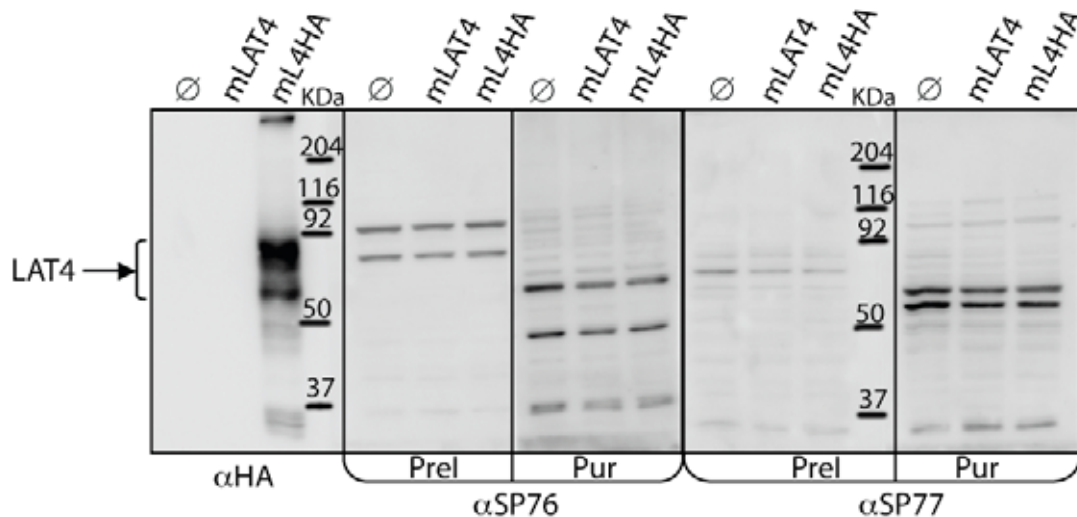


Fig. 59 Western blot amb α SP76 i α SP77 purificats. Western blot representatiu del conjunt realitzat per posar a punt els sèrums α SP76 i α SP77. Cada carril del gel mostrat correspon a 50 μ g (10 μ g en el cas de la membrana α HA) d'extracte total de proteïnes de cèl·lules HeLa sense transfectar (\emptyset) o transfectades amb mL4HA o mL4HA amb l'epítip HA (mL4HA). Després de l'electroforesi i la transferència, s'ha bloquejat i incubat la membrana amb els diferents sèrums α HA, pre-immune del conill SP76 (preI), α SP76 purificat (pur), pre-immune del conill SP77 i α SP77 purificat, a una dilució de 1/100 en 5% de llet descremada en tots els casos excepte pel sèrum α HA que s'ha utilitzat una dilució 1/1000. S'ha rentat la membrana amb PBS-T i els anticossos secundaris marcats amb peroxidasa utilitzats han estat d'anti-rata (α HA) i anti-conill (preimmunes, SP76 i SP77). S'ha revelat amb ECL i s'ha captat la luminescència a la cambra fosca de Fujifilm LAS-3000.

Al no ser capaços de detectar la proteïna en cap de les condicions assajades, es van purificar les Igs del sèrum. Tot i enriquir la mostra en l'anticòs generat no

vam aconseguir observar cap banda específica que poguéssim associar a LAT4 (Fig. 59).

Anticòs policlonal anti-proteïna

En segon lloc, es va optar per produir diferents proteïnes de fusió per utilitzar com a antígens en la immunització de conills. Aquesta estratègia es va abordar per dues vies diferents: la producció de proteïnes de fusió a partir de fragments de LAT4 units a la GST (glutatió S-transferasa) i a partir d'un fragment unit a una cua d'histidines. En tots dos casos es va escollir un sistema d'expressió, purificació i detecció de proteïnes quimèriques en *Escherichia coli* (*E.coli*), principalment perquè és un mètode ràpid, senzill i econòmic. Cal tenir present però, que algunes proteïnes eucariotes expressades en sistemes procarïotes, a vegades no es pleguen correctament i formen agregats insolubles (cossos d'inclusió). Per això, es va considerar l'estratègia de fusionar un fragment de LAT4 a una cua d'histidines, que permet utilitzar mètodes de solubilització desnaturalitzants i, per tant, recuperar proteïnes que al sobreexpressar-se queden retingudes en cossos d'inclusió.

- Producció de proteïnes de fusió amb GST

Es van construir els plasmidis adequats per expressar 3 proteïnes de fusió: GST-extrem NH₂, GST-6è loop i GST-extrem COOH, de 20, 99 i 32 aminoàcids cada fragment (Fig. 60).

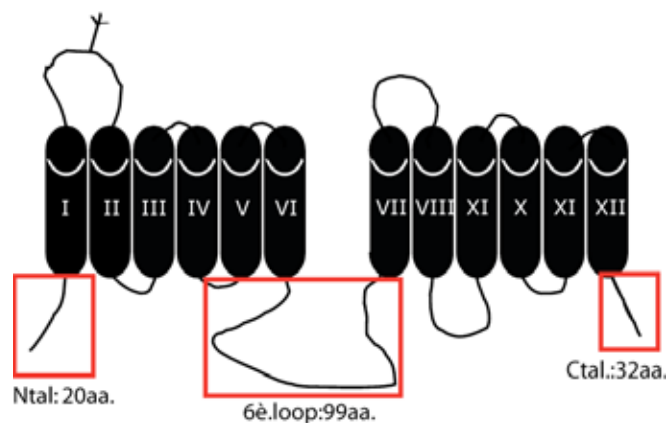


Fig. 60 Esquema dels fragments fusionats amb la GST. Es mostren els 12 putatius segments transmembrana i la situació dels 3 fragments dels quals s'han generat proteïnes de fusió: Ntal (extrem amino terminal) de 20 aminoàcids, el 6è.loop de 99 aminoàcids i l'extrem carboxi terminal (Ctal) de 32 aminoàcids.

El mètode escollit per l'expressió va ser un sistema induïble per IPTG, per tant, va ser necessari posar a punt les condicions òptimes per l'expressió de les 3

proteïnes de fusió (quantitat d'IPTG, temperatura, temps...). De les 3 proteïnes generades, la GST unida al fragment NH₂-terminal va resultar ser la que millor s'expressava i la més soluble en les condicions utilitzades i per tant, es va continuar amb la purificació d'aquesta. L'expressió de la proteïna GST-Ntal a gran escala es va realitzar durant 3 h a 37°C amb 0,2 mM d'IPTG. La mostra eluïda amb glutatió reduït, es va concentrar (*Amicon Ultra-15*) i dialitzar per tal de reduir la quantitat de sals i detergent que hi pogués haver a la mostra, i conservar la proteïna en tampó fosfat (PBS). Es van aconseguir 3,8 mg de la proteïna de fusió GST-Ntal (a 1,26 mg/ml), quantitat suficient per immunitzar dos conills i intentar generar anticossos contra LAT4 (Fig. 61).

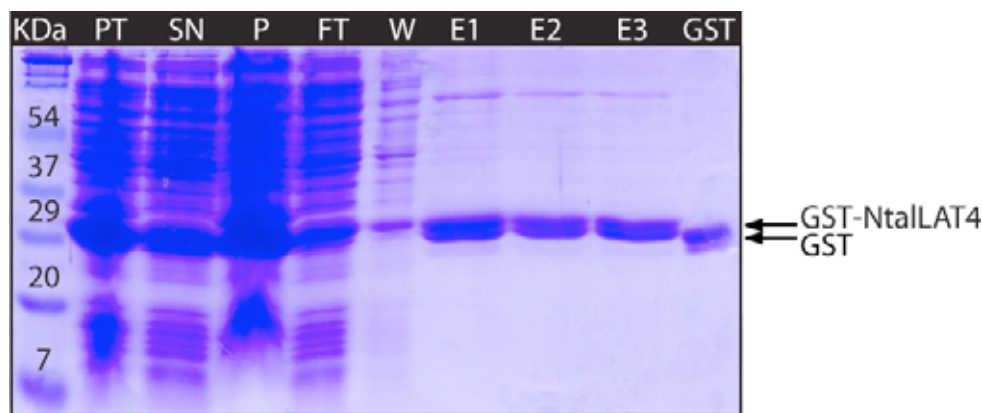


Fig. 61 Gel tenyit amb blau de Coomassie que mostra la purificació de GST-Ntal. Gel d'acrilamida del 15% tenyit amb blau brillant de Coomassie per detectar les proteïnes. Es mostren les proteïnes totals (PT), el sobrenedant obtingut de la lisis dels bacteris (SN) i el pellet (P), el que no queda retingut a la columna (FT), el rentat de la columna (W), les 3 elucions amb Glutatió reduït (E1-E3) i la GST lliure sense el fragment amino terminal. Es pot apreciar el canvi de mobilitat de la banda degut al canvi de pes de la proteïna (indicat amb unes fletxes).

- Producció de proteïnes de fusió amb cua d'histidines

Paral·lelament, per solucionar la insolubilitat dels altres dos fragments de la proteïna, es va subclonar el fragment 6è loop amb una cua de 6 histidines en un nou vector (pRTcHis). Només es va intentar la producció d'aquest fragment ja que era l'únic amb una mida suficientment gran com per ser injectat sense la companyia d'una altra proteïna (14 KDa amb les 6 His). Aquest vector ens permet la purificació de la proteïna mitjançant una columna de NTA-Ni²⁺ (Quiagen), tant en condicions natives com desnaturalitzants. Així, si el fragment de la proteïna quedés retinguda als cossos d'inclusió es podria intentar recuperar en condicions desnaturalitzants i tornar-la a plegar. També té l'avantatge de poder detectar la proteïna amb l'anticòs monoclonal anti-Xpress i de separar les histidines del fragment de LAT4 gràcies a la seqüència de tall per l'enteroquinasa.

Com en el cas anterior, es va posar a punt el creixement bacterià i la inducció de l'expressió. Les millors condicions es van aconseguir amb una concentració 1mM d'IPTG a 30°C durant tota la nit. Després de la lisi, la proteïna es localitzava a les dues fraccions (sobrenedant i *pellet*) en quasi la mateixa proporció. Per aquest motiu es va intentar la solubilització i purificació de la proteïna 6è loop-His de: a) la part soluble a partir d'un tampó suau per mantenir la proteïna en forma nativa, i b) de la part del pellet amb un tampó desnaturant (8 M urea). A) En la purificació de la part soluble del lisat, es van utilitzar unes condicions d'alta l'astringència en els rentats (300-600 mM NaCl) i es va afegir imidazole (20 mM) i NaCl (300 mM) tant en els tampons de rentat, com d'equilibrat i d'elució. Per l'elució de la proteïna de la columna es van utilitzar concentracions creixents d'imidazole, de 50 a 300 mM, un 20% de glicerol i 1 mM de de β -mercaptoetanol. Amb aquestes condicions es va obtenir la proteïna amb la màxima puresa. B) En el cas de la purificació de la proteïna de la part insoluble del lisat, es van utilitzar tampons d'elució on es disminuïa el pH (de 5,9 a 4,5) (Fig. 62).

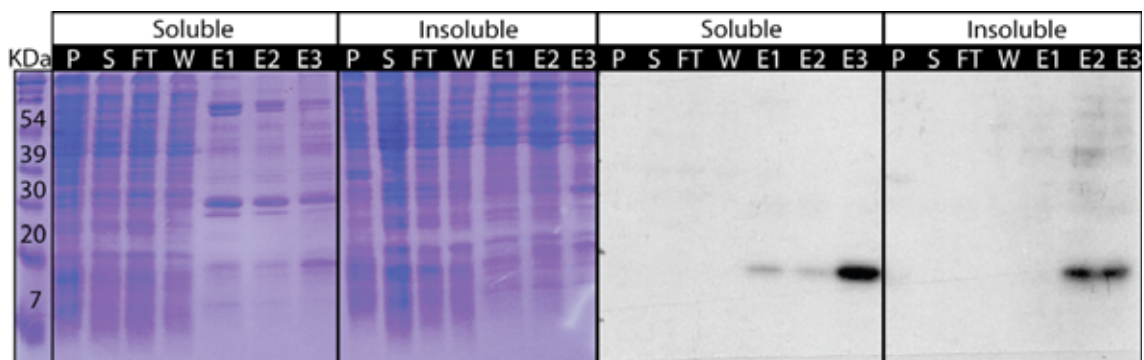


Fig. 62 Gel tenyit amb blau de Coomassie i western blot de la part soluble i insoluble de l'expressió del fragment de LAT4-His. La imatge de la esquerra correspon al gel tenyit amb blau de coomassie, on s'han separat les següents fraccions: Pellet (P), part soluble (S), proteïnes no unides o *flow through* (FT), rentat (W) i les 3 elucions (E1, E2 i E3). En la purificació de la part soluble s'han utilitzat diferents concentracions d'imidazole, 50 mM (E1), 100 mM (E2) i 300 mM (E3) per l'elució i en el de la part insoluble, la disminució del pH (E1 pH 5.9, E2 pH 5.0 i E3 pH 4,5) del tampó. La imatge de la dreta correspon a la imatge de western blot obtinguda del gel on s'ha carregat la mateixa quantitat de proteïnes que en l'anterior, revelat amb anti-Xpress. El tampó per la lisi de la part soluble conté 20 mM d'imidazole i 300 mM de NaCl, i el de la part insoluble 8 M d'urea.

Al veure que la puresa amb què aconseguíem purificar la proteïna de la part insoluble era menor que la de la part soluble, vam descartar l'opció de recuperar la proteïna per un mètode desnaturant. Un altre problema que se'ns plantejava a part de la puresa de la mostra, era la quantitat que n'obteníem, ja que després de concentrar les fraccions eluides, no podíem aconseguir més de 30 μ g de proteïna. Per tots aquest motius, vam decidir enviar a l'empresa Eurogentec la proteïna de

fusió GST-Ntal, de la qual disposàvem la suficient quantitat (3,8 mg) i una puresa acceptable perquè es generessin els sèrums en conills injectats amb la proteïna de fusió.

Els sèrums generats en els dos conills (1069-1070) es van testar seguint els mateixos passos que en el cas anterior. Cap dels sèrums generats era capaç de detectar la proteïna LAT4 ni per Western blot, ni per immunofluorescència en cèl·lules HeLa que sobreexpressaven la proteïna. Per aquest motiu vam descartar avançar en l'estudi del paper fisiològic de LAT4, i ens vam centrar en aprofundir en el coneixement del tercer membre de la família de transportadors d'aminoàcids SLC43.

Apèndix 2: Anàlisi de mutacions en LAT4

Gràcies a la participació en el projecte europeu EUGINDAT, vam tenir l'oportunitat de col·laborar amb l'empresa *Ingenium Pharmaceuticals*, la qual amb la tecnologia *INGENOTyping*, és capaç de generar colònies d'animals amb mutacions puntuals a diferents gens en poc temps. Aquesta tecnologia es basa en la utilització de l'agent químic altament mutagènic ENU i el posterior anàlisi de les mutacions generades a l'atzar que provoquen l'alteracions gèniques. En el cas del gen SLC43A2 es van localitzar 4 mutacions sense sentit que podrien ser d'interès per la generació de ratolins mutants per LAT4 (Taula 12).

Canvi de nucleòtid	Localització genòmica	Posició a la proteïna	Canvi aminoacídic	Símbol
C a T	exó 2	51	Thr a Met	T51M
T a A	exó 3	76	Asn a Lys	N76K
T a A	exó 10	372	Leu a Gln	L372Q
G a A	exó 1	1	Met a Ile	M1I

Taula 12. Mutacions ENU per LAT4.

Per tal d'analitzar el possible impacte de les mutacions detectades, vam generar els cDNAs amb les diferents mutacions puntuals i vam assajar el transport d'entrada de $[^3\text{H}]\text{Phe}$ en oòcits de *Xenopus* injectats amb els cRNAs de LAT4 mutats i salvatge.

Com es pot observar en la Fig. 63, només en el cas de la mutació en la primera metionina (M1I), l'activitat de transport induïda es va veure alterada, tot i que només es va reduir al voltant del 50%, percentatge insuficient alhora de generar un animal mutant per tal d'eliminar l'expressió d'una proteïna.

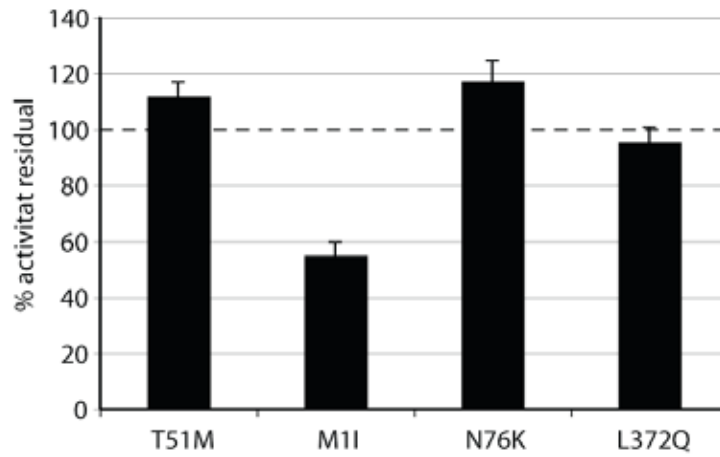


Fig. 63 Activitat de transport induïda per els mutants de LAT4. Percentatge d'activitat residual del transport obtingut en oòcits injectats amb el crRNA de LAT4 amb les mutacions Thr a Met a la posició 51, Met a Ile a la posició 1, Asn a Lys a la posició 76 i Leu a Glu a la posició 372. Amb una línia horitzontal retallada es mostra el 100% d'activitat. El % d'activitat residual s'ha calculat respecte a l'activitat induïda per el transportador salvatge i restant en cada cas el valor dels oòcits injectats amb aigua. S'ha utilitzat una concentració de substrat 10 μ M de Phe.

Apèndix 3: Article: Bodoy et al., *J. Biol. Chem.*, 2005

**Identification of LAT4, a Novel Amino Acid
Transporter with System L Activity**

J. Biol. Chem. Vol. 280, No. 12, pàg. 12002–12011, Març 2005.

URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/full/280/12/12002>

Susanna Bodoy, Lorena Martín, Antonio Zorzano, Manuel Palacín, Raúl Estévez, and
Joan Bertran

La doctoranda és responsable de totes les figures de l'article excepte les Fig.
1c i Fig. 1d, realitzades per la Dra. Lorena Martín.

Apèndix 4: Article: Ristic et al., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 2006

Neutral amino acid transport mediated by ortholog of imino acid transporter SIT1/SLC6A20 in opossum kidney cells

Am. J. Physiol. Renal Physiol. Vol. 290. pàg. F880 –F887, 2006.

URL: <http://ajprenal.physiology.org/cgi/content/full/290/4/F880>

Zorica Ristic, Simone M. R. Camargo, Elisa Romeo, Susana Bodoy, Joan Bertran, Manuel Palacin, Victoria Makrides, Esther M. Furrer, and François Verrey

Aquesta col·laboració és fruit del primer objectiu d'aquesta tesi, que pretenia la identificació i clonació de nous transportadors d'aminoàcids implicats en la reabsorció d'aminoàcids al ronyó. En un inici es va utilitzar el model de les cèl·lules d'opòssum (OK) perquè expressaven tots els transportadors d'aminoàcids implicats en el procés de reabsorció d'aminoàcids coneguts fins aquell moment. Al 2005 no es coneixia encara, la seqüència completa del genoma d'opòssum (*Didelphis virginiana*) i per tant, va ser necessària la clonació, mitjançant RT-PCR i encebadors degenerats i 3'-5'-RACE, dels gens identificats.

En aquest article, la doctoranda ha contribuït en la clonació de la seqüència dels gens d'opòssum *oXT2* i *oSIT/XT3*.

Apèndix 5: Plasmidis generats

Nom	Vector	Insert	Dianes d'alliberament	Extra
pCMVpSPORT6MGC34	pSPORT6	LAT4 humà	NcoI- SalI	comercial
pTLNMG34	pTLN	LAT4 humà	NcoI-XhoI	
pCDNA3hLAT4	pDNA3.1	LAT4 humà	HindIII-XhoI	
pCDNA3hLAT4CHA	pDNA3.1	LAT4 humà	HindIII-XhoI	HA Ctal
pCDNA3hLAT4SD	pDNA3.1	LAT4 humà	HindIII-XhoI	Mutació S297D
pCDNA3hLAT4SA	pDNA3.1	LAT4 humà	HindIII-XhoI	Mutació S297A
pCDNA3hLAT4C295A	pDNA3.1	LAT4 humà	HindIII-XhoI	Mutació C295A
pCDNA3hLAT4SAHA	pDNA3.1	LAT4 humà	HindIII-XhoI	Mutació S297A i HA
pCDNA3hLAT4SDHA	pDNA3.1	LAT4 humà	HindIII-XhoI	Mutació S297D i HA
pSUPERsiRNA1hLAT4	pSUPER	LAT4 humà		
pTLNmLAT4	pTLN	LAT4 murí	NcoI-EcoRI	
pTLNmLAT4HA	pTLN	LAT4 murí	NcoI-EcoRI	HA Ntal
pCDNA3mLAT4	pDNA3.1	LAT4 murí	NcoI-EcoRI	
pCDNA3mLAT4HA	pDNA3.1	LAT4 murí	NcoI-EcoRI	HA
pTLNmLAT4N76K	pTLN	LAT4 murí	NcoI-EcoRI	Mutació N76K
pTLNmLAT4M1I	pTLN	LAT4 murí	NcoI-EcoRI	Mutació M1I
pTLNmLAT4L372Q	pTLN	LAT4 murí	NcoI-EcoRI	Mutació L372Q
pTLNmLAT4T51M	pTLN	LAT4 murí	NcoI-EcoRI	Mutació T51M
pSUPERmLAT4siRNA1	pSUPER	LAT4 murí		siRNA1
pSUPERmLAT4siRNA2	pSUPER	LAT4 murí		siRNA2
pSUPERmLAT4siRNA3	pSUPER	LAT4 murí		siRNA3
pSUPERmLAT4siRNA4	pSUPER	LAT4 murí		siRNA4
pGEXCtal	pGEX	LAT4 murí		Fragment Ctal
pGEXNtal	pGEX	LAT4 murí		Fragment Ntal
pGEX7loop	pGEX	LAT4 murí		Fragment 7èloop
pRTSHis7loop	pRTC	LAT4 murí	BamHI-EcoRI	Fragment 7èloop amb cua de 6His
pTLNheEG1	pTLN	EEG1 humà	NcoI-XhoI	
pTLNheEG1NHA	pTLN	EEG1 humà	NcoI-XhoI	HA a Ntal
pTLNheEG1SA	pTLN	EEG1 humà	NcoI-XhoI	mutació S253A
pTLNheEG1SD	pTLN	EEG1 humà	NcoI-XhoI	mutació S253D
pCDNA3heEG1	pCDNA3	EEG1 humà	EcoRI-XhoI	
pDONR201mEEG1	pDONR	EEG1 murí		comercial
pTLBmEEG1	pTLB	EEG1 murí	EcoRI-XhoI	
pTLBmEEG1NHA	pTLB	EEG1 murí	EcoRI-XhoI	HA Ntal
pCDNA3mEEG1	pCDNA3	EEG1 murí	HindIII-EcoRI	
pCDNA3mEEG1NHA	pCDNA3	EEG1 murí	HindIII-EcoRI	HA Ntal
pOTB7hLAT3	pOTB7	hLAT3		
pCDNA3hLAT3	pCDNA3	hLAT3		
Altres				
pSFB91EGF	pSFB	eGFP	NcoI-EcoRI	Expressió GFP
Fragments de gens d'opòssum				
pGEMt-36.1	pGEMt	oXT2	EcoRI	fragment PCR 36.1
pGEMt-41.5	pGEMt	oSN1	EcoRI	fragment PCR 41.5
pGEMt-46.4	pGEMt	oXT3	EcoRI	fragment PCR 46.4
pGEMt-45.1	pGEMt	oXT2	EcoRI	fragment PCR 45.1

Apèndix 6: Llistat d'encebadors

Nom	Seqüència
mEEG1	
R1mEEG1	GGCGGGCCACAGTAGTCTTGAA
F2mEEG1	CCTTCCCCTGGCTACATCTTTG
F3mEEG1	CCTACCCACTGCCTCCCAACT
F4mEEG1	GCAGCTACAGTACGCCACCTTCA
R5mEEG1	GTAGTTGGGAGGCAGTGGGTA
F1EEG1RT	AGGAGCTGCGGTCAAAGGAATGT
R2EEG1RT	GCGCAGCGTCGAAAAGAGTGT
F3EEG1RT	CTGCCACCCAAGGAAGAGAAC
R4EEG1RT	GCGCAGCGTCGAAAAGAGT
FNHAmEEG1	TACCCGTATGACGTCCCAGACTATGCAAGCAAGGGCTTGCCCTTTACTTGCCACCTTG
RNHAmEEG1	GACGTCATACGGGTACATCTCGAGAGATCTGCCAAAGTTGAGCGTTTA
FCHAmEEG1	TATCCGTATGACGTCCCAGACTATGCGTAGGAATTCGGTACCTCTAGACCATGGTGG
RCHAmEEG1	GACGTCATACGGATAGGCATCCACAGACGATTTTGTCTTCTCAGC
Eeg 6-7F	GCTCCTGGGAGTACTGCTGTT
Eeg 6-8R	CATGCTCGTTATGCAGGAGT
hEEG1	
EEG1R1	GCATGGCCAGGAAGAGCA
EEG1F2	CCAGGGGCAGGGCAGAAG
EEG1F3	TGTGCCTCAGTCCCATCC
F4hEEG1	CCTCTGCAGGCTCAGCCGTGC
hEEG1R5	GAAAGTGCCTGCTACATGCCAGGT
EEG1S253DF	CAGTCAAAGGAGTTCTTGACGCGAAGGAAGAGACCCCAAG
EEG1S253DR	CCTGGGGTCTCTTCTTCGCGTCAAGGAACCTTTGACTG
EEG1S253AF	CAGTCAAAGGAGTTCTTGCCGCAAGGAAGAGACCCCAAG
EEG1S253AR	CCTGGGGTCTCTTCTTCGCGGCAAGGAACCTTTGACTG
FHANhEEG1	TACCCGTATGACGTCCCAGACTATGCGGGCCAGGGCTTGCCCTGCACGTGGCCACACTGCTG
hLAT4	
MGCR1	CAGAGCCAGGGCGATGAAGA
MGCF2	ATCGCCCTGGCTCTGAATGG
MGCF3	GCCGGCGCTGAGTGTGG
MGCF4	GCCTTCGCTTCACCAACC
TMhLAT4F	TTTTACTCCTACCTGTGTATGGAGCCAGAGAATGTACC
TMhLAT4R	GGTGACATTCTCTGGCTCCATACACAGGTAGGAGTAAAA
SDLAT4F	GAGGGCCACAAGCTGTGCTGGACACTGTGACCTGGAGGTG
SDLAT4R	CACCTCCAGGTCGACAGTGTCCAGGCACAGCTTGTGGCCCTC
C2ALAT4F	GACCTGGAGGTGAAGGCCAGCCGGATGCCGAGTGGCCCCC
C2ALAT4R	GGGGGCCACTGCGGCATCCGGCTGGGCCTTACCTCCAGGTC
hLAT4 R8	GGCATCCGGCTGGCACTTC
CALAT4R	CACCTCCAGGTCGACAGTGGACAGGGCCAGCTTGTGGCCCTC
sihLAT41F	GATCCCCCTCAACTGCTTCTTTAACTTTCAAGAGAAGTTAAACAAGCAGTTGAGTTTTTA
sihLAT41R	AGCTTAAAACTCAACTGCTTCTTTAATTCTCTTGAAGTTAAAGAAGCAGTTGAGGGG
sihLAT42R	GATCCCCCTCAACTGCTTCTTTAATTCAAGAGATTAAGAAGCAGTTGAGGATTTTTA
sihLAT42R	AGCTTAAAAATCCTCAACTGCTTCTTTAATTCTCTTGAATTAAGAAGCAGTTGAGGAGGG
sihLAT43F	GATCCCCGGAGAAAGACGCCAACAATTCAAGAGATTGGTTGGCGTCTTCTCCTTTTTA
sihLAT43R	AGCTTAAAAAGGAGAAAGACGCCAACAATTCTTGAATTGGTTGGCGTCTTCTCCGGG
sihLAT44F	GATCCCCGGATGTGTATGACCTTCACTTCAAGAGAGTGAAGGTCATACACATCCTTTTTA
sihLAT44R	AGCTTAAAAAGGATGTGTATGACCTTCACTTCTTGAAGTGAAGGTCATACACATCCGGG
mLAT4	
R1mEEG1	GGCGGGCCACAGTAGTCTTGAA
F2mEEG1	CCTTCCCCTGGCTACATCTTTG
F3mEEG1	CCTACCCACTGCCTCCCAACT
F4mEEG1	GCAGCTACAGTACGCCACCTTCA
F7LmLAT4	TATATCGGATCCTTCAACTGTTTCTTCAACTGGCCACTC
R7LmLAT4	TATATCGAATTCTCAAACGATGGGGCCGCTGCAGCATC
mLAT4M11F	GGCAGATCGCGAGCCACCATAGCGCCACCCTGGCC
mLAT4M11R	GGCCAGGGTGGGCGCTATGGTGGCTCGCGATCTGCC

Llistat d'encebadors

mLAT4L372QF	TTTGCGCACTCCAGCAGCTCTGCCTGCTGACAGC
mLAT4L372QR	GCTGTCAGCAGGCAGAGCTGCTGGAGTGCGCCAAA
NKLAT4R	CTGGCAGCTGAGCCAGCCTTTCATCCAGCTCACCTCCTC
NKLAT4F	GAGGAGGTGAGCTGGATGAAAGGCTGGCTCAGCTGCCAG
hLAT3	
F1hLAT3	TCCTGGCGCTGTCCCTGAATG
F3hLAT3	CAGCAACAAAAGGTGGCAGAG
R2hLAT3	AAACATGTTGGGCAGCGTGAG
R4hLAT3	AAGCAGCAGGTTGGTCAGG
LAT3S253DF	GGTTCGGATGCCTTCATGGACCCCCAGGATGTTCCGGGGC
LAT3S253AR	GCCCCGAACATCCTGGGGGGCCATGAAGGCATCCGAACC
LAT3S253AF	GGTTCGGATGCCTTCATGGCCCCCAGGATGTTCCGGGGC
LAT3S253DR	GCCCCGAACATCCTGGGGGTCCATGAAGGCATCCGAACC
mLAT3	
F1mLAT3	TCCTGGCACTGTCCTTGAATG
R2mLAT3	TGGCAGAAGACGCATAGGAG
F3mLAT3	TGTGACTGGTGGCAAGGAAC
R4mLAT3	CCAATGAGGGGGCAGGTGAG
Gens d'opòssum	
F3okXT2	CTCTCCTGGATGGGCTGTGCT
F4okXT2	GCCTAGTCTGCTGCCTTTGTGC
XT3 F1	CAGCGAATGCGGCAGGGAGTA
XT3 F2	GCATGGCTGGTGGTGTATCTGTG
OK XT3 R1	CTGGGTGGCTGCATTGATCCAGGC
OK XT3 R2	GGCCATTGGTGGCTCCATGCAGGG
XT3 R3	CGCTGGCAATGCCAACTCCTCG
XT2 F1	GAGTGGGACCTTACAGTGGCGG
XT2 F2	TCGCTGGCTTTTGGAGGACACA
OK XT2 R1	CTTCCCGCTGGATGCTTTGGTCTGG
OK XT2 R2	CGCTCCAGGTAGAGTGAGTCCTCG
sOKSN1-1	GACAGAGATGGTGGAGCTGGTG
sOKSN1-2	CCAGCAAGGAGCCACACTTC
sOKSN1-3	CTTGTCATACAGACCTTCCTG
SLC38 F1	GDAMGACHTCCTTTGGAATGTC
SLC38 F2	GCCATCATGGGCAGTGGNATCYTGGG
SLC38 F3	CCTAYGCCATGGCCAAYACBGG
SLC38 R1	TGRAAYTCTTGTARATSAC
Altres gens	
F1mPAT2	TTGATTGCCCTCTCCCTACCT
R2mPAT2	GAACACCAGAAGCCCCAGAAC
F1-mTAT1	CTGCTGCCCATCGTGAGTGTC
R2-mTAT1	AGCAATGCGGCCAAAGAGAAGC
VECTORS	
SMART IIA	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG
RACE CDS	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV
UPM LONG	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
UPM SHORT	CTAATACGACTCACTATAGGGC
T7pGEMt	TAATACGACTCACTATAGGG
SP6pGEMt	ATTTTAGGTGACACTATAGAA
FpRTCHis	GAAAAAGCGAAGCGGCACTGC
pTLNF1	TCCAACCAAACCGACTCTGACG

Bibliografia

A

- Aigner, B., B. Rathkolb, N. Herbach, M. Hrabe de Angelis, R. Wanke i E. Wolf (2008). "Diabetes models by screen for hyperglycemia in phenotype-driven ENU mouse mutagenesis projects." Am J Physiol Endocrinol Metab **294**(2): E232-40.
- Asanuma, K., K. Adachi, T. Sugimoto i S. Chiba (2006). "Effects of lysine-induced acute renal failure in dogs." J Toxicol Sci **31**(2): 87-98.
- Asghar, M., T. Hussain i M. F. Lokhandwala (2002). "Higher basal serine phosphorylation of D1A receptors in proximal tubules of old Fischer 344 rats." Am J Physiol Renal Physiol **283**(2): F350-5.
- Atluri, H., R. S. Talluri i A. K. Mitra (2008). "Functional activity of a large neutral amino acid transporter (LAT) in rabbit retina: a study involving the in vivo retinal uptake and vitreal pharmacokinetics of L-phenyl alanine." Int J Pharm **347**(1-2): 23-30.
- Augustin, M., R. Sedlmeier, T. Peters, U. Huffstadt, E. Kochmann, D. Simon, M. Schoniger, S. Garke-Mayerthaler, J. Laufs, M. Mayhaus, S. Franke, M. Klose, A. Graupner, M. Kurzmann, C. Zinser, A. Wolf, M. Voelkel, M. Kellner, M. Kilian, S. Seelig, A. Koppius, A. Teubner, D. Korthaus, M. Nehls i S. Wattler (2005). "Efficient and fast targeted production of murine models based on ENU mutagenesis." Mamm Genome **16**(6): 405-13.

B

- Babu, E., Y. Kanai, A. Chairoungdua, K. Kim do, Y. Iribe, S. Tangtrongsup, P. Jutabha, Y. Li, N. Ahmed, S. Sakamoto, N. Anzai, S. Nagamori i H. Endou (2003). "Identification of a novel system L amino acid transporter structurally distinct from heterodimeric amino acid transporters." J Biol Chem **278**(44): 43838-45.
- Balling, R. (2001). "ENU mutagenesis: analyzing gene function in mice." Annu Rev Genomics Hum Genet **2**: 463-92.
- 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 i et al. (1984). "Amino acid transport systems." Nature **311**(5984): 308.
- Bartoccioni, P., M. Rius, A. Zorzano, M. Palacin i J. Chillaron (2008). "Distinct classes of trafficking rBAT mutants cause the type I cystinuria phenotype." Hum Mol Genet.
- Bauch, C. i F. Verrey (2002). "Apical heterodimeric cystine and cationic amino acid transporter expressed in MDCK cells." Am J Physiol Renal Physiol **283**(1): F181-9.
- Beck, F. X., A. Burger-Kentischer i E. Muller (1998). "Cellular response to osmotic stress in the renal medulla." Pflugers Arch **436**(6): 814-27.
- Bertran, J., S. Magagnin, A. Werner, D. Markovich, J. Biber, X. Testar, A. Zorzano, L. C. Kuhn, M. Palacin i H. Murer (1992). "Stimulation of system γ (+)-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**(12): 5606-10.
- Bertran, J., A. Werner, J. Chillaron, V. Nunes, J. Biber, X. Testar, A. Zorzano, X. Estivill, H. Murer i 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**(20): 14842-9.
- Bertran, J., A. Werner, M. L. Moore, G. Stange, D. Markovich, J. Biber, X. Testar, A. Zorzano, M. Palacin i H. Murer (1992). "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**(12): 5601-5.
- Bertran, J., A. Werner, G. Stange, D. Markovich, J. Biber, X. Testar, A. Zorzano, M. Palacin i H. Murer (1992). "Expression of Na(+)-independent amino acid transport in *Xenopus laevis* oocytes by injection of rabbit kidney cortex mRNA." Biochem J **281** (Pt 3): 717-23.
- Bliss, T. V. i G. L. Collingridge (1993). "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus." Nature **361**(6407): 31-9.

- Blom, N., S. Gammeltoft i S. Brunak (1999). "Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites." *J Mol Biol* **294**(5): 1351-62.
- Blom, N., T. Sicheritz-Ponten, R. Gupta, S. Gammeltoft i S. Brunak (2004). "Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence." *Proteomics* **4**(6): 1633-49.
- Bode, B. P. (2001). "Recent molecular advances in mammalian glutamine transport." *J Nutr* **131**(9 Suppl): 2475S-85S; discussion 2486S-7S.
- Bode, B. P., N. Reuter, J. L. Conroy i W. W. Souba (1998). "Protein kinase C regulates nutrient uptake and growth in hepatoma cells." *Surgery* **124**(2): 260-7; discussion 267-8.
- Bodoy, S., L. Martin, A. Zorzano, M. Palacin, R. Estevez i J. Bertran (2005). "Identification of LAT4, a novel amino acid transporter with system L activity." *J Biol Chem* **280**(12): 12002-11.
- Boerner, P., M. Evans-Laying, H. S. U i M. H. Saier, Jr. (1986). "Polarity of neutral amino acid transport and characterization of a broad specificity transport activity in a kidney epithelial cell line, MDCK." *J Biol Chem* **261**(30): 13957-62.
- 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 i G. Sebastio (1999). "SLC7A7, encoding a putative permease-related protein, is mutated in patients with lysinuric protein intolerance." *Nat Genet* **21**(3): 297-301.
- Bovée, K. C., M. Bush, J. Dietz, P. Jezyk i S. Segal (1981). "Cystinuria in the maned wolf of South America." *Science* **212**(4497): 919-20.
- Boyd, C. A. (2008). "Facts, fantasies and fun in epithelial physiology." *Exp Physiol* **93**(3): 303-14.
- Brenner, S. (1974). "The genetics of *Caenorhabditis elegans*." *Genetics* **77**(1): 71-94.
- Bröer, A., J. A. Cavanaugh, J. E. Rasko i S. Broer (2006). "The molecular basis of neutral aminoacidurias." *Pflugers Arch* **451**(4): 511-7.
- Bröer, A., K. Klingel, S. Kowalczyk, J. E. Rasko, J. Cavanaugh i S. Broer (2004). "Molecular cloning of mouse amino acid transport system B0, a neutral amino acid transporter related to Hartnup disorder." *J Biol Chem* **279**(23): 24467-76.
- Bröer, S. (2002). "Adaptation of plasma membrane amino acid transport mechanisms to physiological demands." *Pflugers Arch* **444**(4): 457-66.
- Bröer, S. (2008). "Amino Acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia." *Physiol Rev* **88**(1): 249-86.
- Bröer, S., A. Bröer i B. Hamprecht (1995). "The 4F2hc surface antigen is necessary for expression of system L-like neutral amino acid-transport activity in C6-BU-1 rat glioma cells: evidence from expression studies in *Xenopus laevis* oocytes." *Biochem J* **312** (Pt 3): 863-70.

C

- Calonge, M. J., P. Gasparini, J. Chillaron, M. Chillon, M. Gallucci, F. Rousaud, L. Zelante, X. Testar, B. Dallapiccola, F. Di Silverio i et al. (1994). "Cystinuria caused by mutations in rBAT, a gene involved in the transport of cystine." *Nat Genet* **6**(4): 420-5.
- Campbell, W. A. i 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**(20): 16877-84.
- Cartier, N., R. Lacave, V. Vallet, J. Hagege, R. Hellio, S. Robine, E. Pringault, F. Cluzeaud, P. Briand, A. Kahn i et al. (1993). "Establishment of renal proximal tubule cell lines by targeted oncogenesis in transgenic mice using the L-pyruvate kinase-SV40 (T) antigen hybrid gene." *J Cell Sci* **104** (Pt 3): 695-704.

- Castle, W. E., F. W. Carpenter, A. H. Clark, S. O. Mast i W. M. Barrows (1906). "The effects on inbreeding, cross-breeding, and selection upon the fertility and variability of *Drosophila*." Proc. Amer. Acad. Arts Sci. **41**: 731-786.
- Cecchini, G., G. S. Payne i D. L. Oxender (1977). "Reconstitution of neutral amino acid transport from partially purified membrane components from Ehrlich ascites tumor cells." J Supramol Struct **7**(3-4): 481-7.
- Cleal, J. K., P. Brownbill, K. M. Godfrey, J. M. Jackson, A. A. Jackson, C. P. Sibley, M. A. Hanson i R. M. Lewis (2007). "Modification of fetal plasma amino acid composition by placental amino acid exchangers in vitro." J Physiol **582**(Pt 2): 871-82.
- Coghill, E. L., A. Hugill, N. Parkinson, C. Davison, P. Glenister, S. Clements, J. Hunter, R. D. Cox i S. D. Brown (2002). "A gene-driven approach to the identification of ENU mutants in the mouse." Nat Genet **30**(3): 255-6.
- Cohen, G. N. i H. V. Rickenberg (1956). "Not Available." Ann Inst Pasteur (Paris) **91**(5): 693-720.
- Cole, K. A., R. F. Chuaqui, K. Katz, S. Pack, Z. Zhuang, C. E. Cole, J. C. Lyne, W. M. Linehan, L. A. Liotta i M. R. Emmert-Buck (1998). "cDNA sequencing and analysis of POV1 (PB39): a novel gene up-regulated in prostate cancer." Genomics **51**(2): 282-7.
- Colman, A., S. Bhamra i G. Valle (1984). "Post-translational modification of exogenous proteins in *Xenopus laevis* oocytes." Biochem Soc Trans **12**(6): 932-7.
- Cuénot, L. (1902). "La loi de Mendel et l'hérédité de la pigmentation chez les souris." Archives de Zoologie Expérimentale et Générale **3**(3): 27-30.
- Culiat, C. T., M. L. Klebig, Z. Liu, H. Monroe, B. Stanford, J. Desai, S. Tandan, L. Hughes, M. K. Kerley, D. A. Carpenter, D. K. Johnson, E. M. Rinchik i Q. Li (2005). "Identification of mutations from phenotype-driven ENU mutagenesis in mouse chromosome 7." Mamm Genome **16**(8): 555-66.
- Chairoungdua, A., Y. Kanai, H. Matsuo, J. Inatomi, D. K. Kim i 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**(52): 49390-9.
- Chen, Y., D. Yee, K. Dains, A. Chatterjee, J. Cavalcoli, E. Schneider, J. Om, R. P. Woychik i T. Magnuson (2000). "Genotype-based screen for ENU-induced mutations in mouse embryonic stem cells." Nat Genet **24**(3): 314-7.
- Chenchik, A., L. Diachenko, F. Moqadam, V. Tarabykin, S. Lukyanov i P. D. Siebert (1996). "Full-length cDNA cloning and determination of mRNA 5' and 3' ends by amplification of adaptor-ligated cDNA." Biotechniques **21**(3): 526-34.
- Chesney, R. W. (2001). Iminoglycinuria. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases. C. H. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly i D. Valle. New York, Mc.Graw-Hill: 4971-4982.
- Chillarón, J., R. Roca, A. Valencia, A. Zorzano i M. Palacin (2001). "Heteromeric amino acid transporters: biochemistry, genetics, and physiology." Am J Physiol Renal Physiol **281**(6): F995-1018.
- Chintala, S., W. Li, M. L. Lamoreux, S. Ito, K. Wakamatsu, E. V. Sviderskaya, D. C. Bennett, Y. M. Park, W. A. Gahl, M. Huizing, R. A. Spritz, S. Ben, E. K. Novak, J. Tan i R. T. Swank (2005). "Slc7a11 gene controls production of pheomelanin pigment and proliferation of cultured cells." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(31): 10964-9.
- Choi, D. W. (1987). "Ionic dependence of glutamate neurotoxicity." J. Neurosci. **7**: 369-379.
- Christensen, H. N. (1975). Biological Transport. Reading, MA, W.A.Benjamin, Inc.
- Christensen, H. N. (1990). "Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism." Physiol Rev **70**(1): 43-77.
- Christensen, H. N., L. M. Albritton, D. K. Kakuda i C. L. MacLeod (1994). "Gene-product designations for amino acid transporters." J Exp Biol **196**: 51-7.

Christensen, H. N., M. E. Handlogten, I. Lam, H. S. Tager i R. Zand (1969). "A bicyclic amino acid to improve discriminations among transport systems." J Biol Chem **244**(6): 1510-20.

D

Dalton, P., H. C. Christian, C. W. Redman, I. L. Sargent i C. A. Boyd (2007). "Membrane trafficking of CD98 and its ligand galectin 3 in BeWo cells--implication for placental cell fusion." FEBS J **274**(11): 2715-27.

Daniel, H. (2004). "Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport." Annu Rev Physiol **66**: 361-84.

Daniel, H. i G. Kottra (2004). "The proton oligopeptide cotransporter family SLC15 in physiology and pharmacology." Pflugers Arch **447**(5): 610-8.

Danilczyk, U., R. Sarao, C. Remy, C. Benabbas, G. Stange, A. Richter, S. Arya, J. A. Pospisilik, D. Singer, S. M. Camargo, V. Makrides, T. Ramadan, F. Verrey, C. A. Wagner i J. M. Penninger (2006). "Essential role for collectrin in renal amino acid transport." Nature **444**(7122): 1088-91.

Dantzler, W. H. i S. Silbernagl (1988). "Amino acid transport by juxtamedullary nephrons: distal reabsorption and recycling." Am J Physiol **255**(3 Pt 2): F397-407.

Dello Strologo, 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 i G. Rizzoni (2002). "Comparison between SLC3A1 and SLC7A9 cystinuria patients and carriers: a need for a new classification." J Am Soc Nephrol **13**(10): 2547-53.

Deves, R., S. Angelo i P. Chavez (1993). "N-ethylmaleimide discriminates between two lysine transport systems in human erythrocytes." J Physiol **468**: 753-66.

Deves, R. i 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**(3): 165-77.

DiBartola, S. P., D. J. Chew i M. L. Horton (1991). "Cystinuria in a cat." J Am Vet Med Assoc **198**(1): 102-4.

Diez-Sampedro, A., B. A. Hirayama, C. Osswald, V. Gorboulev, K. Baumgarten, C. Volk, E. M. Wright i H. Koepsell (2003). "A glucose sensor hiding in a family of transporters." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(20): 11753-8.

Dumont, J. N. (1972). "Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals." J Morphol **136**(2): 153-79.

E

Estevez, R., M. Camps, A. M. Rojas, X. Testar, R. Deves, M. A. Hediger, A. Zorzano i M. Palacin (1998). "The amino acid transport system y⁺L/4F2hc is a heteromultimeric complex." FASEB J **12**(13): 1319-29.

F

Fang, H., W. Tong, R. Perkins, L. Shi, H. Hong, X. Cao, Q. Xie, S. H. Yim, J. M. Ward, H. C. Pitot i Y. P. Dragan (2005). "Bioinformatics approaches for cross-species liver cancer analysis based on microarray gene expression profiling." BMC Bioinformatics **6 Suppl 2**: S6.

Feliubadaló, L., M. L. Arbones, S. Manas, J. Chillaron, J. Visa, M. Rodes, F. Rousaud, A. Zorzano, M. Palacin i V. Nunes (2003). "Slc7a9-deficient mice develop cystinuria non-I and cystine urolithiasis." Hum Mol Genet **12**(17): 2097-108.

Feliubadaló, L., M. Font, J. Purroy, F. Rousaud, X. Estivill, V. Nunes, E. Golomb, M. Centola, I. Aksentijevich, Y. Kreiss, B. Goldman, M. Pras, D. L. Kastner, E. Pras, P. Gasparini, L. Bisceglia, E. Beccia, M. Gallucci, L. de Sanctis, A. Ponzzone, G. F. Rizzoni, L. Zelante, M. T. Bassi, A. L. George, Jr., M. Manzoni, A. De Grandi, M. Riboni, J. K. Endsley, A. Ballabio, G. Borsani, N. Reig, E. Fernandez, R. Estevez, M. Pineda, D. Torrents, M. Camps, J. Lloberas, A. Zorzano i M. Palacin (1999). "Non-type I cystinuria caused by

- mutations in SLC7A9, encoding a subunit (bo,+AT) of rBAT." *Nat Genet* **23**(1): 52-7.
- Fenczik, C. A., T. Sethi, J. W. Ramos, P. E. Hughes i M. H. Ginsberg (1997). "Complementation of dominant suppression implicates CD98 in integrin activation." *Nature* **390**(6655): 81-5.
- Fenczik, C. A., R. Zent, M. Dellos, D. A. Calderwood, J. Satriano, C. Kelly i M. H. Ginsberg (2001). "Distinct domains of CD98hc regulate integrins and amino acid transport." *J Biol Chem* **276**(12): 8746-52.
- Feral, C. C., N. Nishiya, C. A. Fenczik, H. Stuhlmann, M. Slepak i M. H. Ginsberg (2005). "CD98hc (SLC3A2) mediates integrin signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(2): 355-60.
- Fernández, E., D. Torrents, J. Chillaron, R. Martin Del Rio, A. Zorzano i M. Palacin (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**(4): 837-47.
- Fernández, E., D. Torrents, A. Zorzano, M. Palacin i J. Chillaron (2005). "Identification and functional characterization of a novel low affinity aromatic-preferring amino acid transporter (arpAT). One of the few proteins silenced during primate evolution." *J Biol Chem* **280**(19): 19364-72.
- Font-Llitjós, M., L. Feliubadaló, M. Espino, R. Cleries, S. Manas, I. M. Frey, S. Puertas, G. Colell, S. Palomo, J. Aranda, J. Visa, M. Palacin i V. Nunes (2007). "Slc7a9 knockout mouse is a good cystinuria model for antilithiasic pharmacological studies." *Am J Physiol Renal Physiol* **293**(3): F732-40.
- Fort, J., L. R. de la Ballina, H. E. Burghardt, C. Ferrer-Costa, J. Turnay, C. Ferrer-Orta, I. Uson, A. Zorzano, J. Fernandez-Recio, M. Orozco, M. A. Lizarbe, I. Fita i M. Palacin (2007). "The structure of human 4F2hc ectodomain provides a model for homodimerization and electrostatic interaction with plasma membrane." *J Biol Chem* **282**(43): 31444-52.
- Freeman, H. J. i Y. S. Kim (1978). "Digestion and absorption of protein." *Annu Rev Med* **29**: 99-116.
- Friesema, E. C., R. Docter, E. P. Moerings, F. Verrey, E. P. Krenning, G. Hennemann i T. J. Visser (2001). "Thyroid hormone transport by the heterodimeric human system L amino acid transporter." *Endocrinology* **142**(10): 4339-48.
- Fuchs, B. C. i B. P. Bode (2005). "Amino acid transporters ASCT2 and LAT1 in cancer: partners in crime?" *Semin Cancer Biol* **15**(4): 254-66.
- Fukuhara, D., Y. Kanai, A. Chairoungdua, E. Babu, F. Bessho, T. Kawano, Y. Akimoto, H. Endou i K. Yan (2007). "Protein characterization of NA+-independent system L amino acid transporter 3 in mice: a potential role in supply of branched-chain amino acids under nutrient starvation." *Am J Pathol* **170**(3): 888-98.
- Furriols, M., J. Chillarón, C. Mora, A. Castello, J. Bertran, M. Camps, X. Testar, S. Vilaro, A. Zorzano i 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**(36): 27060-8.
- Furutani-Seiki, M., T. Sasado, C. Morinaga, H. Suwa, K. Niwa, H. Yoda, T. Deguchi, Y. Hirose, A. Yasuoka, T. Henrich, T. Watanabe, N. Iwanami, D. Kitagawa, K. Saito, S. Asaka, M. Osakada, S. Kunimatsu, A. Momoi, H. Elmasri, C. Winkler, M. Ramialison, F. Loosli, R. Quiring, M. Carl, C. Grabher, S. Winkler, F. Del Bene, A. Shinomiya, Y. Kota, T. Yamanaka, Y. Okamoto, K. Takahashi, T. Todo, K. Abe, Y. Takahama, M. Tanaka, H. Mitani, T. Katada, H. Nishina, N. Nakajima, J. Wittbrodt i H. Kondoh (2004). "A systematic genome-wide screen for mutations affecting organogenesis in Medaka, *Oryzias latipes*." *Mech Dev* **121**(7-8): 647-58.

- Gallardo, M. A., J. L. Albi i J. Sanchez (1996). "Uptake of L-leucine by trout red blood cells and peripheral lymphocytes." J Membr Biol **152**(1): 57-63.
- Gandolfi, S. A., J. A. Maier, P. G. Petronini, K. P. Wheeler i A. F. Borghetti (1987). "Multicomponent analysis of amino acid transport System L in normal and virus-transformed fibroblasts." Biochim Biophys Acta **904**(1): 29-35.
- Gao, J., T. Chen, G. Hu, Y. Gong, B. Qiang, J. Yuan i X. Peng (2008). "Nectin-like molecule 1 is a glycoprotein with a single N-glycosylation site at N290KS which influences its adhesion activity." Biochim Biophys Acta.
- Garcia-Sancho, J., A. Sanchez i H. N. Christensen (1977). "Free carboxylate groups required for transport of neutral amino acids by the Ehrlich ascites-tumor cell." Biochim Biophys Acta **465**(2): 426-8.
- Geerts, A. (2001). "History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells." Semin Liver Dis **21**(3): 311-35.
- Ghijzen, W. E., A. I. da Silva Aresta Belo, M. Zuiderwijk i F. H. Lopez da Silva (1999). "Compensatory change in EAAC1 glutamate transporter in rat hippocampus CA1 region during kindling epileptogenesis." Neurosci Lett **276**(3): 157-60.
- Goldin, A. L. (1992). "Maintenance of *Xenopus laevis* and oocyte injection." Methods Enzymol **207**: 266-79.
- Gopinath, C., D. E. Prentice i D. J. Lewis (1988). Atlas of experimental toxicological pathology, Mtp Press.
- Grosse, J., P. Tarnow, H. Rompler, B. Schneider, R. Sedlmeier, U. Huffstadt, D. Korthaus, M. Nehls, S. Wattler, T. Schoneberg, H. Biebermann i M. Augustin (2006). "N-ethyl-N-nitrosourea-based generation of mouse models for mutant G protein-coupled receptors." Physiol Genomics **26**(3): 209-17.

H

- Halestrap, A. P. i D. Meredith (2004). "The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond." Pflugers Arch **447**(5): 619-28.
- Halvorson, H. O. i G. N. Cohen (1958). "[Incorporation of endogenous and exogenous amino acids into proteins of yeast.]." Ann Inst Pasteur (Paris) **95**(1): 73-87.
- Harnevik, L., A. Hoppe i P. Soderkvist (2006). "SLC7A9 cDNA cloning and mutational analysis of SLC3A1 and SLC7A9 in canine cystinuria." Mamm Genome **17**(7): 769-76.
- Hediger, M. A., M. F. Romero, J. B. Peng, A. Rolfs, H. Takanaga i E. A. Bruford (2004). "The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteinsIntroduction." Pflugers Arch **447**(5): 465-8.
- Hemler, M. E. i 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**(2): 623-8.
- Henderson, N. C. i J. P. Iredale (2007). "Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution." Clin Sci (Lond) **112**(5): 265-80.
- Henthorn, P. S., J. Liu, T. Gidalevich, J. Fang, M. L. Casal, D. F. Patterson i U. Giger (2000). "Canine cystinuria: polymorphism in the canine SLC3A1 gene and identification of a nonsense mutation in cystinuric Newfoundland dogs." Hum Genet **107**(4): 295-303.
- Hertz, R. (1959). "Choriocarcinoma of women maintained in serial passage in hamster and rat." Proc Soc Exp Biol Med **102**: 77-81.
- Hidalgo, I. J. i R. T. Borchardt (1990). "Transport of a large neutral amino acid (phenylalanine) in a human intestinal epithelial cell line: Caco-2." Biochim Biophys Acta **1028**(1): 25-30.
- Hitotsumachi, S., D. A. Carpenter i W. L. Russell (1985). "Dose-repetition increases the mutagenic effectiveness of N-ethyl-N-nitrosourea in mouse spermatogonia." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(19): 6619-21.

- Ho, S. N., H. D. Hunt, R. M. Horton, J. K. Pullen i L. R. Pease (1989). "Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction." Gene **77**(1): 51-9.
- Hoffert, J. D., G. Wang, T. Pisitkun, R. F. Shen i M. A. Knepper (2007). "An automated platform for analysis of phosphoproteomic datasets: application to kidney collecting duct phosphoproteins." J Proteome Res **6**(9): 3501-8.
- Homberg, J. R., J. D. Olivier, B. M. Smits, J. D. Mul, J. Mudde, M. Verheul, O. F. Nieuwenhuizen, A. R. Cools, E. Ronken, T. Cremers, A. N. Schoffemeer, B. A. Ellenbroek i E. Cuppen (2007). "Characterization of the serotonin transporter knockout rat: a selective change in the functioning of the serotonergic system." Neuroscience **146**(4): 1662-76.
- Hrabe de Angelis, M. H., H. Flawinkel, H. Fuchs, B. Rathkolb, D. Soewarto, S. Marschall, S. Heffner, W. Pargent, K. Wuensch, M. Jung, A. Reis, T. Richter, F. Alessandrini, T. Jakob, E. Fuchs, H. Kolb, E. Kremmer, K. Schaeble, B. Rollinski, A. Roscher, C. Peters, T. Meitinger, T. Strom, T. Steckler, F. Holsboer, T. Klopstock, F. Gekeler, C. Schindewolf, T. Jung, K. Avraham, H. Behrendt, J. Ring, A. Zimmer, K. Schughart, K. Pfeffer, E. Wolf i R. Balling (2000). "Genome-wide, large-scale production of mutant mice by ENU mutagenesis." Nat Genet **25**(4): 444-7.

I

- Ito, T. i M. Nemoto (1952). "[Kupfer's cells and fat storing cells in the capillary wall of human liver.]" Okajimas Folia Anat Jpn **24**(4): 243-58.

J

- Jack, D. L., I. T. Paulsen i M. H. Saier (2000). "The amino acid/polyamine/organocation (APC) superfamily of transporters specific for amino acids, polyamines and organocations." Microbiology **146** (Pt 8): 1797-814.
- Jain-Vakkalagadda, B., S. Dey, D. Pal i A. K. Mitra (2003). "Identification and functional characterization of a Na⁺-independent large neutral amino acid transporter, LAT1, in human and rabbit cornea." Invest Ophthalmol Vis Sci **44**(7): 2919-27.
- Justice, M. J., D. A. Carpenter, J. Favor, A. Neuhauser-Klaus, M. Hrabe de Angelis, D. Soewarto, A. Moser, S. Cordes, D. Miller, V. Chapman, J. S. Weber, E. M. Rinchik, P. R. Hunsicker, W. L. Russell i V. C. Bode (2000). "Effects of ENU dosage on mouse strains." Mamm Genome **11**(7): 484-8.

K

- Kaira, K., N. Oriuchi, H. Imai, K. Shimizu, N. Yanagitani, N. Sunaga, T. Hisada, S. Tanaka, T. Ishizuka, Y. Kanai, H. Endou, T. Nakajima i M. Mori (2008). "Prognostic significance of L-type amino acid transporter 1 expression in resectable stage I-III nonsmall cell lung cancer." Br J Cancer **98**(4): 742-8.
- Kanai, Y. (1997). "Family of neutral and acidic amino acid transporters: molecular biology, physiology and medical implications." Curr Opin Cell Biol **9**(4): 565-72.
- Kanai, Y. i M. A. Hediger (2003). "The glutamate and neutral amino acid transporter family: physiological and pharmacological implications." Eur J Pharmacol **479**(1-3): 237-47.
- Kanai, Y., H. Segawa, K. Miyamoto, H. Uchino, E. Takeda i 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**(37): 23629-32.
- Kanai, Y., M. G. Stelzner, W. S. Lee, R. G. Wells, D. Brown i M. A. Hediger (1992). "Expression of mRNA (D2) encoding a protein involved in amino acid transport in S3 proximal tubule." Am J Physiol **263**(6 Pt 2): F1087-92.
- Kanner, B. I. i S. Schuldiner (1987). "Mechanism of transport and storage of neurotransmitters." CRC Crit Rev Biochem **22**(1): 1-38.

- Karinch, A. M., C. M. Lin, C. L. Wolfgang, M. Pan i W. W. Souba (2002). "Regulation of expression of the SN1 transporter during renal adaptation to chronic metabolic acidosis in rats." *Am J Physiol Renal Physiol* **283**(5): F1011-9.
- Keays, D. A., T. G. Clark i J. Flint (2006). "Estimating the number of coding mutations in genotypic- and phenotypic-driven N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) screens." *Mamm Genome* **17**(3): 230-8.
- Keays, D. A., G. Tian, K. Poirier, G. J. Huang, C. Siebold, J. Cleak, P. L. Oliver, M. Fray, R. J. Harvey, Z. Molnar, M. C. Pinon, N. Dear, W. Valdar, S. D. Brown, K. E. Davies, J. N. Rawlins, N. J. Cowan, P. Nolan, J. Chelly i J. Flint (2007). "Mutations in alpha-tubulin cause abnormal neuronal migration in mice and lissencephaly in humans." *Cell* **128**(1): 45-57.
- Kim, D., Y. Kanai, A. Chairoungdua, H. Matsuo, S. Cha i H. Endou (2001). "Expression Cloning of a Na⁺-independent Aromatic Amino Acid Transporter with Structural Similarity to H⁺/Monocarboxylate Transporters." *J. Biol. Chem.* **276**(20): 17221-17228.
- Kim, D. K., Y. Kanai, H. W. Choi, S. Tangtrongsup, A. Chairoungdua, E. Babu, K. Tachampa, N. Anzai, Y. Iribe i H. Endou (2002). "Characterization of the system L amino acid transporter in T24 human bladder carcinoma cells." *Biochim Biophys Acta* **1565**(1): 112-21.
- Kim, D. K., I. J. Kim, S. Hwang, J. H. Kook, M. C. Lee, B. A. Shin, C. S. Bae, J. H. Yoon, S. G. Ahn, S. A. Kim, Y. Kanai, H. Endou i J. K. Kim (2004). "System L-amino acid transporters are differently expressed in rat astrocyte and C6 glioma cells." *Neurosci Res* **50**(4): 437-46.
- Kleta, R., E. Romeo, Z. Ristic, T. Ohura, C. Stuart, M. Arcos-Burgos, M. H. Dave, C. A. Wagner, S. R. Camargo, S. Inoue, N. Matsuura, A. Helip-Wooley, D. Bockenbauer, R. Warth, I. Bernardini, G. Visser, T. Eggermann, P. Lee, A. Chairoungdua, P. Jutabha, E. Babu, S. Nilwarangkoon, N. Anzai, Y. Kanai, F. Verrey, W. A. Gahl i A. Koizumi (2004). "Mutations in SLC6A19, encoding BOAT1, cause Hartnup disorder." *Nat Genet* **36**(9): 999-1002.
- Kohler, P. O. i W. E. Bridson (1971). "Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma." *J Clin Endocrinol Metab* **32**(5): 683-7.
- Koyama, H., C. Goodpasture, M. M. Miller, R. L. Teplitz i A. D. Riggs (1978). "Establishment and characterization of a cell line from the American opossum (*Didelphys virginiana*)." *In Vitro* **14**(3): 239-46.
- Kozak, M. (1991). "Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation." *J Biol Chem* **266**(30): 19867-70.
- Kubar, J. i N. Rochet (1990). "Basal autophosphorylation of insulin receptor occurs preferentially on the receptor conformation exhibiting high affinity for insulin and stabilizes this conformation." *Cell Signal* **2**(6): 587-94.
- Kudo, Y. i C. A. Boyd (2001). "Characterisation of L-tryptophan transporters in human placenta: a comparison of brush border and basal membrane vesicles." *J Physiol* **531**(Pt 2): 405-16.
- Kuhne, A., R. Kaiser, M. Schirmer, U. Heider, S. Muhlke, W. Niere, T. Overbeck, K. Hohloch, L. Trumper, O. Sezer i J. Brockmoller (2007). "Genetic polymorphisms in the amino acid transporters LAT1 and LAT2 in relation to the pharmacokinetics and side effects of melphalan." *Pharmacogenet Genomics* **17**(7): 505-17.

L

- Lacave, R., M. Bens, N. Cartier, V. Vallet, S. Robine, E. Pringault, A. Kahn i A. Vandewalle (1993). "Functional properties of proximal tubule cell lines derived from transgenic mice harboring L-pyruvate kinase-SV40 (T) antigen hybrid gene." *J Cell Sci* **104** (Pt 3): 705-12.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Lash, L. H. i D. P. Jones (1984). "Characteristics of cysteine uptake in intestinal basolateral membrane vesicles." *Am J Physiol* **247**(4 Pt 1): G394-401.

- Lee, M. R. (1993). "Dopamine and the kidney: ten years on." Clin Sci (Lond) **84**(4): 357-75.
- Leeb-Lundberg, L. M., S. Cotecchia, J. W. Lomasney, J. F. DeBernardis, R. J. Lefkowitz i M. G. Caron (1985). "Phorbol esters promote alpha 1-adrenergic receptor phosphorylation and receptor uncoupling from inositol phospholipid metabolism." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(17): 5651-5.
- Leeb-Lundberg, L. M. F., S. Cotecchia, J. W. Lomasney, J. F. DeBernardis, R. J. Lefkowitz i M. G. Caron (1985). "Phorbol Esters Promote alpha 1-adrenergic Receptor Phosphorylation and Receptor Uncoupling from Inositol Phospholipid Metabolism." Proceedings of the National Academy of Sciences **82**(17): 5651-5655.
- Levy, H. L. (2001). Hartnup disorder. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. S. CR, A. L. Beaudet, W. S. Sly i V. D. New York, Mc.Graw Hill: 4957-4969.
- Li, M. S., L. Sun, T. Satoh, L. M. Fisher i C. J. Spry (1995). "Human eosinophil major basic protein, a mediator of allergic inflammation, is expressed by alternative splicing from two promoters." Biochem J **305 (Pt 3)**: 921-7.
- Li, S. i A. R. Whorton (2005). "Identification of stereoselective transporters for S-nitroso-L-cysteine: role of LAT1 and LAT2 in biological activity of S-nitrosothiols." J Biol Chem **280**(20): 20102-10.
- Lieblich, J. M., B. D. Weintraub, G. H. Krauth, P. O. Kohler, A. S. Rabson i S. W. Rosen (1976). "Ectopic and eutopic secretion of chorionic gonadotropin and its sub-nits in vitro: comparison of clonal strains from carcinomas of lung and placenta." J Natl Cancer Inst **56**(5): 911-7.
- Liu, F., M. J. Soares i K. L. Audus (1997). "Permeability properties of monolayers of the human trophoblast cell line BeWo." Am J Physiol **273**(5 Pt 1): C1596-604.
- Liu, R. R., C. E. Brown i T. H. Murphy (2007). "Differential regulation of cell proliferation in neurogenic zones in mice lacking cystine transport by xCT." Biochem Biophys Res Commun **364**(3): 528-33.
- Lukkarinen, M., K. Nanto-Salonen, K. Pulkki, M. Aalto i O. Simell (2003). "Oral supplementation corrects plasma lysine concentrations in lysinuric protein intolerance." Metabolism **52**(7): 935-8.
- M**
- Mackinnon, A. C., S. L. Farnworth, P. S. Hodgkinson, N. C. Henderson, K. M. Atkinson, H. Leffler, U. J. Nilsson, C. Haslett, S. J. Forbes i T. Sethi (2008). "Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3." J Immunol **180**(4): 2650-8.
- MacLeod, C. L. (1996). "Regulation of cationic amino acid transporter (CAT) gene expression." Biochem Soc Trans **24**(3): 846-52.
- Malakauskas, S. M., H. Quan, T. A. Fields, S. J. McCall, M. J. Yu, W. M. Kourany, C. W. Frey i T. H. Le (2007). "Aminoaciduria and altered renal expression of luminal amino acid transporters in mice lacking novel gene collectrin." Am J Physiol Renal Physiol **292**(2): F533-44.
- Mann, G. E. i S. Peran (1986). "Basolateral amino acid transport systems in the perfused exocrine pancreas: sodium-dependency and kinetic interactions between influx and efflux mechanisms." Biochim Biophys Acta **858**(2): 263-74.
- Manner, C. K., B. Nicholson i C. L. MacLeod (2003). "CAT2 arginine transporter deficiency significantly reduces iNOS-mediated NO production in astrocytes." J Neurochem **85**(2): 476-82.
- Mastroberardino, L., B. Spindler, R. Pfeiffer, P. J. Skelly, J. Loffing, C. B. Shoemaker i F. Verrey (1998). "Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family." Nature **395**(6699): 288-91.
- Matsuo, H., Y. Kanai, 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 i

- H. Endou (2002). "Identification of a novel Na⁺-independent acidic amino acid transporter with structural similarity to the member of a heterodimeric amino acid transporter family associated with unknown heavy chains." J Biol Chem **277**(23): 21017-26.
- McGivan, J. D. i M. Pastor-Anglada (1994). "Regulatory and molecular aspects of mammalian amino acid transport." Biochem J **299 (Pt 2)**: 321-34.
- Medzihradzky, K. F. (2008). "Characterization of site-specific N-glycosylation." Methods Mol Biol **446**: 293-316.
- Meier, C., Z. Ristic, S. Klauser i F. Verrey (2002). "Activation of system L heterodimeric amino acid exchangers by intracellular substrates." EMBO J **21**(4): 580-9.
- Miledi, R., I. Parker i K. Sumikawa (1982). "Synthesis of chick brain GABA receptors by frog oocytes." Proc R Soc Lond B Biol Sci **216**(1205): 509-15.
- Milne, M. D. (1964). "Disorders of Amino-Acid Transport." Br Med J **1**(5379): 327-36.
- Mitsumoto, Y., K. Sato, T. Ohyashiki i T. Mohri (1986). "Leucine-proton cotransport system in Chang liver cell." J Biol Chem **261**(10): 4549-54.
- Mural R. J., Adams M.D., Myers E.W., Smith H.O., Miklos G.L., Wides R. i Halpern A. (2002). "A comparison of whole-genome shotgun-derived mouse chromosome16 and the human genome." Science **296**: 1661-71.

N

- Nakamura, E., M. Sato, H. Yang, F. Miyagawa, M. Harasaki, K. Tomita, S. Matsuoka, A. Noma, K. Iwai i 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**(5): 3009-16.
- Nicholson, B., C. K. Manner, J. Kleeman i C. L. MacLeod (2001). "Sustained nitric oxide production in macrophages requires the arginine transporter CAT2." J Biol Chem **276**(19): 15881-5.
- Nicholson, B., T. Sawamura, T. Masaki i C. L. MacLeod (1998). "Increased Cat3-mediated cationic amino acid transport functionally compensates in Cat1 knockout cell lines." J Biol Chem **273**(24): 14663-6.
- Novak, D. A., M. S. Kilberg i M. J. Beveridge (1994). "Ontogeny and plasma-membrane domain localization of amino acid transport system L in rat liver." Biochem J **301 (Pt 3)**: 671-4.

O

- Olivier, J. D., M. G. van der Hart, R. P. van Swelm, P. J. Dederen, J. R. Homberg, T. Cremers, P. M. Deen, E. Cuppen, A. R. Cools i B. A. Ellenbroek (2008). "A study in male and female 5-HT transporter knockout rats: An animal model for anxiety and depression disorders." Neuroscience.
- Olney, J. W. i T. De Gubareff (1978). "Glutamate neurotoxicity and Huntington's chorea." Nature **271**(5645): 557-9.
- Olli, R. A., H. J. Rajaniemi, R. Rydbeck i K. Metsikko (1993). "Polarity and fusion of JAR choriocarcinoma cells as assessed by enveloped viral glycoproteins." Exp Cell Res **206**(2): 276-82.
- Omidi, Y., J. Barar, S. Ahmadian, H. R. Heidari i M. Gumbleton (2008). "Characterization and astrocytic modulation of system L transporters in brain microvasculature endothelial cells." Cell Biochemistry and Function **9999**(9999): n/a.
- Oxender, D. L. i H. N. Christensen (1963). "Distinct Mediating Systems for the Transport of Neutral Amino Acids by the Ehrlich Cell." J Biol Chem **238**: 3686-99.
- Oxender, D. L. i H. N. Christensen (1963). "Evidence for two types of mediation of neutral and amino-acid transport in Ehrlich cells." Nature **197**: 765-7.
- Oxender, D. L., M. Lee i G. Cecchini (1977). "Regulation of amino acid transport activity and growth rate of animal cells in culture." J Biol Chem **252**(8): 2680-3.

P

- Palacín, M., R. Estevez, J. Bertran i A. Zorzano (1998). "Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters." *Physiol Rev* **78**(4): 969-1054.
- Palacín, M., V. Nunes, M. Font-Llitjos, M. Jimenez-Vidal, J. Fort, E. Gasol, M. Pineda, L. Feliubadalo, J. Chillaron i A. Zorzano (2005). "The genetics of heteromeric amino acid transporters." *Physiology (Bethesda)* **20**: 112-24.
- Parekh, R. B., A. G. Tse, R. A. Dwek, A. F. Williams i T. W. Rademacher (1987). "Tissue-specific N-glycosylation, site-specific oligosaccharide patterns and lentil lectin recognition of rat Thy-1." *EMBO J* **6**(5): 1233-44.
- Parker, M. D., R. Musa-Aziz, J. D. Rojas, I. Choi, C. M. Daly i W. F. Boron (2008). "Characterization of human SLC4A10 as an electroneutral Na/HCO₃ cotransporter (NBCn2) with Cl⁻ self-exchange activity." *J Biol Chem*.
- Parmacek, M. S., B. A. Karpinski, K. M. Gottesdiener, C. B. Thompson i J. M. Leiden (1989). "Structure, expression and regulation of the murine 4F2 heavy chain." *Nucleic Acids Res* **17**(5): 1915-31.
- Pattillo, R. A., G. O. Gey, E. Delfs i R. F. Mattingly (1968). "Human hormone production in vitro." *Science* **159**(822): 1467-9.
- Pawlak, C. R., C. Sanchis-Segura, D. Soewarto, S. Wagner, M. Hrabe de Angelis i R. Spanagel (2008). "A phenotype-driven ENU mutagenesis screen for the identification of dominant mutations involved in alcohol consumption." *Mamm Genome* **19**(2): 77-84.
- Pawlik, T. M., W. W. Souba, T. J. Sweeney i B. P. Bode (2000). "Phorbol esters rapidly attenuate glutamine uptake and growth in human colon carcinoma cells." *J Surg Res* **90**(2): 149-55.
- Peghini, P., J. Janzen i W. Stoffel (1997). "Glutamate transporter EAAC-1-deficient mice develop dicarboxylic aminoaciduria and behavioral abnormalities but no neurodegeneration." *EMBO J* **16**(13): 3822-32.
- Penuela, S., R. Bhalla, X. Q. Gong, K. N. Cowan, S. J. Celetti, B. J. Cowan, D. Bai, Q. Shao i D. W. Laird (2007). "Pannexin 1 and pannexin 3 are glycoproteins that exhibit many distinct characteristics from the connexin family of gap junction proteins." *J Cell Sci* **120**(Pt 21): 3772-83.
- Perkins, C. P., V. Mar, J. R. Shutter, J. del Castillo, D. M. Danilenko, E. S. Medlock, I. L. Ponting, M. Graham, K. L. Stark, Y. Zuo, J. M. Cunningham i R. A. Bosselman (1997). "Anemia and perinatal death result from loss of the murine ecotropic retrovirus receptor mCAT-1." *Genes Dev* **11**(7): 914-25.
- Peters, T., C. Thaete, S. Wolf, A. Popp, R. Sedlmeier, J. Grosse, M. C. Nehls, A. Russ i V. Schlueter (2003). "A mouse model for cystinuria type I." *Hum Mol Genet* **12**(17): 2109-20.
- Petronini, P. G., G. Piedimonte i A. F. Borghetti (1982). "The regulation by cell density of amino acid transport system L in SV40 3T3 cells." *Biochim Biophys Acta* **693**(1): 13-21.
- Pfeiffer, R., B. Spindler, J. Loffing, P. J. Skelly, C. B. Shoemaker i F. Verrey (1998). "Functional heterodimeric amino acid transporters lacking cysteine residues involved in disulfide bond." *FEBS Lett* **439**(1-2): 157-62.
- Pineda, M., E. Fernández, D. Torrents, R. Estevez, C. Lopez, M. Camps, J. Lloberas, A. Zorzano i M. Palacin (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**(28): 19738-44.
- Plaitakis, A., E. Constantakakis i J. Smith (1988). "The neuroexcitotoxic amino acids glutamate and aspartate are altered in the spinal cord and brain in amyotrophic lateral sclerosis." *Ann Neurol* **24**(3): 446-9.
- Prager, G. W., C. C. Feral, C. Kim, J. Han i M. H. Ginsberg (2007). "CD98hc (SLC3A2) interaction with the integrin beta subunit cytoplasmic domain mediates adhesive signaling." *J Biol Chem* **282**(33): 24477-84.

Prasad, P. D., H. Wang, W. Huang, R. Kekuda, D. P. Rajan, F. H. Leibach i V. Ganapathy (1999). "Human LAT1, a subunit of system L amino acid transporter: molecular cloning and transport function." Biochem Biophys Res Commun **255**(2): 283-8.

Q

Quackenbush, E., M. Clabby, K. M. Gottesdiener, J. Barbosa, N. H. Jones, J. L. Strominger, S. Speck i 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**(18): 6526-30.

Quan, H., K. Athirakul, W. C. Wetsel, G. E. Torres, R. Stevens, Y. T. Chen, W. M. Coffman i M. G. Caron (2004). "Hypertension and impaired glycine handling in mice lacking the orphan transporter XT2." Molecular and cellular biology **24**(10): 4166-4173.

Quwailid, M. M., A. Hugill, N. Dear, L. Vizor, S. Wells, E. Horner, S. Fuller, J. Weedon, H. McMath, P. Woodman, D. Edwards, D. Campbell, S. Rodger, J. Carey, A. Roberts, P. Glenister, Z. Lalanne, N. Parkinson, E. L. Coghill, R. McKeone, S. Cox, J. Willan, A. Greenfield, D. Keays, S. Brady, N. Spurr, I. Gray, J. Hunter, S. D. Brown i R. D. Cox (2004). "A gene-driven ENU-based approach to generating an allelic series in any gene." Mamm Genome **15**(8): 585-91.

R

Rabito, C. A. i M. V. Karish (1982). "Polarized amino acid transport by an epithelial cell line of renal origin (LLC-PK1). The basolateral systems." J Biol Chem **257**(12): 6802-8.

Rajan, D. P., R. Kekuda, W. Huang, L. D. Devoe, F. H. Leibach, P. D. Prasad i V. Ganapathy (2000). "Cloning and functional characterization of a Na(+)-independent, broad-specific neutral amino acid transporter from mammalian intestine." Biochim Biophys Acta **1463**(1): 6-14.

Ramadan, T., S. M. Camargo, V. Summa, P. Hunziker, S. Chesnov, K. M. Pos i F. Verrey (2006). "Basolateral aromatic amino acid transporter TAT1 (Slc16a10) functions as an efflux pathway." J Cell Physiol **206**(3): 771-9.

Reig, N., J. Chillarón, P. Bartoccioni, E. Fernandez, A. Bendahan, A. Zorzano, B. Kanner, M. Palacin i J. Bertran (2002). "The light subunit of system b(o,+) is fully functional in the absence of the heavy subunit." EMBO J **21**(18): 4906-14.

Richardson, L. i M. Dym (1994). Bio/Techniques **17**: 847.

Rossier, G., C. Meier, C. Bauch, V. Summa, B. Sordat, F. Verrey i L. C. Kuhn (1999). "LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine." J Biol Chem **274**(49): 34948-54.

Rothstein, J. D., L. J. Martin i R. W. Kuncl (1992). "Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis." N Engl J Med **326**(22): 1464-8.

Russel, E. S. (1978). In origins of Inbred Mice. Origins and history of mouse inbred strains: contributions of Clarence Cook Little. H. C. Morse. New York, Academic Press: 34-43.

Russell, W. L., E. M. Kelly, P. R. Hunsicker, J. W. Bangham, S. C. Maddux i E. L. Phipps (1979). "Specific-locus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(11): 5818-9.

S

Salter, M., R. G. Knowles i C. I. Pogson (1986). "Transport of the aromatic amino acids into isolated rat liver cells. Properties of uptake by two distinct systems." Biochem J **233**(2): 499-506.

Sambrook, J., E. F. Fritsch i T. Maniatis (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sang, J., Y. P. Lim, M. Panzica, P. Finch i N. L. Thompson (1995). "TA1, a highly conserved oncofetal complementary DNA from rat hepatoma, encodes an

- integral membrane protein associated with liver development, carcinogenesis, and cell activation." *Cancer Res* **55**(5): 1152-9.
- Sato, H., A. Shiiya, M. Kimata, K. Maebara, M. Tamba, Y. Sakakura, N. Makino, F. Sugiyama, K. Yagami, T. Moriguchi, S. Takahashi i S. Bannai (2005). "Redox imbalance in cystine/glutamate transporter-deficient mice." *J Biol Chem* **280**(45): 37423-9.
- Segal, S. i S. O. Thier (1995). Cystinuria. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*. C. R. Scriver, W. S. Sly i A. L. Beaudet. New York, McGraw-Hill. **III**: 3581-3601.
- Segawa, H., Y. Fukasawa, K. Miyamoto, E. Takeda, H. Endou i Y. Kanai (1999). "Identification and functional characterization of a Na⁺-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity." *J Biol Chem* **274**(28): 19745-51.
- Segel, G. B., W. Simon i M. A. Lichtman (1984). "Multicomponent analysis of amino acid transport in human lymphocytes. Diminished L-system transport in chronic leukemic B lymphocytes." *J Clin Invest* **74**(1): 17-24.
- Seow, H. F., S. Bröer, A. Broer, C. G. Bailey, S. J. Potter, J. A. Cavanaugh i J. E. Rasko (2004). "Hartnup disorder is caused by mutations in the gene encoding the neutral amino acid transporter SLC6A19." *Nat Genet* **36**(9): 1003-7.
- Shih, T. M., R. D. Smith, L. Toro i A. L. Goldin (1998). "High-level expression and detection of ion channels in *Xenopus* oocytes." *Methods Enzymol* **293**: 529-56.
- Shikano, N., Y. Kanai, K. Kawai, N. Ishikawa i H. Endou (2003). "Characterization of 3-[125I]iodo-alpha-methyl-L-tyrosine transport via human L-type amino acid transporter 1." *Nucl Med Biol* **30**(1): 31-7.
- Siebert, P. D., A. Chenchik, D. E. Kellogg, K. A. Lukyanov i S. A. Lukyanov (1995). "An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA." *Nucleic Acids Res* **23**(6): 1087-8.
- Sigel, E. (1990). "Use of *Xenopus* oocytes for the functional expression of plasma membrane proteins." *J Membr Biol* **117**(3): 201-21.
- Silver, L. M. (1995). *Mouse Genetics. Concepts and Applications*. Oxford Oxford University Press.
- Simell, O., J. Perheentupa, J. Rapola, J. K. Visakorpi i L. E. Eskelin (1975). "Lysinuric protein intolerance." *Am J Med* **59**(2): 229-40.
- Soler, M., O. Tornavaca, E. Sole, A. Menoyo, D. Hardy, J. F. Catterall, A. Vandewalle i A. Meseguer (2002). "Hormone-specific regulation of the kidney androgen-regulated gene promoter in cultured mouse renal proximal-tubule cells." *Biochem J* **366**(Pt 3): 757-66.
- Soriano-Garcia, J. F., M. Torras-Llort, R. Ferrer i M. Moreto (1998). "Multiple pathways for L-methionine transport in brush-border membrane vesicles from chicken jejunum." *J Physiol* **509** (Pt 2): 527-39.
- Sperandeo, M. P., P. Annunziata, A. Bozzato, P. Piccolo, L. Maiuri, M. D'Armiento, A. Ballabio, G. Corso, G. Andria, G. Borsani i G. Sebastio (2007). "Slc7a7 disruption causes fetal growth retardation by downregulating Igf1 in the mouse model of lysinuric protein intolerance." *Am J Physiol Cell Physiol* **293**(1): C191-8.
- Staats, J. (1964). "Standardized Nomenclature for Inbred Strains of Mice. Third Listing." *Cancer Res* **24**: 147-68.
- Stoffel, W., R. Korner, D. Wachtmann i B. U. Keller (2004). "Functional analysis of glutamate transporters in excitatory synaptic transmission of GLAST1 and GLAST1/EAAC1 deficient mice." *Brain Res Mol Brain Res* **128**(2): 170-81.
- Storey, B. T., C. Fugere, A. Lesieur-Brooks, C. Vaslet i N. L. Thompson (2005). "Adenoviral modulation of the tumor-associated system L amino acid transporter, LAT1, alters amino acid transport, cell growth and 4F2/CD98 expression with cell-type specific effects in cultured hepatic cells." *Int J Cancer* **117**(3): 387-97.

- Story, M. T., R. O. Husa i R. A. Pattillo (1974). "Independent dibutyryl cyclic adenosine monophosphate stimulation of human chorionic gonadotropin and estrogen secretion by malignant trophoblast cells in vitro." J Clin Endocrinol Metab **39**(5): 877-81.
- Stuart, R. O., A. Pavlova, D. Beier, Z. Li, Y. Krijanovski i S. K. Nigam (2001). "EEG1, a putative transporter expressed during epithelial organogenesis: comparison with embryonic transporter expression during nephrogenesis." Am J Physiol Renal Physiol **281**(6): F1148-56.
- Su, T. Z., M. R. Feng i M. L. Weber (2005). "Mediation of highly concentrative uptake of pregabalin by L-type amino acid transport in Chinese hamster ovary and Caco-2 cells." J Pharmacol Exp Ther **313**(3): 1406-15.
- Swarna, M., D. N. Rao i P. P. Reddy (1989). "Dicarboxylic aminoaciduria associated with mental retardation." Hum Genet **82**(3): 299-300.

T

- Tanaka, K., K. Watase, T. Manabe, K. Yamada, M. Watanabe, K. Takahashi, H. Iwama, T. Nishikawa, N. Ichihara, T. Kikuchi, S. Okuyama, N. Kawashima, S. Hori, M. Takimoto i K. Wada (1997). "Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1." Science **276**(5319): 1699-702.
- Tate, S. S., N. Yan i S. Udenfriend (1992). "Expression cloning of a Na(+)-independent neutral amino acid transporter from rat kidney." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(1): 1-5.
- Taylor, P. M., C. J. Egan i M. J. Rennie (1989). "Transport of glutamine across blood-facing membranes of perfused rat jejunum." Am J Physiol **256**(4 Pt 1): E550-8.
- Tenenhouse, A. i J. H. Quastel (1960). "Amino acid accumulation in Ehrlich ascites carcinoma cells." Can J Biochem Physiol **38**: 1311-26.
- Torrents, D., R. Estevez, M. Pineda, E. Fernandez, J. Lloberas, Y. B. Shi, A. Zorzano i M. Palacin (1998). "Identification and characterization of a membrane protein (γ +L amino acid transporter-1) that associates with 4F2hc to encode the amino acid transport activity γ +L. A candidate gene for lysinuric protein intolerance." J Biol Chem **273**(49): 32437-45.
- Tsumura, H., N. Suzuki, H. Saito, M. Kawano, S. Otake, Y. Kozuka, H. Komada, M. Tsurudome i Y. Ito (2003). "The targeted disruption of the CD98 gene results in embryonic lethality." Biochem Biophys Res Commun **308**(4): 847-51.
- Tusnády, G. E. i I. Simon (1998). "Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction." J Mol Biol **283**(2): 489-506.
- Tusnády, G. E. i I. Simon (2001). "The HMMTOP transmembrane topology prediction server." Bioinformatics **17**(9): 849-50.

U

- Uchino, H., Y. Kanai, D. K. Kim, M. F. Wempe, A. Chairoungdua, E. Morimoto, M. W. Anders i 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**(4): 729-37.
- Ullrich, K. J., G. Rumrich i S. Kloss (1974). "Sodium dependence of the amino acid transport in the proximal convolution of the rat kidney." Pflugers Arch **351**(1): 49-60.
- Unanue, E. R. (2007). "Ito cells, stellate cells, and myofibroblasts: new actors in antigen presentation." Immunity **26**(1): 9-10.

V

- Van Winkle, L. J., A. L. Campione i J. M. Gorman (1988). "Na⁺-independent transport of basic and zwitterionic amino acids in mouse blastocysts by a shared system and by processes which distinguish between these substrates." J Biol Chem **263**(7): 3150-63.

- Van Winkle, L. J., D. K. Kakuda i C. L. MacLeod (1995). "Multiple components of transport are associated with murine cationic amino acid transporter (mCAT) expression in *Xenopus* oocytes." *Biochim Biophys Acta* **1233**(2): 213-6.
- Veljkovic, E., S. Stasiuk, P. J. Skelly, C. B. Shoemaker i F. Verrey (2004). "Functional characterization of *Caenorhabditis elegans* heteromeric amino acid transporters." *J Biol Chem* **279**(9): 7655-62.
- Verrey, F. (2003). "System L: heteromeric exchangers of large, neutral amino acids involved in directional transport." *Pflugers Arch* **445**(5): 529-33.
- Verrey, F., E. I. Closs, C. A. Wagner, M. Palacin, H. Endou i Y. Kanai (2004). "CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters." *Pflugers Arch* **447**(5): 532-42.
- Verrey, F., C. Meier, G. Rossier i L. C. Kuhn (2000). "Glycoprotein-associated amino acid exchangers: broadening the range of transport specificity." *Pflugers Arch* **440**(4): 503-12.

W

- Wagner, C. A., F. Lang i S. Broer (2001). "Function and structure of heterodimeric amino acid transporters." *Am J Physiol Cell Physiol* **281**(4): C1077-93.
- Wagner, C. A., D. Loffing-Cueni, Q. Yan, N. Schulz, P. Fakitsas, M. Carrel, T. Wang, F. Verrey, J. P. Geibel, G. Giebisch, S. C. Hebert i J. Loffing (2008). "Mouse Model of Type II Bartters Syndrome. II. Altered Expression of Renal Sodium- and Water-Transporting Proteins." *Am J Physiol Renal Physiol*.
- Wang, C. Z., H. Yano, K. Nagashima i S. Seino (2000). "The Na⁺-driven Cl⁻/HCO₃⁻-exchanger. Cloning, tissue distribution, and functional characterization." *J Biol Chem* **275**(45): 35486-90.
- Watase, K., K. Hashimoto, M. Kano, K. Yamada, M. Watanabe, Y. Inoue, S. Okuyama, T. Sakagawa, S. Ogawa, N. Kawashima, S. Hori, M. Takimoto, K. Wada i K. Tanaka (1998). "Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice." *Eur J Neurosci* **10**(3): 976-88.
- Weissbach, L., M. E. Handlogten, H. N. Christensen i M. S. Kilberg (1982). "Evidence for two Na⁺-independent neutral amino acid transport systems in primary cultures of rat hepatocytes. Time-dependent changes in activity." *J Biol Chem* **257**(20): 12006-11.
- Wells, R. G. i 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**(12): 5596-600.
- Wienholds, E., F. van Eeden, M. Kusters, J. Mudde, R. H. Plasterk i E. Cuppen (2003). "Efficient target-selected mutagenesis in zebrafish." *Genome Res* **13**(12): 2700-7.
- Wilde, S. W. i M. S. Kilberg (1991). "Glutamine transport by basolateral plasma-membrane vesicles prepared from rabbit intestine." *Biochem J* **277** (Pt 3): 687-91.
- Winau, F., G. Hegasy, R. Weiskirchen, S. Weber, C. Cassan, P. A. Sieling, R. L. Modlin, R. S. Liblau, A. M. Gressner i S. H. Kaufmann (2007). "Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses." *Immunity* **26**(1): 117-29.
- Wolf, D. A., S. Wang, M. A. Panzica, N. H. Bassily i 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**(21): 5012-22.
- Wright, E. M., V. Harms, A. K. Mircheff i C. H. van Os (1981). "Transport properties of intestinal basolateral membranes." *Ann N Y Acad Sci* **372**: 626-36.
- Wright, E. M., D. D. Loo, B. A. Hirayama i E. Turk (2004). "Surprising versatility of Na⁺-glucose cotransporters: SLC5." *Physiology (Bethesda)* **19**: 370-6.
- Wright, E. M. i E. Turk (2004). "The sodium/glucose cotransport family SLC5." *Pflugers Arch* **447**(5): 510-8.

Y

- 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 i H. Endou (2001). "Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines." Biochim Biophys Acta **1514**(2): 291-302.
- Young, J. A. i B. S. Freedman (1971). "Renal tubular transport of amino acids." Clin Chem **17**(4): 245-66.

Z

- Zan, Y., J. D. Haag, K. S. Chen, L. A. Shepel, D. Wigington, Y. R. Wang, R. Hu, C. C. Lopez-Guajardo, H. L. Brose, K. I. Porter, R. A. Leonard, A. A. Hitt, S. L. Schommer, A. F. Elegbede i M. N. Gould (2003). "Production of knockout rats using ENU mutagenesis and a yeast-based screening assay." Nat Biotechnol **21**(6): 645-51.
- Zarbalis, K., J. A. Siegenthaler, Y. Choe, S. R. May, A. S. Peterson i S. J. Pleasure (2007). "Cortical dysplasia and skull defects in mice with a Foxc1 allele reveal the role of meningeal differentiation in regulating cortical development." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(35): 14002-7.
- Zhang, H., J. Wada, K. Hida, Y. Tsuchiyama, K. Hiragushi, K. Shikata, H. Wang, S. Lin, Y. S. Kanwar i H. Makino (2001). "Collectrin, a collecting duct-specific transmembrane glycoprotein, is a novel homolog of ACE2 and is developmentally regulated in embryonic kidneys." J Biol Chem **276**(20): 17132-9.