

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

Joana Fort i Baixeras

TESI DOCTORAL
Barcelona, octubre de 2006

DISCUSSIÓ

1. Producció i purificació dels ectodominis de 4F2hc i rBAT

L'estratègia de produir els dominis solubles de les subunitats pesades dels transportadors heteromèrics d'aminoàcids ha estat un èxit per a 4F2hc, però no per a rBAT. Experiments de vida mitjana fets al nostre laboratori per Paola Bartochioni demostren que la proteïna rBAT és una proteïna altament inestable, amb una vida mitjana de tan sols 140 minuts en cèl·lules MDCK, quan no s'expressa juntament amb la subunitat lleugera b^{0,+}AT i per tant no forma part de l'heterodímer. Segurament, el fet de tenir moltes possibilitats de formar ponts disulfur intramoleculars en el domini extracel·lular també és un impediment per a la producció d'aquesta proteïna en bacteris, tot i que els intents de solucionar aquest problema, com la producció d'EDrBAT sense la cua C-terminal, on hi ha 3 cisteïnes, o la producció de l'ectodomini en cèl·lules *E. coli* específiques per formar ponts disulfur, tampoc han donat mai resultats.

En 4F2hc, però, el fet de poder produir aquest domini de manera soluble en bacteris i en el medi de cèl·lules HEK293T ja ens demostrava que l'estructura d'aquest domini era compacta, que realment aquest domini no amagava més hèlixs transmembrana i que segurament l'estructura seria semblant a les glucosidases. Tot això també va ser corroborat amb els estudis de dicromisme circular, que ens van donar unes T_m força elevades (56 °C), mostrant un caràcter d'estructura molt estable, i també uns percentatges d'estructura secundària molt semblants als que ens podíem esperar en un barril (α/β)₈ i un domini tot β , com el de les glucosidases.

Finalment, la producció d'ED4F2hc en cèl·lules HEK 293T ens demostra que la proteïna glicosilada en cèl·lules de mamífer també és soluble. Aquesta proteïna ens obre moltes portes per poder estudiar les glicosilacions de 4F2hc i com afecten aquestes en l'estructura ja resolta de l'ectodomini. En els estudis de cristal·lització preliminars que s'han dut a terme amb la proteïna glicosilada es veu una tendència a cristal·litzar, formant microcristalls i esferòlits. En aquestes condicions de cristal·lització hi coincideix la sal, acetat de zenc, la qual cosa ens fa pensar que potser el zenc és un element important en l'estructura cristal·lina que es troba en aquests microcristalls. Per altra banda aquesta proteïna glicosilada ens servirà per fer estudis funcionals i d'interacció amb altres proteïnes, ja que és més similar a l'ectodomini de la proteïna 4F2hc en condicions fisiològiques.

2. L'estructura d'ED4F2hc. Relació amb les glucosidases i rBAT

Amb la resolució de l'estructura de l'ectodomini de 4F2hc hem demostrat el que per alineaments de seqüència ja s'havia apuntat: realment té una estructura semblant a la de les α -amilases. Aquesta afirmació també creiem que es pot aplicar a l'ectodomini d'rBAT, i amb més raó perquè l'homologia és més alta.

Fent un Blast contra la base de dades de les proteïnes conegudes (nr) amb la seqüència d'aminoàcids de la proteïna rBAT humana (gen SLC3A1) trobem que les proteïnes que més s'hi assemblen són les de la seva mateixa família de HSHAT. Les següents proteïnes que s'alineen, amb un 35-40% de similitud, són el precursor de maltasa o precursor d' α -glucosidasa de 2 espècies d'insectes, *Drosophila* i *Aedes aegypti* (mosquit de la febre groga).

Com ja s'ha explicat en la introducció d'aquesta memòria, la relació entre 4F2hc, rBAT i les glucosidases ja havia estat objecte d'estudi en algunes publicacions. Amb l'objecte d'entendre la relació estructural i funcional entre aquestes proteïnes s'havien publicat diversos alineaments de seqüència amb l'oligo-1,6-glucosidasa de *B. cereus*, que tenia l'estructura tridimensional resolta a una resolució de 2 Å (Watanabe et al., 1997). En gran mesura aquests alineaments ens van servir per plantejar la resolució de l'estructura per reemplaçament molecular.

Si superposem diverses estructures de la família de les α -amilases i la d'ED4F2hc podem veure quines són les parts més conservades (figura 42). Encara que per homologia de seqüència no trobem homologia en la meitat del barril $(\alpha/\beta)_8$ que va des de A α 4 fins a A β 6 (figura 42 A) podem veure com els fulls beta que s'hi comprenen (A β 5 i A β 6) estan estructuralment molt conservats (figura 42 B). En canvi les hèlixs i els fragments entre les beta i les hèlixs, estan força desplaçats i fins i tot hi ha bucles que no existeixen en ED4F2hc. Els bucles, en general, són les zones on les diferents estructures de la família de les α -amilases difereixen més. Un dels elements importants és el domini B, que és un d'aquests bucles que en 4F2hc no existeixen o està molt reduït. L'hèlix A α 5 és l'estructura secundària del barril $(\alpha/\beta)_8$

que mostra més diferències entre les diferents glucosidases i ED4F2hc, tant de seqüència com d'estructura. En arribar a l'hèlix A α 6 tant l'homologia de seqüència com la superposició d'estructures mostren que les proteïnes tornen a assemblar-se, i això es conserva fins més o menys la meitat del domini C-terminal. Aquest fragment constitueix una part estructural important, ja que són els residus del barril i del domini C que estan interaccionant i permeten l'arquitectura entre aquests dos dominis.

Així, en l'alineament estructural d'ED4F2hc i l'oligo-1,6-glucosidasa de *B. cereus* (figura 32) comprovem que els alineaments de seqüència publicats fins ara eren bastant encertats, i contienien els elements d'estructura secundària que també es mantenen en l'estructura. Tot i això podem veure una major conservació de l'estructura respecte la conservació de la seqüència.

Llavors, tenint l'estructura semblant a glucosidases d'ED4F2hc, ens preguntàvem com estava el centre actiu. El centre actiu de la família de les α -amilases està molt conservat com es pot comprovar en la superposició entre l'oligo-1,6-glucosidasa de *B. cereus* i la α -amilasa 2 d'*Hordeum vulgare* (figura 43 A i B). Els tres aminoàcids catalítics (un glutàmic i dos aspàtics) estan conservats en totes les α -amilases de la família tinguin l'especificitat de substrat que tinguin. Si superposem diferents membres de la família de les α -amilases i mirem el lloc catalític comprovem que les diferències en el lloc catalític són molt poques. En superposar l'estructura de 4F2hc no trobem aquests aminoàcids catalítics. Només l'Asp 248 està proper al lloc catalític, però no es troba en la conformació semblant a la resta. De fet, estudiant bé l'ambient del lloc catalític hi trobem més aminoàcids neutres de tipus amina com la glutamina o bàsics (asparagina). Els aminoàcids àcids que trobem (D206, D248, E250 i E384) en un entorn de 4Å del corresponent lloc actiu de les glucosidases, és troben disposats de manera diferent i no podrien fer la mateixa funció.

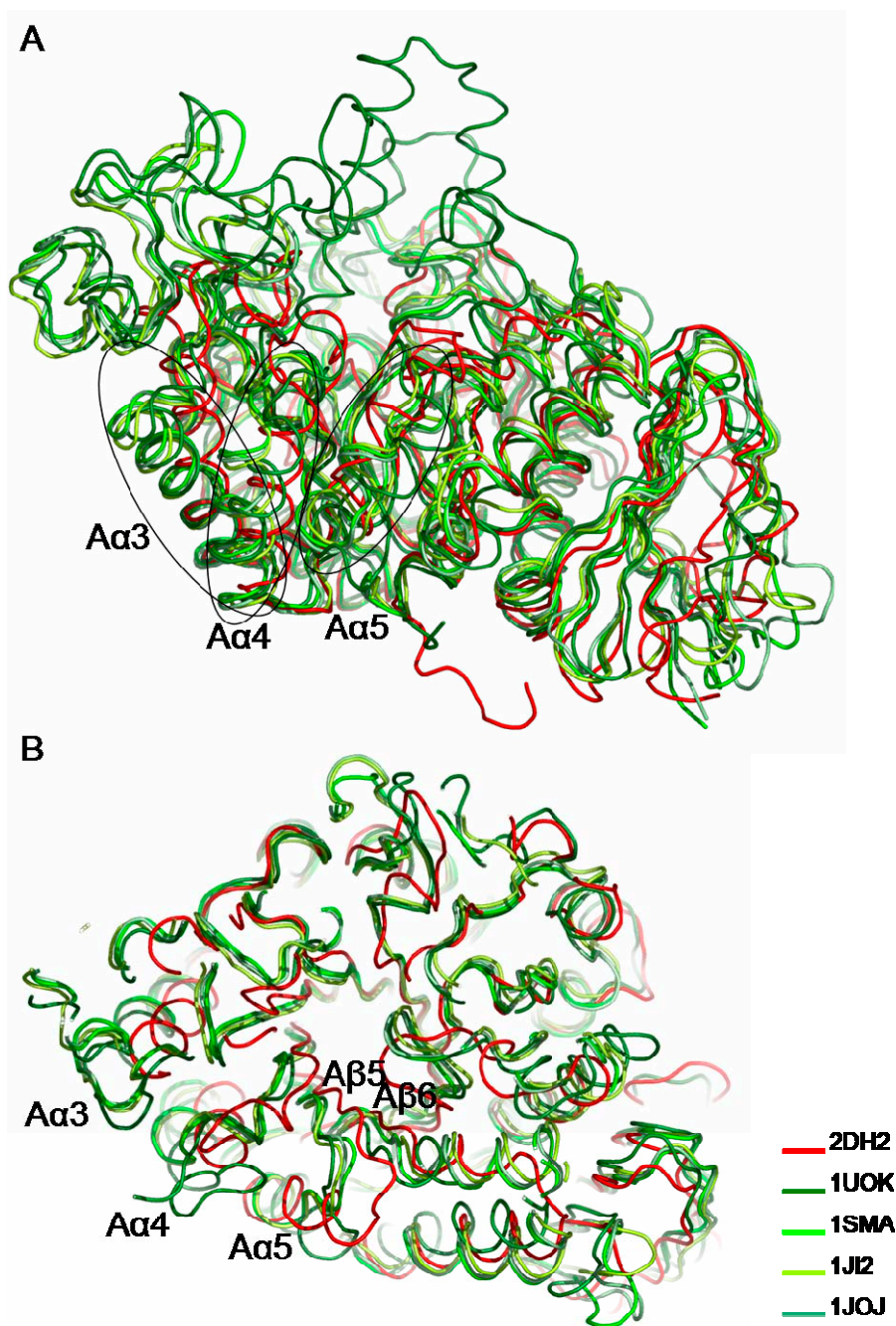


Figura 42. Superposició de l'estructura d'ED4F2hc amb quatre membres de la família 13 de les glicosilhidrolases. Visió lateral (A) i superior (B) de la superposició. En la llegenda s'hi indiquen els PDBID. 2DH2: ED4F2hc; 1UOK: oligo-1,6-glucosidase, EC 3.2.1.10, de *Bacillus cereus*; 1SMA: maltogenic α -amylase, EC 3.2.1.133, *Thermus sp.*; 1J12: neopullulanase, EC 3.2.1.135 de *Thermoactinomyces vulgaris* R-47; 1J0J: neopullulanase, EC 3.2.1.135, de *Geobacillus stearothermophilus*.

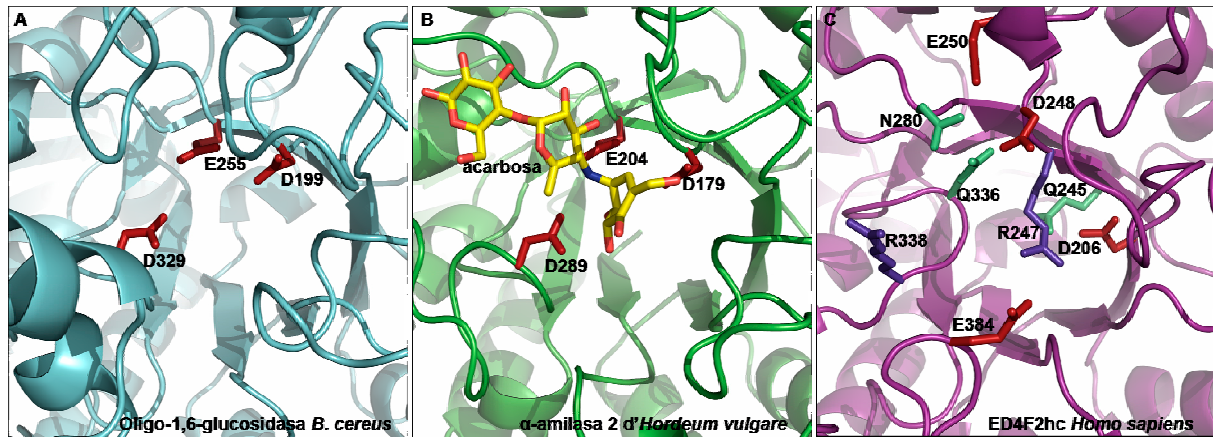


Figura 43. Comparativa del lloc catalític de A) l'oligo-1,6-glucosidasa de *Bacillus cereus* (PDBID 1UOK), B) l' α -amilasa d'*Hordeum vulgare* (PDBID 1BG9) i C) ED4F2hc (PDBID 2DH2). En A i B s'hi representen els tres aminoàcids catalítics conservats en tota la família 13 de les glicosilhidrolases. En B també s'hi representa l'acarbosa, un anàleg de substrat cocrystal·litzat amb l'enzim. En C s'hi representen tots els aminoàcids àcids (vermell), amb grup amino (verd pàlid) i bàsics (blau) que es troben a prop ($<4 \text{ \AA}$) dels corresponents aminoàcids catalítics en les altres dues figures A i B.

Comparant l'interior del barril $(\beta/\alpha)_8$ de l'oligo-1,6-glucosidasa de *B. cereus* amb el de 4F2hc podem concloure que el d'aquest és més profund que el primer (figura 38). El barril $(\alpha/\beta)_8$ no és buit, tal com podria semblar en les representacions de la cadena principal, sinó que les cadenes laterals s'hi projecten enmig. A la part inferior tenim diverses capes d'aminoàcids hidrofòbics i aromàtics que en constitueixen una base. En l'oligo-1,6-glucosidasa de *B. cereus* trobem una capa d'aminoàcids aromàtics just sota dels aminoàcids catalítics que en 4F2hc no existeix. Aquesta capa podria servir per posicionar els anells de glúcid en el lloc catalític perquè els aminoàcids catalítics poguessin actuar. En 4F2hc trobem, en canvi, una arginina (R247) que projecta la cadena lateral cap enmig del lloc catalític, que li confereix una càrrega positiva, que no existeix en els membres de la família de les α -amilases.

S'han trobat casos on proteïnes semblants a glicosilhidrolases tenien altres funcions diferents relacionades o heretades d'aquesta homologia. Per una banda tenim les proteïnes semblant a glucosidases que han perdut els aminoàcids catalítics però conserven la capacitat d'unió a glúcids i han esdevingut lectines. En mamífers trobem tres famílies de proteïnes Ym1/2, YKL-39/40 i SPX-40 que tenen una homologia de seqüència amb les quitinases de plantes (família 18 de les glicosilhidrolases) però que no tenen activitat catalítica i han conservat la capacitat d'unir glúcids (Chang et al., 2001; Hakala et al., 1993). Ym1/2 són citoquines i hi ha

controvèrsia per descobrir quin glúcid uneixen (Tsai et al., 2004); YKL-39/40 són proteïnes expressades en cartílag i s'ha demostrat que uneixen col·lagen I i modulen la formació de les fibril·les d'aquest tipus de col·lagen (Bigg et al., 2006); i SPX-40 es troben en glàndula mamària i no s'ha trobat quin glúcid uneixen. Una altra proteïna de mamífers és *Edem*, una proteïna de membrana del reticle endoplasmàtic amb homologia de seqüència amb les α -1,2-manosidases però que ha perdut l'activitat catalítica (Hosokawa et al., 2001) i participa en el procés de degradació del reticle endoplasmàtic reconeguent les glicosilacions de proteïnes mal plegades (Hosokawa et al., 2006).

Nosaltres hem testat l'ectodomini de 4F2hc en dos glicoxips (Glycominds i Consortium For Functional Glycomics), obtenint en tots dos resultat negatiu. S'han testat més de 200 glúcids diferents i amb cap d'ells s'ha vist una unió específica. Així doncs, no hem pogut demostrar cap possible unió a glúcids que ens donés indicis per una funció lectina de l'ectodomini de 4F2hc.

Per altra banda tenim el cas de *Klotho*, que ha perdut els aminoàcids catalítics de la família amb la qual presenta homologia i ha guanyat una nova activitat glucosidasa. *Klotho* és una glicoproteïna de tipus I (N-terminal extracel·lular), d'uns 130KDa amb dues repeticions internes en el domini extracel·lular semblants a β -glucosidases de la família 1 de les glicosilhidrolases (de 20 a 40 % d'homologia de seqüència) de bacteris, plantes i eucariotes (Henrissat and Bairoch, 1996; Kuro-o M et al., 1997). La inactivació del gen *klotho* en ratolins provoca un síndrome semblant a l'envelliment humà (Kuro-o M et al., 1997). Tot i la seva semblança amb la família 1 de les glicosilhidrolases, *Klotho* no té els dos glutàmics catalítics característics en els seus dominis extracel·lulars. De fet, en els dos dominis extracel·lulars semblants a glucosidases conserva un dels glutàmics en un dels dominis i l'altre en l'altre domini, no tenint cap dels dos dominis el lloc catalític complet. Més tard es va demostrar que la proteïna recombinant de l'ectodomini de *Klotho* té activitat β -glucuronidasa (família 2 de les glicosilhidrolases) (Tohyama et al., 2004). Aquesta activitat li serveix a *Klotho* per hidrolitzar una N-glicosilació d'un canal de calci, TRPV5, i augmenten la seva retenció a la membrana i, per tant, també la seva activitat (Chang et al., 2005).

Aquest exemple d'una proteïna semblant a glucosidases que ha perdut part dels aminoàcids catalítics però que encara conserva una activitat, tot i que d'una altra

família de les glicosilhidrolases, ens va dirigir als experiments d'activitat α -glucosidasa de l'ectodomini de 4F2hc (apartat 5.1 dels resultats). Hem ampliat el rang a altres activitats enzimàtiques de la família 13 de les glicosilhidrolases, tenint com a substrats universals methylumbelliferyl α -D-glucoside, methylumbelliferyl α -D-maltoside i el methylumbelliferyl α -D-mannoside. Aquests són els substrats alpha dels enzims més abundants i els que es troben conjugats a la metil umbeliferona comercialment. De fet, segur que l'aspectre es podria ampliar més, però no hem trobat cap activitat residual per a aquests tres substrats, la qual cosa ens fa pensar que l'ectodomini de 4F2hc no té activitat glucosidasa. El món de les glicosilhidrolases és molt gran, i conté amplis rangs d'activitats i substrats. Una altra consideració és que estem treballant amb el domini extracel·lular purificat. Mai hem provat de treballar amb cèl·lules que tinguin 4F2hc en la superfície o amb homogenat d'aquestes cèl·lules. Sobre aquest experiment només hi ha un treball que comenta no haver trobat activitat α -amilasa o maltasa en fraccions cel·lulars d'oòcits injectats amb l'RNA d'rBAT (Wells and Hediger, 1992).

3. El model d'rBAT. Relació amb les mutacions de la cistinúria de tipus A.

L'estructura tridimensional d'rBAT aportaria molta informació per a l'estudi de les mutacions de la cistinúria tipus A. No hem estat capaços de produir l'ectodomini d'rBAT en bacteris tal com ho hem fet amb el de 4F2hc. Amb la resolució de l'estructura d'ED-4F2hc i l'alineament estructural entre aquesta proteïna i 1UOK hem pogut fer un multialineament de seqüència amb l'ectodomini d'rBAT (figura 33). Mitjançant la tècnica de modelat per homologia (amb el programa MODELLER) hem construït un model de l'ectodomini d'rBAT humà sense la cua C-terminal usant com a motlles les seqüències d'algunes glucosidases amb estructura coneguda i l'ectodomini de 4F2hc. A més a més del càlcul d'energies del model (figura 33) podem pensar que serà més vàlid en aquelles zones estructuralment molt conservades entre les α -amilases i ED4F2hc i també en el domini B, on la identitat de seqüència entre rBAT i 1UOK és significativa (49%); en canvi, aquelles regions que més difereixen entre els membres de la família coincideixen amb les regions

amb menys energia en el model (funció DOPE més positiva) i de més baixa identitat de seqüència amb els membres amb estructures conegudes, fent que aquesta part del model sigui poc informativa. Finalment, els últims 34 aminoàcids de la proteïna rBAT, que contenen tres cisteïnes que podrien formar ponts disulfur, no s'alineen amb cap proteïna coneguda, de manera que no tenim cap tipus d'informació estructural d'aquesta cua C-terminal.

La majoria de les mutacions trobades en el gen d'rBAT (SLC3A1) en pacients de cistinúria que han estat estudiades provoquen un defecte de trànsit a la membrana de l'heterodímer, segurament pel mal plegament d'aquesta proteïna. Moltes d'aquestes mutacions es troben en el domini extracel·lular, la qual cosa indica un paper important d'aquest domini en l'assemblatge de l'heterodímer i/o en el plegament i maduració final del complex. Les mutacions de canvi d'aminoàcid representades en la figura 44 i en la taula 9 mostren una distribució irregular al llarg de la proteïna. Hi ha una acumulació de mutacions en la part del barril que està formada pels elements $A\beta 1$ - $A\alpha 1$, i des de $A\beta 7$ fins al principi de la $A\alpha 8$ (zona superior en la figura 44 B). En aquesta regió s'hi troben 26 mutacions de les 42 que estan situades en el domini A (un 62%) i es troben estructuralment en la mateixa zona. Aquesta regió coincideix en una regió conservada entre rBAT i les glicosidases i 4F2hc (taula 9). La majoria d'aquestes mutacions, pels criteris abans esmentats, pel tipus de mutació i per l'espai que ocupen les seves cadenes laterals en el model, probablement afectaran a l'estructura del barril (taula 9), que és la base de l'estructura de l'ectodomini. Les mutacions que es troben en el domini C també es troben majoritàriament localitzades en la zona conservada d'aquest domini (taula 9), sobretot les dues que es troben en el full β $C\beta 2$, la Y582H i la R584T, residus totalment conservats en les altres dues proteïnes de l'alineament de la figura 32. També en aquest cas aquests residus semblen tenir una importància estructural bàsica per al plegament final de l'estructura de l'ectodomini, afectant el plegament del domini C i la interacció entre el domini A i el domini C.

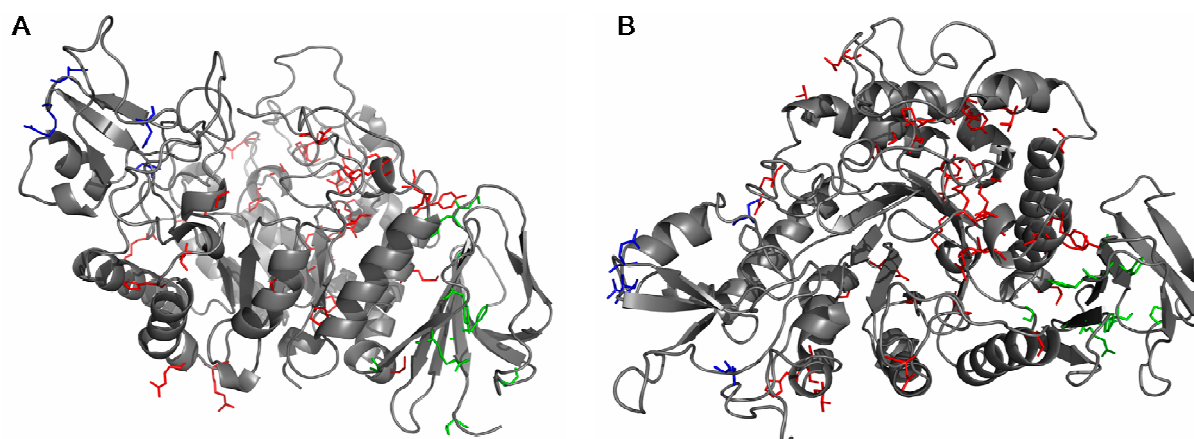


Figura 44. Representació del model de l'ectodomini d'rBAT amb les cadenes laterals de tots els residus implicats en mutacions de canvi d'aminoàcid en pacients de cistinúria tipus A. A. Visió lateral del model de l'ectodomini d'rBAT, B. Visió superior del model. Codi de colors: en vermell, mutacions que es localitzen en el domini A; en blau, mutacions que es localitzen en el subdomini B; i en verd, mutacions que es troben en el domini C.

Algunes d'aquestes mutacions s'han estudiat en el laboratori. La mutació més comú entre els pacients de cistinúria, la M467T, i la M467K, que hi està relacionada, provoca un defecte de trànsit del transportador a la membrana en oòcits (Chillaron et al., 1997) i en cèl·lules HeLa (tesi doctoral (Bartoccioni, 2006)). Si mirem el model (figura 45), la metionina 467 es troba en la interfase entre els dominis A i C, al final de la hèlix A α 7. Aquesta zona està bastant conservada i aquesta metionina, en el model, sembla estar participant en un *stacking* hidrofòbic entre els dos dominis.

La mutació R365W és una mutació en que l'estabilitat de la proteïna mutant és sensible a la temperatura, presenta defecte de trànsit i afecta la sortida d'arginina, però no l'entrada ni el transport de leucina i lisina (Pineda et al., 2004b). Aquests estudis indiquen que aquest rBAT mutat està modulant l'activitat del transportador b^{0,+}AT/rBAT (revisat en (Palacin et al., 2005)). Si ens mirem el model, aquesta arginina està posada en la part inferior del barril, amb la cadena lateral completament exposada al solvent, en la part on es troba l'N-terminal i que per tant està propera a la membrana (figura 45). El fet que moduli el transport podria indicar que aquest residu està proper a la subunitat lleugera b^{0,+}AT (la catalítica o transportadora) i per tant ens dibuixaria un model per l'heterodímer. Serien necessaris més experiments per demostrar que aquesta arginina està propera a la subunitat lleugera o al lloc de pas de l'arginina substrat que ha de ser transportada de l'interior cel·lular a l'exterior.

	Localització	Mutació	Energia DOPE	Conservació	Rellevància estructural	
Domini A	Abans d'Aβ1	P122S	X	NO	+	
	Aβ1	M123R	X	NO		
	Aβ1	Y124C	X	3/3	++	
	Aβ1-Aα1	P128Q	X	2/3	+	
	Aβ1-Aα1	S130P	X	2/3		
	Aβ1-Aα1	D137G	X	2/3		
	Aα1	L149Q	X	3/3	+++	
	Aα1	Y151N/C	~	3/3	+++	
	Aβ2-Aα2	R181Q	X	NO	SUP	
	Aβ2-Aα2	T189M	~	2/3	SUP	
	Aβ3-Bα1	T216M	X	2/3	+	
Domini B	Aβ3-Bα1	S217R	~	2/2	+	
	Bβ1-Bβ2	N253K	~	2/2	+	
	Bβ2-Bβ3	E268K	~	2/2	SUP	
	Bβ2-Bβ3	R270L	~	NO	SUP	
Domini A	Aβ4-Aα4	T341A	X	NO	SUP	
	Aβ4-Aα4	L346P	X	NO	+	
	Aβ4-Aα4	H348P	X	2/3	SUP	
	Aα4	R362H	X	NO	SUP	
	Aα4-Aβ5	R365W/L/Q	XX	NO	SUP	
	Aβ6	G398R	~	NO	+	
	Aβ6-Aα6	N410K	~	NO	SUP	
	Aβ6-Aα6	S420C	~	2/3	+	
	Aα6-Aβ7	P441R	~	NO	+	
	Aβ7-Aα7	I445T	~	NO	++	
	Aβ7-Aα7	R452W/Q	~	3/3	++	
	Aβ7-Aα7	S455L	X	2/3	+	
	Aβ7-Aα7	R456C/H	X	2/3	+	
	Aβ7-Aα7	G458E	X	2/3	+	
	Aβ7-Aα7	Y461H	X	NO	+	
	Aα7-	M467T/K	X	NO	+	
	Aβ8-Aα8	G481V	~	3/3	+	
	Aβ8-Aα8	E482K	~	2/3	+	
	Aβ8-Aα8	S507L	~	NO	+	
	Aβ8-Aα8	P508A	~	2/3		
	Aβ8-Aα8	Q510R	~	2/3	+	
	Aβ8-Aα8	V536G	~	NO	+	
	Aβ8-Aα8	S547W	~	3/3	++	
	entre dom A i C	L564F	OK	NO	++	
	Domini C	entre dom A i C	G568S	OK	2/3	++
		Cβ2	Y582H	X	3/3	+
		Cβ2	R584T	X	3/3	+
		Cβ3-Cβ4	F599S	OK	2/3	+++
		Cβ3-Cβ4	G600E	OK	2/3	SUP
		Cβ4-Cβ5	P615T	XX	2/3	++
		Cβ8	G645	XX	2/3	+
		Cβ8	F648S	XXX	2/3	+
cua C-terminal		T652R	XXX	NO		

Taula 9. Valoració del llistat de les mutacions de canvi d'aminoàcid trobades en pacients de cistinúria tipus A (fins al novembre de 2004) que afecten la regió modelada. En vermell, mutacions que pertanyen al domini A; en blau, mutacions que pertanyen al domini B; en verd, mutacions en el domini C. Energia DOPE: OK, l'energia del model és millor o igual que la dels dos motlles; ~, l'energia del model és millor o igual que la d'un dels motlles; X, l'energia del model s'allunya dels dos motlles (X,

XX i XXX de menys a més distància). Conservació segons l'alineament de la figura 32. Rellevància estructural: SUP, residu en la superfície; +, probabilitat (+, ++, +++, de menys a més probabilitat) de que les mutacions tinguin rellevància estructural segons els paràmetres abans exposats, el tipus de mutació i el lloc físic que ocupen aquests residus en el model.

Estudis recents de biogènesi de l'heterodímer d'rBAT/b^{0/+}AT i del mutants d'rBAT M467T, M467K, T216M, R365W i una duplicació des del glutàmic E298 fins l'aspàrtic D539 (Bartoccioni, 2006) demostren que tant rBAT *wild type* com els mutants, quan són expressats sense la cadena lleugera, tenen la mateixa vida mitjana (140 minuts en cèl·lules MDCK i 240 minuts en cèl·lules HeLa). Quan els rBATs mutats s'expressen amb la subunitat lleugera aconseguen formar l'heterodímer, però no aconseguen sortir del reticle i són degradats, la majoria d'ells pel proteosoma. La proteïna rBAT que té alguna d'aquestes mutacions és en tot moment endoglicosidasa H sensible, o sigui, les seves glicosilacions no maduren. Com que els mutants no aconseguen portar l'heterodímer a la membrana no transporten ni arginina ni cistina quan són expressats en HeLa. Així doncs, probablement aquestes mutacions provoquen un mal plegament de la proteïna però el procés falla després de l'assemblatge de l'heterodímer. Llavors aquest mal plegament de la subunitat pesada és detectat per la maquinària del reticle i rBAT és degradat pel proteosoma.

La mutació que consisteix en una duplicació prové d'una duplicació gènica, després de l'exó 9, dels exons 5 al 9 seguida per l'exó 10. A nivell de proteïna provoca la repetició del fragment de la proteïna comprès entre l'E298 i l'aspàrtic D539 posat després del primer aspàrtic D539 i seguida de la resta de la proteïna (figura 45 superior esquerra). No sabem quina estructura té aquesta proteïna, però sabem que es transcriu i que forma l'heterodímer com la resta de les mutacions i que la seva vida mitjana quan és expressada sola, és la mateixa que la d'rBAT *wild type* (Bartoccioni, 2006). És sorprenent que una mutació d'aquestes característiques, que afegeix la meitat del barril (α/β)₈, no tingui un efecte anterior a la formació de l'heterodímer. Malgrat això els pacients que duen aquesta mutació tenen fenotip de cistinúria no I, més sever que la resta de mutants d'rBAT.

Tot això indica que la formació del pont disulfur entre la subunitat lleugera i la pesada és anterior a un bon plegament de la subunitat pesada i només seria després quan la maquinària de la cèl·lula detectaria l'error i no deixaria que aquesta proteïna sortís del reticle endoplasmàtic i, per tant, que arribés a la membrana, on la

subunitat lleugera té la seva activitat de transport.

El cas d'aquestes mutacions estudiades podria ser el mateix en la majoria de les mutacions trobades en rBAT (taula 9), sobretot en les que estan predites com a mutacions que afectarien estructuralment l'ectodomini d'rBAT. De totes maneres hi ha algunes mutacions que queden a la superfície en el model (taula 9) i que no estan conservades en les proteïnes estructuralment relacionades. Algunes d'aquestes últimes mutacions podrien estar relacionades amb altres tipus de malfuncionament, com modulació del transport o de l'oligomerització de l'heterodímer. Caldria un estudi més a fons per determinar-ne la naturalesa, malgrat totes les mutacions estudiades fins ara provoquen un defecte de trànsit a la membrana que els impedeix cap mena de funció transportadora.

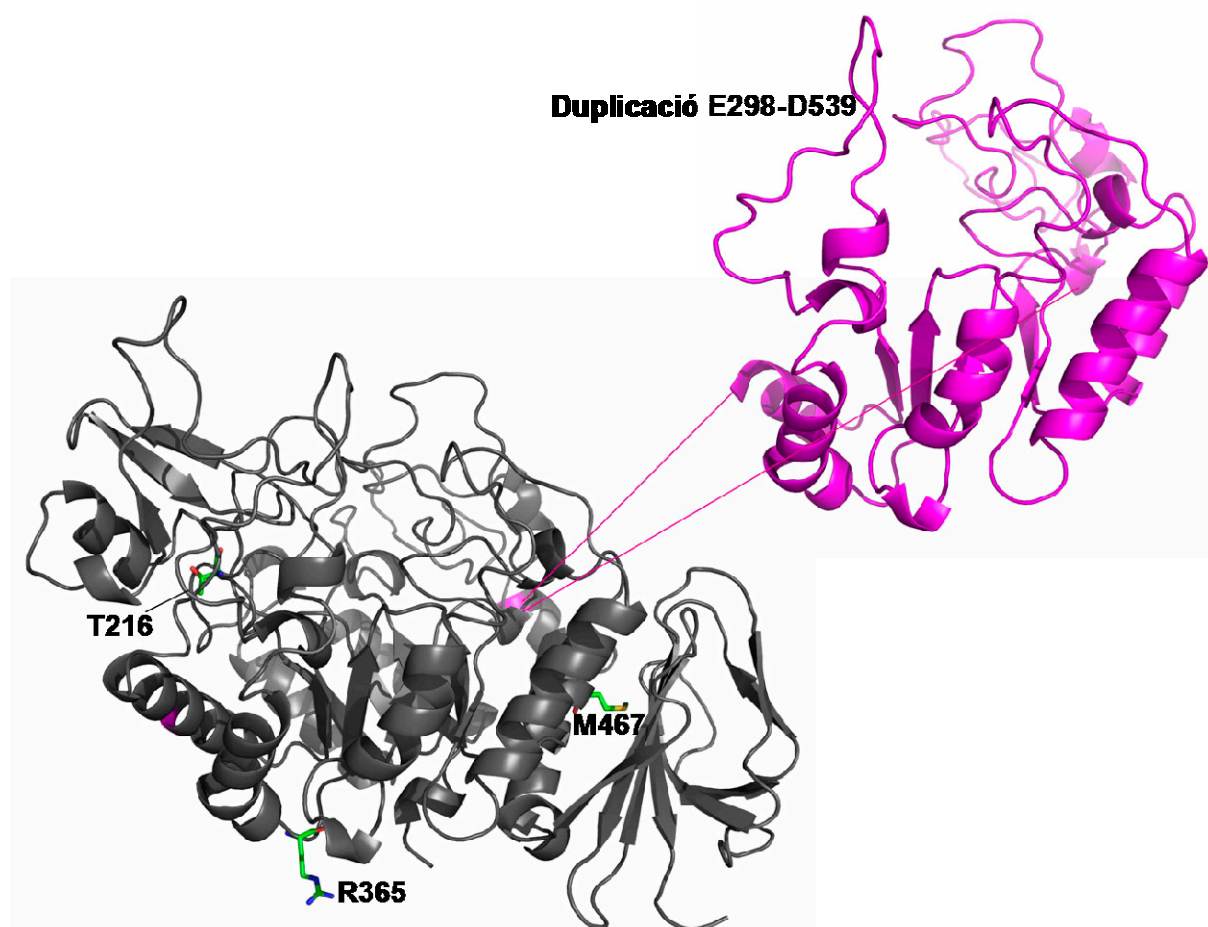


Figura 45. Representació dels residus mutats en els mutants T216M, R365W, M467T, M467K de cistinúria sobre el model d'rBAT i representació del fragment duplicat en la duplicació E298-D539.

4. L'homodímer de 4F2hc

4.1. L'homodímer de l'ectodomini en el cristall

Quan vam resoldre l'estructura de l'ectodomini de 4F2hc en el cristall ortoròmbic vam trobar un homodímer en la unitat asimètrica. La interacció d'aquest homodímer conté en el centre un àtom de zenc coordinat de manera asimètrica: el mateix grup de residus de les dues molècules hi estan implicats, però una molècula hi posa dues histidines i un aspàrtic i l'altra només hi posa una histidina. El fet que la coordinació impliqui al mateix grup de residus en les dues molècules d'ED4F2hc provoca un eix de "quasi simetria" que gairebé coincideix amb l'eix cristal·logràfic c, on aquesta "quasi simetria" està trencada per la coordinació asimètrica (veure figura 31 A). A més a més les dues molècules del dímer són estructuralment una mica diferents, trobant la major diferència en l'hèlix A α 5 i alguns bucles del barril i altres bucles del domini C adjacents a la coordinació. Com que en les condicions de cristal·lització no s'hi havia afegit zenc l'afinitat d'aquest grup pel metall havia de ser molt elevada. Tot i això, en el cristall monoclínic no hi ha rastre de cap metall en aquests residus com es pot veure en la figura 27. A més, experiments de cromatografia de gel filtració de la proteïna ED4F2hc pura (la mateixa que s'havia usat per cristal·litzar) no han determinat que existeixi el dímer en solució, resultant sempre un sol pic d'elució d'un tamany aproximat de 50 KDa, corresponent al monòmer de l'ectodomini (resultats no mostrats).

En un primer moment aquesta coordinació ens va fer pensar en un lloc d'interacció amb altres proteïnes, un cas semblant al de la molècula SEA (Enterotoxina d'*Staphylococcus aureus* A) amb MHCII. SEA pertany a un subgrup de superantígens d' *Staphylococcus* que utilitzen Zn²⁺ en la interacció d'alta afinitat amb les molècules MHC de classe II. En aquest cas (PDBID 1SXT) es va trobar un dímer en el cristall de SEA amb una coordinació tetraèdrica de Zn²⁺ amb dues histidines i un aspàrtic d'una molècula i una histidina de la molècula veïna (molt semblant estructuralment a la del cristall d'ED4F2hc) (figura 46) . En aquell cas, però, la coordinació entre dues molècules de SEA no es donava pel mateix grup de residus com en el nostre cas. Aquesta interacció amb zenc té un paper important en el

reconeixement intermolecular amb MHCII. El motiu d'aminoàcids que trobem en el cristall de SEA és molt semblant al d'ED4F2hc: una histidina seguida d'un aminoàcid qualsevol seguit d'un aspàrtic (HXD) que es troben en un full β (en el cas d'ED4F2hc el motiu és al revés DXH) i al full β adjacent s'hi troba l'altra histidina mentre de l'altra molècula s'hi coordina una histidina.

Per estudiar la importància d'aquesta coordinació en 4F2hc vam mutar aquests llocs (experiments de Laura R. de la Ballina), però ni tan sols el triple mutant que havia perdut els tres aminoàcids (D439A, H441A i H455A) demostrava tenir variacions en l'arribada a superfície de 4F2hc ni en el transport d'aminoàcids. El transport tampoc era dependent de la concentració de zenc. Això ens suggereix que aquesta coordinació no és necessària per a la interacció entre la subunitat lleugera i la pesada ni per a l'activitat de transport.

Com hem comentat llargament en la introducció, 4F2hc està relacionat amb altres activitats i amb interaccions amb altres proteïnes. No descartem que aquesta coordinació sigui important per a alguna altra interacció específica, que encara no hem pogut demostrar. Serà interessant, també, veure com afecten els mutants dels residus que coordinen el zenc en les altres activitats relacionades amb 4F2hc, com l'activació d'integrines, l'adhesió i la fusió cel·lular.

El fet que el dímer del cristall ortoròmbic fos "quasi simètric" (les interaccions entre les dues molècules eren "quasi simètriques") també podia ser indicatiu d'una homodimerització, malgrat que aquest tipus d'oligomerització rarament conté asimetries. Tot i això existeixen alguns casos d'homodímers asimètrics, on aquesta asimetria és important per a la seva funció i a continuació es descriuen alguns. Un exemple el trobem en la proteïna IscA (proteïna que participa en la formació i alliberament de grups Fe-S) homodímeritza en un cristall de manera asimètrica a través d'un grup de tres cisteïnes (Cys 37, Cys 101 i Cys 103) que interaccionen amb el grup 2Fe-2S (2 àtoms de ferro i dos de sofre). Una de les molècules utilitza les tres cisteïnes d'aquest grup, mentre que l'altra molècula només n'utilitza una (Cys 103). Els autors hipotetitzen que aquesta interacció asimètrica és important per a la funció, ja que el protòmer que només proveeix d'un lligand es troba menys estable, i permet la interacció de l'apoproteïna acceptora amb aquest grup de metalls i la seva posterior transferència (Morimoto et al., 2006). Un altre exemple

d'homodimerització asimètrica el trobem en proteïnes que s'uneixen a seqüències de DNA asimètriques com ha estat demostrat per HAP1, GAL4, PPR1 i PUT3 (King et al., 1999).

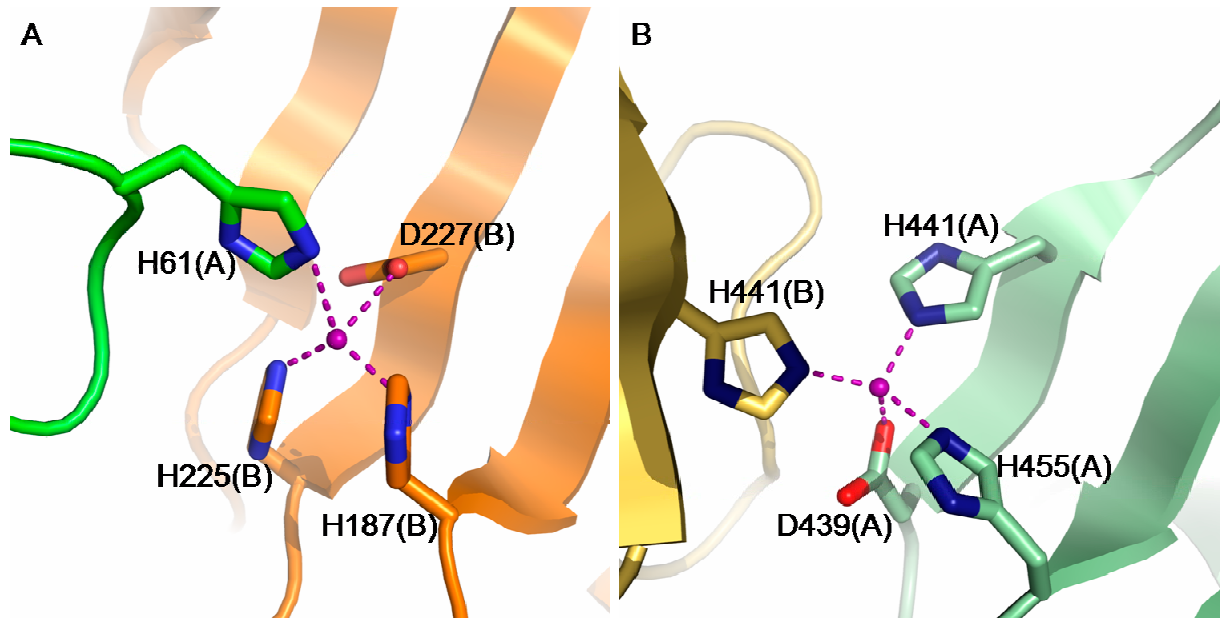


Figura 46. Representació de la coordinació trobada en el cristall de SEA . A. Detall de la coordinació tetraèdrica del zinc entre dues molècules de SEA en una estructura de raigs X a 2,7Å (PDBID 1SXT). B. Detall de la coordinació de zinc trobada en el cristall ortoròmbic d'ED4F2hc. Entre parèntesi s'hi mostra la cadena la qual pertanyen els residus implicats.

4.2. Existeix un homodímer quan sobreexpressem 4F2hc en cèl·lules

En els primers experiments de coexpressió de 4F2hc amb γ^+ LAT-1 en oòcits es va detectar un banda d'immunoprecipitació amb anticòs anti-4F2hc d'uns 170 kDa que era dependent de DTT i de la cisteïna 109, de manera semblant a la banda de 135 kDa de l'heterodímer 4F2hc/ γ^+ LAT-1 (Torrents et al., 1998a). En el treball ja apuntaven a un possible homodímer de 4F2hc unit per pont disulfur per la cisteïna 109. Hi ha un altre article on també apareix una banda, en un gel no reductor, de menys de 200 kDa en sobreexpressar 4F2hc (Nakamura et al., 1999).

En el mateix sentit, experiments de Laura R. de la Ballina demostren l'existència d'un homodímer de 4F2hc quan aquest se sobreexpresca en cèl·lules HeLa i en oòcits (figura 47 A i C). Per demostrar que aquesta banda, que correspon al doble del pes habitual de la proteïna 4F2hc (90 kDa + 90 kDa \approx 180 kDa) en gels no reductors, és un homodímer s'ha dut a terme un experiment d'immunoprecipitació a partir de

cèl·lules HeLa transfectades amb dos 4F2hc que porten epítops diferents, un amb una cua de 6 histidines a N-terminal i l'altre amb un epítop HA a C-terminal (figura 47 C). Si immunoprecipita amb boles de níquel l'His-4F2hc i revela el resultat en un western anti-HA el resultat és que 4F2hc-HA immunoprecipita amb His-4F2hc. Per tant, la banda que veiem a 180 KDa correspon a un homodímer (figura 47).

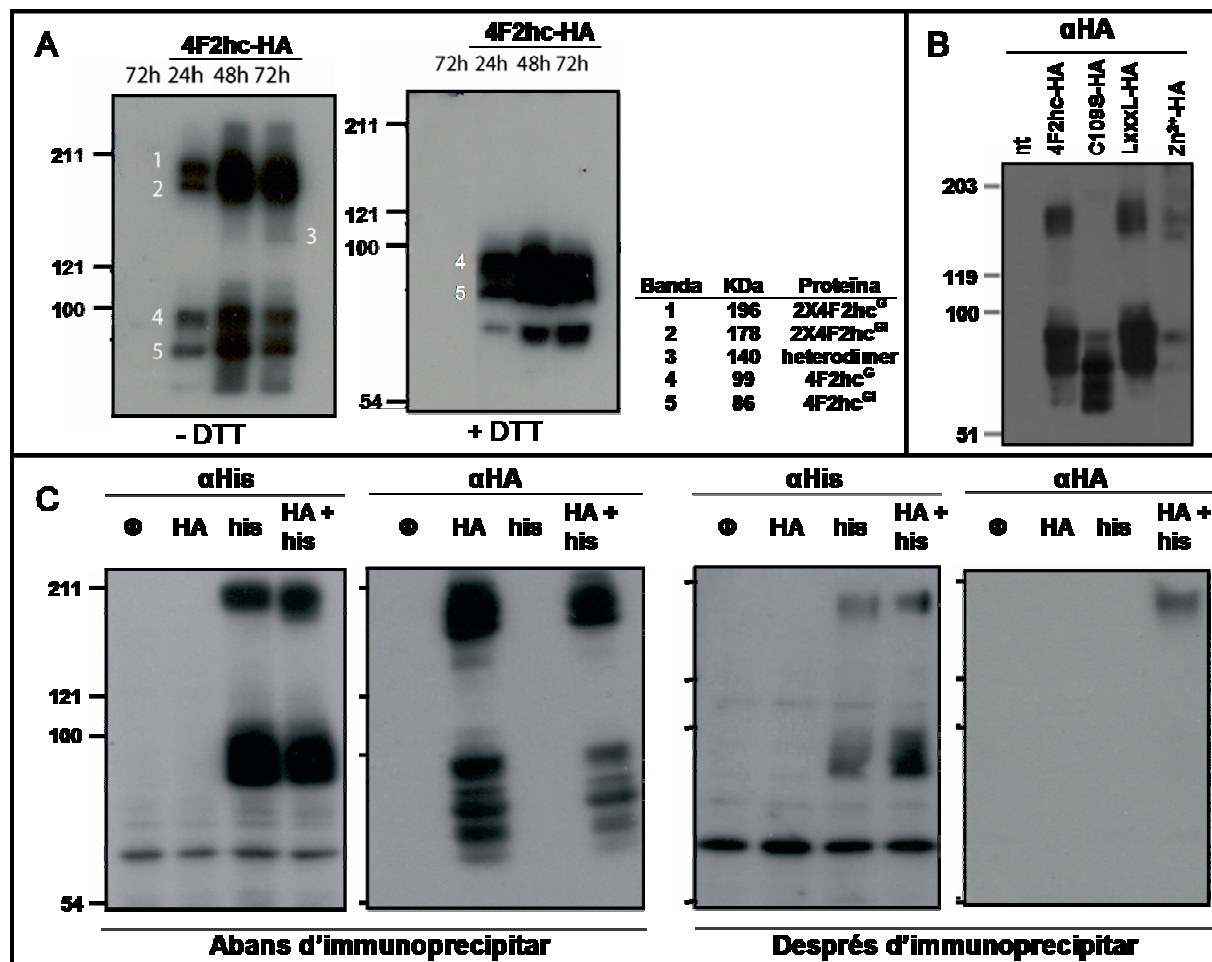


Figura 47. En sobreexpressar 4F2hc en cèl·lules HeLa apareix una banda a ~ 200KDa que correspon a un homodímer de 4F2hc. A) *Western Blots* en condicions no reductores (esquerra) o reductores (dreta) de cèl·lules HeLa transfectades amb 4F2hc-HA (epítop HA a C-terminal) a diferents hores després de la transfecció o amb plàsmid control (primer carril dels dos gels) a 72 hores de transfecció. (4F2hc^G 4F2hc^{GI} formes glicosilada madura i immadura respectivament). B) *Western Blot* no reductor de cèl·lules HeLa transfectades amb mutants de 4F2hc-HA (C109S-HA és 4F2hc-HA mutant Cys 109 Ser, LXXXL-HA és 4F2hc-HA mutant del motiu d'Engelman GXXXG a LXXXL i Zn²⁺-HA és 4F2hc-HA amb mutacions del lloc del zinc. C) Immunoprecipitació amb boles de Ni²⁺ de cèl·lules transfectades amb plàsmid control, 4F2hc-HA i His-4F2hc (Tag de 6 histidines a N-terminal) i cèl·lules transfectades amb tots dos constructes. Els dos gels de l'esquerra són les mostres abans de la immunoprecipitació i els de la dreta després de la immunoprecipitació. Aquests *western blots* són en condicions no reductores. (experiments de Laura R. de la Ballina).

Aquest fet ens fa pensar que potser l'homodímer de l'ectodomini de 4F2hc del cristall es podia donar en 4F2hc sencer en sobreexpressió en cèl·lules. L'homodímer que trobem en les cèl·lules conté un pont disulfur on intervé la cisteïna 109 (la mateixa cisteïna que forma l'heterodímer) (figura 47B). En el cristall, els N-terminals de les dues molècules queden properes fent plausible un pont disulfur entre els dos residus que correspondrien a la cisteïna 109 (glicina 109 en la proteïna del cristall). A més la superfície que queda propera a l'N-terminal està carregada positivament, cosa que fa pensar en una interacció amb els fosfats de la membrana de fosfolípids (figura 51 B).

En contra d'aquests arguments, els mutants dels residus del zinc no impedeixen la formació de l'homodímer (figura 47 B).

El fet que la cisteïna 109 estigués participant en un pont disulfur en l'homodímer restringeix molt les possibilitats de formació d'aquest homodímer, una de les quals és la que tenim en el cristall (figura 48).

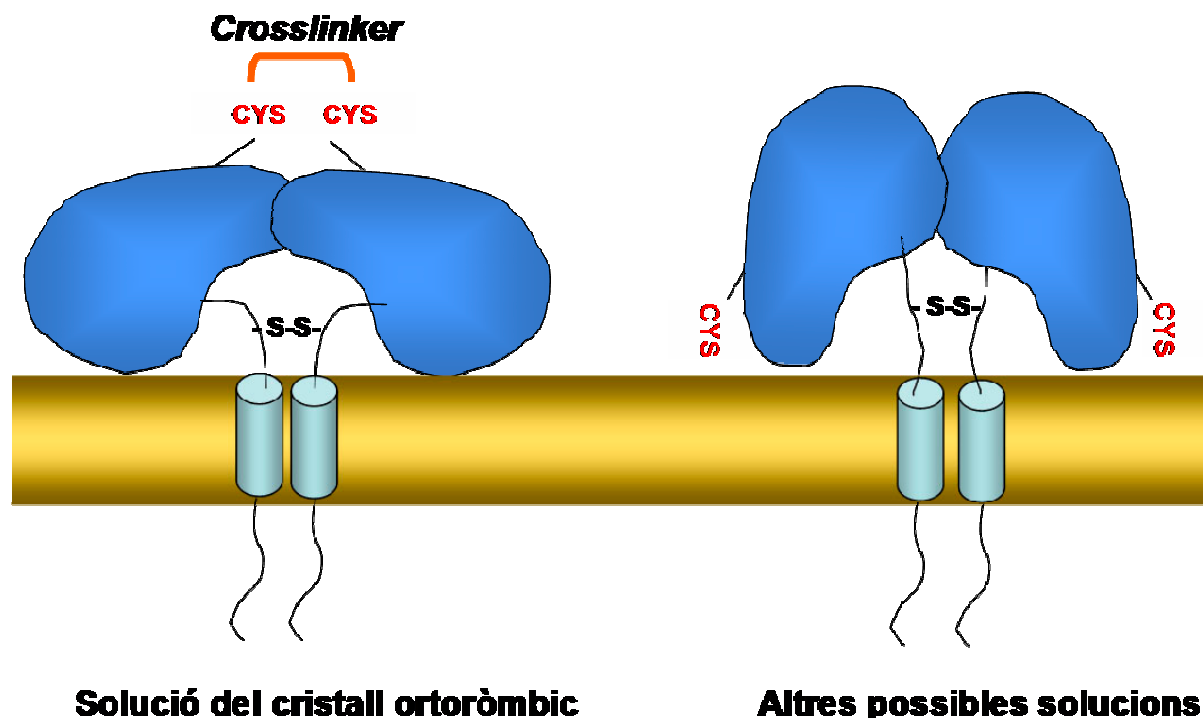


Figura 48. Esquema de les possibles arquitectures que podria tenir l'homodímer de 4F2hc en la membrana cel·lular segons la restricció del pont disulfur entre les cisteïnes 109. També s'hi assenyalen els dos residus que mutats a cisteïna permetrien distingir entre les dues possibilitats mitjançant un entrecreuantor químic (o *crosslinker*) d'una longitud semblant a la qual es troben els dos residus en el cristall.

Per determinar si l'homodímer del cristall ortoròmbic era semblant al que es troba en cèl·lules s'han dissenyat uns mutants individuals a cisteïna per tal de poder entrecreuar-los específicament a la distància que ens indica l'estructura (esquema de la figura 48 i figura 49). Tenint en compte l'estructura dimèrica del cristall ortoròmbic, hem buscat un residu que es trobés a menys de 15 Å, entre el de la cadena A i el corresponent de la cadena B. Hem seleccionat dos residus, S444 i S480, que compleixen aquesta característica: estan exposats però a prop de la zona de dimerització i tots dos són fàcilment mutables a cisteïna (figura 49). Actualment s'estan realitzant experiments d'entrecreuament químic (experiments de Laura R. de la Ballina) amb entrecreuadors específics per cisteïnes, per determinar si aquests dos residus es troben com a màxim a la distància d'entrecreuament (específica per cada entrecreuador) en l'homodímer de 4F2hc sobreexpressat en cèl·lules, o sigui si aquest homodímer està interaccionant pel domini C.

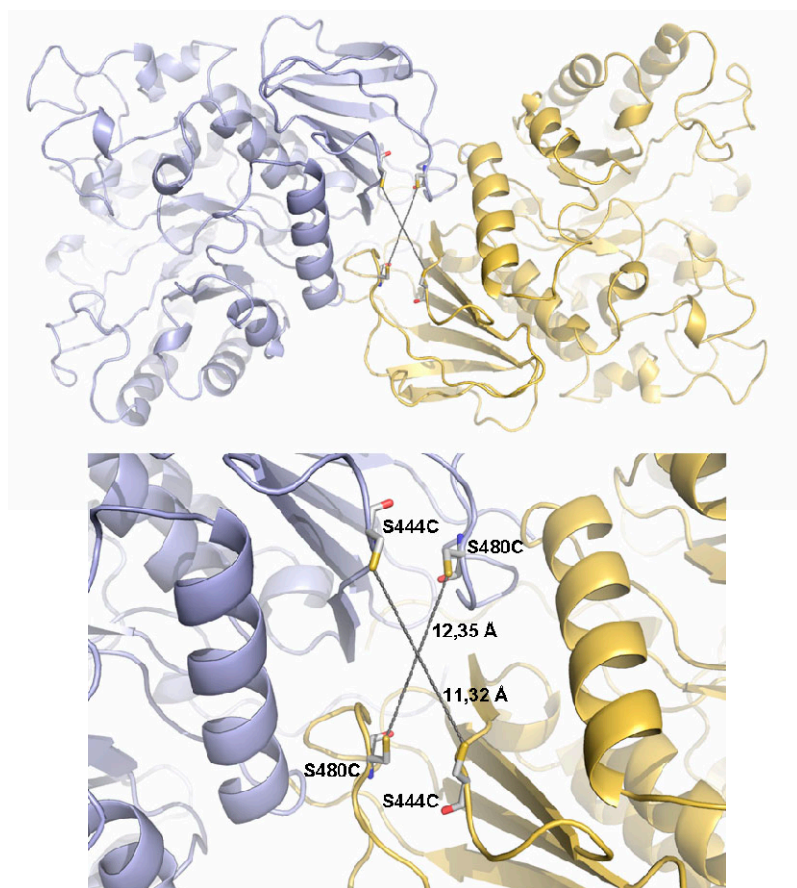


Figura 49. Model de l'homodímer amb les mutacions S444C i S480C. Visió superior del model (imatge superior) i zoom de la regió a entrecreuar (imatge inferior) on es poden apreciar els residus que han estat mutats individualment i la distància que hi ha entre ells en el model. Les mutacions s'han fet de manera individual, per tant l'entrecreuament només és possible amb el mateix residu de l'altra molècula, que són les distàncies representades.

El dímer que es troba en sobreexpressar 4F2hc no ha estat descrit fins ara en cèl·lules o teixits. De moment, el trobem en sobreexpressió de cèl·lules i oòcits en cultiu. Aquest fet seria menys rellevant si no fos perquè hi ha molts estudis sobre la sobreexpressió de 4F2hc. Com ja hem comentat en l'apartat 3.1 de la introducció, la sobreexpressió de 4F2hc en cèl·lules augmenta la proliferació i l'adhesió cel·lular i provoca morfologia transformant. Per estudis de la literatura (apartat 3.1 de la introducció) i estudis recents del Dr. Hans Burghardt en el nostre laboratori, sabem que 4F2hc es troba sobreexpressat en diferents tumors. A més a més els estudis d'activació d'integrines $\beta 1$ també estan fets amb sobreexpressió de 4F2hc.

En quant a l'expressió en superfície, fins ara s'havia demostrat que 4F2hc arribava sola a la membrana, quan es transfectava sense subunitat lleugera, com a monòmer (Nakamura et al., 1999), tot i que en l'article apareix una banda més gran de 160 kDa, que els autors no expliquen, que segurament correspon a l'homodímer. Estudis de biotinitiació de Laura R. de la Ballina (no mostrats) també demostren que quan sobreexpressem tenim homodímers de 4F2hc en la membrana.

També tenim tots els treballs que parlen de la *clusterització* de 4F2hc amb anticossos específics contra la proteïna i que el paper de la possible interacció amb galectina-3 podria ser precisament aquest (apartat 3.3 de la introducció). La *clusterització* de molècules de 4F2hc pot ser semblant a l'homodimerització i també faria possible fer complexos més grans mitjançant la unió de diferents homodímers per part de molècules amb més d'un lloc d'unió (és el cas dels anticossos bivalents).

Si aquests homodímers són els causants de la transformació de la cèl·lula o de la interacció amb les integrines encara està per demostrar, però no es pot descartar. Més enllà, podríem pensar que l'homodímer es podria donar en moments de sobreexpressió natural de 4F2hc, com l'activació de limfòcits T (Haynes et al., 1981). Un estudi exhaustiu de l'expressió de la proteïna en teixits i cèl·lules ens podria revelar si l'homodímer existeix en condicions fisiològiques. En aquest sentit, estudis preliminars duts a terme pel Dr. Hans Burghardt indiquen que l'homodímer podria existir en limfòcits humans. De fet, en un article de Hemler et al. de l'any 82 ja apareixia una banda més gran que l'heterodímer en un gel no reductor d'una línia cel·lular de cèl·lules T, malgrat que els autors no la identificaren (Hemler and Strominger, 1982).

Així, l'estudi de l'homodímer es fa rellevant per entendre en quina forma de 4F2hc tenen lloc les diferents activitats amb les que 4F2hc ha estat relacionada.

4.3. Model de treball proposat per a l'homodímer de 4F2hc

Amb la informació dels experiments exposats a l'apartat anterior hem construït un model per a l'homodímer que compleix la formació d'un pont disulfur entre les cisteïnes 109 i la interacció entre les dues molècules es produeix pel domini C terminal (de manera semblant a la interacció trobada en el cristall ortoròmbic). Més enllà també proposem un possible model per la dimerització de les hèlix transmembrana (figura 51).

Per modelar el dímer de les hèlixs transmembrana hem utilitzat el dímer de les hèlixs de la glicoforina A. El segment transmembrana de la glicoforina A és l'homodímer d'hèlixs transmembrana més ben caracteritzat: s'associa amb alta afinitat, principalment usant un motiu GXXXG. Aquest motiu on dues glicines estan separades per tres aminoàcids, ha estat proposat com a motiu universal per l'assemblatge de dues hèlixs transmembrana (Lemmon et al., 1994; MacKenzie et al., 1997). En 4F2hc trobem aquest motiu en una zona similar al de la glicoforina A, en la part superior del segment transmembrana (G94 i G98, figura 50). A partir de l'estructura de les hèlixs de la glicoforina A vam substituir la seqüència d'aquesta per la de 4F2hc (figura 51 C) mantenint el motiu GXXXG. L'angle que defineixen les dues hèlix hidrofòbiques d'ED4F2hc dimeritzant pel motiu GXXXG dona una inclinació compatible amb la llargada necessària (uns 32 Å) per travessar la membrana de fosfolípids. A més en la seqüència hi trobem una estabilització per sobre i per sota del motiu GXXXG (figura 51 C), per part de la Leu 87 i la Ile 102, que queden enfrontades donant lloc a una interacció hidrofòbica (posicions A i G figura 50). Aquesta estabilització és semblant a les que trobem en proteïnes com la glicoforina A o la proteïna *Major Coat Protein of the M13 bacteriophage* (MCP-TM) (figura 50) (Melnik et al., 2004). En algunes proteïnes com la glicoforina A aquest motiu és més complex que el simple motiu GXXXG (figura 50) (Dawson et al., 2002), i és necessària una treonina o una serina en posició G (figura 50) per formar un pont d'hidrogen que estabilitza i potser dirigeix la formació de l'homodímer. En altres, com MCP-TM, la inexistència d'aquesta estabilització en possibilita la funció ja que han

d'existir les formes monomèrica i dimèrica durant la vida del bacteriòfag (Melnyk et al., 2004). 4F2hc no té aquest residu serina o treonina en posició G, però hi té una isoleucina que produeix una interacció hidrofòbica, de manera més semblant a l'hèlix de MCP-TP.

4F2hc (90-102)	LGwlGMlaGAvvI
MCP (30-42)	VVivGAtiGIKLF
GpA (75-87)	LIifGVmaGVigT
	AB CD EF G

Figura 50. Aliniament de seqüència de la zona d'interacció del segments transmembrana entre 4F2hc, MCP (MCP-TM) i glicoforina A (GpA). A, B, C, D, E, F i G són els residus de la interfase del dímer. (figura basada en (Melnyk et al., 2004))

L'hèlix TM3 de xCT (una de les subunitats lleugeres que forma heterodímer amb 4F2hc) té un motiu SXXXG, que podria ser intercanviat per una de les dues hèlixs de l'homodímer per formar l'heterodímer (les glicines, en alguns casos, poden ser substituïdes per una alanina o una serina). En aquesta hèlix la cisteïna del pont disulfur queda en la mateixa posició, respecte el motiu d'Engelman, que en l'hèlix de 4F2hc. Així doncs, podria ser un lloc d'heterodimerització.

Per demostrar que les hèlixs interaccionen pel domini GXXXG vam construir els mutants LXXXL, on les dues glicines de 4F2hc eren substituïdes per leucines (doble mutant G94L i G98L). El resultat és el mostrat en la figura 51 B. El mutant no impedeix la formació de l'homodímer unit pel pont disulfur. Com en la resta de casos s'hauran de fer més experiments per saber si realment aquesta dimerització pel motiu GXXXG no es dóna o aquestes mutacions no són suficients per trencar l'homodimerització.

Finalment, en el model que hem construït (figura 51), el fragment del coll de la proteïna es va optimitzar a partir del primer aminoàcid polar després de l'hèlix hidrofòbica fins la Cys109, tenint en compte el pont disulfur i procurant relaxar l'estructura. Posteriorment el dímer de l'ectodomini es va posicionar a sobre utilitzant l'eix binari de simetria.

Segons aquest model un fragment proper a l'N-terminal (W456, D457 i Q458) (figura 27), que està conservat en tots els 4F2hc de vertebrats i no en rBAT en les glucosidases, interaccionaria amb el coll de la pròpia molècula i també de la molècula veïna, i podria establir la interacció entre els 2 colls.

En resum, el model de la figura 51 es basa en tres punts: la restricció del motiu GXXXG, el pont disulfur entre les cisteïnes 109 i la dimerització mitjançant el domini C de l'ectodomini.

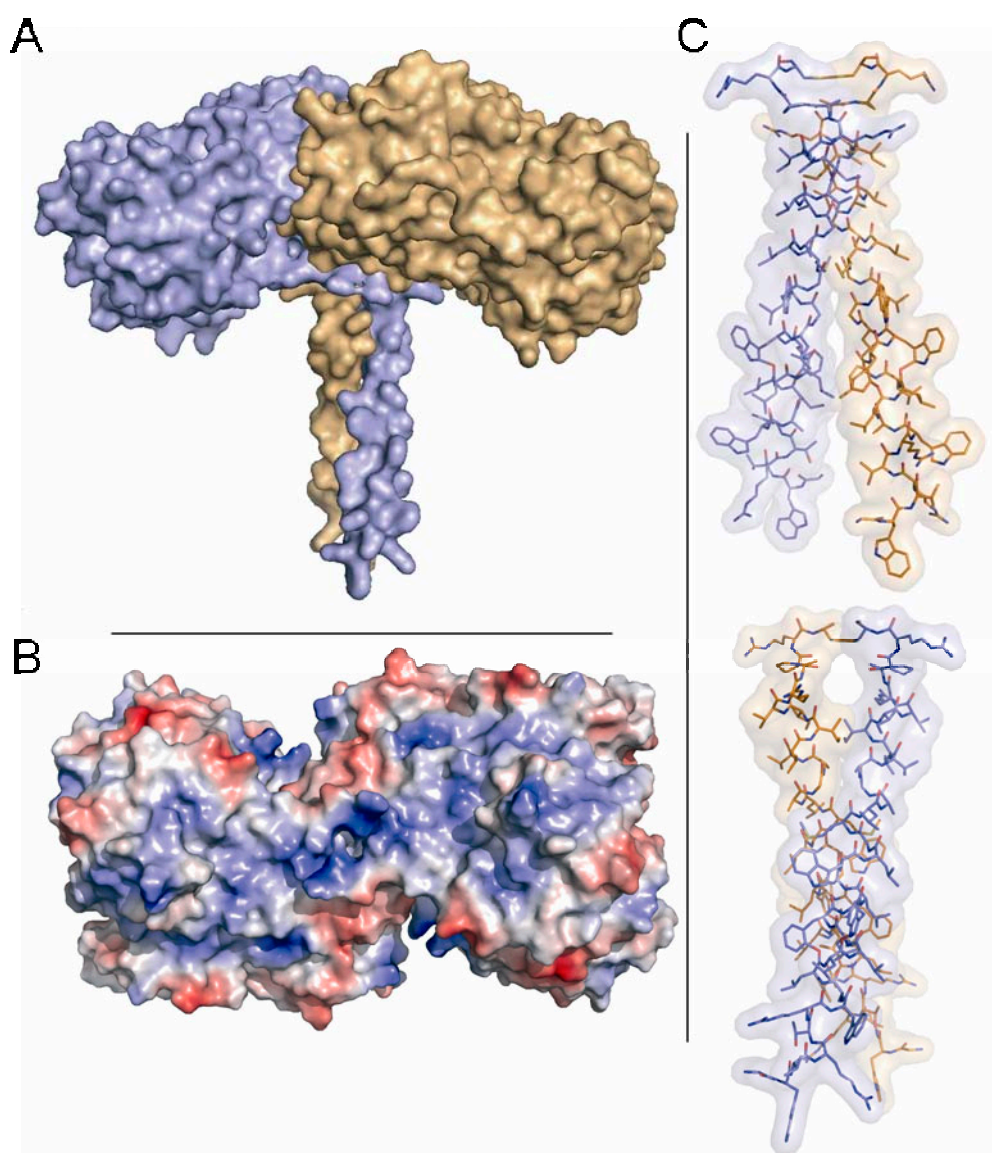


Figura 51. **A.** Dibuix del model de l'homodímer de 4F2hc (sense extrem N-terminal) . **B.** representació de la superfície electrostàtica de l'ectodomini per la banda on estaria en contacte amb la membrana. **C.** Detall de la dimerització de les dues hèlixs transmembrana mitjançant el domini GXXXG, i en la part superior les dues cisteïnes formant el pont disulfur sense dificultat.

5. Models d'interacció amb la membrana

L'estudi de l'estructura de l'ectodomini de 4F2hc ens ha donat certa informació per elaborar hipòtesis de la seva funció i intentar demostrar-les experimentalment.

L'estudi de la superfície de càrregues electrostàtiques ens indica una diferència de càrregues (figura 24 i figura 52 B) entre la zona inferior del barril (β/α)₈ i la resta de l'estructura. La zona inferior és on es troba l'N-terminal i conté diverses lisines i arginines que projecten les seves cadenes laterals cap a l'exterior, conferint una càrrega positiva al voltant de la cua N-terminal. Creiem que aquestes cadenes laterals interaccionaran amb els fosfolípids de la membrana, de manera semblant com ho fan algunes proteïnes associades a membrana. Està demostrat que algunes proteïnes perifèriques de membrana (com Src, K-Ras, Fosfolipasa secretada A2s, MARCKS i la poliproteïna Gag de HIV-1) requereixen per a la seva activitat i regulació, una interacció electrostàtica entre grups de residus bàsics en la proteïna i els fosfolípids acídics de la membrana (McLaughlin and Aderem, 1995; Resh, 1999; Bhatnagar and Gordon, 1997; Murray et al., 1997; Garnier et al., 1998; Conte and Matthews, 1998; Gelb et al., 1999). També hi ha moltes evidències que moltes altres proteïnes i dominis proteics implicats en direccionament a la membrana també utilitzen interaccions electrostàtiques no específiques per a la seva funció i per a l'associació amb la membrana (Johnson and Cornell, 1999; Hurley and Misra, 2000; Murray et al., 2002)

Per altra banda, el fragment de l'N-terminal que es pot veure en els cristalls està disposat més o menys paral·lel a la superfície del barril, de manera que si ens creiem aquesta disposició en la proteïna natural no hi ha gaire marge perquè aquesta cua N-terminal arribi fins al segment transmembrana (4 residus abans de la Cys 109) i, tenint en compte la informació de les càrregues de la superfície, nosaltres proposem que l'N-terminal fa un gir d'aproximadament 90° i el barril interacciona amb la membrana per la zona carregada positivament. El pla de la membrana, però, no seria completament antiparal·lel a l'eix del barril, sinó que els finals de les hèlixs A α 1 i A α 2 estarien contactant amb els fosfolípids (figura 52).

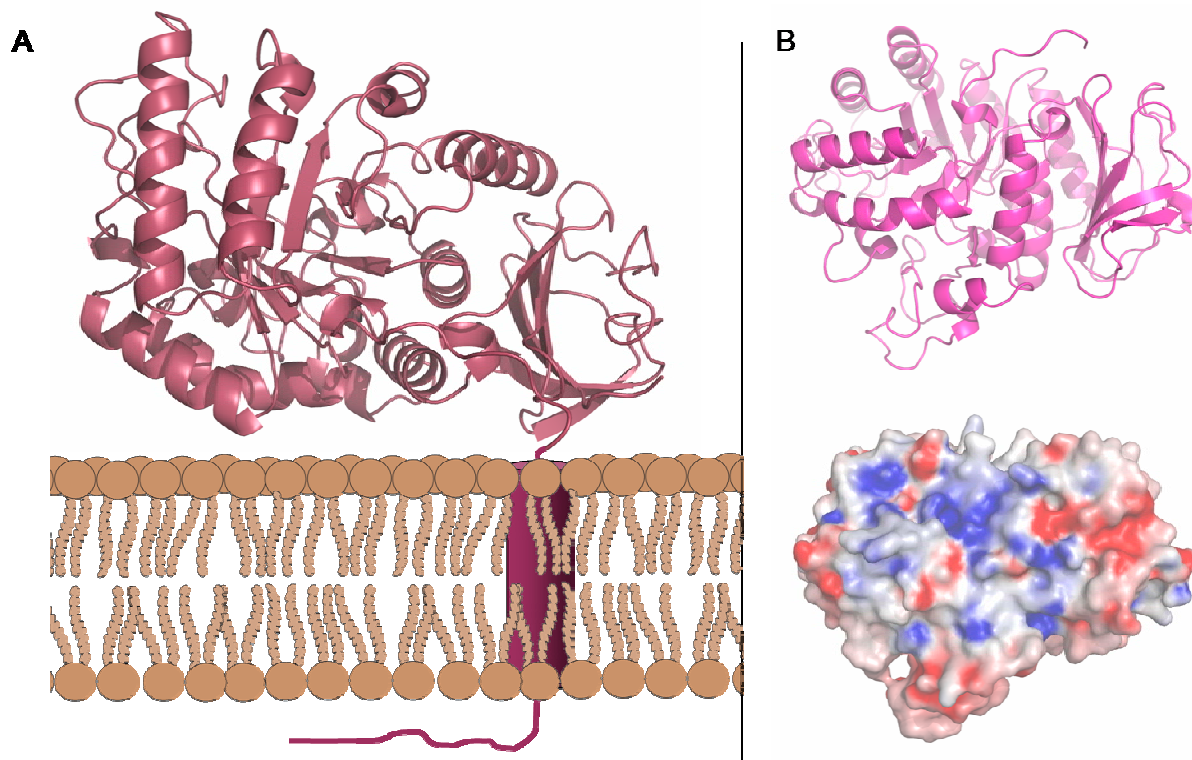


Figura 52. A. Model 1 proposat per a la interacció de l'ectodomini amb la membrana. El pla de la membrana s'ha posat paral·lel al pla que defineix el triangle dels C α dels residus lisina 154, arginina 433 i arginina 524. B. Vista inferior de la zona d'interacció amb la membrana de l'estructura de l'ED4F2hc (superior) on s'hi mostra la superfície electrostàtica calculada amb GRASP (inferior).

Per altra banda el model de l'homodímer de 4F2hc (apartat 4.2 dels resultats) ens proposa un posicionament en la membrana una mica diferent. En aquest cas el pla de la membrana es situaria perpendicular a l'eix de simetria de l'homodímer (figura 53 A). La superfície electrostàtica que contacta amb la membrana continua sent positiva (figura 53 B), però no és plana, ja que l'estructura s'alça per la zona de contacte entre els dos protòmers. Per resoldre aquest dilema hi ha dues possibilitats: o bé l'estructura adopta una conformació més plana com a efecte de les interaccions amb la membrana o bé la membrana es corba acoblant-se a la superfície de la part inferior de l'homodímer també a causa de les interaccions electrostàtiques. Aquest últim cas ha estat demostrat amb simulacions de dinàmica molecular pels dominis BAR (Bin/amphysin/Rvs), els quals indueixen la curvatura de la membrana per unió completa de la membrana a la superfície còncava del (Blood and Voth, 2006).

Aquests dos models volen ser una aproximació a la posició de 4F2hc respecte la membrana cel·lular. Com el seu nom indica són models, o sigui, dibuixos que intenten complir amb les restriccions experimentals, però dels quals desconeixem la

seva estructura final. La disposició de 4F2hc en la membrana ens donaria una idea de la posició respecte l'ectodomini de 4F2hc en què podrien trobar-se les subunitats lleugeres quan estan unides pel pont disulfur. Es podrien plantejar estratègies de mutagènesi dirigida i entrecreuament de cisteïnes per esbrinar quines parts de les dues subunitats de l'heterodímer estan a prop i/o interaccionen.

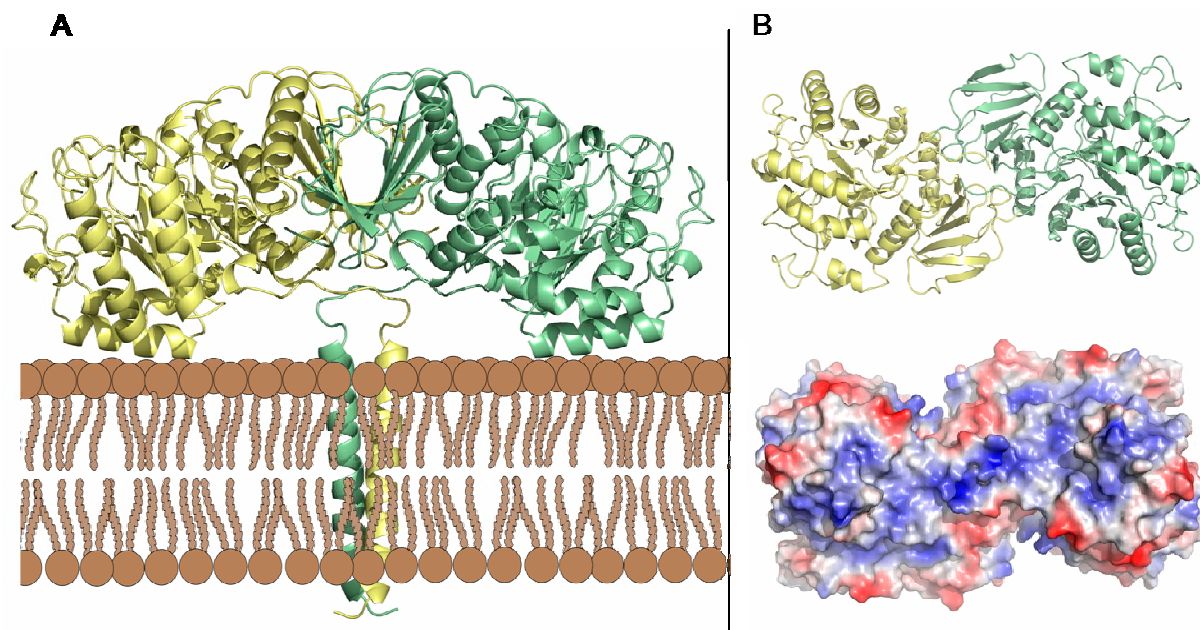


Figura 53. A. Model 2 proposat per a la interacció de l'homodímer amb la membrana. El pla de la membrana s'ha posat perpendicular a l'eix de simetria del dímer. B. Vista inferior de la zona d'interacció amb la membrana de l'estructura de l'ED4F2hc (superior) on es mostra la superfície electrostàtica calculada amb GRASP (inferior).

6. Interacció de l'ectodomini de 4F2hc amb altres proteïnes

Amb col·laboració amb el Dr. Fernández-Recio s'han fet estudis de les zones de possible interacció amb proteïnes de la superfície de l'estructura de l'ectodomini de 4F2hc amb el mètode ODA (*Optimal docking area*) (Fernandez-Recio et al., 2005). No ha sortit cap regió amb alta probabilitat d'interacció, només una lleugera probabilitat al voltant de la fenilalanina 235, que queda una mica exposada cap al final de l'hèlix A α 3 del barril.

Per altra banda, estudis de dinàmica molecular de l'estructura elaborats pel Dr. Ferrer-Costa a 10 ns ens mostren poc moviment de l'estructura. La distància màxima, en RMSD, a què arriben els models de la dinàmica és d'1,8 Å d'. Aquestes

dades ens indiquen que l'estructura és molt estable, sense tendència a tenir canvis conformacionals. Les zones que més es desplacen en la dinàmica són l'N-terminal i alguns bucles en el barril. Estudis de dicroisme circular fets pel Dr. Turnay ja ens indicaven que l'estructura era molt estable amb una T_m de 56°C (apartat 1.5 de resultats).

Així, tots els estudis de l'estructura ens indiquen un caràcter estable i inert de l'ectodomini de 4F2hc, que no sembla tenir cap canvi conformacional ni cap zona d'interacció evident per proteïnes.

Malgrat això, estudis d'assemblatge (*docking*) computacional, han demostrat que l'ectodomini de 4F2hc podria interaccionar amb ell mateix per diverses zones. Aquestes zones contenen majoritàriament interaccions electrostàtiques entre les cadenes laterals de les dues proteïnes. Són estudis preliminars, però ens permeten dir que sí que hi ha zones que podrien interaccionar amb proteïnes, tot i que la naturalesa d'aquestes interaccions seria bàsicament electrostàtica i no tant hidrofòbica.

Com em comentat en la introducció, en la literatura hi han indicis de la interacció de 4F2hc amb algunes proteïnes. Estudis d'immunoprecipitació han demostrat interacció amb galectina 3 (Dong and Hughes, 1997), ICAM-1 (Liu et al., 2003) i CD147 (Xu and Hemler, 2005) (apartat 3.3, 3.4 i 3.5 de la introducció) a més de totes les subunitats lleugeres amb les quals es troba unit per un pont disulfur.

Nosaltres hem començat a fer estudis amb l'ectodomini purificat i proteïnes candidates purificades. S'han fet estudis d'ELISA amb algunes d'aquestes proteïnes candidates de les quals disposàvem: diferents dominis de ICAM-1, ICAM-3 i ICAM-5 (proteïnes recombinants glucosilades facilitades pel laboratori del Dr. Casasnovas). Els resultats semblen mostrar certa interacció amb ICAM-1 3 dominis (tres dominis N-terminals semblants a immunoglobulines d'ICAM-1) però els resultats no han estat concloents i segurament necessitem més sensibilitat.

Per aquest motiu vam començar estudis de Ressonància del Plasmó de Superfície. Tot i que les dades són molt preliminars, els primers experiments indiquen una interacció específica de l'ectodomini glicosilat de 4F2hc (produït en cèl·lules 293T) amb galectina-3 (apartat 5.5 dels resultats). Sobre els ICAMs no s'han fet els estudis

per afirmar o descartar la interacció. Tampoc disposem de la informació de la interacció amb l'ectodomini de CD147 ni EpCAM, tot i que ja disposem de les proteïnes pures per fer els experiments. Tenim previst ampliar l'estudi d'interaccions amb aquestes proteïnes candidates amb la Ressonància del Plasmó de Superfície pròximament.

La producció de l'ectodomini de 4F2hc com a proteïna soluble ens ha permès fer molts estudis funcionals i d'interacció amb altres substrats i proteïnes i la seva cristal·lització. La resolució de l'estructura de l'ectodomini de 4F2hc ha donat molta informació per estudiar la possible funció de 4F2hc. Evidentment l'estructura de 4F2hc complet i unida a una subunitat lleugera encara aportarien més informació, però encara està lluny de resoldre's. Gràcies a aquesta estructura ara coneixem una mica més com són les subunitats pesades dels transportadors heteromèrics d'aminoàcids, informació que esperem que sigui útil per dissenyar experiments tant funcionals com d'estructura en un futur. Aquest treball només ha estat una aportació a un projecte l'objectiu final del qual és entendre l'estructura dels transportadors heteromèrics d'aminoàcids i descobrir quina és la funció d'aquest gran domini semblant a glicosidases en una proteïna implicada en múltiples funcions.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. L'ectodomini de 4F2hc es produeix de forma soluble en *E. coli* i en el sobrenedant de cèl·lules 293T.
2. La proteïna purificada cristal·litza en diverses condicions. Els cristalls en forma d'agulla són de tipus monoclínic i contenen 1 molècula per unitat asimètrica. Els cristalls en forma de placa són ortoròmbics i contenen dues molècules per unitat asimètrica.
3. S'ha resolt l'estructura de l'ectodomini de 4F2hc a 2,1 Å en el cristall monoclínic i a 2,8 Å en l'ortoròmbic.
4. L'estructura de l'ectodomini de 4F2hc està formada per un barril (β/α)₈ i un tot β amb 8 fulls beta semblants als dominis A i C de les glicosilhidrolases.
5. El lloc catalític remissent de les α -glucosidases no conté els aminoàcids catalítics clau. D'acord amb això no hem trobat activitat α -glucosidasa, α -manosidasa ni α -galactosidasa en l'ectodomini de 4F2hc. Tampoc hem trobat cap unió específica a glúcids.
6. El dicroisme circular i la dinàmica molecular demostra que ED-4F2hc té una estructura molt rígida.
7. ED-4F2hc homodímeriza en els cristalls ortoròmbics amb una coordinació de zenc en la interfase. El dímer és compatible amb el que es troba en sobreexpressar 4F2hc en cèl·lules. La funció de la coordinació de zenc és encara desconeguda.

