

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

Joana Fort i Baixeras

TESI DOCTORAL  
Barcelona, octubre de 2006

## **MATERIALS i MÈTODES**



# 1. Biologia molecular

## 1.1 Tècniques estàndards

### 1.1.1 PCR

La reacció en cadena de la polimerasa, PCR (Saiki et al., 1988) s'ha utilitzat per a amplificar fragments de DNA a partir de plasmidis amb el cDNA clonat. La PCR utilitza la Pfu DNA polimerasa (Stratagene), un enzim d'elevada fidelitat de còpia, capaç de sintetitzar DNA a les temperatures necessàries per a deshibridar les cadenes de DNA i hibridar els oligonucleòtids a les cadenes complementàries de DNA, atesa la seva naturalesa termoestable. L'aparell emprat ha estat Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2400. El tampó adequat per a la reacció conté magnesi, dNTPs i dos oligonucleòtids, directe i invers, complementaris als límits del fragment de DNA a amplificar. Els oligonucleòtids encebadors (*primers*) han de ser el més específics possible a la regió del DNA on s'han d'hibridar, amb una llargada mitjana d'uns 20 nucleòtids i un contingut mínim del 50 % en bases G i C, evitant la formació d'estructures secundàries. Per al disseny dels *primers* s'ha usat el programa DNASTar (Lasergene).

### 1.1.2 Clonatge

Procés a partir del qual s'aconsegueix la lligació del DNA, el qual implica reaccions de digestió i obtenció de DNA amb extrems roms o cohesius segons allò descrit per Sambrook i col·laboradors (Sambrook and Russell, 2001). L'enzim T4 DNA lligasa (New England Biolabs, NEB) s'ha usat per a lligar inserts de DNA i plasmidis durant 2 o 3 hores a temperatura ambient. Les quantitats totals de DNA oscil·len entre 10-500 ng de DNA amb un excès de les molècules d'insert respecte a les de plasmidi (relació 3 :1).

Per a clonar els fragments de DNA que provenien de la PCR, s'ha utilitzat el paquet comercial *pGEMt easy* (Promega) segons les indicacions del fabricant.

### 1.1.3 Transformació de cèl·lules competents

Tècnica a partir de la qual s'introdueix DNA exogen, plasmidi que conté el DNA

d'interès, en cèl·lules procariotes. Per a aconseguir la internalització del plasmidi, s'altera la permeabilitat de la membrana bacteriana mitjançant xoc tèrmic (Sambrook and Russell, 2001) amb el següent protocol:

S'afegeix el DNA plasmídic (relació 10:1) a 50 µl de cèl·lules competents pretractades amb clorur de calci. Després de 10 minuts en gel, s'incuba la barreja 1 minut a 42 °C i 5 minuts a 4 °C. S'afegeix 1 mL de medi LB (1 % triptona, 0.5 % extracte de llevat i 1 % NaCl) i s'incuba durant 1 hora a 37 °C, en agitació constant. A continuació, se sembren 200 µl de la suspensió cel·lular (o es centrifuga el tub i es torna a resuspendre el precipitat en un volum de 200 µl) sobre plaques de LB-agar (1.5 % agar), que contenen l'antibiòtic, al qual és resistent el plasmidi que hem introduït. S'incuben les plaques a 37 °C durant tota la nit.

S'han utilitzat cèl·lules competents d'E.coli DH5α per als passos inicials de biologia molecular i la soca d' E.coli BL21(DE3) (Stratagene), transformada amb els plasmidis d'expressió per a produir la proteïna recombinant. Els plasmidis utilitzats pTrcHisA, pGEX6p conferien resistència a ampicil·lina, mentre que pET28a(+) ho fa a la kanamicina.

#### **1.1.4 Obtenció de DNA plasmídic**

Per a aïllar el DNA plasmídic dels cultius cel·lulars, s'han utilitzat els kits de miniprep per a cultius de 5 ml (Qiagen Plasmid Miniprep) i maxiprep per cultius a de 500 ml (Qiagen Plasmid Maxiprep) segons les recomanacions del fabricant. Aquests protocols es basen en la lisi inicial de la paret cel·lular mitjançant tractament alcalí (lisi alcalina), seguida per l'absorció del DNA a una reïna de sílice en presència d'un tampó amb alta concentració de sal i la posterior elució amb un tampó amb baixa concentració de sal (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, pH8.0).

#### **1.1.5 Seqüenciació del DNA**

Per a comprovar l'absència d'errors, s'han seqüenciat totes les construccions de DNA mitjançant el paquet de seqüenciació ABI-Prism DNA versió 3.0 (Applied Biosystems). Es du a terme una reacció de PCR i es posen dNTPs marcats amb diferents grups fluoròfors. A continuació, les cadenes de DNA són analitzades per electroforesi capil·lar i fluorimetria amb el seqüenciador ABI Prism 3700 (Applied

Biosystems) al servei de seqüenciació dels Serveis Científico-Tècnics (SCT) de la Universitat de Barcelona al Parc Científic de Barcelona.

### 1.1.6 Electroforesi de DNA

Per a separar molècules de DNA de diferents mides s'ha usat l'electroforesi en gel d'agarosa segons allò descrit per Sambrook i col·laboradors (Sambrook and Russell, 2001). El gel s'obté dissolent 1.5 % d'agarosa en tampó TAE (TrisHCl 40 mM, EDTA 2 mM), s'escalfa, s'afegeixen 0.5 µg/mL de bromur d'etidi i es deixa gelificar dins de la cubeta d'electroforesi. Es carreguen les mostres, a les quals s'ha afegit el tampó de càrrega a una concentració final de 5 % de glicerol i 0.05 % de blau de bromofenol i se sotmet a una diferència de potencial de 80 V en el tampó d'electroforesi TAE. El DNA és visible a l'UV atès que les molècules de bromur d'etidi presents en el gel d'agarosa s'intercalen entre les cadenes de DNA i donen lloc a una fluorescència rosada.

## 1.2 Construcció del vectors d'expressió

El plasmidi bacterià usat per a l'expressió de les nostres proteïnes d'interès és el pTrcHis (*invitrogen*) que té una cua de sis histidines, un epítip X-press i un lloc de tall per EK a N-terminal d'on clonem la proteïna. Hem construït tres plasmidis: pTrcHisGrBAT (amb el domini semblant a glucosidasa d'rBAT humà), pTrcHisrGrBAT (amb el domini semblant a glucosidasa d'rBAT de conill) i pTrcHisG4F2hc (amb el domini semblant a glucosidasa de 4F2hc humà) (figura 9). L'estratègia de clonatge ha estat, en el cas de pTrcHisGrBAT i pTrcHisrGrBAT, per PCR introduint en el fragment amplificat una diana BamHI just on comença el domini semblant a glucosidases amb *primers* que incloïen aquesta diana en l'extrem 5' (veure en taula 10 BamHI.RBAT i BamH1.rGrBAT respectivament) i la seva posterior digestió amb BamHI i un enzim de restricció la diana del qual ja es trobava dins el producte de PCR (HindIII i XhoI respectivament). pTrcHisG4F2hc ha estat clonat a partir d'un insert producte d'una digestió amb NruI i HindIII d'un plasmidi del nostre laboratori on hi ha el cDNA de 4F2hc humà clonat (pSPORT-h4F2hc).

Els plasmidis pGEX6p1-hG4F2hc i pGEX6p1-hGrBAT i pET28-hG4F2hc i pET28-hGrBAT s'han construït a partir dels plasmidis comercials pGEX6p1 (Amersham) que té la proteïna de fusió GST abans del lloc de clonatge i pET28a

(Novagen) que té una cua de 6 histidines a 5' del lloc de clonatge. En el cas dels plasmidis d'rBAT han estat clonats a partir de pTrcHishGrBAT entre les dianes de restricció BamHI i NotI i en el cas de 4F2hc a partir de pTrcHishG4F2hc digerint amb un únic enzim BamHI. També s'ha fet la construcció pTrcHishGrBAT-Cter i pGEX6p1hGrBAT-Cter (li manquen els aminoàcids 652-686 d'rBATH) mitjançant la introducció d'un codó STOP i d'una diana de restricció XhoI a 3' per PCR (veure en la taula 10 CterXho).

Per a l'expressió en cèl·lules eucariotes d'ED4F2hc s'ha construït el plasmidi pEF-ED4F2hc-Fc (veure taula 11). La introducció de les dianes de la proteasa trombina (Amersham) s'ha fet mitjançant PCR amb *primers* que inclouen aquestes dianes (ThrBamHIREV taula 10). Aquest vector s'ha construït amb 2 passos per obtenir un vector final amb pèptid senyal (SP, perquè la proteïna sigui secretada), epítotop HA i diana per trombina a N-terminal, i diana per trombina i fragment Fc de IgG humanes a C-terminal de l'ectodomini de 4F2hc.

Nom primer	Seqüència 5'-3'	motiu
<b>BamHI.RBAT</b>	AGGGATCCGACTGGTGGCAGGAGGGGC	Clonació ED-rBAT humana FORWARD
<b>pbshrbat.rev</b>	GTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGG	Clonació ED-rBAT humana REVERSE
<b>BamHI.rGrBAT</b>	GGGATCCGATTGGTGGCAGGCAGGGC	Clonació ED-rBAT de conill FORWARD
<b>HisFOR2</b>	CGGACTCTGTACGACGATGACG	Amplificació a partir de pTrcHis FORWARD
<b>CterXho</b>	AAGCTCGAGCTAGTTGTGTTCAAAGATGAG	Clonació rBATH sense la cua C-terminal (652-685) REVERSE
<b>NcoIrrBBFOR</b>	TAACCATGGCTTTCATACCAAACCACACGAG	Clonació subdomini rBATH FORWARD
<b>EcoIrrBsub</b>	CTTGAATTCACCTAATTGCGGAAATTTAAATCAGGT	Clonació subdomini rBATH REVERSE
<b>pTrcHisFOR</b>	GAGGTATATATTAATGTATCG	seqüenciar pTrcHis FORWARD
<b>pTrcHISREVBO</b>	GAGTTCGGCATGGGGTCAGGT	seqüenciar pTrcHis REVERSE
<b>rrBAT1/2FOR</b>	TCACAGCCTGGATGGAAAACA	seqüenciar rBAT de conill FORWARD
<b>rrBAT1/4F</b>	ATGTTCAAGAAGAAATAAAAAG	seqüenciar rBAT de conill FORWARD
<b>rrBAT1/2REV</b>	ATTGGGCCATTTTCCTTC	seqüenciar rBAT de conill REVERSE
<b>Xba1FOR</b>	CGCTCTAGACCGGCGCAGAAGTGG	Clonació ED-4F2hc humana en pBSKS-SP-HA FORWARD
<b>ThrBamHIREV</b>	GGTCGGATCCACGAGGAACCAAGGCCGCGTAGGGGAAGC	Clonació ED-4F2hc humana en pBSKS-SP-HA més lloc de tall per Thrombin REVERSE

**Taula 10. Taula de primers.** Taula amb tots els primers usats en aquesta tesi amb el motiu de cadascun.

Nom construcció	Plasmidi mare	Insert	Dianes de restricció	Primers	Característiques
<i>pTrcHisHED4F2hc</i>	pTrcHisA (Invitrogen)	ED-4F2hc (aa 111-529)	NruI i HindIII		6xHis, X-press lloc de tall per EK a N-terminal
<i>pTrcHisHEDrBAT</i>	pTrcHisA (Invitrogen)	ED-rBATH (aa 116-686)	BamHI i HindIII	BamHI.RBAT i pbshrbat.rev	idem
<i>pTrcHisrEDrBAT</i>	pTrcHisA (Invitrogen)	ED-rBATr (aa 108-677)	BamHI i XhoI	BamHI1.rGrBAT i T7	idem
<i>pGEX6p1-hED4F2hc</i>	pGEX6p1 (Amersham)	ED-4F2hc (aa 111-529)	BamHI		GST a N-terminal
<i>pGEX6p1-hEDrBAT</i>	pGEX6p1 (Amersham)	ED-rBATH (aa 116-686)	BamHI i NotI		GST a N-terminal
<i>pET28-hED4F2hc</i>	pET28a (Novagen)	ED-4F2hc (aa 111-529)	BamHI		6xHis a N-terminal
<i>pET28-hEDrBAT</i>	pET28a (Novagen)	ED-rBATH (aa 116-686)	BamHI i NotI		6xHis a N-terminal
<i>pTrcHisHEDrBAT-Cter</i>	pTrcHisA (Invitrogen)	ED-rBATH (aa 116-651)	BamHI i XhoI	HisFOR2 i CterXho	6xHis, X-press lloc de tall per EK a N-terminal
<i>pGEX6p1hEDrBAT-Cter</i>	pGEX6p1 (Amersham)	ED-rBATH (aa 116-651)	BamHI i XhoI	HisFOR2 i CterXho	GST a N-terminal
<i>pBSKS-SP-HA-ED4F2hc</i>	pBSKS-SP-HA (Dr. Casasnovas)	ED-4F2hc-Thr	XbaI i BamHI	Xba1FOR i ThrBamHIREV	SP-HA-Thr a N-ter i Thr a C-terminal
<i>pEF-ED4F2hc-Fc</i>	pEF-Fc (Dr. Casasnovas)	SP-HA-ED-4F2hc-Thr	Sall i BamHI		SP-HA-Thr a N-ter i Thr-Fc a C-terminal

Taula 11. Taula de vectors. Vectors construïts durant la tesi per usar en experiments d'expressió.

## 2. Tècniques d'expressió

### 2.1 Expressió pilot

Per tal d'optimitzar diferents paràmetres de l'expressió de les nostres proteïnes hem fet expressions pilot que consisteixen en el creixement (37°C 250rpm aproximadament) en 125 ml de medi LB amb ampil·lina d'un inòcul de 500 µl provinent d'un cultiu líquid de 2 ml ON a la temperatura desitjada de les cèl·lules d'interès. Quan aquest cultiu arriba a la OD<sub>600</sub> requerida s'indueix mitjançant l'addició d'IPTG a la concentració desitjada. En les hores posteriors s'agafen alíquotes d'1 ml del cultiu, es mesura l'OD<sub>600</sub> i es centrifuga a 13000 rpm 3 min. El pèl·let de cèl·lules es guarda a -20 °C per tal de ser analitzat posteriorment. Quan s'han agafat totes les alíquotes requerides els pèl·lets són descongelats, resuspendos en tampó fosfat 20mM pH7 i lisats per congelació/descongelació durant quatre cicles (mitjançant nitrogen líquid i un bany a 42 °C). Aquesta solució se centrifuga durant 30 min a 13000 rpm a 4°C i es guarden els sobrenedants (proteïna soluble) i els precipitats (proteïna no soluble i cossos d'inclusió) per a la seva posterior anàlisi per Western Blot i tinció de proteïnes de Coomassie.



**Soques utilitzades:** Hem fet expressions pilots amb diferents soques d'*E. coli*: DH5 $\alpha$ , TOP10, JM109, XL1Blue i BL21DE3. Totes elles han estat fetes competents amb el mètode de CaCl<sub>2</sub> (Current Protocols in Protein Science) i transformades amb els plasmidis. Després s'han fet expressions pilot i s'han comparat.

**Inducció a diferents temps de la corba de creixement exponencial.** Després de determinar la corba de creixement (lectures de OD<sub>600</sub> a cada hora) per a cada soca de cèl·lules i per a cada plasmidi transformat, s'han induït les cèl·lules en les tres fases del creixement exponencial: al principi, al mig i al final i s'han comparat.

**Temperatures d'inducció:** també s'ha provat de baixar la temperatura de creixement després d'induir fins a 20 °C i deixar créixer les cèl·lules *over night* (ON) a aquesta temperatura (agitant en un bany orbital a RT).

## 2.2 Expressió a gran escala

A partir dels resultats de les expressions pilot s'estableixen les millors condicions d'expressió per a cada proteïna i es preparen els cultius d'*E. coli* amb més quantitat per tal d'obtenir proteïna en quantitat abundant. Al llarg del temps el protocol es va millorant, fins a arribar al protocol actual:

Primer dia:

Posar starter ON del glicerol: 20 ml LB ampicil·lina d'starter per 4 litres de cultiu.

Segon dia:

- 1- Inocular l'starter en el volum total de cultiu al migdia (14-15h). Esperar que la OD sigui de 0,6-0,7 (3,5 h aprox.).
- 2- Preparar IPTG per induir: IPTG 1M en aigua, filtrat. 5g IPTG (MW 238,3) dissolt en 21 ml d'aigua miliQ i filtrat amb filtre 0,22 $\mu$ m amb xeringa. Guardar a -20°C.
- 3- Abans d'induir separar una alíquota (uns 25 ml) per fer cultiu no induït (To).
- 4- Induir cultiu amb una concentració d'IPTG 1 mM (1/1000 de la solució 1 M). (1 ml per litre)

5- Deixar créixer ON a 37 °C (unes 16 hores aproximadament)

Tercer dia:

- 1- Recollir una alíquota de 100 µl de cèl·lules de cultiu no induït (de l'alíquota que hem separat) i de cultiu induït per carregar en un gel d' SDS
- 2- Centrifugar el cultiu a 6000 xg a 4°C durant 15-30 minuts.
- 3- Descartar el medi
- 4- Resuspendre els pèl·lets aproximadament a 2/1 (volum/pes) (per ex., 4 litres ±25 mg de pèl·let = 50 ml de buffer)
- 5- Congelar els pèl·lets resuspesos amb buffer de lisi en falcons a -80 °C (si es vol guardar). (Buffer lisi : 0,02 M NaHPO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, pH 7,4)

L'expressió estàndard actual és: un inòcul de 16 ml (procedent d'un cultiu ON) és inoculat en 4l d'LB amb ampicil·lina i aquest es deixa créixer (a 37 °C i 250 rpm) fins a una OD<sub>600</sub> de 0,6-0,7. En aquest punt s'indueix el cultiu amb una concentració d'IPTG final d'1 mM i es deixa créixer el temps requerit segons els resultats de les expressions pilot (16 hores en el cas de BL21-HishG4F2hc). El cultiu se centrifuga a 6000xg a 4°C durant 15 min i el pèl·let resultant s'utilitza o es congela a -80°C.

### 2.3 Expressió a gran escala amb selenometionina

Per produir la proteïna amb selenometionina enlloc de metionina es va utilitzar un protocol semblant al estàndard però amb algunes diferències. Per de créixer les cèl·lules BL21 transformades amb HishG4F2hc s'ha utilitzat un medi especial enlloc d'LB. El medi s'anomena M9 medi mínim i conté: 6 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g de NH<sub>4</sub>Cl i 0,5g NaCl en un litre d'aigua bidestil·lada. A aquest medi se li afegixen tots els aminoàcids a 40 µg/ml excepte glicina, prolina, asparagina, cisteïna i metionina que prèviament han estat pesats i dissolts en una solució 50X; glucosa al 0,2 % final (preparar solució 20 % glucosa), 2 µM MgSO<sub>4</sub> (prepara solució 1 M MgSO<sub>4</sub>), 0,1 µM de Ca<sub>2</sub>Cl (d'una solució 2 M Ca<sub>2</sub>Cl), tiamina i biotina 0,5 mg/l (solucions mare 0,5 % de cadascuna) i ampicil·lina 1/1000. El protocol és idèntic fins al moment que els cultius estan a una OD=0,5-0,6 (segon dia), quan es centrifuguen a 3000 rpm i els pèl·lets són ressuspesos en el medi descrit abans. Es deixen recuperar les cèl·lules 15 minuts i se'ls afegix la L-Se-Met a 50 mg/l de cultiu. Es

deixen recuperar 15 minuts més i s'indueixen els cultius amb IPTG 1mM. La resta és idèntica a l'expressió estàndard.

## 2.4 Expressió en cèl·lules HEK 293T

L'ectodomini de 4F2hc també ha estat produït en cèl·lules eucariotes amb el següent protocol. El medi de cultiu escollit és especial per créixer cèl·lules eucariotes sense sèrum. D'aquesta manera obtenim un medi amb la proteïna secretada amb molt poc contingut de proteïnes contaminants (veure apartat resultats)

Es plaquegen les cèl·lules a la confluència desitjada (> del 50 %). Es transfecten les cèl·lules HEK 293T amb el protocol de clorur càlcic, de manera transitòria. Es deixen les cèl·lules a 37 °C ON. El següent dia es posa medi *Optimem* (Invitrogen) sense sèrum, només amb antibiòtic afegit. Al cap de tres dies es recull el medi i se'n posa de fresc, que es recollirà al cap de tres dies; aquesta operació es pot fer fins que les cèl·lules es morin. S'analitza en un gel desnaturalitzant el medi recollit per saber si hi ha la proteïna secretada. Si hi és, es concentra el medi i es carrega en una cromatografia d'afinitat (veure apartat 3.4 de Materials i Mètodes)

## 3. Tècniques de purificació

Un cop el precipitat de cèl·lules es resuspén en tampó de lisi (50ml per cada pèl·let provinent de 4 l de cultiu) (tampó de càrrega de la columna de purificació següent amb inhibidors de proteases, lisozim 1 mg/ml i DNAsa 5µg/ml) es deixa 30 min en gel. Després es passa per una cel·la de *French press* a 20000 psi 2 vegades (en aquest cas no cal afegir lisozim al tampó de lisi) o se sonica en gel (4 cicles de 30 segons ON/OFF) fins que canvia de color. Se centrifuga la solució de lisat a 4 °C durant 45 min a 16000 xg i el sobrenedant d'aquest pas es torna a centrifugar a 4 °C durant 45 min a 16000 xg. El sobrenedant d'aquestes centrifugacions correspon a la fracció de la proteïna soluble, i és la que s'usarà per a la seva posterior purificació després de ser filtrat amb un filtre de 0,45 µm per treure les impureses quan ho volem carregar a l'FPLC.

### 3.1 Cromatografia d'afinitat amb Ni<sup>2+</sup>

Aquesta tècnica permet la separació de proteïnes en base a la interacció reversible entre un lligand específic unit covalentment a una matriu i una proteïna. En el nostre estudi, s'ha utilitzat la cua de 6 histidines en l'extrem N-terminal per a interaccionar amb l'ió Ni<sup>2+</sup> unit a la reïna. Aquesta tècnica ha estat escollida com a primera etapa en la purificació de l'ectodomini de 4F2hc i durant la tesi se n'han posat a punt tres modalitats:

#### **Purificació en *Batch* sota condicions natives**

Es barreja el lisat amb una resina d'agarosa amb Ni<sup>2+</sup> unit (Ni-NTA Qiagen) en una proporció 4:1 i s'agita en un agitador orbital a 4°C durant 1-2 hores. S'empaqueta la resina en una columna deixant sortir l'*Slurry* o proteïna no unida a la resina. Es fan diversos rentats amb tampons (Fosfat 50 mM pH7, NaCl 1 M) que tenen una concentració d'imidazol creixent (de 5 mM a 50 mM) amb un total d'uns 8 CV (volums de columna) i finalment s'elueix amb un tampó 250 mM d'imidazol (Fosfat 50 mM pH 7, NaCl 1 M) amb un volum de 3 CV. Es recullen diverses fraccions de cada pas per la seva posterior anàlisi per *Western Blot* i tinció de proteïnes de Coomassie.

#### **Purificació en un FPLC**

Mitjançant un ÄktaFPLC (Amersham Biosciences) amb una columna *HiTrapChelating HP* (Amersham Biosciences) d'1 ml o 5 ml, carregada amb 1 o 2,5 ml de NiSO<sub>4</sub> 0,1 M respectivament, es carrega l'extracte de proteïnes solubles i se sotmet a un programa de purificació (software UNICORN, Amersham Biosciences) que consisteix a equilibrar la columna amb el tampó Fosfat 20 mM pH 7,4, NaCl 0,5 M i fer els rentats i l'elució a determinades concentracions d'imidazol que aconseguix barrejant el tampó anterior amb un altre d'igual però amb 500 mM d'imidazol. Les fraccions són recollides per un col·lector i s'analitzen els pics de proteïna del cromatograma per Coomassie i/o *Western Blot*.

#### **Purificació mitjançant digestió amb enteroquinasa.**

Es carreguen els 50 ml de la part soluble de la lisi dels cultius en una columna *HiTrap Chelating* de 5ml carregada amb níquel a un flux 0,5-1ml/min. Un cop la

columna està carregada amb la proteïna s'equilibra amb 2CV (volum de columna) de tris 50mM pH8 i després amb 4CV de *buffer de cleavage* de l'Enterokinase EK-Max (Invitrogen) (tris 50mM pH8, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1% tween-20). Es desmunta la columna de l'FPLC i s'hi injecta amb una xeringa 1 CV de *buffer de cleavage* amb 50U de la proteasa específica enteroquinasa. Es deixa agitant en un orbital ON a temperatura ambient. L'endemà es torna a connectar la columna a l'FPLC i en les primeres fraccions es recull la proteïna sense cua d'histidines que ha estat tallada junt amb l'enteroquinasa que no estava unida a la columna.

### 3.2 Cromatografia d'intercanvi iònic

Malgrat que la puresa de la cromatografia d'afinitat era bastant elevada ens quedava l'enteroquinasa barrejada amb l'elució. Així doncs hem fet un segon pas de purificació. En aquest cas hem escollit una cromatografia d'intercanvi aniònic, ja que l'ectodomini de 4F2hc té un pI teòric de 5,5. En posar la proteïna a pH 8 aquesta està carregada negativament i s'uneix a una resina carregada positivament. L'elució es fa amb un gradient de força iònica.

Les fraccions obtingudes en la cromatografia d'afinitat es carreguen en una columna d'intercanvi iònic monoQ (Amersham, monoQ HR 5/5) i aquesta s'elueix amb un gradient de 20 CV entre tampó tris pH 8 i tampó tris pH 8 i 1 M de NaCl. El pic resultant d'aquesta cromatografia acostuma a ser la proteïna sense la cua d'histidines i > 90 % pura.

### 3.3 Cromatografia de filtració en gel

Aquest tipus de cromatografia es basa en la separació de les molècules en funció de la seva mida. Aquesta tècnica va ser escollida com a últim pas tant en la purificació d'ED4F2hc en alguna ocasió i també per a l'estudi de l'oligomerització de la proteïna pura.

Les fraccions eluïdes positives de la cromatografia d'afinitat es concentren i es canvia el tampó amb el de la cromatografia, es concentren i es carreguen en una columna de filtració en gel Superdex 200 HR10/30 *Prep grade* (Amersham Biosciences) i la proteïna s'elueix en un tampó que conté 50mM fòsfat sòdic, 150 mM NaCl, pH 7,2. Per a calibrar la columna, s'ha utilitzat el paquet de marcadors de

pes molecular específic per a cromatografia de filtració en gel (Sigma-Aldrich).

### **3.4 Cromatografia d'afinitat amb proteïna A**

Per a la proteïna produïda en cèl·lules eucariotes s'ha utilitzat aquesta cromatografia, ja que en el constructe de la proteïna secretada tenim el fragment Fc de les IgG humanes que s'uneix amb alta afinitat a la proteïna A.

Es carrega la proteïna que prové del medi de les cèl·lules HEK293T, concentrat amb un concentrador de 50 KDa, en una columna HiTrap ProtA d'1 ml (Amersham Biosciences). L'elució s'ha fet, com en el cas de la proteïna produïda en bacteris, per digestió amb una proteasa específica, en aquest cas la Trombina (Amersham), que ens separa les cues HA i Fc de la proteïna recombinant deixant-nos només la proteïna d'interès. El protocol és igual al citat per l'enteroquinasa, però en aquest cas es posen a la columna 1000 unitats de trombina.

Després de l'elució dels fragments alliberats amb la trombina es concentra la proteïna pura a > 90 %.

### **3.5 Concentradors de proteïna**

En tots els passos on cal canviar el tampó de la mostra o concentrar la proteïna de la mostra s'ha utilitzat la tecnologia d'ultrafiltració, amb uns filtres que retenen macromolècules de diferents mides, en el nostre cas de > 10 KDa i > 50 KDa.

Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter (Millipore) per volums <15 ml

Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter (Millipore) per volums d'1–4 ml

Centricon Centrifugal Filter Units (Millipore) per volums <2ml

Tots aquests filtres s'usen amb una centrifuga de rotor basculant a 4000 xg durant 10-15 minuts. Si tenim més volum tornem a omplir el reservori i si volem canviar el tampó barregem el concentrat amb el tampó desitjat i repetim el procés 2 o 3 vegades.

## 4. Tècniques d'electroforesi de proteïnes

### 4.1 Electroforesi en gel desnaturalitzant (SDS/PAGE)

L'electroforesi discontinua en gel de poliacrilamida amb SDS (SDS-PAGE) és un dels mètodes més emprats per a analitzar barreges de proteïnes en funció dels seus pesos moleculars. La tècnica fou descrita per Laemmli (Laemmli, 1970). Aquesta tècnica es basa en utilitzar dos tipus de gels, amb diferent concentració d'acrilamida i pH: el gel concentrador (*stacking*), a la part superior i amb porus grans, i el gel separador (*running*), a la part inferior. Aquestes diferències fan que les mostres s'apilin en estretes bandes abans de produir-se la separació durant la migració de les proteïnes en el gel separador.

Les electroforesis s'han dut a terme en gels de poliacrilamida i SDS, de grandària 10 x 8 cm i de 1,5 mm de gruix emprant l'aparell d'electroforesi *miniprotein 3* (Bio-Rad). Els gels utilitzats són del 7,5-10 % d'acrilamida (p/v).

Referit a la preparació de les mostres, els cultius bacterians s'han homogeneïtzat segons el protocol exposat a l'apartat 2 i 3 i s'han pres mostres del sobrenedant i el precipitat. També s'han pres mostres de les fraccions eluïdes en cada columna cromatogràfica. Les diferents mostres es dilueixen en tampó de càrrega, la composició final del qual és Tris/HCl 50 mM a pH 6.8, DTT 10 mM, 2 % (p/v) SDS, , glicerol 10 %, blau de bromofenol 0.1 % (p/v) (tinció) i DTT 100 mM. Les mostres s'incuben durant 5 minuts a 100 °C, per desnaturalitzar les proteïnes. S'han usat els marcadors de pes moleculars d'alt rang de Biorad formats per una barreja de proteïnes amb massa de 205, 119, 100, 52, 38 i 29 kDa (amb alguna variació depenent del lot del producte).

El tampó d'electroforesi és Tris/HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS al 0.1%, pH 8.3. L'electroforesi es desenvolupa durant 1 hora aproximadament amb un voltatge fix de 150 V i una intensitat variable d'uns 80-30 mA.

### 4.2 Electroforesi en gel no desnaturalitzant

Per fer l'assaig d'activitat  $\alpha$ -glucosidasa en gel no desnaturalitzant s'ha usat aquesta tècnica amb el següent protocol: es corre un gel no desnaturalitzant (gel d'acrilamida al 7,5 % sense SDS). El tampó d'electroforesi Tris-Glicina és sense SDS, i el tampó

de càrrega de proteïnes també sense SDS i no es bullen les mostres. Les mostres poden ser preparades en condicions reductores (afegint 100 mM de  $\beta$ -ME) i/o no reductores.

### 4.3 Western blot

Es corre un SDS-PAGE amb un percentatge del 7-10 % fins que el front de proteïnes arriba al final del gel. Seguidament es transfereix el gel en una membrana de nitrocel·lulosa, prèviament activada amb metanol 5 min., durant 1 h a 250 mA (tampó 25 mM tris, 192 mM glicina, 20 % metanol, pH 8,3). La membrana es bloqueja amb solució de bloqueig (llet descremada en pols al 5 % en PBS) durant una hora a RT. Després s'incuba amb l'anticòs primari, amb la dilució indicada pel fabricant, amb llet 1 % PBST (tween 0,05 % en PBS) durant 2 hores a RT o ON a 4 °C. Es fan tres rentats de 10 minuts amb PBST i s'incuba amb anticòs secundari (*donkey antimouse* o *antirabbit*, segons el primari utilitzat, diluït segons recomanacions del fabricant en llet 1 % PBST) durant 1-2 hores a RT. Es fan tres rentats de 10 minuts amb PBST i es revela la membrana amb ECL (Amersham-Pharmacia) segons protocol del fabricant.

### 4.4 Tinció dels gels de poliacrilamida

Les tècniques usades per a detectar les proteïnes separades pels gels de poliacrilamida han estat dues:

**tinció amb blau de Coomassie.** Aquest mètode permet detectar fins a uns 0.5  $\mu$ g de proteïna i és quantitatiu fins a uns 15  $\mu$ g. Es tenyeix el gel 1 hora amb una solució de tinció (45 % metanol, 10 % àcid acètic glacial, 45 % aigua bidestil·lada i 0,1 % p/v *Brilliant Blue R*, Sigma). Seguidament es destenyeix amb solució de destinció (7,5 % àcid acètic glacial, 7,5 % isopropanol en aigua bidestil·lada) (es pot canviar la solució unes quantes vegades) fins que el fons del gel és transparent.

**tinció amb plata.** Aquest mètode és més sensible que l'anterior però s'ha usat menys. S'ha usat el paquet per tinció de proteïnes amb plata de *Pierce* (*GelCode SilverSNAP Stain Kit*, *Pierce*) i s'ha fet segons les indicacions del comerciant. Només ressaltar que tots els passos s'han de dur a terme en recipients de vidre nets amb aigua bidestil·lada per no interferir amb proteïnes contaminants.



## 5. Tècniques de caracterització en solució

Els estudis de dicroisme circular i de fluorescència es van realitzar en el laboratori de la Dra. Maria Antonia Lizarbe a la Universitat Complutense de Madrid amb la col·laboració del Dr. Javier Turnay.

### 5.1 Dicroisme circular

El dicroisme circular és un bon mètode per a analitzar l'estructura secundària de les proteïnes en solució, ja que les proteïnes són òpticament actives per la disposició quiral dels seus enllaços peptídics en l'espai.

Es va recollir l'espectre en l'UV llunyà entre 180 i 260 nm de la proteïna ED4F2hc a concentracions de 0.1 i 0.5 mg/mL en una cel·la d'1 mm. La desnaturalització tèrmica fins a 80°C es va seguir a 220 nm, amb una velocitat d'escalfament d'1 °C per minut. Aquesta corba es va fer amb la proteïna amb 2,5 mM d'EGTA i amb 2,5 mM de CaCl<sub>2</sub>. En el primer cas es va poder seguir la corba de refredament o renaturalització.

### 5.2 Fluorescència

Amb la proteïna ED4F2hc també es van realitzar estudis de fluorescència. Per la fluorescència dels triptòfans es va usar la  $\lambda=295$  nm, mentre que per la fluorescència dels triptòfans i les tirosines la  $\lambda$  era de 275 nm. L'espectre d'emissió de fluorescència es va seguir de 280 a 420 nm.

## 6. Tècniques de cristal·lització

Les cristal·litzacions es van dur a terme al laboratori del Dr. I. Fita, a l'Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB) del CSIC.

### 6.1 Gota suspesa

S'escollí el mètode de difusió de vapor per gota suspesa (*hanging drop*) per a assolir

la sobresaturació (Gómez-Moreno and Sancho, 2003). La proteïna purificada i concentrada a 5-15 µg/µL fou sotmesa a un extens criatge de condicions inicials de cristal·lització. Es barrejà 1 µL de proteïna amb 1µL de la cada solució precipitant i s'equilibrà amb 1mL de solució precipitant continguda en la cambra de cristal·lització. Com a cambres de cristal·lització, s'utilitzaren plaques de 24 pouets (Linbro) cobertes per cobreobjectes de 22x22 mm tractats amb diclorometilsilà (Merck) per aconseguir una superfície hidrofòbica que eviti deformacions i desplaçaments de la gota.

Com a base del criatge, vam utilitzar entre d'altres els equips de Hampton (Crystal Screen 1, Crystal Screen 2, Index, PEG-ion Screen a 4 i 20°C).

Per a optimitzar la qualitat dels cristalls, es féu un segon criatge al voltant de les condicions inicials de la concentració de precipitant, concentració de sal, pH, volum de la gota i concentració de la proteïna.

## 6.2 Criopreservació

La radiació de raigs X és molt energètica i s'ha de protegir el cristall perquè el dany per radiació no el destrueixi. Una alternativa és mantenir el cristall a 100 K durant la recollida.

S'han assajat diferents condicions de criopreservació per a garantir la integritat del cristall en ser congelat a 100 K en nitrogen líquid. A fi i efecte de minimitzar les alteracions fisico-químiques del cristall, afegim l'agent criopreservant en dues etapes, i així en facilitem l'adaptació. Els millors crioprotectors per als nostres cristalls han estat el glicerol al 15 % i el PEG3000 al 30 %.

Els cristalls s'han recollit en bucles de 0.05 a 0.4 mm (Hampton Research) i s'han congelat immediatament en nitrogen líquid.

## 7. Recollida dels espectres de difracció

### 7.1 Radiació de sincrotó

La radiació de sincrotró és la que es desprèn en canviar la trajectòria de les partícules carregades (electrons i positrons) que circulen properes a la velocitat de la llum (Helliwell, 1992). Aquestes partícules viatgen dins d'un anell que està al buit. A

les zones corbes de l'anell se situen el imans corbadors (*bending magnets*) que com el seu propi nom indica, corben la trajectòria de les partícules tot generant raigs X i donen lloc a les línies BM del sincrotró. En les zones rectes de l'anell, s'intercalen els onduldadors (*insertion device magnet*), els quals produeixen una radiació de major intensitat que els imans corbadors i donen lloc a les línies ID. La longitud d'ona a estudi és filtrada pels monocromadors i els col·limadors afinen el raig (Drenth, 1994). Tots els cristalls es van difractar al sincrotró ESRF (Grenoble), amb un anell de 844 metres de perímetre i una energia de 6 GeV.

Tots els espectres de la tesi han estat recollits en la línia ID13 la qual es caracteritza per una òptica microfocus i un doble monocromador de Si (111).

## 7.2 Processament dels espectres de difracció

L'indexat de les primeres imatges permet determinar el grup espacial, l'orientació del cristall i la cel·la del cristall. Un cop es disposa d'aquesta informació, es pot determinar el nombre mínim de graus que s'han de recollir per a disposar d'un espectre complet. A partir de l'indexat, es poden predir els patrons de les imatges següents i així, durant la integració, es quantifica l'energia en cadascuna de les reflexions. En l'escalat, s'ajunten les reflexions repetides i s'intenten reconstruir les que estan disperses en diverses imatges a causa de la mosaïcitat.

L'indexat, la integració i l'escalat de les dades dels cristalls s'ha dut a terme amb el paquet HKL (Denzo i Scalepack) (Otwinowski and Minor, 1997).

# 8. Resolució de l'estructura

## 8.1 Reemplaçament molecular

El mètode del reemplaçament molecular es basa en una optimització global per a localitzar en la millor posició un model d'una proteïna, de manera que en aquesta posició les intensitats calculades (per aquest model) seran al més properes possible a les observades experimentalment, per a la proteïna de la qual es desconeix l'estructura (Drenth, 1994).

La cerca sistemàtica de possibles posicions del model dins de la cel·la unitària condueix a un problema de sis dimensions (tres rotacions i tres translacions). Aquest

es redueix a un problema de tres dimensions, buscant primer les rotacions i en segon lloc les translacions.

Molrep (Vagin and Teplyakov, 1997) i AMoRe (Navaza, 1994) han estat els programes de reemplaçament emprats en aquest treball.

En general, s'accepta que per a resoldre amb èxit una estructura per reemplaçament molecular, la identitat de seqüència entre la proteïna model i la problema ha de ser igual o superior al 40%. En el nostre cas, aquesta identitat amb les estructures amb PDBID 1JI2, 1UOK i 1SMA (neopullulanase de *Bacillus Subtilis*, Oligo-1,6-glucosidasa de *Bacillus Cereus*, i  $\alpha$ -amylase de *Thermus sp.*) era de 25 % i 22 % en les dues últimes.

Per fer el reemplaçament molecular s'ha usat en primer terme el servidor Caspr (CNRS, Marseille) (Claude et al., 2004) amb els PDBs d'entrada de 1JI2, 1UOK i 1SMA, la seqüència d'ED4F2hc i l'escalat (arxiu mtz) del cristall monoclínic. Caspr utilitza T-Coffee per fer un multialineament i decidir quines zones són les que tenen menys homologia per truncar-les. Després usa Modeller per fer 30 models amb tota la seqüència de la proteïna i 30 amb la forma truncada, i 3 models amb la seqüència dels PDBs d'entrada i 3 més amb la seqüència d'aquests truncada. Caspr usa aquests models i les dades del cristall a 3 Å per fer reemplaçament molecular amb AMoRe, selecciona els 15 millors i els refina amb CNS. En el nostre cas el millor model refinat tenia un  $R_{work}$  de 0.45 i un  $R_{free}$  de 0.52.

Amb aquest model de sortida de Caspr s'ha corregut MOLREP a 3 Å fixant el domini barril  $(\alpha/\beta)_8$  i deixant lliure el domini C-terminal. S'ha tornat a córrer MOLREP amb el model de sortida a 3 Å . Aquest model ha estat refinat fins a 2.8 Å per a cos rígid amb Refmac5 definint els dos dominis barril  $(\alpha/\beta)_8$  i C-terminal donant un  $R_{work}$  i un  $R_{free}$  de 0.48. Aquest últim model va ser sotmès a seguits refinaments de cos rígid amb MOLREP anant definint diferents motius (ex. fulls  $\beta$  del barril  $(\alpha/\beta)_8$ , hèlixs alfa del barril  $(\alpha/\beta)_8$ , ...) fins a obtenir un model amb  $R$  0.48,  $R_{free}$  de 0.48 i una correlació de 0.45 a 2.8 Å.

Amb aquest model del cristall monoclínic s'ha fet reemplaçament molecular amb AMoRe amb les dades de l'ortoròmbic a 4 Å. El model de sortida d'AMoRe ha resultat tenir 2 molècules per unitat asimètrica amb un  $R$  0.50 i una correlació de 0.40. Després s'ha refinat el model amb cos rígid de Refmac5 a 2.8 Å fins a  $R$  0.54,  $R_{free}$  de 0.52.

## 8.2 Mitjanat entre cristalls

DMMULTI (Cowtan, 1994) s'ha fet servir per fer un mitjanat entre cristalls amb les fases fetes amb els models amb polialanines. El programa ha mitjanat les dades de les dues molècules del cristall ortoròmbic i la molècula del cristall monoclínic. El mapa resultant ens ha permès començar el retraçat del model monoclínic i a partir d'aquí s'ha anat reconstruint, repetint el mitjanat de cristalls per millorar les fases i refinant els models amb cos rígid de Refmac5.

## 8.3 Construcció de màscares

S'han construït màscares per a definir una porció del cristall on s'ha d'aplicar una operació de modificació de densitat electrònica, sigui per diferenciar l'estructura cristal·logràfica del contingut de solvent o bé per mitjanar les zones de densitat electrònica relacionades en la unitat asimètrica per simetria no-cristal·logràfica o entre els dos cristalls diferents. Les màscares s'han dissenyat al voltant del model monoclínic amb el programa NCSMask (Collaborative Computational Project, 1994).

## 8.4 Refinament de l'estructura

Es calcularen els primers mapes de diferència ( $2F_o - F_c$ ),  $\Phi_c$  i  $(F_o - F_c)$ ,  $\Phi_c$  amb el programa FFT (Collaborative Computational Project, 1994). Aquests mapes s'obtenen fent la síntesi de Fourier entre les amplituds observades ( $F_o$ ) i les calculades ( $F_c$ ) i les fases calculades ( $\Phi_c$ ). Els mapes ( $2F_o - F_c$ ),  $\Phi_c$  són més "reals", ja que el pes negatiu de  $F_c$  fa disminuir el biaix del mapa (*bias*). Els mapes  $(F_o - F_c)$ ,  $\Phi_c$  ajuden a resoldre les zones conflictives de densitat.

L'afinament es dugué a terme alternant cicles d'afinament de les posicions atòmiques i mantenint l'estereoquímica amb el programa Refmac5 amb cicles manuals de traçat usant el programa O (Jones et al., 1991).

Finalment es van afegir les aigües amb Refmac5 i manualment fins a un model final de  $R$  0.18,  $R_{\text{free}}$  de 0.23.

La qualitat estereoquímica del model fou analitzada amb el programa Procheck (Laskowski et al., 1993)

## 9. Modelatge de proteïnes amb MODELLER

La seqüència d'ED-rBAT ha estat modelada amb el programa MODELLER (Sali and Blundell, 1993). S'han usat les estructures corresponents a PDBID 1M53, 1UOK i 2DH2 com a motlles. L'alineament s'ha afinat manualment mitjançant l'alineament de seqüència i estructura provinent del servidor T-coffee.

## 10. Representacions de l'estructura i superposicions

Tots els dibuixos que representen les estructures, densitats electròniques i superfícies de potencial s'han realitzat amb el sistema de visualització molecular PyMOL (DeLano, 2002).

El càlcul de mapa de potencial electrostàtic de la superfície ha estat fet amb GRASP (Nicholls et al., 1991) i després representat amb PyMOL.

Per a superposar les diferents estructures, s'han utilitzat els programes SHP (Stuart et al., 1979) i el servidor SSM (Secondary Structural Matching) (Krissinel and Henrick, 2004). Per a la representació de l'alineament de seqüència segons l'estructura s'ha usat el servidor T-coffee (Notredame et al., 2000).

## 11. Activitat $\alpha$ -glucosidasa

Per mesurar la possible activitat  $\alpha$ -glucosidasa de la proteïna ED4F2hc pura s'han utilitzat diferents mètodes. Com a control positiu de tots els experiments s'ha usat l' $\alpha$ -glucosidasa del llevat del pa (alpha-glucosidase of Baker's Yeast, SIGMA).

### 11.1 Assaig *in situ*

Es corre un gel no desnaturalitzant amb la mostra (gel d'acrilamida al 7,5% sense SDS). Es fan dos rentats del gel de 20 minuts amb tampó fosfat 50mM pH6,5 i després es cobreix amb una dissolució de metilumbeliferil  $\alpha$ -D-glucosa 2mM (4-*Methylumbelliferyl*  $\alpha$ -D-glucopyranoside, SIGMA) (en el mateix tampó que els rentats) i es posa a 4°C durant 15 minuts. En la mateixa dissolució s'incuba a 37°C durant 20-40 minuts. Es renta breument amb aigua bidestil·lada i es cobreix amb una dissolució 1M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Després d'uns 10-30 minuts es mira el gel en un

transiluminador UV i es fotografia.

## 11.2 Assaig en solució

Es posen en un tub 25 µl de dilució d'α-glucosidasa (α-glucosidase from Baker's yeast, Sigma) o de mostra, s'hi afegeixen 50 µl de metilumbeliferil α-D-glucosa (4-Methylumbelliferyl α-D-glucopyranoside, Sigma) 1,3mM i es deixen reaccionar a 37° i a la foscor durant 7 hores. Passats 30 minuts s'afegeixen 200 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2M. Es llegeix la fluorescència amb un fluorímetre (λ excitació=385 nm λ emissió=460 nm). Aquest experiment es pot fer en plaques Maxisorb (Nunc) i es llegeix en un fluorímetre de plaques (en el nostre cas s'ha usat el fluorímetre luminòmetre FL-600 de BioTek). També s'han utilitzat dos reactius més per tal de cobrir més l'aspecte d'activitats relacionades amb α-amilases, que són metilumbeliferil α-D-galactosa (4-Methylumbelliferyl α-D-galactopyranoside, Sigma) i el metilumbeliferil α-D-maltosa (4-Methylumbelliferyl α-D-maltopyranoside, Sigma). Aquests compostos han estat usats igual que el derivat de la glucosa.

## 12. Interacció amb proteïnes

### 12.1 Glicoxip (Glycominds)

Per fer els estudis d'unió a glúcids vam utilitzar un xip de glúcids comercial: Glycochip (Glycominds). El protocol que seguíem era l'indicat per la casa comercial amb algunes variacions en la detecció. Els glúcids estan adherits a una placa de 384 pous. Hi han representat 43 glúcids i derivats diferents, de 8 en 8 (figura 54).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
A	Aa				Ab4(Fa3)GNb				Fa2Ab				GNa				OH group				NNa3Ab4GNb				a	alpha
B																									b	beta
C	Aa3(Fa2)Ab				Ab4GNb				Fb				GNb				Ma3(Ma6)Ma				NNa6Ab4GNb				A	Galactose (Gal)
D																									G	Glucose (Glc)
E	Aa3Ab4GNb				OH group				Ga				GNb3Ab4Gb				Ma3Ma				Ra				GH	N-Acetylglucosamine (GlcNAc)
F																									AN	N-Acetylgalactosamine (GalNAc)
G	Aa3Ab4GNb3Ab4Gb				Ab4GNb3Ab4Gb				Ga4Ga				GNb4GNb				Mb				Ub				F	L-Fucose (Fuc)
H																									M	Mannose (Man)
I	Aa4Ab4Gb				ANa				Gb				Ha				NNa				Xa				X	Xylose (Xyl)
J																									H	L-Rhamnose (Rha)
K	Ab3ANa				ANa3(Fa2)Ab				Gb3Gb				Lb				NNa3Ab3(Fa4)GNb				Xb				U	Glucuronic acid (GlcA)
L																									NN	N-Acetylneuraminate (NeuAc)
M	Ab				ANb				Gb4Gb				Ma				NNa3Ab4(Fa3)GNb				Biotin				L	Galacturonic acid (GalA)
N																									R	Arabinose (Ara)
O	Ab3GNb				Fa				OH group				Ma2Ma				NNa3Ab4Gb				OH group				[#5]	Sulfate group in position #
P																										

Figura 54. Esquema de la placa de Glycominds utilitzada per als estudis de glicoxip.

El protocol que s'ha utilitzat és el següent:

1. Posar 10 µl de proteïna a 50 µg/ml diluïda en TBSTM a cada pou. En el control negatiu posar la proteïna sense cua d'histidines.  
Incubar a RT 30-60 min  
Rentar un cop amb TBST
2. Afegir 10 µl d'anticòs primari 1/2000 en TBSTM.  
Incubar a RT 30-60 min  
Rentar 2 cops amb TBST
3. Afegir 10 µl d'anticòs secundari conjugat amb HRP (HRP-donkey antimouse)  
Incubar 30 min a RT  
Aspirar l'anticòs secundari i rentar 2 cops amb TBST i un cop amb tampó d'alta concentració de sal.
4. Aspirar i deixar les plaques durant 15 min en l'últim rentat amb TBS
5. Aspirar la solució i rentar amb aigua miliQ
6. Quan estigui el lector preparat aspirar l'aigua i detecció amb Amplex Red (s'afegeixen 100 µl de solució 100µM d' AmplexRed (Molecular Probes) i 2mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en cada pou i es deixa reaccionar 5 min. Es llegeix la reacció en un fluorímetre de plaques a  $\lambda=530/25$  d'excitació i  $\lambda=590/35$  d'emissió).

## 12.2 Glicoxip del Consortium For Functional Glycomics

A causa del poc èxit amb el glicoxip comercial, vam enviar la mostra al Consortium for Functional Glycomics al Protein-Glycan Interaction Core (H), perquè ens testessin la nostra proteïna amb el seu glycoxip, que conté més de 260 glúcids. Els glúcids es troben en rèpliques de 6, de manera que un veritable positiu donarà 6 punts en el xip. El protocol es pot trobar al web:

<http://www.functionalglycomics.org/static/consortium/resources/resourcecoreh3.shtml>

La proteïna que es va utilitzar era ED4F2hc i es va detectar amb un anticòs monoclonal específic contra 4F2hc a la dilució 1:45. L' anticòs secundari era un anti-*mouse* conjugat amb FITC (GαMlgG/M/A-FITC) a 10 µg/ml. La proteïna recombinant es va utilitzar a 100 µg/µl. Com a control positiu es va usar un còctel de lectines.

## 13. Interacció amb proteïnes



### 13.1 Elisa

Aquest protocol d'ELISA prové del laboratori del Dr. Casasnovas (Jimenez et al., 2005) amb la diferència de l'últim pas, la detecció de la proteïna.

Es posen 50 µl de proteïna a 0-100 µg/ml diluïda en tampó d'unió (TU: Tris 20 mM NaCl 100 mM pH7.5 + CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM (important en unió amb ICAMs)), en pous de plaques *Maxisorb* negres (especials per a fluorescència Nunc) i s'incuba ON a 4 °C i 1 h. a 37 °C, perquè la proteïna s'enganxi a la superfície de la placa. Es treu la proteïna i es renta 4 vegades amb el TU. Es bloqueja amb el tampó de bloqueig (TU + 2 % BSA) 1 h. a 37 °C. Es torna a rentar 4 vegades amb TU. S'afegeixen 50 µl de la 2<sup>a</sup> proteïna a 20 µg/ml diluïda en TU. S'incuba 1 h a 37 °C i es torna a rentar 4 vegades amb TU. S'hi afegeixen 50 µl d'anticòs primari 1/2000 en TU + 1 % BSA i s'incuba 1 h a 37 °C. Es treu l'anticòs i es renta 4 vegades amb TU. S'hi afegeixen 50 µl d'anticòs secundari conjugat amb HRP 1/10000 en TU + 1 % BSA i s'incuba 1 h. a 37 °C. Es treu l'anticòs secundari, es renta 4 vegades amb TU i es revela.

L'anticòs anti-histidines (Invitrogen) s'uneix feblement a la nostra proteïna, de manera que la detecció s'ha fet amb un reactiu molt sensible, Amplex Red (Molecular Probes), tot i que també es pot fer amb ECL. Per fer la detecció amb Amplex Red s'afegeixen 100 µl de solució 100 µM d' amplexred i 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en cada pou i es deixa reaccionar 5 min. Es llegeix la reacció en un fluorímetre de plaques a  $\lambda = 530/25$  d'excitació i  $\lambda = 590/35$  d'emissió.

### 13.2 Biacore

Els estudis de plasmó de superfície han estat molt inicials. S'ha usat un aparell Biacore 1000 dels serveis científicotècnics del Parc Científic de Barcelona.

La proteïna s'immobilitza en un XIP CM5 a una concentració de 0,5 mg/ml, i així s'aconsegueixen unes immobilitzacions amb el protocol estàndard recomanat pel comerciant, de 5000 a 8000 RU, depenent de la proteïna. El tampó utilitzat per córrer els experiments ha estat HBS-EP (Biacore) (0,01M HEPES pH7,4, 0,15M NaCl, 0,005% P20 i 3mM EDTA), tot i que en els últims experiments s'ha usat el mateix tampó sense EDTA.

S'han utilitzat les proteïnes purificades:

ICAM-1 2D proporcionat pel laboratori del Dr. Casasnovas

ICAM1-3D proporcionat pel laboratori del Dr. Casasnovas

ICAM5-2D proporcionat pel laboratori del Dr. Casasnovas

Galectina-3 casa comercial PeproTech

EpCAM de la casa comercial R&D Systems

CD147 produït en el medi de cèl·lules 293T (plàsmid cedit pel laboratori del Dr. Hemler)

ED4F2hc<sup>G</sup> produït en el medi de cèl·lules 293T

ED4F2hc produït en *E. coli*.

BSA (Pierce) com a control negatiu.



## **BIBLIOGRAFIA**



## Bibliografia

Ahmed,A., Peter,G.J., Taylor,P.M., Harper,A.A., and Rennie,M.J. (1995). Sodium-independent currents of opposite polarity evoked by neutral and cationic amino acids in neutral and basic amino acid transporter cRNA-injected oocytes  
33. *J. Biol. Chem.* 270, 8482-8486.

Ahmed,A., Yao,P.C., Brant,A.M., Peter,G.J., and Harper,A.A. (1997). Electrogenic L-histidine transport in neutral and basic amino acid transporter (NBAT)-expressing *Xenopus laevis* oocytes. Evidence for two functionally distinct transport mechanisms induced by NBAT expression  
46. *J. Biol. Chem.* 272, 125-130.

Akula,S.M., Pramod,N.P., Wang,F.Z., and Chandran,B. (2002). Integrin alpha3beta1 (CD 49c/29) is a cellular receptor for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) entry into the target cells  
2. *Cell* 108, 407-419.

Albi,J.L., Canals,P., Gallardo,M.A., and Sanchez,J. (1994). Na(+)-independent L-alanine uptake by trout cells. Evidence for the existence of at least two functionally different acs systems  
2. *J. Membr. Biol.* 140, 189-196.

Bannai,S. (1984). Transport of cystine and cysteine in mammalian cells  
3. *Biochim. Biophys. Acta* 779, 289-306.

Bannai,S. and Tateishi,N. (1986). Role of membrane transport in metabolism and function of glutathione in mammals  
8. *J. Membr. Biol.* 89, 1-8.

Bartoccioni, Paola Chiara. Biogénesis del transportador de cistinuria rBAT/ b<sup>0,+</sup>AT. 2006. Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.  
Ref Type: Thesis/Dissertation

Bassi,M.T., Gasol,E., Manzoni,M., Pineda,M., Riboni,M., Martin,R., Zorzano,A., Borsani,G., and Palacin,M. (2001). Identification and characterisation of human xCT that co-expresses, with 4F2 heavy chain, the amino acid transport activity system xc-1. *Pflugers Arch.* 442, 286-296.

Bauch,C., Forster,N., Loffing-Cueni,D., Summa,V., and Verrey,F. (2003). Functional cooperation of epithelial heteromeric amino acid transporters expressed in madin-darby canine kidney cells  
9. *J. Biol. Chem.* 278, 1316-1322.

Bertran,J., Magagnin,S., Werner,A., Markovich,D., Biber,J., Testar,X., Zorzano,A., Kuhn,L.C., Palacin,M., and Murer,H. (1992a). Stimulation of system y(+)-like amino acid transport by the heavy chain of human 4F2 surface antigen in *Xenopus laevis* oocytes  
18. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 5606-5610.

Bertran,J., Werner,A., Chillaron,J., Nunes,V., Biber,J., Testar,X., Zorzano,A., Estivill,X., Murer,H., and Palacin,M. (1993). Expression cloning of a human renal cDNA that induces high affinity transport of L-cystine shared with dibasic amino acids in *Xenopus oocytes*

5. *J. Biol. Chem.* 268, 14842-14849.

Bertran,J., Werner,A., Moore,M.L., Stange,G., Markovich,D., Biber,J., Testar,X., Zorzano,A., Palacin,M., and Murer,H. (1992b). Expression cloning of a cDNA from rabbit kidney cortex that induces a single transport system for cystine and dibasic and neutral amino acids

19. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 5601-5605.

Bhatnagar,R.S. and Gordon,J.I. (1997). Understanding covalent modifications of proteins by lipids: where cell biology and biophysics mingle. *Trends in Cell Biology* 7, 14-20.

Bigg,H.F., Wait,R., Rowan,A.D., and Cawston,T.E. (2006). The mammalian chitinase-like lectin, YKL-40, binds specifically to type I collagen and modulates the rate of type I collagen fibril formation

1. *J. Biol. Chem.* 281, 21082-21095.

Birdsall,B., Feeney,J., Burdett,I.D., Bawumia,S., Barboni,E.A., and Hughes,R.C. (2001). NMR solution studies of hamster galectin-3 and electron microscopic visualization of surface-adsorbed complexes: evidence for interactions between the N- and C-terminal domains

3. *Biochemistry* 40, 4859-4866.

Blondeau,J.P. (2002). Homologues of amino acid permeases: cloning and tissue expression of XAT1 and XAT2

13. *Gene* 286, 241-248.

Blood,P.D. and Voth,G.A. (2006). Direct observation of Bin/amphiphysin/Rvs (BAR) domain-induced membrane curvature by means of molecular dynamics simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 15068-15072.

Boado,R.J., Li,J.Y., Nagaya,M., Zhang,C., and Pardridge,W.M. (1999). Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier

2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 12079-12084.

Borsani,G., Bassi,M.T., Sperandeo,M.P., De,G.A., Buoninconti,A., Riboni,M., Manzoni,M., Incerti,B., Pepe,A., Andria,G., Ballabio,A., and Sebastio,G. (1999). SLC7A7, encoding a putative permease-related protein, is mutated in patients with lysinuric protein intolerance

12. *Nat. Genet.* 21, 297-301.

Bridges,C.C., Kekuda,R., Wang,H., Prasad,P.D., Mehta,P., Huang,W., Smith,S.B., and Ganapathy,V. (2001). Structure, function, and regulation of human cystine/glutamate transporter in retinal pigment epithelial cells

1. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 47-54.

Broer,A., Friedrich,B., Wagner,C.A., Fillon,S., Ganapathy,V., Lang,F., and Broer,S. (2001). Association of 4F2hc with light chains LAT1, LAT2 or y+LAT2 requires

different domains

2. *Biochem. J.* 355, 725-731.

Broer,A., Hamprecht,B., and Broer,S. (1998). Discrimination of two amino acid transport activities in 4F2 heavy chain- expressing *Xenopus laevis* oocytes

2. *Biochem. J.* 333 ( Pt 3), 549-554.

Broer,A., Wagner,C.A., Lang,F., and Broer,S. (2000). The heterodimeric amino acid transporter 4F2hc/y+LAT2 mediates arginine efflux in exchange with glutamine

13. *Biochem. J.* 349 Pt 3, 787-795.

Broer,S. (2002). Adaptation of plasma membrane amino acid transport mechanisms to physiological demands

48

48. *Pflugers Arch.* 444, 457-466.

Broer,S., Broer,A., and Hamprecht,B. (1995). The 4F2hc surface antigen is necessary for expression of system L-like neutral amino acid-transport activity in C6-BU-1 rat glioma cells: evidence from expression studies in *Xenopus laevis* oocytes

1. *Biochem. J.* 312 ( Pt 3), 863-870.

Broer,S., Broer,A., and Hamprecht,B. (1997). Expression of the surface antigen 4F2hc affects system-L-like neutral-amino-acid-transport activity in mammalian cells

1. *Biochem. J.* 324 ( Pt 2), 535-541.

Busch,A.E., Herzer,T., Waldegger,S., Schmidt,F., Palacin,M., Biber,J., Markovich,D., Murer,H., and Lang,F. (1994). Opposite directed currents induced by the transport of dibasic and neutral amino acids in *Xenopus* oocytes expressing the protein rBAT

1. *J. Biol. Chem.* 269, 25581-25586.

Cai,S., Bulus,N., Fonseca-Siesser,P.M., Chen,D., Hanks,S.K., Pozzi,A., and Zent,R. (2005). CD98 modulates integrin beta1 function in polarized epithelial cells

6. *J. Cell Sci.* 118, 889-899.

Calonge,M.J., Gasparini,P., Chillaron,J., Chillon,M., Gallucci,M., Rousaud,F., Zelante,L., Testar,X., Dallapiccola,B., Di,S.F., and . (1994). Cystinuria caused by mutations in rBAT, a gene involved in the transport of cystine

1. *Nat. Genet.* 6, 420-425.

Campbell,W.A., Sah,D.E., Medina,M.M., Albina,J.E., Coleman,W.B., and Thompson,N.L. (2000). TA1/LAT-1/CD98 light chain and system L activity, but not 4F2/CD98 heavy chain, respond to arginine availability in rat hepatic cells. Loss Of response in tumor cells

1. *J. Biol. Chem.* 275, 5347-5354.

Carpenter,T.O., Levy,H.L., Holtrop,M.E., Shih,V.E., and Anast,C.S. (1985). Lysinuric protein intolerance presenting as childhood osteoporosis. Clinical and skeletal response to citrulline therapy

1. *N. Engl. J. Med.* 312, 290-294.

Chairoungdua,A., Kanai,Y., Matsuo,H., Inatomi,J., Kim,D.K., and Endou,H. (2001). Identification and characterization of a novel member of the heterodimeric amino acid



transporter family presumed to be associated with an unknown heavy chain  
15. *J. Biol. Chem.* 276, 49390-49399.

Chairoungdua,A., Segawa,H., Kim,J.Y., Miyamoto,K., Haga,H., Fukui,Y., Mizoguchi,K., Ito,H., Takeda,E., Endou,H., and Kanai,Y. (1999). Identification of an amino acid transporter associated with the cystinuria-related type II membrane glycoprotein  
26. *J. Biol. Chem.* 274, 28845-28848.

Chandrasekaran,S., Guo,N.H., Rodrigues,R.G., Kaiser,J., and Roberts,D.D. (1999a). Pro-adhesive and chemotactic activities of thrombospondin-1 for breast carcinoma cells are mediated by alpha3beta1 integrin and regulated by insulin-like growth factor-1 and CD98. *J. Biol. Chem.* 274, 11408-11416.

Chandrasekaran,S., Guo,N.H., Rodrigues,R.G., Kaiser,J., and Roberts,D.D. (1999b). Pro-adhesive and chemotactic activities of thrombospondin-1 for breast carcinoma cells are mediated by alpha3beta1 integrin and regulated by insulin-like growth factor-1 and CD98  
4. *J. Biol. Chem.* 274, 11408-11416.

Chang,N.C., Hung,S.I., Hwa,K.Y., Kato,I., Chen,J.E., Liu,C.H., and Chang,A.C. (2001). A macrophage protein, Ym1, transiently expressed during inflammation is a novel mammalian lectin  
2. *J. Biol. Chem.* 276, 17497-17506.

Chang,Q., Hoefs,S., van der Kemp,A.W., Topala,C.N., Bindels,R.J., and Hoenderop,J.G. (2005). The beta-glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. *Science* 310, 490-493.

Chillaron,J., Estevez,R., Mora,C., Wagner,C.A., Suessbrich,H., Lang,F., Gelpi,J.L., Testar,X., Busch,A.E., Zorzano,A., and Palacin,M. (1996). Obligatory amino acid exchange via systems bo,+/-like and y+L-like. A tertiary active transport mechanism for renal reabsorption of cystine and dibasic amino acids  
3. *J. Biol. Chem.* 271, 17761-17770.

Chillaron,J., Estevez,R., Samarzija,I., Waldegger,S., Testar,X., Lang,F., Zorzano,A., Busch,A., and Palacin,M. (1997). An intracellular trafficking defect in type I cystinuria rBAT mutants M467T and M467K  
1. *J. Biol. Chem.* 272, 9543-9549.

Chillaron,J., Roca,R., Valencia,A., Zorzano,A., and Palacin,M. (2001). Heteromeric amino acid transporters: biochemistry, genetics, and physiology. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 281, F995-1018.

Cho,J.Y., Fox,D.A., Horejsi,V., Sagawa,K., Skubitz,K.M., Katz,D.R., and Chain,B. (2001). The functional interactions between CD98, beta1-integrins, and CD147 in the induction of U937 homotypic aggregation  
3. *Blood* 98, 374-382.

Christensen,H.N. (1990). Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism  
1. *Physiol Rev.* 70, 43-77.

Christensen,H.N. (1966). Methods for distinguishing amino acid transport systems of a given cell or tissue  
61. Fed. Proc. 25, 850-853.

Christensen,H.N., Albritton,L.M., Kakuda,D.K., and MacLeod,C.L. (1994). Gene-product designations for amino acid transporters  
3. J. Exp. Biol. 196, 51-57.

Claude,J.B., Suhre,K., Notredame,C., Claverie,J.M., and Abergel,C. (2004). CaspR: a web server for automated molecular replacement using homology modelling  
1. Nucleic Acids Res. 32, W606-W609.

Coady,M.J., Jalal,F., Chen,X., Lemay,G., Berteloot,A., and Lapointe,J.Y. (1994). Electrogenic amino acid exchange via the rBAT transporter  
1. FEBS Lett. 356, 174-178.

Collaborative Computational Project (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography  
1. Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 50, 760-763.

Conte,M.R. and Matthews,S. (1998). Retroviral matrix proteins: a structural perspective. Virology 246, 191-198.

Coutinho,P.M.&H.B. (1999). Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering 3-12.

Cowtan,K. (1994). Joint CCP4 and ESF-EACBM. Newsletter on Protein Crystallography 31, 34-38.

Crane,R.K. (1965). Na<sup>+</sup> -dependent transport in the intestine and other animal tissues  
12. Fed. Proc. 24, 1000-1006.

CRAWHALL,J.C., SCOWEN,E.F., and WATTS,R.W. (1963). Effect of penicillamine on cystinuria  
1. Br. Med. J. 5330, 588-590.

Dauter,Z., Dauter,M., Brzozowski,A.M., Christensen,S., Borchert,T.V., Beier,L., Wilson,K.S., and Davies,G.J. (1999). X-ray structure of Novamyl, the five-domain "maltogenic" alpha-amylase from Bacillus stearothermophilus: maltose and acarbose complexes at 1.7Å resolution  
1. Biochemistry 38, 8385-8392.

Dawson,J.P., Weinger,J.S., and Engelman,D.M. (2002). Motifs of serine and threonine can drive association of transmembrane helices  
5. J. Mol. Biol. 316, 799-805.

DeLano, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System (2002). 2002. San Carlos, CA, USA., DeLano Scientific.  
Ref Type: Computer Program

Dello Strologo,L., Pras,E., Pontesilli,C., Beccia,E., Ricci-Barbini,V., de,S.L.,

Ponzone,A., Gallucci,M., Bisceglia,L., Zelante,L., Jimenez-Vidal,M., Font,M., Zorzano,A., Rousaud,F., Nunes,V., Gasparini,P., Palacin,M., and Rizzoni,G. (2002). Comparison between SLC3A1 and SLC7A9 cystinuria patients and carriers: a need for a new classification

1. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 2547-2553.

DENT,C.E. and SENIOR,B. (1955). Studies on the treatment of cystinuria

1. *Br. J. Urol.* 27, 317-332.

Deora,A.A., Philp,N., Hu,J., Bok,D., and Rodriguez-Boulan,E. (2005). Mechanisms regulating tissue-specific polarity of monocarboxylate transporters and their chaperone CD147 in kidney and retinal epithelia

1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 16245-16250.

Deves,R. and Boyd,C.A. (2000). Surface antigen CD98(4F2): not a single membrane protein, but a family of proteins with multiple functions. *J. Membr. Biol.* 173, 165-177.

Dong,S. and Hughes,R.C. (1997). Macrophage surface glycoproteins binding to galectin-3 (Mac-2-antigen). *Glycoconj. J.* 14, 267-274.

Dong,S. and Hughes,R.C. (1996). Galectin-3 stimulates uptake of extracellular Ca<sup>2+</sup> in human Jurkat T-cells

2. *FEBS Lett.* 395, 165-169.

Drenth,J. (1994). Principles of Protein X-ray Crystallography.

Estevez,R., Camps,M., Rojas,A.M., Testar,X., Deves,R., Hediger,M.A., Zorzano,A., and Palacin,M. (1998). The amino acid transport system y<sup>+</sup>L/4F2hc is a heteromultimeric complex

3. *FASEB J.* 12, 1319-1329.

Feliubadalo,L., Font,M., Purroy,J., Rousaud,F., Estivill,X., Nunes,V., Golomb,E., Centola,M., Aksentijevich,I., Kreiss,Y., Goldman,B., Pras,M., Kastner,D.L., Pras,E., Gasparini,P., Bisceglia,L., Beccia,E., Gallucci,M., de,S.L., Ponzone,A., Rizzoni,G.F., Zelante,L., Bassi,M.T., George,A.L., Jr., Manzoni,M., De,G.A., Riboni,M., Endsley,J.K., Ballabio,A., Borsani,G., Reig,N., Fernandez,E., Estevez,R., Pineda,M., Torrents,D., Camps,M., Lloberas,J., Zorzano,A., and Palacin,M. (1999). Non-type I cystinuria caused by mutations in SLC7A9, encoding a subunit (bo,+AT) of rBAT

5. *Nat. Genet.* 23, 52-57.

Fenczik,C.A., Sethi,T., Ramos,J.W., Hughes,P.E., and Ginsberg,M.H. (1997).

Complementation of dominant suppression implicates CD98 in integrin activation

1. *Nature* 390, 81-85.

Fenczik,C.A., Zent,R., Dellos,M., Calderwood,D.A., Satriano,J., Kelly,C., and Ginsberg,M.H. (2001). Distinct domains of CD98hc regulate integrins and amino acid transport

1. *J. Biol. Chem.* 276, 8746-8752.

Feral,C.C., Nishiya,N., Fenczik,C.A., Stuhlmann,H., Slepak,M., and Ginsberg,M.H. (2005). CD98hc (SLC3A2) mediates integrin signaling

1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 355-360.

- Fernandez,E., Carrascal,M., Rousaud,F., Abian,J., Zorzano,A., Palacin,M., and Chillaron,J. (2002). rBAT-b(0,+)-AT heterodimer is the main apical reabsorption system for cystine in the kidney  
22. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 283, F540-F548.
- Fernandez,E., Jimenez-Vidal,M., Calvo,M., Zorzano,A., Tebar,F., Palacin,M., and Chillaron,J. (2006). The structural and functional units of heteromeric amino acid transporters. The heavy subunit rBAT dictates oligomerization of the HATs  
1. *J. Biol. Chem.*
- Fernandez,E., Torrents,D., Chillaron,J., Martin Del,R.R., Zorzano,A., and Palacin,M. (2003). Basolateral LAT-2 has a major role in the transepithelial flux of L-cystine in the renal proximal tubule cell line OK  
1. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 837-847.
- Fernandez,E., Torrents,D., Zorzano,A., Palacin,M., and Chillaron,J. (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  
2. *J. Biol. Chem.* 280, 19364-19372.
- Fernandez-Recio,J., Totrov,M., Skorodumov,C., and Abagyan,R. (2005). Optimal docking area: a new method for predicting protein-protein interaction sites. *Proteins* 58, 134-143.
- Fincham,D.A., Mason,D.K., and Young,J.D. (1985). Characterization of a novel Na<sup>+</sup>-independent amino acid transporter in horse erythrocytes  
9. *Biochem. J.* 227, 13-20.
- Font, M. Reabsorció renal d'aminoàcids: anàlisi de mutacions de *SLC7A9*, el gen de cistinúria de tipus b, i generació d'un model murí *knockout* de *slc7a8*. 2006.  
Ref Type: Thesis/Dissertation
- Font,M.A., Feliubadalo,L., Estivill,X., Nunes,V., Golomb,E., Kreiss,Y., Pras,E., Bisceglia,L., d'Adamo,A.P., Zelante,L., Gasparini,P., Bassi,M.T., George,A.L., Jr., Manzoni,M., Riboni,M., Ballabio,A., Borsani,G., Reig,N., Fernandez,E., Zorzano,A., Bertran,J., and Palacin,M. (2001). Functional analysis of mutations in SLC7A9, and genotype-phenotype correlation in non-Type I cystinuria  
3. *Hum. Mol. Genet.* 10, 305-316.
- Fukasawa,Y., Segawa,H., Kim,J.Y., Chairoungdua,A., Kim,D.K., Matsuo,H., Cha,S.H., Endou,H., and Kanai,Y. (2000). Identification and characterization of a Na<sup>+</sup>-independent neutral amino acid transporter that associates with the 4F2 heavy chain and exhibits substrate selectivity for small neutral D- and L-amino acids  
21. *J. Biol. Chem.* 275, 9690-9698.
- Furriols,M., Chillaron,J., Mora,C., Castello,A., Bertran,J., Camps,M., Testar,X., Vilaro,S., Zorzano,A., and Palacin,M. (1993). rBAT, related to L-cysteine transport, is localized to the microvilli of proximal straight tubules, and its expression is regulated in kidney by development  
1. *J. Biol. Chem.* 268, 27060-27068.

Garnier,L., Bowzard,J.B., and Wills,J.W. (1998). Recent advances and remaining problems in HIV assembly. *AIDS 12 Suppl A*, S5-16.

Gasol,E., Jimenez-Vidal,M., Chillaron,J., Zorzano,A., and Palacin,M. (2004). Membrane topology of system xc- light subunit reveals a re-entrant loop with substrate-restricted accessibility  
1. *J. Biol. Chem.* 279, 31228-31236.

Gelb,M.H., Cho,W., and Wilton,D.C. (1999). Interfacial binding of secreted phospholipases A2: more than electrostatics and a major role for tryptophan. *Current Opinion in Structural Biology* 9, 428-432.

Gómez-Moreno,C. and Sancho,J. (2003). Estructura de proteínas. Ariel Ciencia).

Hakala,B.E., White,C., and Recklies,A.D. (1993). Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family  
1. *J. Biol. Chem.* 268, 25803-25810.

Hara,K., Kudoh,H., Enomoto,T., Hashimoto,Y., and Masuko,T. (1999). Malignant transformation of NIH3T3 cells by overexpression of early lymphocyte activation antigen CD98  
1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262, 720-725.

Haynes,B.F., Hemler,M.E., Mann,D.L., Eisenbarth,G.S., Shelhamer,J., Mostowski,H.S., Thomas,C.A., Strominger,J.L., and Fauci,A.S. (1981). Characterization of a monoclonal antibody (4F2) that binds to human monocytes and to a subset of activated lymphocytes. *J. Immunol.* 126, 1409-1414.

Hediger,M.A., Romero,M.F., Peng,J.B., Rolfs,A., Takanaga,H., and Bruford,E.A. (2004). The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteinsIntroduction  
14. *Pflugers Arch.* 447, 465-468.

Helliwell,J.R. (1992). Macromolecular Crystallography with Synchrotron Radiation.

Hemler,M.E. and Strominger,J.L. (1982). Characterization of antigen recognized by the monoclonal antibody (4F2): different molecular forms on human T and B lymphoblastoid cell lines  
3. *J. Immunol.* 129, 623-628.

Henderson,N.C., Collis,E.A., Mackinnon,A.C., Simpson,K.J., Haslett,C., Zent,R., Ginsberg,M., and Sethi,T. (2004). CD98hc (SLC3A2) interaction with beta 1 integrins is required for transformation  
3. *J. Biol. Chem.* 279, 54731-54741.

Henrissat,B. and Bairoch,A. (1996). Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* 316 ( Pt 2), 695-696.

Hosokawa,N., Wada,I., Hasegawa,K., Yorihuri,T., Tremblay,L.O., Herscovics,A., and Nagata,K. (2001). A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation

10. EMBO Rep. 2, 415-422.

Hosokawa,N., Wada,I., Natsuka,Y., and Nagata,K. (2006). EDEM accelerates ERAD by preventing aberrant dimer formation of misfolded alpha1-antitrypsin. *Genes Cells* 11, 465-476.

Hughes,R.C. (2001). Galectins as modulators of cell adhesion  
1. *Biochimie* 83, 667-676.

Hurley,J.H. and Misra,S. (2000). Signaling and subcellular targeting by membrane-binding domains. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 29, 49-79.

Ishii,T., Sato,H., Miura,K., Sagara,J., and Bannai,S. (1992). Induction of cystine transport activity by stress  
1. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 663, 497-498.

Jack,D.L., Paulsen,I.T., and Saier,M.H. (2000). The amino acid/polyamine/organocation (APC) superfamily of transporters specific for amino acids, polyamines and organocations  
1. *Microbiology* 146 ( Pt 8), 1797-1814.

Janecek,S. (1997). alpha-Amylase family: molecular biology and evolution  
67. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 67, 67-97.

Janecek,S., Svensson,B., and Henrissat,B. (1997a). Domain evolution in the alpha-amylase family. *J. Mol. Evol.* 45, 322-331.

Janecek,S., Svensson,B., and Henrissat,B. (1997b). Domain evolution in the alpha-amylase family  
2. *J. Mol. Evol.* 45, 322-331.

Jans,A.W., Grunewald,R.W., and Kinne,R.K. (1988). Pathways for organic osmolyte synthesis in rabbit renal papillary tissue, a metabolic study using <sup>13</sup>C-labeled substrates  
4. *Biochim. Biophys. Acta* 971, 157-162.

Jimenez,D., Roda-Navarro,P., Springer,T.A., and Casasnovas,J.M. (2005). Contribution of N-linked glycans to the conformation and function of intercellular adhesion molecules (ICAMs)  
6. *J. Biol. Chem.* 280, 5854-5861.

Johnson,J.E. and Cornell,R.B. (1999). Amphitropic proteins: Regulation by reversible membrane interactions. *Molecular Membrane Biology* 16, 217-235.

Joly,D., Rieu,P., Mejean,A., Gagnadoux,M.F., Daudon,M., and Jungers,P. (1999). Treatment of cystinuria  
6. *Pediatr. Nephrol.* 13, 945-950.

Jones,T.A., Zou,J.Y., Cowan,S.W., and Kjeldgaard (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models

1. *Acta Crystallogr. A* 47 ( Pt 2), 110-119.

Kaleeba, J.A. and Berger, E.A. (2006). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus fusion-entry receptor: cystine transporter xCT

3. *Science* 311, 1921-1924.

Kamada, Y., Nagaretani, H., Tamura, S., Ohama, T., Maruyama, T., Hiraoka, H., Yamashita, S., Yamada, A., Kiso, S., Inui, Y., Ito, N., Kayanoki, Y., Kawata, S., and Matsuzawa, Y. (2001). Vascular endothelial dysfunction resulting from L-arginine deficiency in a patient with lysinuric protein intolerance

6. *J. Clin. Invest* 108, 717-724.

Kanai, Y., Fukasawa, Y., Cha, S.H., Segawa, H., Chairoungdua, A., Kim, D.K., Matsuo, H., Kim, J.Y., Miyamoto, K., Takeda, E., and Endou, H. (2000). Transport properties of a system y<sup>+</sup>L neutral and basic amino acid transporter. Insights into the mechanisms of substrate recognition

41. *J. Biol. Chem.* 275, 20787-20793.

Kanai, Y., Segawa, H., Miyamoto, K., Uchino, H., Takeda, E., and Endou, H. (1998). Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98)

26. *J. Biol. Chem.* 273, 23629-23632.

Kanai, Y., Stelzner, M.G., Lee, W.S., Wells, R.G., Brown, D., and Hediger, M.A. (1992). Expression of mRNA (D2) encoding a protein involved in amino acid transport in S3 proximal tubule

4. *Am. J. Physiol* 263, F1087-F1092.

Kim, d.K., Kanai, Y., Choi, H.W., Tangtrongsup, S., Chairoungdua, A., Babu, E., Tachampa, K., Anzai, N., Iribe, Y., and Endou, H. (2002). Characterization of the system L amino acid transporter in T24 human bladder carcinoma cells

12. *Biochim. Biophys. Acta* 1565, 112-121.

Kim, J.S., Cha, S.S., Kim, H.J., Kim, T.J., Ha, N.C., Oh, S.T., Cho, H.S., Cho, M.J., Kim, M.J., Lee, H.S., Kim, J.W., Choi, K.Y., Park, K.H., and Oh, B.H. (1999). Crystal structure of a maltogenic amylase provides insights into a catalytic versatility

2. *J. Biol. Chem.* 274, 26279-26286.

Kim, J.Y., Kanai, Y., Chairoungdua, A., Cha, S.H., Matsuo, H., Kim, D.K., Inatomi, J., Sawa, H., Ida, Y., and Endou, H. (2001). Human cystine/glutamate transporter: cDNA cloning and upregulation by oxidative stress in glioma cells

1. *Biochim. Biophys. Acta* 1512, 335-344.

Kim, S.G., Kim, H.H., Kim, H.K., Kim, C.H., Chun, H.S., Kanai, Y., Endou, H., and Kim, d.K. (2006). Differential expression and functional characterization of system L amino acid transporters in human normal osteoblast cells and osteogenic sarcoma cells

1. *Anticancer Res.* 26, 1989-1996.

King, D.A., Zhang, L., Guarente, L., and Marmorstein, R. (1999). Structure of a HAP1-DNA complex reveals dramatically asymmetric DNA binding by a homodimeric protein. *Nat Struct Mol Biol* 6, 64-71.

- King, J.S., Jr. (1968). Treatment of cystinuria with alpha-mercaptopropionylglycine: a preliminary report with some notes on column chromatography of mercaptans  
1. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **129**, 927-932.
- Kirk, P., Wilson, M.C., Heddle, C., Brown, M.H., Barclay, A.N., and Halestrap, A.P. (2000). CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression  
2. *EMBO J.* **19**, 3896-3904.
- Kobayashi, H., Ishii, Y., and Takayama, T. (2005). Expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) in esophageal carcinoma  
2. *J. Surg. Oncol.* **90**, 233-238.
- Krissinel, E. and Henrick, K. (2004). Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions  
1. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **60**, 2256-2268.
- Kuro-o M, Matsumura, Y., Aizawa, H., Kawaguchi, H., Suga, T., Utsugi, T., Ohshima, Y., Kurabayashi, M., Kaname, T., Kume, E., Iwasaki, H., Iida, A., Shiraki-Iida, T., Nishikawa, S., Nagai, R., and Nabeshima, Y.I. (1997). Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* **390**, 45-51.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Laskowski, R.A., Moss, D.S., and Thornton, J.M. (1993). Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures  
7. *J. Mol. Biol.* **231**, 1049-1067.
- Lawson, C.L., van, M.R., Strokopytov, B., Rozeboom, H.J., Kalk, K.H., de Vries, G.E., Penninga, D., Dijkhuizen, L., and Dijkstra, B.W. (1994). Nucleotide sequence and X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 in a maltose-dependent crystal form  
1. *J. Mol. Biol.* **236**, 590-600.
- Lee, W.S., Wells, R.G., Sabbag, R.V., Mohandas, T.K., and Hediger, M.A. (1993). Cloning and chromosomal localization of a human kidney cDNA involved in cystine, dibasic, and neutral amino acid transport  
9. *J. Clin. Invest* **91**, 1959-1963.
- Lemmon, M.A., Treutlein, H.R., Adams, P.D., Brunger, A.T., and Engelman, D.M. (1994). A dimerization motif for transmembrane alpha-helices  
14. *Nat. Struct. Biol.* **1**, 157-163.
- Lin, J., Raoof, D.A., Thomas, D.G., Greenson, J.K., Giordano, T.J., Robinson, G.S., Bourner, M.J., Bauer, C.T., Orringer, M.B., and Beer, D.G. (2004). L-type amino acid transporter-1 overexpression and melphalan sensitivity in Barrett's adenocarcinoma  
1. *Neoplasia*. **6**, 74-84.
- Liu, X., Charrier, L., Gewirtz, A., Sitaraman, S., and Merlin, D. (2003). CD98 and intracellular adhesion molecule I regulate the activity of amino acid transporter LAT-2 in polarized intestinal epithelia



9. *J. Biol. Chem.* 278, 23672-23677.

Lukyanov,P., Furtak,V., and Ochieng,J. (2005). Galectin-3 interacts with membrane lipids and penetrates the lipid bilayer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 1031-1036.

MacGregor,E.A., Janecek,S., and Svensson,B. (2001). Relationship of sequence and structure to specificity in the alpha-amylase family of enzymes  
39. *Biochim. Biophys. Acta* 1546, 1-20.

MacKenzie,K.R., Prestegard,J.H., and Engelman,D.M. (1997). A transmembrane helix dimer: structure and implications. *Science* 276, 131-133.

Mannion,B.A., Kolesnikova,T.V., Lin,S.H., Wang,S., Thompson,N.L., and Hemler,M.E. (1998). The light chain of CD98 is identified as E16/TA1 protein. *J. Biol. Chem.* 273, 33127-33129.

Markovich,D., Stange,G., Bertran,J., Palacin,M., Werner,A., Biber,J., and Murer,H. (1993). Two mRNA transcripts (rBAT-1 and rBAT-2) are involved in system b<sub>0</sub>(+)-related amino acid transport  
6. *J. Biol. Chem.* 268, 1362-1367.

Mastroberardino,L., Spindler,B., Pfeiffer,R., Skelly,P.J., Loffing,J., Shoemaker,C.B., and Verrey,F. (1998). Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family  
3. *Nature* 395, 288-291.

Matsuo,H., Kanai,Y., Kim,J.Y., Chairoungdua,A., Kim,d.K., Inatomi,J., Shigeta,Y., Ishimine,H., Chaekuntode,S., Tachampa,K., Choi,H.W., Babu,E., Fukuda,J., and Endou,H. (2002). Identification of a novel Na<sup>+</sup>-independent acidic amino acid transporter with structural similarity to the member of a heterodimeric amino acid transporter family associated with unknown heavy chains  
1. *J. Biol. Chem.* 277, 21017-21026.

Matsuura,Y., Kusunoki,M., Harada,W., and Kakudo,M. (1984). Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A  
1. *J. Biochem. (Tokyo)* 95, 697-702.

McLaughlin,S. and Aderem,A. (1995). The myristoyl-electrostatic switch: a modulator of reversible protein-membrane interactions. *Trends Biochem. Sci.* 20, 272-276.

McMurray,R.W. (1996). Adhesion molecules in autoimmune disease  
2. *Semin. Arthritis Rheum.* 25, 215-233.

Meier,C., Ristic,Z., Klauser,S., and Verrey,F. (2002). Activation of system L heterodimeric amino acid exchangers by intracellular substrates  
26. *EMBO J.* 21, 580-589.

Melnyk,R.A., Kim,S., Curran,A.R., Engelman,D.M., Bowie,J.U., and Deber,C.M. (2004). The affinity of GXXXG motifs in transmembrane helix-helix interactions is modulated by long-range communication  
1. *J. Biol. Chem.* 279, 16591-16597.

- Merlin,D., Sitaraman,S., Liu,X., Eastburn,K., Sun,J., Kucharzik,T., Lewis,B., and Madara,J.L. (2001). CD98-mediated links between amino acid transport and beta 1 integrin distribution in polarized columnar epithelia  
23. *J. Biol. Chem.* 276, 39282-39289.
- Miyamoto,Y.J., Mitchell,J.S., and McIntyre,B.W. (2003). Physical association and functional interaction between beta1 integrin and CD98 on human T lymphocytes  
11. *Mol. Immunol.* 39, 739-751.
- Mizoguchi,K., Cha,S.H., Chairoungdua,A., Kim,D.K., Shigeta,Y., Matsuo,H., Fukushima,J., Awa,Y., Akakura,K., Goya,T., Ito,H., Endou,H., and Kanai,Y. (2001). Human cystinuria-related transporter: localization and functional characterization  
6. *Kidney Int.* 59, 1821-1833.
- Mora,C., Chillaron,J., Calonge,M.J., Forgo,J., Testar,X., Nunes,V., Murer,H., Zorzano,A., and Palacin,M. (1996). The rBAT gene is responsible for L-cystine uptake via the b0,(+)-like amino acid transport system in a "renal proximal tubular" cell line (OK cells)  
9. *J. Biol. Chem.* 271, 10569-10576.
- Morimoto,K., Yamashita,E., Kondou,Y., Lee,S.J., Arisaka,F., Tsukihara,T., and Nakai,M. (2006). The Asymmetric IscA Homodimer with an Exposed [2Fe-2S] Cluster Suggests the Structural Basis of the Fe-S Cluster Biosynthetic Scaffold. *Journal of Molecular Biology* 360, 117-132.
- Mosckovitz,R., Udenfriend,S., Felix,A., Heimer,E., and Tate,S.S. (1994). Membrane topology of the rat kidney neutral and basic amino acid transporter  
1. *FASEB J.* 8, 1069-1074.
- Murray,D., Arbuzova,A., Honig,B., and McLaughlin,S. (2002). The role of electrostatic and nonpolar interactions in the association of peripheral proteins with membranes. In *Current Topics in Membranes Peptide-Lipid Interactions*, A.S.a.T.Sidney, ed. Academic Press), pp. 277-298.
- Murray,D., Ben-Tal,N., Honig,B., and McLaughlin,S. (1997). Electrostatic interaction of myristoylated proteins with membranes: simple physics, complicated biology. *Structure* 5, 985-989.
- Nakahara,S., Oka,N., and Raz,A. (2005). On the role of galectin-3 in cancer apoptosis  
2. *Apoptosis.* 10, 267-275.
- Nakamura,E., Sato,M., Yang,H., Miyagawa,F., Harasaki,M., Tomita,K., Matsuoka,S., Noma,A., Iwai,K., and Minato,N. (1999). 4F2 (CD98) heavy chain is associated covalently with an amino acid transporter and controls intracellular trafficking and membrane topology of 4F2 heterodimer  
1. *J. Biol. Chem.* 274, 3009-3016.
- Nakauchi,J., Matsuo,H., Kim,D.K., Goto,A., Chairoungdua,A., Cha,S.H., Inatomi,J., Shiokawa,Y., Yamaguchi,K., Saito,I., Endou,H., and Kanai,Y. (2000). Cloning and characterization of a human brain Na(+)-independent transporter for small neutral amino acids that transports D-serine with high affinity

19. *Neurosci. Lett.* **287**, 231-235.

Navaza, J. (1994). *Acta Cryst.* **A50**, 157-163.

Nawashiro, H., Otani, N., Shinomiya, N., Fukui, S., Ooigawa, H., Shima, K., Matsuo, H., Kanai, Y., and Endou, H. (2006). L-type amino acid transporter 1 as a potential molecular target in human astrocytic tumors

1. *Int. J. Cancer* **119**, 484-492.

Nicholls, A., Sharp, K.A., and Honig, B. (1991). Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons

3. *Proteins* **11**, 281-296.

Notredame, C., Higgins, D.G., and Heringa, J. (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment

1. *J. Mol. Biol.* **302**, 205-217.

Ohgimoto, S., Tabata, N., Suga, S., Nishio, M., Ohta, H., Tsurudome, M., Komada, H., Kawano, M., Watanabe, N., and Ito, Y. (1995). Molecular characterization of fusion regulatory protein-1 (FRP-1) that induces multinucleated giant cell formation of monocytes and HIV gp160-mediated cell fusion. FRP-1 and 4F2/CD98 are identical molecules

2. *J. Immunol.* **155**, 3585-3592.

Ohgimoto, S., Tabata, N., Suga, S., Tsurudome, M., Kawano, M., Nishio, M., Okamoto, K., Komada, H., Watanabe, N., and Ito, Y. (1996). Regulation of human immunodeficiency virus gp160-mediated cell fusion by antibodies against fusion regulatory protein 1

1. *J. Gen. Virol.* **77** ( Pt 11), 2747-2756.

Ohta, H., Tsurudome, M., Matsumura, H., Koga, Y., Morikawa, S., Kawano, M., Kusugawa, S., Komada, H., Nishio, M., and Ito, Y. (1994). Molecular and biological characterization of fusion regulatory proteins (FRPs): anti-FRP mAbs induced HIV-mediated cell fusion via an integrin system

30. *EMBO J.* **13**, 2044-2055.

Okamoto, K., Ohgimoto, S., Nishio, M., Tsurudome, M., Kawano, M., Komada, H., Ito, M., Sakakura, Y., and Ito, Y. (1997a). Paramyxovirus-induced syncytium cell formation is suppressed by a dominant negative fusion regulatory protein-1 (FRP-1)/CD98 mutated construct: an important role of FRP-1 in virus-induced cell fusion

49. *J. Gen. Virol.* **78** ( Pt 4), 775-783.

Okamoto, K., Tsurudome, M., Ohgimoto, S., Kawano, M., Nishio, M., Komada, H., Ito, M., Sakakura, Y., and Ito, Y. (1997b). An anti-fusion regulatory protein-1 monoclonal antibody suppresses human parainfluenza virus type 2-induced cell fusion

81. *J. Gen. Virol.* **78** ( Pt 1), 83-89.

Oppenheimer-Marks, N. and Lipsky, P.E. (1996). Adhesion molecules as targets for the treatment of autoimmune diseases

3. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **79**, 203-210.

Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997). *Methods in Enzymology* **276**, 307-326.

Oxender,D.L. and Christensen,H.N. (1963). DISTINCT MEDIATING SYSTEMS FOR THE TRANSPORT OF NEUTRAL AMINO ACIDS BY THE EHRLICH CELL  
3. J. Biol. Chem. 238, 3686-3699.

Palacin,M. (1994). A new family of proteins (rBAT and 4F2hc) involved in cationic and zwitterionic amino acid transport: a tale of two proteins in search of a transport function. J. Exp. Biol. 196, 123-137.

Palacin,M., Bertran,J., Chillaron,J., Estevez,R., and Zorzano,A. (2004). Lysinuric protein intolerance: mechanisms of pathophysiology. Mol. Genet. Metab 81 Suppl 1, S27-S37.

Palacin,M., Bertran,J., and Zorzano,A. (2000). Heteromeric amino acid transporters explain inherited aminoacidurias. Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. 9, 547-553.

Palacin,M., Borsani,G., and Sebastio,G. (2001). The molecular bases of cystinuria and lysinuric protein intolerance. Curr. Opin. Genet. Dev. 11, 328-335.

Palacin,M., Chillaron,J., and Mora,C. (1996). Role of the b(o,+)-like amino acid-transport system in the renal reabsorption of cystine and dibasic amino acids  
1. Biochem. Soc. Trans. 24, 856-863.

Palacin,M., Estevez,R., Bertran,J., and Zorzano,A. (1998). Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters  
86  
86. Physiol Rev. 78, 969-1054.

Palacin,M. and Kanai,Y. (2004). The ancillary proteins of HATs: SLC3 family of amino acid transporters. Pflugers Arch. 447, 490-494.

Palacin,M., Nunes,V., Font-Llitjos,M., Jimenez-Vidal,M., Fort,J., Gasol,E., Pineda,M., Feliubadalo,L., Chillaron,J., and Zorzano,A. (2005). The genetics of heteromeric amino acid transporters. Physiology. (Bethesda. ) 20, 112-124.

Parmacek,M.S., Karpinski,B.A., Gottesdiener,K.M., Thompson,C.B., and Leiden,J.M. (1989). Structure, expression and regulation of the murine 4F2 heavy chain  
3. Nucleic Acids Res. 17, 1915-1931.

Peter,G.J., Davidson,I.G., Ahmed,A., McIlroy,L., Forrester,A.R., and Taylor,P.M. (1996). Multiple components of arginine and phenylalanine transport induced in neutral and basic amino acid transporter-cRNA-injected Xenopus oocytes  
1. Biochem. J. 318 ( Pt 3), 915-922.

Peter,G.J., Panova,T.B., Christie,G.R., and Taylor,P.M. (2000). Cysteine residues in the C-terminus of the neutral- and basic-amino-acid transporter heavy-chain subunit contribute to functional properties of the system b(0,+)-type amino acid transporter  
1. Biochem. J. 351 Pt 3, 677-682.

Pfeiffer,R., Loffing,J., Rossier,G., Bauch,C., Meier,C., Eggemann,T., Loffing-Cueni,D., Kuhn,L.C., and Verrey,F. (1999a). Luminal heterodimeric amino acid transporter defective in cystinuria  
2. Mol. Biol. Cell 10, 4135-4147.

Pfeiffer,R., Rossier,G., Spindler,B., Meier,C., Kuhn,L., and Verrey,F. (1999b). Amino acid transport of  $\gamma$ -L-type by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of the glycoprotein-associated amino acid transporter family  
14. *EMBO J.* 18, 49-57.

Pfeiffer,R., Spindler,B., Loffing,J., Skelly,P.J., Shoemaker,C.B., and Verrey,F. (1998). Functional heterodimeric amino acid transporters lacking cysteine residues involved in disulfide bond  
25. *FEBS Lett.* 439, 157-162.

Pickel,V.M., Nirenberg,M.J., Chan,J., Mosckovitz,R., Udenfriend,S., and Tate,S.S. (1993). Ultrastructural localization of a neutral and basic amino acid transporter in rat kidney and intestine  
8. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 7779-7783.

Pineda,M., Fernandez,E., Torrents,D., Estevez,R., Lopez,C., Camps,M., Lloberas,J., Zorzano,A., and Palacin,M. (1999). Identification of a membrane protein, LAT-2, that Co-expresses with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transport activity with broad specificity for small and large zwitterionic amino acids  
8. *J. Biol. Chem.* 274, 19738-19744.

Pineda,M., Font,M., Bassi,M.T., Manzoni,M., Borsani,G., Marigo,V., Fernandez,E., Rio,R.M., Purroy,J., Zorzano,A., Nunes,V., and Palacin,M. (2004a). The amino acid transporter asc-1 is not involved in cystinuria  
4. *Kidney Int.* 66, 1453-1464.

Pineda,M., Wagner,C.A., Broer,A., Stehberger,P.A., Kaltenbach,S., Gelpi,J.L., Martin Del,R.R., Zorzano,A., Palacin,M., Lang,F., and Broer,S. (2004b). Cystinuria-specific rBAT(R365W) mutation reveals two translocation pathways in the amino acid transporter rBAT-b0,+AT  
6. *Biochem. J.* 377, 665-674.

Prasad,P.D., Wang,H., Huang,W., Kekuda,R., Rajan,D.P., Leibach,F.H., and Ganapathy,V. (1999). Human LAT1, a subunit of system L amino acid transporter: molecular cloning and transport function  
11. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255, 283-288.

Quackenbush,E., Clabby,M., Gottesdiener,K.M., Barbosa,J., Jones,N.H., Strominger,J.L., Speck,S., and Leiden,J.M. (1987). Molecular cloning of complementary DNAs encoding the heavy chain of the human 4F2 cell-surface antigen: a type II membrane glycoprotein involved in normal and neoplastic cell growth  
11. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84, 6526-6530.

Quackenbush,E.J., Gougos,A., Baumal,R., and Letarte,M. (1986). Differential localization within human kidney of five membrane proteins expressed on acute lymphoblastic leukemia cells  
5. *J. Immunol.* 136, 118-124.

Rajan,D.P., Huang,W., Kekuda,R., George,R.L., Wang,J., Conway,S.J., Devoe,L.D., Leibach,F.H., Prasad,P.D., and Ganapathy,V. (2000a). Differential influence of the

4F2 heavy chain and the protein related to b(0,+)  
amino acid transport on substrate  
affinity of the heteromeric b(0,+)  
amino acid transporter

2. *J. Biol. Chem.* 275, 14331-14335.

Rajan,D.P., Kekuda,R., Huang,W., Devoe,L.D., Leibach,F.H., Prasad,P.D., and Ganapathy,V. (2000b). Cloning and functional characterization of a Na(+)-independent, broad-specific neutral amino acid transporter from mammalian intestine

22. *Biochim. Biophys. Acta* 1463, 6-14.

Rajantie,J., Simell,O., and Perheentupa,J. (1983). Oral administration of epsilon N-acetyllysine and homocitrulline in lysinuric protein intolerance

3. *J. Pediatr.* 102, 388-390.

Reig,N., Chillaron,J., Bartoccioni,P., Fernandez,E., Bendahan,A., Zorzano,A., Kanner,B., Palacin,M., and Bertran,J. (2002). The light subunit of system b(o,+) is fully functional in the absence of the heavy subunit

1. *EMBO J.* 21, 4906-4914.

Resh,M.D. (1999). Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1451, 1-16.

Rintoul,R.C., Buttery,R.C., Mackinnon,A.C., Wong,W.S., Mosher,D., Haslett,C., and Sethi,T. (2002). Cross-linking CD98 promotes integrin-like signaling and anchorage-independent growth

18. *Mol. Biol. Cell* 13, 2841-2852.

Romero,M.F., Kanai,Y., Gunshin,H., and Hediger,M.A. (1998). Expression cloning using *Xenopus laevis* oocytes

1. *Methods Enzymol.* 296, 17-52.

Rossier,G., Meier,C., Bauch,C., Summa,V., Sordat,B., Verrey,F., and Kuhn,L.C. (1999). LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine

2. *J. Biol. Chem.* 274, 34948-34954.

Saadi,I., Chen,X.Z., Hediger,M., Ong,P., Pereira,P., Goodyer,P., and Rozen,R. (1998). Molecular genetics of cystinuria: mutation analysis of SLC3A1 and evidence for another gene in type I (silent) phenotype

6. *Kidney Int.* 54, 48-55.

Saiki,R.K., Gelfand,D.H., Stoffel,S., Scharf,S.J., Higuchi,R., Horn,G.T., Mullis,K.B., and Erlich,H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase

5. *Science* 239, 487-491.

Sali,A. and Blundell,T.L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints

1. *J. Mol. Biol.* 234, 779-815.

Sambrook,J. and Russell,D.W. (2001). *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.).

Santamaria, F., Parenti, G., Guidi, G., Rotondo, A., Grillo, G., Larocca, M.R., Celentano, L., Strisciuglio, P., Sebastio, G., and Andria, G. (1996). Early detection of lung involvement in lysinuric protein intolerance: role of high-resolution computed tomography and radioisotopic methods  
39. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 153, 731-735.

Sato, H., Kuriyama-Matsumura, K., Hashimoto, T., Sasaki, H., Wang, H., Ishii, T., Mann, G.E., and Bannai, S. (2001). Effect of oxygen on induction of the cystine transporter by bacterial lipopolysaccharide in mouse peritoneal macrophages  
1. *J. Biol. Chem.* 276, 10407-10412.

Sato, H., Kuriyama-Matsumura, K., Siow, R.C., Ishii, T., Bannai, S., and Mann, G.E. (1998). Induction of cystine transport via system x-c and maintenance of intracellular glutathione levels in pancreatic acinar and islet cell lines  
1. *Biochim. Biophys. Acta* 1414, 85-94.

Sato, H., Tamba, M., Ishii, T., and Bannai, S. (1999). Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins  
1. *J. Biol. Chem.* 274, 11455-11458.

Sato, H., Tamba, M., Okuno, S., Sato, K., Keino-Masu, K., Masu, M., and Bannai, S. (2002). Distribution of cystine/glutamate exchange transporter, system x(c)-, in the mouse brain  
2. *J. Neurosci.* 22, 8028-8033.

Schwartz, M.A. (1997). Integrins, oncogenes, and anchorage independence  
1. *J. Cell Biol.* 139, 575-578.

Sekine, T., Watanabe, N., Hosoyamada, M., Kanai, Y., and Endou, H. (1997). Expression cloning and characterization of a novel multispecific organic anion transporter  
1. *J. Biol. Chem.* 272, 18526-18529.

Shishido, T., Uno, S., Kamohara, M., Tsuneoka-Suzuki, T., Hashimoto, Y., Enomoto, T., and Masuko, T. (2000). Transformation of BALB3T3 cells caused by over-expression of rat CD98 heavy chain (HC) requires its association with light chain: mis-sense mutation in a cysteine residue of CD98HC eliminates its transforming activity  
1. *Int. J. Cancer* 87, 311-316.

Shoji, Y., Noguchi, A., Shoji, Y., Matsumori, M., Takasago, Y., Takayanagi, M., Yoshida, Y., Ihara, K., Hara, T., Yamaguchi, S., Yoshino, M., Kaji, M., Yamamoto, S., Nakai, A., Koizumi, A., Hokezu, Y., Nagamatsu, K., Mikami, H., Kitajima, I., and Takada, G. (2002). Five novel SLC7A7 variants and y+L gene-expression pattern in cultured lymphoblasts from Japanese patients with lysinuric protein intolerance  
1. *Hum. Mutat.* 20, 375-381.

Shultz, V.D., Campbell, W., Karr, S., Hixson, D.C., and Thompson, N.L. (1999). TA1 oncofetal rat liver cDNA and putative amino acid permease: temporal correlation with c-myc during acute CCl<sub>4</sub> liver injury and variation of RNA levels in response to amino acids in hepatocyte cultures

38. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **154**, 84-96.

Silbernagl, S. (1988). The renal handling of amino acids and oligopeptides  
2. *Physiol Rev.* **68**, 911-1007.

Simell, O. (2001). Lysinuric protein intolerance and other actionic aminoacidurias. In *In Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*, McGraw-Hill, ed. (New York: pp. 4933-4956.

Spindler, B., Mastroberardino, L., Custer, M., and Verrey, F. (1997). Characterization of early aldosterone-induced RNAs identified in A6 kidney epithelia. *Pflugers Arch.* **434**, 323-331.

Stuart, D.I., Levine, M., Muirhead, H., and Stammers, D.K. (1979). Crystal structure of cat muscle pyruvate kinase at a resolution of 2.6 Å  
16. *J. Mol. Biol.* **134**, 109-142.

Suga, K., Katagiri, K., Kinashi, T., Harazaki, M., Iizuka, T., Hattori, M., and Minato, N. (2001). CD98 induces LFA-1-mediated cell adhesion in lymphoid cells via activation of Rap1  
23. *FEBS Lett.* **489**, 249-253.

Suga, S., Tsurudome, M., Ito, M., Ohgimoto, S., Tabata, N., Nishio, M., Kawano, M., Komada, H., Ito, M., Sakurai, M., and Ito, Y. (1997). Human immunodeficiency virus type-1 envelope glycoprotein gp120 induces expression of fusion regulatory protein (FRP)-1/CD98 on CD4<sup>+</sup> T cells: a possible regulatory mechanism of HIV-induced syncytium formation  
29. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl)* **185**, 237-243.

Tabata, N., Ito, M., Shimokata, K., Suga, S., Ohgimoto, S., Tsurudome, M., Kawano, M., Matsumura, H., Komada, H., Nishio, M., and . (1994). Expression of fusion regulatory proteins (FRPs) on human peripheral blood monocytes. Induction of homotypic cell aggregation and formation of multinucleated giant cells by anti-FRP-1 monoclonal antibodies  
4. *J. Immunol.* **153**, 3256-3266.

Tate, S.S., Yan, N., and Udenfriend, S. (1992). Expression cloning of a Na<sup>(+)</sup>-independent neutral amino acid transporter from rat kidney  
7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 1-5.

Teixeira, S., Di, G.S., and Kuhn, L.C. (1987). Primary structure of the human 4F2 antigen heavy chain predicts a transmembrane protein with a cytoplasmic NH<sub>2</sub> terminus  
15. *J. Biol. Chem.* **262**, 9574-9580.

Tohyama, O., Imura, A., Iwano, A., Freund, J.N., Henrissat, B., Fujimori, T., and Nabeshima, Y. (2004). Klotho is a novel beta-glucuronidase capable of hydrolyzing steroid beta-glucuronides. *J. Biol. Chem.* **279**, 9777-9784.

Torrents, D., Estevez, R., Pineda, M., Fernandez, E., Lloberas, J., Shi, Y.B., Zorzano, A., and Palacin, M. (1998b). Identification and characterization of a membrane protein (y<sup>+</sup>L amino acid transporter-1) that associates with 4F2hc to encode the amino acid



transport activity y<sup>+</sup>L. A candidate gene for lysinuric protein intolerance  
50. *J. Biol. Chem.* 273, 32437-32445.

Torrents,D., Estevez,R., Pineda,M., Fernandez,E., Lloberas,J., Shi,Y.B., Zorzano,A., and Palacin,M. (1998a). Identification and characterization of a membrane protein (y<sup>+</sup>L amino acid transporter-1) that associates with 4F2hc to encode the amino acid transport activity y<sup>+</sup>L. A candidate gene for lysinuric protein intolerance. *J. Biol Chem.* 273, 32437-32445.

Torrents,D., Mykkanen,J., Pineda,M., Feliubadalo,L., Estevez,R., de,C.R., Sanjurjo,P., Zorzano,A., Nunes,V., Huoponen,K., Reinikainen,A., Simell,O., Savontaus,M.L., Aula,P., and Palacin,M. (1999). Identification of SLC7A7, encoding y<sup>+</sup>LAT-1, as the lysinuric protein intolerance gene  
3. *Nat. Genet.* 21, 293-296.

Tsai,M.L., Liaw,S.H., and Chang,N.C. (2004). The crystal structure of Ym1 at 1.31 Å resolution. *J. Struct. Biol.* 148, 290-296.

Tsurudome,M., Ito,M., Takebayashi,S., Okumura,K., Nishio,M., Kawano,M., Kusagawa,S., Komada,H., and Ito,Y. (1999). Cutting edge: primary structure of the light chain of fusion regulatory protein-1/CD98/4F2 predicts a protein with multiple transmembrane domains that is almost identical to the amino acid transporter E167. *J. Immunol.* 162, 2462-2466.

Tsurudome,M. and Ito,Y. (2000). Function of fusion regulatory proteins (FRPs) in immune cells and virus-infected cells. *Crit Rev. Immunol.* 20, 167-196.

Vagin,A. and Teplyakov,A. (1997). MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Cryst.* 30, 1022-1025.

Van Winkle,L.J., Campione,A.L., and Gorman,J.M. (1988). Na<sup>+</sup>-independent transport of basic and zwitterionic amino acids in mouse blastocysts by a shared system and by processes which distinguish between these substrates  
2. *J. Biol. Chem.* 263, 3150-3163.

Veljkovic,E., Stasiuk,S., Skelly,P.J., Shoemaker,C.B., and Verrey,F. (2004). Functional characterization of *Caenorhabditis elegans* heteromeric amino acid transporters  
5. *J. Biol. Chem.* 279, 7655-7662.

Verrey,F., Closs,E.I., Wagner,C.A., Palacin,M., Endou,H., and Kanai,Y. (2004). CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch.* 447, 532-542.

Verrey,F., Jack,D.L., Paulsen,I.T., Saier,M.H., Jr., and Pfeiffer,R. (1999). New glycoprotein-associated amino acid transporters. *J. Membr. Biol.* 172, 181-192.

Wagner,C.A., Lang,F., and Broer,S. (2001). Function and structure of heterodimeric amino acid transporters. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 281, C1077-C1093.

Warren,A.P., Patel,K., Miyamoto,Y., Wygant,J.N., Woodside,D.G., and McIntyre,B.W. (2000). Convergence between CD98 and integrin-mediated T-lymphocyte co-stimulation

1. *Immunology* 99, 62-68.

Watanabe, K., Hata, Y., Kizaki, H., Katsube, Y., and Suzuki, Y. (1997). The refined crystal structure of *Bacillus cereus* oligo-1,6-glucosidase at 2.0 Å resolution: structural characterization of proline-substitution sites for protein thermostabilization  
1. *J. Mol. Biol.* 269, 142-153.

Weaver, V.M., Petersen, O.W., Wang, F., Larabell, C.A., Briand, P., Damsky, C., and Bissell, M.J. (1997). Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies  
3. *J. Cell Biol.* 137, 231-245.

Weissbach, L., Handlogten, M.E., Christensen, H.N., and Kilberg, M.S. (1982). Evidence for two Na<sup>+</sup>-independent neutral amino acid transport systems in primary cultures of rat hepatocytes. Time-dependent changes in activity  
25. *J. Biol. Chem.* 257, 12006-12011.

Wells, R.G. and Hediger, M.A. (1992). Cloning of a rat kidney cDNA that stimulates dibasic and neutral amino acid transport and has sequence similarity to glucosidases  
6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 5596-5600.

Wells, R.G., Lee, W.S., Kanai, Y., Leiden, J.M., and Hediger, M.A. (1992). The 4F2 antigen heavy chain induces uptake of neutral and dibasic amino acids in *Xenopus* oocytes  
1. *J. Biol. Chem.* 267, 15285-15288.

Wilson, M.C., Meredith, D., Fox, J.E., Manoharan, C., Davies, A.J., and Halestrap, A.P. (2005). Basigin (CD147) is the target for organomercurial inhibition of monocarboxylate transporter isoforms 1 and 4: the ancillary protein for the insensitive MCT2 is EMBIGIN (gp70). *J. Biol. Chem.* 280, 27213-27221.

Wolf, D.A., Wang, S., Panzica, M.A., Bassily, N.H., and Thompson, N.L. (1996). Expression of a highly conserved oncofetal gene, TA1/E16, in human colon carcinoma and other primary cancers: homology to *Schistosoma mansoni* amino acid permease and *Caenorhabditis elegans* gene products  
1. *Cancer Res.* 56, 5012-5022.

Xu, D. and Hemler, M.E. (2005). Metabolic activation-related CD147-CD98 complex  
1. *Mol. Cell Proteomics.* 4, 1061-1071.

Yan, N., Mosckovitz, R., Udenfriend, S., and Tate, S.S. (1992). Distribution of mRNA of a Na<sup>(+)</sup>-independent neutral amino acid transporter cloned from rat kidney and its expression in mammalian tissues and *Xenopus laevis* oocytes  
1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 9982-9985.

Yanagida, O., Kanai, Y., Chairoungdua, A., Kim, D.K., Segawa, H., Nii, T., Cha, S.H., Matsuo, H., Fukushima, J., Fukasawa, Y., Tani, Y., Taketani, Y., Uchino, H., Kim, J.Y., Inatomi, J., Okayasu, I., Miyamoto, K., Takeda, E., Goya, T., and Endou, H. (2001). Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines  
3. *Biochim. Biophys. Acta* 1514, 291-302.

Yoon, J.H., Kim, I.J., Kim, H., Kim, H.J., Jeong, M.J., Ahn, S.G., Kim, S.A., Lee, C.H., Choi, B.K., Kim, J.K., Jung, K.Y., Lee, S., Kanai, Y., Endou, H., and Kim, d.K. (2005). Amino acid transport system L is differently expressed in human normal oral keratinocytes and human oral cancer cells  
2. *Cancer Lett.* 222, 237-245.

Zent, R., Fenczik, C.A., Calderwood, D.A., Liu, S., Dellos, M., and Ginsberg, M.H. (2000). Class- and splice variant-specific association of CD98 with integrin beta cytoplasmic domains  
33. *J. Biol. Chem.* 275, 5059-5064.

Zou, J.X., Liu, Y., Pasquale, E.B., and Ruoslahti, E. (2002). Activated SRC oncogene phosphorylates R-ras and suppresses integrin activity  
3. *J. Biol. Chem.* 277, 1824-1827.