



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estructura y determinantes funcionales de selectividad de sustrato de los transportadores HAT para aminoácidos neutros

Paloma Escudero Bravo



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – Compartir Igual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – Compartir Igual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0. Spain License.**



UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Facultad de farmacia y ciencias de la
alimentación
Programa de doctorado: Biotecnología

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
DE BARCELONA (IRB)

Departamento Envejecimiento y
metabolismo
Transportadores de aminoácidos y
enfermedades

**» ESTRUCTURA Y DETERMINANTES FUNCIONALES DE SELECTIVIDAD DE SUSTRATO DE LOS
TRANSPORTADORES HAT PARA AMINOÁCIDOS NEUTROS «**

Memoria para optar al título de Doctor por la Universidad de Barcelona

presentada por *Paloma Escudero Bravo*

El director:

El Codirector:

La Interessada:

Manuel Palacín Prieto

Ekaitz Errasti Murugarren

Paloma Escudero Bravo

Siempre he querido pensar que mi tesis se ha peleado entre dar la importancia que se merecen a dos campos de la biología diferentes pero que se necesitan el uno al otro, la función y la estructura. Durante esta tesis he trabajado con los transportadores de aminoácidos y la importancia de conocer su funcionalidad para entender su propio mecanismo de acción y con ello saber a qué se debe su selectividad de sustrato y las patologías que tienen asociadas. No obstante, este estudio resulta incompleto y sin bases que lo apoyen si no le acompaña un trabajo en el estudio estructural de las proteínas, ese misterio que guardan los átomos para disponerse de tal manera que un ligero cambio de posición o un par de átomos adicionales puede provocar el caos desde lo más profundo de cada biomolécula.

ÍNDICE:

1. INTRODUCCIÓN	23
1.1. PROTEÍNAS DE MEMBRANA	24
1.1.1. Transporte celular	24
1.1.1.1. Transporte de aminoácidos	26
1.1.1.2. Superfamilia APC	26
1.1.2. Transportadores heteroméricos de aminoácidos (HATs)	28
1.1.2.1. rBAT y sus subunidades ligeras	31
1.1.2.2. 4F2hc y sus subunidades ligeras	32
1.2. BIOLOGÍA ESTRUCTURAL	38
1.2.1. Metodologías de resolución estructural	39
1.2.1.1. Revolución de la resolución	39
1.2.2. Relevancia del estudio estructural de los HATs	41
1.2.3. Biología estructural de los HATs	43
1.2.3.1. 4F2hc-ED	43
1.2.3.2. LeuT	45
1.2.3.3. AdiC	47
1.2.3.4. GkApcT	48
1.2.3.5. BasC	50
1.2.3.6. MhsT	52
1.2.3.7. 4F2hc/LAT1	53
1.2.3.8. rBAT/b ⁰⁺ AT	57
2. OBJETIVOS	59
3. MATERIALES Y MÉTODOS	61
3.1. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN Y OBTENCIÓN DEL ADN	62
3.1.1. Diseño de los constructos	62
3.1.1.1. Elección de las dianas de restricción y diseño de cebadores	62
3.1.1.2. Digestión de los fragmentos de ADN con endonucleasas	64
3.1.1.3. Ligación de fragmentos de ADN mediante <i>InFusion</i>	64

3.1.2 Reacción en cadena de la polimerasa	65
3.1.2.1. Reacción de amplificación	65
3.1.2.2. Introducción de dianas de restricción mediante PCR	66
3.1.2.3. Mutagénesis dirigida	67
3.1.2.4. Gel de agarosa no desnaturizante	68
3.1.2.5. Secuenciación por PCR	68
3.1.3. Amplificación de las construcciones plasmídicas	68
3.1.3.1. Crecimiento bacteriano y obtención de bacterias competentes	69
3.1.3.2. Transformación de bacterias competentes	70
3.1.4. Obtención del ADN clonado	71
3.2. EXPRESIÓN HETERÓLOGA EN CULTIVOS CELULARES.....	71
3.2.1. Cultivos celulares.....	71
3.2.1.1. Células de mamífero.....	72
3.2.1.2. Células con crecimiento adherido	75
3.2.1.3. Células con crecimiento en suspensión	76
3.2.2. Introducción del ADN exógeno	77
3.2.2.1. Tranfección transitoria	768
3.2.3. Expresión de la proteína heteróloga	79
3.3. ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS HETERÓLOGAS.....	80
3.3.1. Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad	81
3.3.1.1. Purificación del heterodímero.....	81
3.3.2. Análisis de expresión y de estabilidad.....	83
3.3.2.1. Análisis de fluorescencia por cromatografía de exclusión por tamaño (FSEC)	83
3.3.2.2. Análisis por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)	84
3.3.3. Detección de la proteína	84
3.3.3.1. Electroforesis en SDS-PAGE.....	85
3.3.3.2. Ensayo de inmunoblot.....	86
3.3.3.3. Determinación de la concentración de proteínas.....	89
3.3.3.4. Métodos de tinción de geles	89
3.4. ACTIVIDAD FUNCIONAL.....	90
3.4.1. Transporte en liposomas.....	90
3.4.2. Transporte <i>in vivo</i>	92
3.5. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	95
3.5.1. Preparación de muestras	95

3.5.1.1. Tinción negativa	96
3.5.1.2. Criogenización	97
3.5.2. Toma de imágenes	98
3.5.3. Procesamiento digital de las imágenes	99
3.5.4. Construcción del modelo atómico	101
3.5.4.1. Números de acceso de las estructuras de crio-microscopía electrónica	101
3.6. ESTUDIOS POR SIMULACIÓN	102
3.6.1 Modelado de interacción proteína - sustrato por PELE.....	102
3.6.2. Simulaciones por dinámica molecular	103
4. RESULTADOS	104
4.1. ELECCIÓN, OPTIMIZACIÓN Y ANÁLISIS DE 4F2hc/LAT2	105
4.1.1. Cribado de los transportadores humanos candidatos	105
4.1.1.1. Expresión en células HEK293-6E y MGA.....	105
4.1.1.2. Análisis de fluorescencia por cromatografía de exclusión	106
4.1.1.3. Comparación y elección de las proteínas candidatas	109
4.1.2. Análisis de estabilidad de 4F2hc/LAT2 y 4F2hc/y+LAT1.....	110
4.1.2.1. Purificación de 4F2hc/LAT2 con DDM/CHS	110
4.1.2.2. Purificación de 4F2hc/y+LAT1 con DDM /CHS	113
4.1.2.3. Purificación de 4F2hc/LAT2 con digitonina	115
4.1.2.4. Purificación de 4F2hc/y+LAT1 con digitonina	117
4.1.3. Optimización de la expresión de 4F2hc/LAT2	119
4.1.3.1 Concentración celular óptima	120
4.1.3.2. Concentración ADN y PEI-MAX.....	121
4.1.4. Optimización de la purificación de 4F2hc/LAT2	123
4.1.4.1. Purificación de 4F2hc/LAT2 con digitonina desde extracto membranal	124
4.1.4.2. Optimización de la solubilización por digitonina	127
4.1.5. Análisis funcional de 4F2hc/LAT2.....	131
4.1.5.1. Transporte en células HeLa	132
4.1.5.2. Determinación de la actividad de 4F2hc/LAT2 reconstituido en liposomas.....	132
4.1.5.3. Ensayo de actividad de 4F2hc/LAT2 en liposomas.....	133
4.2. DETERMINANTES ESTRUCTURALES DE 4F2hc/LAT2	135
4.2.1. Arquitectura general	138
4.2.2. Contactos entre 4F2hc y LAT2.....	140

4.2.3. El sitio de unión del sustrato	141
4.3. DETERMINANTES FUNCIONALES DE 4F2hc/LAT2	142
4.3.1. Residuos implicados en la selectividad del sustrato	142
4.3.1.1. Estudios PELE para determinar residuos clave para la selectividad de sustrato	143
4.3.1.2. Comparación de secuencia entre transportadores de aminoácidos neutros	145
4.3.1.3. Análisis mutacional del sitio de unión	146
4.3.2. Residuos implicados en la pérdida auditiva asociada a la edad	151
4.3.2.1. Mutación Val 460 Glu	152
4.3.2.2. Mutación Thr 402 Met	153
5. DISCUSIÓN	159
6. CONCLUSIÓN	180
7. BIBLIOGRAFÍA	183
8. APÉNDICE	213

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representación de los transportadores SLC y no SLC.	25
Figura 2: Representación de la topología de los HATs.	29
Figura 3: Estructura de 4F2hc-ED humano	44
Figura 4: Representación esquemática de la disposición LeuT.	46
Figura 5: Estados de conformación a lo largo del ciclo de transporte de transportadores LATs y homólogos.	47
Figura 6: Estructura del sitio de unión al sustrato en GkApcT.	49
Figura 7: Modelo de BasC para la liberación del sustrato al citoplasma.	51
Figura 8: Mapa de crio-microscopia de h4F2hc/LAT1.	53
Figura 9: Interfases que participan en la interacción entre 4F2hc y LAT1.	56
Figura 10: Construcción modelo de las proteínas estudiadas.	63
Figura 11: Imágenes de crio-microscopia de la proteína 4F2hc/LAT2 humano	99
Figura 12: Flujo de partículas durante el procesamiento de las imágenes de 4F2hc/LAT2 humano.	100
Figura 13: Comparación de los perfiles FSEC de las proteínas HAT candidatas.	109
Figura 14: Perfil de SEC correspondiente a 4F2hc/LAT2 purificado en DDM/CHS.	111
Figura 15: Detección de 4F2hc/LAT2 purificado en DDM/CHS.	112
Figura 16: Perfil de SEC correspondiente a 4F2hc/ γ +LAT1 purificado en DDM/CHS.	113
Figura 17: Detección de 4F2hc/ γ +LAT1 purificado en DDM/CHS.	114
Figura 18: Perfiles de SEC correspondientes a 4F2hc/LAT2 purificado en digitonina 2%.	115
Figura 19: Detección de 4F2hc/LAT2 purificado en digitonina 2%.	116
Figura 20: Perfiles de SEC correspondientes a las muestras purificadas de 4F2hc/ γ +LAT1 en digitonina 2%.	118
Figura 21: Detección de 4F2hc/ γ +LAT1 purificado en digitonina 2%.	119
Figura 22: Perfiles de SEC correspondientes a las muestras purificadas de 4F2hc/LAT2 en digitonina 2% con previa extracción membranal.	126

Figura 23: Detección de 4F2hc/LAT2 purificado en digitonina 2% con previa extracción membranal.	127
Figura 24: Detección de GFP en purificaciones de 4F2hc/LAT2.	131
Figura 25: Ensayo de actividad de 4F2hc/LAT2 reconstituido en liposomas.	134
Figura 26: Estimación de la resolución de 4F2hc/LAT2 humano	136
Figura 27: Detalle de los dominios transmembrana y bucles intra y extracelulares del mapa de crio-ME de 4F2hc/LAT2 humano con modelaje incluido	137
Figura 28: Mapa de densidad de crio-ME y modelo atómico de 4F2hc/LAT2 humano.	139
Figura 29: Sitio de unión al sustrato.	140
Figura 30: Contactos entre 4F2hc y LAT2 en la región transmembranal.	141
Figura 31: Dominios transmembrana pertenecientes al sitio de unión al sustrato y sus interacciones.	142
Figura 32: Poses canónicas de los sustratos glicina, L-alanina, L-triptófano y L-glutamina procedentes de los análisis de PELE de LAT2.	144
Figura 33: Alineación de la secuencia de LAT2 con LAT1 y Asc1 humanos.	
Figura 34: Ensayo de transporte de mutantes de 4F2hc/LAT2 y 4F2hc/Asc1 humanos para el residuo 246.	146
Figura 35: Simulación PELE de la unión de los sustratos glicina, L-alanina, L-glutamina y L-triptófano a LAT2 humano en conformación abierta hacia el citosol, salvaje y mutante Gly 246 Ser.	147
Figura 36: Poses canónicas de los sustratos glicina, L-alanina, L-triptófano y L-glutamina procedentes de los análisis de PELE de 4F2hc/LAT2 humano Gly 246 Ser.	148
Figura 37: Ensayo de transporte de mutantes de 4F2hc/LAT2 para el residuo 134.	150
Figura 38: Simulación PELE de la unión de los sustratos glicina, L-alanina, L-glutamina y L-triptófano a LAT2 humano en conformación abierta hacia el citosol, salvaje y mutante Asn 134 Ser.	151
Figura 39: Localización del residuo Val 460.	152
Figura 40: Tríada formada por Tyr 93, Asp 106 y Thr 402.	154
Figura 41: Análisis de dinámica molecular de 4F2hc/LAT2 humano, forma salvaje y mutante Tyr 93 Ala, unido a L-alanina o L-triptófano, residuo Gly 246 – sustrato.	156
Figura 42: Análisis de dinámica molecular de 4F2hc/LAT2 humano, forma salvaje y mutante Tyr 93 Ala, unido a L-alanina o L-triptófano, Tyr/Ala 93 - Trp 248.	158

Figura 43: Comparación de la cavidad formada por los sitios de unión al sustrato de LAT1, LAT2 y BasC	169
Figura 44: Localización de los mutantes identificados en el gen LAT2 humano y asociados a ARHL y cataratas.	172
Figura 45: Representación de los TM2, IL1 y TM10 de LAT1 y LAT2	173
Figura 46: Comparativa de los TM6 de las estructuras resueltas de LAT1, LAT2, b ⁰⁺ AT y BasC	174
Figura 47: Andamiaje del TM2, IL1 y TM10 que sostiene el segmento desenrollado del TM6.	176
Figura 48: Alineamiento de la secuencia de LAT2 humano entre el TM2 y el IL1 con otros LATs y transportadores homólogos más remotos	178
Figura suplementaria 1: Representación de los plásmidos empleados	208
Figura suplementaria 2: Análisis de la eficacia de la transfección por fluorescencia verde.	210

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Selección de familias pertenecientes a la superfamilia de transportadores SLC.	27
Tabla 2: Transportadores de aminoácidos.	28
Tabla 3: Resumen de las características de los HATs.	30
Tabla 4: Homólogos bacterianos remotos de LATs.	45
Tabla 5: Parámetros y estadísticas de la adquisición de datos crio-ME y del procesamiento digital de las imágenes.	98
Tabla 6: Medidas RFUs de los ensayos UDS de las expresiones en HEK293-E6 y HEK293-MGA	107
Tabla 7: Medidas de fluorescencia de la optimización de la concentración celular.	121
Tabla 8: Medidas de fluorescencia de la optimización de relación de ADN, volumen de cultivo celular, concentración celular y ratio ADN:PEI-MAX	122
Tabla suplementaria 1: Cebadores utilizados.	209
Tabla suplementaria 2: Ensayos UDS con el objetivo de optimizar la solubilización por digitonina	211

ABREVIATURAS

4F2hc: 4F2 *heavy chain*.

β -OG: n-octil- β -D-glucósido.

AA: aminoácidos.

AAT: transportador de aminoácidos (*amino acid transporter*).

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ADN copia.

AE: actividad específica.

APA: antiporter aminoácido/poliamina.

APC: transportadores de aminoácidos, poliaminas y órgano-cationes.

BCA: ensayo de proteína de ácido bicinconínico (*bicinchoninic acid protein assay*).

BMGY: medio de glicerol complejo tamponado (*buffered complex glycerol medium*).

BMMY: medio de metanol complejo tamponado (*buffered complex methanol medium*).

BSA: suero de albúmina bovina (*bovine serum albumin*).

CATs: transportadores de aminoácidos catiónicos.

CCD: cámaras de dispositivo de carga acoplada.

CHS: colesterol hemisucinato (*cholesteryl hemisuccinate*).

CMC: concentración micelar crítica (*critical miceller concentration*).

CPM: cuentas por minute.

Crio-ME: crio-microscopía electrónica.

CRISPR: repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*).

CTF: función de transferencia de contraste.

dATP: desoxiadenosina 5'-trifosfato.

dCTP: desoxicitidina 5'-trifosfato.

DDM: n-dodecil- β -D-maltósido.

dGTP: desoxiguanina 5'-trifosfato.

DM: n-decil- β -D-maltósido.

DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium*.

DMSO: dimetilsulfóxido.

dNTP: desoxirribonucleótido.

DPM: desintegraciones por minute.

DPPC 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-3-fosfolina

DQE: eficiencia cuántica de detección.

dTTP: desoxitimidina 5'-trifosfato.

DTT: ditioneitol.

ECL: quimioluminiscente a base de luminol mejorado (*enhanced luminol-based chemiluminescent*).

ED ectodominio

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

EL: bucle extracelular (*intercellular loop*).

FBS: Suero fetal bovino

FPLC: cromatografía líquida de proteínas rápida (*fast protein liquid chromatography*).

FSC: Correlación de Fourier (*Fourier Shell Correlation*).

FSEC: cromatografía de exclusión por tamaño fluorescente (*fluorescent size exclusion chromatography*).

G: fuerza gravitacional.

GABA: glutamato / ácido c-aminobutírico.

GFP: proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*).

HAT: transportador heteromérico de aminoácidos.

HEK 293T: riñón embrionario humano 293T (*human embryonic kidney*).

HH: hélice α horizontal

HRP: peroxidasa de rábano picante (*horseradish peroxidase*).

HUGO: Organización del Genoma Humano (*Human Genome Organization*).

IL: bucle intracelular (*intercellular loop*).

IMAC: cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados

IMP: proteínas integrales de membrana (*Integral Membrane Protein*).

IPTG: isopropil β -D-1- tiogalactopiranosido.

Kb: kilo-base.

kDa: kilo-Dalton.

Kd: constante de disociación.

km: constante de Michaelis-Menten.

kV: kilo-voltios

LAT: L-transportador de aminoácidos.

LB: *Luria Broth*.

LCR: líquido cefalorraquídeo.

LPI: lisinuria con intolerancia proteica.

LSB: tampón de muestra Laemmli.

mA: mili-amperios.

MD: dinámica molecular (*molecular dynamic*).

MSP: andamiaje de proteína de membrana (*Membrane Scaffold protein*).

mUAs: mili-unidad de absorbancia.

MWCO: Corte de peso molecular (*Molecular weight cut-off*).

NMDA: N-metil-D-aspartato.

NMR: resonancia magnética nuclear (*Nuclear Magnetic Resonance*)

OD: densidad óptica.

pb: pares de bases.

PBS: solución salina tampón fosfato.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*).

PDB: banco de datos de proteínas (*protein data bank*)

PEI: polietilenimina.

PELE: Exploración del paisaje de la energía proteica (*Protein Energy Landscape Exploration*).

POPC: 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfocolina.

rBAT: relacionado con el transportador de aminoácidos básicos.

RCSB: colaboración de investigación para bioinformática estructural (*Research Collaboratory for Structural Bioinformatics*)

RFU: unidades de fluorescencia relativa (*Relative Fluorescence Units*).

RMSD: Desviación de la raíz cuadrada media (*Root-Mean-Square Deviation*).

RT: temperatura ambiente (*room temperature*).

SDS: dodecil sulfato de sodio.

SDS - PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida SDS.

SEC: cromatografía de exclusión por tamaño (*size exclusion chromatography*).

SEM / sem: error estándar de la media (*standard error median*)

SLC: portadores de soluto (*solute carrier*).

TCDB: base de datos de clasificación de transportadores (*Transporter Classification DataBase*).

TM: dominio transmembrana.

Tris: tris (hidroximetil) aminometano.

UDS: ensayo de sedimentación por dispersión por ultracentrifugación (*Ultracentrifugation Dispersity Sedimentation Assay*).

UI: unidad internacional

V: voltios

WT: tipo salvaje (*wild type*).

YNB: bases nitrogenadas de levadura (*Yeast Nitrogen base*).

YPD: medio de dextrosa de peptona de extracto de levadura (*yeast extract peptone dextrose media*)

TABLA DE AMINOÁCIDOS

<u>Nombre completo</u>	<u>Nombre tres letras</u>	<u>Nombre una letra</u>
Alanina	Ala	A
Metionina	Met	M
Cisteína	Cys	C
Asparagina	Asn	N
Aspartato	Asp	P
Prolina	Pro	P
Glutamato	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Fenilalanina	Phe	F
Arginina	Arg	R
Glicina	Gly	G
Serina	Ser	S
Histidina	His	H
Treonina	Thr	T
Isoleucina	Ile	I
Valina	Val	V
Lisina	Lys	K
Triptófano	Trp	W
Leucina	Leu	L
Tirosina	Tyr	T

RESUMEN EN CASTELLANO

Los transportadores heteroméricos de aminoácidos (HAT) se encuentran compuestos por una subunidad pesada que dirige el tráfico del transportador a la membrana plasmática y la subunidad ligera que posee la actividad catalítica. Cada uno de sus miembros ha evolucionado para reconocer y transportar una serie de aminoácidos específicos, lo cual les confiere un papel fisiológico cuya alteración se ha visto relacionada con diferentes patologías humanas; cáncer, aminoacidurias, sordera asociada a la edad o autismo. De la aplicación de inhibidores que reconozcan estos transportadores de manera específica y de la comprensión de cómo una mutación afecta a su actividad radica la importancia de caracterizar estructural y funcionalmente estos transportadores. Hasta hace muy pocos años la información estructural publicada de los HATs se reducía a modelos atómicos construidos a partir de homólogos bacterianos lejanos y una estructura de h4F2hc/LAT2 resuelta a 21 Å. No obstante, en los 2 últimos años, se han resuelto varias estructuras, desde un LAT bacteriano hasta tres HATs diferentes, incluyendo uno en varias conformaciones, en presencia y ausencia de sustrato.

Durante esta tesis se ha realizado un cribado de varios HATs, con el objetivo de encontrar aquel que mejor balance presentara entre un alto nivel de expresión y purificación, y una homogeneidad y estabilidad suficientes para realizar un estudio estructural en criomicroscopía electrónica. Tal estudio resultó en la resolución de la estructura de 4F2hc/LAT2 humano a una resolución de 3,7 Å con el núcleo transmembranal de LAT2 resuelto en un rango entre 2,5 y 3 Å.

El análisis de la estructura de 4F2hc/LAT2, junto con una aproximación multidisciplinar, ha permitido establecer las bases moleculares del diferente perfil de selectividad mostrado por los transportadores HAT de aminoácidos neutros (LAT2, LAT1 y Asc1). De este modo, la información estructural existente (LAT1 y LAT2 humanos) junto con los estudios funcionales llevados a cabo para LAT2 y Asc1 humanos y los análisis de simulación con sustratos realizados en LAT2 humano permitieron identificar los residuos clave para la diferente selectividad de sustrato dentro de los transportadores HAT de aminoácidos neutros.

Por otro lado, el análisis estructural de las mutaciones identificadas en LAT2 asociadas a sordera temprana y cataratas en pacientes determinaron que la región entre el dominio transmembrana 2 (TM2) y el bucle intercelular 1 (IL1) resultaría clave en la configuración del sitio de unión al sustrato. De esta manera, proponemos que las conexiones de regiones cercanas al sitio de unión con el TM2 y el IL1 resultarían clave en la conformación espacial de los residuos clave para el reconocimiento de sustrato y que han sido identificados en el transcurso de esta tesis. Así, pequeños cambios en las interacciones entre estas regiones que se observan en el análisis de secuencia de los diferentes HATs podrían explicar, al menos en parte, el perfil de selectividad de sustrato observados para los diferentes subgrupos de transportadores HAT. Nuestros resultados abren la puerta para identificar los mecanismos moleculares de selectividad de sustratos de los transportadores HAT tanto en el lugar de unión al sustrato como en una región que determina la conformación de este lugar de unión.

RESUMEN EN INGLÉS

Heteromeric amino acid transporters (HAT) are composed of a heavy subunit which traffics the transporter to the plasma membrane and a light subunit, which has the catalytic activity. Each HAT evolved to recognize and transport a series of specific amino acids, presenting different physiological roles and whose alteration has been related to different human pathologies such as cancer, aminoacidurias, age-related hearing loss or autism. The increased use of transporter-specific inhibitors, and the need to understand the effect on activity caused by mutations highlight the importance of structural and functional characterization of these transporters.

Until a few years ago, the published structural information of HATs was reduced to atomic models from remote bacterial homologues and an 4F2hc/LAT2 structure resolved at 21 Å. However, in the last 2 years, several structures have been resolved, from a bacterial LAT to three different HATs, including one in various conformations, in the presence and absence of substrate.

During this thesis, a screening of several HATs was carried out, in order to identify the transporter with the best balance between a high level of expression and purification, and enough homogeneity and stability to approach a structural study by cryo-electron microscopy. This study showed the structure of human 4F2hc / LAT2 at 3.7 Å of resolution, with the transmembrane core of LAT2 resolved at resolutions between 2.5 and 3.0 Å.

The analysis of the 4F2hc/LAT2 structure, combined with multidisciplinary approaches, has allowed us to establish the molecular basis of the differential selectivity profile of human neutral amino acid transporters (LAT2, LAT1 and Asc1). In this way, the combination of structural information (human LAT1 and LAT2), the functional studies of human LAT2 and Asc1 and simulation analyses with substrates of LAT2 have allowed to identify the key residues responsible for the differences substrate selectivity within of the family of neutral amino acid HATs.

On the other hand, the structural analysis of hLAT2 mutations associated to age-related hearing loss and cataracts identified that the region between the transmembrane domain 2 (TM2) and the intercellular loop 1 (IL1) would be key in the conformation of the binding site. We propose that the connections between regions proximal to the binding site, with TM2 and IL1 would be determinant in the conformation of the key residues for substrate recognition, which have been identified during this thesis. Thus, small changes in these interactions could explain, at least in part, the substrate selectivity profile of the different HAT members. Our results identify the molecular mechanisms of substrate selectivity of HAT, both at the binding site and at the regions that determines the conformation of this binding site.

INTRODUCCIÓN

1.1. PROTEÍNAS DE MEMBRANA

La célula es la unidad anatómica fundamental de todos los organismos vivos, pudiendo formar un organismo completo (organismos unicelulares) o parte de él (organismos pluricelulares) funcionando de manera organizada. De forma básica, las células eucariotas se encuentran formadas por un interior acuoso, el citoplasma donde se incluyen todos los orgánulos relevantes para la vida, un núcleo que contiene la información genética y una membrana plasmática impermeable que envuelve todo.

La membrana plasmática, que delimita las células, se encuentra formada por una bicapa fosfolípida, con colesterol en el caso de las células de mamíferos, y proteínas que protegen mecánicamente la célula y que contribuyen al transporte selectivo de moléculas cuyo uso es requerido en el interior celular o que deben ser excretadas al exterior, o, que participan en la adhesión y comunicación de las células con el exterior. Además, es muy común que las células eucariotas contengan glicosilaciones en las proteínas lo que les confiere una identidad para poder ser reconocidas en el interior del organismo.

1.1.1. Transporte celular

La permeabilidad selectiva que confiere la membrana plasmática a las células resulta esencial para controlar el transporte de moléculas y su concentración en los medios intracelular y extracelular y, con todo ello, mantener la homeostasis celular. Solo ciertas moléculas básicas como el O₂ o el CO₂ tienen la capacidad de cruzar la bicapa lipídica sin necesidad de proteínas específicas, este modo de transporte es llamado difusión. Para el caso de azúcares tales como glucosa o sacarosa, nucleósidos, aminoácidos, iones o drogas, se requiere de un transporte controlado mediante transportadores membranales o canales (Figura 1).

En las células eucariotas más desarrolladas, como las células de mamíferos, las moléculas que requieren este transporte específico son reguladas por proteínas integrales de membrana (IMPs por sus siglas en inglés *Integral Membrane Proteins*). Dentro de tal grupo se encuentran los transportadores portadores de solutos (SLC por sus siglas en inglés *Solute Carrier*) y los transportadores no SLC entre los que destacan las bombas y los canales iónicos; son conocidos como transportadores y canales respectivamente.

La clasificación de los transportadores SLC propuesta por el comité de nomenclatura de la Organización del genoma Humano (HUGO por sus siglas en inglés *HUMAN Gene Organization*) se encuentra en la dirección web <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/>.

Los canales impulsan el movimiento de los solutos a través de gradientes electroquímicos, y una de las diferencias con los transportadores es que la interacción entre el canal y el ion transportado requiere poca energía. Además, los cambios que producen que los dominios modifiquen su conformación para permitir el transporte y actúen como “puertas” son inducidos por factores extrínsecos (cambios en el potencial de membrana o unión de pequeñas moléculas reguladoras) (Dubyak, 2004). Por el contrario, los cambios de conformación necesarios para la translocación del sustrato en los transportadores son inducidos por la interacción del sustrato con residuos específicos del transportador y suelen implicar movimiento de los dominios a lo largo de la proteína y entonces permitir la translocación del sustrato (Dubyak, 2004).

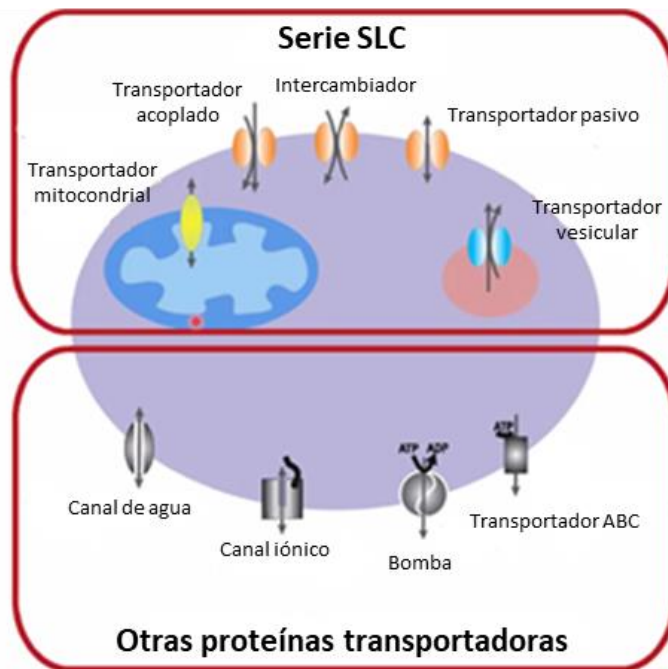


Figura 1: Representación de los transportadores SLC y no SLC. Se pueden localizar tanto en la membrana plasmática como en membranas intercelulares. Imagen adaptada de Hediger *et al.*, 2004.

Dependiendo de la energía requerida para realizar el transporte de estas moléculas existen diferentes tipos de transportadores, pasivos y activos (Hediger *et al.*, 2004):

- Los transportadores pasivos, también conocidos como transportadores facilitadores o equilibrativos, permiten el cruce por la membrana a los solutos mediante difusión al ir a favor de gradiente, equilibrando así la concentración a un lado y otro de la membrana (Cooper, 2000).
- Los transportadores activos permiten el cruce de la membrana plasmática a los solutos en contra del gradiente de concentración para lo cual emplean diferentes mecanismos para obtener la energía necesaria para crear dichos gradientes (Dubyak, 2004). El transporte activo está clasificado en primario y secundario según el modo de obtención de dicha energía. El transporte activo primario es dependiente del uso de la energía libre procedente de la unión o hidrólisis de ATP y el gradiente que hay que superar para transportar la molécula es electrostático. Estos transportadores son considerados realmente bombas que generan y almacenan un gradiente de iones electrostático (emplean Na^+ , K^+ , H^+ , Ca^{2+} o Cu^{2+}) que luego utilizan los transportadores de transporte activo secundario acoplados a iones para realizar el transporte (Lodish *et al.*, 2000). Los transportadores activos secundarios acoplan iones del gradiente electroquímico generado por bombas de iones para permitir el transporte. Dentro de este grupo, el tipo de transporte cotransporte o simporte se da cuando el ion almacenado y la molécula a transportar tienen el mismo sentido y el tipo intercambiador o antiporte cuando el sentido de estos es contrario (Lodish *et al.*, 2000).

Los transportadores membranales presentan un alto grado de selectividad por los sustratos que transportan; solo la unión específica de los sustratos afines promueve el movimiento necesario del transportador para que esta molécula sea transportada al otro lado de la membrana.

1.1.1.1. Transporte de aminoácidos

Entre las piezas básicas necesarias para el funcionamiento de una célula, los aminoácidos son el componente que forma todas las proteínas, tomando parte desde la estructura de las células hasta la regulación de procesos celulares pasando por la síntesis proteica, el crecimiento celular, el metabolismo, la señalización intercelular o acciones específicas como la transmisión neuronal al actuar como neurotransmisores (es el caso del glutamato, la glicina o la D-serina) (Bröer y Palacín, 2011).

Aunque ciertos tipos de aminoácidos pueden ser sintetizados en las propias células, los aminoácidos suelen ser obtenidos a través de la alimentación/ingestión de proteínas (Bröer *et al.*, 2018). Durante la digestión, los grandes complejos proteicos son degradados en pequeños péptidos que son absorbidos en el intestino delgado y entonces hidrolizados para que las unidades individuales de aminoácidos puedan ser liberados al torrente sanguíneo. Una vez los aminoácidos alcanzan el medio extracelular deben ser incorporados por las células para su uso (Bröer *et al.*, 2018).

Al ser la membrana plasmática impermeable, los aminoácidos no pueden cruzarla libremente y requieren de mediadores, proteínas membranales que actúan como transportadores. Estos transportadores llevan a cabo el transporte de aminoácidos de manera dependiente o independiente a iones (Jack *et al.*, 2000).

1.1.1.2. Superfamilia APC

Las familias de los transportadores SLC se han agrupado en superfamilias según la relación evolutiva y la especificidad del sustrato (según *Transporter Classification DataBase*, TCDB, www.tcdb.org) (Tabla 1). Una de ellas es la superfamilia aminoácido/poliamina/organocación (APC), que incluye cotransportadores soluto:cación e intercambiadores soluto:soluto (Isnard *et al.*, 1996; Kashiwagi *et al.*, 1997; Deves y Boyd, 1998).

Estos a su vez se dividen en 52 familias cuya clasificación se debe al número de dominios transmembrana α -hélice y a la secuencia de aminoácidos (requieren tener al menos un 20% de similitud para situarse en la misma familia) (Jack *et al.*, 2000, Schlessinger *et al.*, 2013). Algunas de ellas comparten un origen evolutivo común pero no siempre una especificidad de sustrato mientras que otras no relacionadas, sí que comparten especificidad de sustrato (Schlessinger *et al.*, 2013).

Estos transportadores están no solo involucrados en el transporte de aminoácidos sino también de nutrientes tan relevantes para las células como las vitaminas, los minerales o los iones, todo ello necesario para el mantenimiento de la homeostasis celular y el potencial de membrana. Como consecuencia de su relevancia, se han descrito mutaciones que afectan a los genes que los codifican, resultando en el desarrollo de enfermedades.

2.A.3	Familia APC: aminoácido / poliamina / organocación
2.A.15	Familia BCCT: betaína / carnitina / colina
2.A.18	Familia AAAP: permeasa de aminoácidos / auxinas
2.A.21	Familia SSS: simportador de soluto:sodio
2.A.22	Familia NSS: simportador de neurotransmisor:sodio
2.A.25	Familia AGCS: simportador de alanina o glicina:cationes
2.A.30	Familia CCC: cotransportador de catión cloruro
2.A.39	Familia NCS1: simportador de nucleobase:catión-1
2.A.40	Familia NCS2: simportador de nucleobase:catión-2
2.A.42	Familia HAAAP: permeasa de aminoácidos hidroxil / aromáticos
2.A.53	Familia SulP: permeasa de sulfato

Tabla 1: Selección de familias pertenecientes a la superfamilia de transportadores SLC. La primera columna indica el número de la clasificación de transportadores y la segunda columna el nombre de la familia (Wong *et al.*, 2012). Descripción, miembros y referencias de estas familias en TCDB (www.TCDB.org).

Además, para añadir información sobre las familias de transportadores de aminoácidos, en la siguiente tabla son mostrados con sus principales características tales como el gen codificante, la función y las enfermedades descritas asociadas (Tabla 2).

SLC	Acronimo	Sustratos	Función	Enfermedad / fenotipo
SLC1A1	EAAT3	D, E, Cn	Sistema X ⁻ _{AG}	Aminoaciduria dicarboxílica
SLC1A2	EAAT2	D, E	Sistema X ⁻ _{AG}	
SLC1A3	EAAT1	D, E	Sistema X ⁻ _{AG}	Episodios de ataxia ?
SLC1A4	ASCT1	A, S, C	Sistema ASC	
SLC1A5	ASCT2	A, S, C, T, Q	Sistema ASC	Cáncer
SLC1A6	EAAT4	D, E	Sistema X ⁻ _{AG}	
SLC1A7	EAAT5	D, E	Sistema X ⁻ _{AG}	
SLC3A1	rBAT	Tráfico subunidades	Cadena pesada de AAT heteroméricos	Cistinuria
SLC3A2	4F2hc	Tráfico subunidades	Cadena pesada de AAT heteroméricos	Cáncer
SLC6A5	GlyT2	G	Sistema Gly	Hiperekplexia
SLC6A7	PROT	P	Transportador prolina	
SLC6A9	GlyT1	G	Sistema Gly	
SLC6A14	ATB ^{0,+}	AAs neutros y catiónicos	Sistema B ^{0,+}	Obesidad
SLC6A15	B ⁰ AT2	P, L, V, I, M	Sistema B ⁰	
SLC6A17	NTT4/B ⁰ AT3	L, M, P, C, A, Q, S, H, G	Sistema B ⁰	
SLC6A18	XT2/B ⁰ AT3	G, A	Sistema Gly	Hiperglicinuria? Hipertensión?
SLC6A19	B ⁰ AT1	AAs neutros	Sistema B	Desorden Hartnut, hipertensión?
SLC6A20	IMINO	P	Sistema IMINO	Iminoglicinuria
SLC7A1	CAT-1	K, R, O	Sistema y ⁺	
SLC7A2	CAT-2	K, R, O	Sistema y ⁺	
SLC7A3	CAT-3	K, R, O	Sistema y ⁺	

SLC	Acrónimo	Sustratos	Función	Enfermedad / fenotipo
SLC7A5	LAT1	H, M, L, I, V, F, Y, W	Sistema L	Cáncer
SLC7A6	y+LAT1	K, R, Q, H, M, L	Sistema y ⁺ L	
SLC7A7	y+LAT2	K, R, Q, H, M, L, A, C	Sistema y ⁺ L	Lisinuria con intolerancia de proteínas
SLC7A8	LAT2	AAs neutros, excepto P	Sistema L	Cataratas y sordera
SLC7A9	b ⁰ +AT	R, K, O, Cn	Sistema b ⁰ +	Cistinuria
SLC7A10	Asc-1	G, A, S, C, T	Sistema asc	
SLC7A11	xCT	D, E, Cn	Sistema X ⁻ c	Cáncer
SLC7A12	Asc-2	G, A, S, C, T	Sistema asc	
SLC7A13	AGT1	D, E	Transportador de Asp, Glu	
SLC16A10	TAT1	W, Y, F	Sistema T	Síndrome del pañal azul
SLC17A6	vGLUT2	E	Transportador vesicular Glu	
SLC17A7	vGLUT1	E	Transportador vesicular Glu	
SLC17A8	vGLUT3	E	Transportador vesicular Glu	Sordera no sindrómica
SLC25A2	ORC2	K, R, H, O, Cit	Transportador Orn/Cit	
SLC25A12	AGC1	D, E	Transportador Asp/Glu	Hipomielinación cerebral global
SLC25A13	AGC2	D, E	Transportador Asp/Glu	Citrulinemia tipo II, colestasil intrahepática neonatal
SLC25A15	ORC1	K, R, H, O, Cit	Transportador Orn/Cit	Síndrome HHH
SLC25A18	GC2	E	Transportador Glu	
SLC25A22	GC1	E	Transportador Glu	Epilepsia mioclónica neonatal
SLC32A1	VIAATT	G, GABA	Transportador vesicular Gly/GABA	
SLC36A1	PAT1	G, P, A	Protón AAT	Color del pelo en caballos
SLC36A2	PAT2	G, P, A	Protón AAT	iminoglicinuria
SLC36A4	PAT4	P, W	Sensor amino ácidos	
SLC38A1	SNAT1	G, A, N, C, Q, H, M	Sistema A	
SLC38A2	SNAT2	G, P, A, S, C, Q, N, H, M	Sistema A	
SLC38A3	SNAT3	Q, N, H	Sistema N	
SLC38A4	SNAT4	G, A, S, C, Q, N, M	Sistema A	
SLC38A5	SNAT5	Q, N, H, A	Sistema N	
SLC43A1	LAT3	L, I, M, F, V	Sistema L	
SLC43A2	LAT4	L, I, M, F, V	Sistema L	
No asignado	Cistinosis	Cn	Transportador lisosomal Cys	Cistinosis

Tabla 2: Transportadores de aminoácidos. Se muestra en columnas la información referente a la familia perteneciente (SLC), el gen codificante, el acrónimo, los sustratos transportados, la función y si existen enfermedades o anomalías asociadas. El símbolo “?” hace referencia a que existen indicios de asociación, pero que requieren más estudios. La subfamilia LAT se detallará más extensamente a continuación.

1.1.2. Transportadores heteroméricos de aminoácidos (HATs)

Los HATs son el único ejemplo conocido en todos los reinos de vida de un transportador de aminoácidos que se encuentra compuesto por dos cadenas proteicas unidas por un puente disulfuro. Son heterodímeros formados por una subunidad pesada (o cadena pesada, hc, por sus siglas en inglés *heavy chain*) procedente de la familia SLC3, 4F2hc (SLC3A2) o rBAT (SLC3A1); y por una subunidad ligera perteneciente a la subfamilia LAT dentro de la familia SLC7 (Figura 2 - A).

La subunidad pesada es la responsable del tráfico de la subunidad ligera a la membrana plasmática (Estévez *et al.*, 1998; Pfeiffer *et al.*, 1998; Deves y Boyd, 2000; Palacín y Kanai, 2004), mientras que la subunidad ligera es la encargada de la actividad transportadora al ser la subunidad catalítica (Reig *et*

al., 2002; Fernández *et al.*, 2006). Debido a las diferentes subunidades catalíticas que pueden formar el heterodímero, existe un amplio abanico de tipos de aminoácidos que pueden ser transportados por los HATs, desde neutros (excepto L-prolina) hasta aromáticos pasando por los aniónicos o los catiónicos. Entre estos transportadores cabe detallar que los de tipo γ +L (γ +LAT1 y γ +LAT2) son los únicos que son sodio-dependientes (Fotiadis *et al.*, 2013).

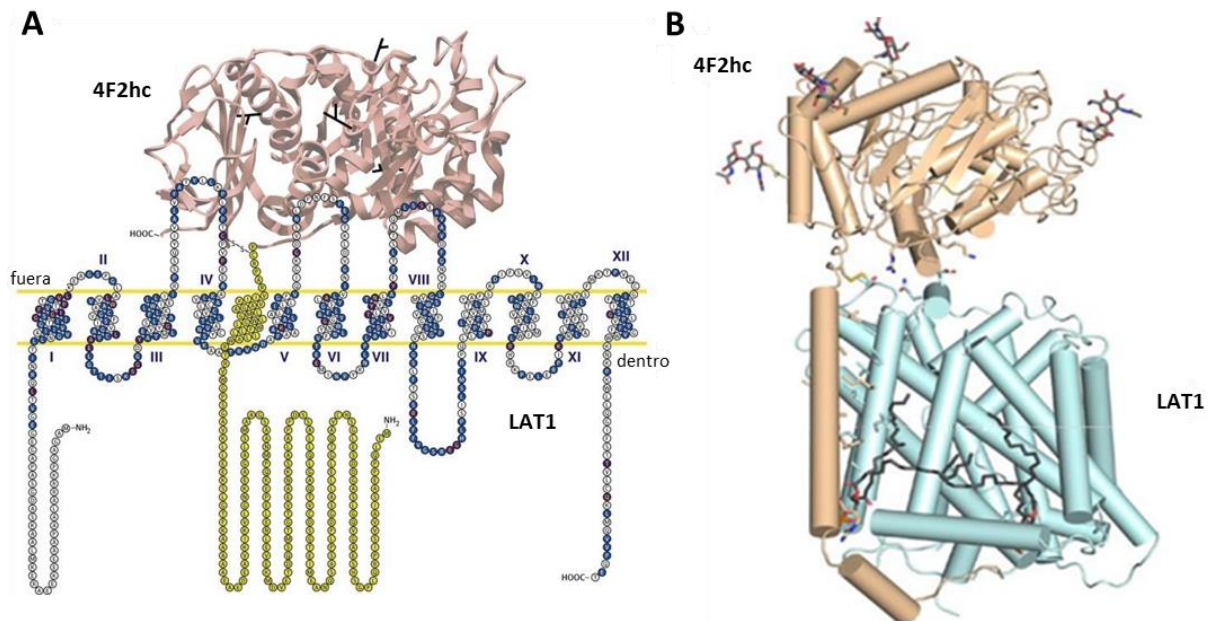


Figura 2: Representación de la topología de los HATs. A) Modelo del transportador humano 4F2hc/LAT1. B) Estructura del transportador humano 4F2hc/LAT1 publicada durante el desarrollo de la tesis, hélices representadas en cilindros (Yan *et al.*, 2019). Glicosilaciones de 4F2hc mostrados como *sticks*, palos.

La subunidad pesada es una N-glicoproteína de membrana tipo II con la región N-terminal en la zona intracelular, un dominio transmembrana y un ectodominio (ED) voluminoso, y que muestra una homología estructural a las maltasas de los insectos y a las α -glucosilasas de las bacterias (Estévez *et al.*, 1992, Torrents *et al.*, 1998; Fort *et al.*, 2007; Gabrisko y Janecek, 2009). La subunidad 4F2hc cuenta con cuatro sitios de glicosilación que fueron descritos en la estructura del ectodominio de 4F2hc resuelta por cristalografía (Fort *et al.*, 2007) (Figura 2 - B).

Las dos subunidades pesadas descritas que forman parte de los HATs son 4F2hc y rBAT, que comparten un 22% de identidad de secuencia de aminoácidos y un 50% de similitud (Bertran *et al.*, 1992a; Bertran *et al.*, 1992b; Tates *et al.*, 1992; Wells y Hediger, 1992); pero mientras 4F2hc se expresa probablemente en todas las células, rBAT tiene una expresión focalizada en el intestino delgado y el túbulo renal proximal (Fernández *et al.*, 2006).

Por su lado, la subunidad ligera es una proteína politópica que consiste en doce dominios transmembrana (TMDs por sus siglas en inglés *TransMembrane Domains*) con los extremos N y C-terminal en la región intracelular (Figura 2) (Kanai *et al.*, 1998; Torrents *et al.*, 1998, Gasol *et al.*, 2004, Fotiadis *et al.*, 2013). Las subunidades ligeras no poseen glicosilaciones ya que apenas cuentan con regiones extracelulares.

El peso molecular de las subunidades pesadas ronda sobre los 70 kDa, mientras que el de las subunidades ligeras ronda sobre los 50 kDa (Verrey *et al.*, 2000; Chillarón *et al.*, 2001).

De las diez subunidades ligeras identificadas pertenecientes a la subfamilia LAT, LAT1, LAT2, y+LAT1, y+LAT2, Asc1 y xCT se encuentran asociadas a 4F2hc mientras que AGT-1 y b⁰AT están asociadas a rBAT (Fotiadis *et al.*, 2013; Nagamori *et al.*, 2016) y las dos restantes, no localizadas en humanos, Asc2 y ArPAT están unidas a una subunidad pesada no identificada (Tabla 3). La mayoría de los heterodímeros formados tienen una función tipo intercambiadora a excepción de 4F2hc/Asc1 que muestra, además, un transporte tipo uniporte o equilibrativo (Busch *et al.*, 1994; Chillarón *et al.*, 1996, Fukasawa *et al.*, 2000).

Subunidad pesada	Subunidad ligera asociada	Gen	Localización cromosómica humana	Sistema de transporte	Función y sustratos predominantes	Enfermedades asociadas
4F2hc		SLC3A2	11q13		Tráfico del holotransportador a la membrana	Cáncer. Autismo
	LAT1	SLC7A1	16q24.3	L	AA L-neutros grandes, T3, T4, L-DOPA y BCH. Crecimiento celular a través de mTOR	Cáncer
	LAT2	SLC7A8	14q11.2	L	AA L-neutros, T3, T4 y BCH. Reabsorción renal.	Cataratas y sordera asociada a la edad (ARHL)
	y+LAT1	SLC7A7	14q11.2	y+L	AA catiónicos - Na ⁺ independiente y AA L-neutros grandes - Na ⁺ dependiente	Lisinuria con intolerancia a proteínas (LPI)
	y+LAT2	SLC7A6	16q22.1	y+L	AA catiónicos - Na ⁺ independiente y AA L-neutros grandes - Na ⁺ dependiente	
	Asc1	SLC7A10	19q13.1	Asc	AA neutros pequeños y D-Ser. Control sináptico	Esquizofrenia. Hiperexcitabilidad
	xCT	SLC7A11	4q28.3	Xc-	Cistina (forma aniónica, L-glutamato). Control balance redox	Cáncer (ferroptosis). Sarcoma de Kaposi. Receptor del virus herpes. Adicción a la cocaína
rBAT		SLC3A1			Tráfico del holotransportador a la membrana	Cistinuria tipo A
	b ⁰ AT	SLC7A9	19q13.1	b ⁰	AA neutros y dibásicos	Cistinuria tipo B
	AGT-1	SLCA13	8q21.3		L-aspartato y L-glutamato	
Desconocido						
	Asc2	Slc7a12		Asc	AA neutros	Cáncer. Receptor de retrovirus
	ArpAT	Slc7a15	Silenciado en primates		AA aromáticos	

Tabla 3: Resumen de las características de los HATs. En columnas se detalla la información referente a la asociación entre subunidades pesada y ligera, el gen, la localización cromosómica, el sistema de transporte, especificidad de sustrato y enfermedades asociadas (Fairweather *et al.*, 2021).

Las dos subunidades se encuentran conectadas por un puente disulfuro situado en dos cisteínas altamente conservadas y localizadas en la región extracelular del bucle 2 de la subunidad ligera y en la región externa del dominio transmembrana denominada “cuello” de la subunidad pesada (Pfeiffer *et al.*, 1998; Verrey *et al.*, 1999; Chillarón *et al.*, 2001; Palacín y Kanai, 2004). Sin embargo, aunque sean estas cisteínas las que participan en la unión, una mutación que impidiera la formación del puente disulfuro no impide la unión de las dos subunidades, lo que sugiere que deben existir otros enlaces

no covalentes que participen en la unión (Estévez *et al.*, 1998; Pfeiffer *et al.*, 1998). En la estructura de 4F2hc/LAT1 humano publicada durante el desarrollo de esta tesis se han descrito varias interacciones entre la parte superior de LAT1 en contacto con 4F2hc, así como entre el dominio transmembrana de 4F2hc y los dominios transmembrana 3 y 4 de LAT1 (Lee *et al.*, 2019) (Yan *et al.*, 2019).

La correcta formación del heterodímero es esencial para el correcto funcionamiento de la subunidad catalítica ya que la subunidad pesada lo acompaña hasta la membrana celular. Por ello, la pérdida de función de la subunidad pesada se traduce en una deslocalización de la subunidad ligera en la membrana, lo cual no impide que continúe siendo funcional. Del mismo modo, mutaciones que afecten a la subunidad ligera pueden afectar al correcto transporte de los sustratos específicos de esa subunidad, como es el caso de aquellas que producen cistinuria (Chillarón *et al.*, 2010).

Ahora pasaré a explicar brevemente la importancia que tiene el estudio de estos transportadores de una manera individual antes de focalizar la atención sobre la proteína de interés de este trabajo, 4F2hc/LAT2 humana. Entre todos los transportadores cabe destacar la diferente especificidad de sustrato que muestran cada uno de ellos, poniendo el foco especialmente en los transportadores de la familia LAT que transportan aminoácidos neutros LAT1, LAT2 y Asc1. Estos han sido estudiados en más profundidad durante el desarrollo de esta tesis para arrojar luz a la relación entre la diferente especificidad de sustrato y la estructura del sitio de unión (conocido en inglés como *binding site*), pudiendo de este modo conocer las razones por las que son diferentes.

1.1.2.1. rBAT y sus subunidades ligeras

Los heterodímeros formados por la subunidad pesada rBAT se caracterizan por transportar aminoácidos neutros y básicos de una manera sodio-independiente (Bertran *et al.*, 1992; Tate *et al.*, 1992; Wells y Hediger, 1992).

El transportador formado por rBAT/b⁰⁺AT forma heterotetrámeros de forma estable como un dímero de heterodímeros (Wu *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2020a) y se expresa mayoritariamente en el lado apical de las células epiteliales del túbulo renal proximal (Fernández *et al.*, 2006) y del intestino delgado (Bertran *et al.*, 1992, Yan *et al.*, 1992). Actúa como un intercambiador electrogénico de aminoácidos catiónicos y L-cistina hacia el medio extracelular, y de aminoácidos neutros (excepto iminoácidos) hacia el medio intracelular (Bertran *et al.*, 1992; Busch *et al.*, 1994; Chillarón *et al.*, 1996; Pfeiffer *et al.*, 1999). La dirección es dirigida por la alta concentración intracelular de aminoácidos neutros o la baja concentración intracelular de cistina, así como por el potencial eléctrico que cruza la membrana plasmática.

Debido a la relevancia de rBAT/b⁰⁺AT en la reabsorción de cistina en el riñón (Fernández *et al.*, 2002), una mutación en cualquiera de las subunidades desemboca en la más común de las aminocidurias primarias, la cistinuria (Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) database, entry 220100) (Calonge *et al.*, 1994; Feliubadalo *et al.*, 1999, Chillarón *et al.*, 2010). La cistinuria produce la hiperexcreción de aminoácidos dibásicos (lisina, arginina y ornitina) y cistina en la orina, pudiendo llegar a producir cálculos renales (urolitiasis), que causan a su vez obstrucción, infección y enfermedad crónica renal (Chillarón *et al.*, 2010).

Recientemente ha sido publicada la estructura de este dímero de heterodímeros a una resolución de 3,4 Å (Wu *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2020a), confirmándose la estructura descrita mediante estudios bioquímicos (Fernández *et al.*, 2006).

El segundo heterodímero formado por esta subunidad pesada es rBAT/AGT-1 que es un intercambiador sodio-independiente de aminoácidos aniónicos con una gran afinidad por el L-aspartato, L-glutamato y L-cistina (Nagamori *et al.*, 2016). La subunidad AGT1 comparte un 35 - 37% de identidad de aminoácidos con otros LATs y se localiza principalmente en la membrana apical de los túbulos rectos distal y proximal (Nagamori *et al.*, 2016, Matsuo *et al.*, 2002).

1.1.2.2. 4F2hc y sus subunidades ligeras

La proteína 4F2hc también es conocida como CD98 según el sistema de designación de antígenos CD (Haynes *et al.*, 1981; Quackenbush *et al.*, 1987) y como proteína reguladora de fusión, FRP-1 debido a su relación con los eventos de fusión celular que dirigen la multinucleación de células como en el caso de los osteocitos (Ohgimoto *et al.*, 1996; Suga *et al.*, 1997). Las isoformas humanas están formadas por unos 500 - 550 aminoácidos, su peso molecular es de unos 85 kDa y presenta cuatro sitios de glicosilación (Fairweather *et al.*, 2021).

Se localiza en la membrana celular de todo el organismo (Parmacek *et al.*, 1989; Nakamura *et al.*, 1999), pero se debe destacar su presencia en la membrana basolateral del intestino delgado y el epitelio renal. A diferencia de los heterodímeros formados por rBAT, los experimentos realizados con 4F2hc indican que forma heterodímeros únicos que no se asocian entre ellos (Fernández *et al.*, 2006), lo cual se ha visualizado recientemente con la estructura atómica de los transportadores humanos LAT1 (Lee *et al.*, 2019, Yan *et al.*, 2019), LAT2 (Yan *et al.*, 2020b) y xCT (Oda *et al.*, 2020).

No hay descritas mutaciones que afecten a la secuencia de 4F2hc, lo que sugiere que las mutaciones que pudieran darse fuesen letales en etapas embriogénicas tempranas. Tanto pudiera ser así que el silenciamiento de 4F2hc en ratones produce una implantación fetal en la placenta deficiente (Dominguez *et al.*, 2010) ocasionando letalidad embrionaria (Tsumura *et al.*, 2003).

Aunque la razón de su estudio se centra en su alta implicación en la función transportadora de las subunidades ligeras a las que se encuentra unida, también participa en eventos de migración, fusión y proliferación celular debido a su mediación en la señalización de las integrinas $\beta 1$ y $\beta 3$, (Feral *et al.*, 2005; Cantor *et al.*, 2009; Fogelstrand *et al.*, 2009). Del mismo modo, al asociarse a través de su dominio transmembrana puede inducir la proliferación (Cantor *et al.*, 2009), migración (Fogelstrand *et al.*, 2009) y adhesión celular (Prager *et al.*, 2007) por lo que resulta tener un rol adicional en cáncer y metástasis.

Según a qué subunidad ligera se encuentre 4F2hc asociado participará en diferentes tipos de transporte, por ello, según la especificidad de sustrato de las subunidades ligeras, estas se han clasificado por sistemas de transporte.

- El sistema de transporte y+L (Torrents *et al.*, 1998; Deves y Boyd, 1998) es llevado a cabo por los heterodímeros 4F2hc/y+LAT1 y 4F2hc/y+LAT2 que median el intercambio electro-neutral sodio-independiente de aminoácidos catiónicos (y+) y sodio-independiente de aminoácidos neutros grandes (L) (Chillarón *et al.*, 2001).
- El sistema Xc- se encuentra representado por 4F2hc/xCT (Sato *et al.*, 1999). Es un transportador sodio-independiente que actúa como un intercambiador electro-neutral de cistina aniónica desde el lado extracelular y del glutamato por el lado intracelular en una

relación estequiométrica de 1:1 (Bannai *et al.*, 1984; Makowske y Christensen, 1982; Sato *et al.*, 1999; Bassi *et al.*, 2001).

- El sistema Asc es un sistema de transporte sodio-independiente de aminoácidos neutros de cadena corta como por ejemplo glicina, alanina, serina, treonina y cisteína. Los heterodímeros cuyo transporte sigue este sistema son 4F2hc/Asc1 y Asc2 (este último no presente en humanos) (Pineda *et al.*, 1999; Fukasawa *et al.*, 2000).
- Y por último el sistema L que media el transporte de aminoácidos neutros de una forma sodio-independiente. Es un sistema de transporte presente en los intercambiadores LAT1 y LAT2 (pertenecientes a la familia SLC7). Este es el modo de transporte de la molécula BCH (ácido 2-aminobiciclo-(2,2,1)-heptano-2-carboxílico), un activador de la enzima deshidrogenasa del glutamato que posee un importante rol en la secreción de la insulina y que es empleado como inhibidor de estos transportadores (Mastroberardino *et al.*, 1998; Meier *et al.*, 2002) y que resulta ser un sustrato de baja afinidad de LAT1 (Wang *et al.*, 2015).

Una vez explicados los diferentes tipos de sistemas de transporte según la selectividad de sustrato pertenecientes a los transportadores heteroméricos de aminoácidos pasaré a explicar con mayor detalle cada uno de estos transportadores formados por 4F2hc enfocándonos en la importancia fisiológica y con ella, en las patologías asociadas.

4F2hc/ γ +LAT1

El transportador 4F2hc/ γ +LAT1 es un transportador que media el intercambio de aminoácidos dibásicos con aminoácidos neutros más un ion sodio con una estequiometría de 1:1:1 (Bröer y Palacin, 2011). Sin embargo, su afinidad por el sustrato en la región intracelular es menor que en la extracelular (Verrey *et al.*, 1999; Kanai *et al.*, 2000).

Se encuentra localizado en riñón, pulmón, intestino delgado, placenta y bazo, tanto en células epiteliales como móviles como monocitos y macrófagos (Torrents *et al.*, 1998; Pfeiffer *et al.*, 1999; Bröer *et al.*, 2000; Barilli *et al.*, 2010). En los casos del intestino delgado y del túbulo proximal renal (con una presencia descendente hacia la región axial) se localiza celularmente en la región basolateral de las células epiteliales (Torrents *et al.*, 1998; Pfeiffer *et al.*, 1999; Bauch *et al.*, 2003). Además, en las células que requieren aminoácidos catiónicos, como los macrófagos, 4F2hc/ γ +LAT1 media en su importación (*influx*) (Verrey *et al.*, 2004).

Se han descrito mutaciones que afectan a la correcta función del transportador γ +LAT1 que resultan en lisinuria con intolerancia a proteínas (LPI; OMIM database, entry 222700) (Borsani *et al.*, 1999; Torrents *et al.*, 1999). Es un tipo de aminoaciduria primaria con herencia autosómica recesiva que afecta a aminoácidos catiónicos, principalmente lisina, pero también a arginina y ornitina (Oyanagi y Nagao, 1998; Palacín *et al.*, 2001; Simell, 2002; Sebastio *et al.*, 2011). Como consecuencia de la mala absorción en el riñón, la orina presenta una alta concentración de estos aminoácidos (Palacín *et al.*, 2005) y a su vez resulta en una disminución de los niveles de aminoácidos dibásicos en el plasma que produce una disfunción en el ciclo de la urea que desemboca en hiperamonemia, aversión proteica y aciduria orótica (Mykkänen, *et al.*, 2000; Torrents *et al.*, 1998; Borsani *et al.*, 1999).

4F2hc/y+LAT2

En un principio el heterodímero 4F2hc/y+LAT2 muestra mucha similitud con 4F2hc/y+LAT1; es sodio-dependiente para aminoácidos neutros (Torrents *et al.*, 1998; Pfeiffer *et al.*, 1999; Kanai *et al.*, 2000) y tiene una afinidad por el substrato heterogénea entre ambos lados de la membrana plasmática. Su principal diferencia es que su actuación en el flujo de L-arginina por L-glutamina más un ion sodio cuenta con una mayor afinidad por la arginina situada en la región intracelular. Además, como diferencia de otros sistemas de transporte de glutamina, 4F2hc/y+LAT2 reconoce también aminoácidos neutros en presencia de sodio y catiónicos en ausencia de éste (Dye *et al.*, 2004).

También se diferencia del transportador 4F2hc/y+LAT1 en que, y+LAT2 se encuentra localizado en una mayor cantidad de tejidos como es el caso de cerebro, corazón, testículos, riñón, intestino delgado y glándula parótida (Bröer *et al.*, 2000). Debido a su distribución y función similar a 4F2hc/y+LAT1, se ha visto que en fibroblastos de pacientes de LPI, y+LAT2 compensa la acción del sistema +yLAT1 (Dall'Asta *et al.*, 2000).

4F2hc/xCT

Este transportador es un intercambiador electro-neutro y sodio-independiente que principalmente transporta hacia el medio extracelular cistina aniónica y hacia el medio intracelular glutamato con una estequiometría 1:1 (Bannai, 1984; Sato *et al.*, 1999; Bassi *et al.*, 2001). Debido a que la cistina actúa como antioxidante endógeno, es responsable del mantenimiento intracelular de la homeostasis redox al ser un sustrato en la síntesis del tripéptido de glutatión reducido GSH (Bannai 1984; Bannai y Tateishi 1986), por lo que la cistina y el transportador xCT tienen un importante rol fisiológico en la proliferación, el ciclo redox y la defensa celular antioxidativa (Reddy *et al.*, 2008; Seiler *et al.*, 2008).

xCT se expresa en células neuronales, macrófagos, fibroblastos, páncreas, hepatocitos y riñón (Sato *et al.*, 1999; Bassi *et al.*, 2001). Además, debido a su importancia para el GSH, se encuentra sobreexpresado en células que requieren de esta síntesis, desde macrófagos activados hasta varios cánceres como tumores malignos primarios cerebrales (gliomas), linfomas, sarcoma de Kaposi y cáncer pancreático (Sato *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2001; Huang y Ingber, 2005; Lo *et al.*, 2008; Seib *et al.*, 2011).

Por tanto, debido a la relación del transportador xCT con el ciclo redox, su acción es muy importante para las células tumorales, debido a su elevada tasa proliferativa y consumo de nutrientes. Esto produce un aumento de especies oxidativas de oxígeno (ROS) que resulta en estrés oxidativo activando en consecuencia un proceso de autofagia si no es activada la defensa antioxidativa (Lewerenz *et al.* 2013). Por ello, la sobreexpresión de xCT fomenta un incremento de la síntesis de glutatión (Takeuchi *et al.*, 2013) siendo un evento común en las células tumorales.

En este sentido, hace unos años se observó que la inhibición de 4F2hc/xCT estaba relacionada con un tipo de muerte celular, llamada ferroptosis (Dixon *et al.*, 2014), a través de la inducción de p53 por lo que, además, es un tipo de defensa supresora de tumores (Jiang *et al.*, 2015).

En el caso contrario, una pérdida de función de xCT conlleva a un estrés oxidativo y excitotoxicidad. Ambos fenómenos son muy importantes en la enfermedad de Parkinson, pero la excitabilidad también tiene consecuencias en el comportamiento debido al transporte de glutamato. Se ha encontrado cierta relevancia de xCT en la memoria espacial y su inactivación disminuye la susceptibilidad a las convulsiones epilépticas (De Bundel *et al.*, 2011).

Una de las causas exógenas que producen la baja actividad del transportador xCT es el consumo crónico de cocaína en donde se reduce el nivel extracelular del glutamato que a su vez reduce la estimulación extrasináptica causando recaída en la adicción (Xi *et al.*, 2002a; Xi *et al.*, 2002b; Baker *et al.*, 2003; Kau *et al.*, 2008).

4F2hc/Asc1

El transportador 4F2hc/Asc1 transporta aminoácidos neutros de cadena corta de manera sodio-independiente como pueden ser glicina, L-alanina, L-treonina, L-cisteína, α -aminoisobutírico y β -alanina (Fukasawa *et al.*, 2000; Nakauchi *et al.*, 2000). El transportador Asc1 posee dos peculiaridades que le diferencian del resto de los HATs; por un lado que transporta D-isómeros de aminoácidos pequeños neutros como puede ser la D-serina con una afinidad aparente de 50 μ M (Fukasawa *et al.*, 2000; Nakauchi *et al.*, 2000) y, por otro lado, que es capaz de realizar un tipo de función de uniporter, de difusión facilitada por lo que no es un cambiador obligatorio como el resto de los HATs aunque sí que es su tipo de transporte preferente (Fukasawa *et al.*, 2000; Nakauchi *et al.*, 2000).

Se expresa en pulmón, músculo esquelético, corazón, riñón, intestino delgado, placenta, tejido adiposo y sistema nervioso central, siendo en estos dos últimos tejidos donde su estudio e implicación tiene más relevancia (Fukasawa *et al.*, 2000; Nakauchi *et al.*, 2000; Jersin *et al.*, 2021).

En el tejido adiposo actúa como un importante regulador de la resiliencia de los adipocitos al estrés oxidativo y de nutrientes, en parte al mejorar los niveles de glutatión y la respiración mitocondrial, lo que conduce a una disminución de la generación de ROS, acumulación de lípidos, hipertrofia de adipocitos, resistencia a la insulina y diabetes tipo 2 (Jersin *et al.*, 2021). En el sistema nervioso central la proteína Asc1 se expresa extensamente, pero se concentra en abundancia en los terminales pre-sinápticos, donde actúa como un transportador neuronal al ser capaz de regular la concentración de D-serina y glicina en el espacio sináptico (Helboe *et al.*, 2003; Rutter *et al.*, 2007).

Los aminoácidos D-serina y glicina son co-agonistas de los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) (Helboe *et al.*, 2003); de este modo 4F2hc/Asc1 es capaz de controlar la activación sináptica (Hashimoto y Oka, 1997, Sason *et al.*, 2017). La hipofunción de los receptores de NMDA puede ser la base del deterioro cognitivo de la esquizofrenia, mientras que su sobreactivación conduce a excitotoxicidad.

Los ratones con ablación génica de Asc1 muestran una reducción de la concentración de glicina en cerebro, que se asocia con una alteración de la transmisión inhibitoria glicinérgica en la médula espinal y el tallo cerebral, dando lugar a hiperekplexia (Xie *et al.*, 2005; Rosenberg *et al.*, 2013; Safory *et al.*, 2015; Ehmsen *et al.*, 2016).

Con estas observaciones, se han realizado estudios en las que se ha visto que la modulación de Asc1 podría ser una diana terapéutica para aliviar los mecanismos asociados al envejecimiento cognitivo, entre los cuales se encuentra la desregulación de la homeostasis de D-serina en el espacio sináptico y que causa fallo en la transmisión del impulso (Billard *et al.*, 2018). En estos casos la sugerencia es activar selectivamente Asc1 mediante D-isoleucina (Billard *et al.*, 2018), pero en los casos contrarios, el bloqueo de Asc1 ya se propuso como estrategia terapéutica para tratar los déficits cognitivos derivados de la esquizofrenia (Yang y Svensson, 2008).

4F2hc/LAT1

El heterodímero formado por la subunidad pesada 4F2hc y la subunidad ligera LAT1 es un intercambiador sodio-independiente con una estequiometría 1:1 que transporta principalmente aminoácidos neutros grandes y aromáticos como L-leucina, L-isoleucina, L-tirosina y L-triptófano (Mastroberardino *et al.*, 1998; Meier *et al.*, 2002). Posee una afinidad menor por aquellos substratos situados en la región intracelular que por los situados en la región extracelular, lo que sugiere que la velocidad de transporte viene regulada por la concentración intracelular de aminoácidos (Meier *et al.*, 2002).

LAT1 se expresa en, y en orden de nivel de expresión descendente, placenta, cerebro, bazo, testículos, ovarios, colon, y tejido óseo marrón (Kanai *et al.*, 1998; Segawa *et al.*, 1999). Adicionalmente LAT1 transporta hormonas tiroideas adquiriendo por ello una importante función en placenta (Ritchie y Taylor, 2001; Kinne *et al.*, 2011), L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) en la barrera hematoencefálica (Kageyama *et al.*, 2000), L-leucina en la barrera hemato-retinal (Tomi *et al.*, 2005) y BCH que actúa como inhibidor (Mastroberardino *et al.*, 1998; Meier *et al.*, 2002).

Entre las patologías asociadas a la mala función del heterodímero 4F2hc/LAT1 se encuentra el autismo, asociado a mutaciones de LAT1, y el cáncer, asociado a la sobreexpresión de LAT1.

Las células tumorales requieren un continuo y acelerado suministro de oxígeno y nutrientes para mantener su tasa de proliferación alta; siendo los aminoácidos uno de los nutrientes más esenciales para la proliferación de estas células con crecimiento anormal (Shchors y Evan, 2007). El transportador 4F2hc/LAT1 ya sido encontrado sobreexpresado en numerosos tipos de cáncer primario y metástasis de pulmón, colon, mama, próstata, cerebro y ovarios, así como en gliomas (Wolf *et al.*, 1996; Yanagida *et al.*, 2001; Fuchs y Bode, 2005; Kaira *et al.*, 2008; Kobayashi *et al.*, 2008). Adicionalmente se han encontrado correlaciones entre la sobreexpresión de 4F2hc/LAT1 con tumores malignos, proliferación celular, angiogénesis y metástasis (Fuchs y Bode, 2005; Kaira *et al.*, 2008; Kaira *et al.*, 2009; Kaira *et al.*, 2011), por lo que LAT1 se puede emplear como marcador de diagnóstico y diana terapéutica.

La implicación de 4F2hc/LAT1 en el cáncer se debe a la estimulación de la proteína mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) (Nicklin *et al.*, 2009), una proteína quinasa de serina y treonina que controla procesos como el crecimiento celular, la proliferación y la supervivencia (Sengupta *et al.*, 2010). El transporte coordinado de aminoácidos ramificados neutros a través de LAT1 y de la acumulación de glutamina en la región intracelular por ASCT2 activa la vía de señalización de mTOR (Nicklin *et al.*, 2009). La sobreexpresión de 4F2hc/LAT1 en células tumorales se ha encontrado coordinada en conjunto con la sobreexpresión del transportador de glutamina y aminoácidos neutros pequeños ASCT2 (Fuchs y Bode, 2005) y cuya estructura ha sido resuelta recientemente (Garaeva *et al.*, 2020).

Por tanto, debido al relevante rol que posee el transportador LAT1 en el crecimiento tumoral y la metástasis, numerosas terapias génicas tienen como objetivo esta proteína, ya sea por la internalización de drogas como la inhibición del propio transportador (del Amo *et al.*, 2008). Algunos de estos ejemplos son el BCH (Yamauchi *et al.*, 2009; Fan *et al.*, 2010; Imai *et al.*, 2010; Kaira *et al.*, 2013), la hormona T3, el melphalan, el JPH203 y el KYT-0353 (Kim *et al.*, 2008), los cuales inhiben el crecimiento de las células tumores a través de la inhibición de LAT1.

Además, al participar LAT1 en el reciclaje de glutamato cerebral, un mal funcionamiento estaría relacionado con enfermedades cerebrales (García-Cazorla *et al.*, 2014) como la pérdida de función en la vía catabólica de los aminoácidos de cadena ramificada en LAT1 que causa trastornos del espectro autista (García-Cazorla *et al.*, 2014; Tarlunganu *et al.*, 2016). En este sentido, las variantes encontradas en LAT1 se han asociado recientemente con un mayor riesgo de trastorno del espectro autista, probablemente a través de la restricción de aminoácidos esenciales durante el desarrollo cerebral (Cascio *et al.*, 2020).

4F2hc/LAT2

El heterodímero formado por la subunidad pesada 4F2hc y la subunidad ligera LAT2, como 4F2hc/LAT1, es un cambiador obligatorio sodio-independiente que posee una alta afinidad por aminoácidos neutros incluso pequeños como L-alanina, L-cisteína, L-serina y en menor medida, glicina, por lo que transporta mayor variedad de sustratos que LAT1 (Pineda *et al.*, 1999; Rossier *et al.*, 1999; Meier *et al.*, 2002). Al igual que LAT1, muestra una afinidad de sustrato del rango de milimolar en la región intracelular y micromolar en la zona extracelular (Meier *et al.*, 2002).

Del mismo modo, aunque 4F2hc/LAT2 no presenta una localización ubicua y su expresión característica es en el intestino delgado y riñón, también se encuentra a bajo nivel y con una localización muy precisa en placenta, plexo coroideo, astrocitos y células mieloides del cerebro, cóclea del oído, cuerpo ciliar del ojo, hígado, bazo, músculo esquelético, corazón y pulmones, y en menor medida en próstata, testículos, ovarios e hígado fetal (Pineda *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2005). Además, al situarse en la cara basolateral de las células epiteliales renales (presencia gradual, mayor en el túbulo proximal y menor a medida que se convierte en distal) y del intestino delgado (presencia homogénea a lo largo de toda su longitud) tiene un papel importante en la absorción de aminoácidos en estos tejidos (Rossier *et al.*, 1999; Vilches *et al.*, 2018).

Sin embargo, a pesar de su presencia e importancia en las células renales, una deficiencia de este transportador no ocasiona una mala reabsorción de aminoácidos neutros. Los ratones con ablación de LAT2 presentan un crecimiento y desarrollo normal lo que sugeriría que hay una compensación funcional por parte de otros transportadores ante la falta de LAT2 evitando el desarrollo de deficiencia de aminoácidos neutros (Braun *et al.*, 2011, Vilches *et al.*, 2018). Esta compensación también ha sido observada en cultivos celulares donde una anomalía en la expresión de 4F2hc/LAT2 no produce ninguna alteración en el transporte de L-cisteína (Bauch *et al.*, 2003; Fernández *et al.*, 2003).

Sin embargo, recientemente han salido a la luz varios artículos que relacionan la disfunción de LAT2 con varias patologías como las cataratas y la sordera asociada a la edad (ARHL por sus siglas en inglés *Age Related Hearing Loss*), y en los cuales ha colaborado el laboratorio.

La ausencia de LAT2, y únicamente junto a la simultánea ausencia de TAT1, incrementa la incidencia de cataratas en ratones (Knöpfel *et al.*, 2019). LAT2 se localiza en el cuerpo ciliar del ojo (en la doble capa de epitelio ciliar), que junto a la misma ubicación de TAT1, sugiere que su ausencia altera la homeostasis de aminoácidos neutros en la lente. Ello muestra que estos transportadores pueden considerarse un factor de riesgo de formación de cataratas (Knöpfel *et al.*, 2019). Además, en pacientes humanos se ha encontrado una mutación (mutación por desplazamiento de marco de lectura) que reduce enormemente el transporte de aminoácidos neutros grandes (Knöpfel *et al.*, 2019).

Del mismo modo que LAT1, en la proteína LAT2 humana también se han encontrado ciertas variantes (Pro 16 Arg, Gly 18 Trp y Ser 29 Phe) que han sido asociadas con un mayor riesgo de trastorno del espectro autista, probablemente a través de la restricción de aminoácidos esenciales durante el desarrollo cerebral (Cascio *et al.*, 2020).

Por otro lado, también se ha observado que ratones con falta de LAT2 sufren daño en las partes sensoriales del oído interno que desemboca en sordera (Espino-Guarch *et al.*, 2018). Según el *Atlas Allen* del cerebro, LAT2 se localiza en las regiones de subplaca cortical, cerebelo, tálamo y bulbo olfatorio, además de en la membrana plasmática de los axones neuronales del plexo coroideo, del órgano subfornical, la corteza cerebral y el hipotálamo (Espino-Guarch *et al.*, 2018). La falta de LAT2 no afecta al aprendizaje ni a la memoria, sí afecta a la coordinación motora en ratones con silenciamiento de LAT2 (Espino-Guarch *et al.*, 2018).

La sordera asociada a la edad es provocada por un conjunto de factores ambientales y genéticos, y estando LAT2 localizado en el ligamento y el limbo espirales de la cóclea, estructuras que se encuentran alteradas en ausencia de LAT2, se sugiere cierta implicación de este transportador en la pérdida auditiva (Espino-Guarch *et al.*, 2018). Se han encontrado diferentes mutaciones de LAT2 en pacientes con ARHL (Val 460 Glu, Thr 402 Met, Val 302 Ile y Arg 418 Cys) que producen un descenso en la actividad transportadora de LAT2 (Espino-Guarch *et al.*, 2018).

Y no tanto como la implicación y sobre-regulación que presenta LAT1, pero también ha sido demostrado que existe un rol por parte de LAT2 en el crecimiento tumoral, ya que transporta glutamina con una afinidad aparente en el rango micromolar y con ello regula la activación de mTOR vía dependiente de esta activando así la glucólisis (Scalise *et al.*, 2020).

Para poder realizar un estudio funcional que nos permita esclarecer los aspectos y las razones por las cuales un grupo de proteínas de la misma familia son capaces de discernir entre pequeños cambios dentro de un grupo de sustratos para así transportar unos y no otros; no solo vale con realizar comparaciones de secuencia de aminoácidos o modelaje a partir de homólogos cuya estructura ya ha sido resuelta. Resulta fundamental conocer a nivel atómico la estructura de las proteínas cuya selección de sustrato queremos explicar, cuyos mecanismos de transporte queremos conocer. Por ello, la biología estructural resulta esencial, junto con otras aproximaciones multidisciplinarias, para profundizar en el conocimiento de estas proteínas, ya que como se dice, la estructura determina la función.

1.2. BIOLOGÍA ESTRUCTURAL

Conocer la estructura de las moléculas a un nivel cuasi-atómico permite visualizar las hélices α , las distancias de interacción entre cadenas β , las densidades de lazos o bucles (*loops*), las cadenas laterales voluminosas de los residuos, así como el patrón en zigzag de los carbonos α separados (Yu *et al.*, 2008). No obstante, no es hasta alcanzar la resolución atómica donde se empieza a conocer la disposición de cada aminoácido, la existencia de los puentes de hidrógeno y otros enlaces covalentes entre los diferentes dominios proteicos y que son esenciales para poder entender cómo

una mutación alejada del sitio de unión al sustrato causa patología. Es más, bajo esta resolución incluso se puede visualizar el espacio exacto que dejan los aminoácidos entre ellos para formar el sitio de unión al sustrato, lo que permite entender por qué un transportador es capaz de transportar aminoácidos pequeños, pero no grandes, por ejemplo.

Dentro de la biología estructural existen varias técnicas que permiten conocer la disposición de los elementos que forman las moléculas, las más extensamente empleadas son la resonancia magnética nuclear (NMR por sus siglas en inglés *Nuclear Magnetic Resonance*), la cristalografía por rayos X y la criomicroscopía electrónica (crio-ME o *cryo-EM* por sus siglas en inglés), y que, según los objetivos y limitaciones de cada estudio será recomendable usar una u otra.

1.2.1. Metodologías de resolución estructural

La difracción de rayos X y la resonancia magnética nuclear fueron las primeras técnicas empleadas para resolver estructuras atómicas y hasta hace pocos años han sido las técnicas más resolutivas (Ferentz y Wagner, 2000; Guntert, 1998; Smyth y Martin, 2000). Sin embargo, cuentan con ciertas limitaciones que impiden que puedan ser utilizadas para resolver la estructura de cualquier tipo de muestra, ya sea por dificultad biológica o por dificultad técnica.

Por ejemplo, las complicaciones que muestra la cristalografía van desde la dificultad en la producción de cantidades suficientes (ME necesita alrededor de 0,1 mg) hasta la formación de cristales 3D de estructuras con segmentos con flexibilidad intrínseca y que impidan su cristalización. Por ello, la cristalografía no es una técnica recomendable para grandes complejos (Berman *et al.*, 2012; Velankar *et al.*, 2012). Por su lado, la espectroscopía de NMR también se encuentra limitada por el tamaño de las moléculas bajo estudio que debe ser bajo (≤ 50 kDa).

Con todo ello, la técnica que actualmente se encuentra en creciente auge es la crio-ME ya que al ser diferentes sus requerimientos y puntos fuertes permite poder resolver estructuras de moléculas biológicas que no se consideraban aptas para el estudio a través las dos técnicas anteriores.

La cantidad de proteínas resueltas por crio-ME de los últimos 5 años resulta ser diez veces superior a los 5 años anteriores (RCSB PDB febrero 2021). Se han producido una serie de mejoras técnicas para que actualmente sea la microscopía electrónica una de las técnicas más usadas para resolver estructuras (Fernández-Leiro y Scheres, 2016). A pesar de las grandes expectativas que alberga, como en las técnicas anteriores, la crio-ME también requiere que se cumplan una serie de condiciones para poder alcanzar una resolución alta.

1.2.1.1 Revolución de la resolución:

En los últimos años se han mejorado aspectos fundamentales, desde la preparación de muestras hasta los microscopios, los detectores y el software de procesamiento de imágenes.

Las primeras observaciones de las muestras con ME se realizaron mediante tinción negativa, donde el agua es reemplazada por una solución seca de sal de un metal pesado. La resolución de este método está limitada por el tamaño del grano (Brenner y Horne, 1959), por lo que una de las mejoras más sustanciales ha sido el uso de la criogenización, en donde la muestra se encuentra en un estado

cercano al nativo al estar embebido en hielo amorfo (no cristalino). La criogenización consiste en una congelación instantánea de la muestra en etano líquido a temperaturas de nitrógeno líquido.

Además, el voltaje de aceleración, la fuerza en la que se lanzan los electrones a la muestra, aumentó de 120 kV a 300 kV y los cañones de electrones de emisión termoiónica fueron reemplazados por cañones de emisión de campo.

Otra de las mejoras más sustanciales fue el aumento de la estabilidad temporal del haz de electrones mediante una disminución de la temperatura de los cátodos de la fuente de electrones, que junto a la mejora del estado de vacío alrededor de las muestras congeladas, redujo la contaminación del hielo por electrones de baja calidad y permitió la recopilación de datos durante días en lugar de horas. De este modo, se permitió tomar una cantidad de imágenes por preparación mucho mayor, especialmente ahora que se trabaja con la adquisición automática de imágenes y las “películas”.

Asimismo, otro de los puntos clave para el desarrollo de la crio-ME fueron los detectores de electrones de nueva generación, capaces de obtener información con una velocidad y sensibilidad sin precedentes (Kühlbrandt, 2014). Las primeras imágenes ME se grabaron en película fotográfica, ahora se toman con cámaras de dispositivo de carga acoplada (CCD). Estas cámaras funcionan bien a energías bajas, sin embargo, su eficiencia cuántica de detección (DQE) disminuye a energías más altas, produciendo ruido en la señal recibida que finalmente produce una disminución de la resolución del mapa de densidad 3D. Las actuales cámaras comerciales tienen un DQE mucho más alto que las cámaras de película y CCD, por lo que alcanzan una alta relación señal / ruido y pueden detectar eventos individuales de electrones de 300 kV (McMullan *et al.*, 2014).

A su vez los detectores de electrones directos pueden integrar electrones continuamente sin ningún paso de conversión adicional, almacenando y procesando fotogramas individuales que forman una "película". De hecho, trabajar con "películas" provocó más desarrollos como la alineación de fotogramas de películas individuales que mejora la relación señal / ruido de partículas individuales y que explica parcialmente su movimiento inducido por el haz (Brilot *et al.*, 2012, Campbell *et al.*, 2012).

El enorme avance en este campo durante los últimos años se ha caracterizado por el término “Revolución de resolución” (Kühlbrandt *et al.*, 2014). Gracias a todo ello, la microscopía electrónica está empezando a ocupar un lugar muy importante dentro del campo y sus grandes capacidades han sido reconocidas con el Premio Nobel de Química del año 2017 a Jacques Dubochet, Joachim Frank y Richard Henderson por todo este progreso (<https://www.bbc.com/mundo/noticias-41497242>).

Todo este progreso mencionado en la técnica de microscopía electrónica permite obtener altas resoluciones no quedándose atrás en comparación con las otras técnicas de biología estructural mencionadas. No obstante, en el mismo sentido que las otras técnicas, es muy importante cumplir ciertos requerimientos o factores para alcanzar la máxima resolución a partir de los datos de crio-ME (Grigorieff y Harrison, 2011; Hryc *et al.*, 2011; Zhou, 2008; Zhou, 2011):

- La muestra biológica: Aunque no es tan decisivo como para la formación de cristales para difractarlos con rayos X, el material bajo estudio debe ser estructuralmente homogéneo. El procesamiento de las imágenes consiste en identificar las características estructurales de la muestra a partir de un promedio de miles de imágenes de partículas, que cuanto más idénticas, mejor será el promedio. Más bien, la homogeneidad estructural de la muestra resulta ser más

importante que su nivel de pureza; las impurezas pueden ser fácilmente identificadas y eliminadas, pero los pequeños cambios estructurales en una misma molécula resultan mucho más difíciles computacionalmente de identificar.

Estos cambios suelen ser debidos a problemas de estabilidad de la muestra, sometimiento a procesos bruscos que pueden modificar parcialmente la estructura como pueden ser la ultracentrifugación o la congelación-descongelación. La posible flexibilidad de la muestra que ocasiona que ciertos dominios presenten diferente posición respecto al centro de la molécula también reduce la capacidad de esta técnica por resolverlos. Es muy común en proteínas de membrana, por ejemplo, que los extremos terminales no sean resueltos ya que su posición respecto al cuerpo transmembranal no está conservada entre las partículas al ser zonas libres.

- Las condiciones de adquisición en crio-ME: Las grandes mejoras técnicas y de instrumentación incorporada en los microscopios electrónicos permiten trabajar no solo con fuentes de electrones más fuertes y estables, sino que la mejora de los propios brazos donde las muestras son colocadas aumenta la resolución obtenida de las muestras analizadas evitando factores que limitan la resolución atómica.

El propio proceso de toma de imágenes es altamente importante para que la muestra sea captada con el máximo contraste posible, con baja relación señal / ruido. Por ello, para obtener imágenes a alta resolución y con la muestra en buen estado se recomienda tomar las imágenes en condiciones próximas a foco y con la mínima dosis de electrones (dosis altas queman la muestra en pocos segundos).

- La optimización y desarrollo de herramientas de modelado atómico con mapas derivados de crio-ME: Antes de comenzar el modelado atómico, para poder alcanzar una resolución lo más alta posible, cuando el proceso de resolución se encuentra a resoluciones medias (cuasi-atómicas) hay que realizar una serie de correcciones y estimaciones. Entre ellas se encuentran: estimar empíricamente un factor B para evaluar características estructurales como el nivel de ruido, la continuidad de la cadena peptídica y las densidades de cadenas laterales, para así mejorar las características de alta resolución y evitar amplificar excesivamente el ruido intrínseco de las altas frecuencias.

Además, durante el refinamiento final de la estructura se pueden emplear modelos homólogos ya resueltos para ajustar las densidades, aunque también existen métodos de modelado adaptados a las características de los mapas de densidad de crio-ME (Baker *et al.*, 2010; Ju *et al.*, 2007).

1.2.2. Relevancia del estudio estructural de los HATs

Durante esta tesis me he centrado en el estudio de un tipo de transportadores de membrana, pero antes de explicar la importancia que tiene conocer la estructura de estas proteínas en particular me gustaría dar una visión más amplia de estos dentro de este campo de estudio, la biología estructural.

Del total del proteoma de una célula eucariota, la importancia de las proteínas de membrana no solo radica a que corresponden a un tercio de él (Krogh *et al.*, 2001); cada una de ellas posee funciones diferentes, específicas y esenciales para el correcto funcionamiento celular y además contribuyen a la especificación de cada célula. No obstante, para darles la importancia que se les debe también hay

que destacar que, al situarse en la zona límite que separa lo que es la célula de todo el exterior y que, al actuar como reguladoras de entrada y salida de solutos, son la principal diana de estudio para el desarrollo de tratamientos.

Las proteínas transportadoras son dianas terapéuticas no solo para encontrar la forma más eficiente para que cierta droga penetre al interior de las células donde debe ejercer su acción de forma específica, sino que también son responsables directas de varias y severas enfermedades desarrolladas a partir de la incorrecta función o desregulación de ellas mismas y que por tanto también actúan como dianas para tal tratamiento (Sanders y Myers, 2004).

Por tanto, las proteínas de membrana han sido establecidas como la diana terapéutica más extendida, son el objetivo de hasta dos tercios de los estudios terapéuticos actuales (Hediger *et al.*, 2013). Sin embargo, esta importancia dada no estaba aparejada con la información estructural que había de ellas; hasta hace pocos años era muy escasa. Desde 2015 el número de estructuras de proteínas de membrana se ha casi triplicado; habiéndose resuelto en los últimos 5 años 2.265 de un total de 3.544 estructuras depositadas en la base de datos, siendo más de 700 las resueltas durante el último año (RCSB PDB en febrero de 2021). Consideramos proteínas resueltas aquellas cuya resolución es inferior a 4,5 Å.

La escasez de estructuras de este tipo de proteínas se debía a la dificultad que tiene trabajar con ellas. Las proteínas de membrana, en comparación con las proteínas solubles, cuentan con segmentos hidrofóbicos, los cuales en su situación endógena se encuentran embebidos por lípidos. El requerimiento de lípidos por parte de estas proteínas conlleva una dificultad extra para la resolución estructural al complicar los procesos de sobreexpresión y purificación bajo unas condiciones de estabilidad adecuadas para realizar tal estudio estructural (Arinaminpathy *et al.*, 2009; Bill *et al.*, 2011).

Por ello, y aunque actualmente continúa siendo complicado su trabajo, es gratificante conocer cómo esta tendencia ha ido cambiando y cada año más proteínas de membrana son resueltas, gracias, entre otros motivos, a la revolución tecnológica y el gran progreso de técnicas como la criomicroscopía, la cual ha resuelto un total de 1.015 proteínas de membrana de 3.544 proteínas de membrana resueltas (RCSB PDB en febrero de 2021).

Muchas de las proteínas resueltas recientemente pertenecen a los transportadores SLC que anteriormente he presentado. Al principio, las proteínas resueltas pertenecientes a este grupo de transportadores eran proteínas procariontas, ya que daban mayor facilidad de trabajo que sus homólogos eucariotas. Estas estructuras fueron útiles modelos que permitieron comenzar a esclarecer varias incógnitas respecto al número de dominios transmembrana, la disposición entre ellos o las zonas claves que participan en el transporte, y que han ayudado al diseño de drogas a partir de la información estructural que aportaban.

Sin embargo, el modelado desde proteínas de organismos inferiores de baja identidad de secuencia con los homólogos humanos seguía siendo una herramienta escasa para conocer la información fundamental de proteínas de organismos superiores o humanas y llegar a entenderlas en profundidad.

Del mismo modo, las alteraciones de las proteínas descritas durante la primera mitad de la Introducción de esta tesis se encuentran asociadas a varias enfermedades genéticas; patologías que requieren de un estudio más directo para poder diseñar drogas que modifiquen la actuación o mala-

actuación de estos transportadores y así tratar tales enfermedades. Es fundamental tener por tanto los conocimientos estructurales a nivel atómico para el diseño dirigido de drogas que ayudaría en gran medida a encontrar agonistas o inhibidores que tuvieran un efecto terapéutico, así como mejorar la selectividad y especificidad de tales drogas no solo por la proteína diana sino también para mejorar la bio-disponibilidad de los fármacos que requieren ser transportados.

Por tanto, debido a la necesidad de conocer las estructuras directamente de las proteínas dianas y gracias a los grandes avances en las técnicas de resolución estructural, desde el inicio de la presente tesis hasta tres proteínas HATs han sido resueltas. El conocimiento estructural de estas proteínas a nivel atómico ha permitido empezar a desentrañar la forma de actuación de cada una de ellas. Efectivamente, se han comenzado a dar pasos en el entendimiento de su especificidad de función y su movimiento, y del mismo modo, en el entendimiento de la base molecular en la que se establecen las alteraciones funcionales que ocasionan las mutaciones encontradas, pero aún queda mucho por saber. El conocimiento individualizado de unos pocos miembros de esta familia no permite extrapolar tales saberes a todos los miembros, ya que, para poder entender la razón de la diferente especificidad de sustrato de cada uno de los ellos, estos se deben estudiar en conjunto.

1.2.3. Biología estructural de los HATs

Tras un periodo de tiempo en donde la información de los HATs escaseaba y se fundamentaba en el cristal del ectodominio de 4F2hc (Fort *et al.*, 2007) y homólogos bacterianos remotos como AdiC (Fang *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2010; Kowalczyk *et al.*, 2011) o más recientemente, el homólogo próximo, BasC (Errasti-Murugarren *et al.*, 2019) se ha alcanzado un periodo de tiempo extremadamente fructífero en la resolución de estructuras de los HATs. En estos dos últimos años de tesis han sido resueltas las estructuras de hasta tres transportadores de aminoácidos humanos a alta resolución, la última de las cuales, la resuelta también durante esta tesis 4F2hc/LAT2.

Aun así, aunque actualmente contemos con tres estructuras de la familia HAT, durante muchos años la escasa información que existía de los homólogos procariontes resueltos fue de gran utilidad. De cada uno de ellos se han extraído importantes conocimientos, tanto estructurales como funcionales; por ello he decidido comenzar la siguiente sección dándoles un pequeño espacio a estas estructuras que en el momento de su publicación tuvieron gran relevancia y que empezaron a arrojar luz sobre este tipo de transportadores antes de presentar las estructuras de 4F2hc/LAT1 y rBAT/b⁰⁺AT. Además, es muy importante destacar que hasta hace muy poco tiempo era necesario apoyarse en las estructuras de homólogos procariontes resueltos en otras conformaciones para poder entender el movimiento conformacional que permite el transporte de los aminoácidos, puesto que los HATs resueltos hasta ese momento presentaban una conformación abierta hacia dentro (*inward facing*), pero que actualmente se encuentra disponible la estructura de h4F2hc/LAT1 en conformación abierta hacia afuera (Yan *et al.*, 2021)

1.2.3.1. 4F2hc-ED

Hace más de 10 años fue resuelto en nuestro laboratorio a una resolución de 2,1 Å el ectodominio de 4F2hc (4F2hc-ED) (Fort *et al.*, 2007). La estructura de 4F2hc-ED muestra una gran similitud con las glucosidasas bacterianas como las α -amilasas en referencia a los dominios A y C, pero no en el caso

del dominio B ya que es la región catalítica de estas proteínas (Chillarón *et al.*, 2001; Fort *et al.*, 2007). El dominio A posee una estructura de tipo barril TIM ($\beta\alpha 8$ barrel), mientras que el dominio C (situado en la región C terminal) es de tipo lámina β (β -sheet) con 8 láminas antiparalelas (Pujadas y Palau, 2001), y el dominio B que está compuesto por largos bucles situados entre la tercera hebra y la tercera hélice del dominio A (Figura 3) (Fort *et al.*, 2007).

La estructura muestra que 4F2hc-ED se encuentra polarizado, mientras que la zona superior y las zonas laterales presentan en su mayoría residuos cargados negativamente, la región inferior posee residuos cargados positivamente (Fort *et al.*, 2007). Esta diferencia de carga, muy común en las proteínas integrales de membrana (McLaughlin y Aderem, 1995; Bhatnagar y Gordon, 1997; Conte y Matthews, 1998), podría indicar que esta región inferior estaría de cara a la capa extracelular de la membrana plasmática (hacia las cabezas polares de los fosfolípidos) y que además podría dirigir la interacción de 4F2hc con otras proteínas.

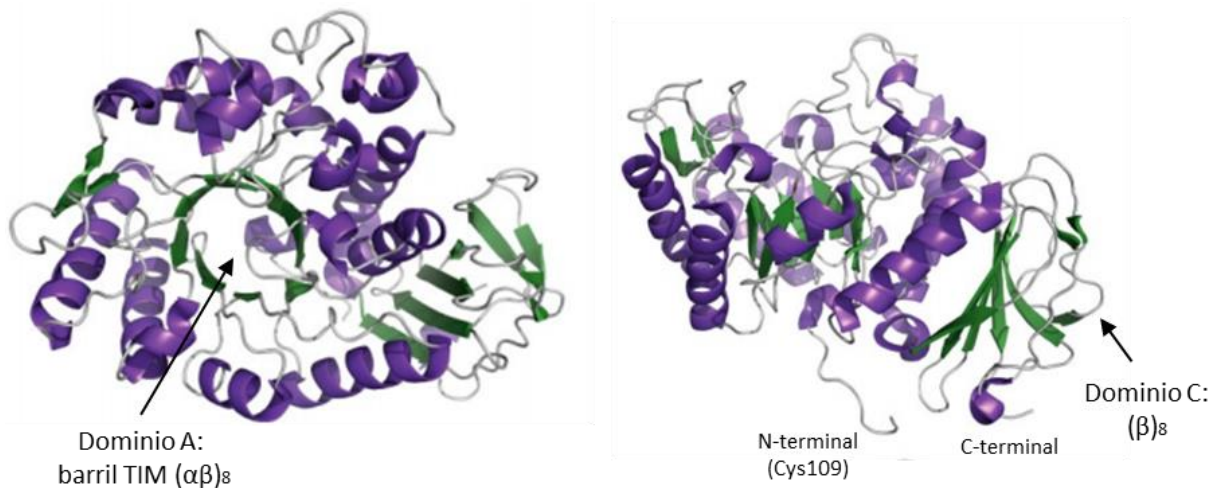


Figura 3: Estructura de 4F2hc-ED humano. A la izquierda hay una vista superior; y a la derecha una vista lateral. En morado están coloreadas las hélices α y en verde las láminas β . Imagen procedente de Fort *et al.*, 2007.

La proteína 4F2hc-ED fue cristalizada en forma de monómero (PDB 2DH2) y en forma de homodímero (PDB 2DH3) (Fort *et al.*, 2007). En un gel SDS-PAGE se observaba una banda de 190 kDa que corresponde a la homodimerización de 4F2hc cuando es sobreexpresado en diferentes cultivos celulares (Fort *et al.*, 2007). No obstante, no se ha encontrado este fenómeno ni en células normales ni en cáncer (Turnay *et al.*, 2011), lo que sugiere que se debe a la propia sobreexpresión. Además, esta banda es eliminada durante el tratamiento con DTT, lo que indica que esta homodimerización se debe a un puente disulfuro entre cisteínas.

En la formación de este puente no estaría implicada la Cys 109 (responsable de la heterodimerización con las subunidades ligeras) ya que este residuo no está localizado en la región del ectodominio, lo que a su vez sugiere por qué la mutación de esta cisteína no impide la formación del heterodímero y que por tanto debe haber otras interacciones implicadas en la heterodimerización (estas son ampliamente descritas más adelante).

Algo interesante que se encontró en la subunidad pesada 4F2hc, pero no en rBAT, es el dominio GxxxG o motivo de Engelman, que está implicado en la homodimerización de α -hélices transmembrana. Este motivo se encuentra altamente conservado, pero no parece que participe en la

unión con las subunidades ligeras (Russ y Engelman, 2000; Senes *et al.*, 2000; Senes *et al.*, 2004), más bien en las interacciones que posee 4F2hc con las integrinas, las cuales también poseen tal dominio (Feral *et al.*, 2005; Cantor *et al.*, 2009; Fogelstrand *et al.*, 2009).

A continuación, pasaré a describir varios ejemplos de estructuras de transportadores bacterianos, alguno de ellos homólogos de LATs humanos, detallando en cada caso la información estructural o funcional relevante que desveló cada estudio (Tabla 4).

Homólogos LATs	Co-cristalización	Resolución	Protein Data Bank (PDB)	Referencias
AdiC	Fab	3,2 Å	3NCY	Fang <i>et al.</i> , 2009
	-	4 Å	3LRC	Gao <i>et al.</i> , 2009
	L-arginina	3 Å	3L1L	Gao <i>et al.</i> , 2010
	L-arginina	3 Å	3OB6	Kowalczyk <i>et al.</i> , 2011
	L-agmatina	2,59 Å	5J4N	Jeckelmann <i>et al.</i> , 2016
ApcT	-	2,32 Å	3GIA	Shaffer <i>et al.</i> , 2009
GadC	-	3,1 Å	4DJK	Ma <i>et al.</i> , 2012
MhSt	L-Triptófano	2,1 Å	4US3	Malinauskaite <i>et al.</i> , 2014
	L-iso-leucina	3,1 Å	6YU2	Focht <i>et al.</i> , 2020
	L-Fenilalanina	2,25 Å	6YU3	Focht <i>et al.</i> , 2020
	4-L-Fenilalanina	2,25 Å	6YU4	Focht <i>et al.</i> , 2020
	L-Valina	2,60 Å	6YU5	Focht <i>et al.</i> , 2020
	L-Leucina	2,35 Å	6YU6	Focht <i>et al.</i> , 2020
	L-Tirosina	2,3 Å	6YU7	Focht <i>et al.</i> , 2020
GkApcT	L-Alanina	2,86 Å	5OQT	Jungnickel <i>et al.</i> , 2018
	L-Arginina	2,21 Å	6F34	Jungnickel <i>et al.</i> , 2018
AgcS	L-Alanina	3,24 Å	6CSE	Ma <i>et al.</i> , 2019

Tabla 4: Homólogos bacterianos remotos de LATs. Se muestran algunos ejemplos de transportadores bacterianos homólogos de los LATs, algunos son tratados más adelante.

1.2.3.2. LeuT

Una de las primeras estructuras resueltas que empezaron a resolver el paradigma que presentaban las subunidades ligeras pertenece a un homólogo procariota de la superfamilia APC, el cual realmente no es homólogo de los LATs, más bien de los transportadores de neurotransmisores. LeuT es un transportador de L-leucina dependiente de iones de sodio y cloro que solo comparte un 7% con los LATs estudiados en esta tesis, aunque a pesar de su baja identidad de secuencia fue importante su estudio debido a un punto común, que se componía de 12 dominios transmembrana.

A partir de ellos se observó una composición estructural común denominada repetición doblada inversa 5+5 (en inglés *5+5 inverted repeat fold*) o también conocido como plegamiento LeuT al ser descrito por primera vez en este transportador (Yamashita *et al.*, 2005). Esta disposición estructural corresponde a los 10 primeros TMs para los transportadores pertenecientes a la familia SLC7 (Bartocioni *et al.*, 2010).

Este punto común que se ha observado en todos los transportadores SLC7 resueltos hasta el momento, viene representado por una pseudosimetría desde la repetición situada en los TMs 1 - 5 y

la repetición situada en los TMs 6 - 10 en disposición inversa respecto a la primera (Figura 4) (Yamashita *et al.*, 2005). Muchas familias de transportadores secundarios muy separadas evolutivamente y que pueden llegar a compartir solo un 10% de identidad de secuencia presentan esta disposición tipo de pseudosimetría, lo que indica un origen evolutivo común. Esta disposición estructural permite a las proteínas que lo contienen una serie de estados de conformación relacionados con la simetría que promueve el transporte de los solutos a través del movimiento coordinados de tales dominios (Khafizov *et al.*, 2010).

Algunas de las proteínas que en las que se ha visto esta misma disposición son AdiC (intercambiador de arginina/agmatina) (Fang *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2010; Kowalczyk *et al.*, 2011); ApcT (transportador de aminoácidos H⁺-dependiente) (Shaffer *et al.*, 2009) GadC (intercambiador de glutamato/GABA) (Ma *et al.*, 2012), Mhp1 (transportador de benzoil-hidantoína) (Weyand *et al.*, 2008), CaiT (intercambiador de carnitina/γ-butirotetaina) (Tang *et al.*, 2010), BetP (transportador de betaína) (Ressl *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2012) y vSGLT (transportador de glucosa acoplado a sodio) (Faham *et al.*, 2008) entre muchos otros.

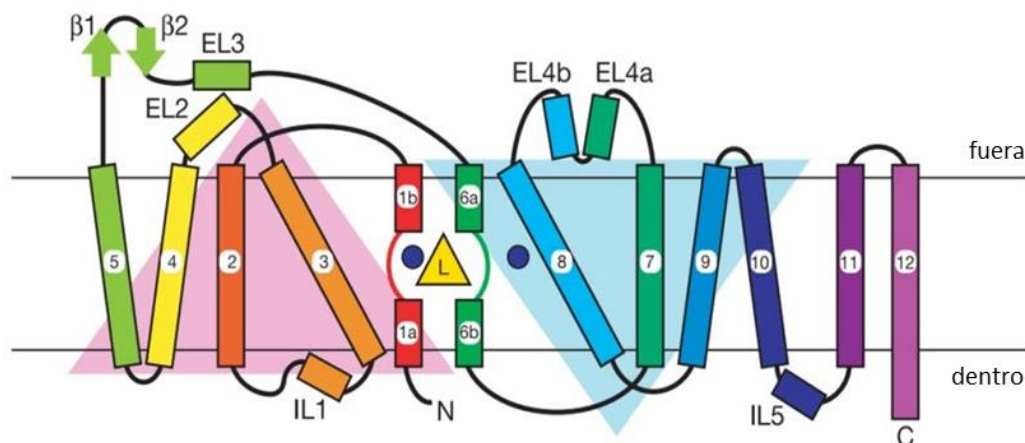


Figura 4: Representación esquemática de la disposición LeuT. Se observa la disposición en simetría inversa de los TMs 1 - 5 y los TMs 6 - 10. En la estructura tridimensional se han agrupado de diferente manera por el dibujo que forma su posición e inclinación; dominio *hash* formado por los TM3, TM4, TM8 y TM9 y dominio *bundle* compuesto por los TM1, TM2, TM6 y TM7, estando TM5 y TM10 conectados en cada lado del transportador. Los dos primeros dominios de cada repetición (TM1 y TM6) presentan un corte en las hélices, un desenrollamiento, una cavidad que tiene un papel clave en el reconocimiento y transporte de los solutos (conocida mayoritariamente como zona despejada, desenrollada o como es conocida en inglés, *unwound*).

Más adelante, otro estudio con esta misma proteína identificó los espacios dentro de la cavidad formada por los desenrollamientos de los TM1 y TM6 (conocidos como *unwound* en inglés) que eran claves para el reconocimiento y transporte de los solutos. Se identificaron el sitio de unión del sustrato primario (S1) y los dos sitios de unión del ion sodio (Na1 y Na2), ubicados entre los dominios denominados *hash* y *bundle* (Shi *et al.*, 2008). Posteriormente, se identificó un segundo sitio de sustrato alostérico (S2), asociado con un vestíbulo extracelular del transportador (Quick *et al.*, 2018; Fitzgerald *et al.*, 2019); actualmente ninguna proteína resuelta muestra un sustrato unido a este S2.

1.2.3.3. AdiC

AdiC es un intercambiador bacteriano de arginina/agmatina perteneciente a la subfamilia antiporter aminoácido/poliamina (APA) (Fang *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2010; Kowalczyk *et al.*, 2011) y por tanto dentro de los transportadores APC (Casagrande *et al.*, 2008) y que se ha utilizado como un sistema modelo (comparte un 18 - 19% de homología con los LATs humanos) para comprender el reconocimiento de aminoácidos en los transportadores de aminoácidos neutros grandes, como LAT1 (Geier *et al.*, 2013) y LAT2 (Rossel *et al.*, 2014, Krause y Hinz, 2017).

AdiC se expresa en la membrana plasmática en forma de dímero en donde facilita la importación de arginina desde el espacio extracelular, donde es descarboxilado por la enzima AdiA, lo cual requiere consumir un protón, para formar agmatina (Gong *et al.*, 2003; Iyer *et al.*, 2003).

La importancia de estudiar AdiC radicaba en que era el homólogo más cercano que había sido resuelto en una conformación distinta a la del resto; una conformación hacia fuera (*outward facing*), con y sin sustrato, tanto abierto como cerrado, permitiéndonos seguir esta parte del ciclo de transporte (Figura 5).

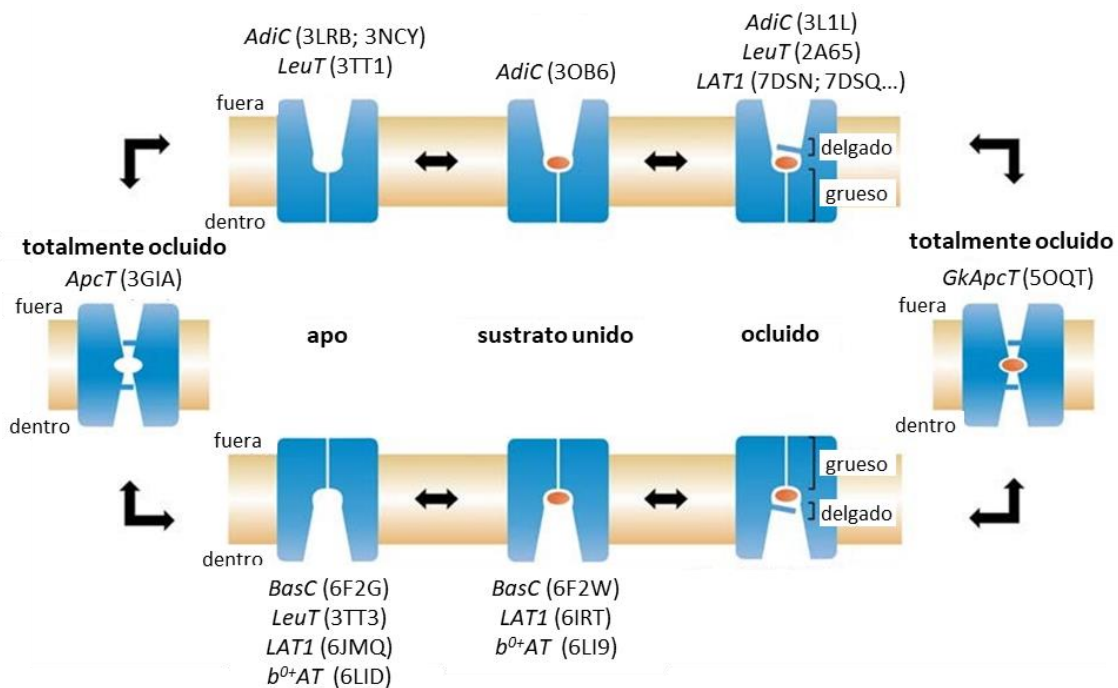


Figura 5: Estados de conformación a lo largo del ciclo de transporte de transportadores LATs y homólogos. Se muestra en cada caso las proteínas que dieron lugar a cada estado de conformación (junto al código PDB correspondiente). Entre los estados necesarios para que se produzca el mecanismo de transporte están y empezando desde arriba a la izquierda; abierto hacia fuera sin sustrato (cuando no hay sustrato se conoce como conformación apo), abierto hacia fuera con sustrato, abierto hacia fuera con sustrato y con la puerta externa cerrándose pero totalmente cerrado hacia dentro, totalmente cerrado (ambas puertas cerradas) con sustrato (derecha), cerrado con sustrato pero la puerta abriéndose hacia dentro, abierto hacia dentro y con sustrato, abierto hacia dentro sin sustrato, y por último, totalmente cerrado y sin sustrato (izquierda). Figura adaptada de Fotiadis *et al.*, 2013.

Gracias a las conformaciones en las que estaba resuelto AdiC (junto con otros transportadores resueltos), se aportaron ciertas ideas sobre el movimiento que deben de realizar los dominios transmembrana para que el transporte del sustrato se lleve a cabo, y en dónde existe una transición

que cierra la comunicación del vestíbulo del sitio de unión al sustrato con el espacio extracelular. Durante estos estudios resultó muy importante la observación de dos tipos de “puertas” que se formaban para separar el soluto tanto del lado extracelular como del intracelular, estos contactos son los cierres y aperturas del canal de transporte. La formación de esta fina puerta que produce el cierre que evita el traslado directo del sustrato a través de la membrana es inducido por el propio contacto del sustrato con el sitio de unión (Figura 5) (Kowalczyk *et al.*, 2011).

A partir de estas estructuras también se realizaron varios estudios sobre la selectividad de aminoácidos en AdiC, que sugieren que la selectividad de la arginina es impulsada por interacciones electrostáticas generales en el sitio de unión, y que por tanto la unión con el sustrato se debe a cargas positivas y negativas por parte de los residuos en el sitio de unión al sustrato (Tsai *et al.*, 2012).

1.2.3.4. GkApcT

GkApcT es un transportador de aminoácidos acoplado a protones, clonado desde *Geobacillus kaustophilus*, que se ha estudiado estructural y bioquímicamente revelando importantes conocimientos sobre el mecanismo de transporte. Fue resuelta en conformación abierta hacia dentro y cerrada en presencia de L-alanina y L-arginina, que se localizan dentro del sitio de unión debido a una puerta extracelular gruesa y una puerta intracelular delgada (Jungnickel *et al.*, 2018).

Al igual que otros miembros APC, GkApcT consta de 12 TMs que adoptan el pliegue canónico LeuT. Por tanto, los TM1 - TM5 y TM6 - TM10 están relacionados por un eje de pseudosimetría dentro del plano de la membrana, de los cuales, TM1 y TM6 presentan un desenrollamiento en el centro lo cual los divide en dos hélices discontinuas (1a, 1b y 6a, 6b) (Figura 6 - A). Las hélices adicionales, TM11 y TM12, se envuelven alrededor y hacia un lado del transportador (Jungnickel *et al.*, 2018).

Son las inclinaciones de los TM1a y TM6b los que determinan la conformación del transportador, un estado ocluido hacia adentro unido al ligando con el lado extracelular cerrado a través de interacciones entre los TM1 y TM6 contra los TM3, TM8 (puerta gruesa) y con el lado intracelular más abierto (puerta fina). Por el lado extracelular, la puerta gruesa se encuentra formada por las cadenas laterales aromáticas conservadas del TM6 (Phe 231) y del TM1 (Thr 43) (por el lado extracelular), mientras que la puerta delgada (lado intracelular) está formada principalmente a partir de cadenas laterales hidrófobas del TM8 (Met 321), el TM6a (Ile 234) y el TM3 (Glu 115) (Figura 6 - B) (Jungnickel *et al.*, 2018).

Dentro del sitio de unión, el grupo amino del ligando interactúa predominantemente con Phe 231, Ala 232 e Ile 234 del TM6 e Ile 40 del TM1; mientras que el carboxilo interactúa mediante enlaces polares con el TM1 (Thr 43 y Gly 44) (Figura 6 - C) (Jungnickel *et al.*, 2018). Adicionalmente, se produce una interacción adicional con una molécula de agua o con un ion de sodio que está unido en un pequeño bolsillo en la región desenrollada del TM1, pero que parece solo estabilizar la región (Jungnickel *et al.*, 2018).

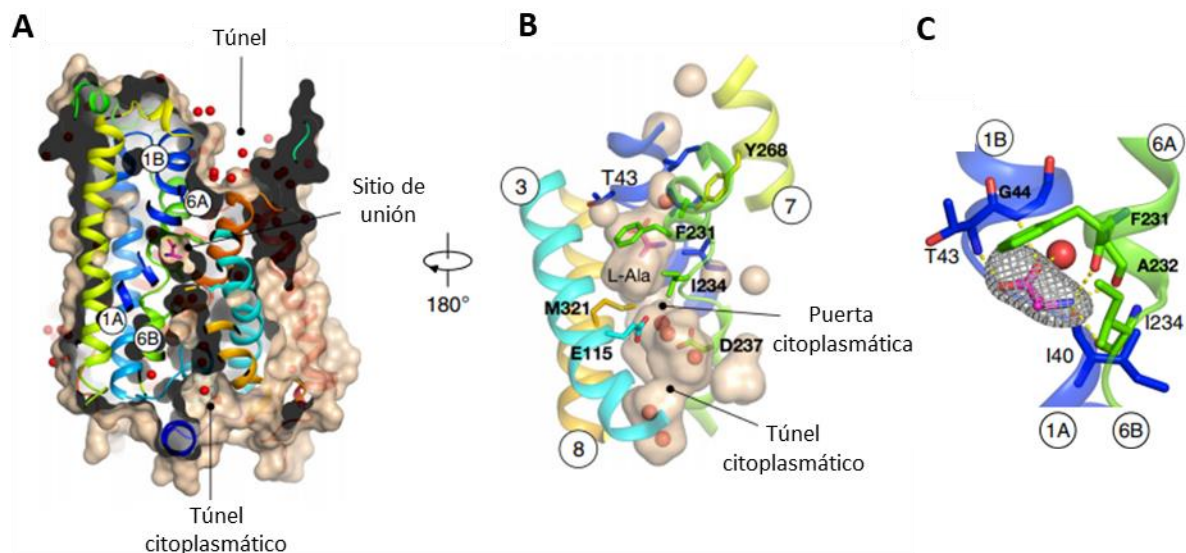


Figura 6: Estructura del sitio de unión al sustrato en GkApcT. A) Representación de la superficie molecular de GkApcT unido a L-alanina. B) Vista del sitio de unión mostrando moléculas de agua en el túnel citoplasmático (sombreado marrón) y la ubicación de la puerta delgada citoplasmática. C) Vista del sustrato L-alanina unido al sitio de unión. Imagen procedente de Jungnickel *et al.*, 2018.

Los transportadores dependientes de sodio poseen los sitios de unión Na1 y Na2, del modo que los iones de sodio estabilizan el transporte y así facilitan los cambios conformacionales, tal como había sido previamente descrito en el transportador ApcT (Shaffer *et al.*, 2009) y AdiC (Shi *et al.*, 2008). GkApcT contiene una lisina equivalente al sitio Na2 en el TM5, la Lys 191, por lo que se sugiere que esta posee ese papel estabilizador de la región desenrollada del TM1 durante el transporte (actuando como un sustituto del ion de sodio). Por el otro lado, la estructura mostraba una molécula de agua en el sitio donde se encuentra el sitio Na1, por lo que de nuevo podría estar sustituido la función del ion de sodio y coordinar la interacción entre el sustrato y el TM1 (Jungnickel *et al.*, 2018).

Estos resultados sugieren que los transportadores que son independientes al ion sodio poseen otros mecanismos, otros lugares equivalentes, para estabilizar y promover los movimientos de los dominios transmembranas (Jungnickel *et al.*, 2018).

Otro de los avances dados durante este estudio fue respecto a los mecanismos por los cuales los transportadores poseen diferente perfil de selectividad de sustrato. Las estructuras resueltas con sustrato revelan que se basa en restricciones estéricas en lugar de en la complementariedad de cargas (como sugerían los estudios en AdiC) (Jungnickel *et al.*, 2018). De esta manera se aclara cómo ha evolucionado la familia SLC7 para seleccionar subconjuntos específicos de aminoácidos.

Especularon que el reconocimiento de aminoácidos en GkApcT está mediado a través de interacciones de la cadena principal con los grupos α -carboxi y amino, que en el caso de este transportador actuaban para excluir aminoácidos más grandes (Jungnickel *et al.*, 2018). Realizaron ensayos de función con mutantes que aumentaban el tamaño del sitio de unión y observaron que sustratos más grandes eran transportados (Jungnickel *et al.*, 2018). Por tanto, ciertos cambios en el tamaño de la cavidad, de los residuos que la limitan podría provocar cambios estructurales en el TM8, que a su vez podrían alterar el empaquetamiento de TM6b y TM3 afectando al perfil de selectividad de sustrato.

1.2.3.5. BasC

En el estudio estructural de homólogos de las subunidades LATs procariontas surgió el intercambiador bacteriano de alanina-serina-cisteína (BasC). Este transportador, procedente de *Carnobacterium*, muestra una identidad de secuencia del 26 - 28% con los LATs humanos respecto al 14 - 22% de los anteriores homólogos cristalizados.

La identidad de secuencia, junto a las características de transporte, indican que BasC pertenece a la familia LAT (Bartoccioni *et al.*, 2019). Por ello, resulta ser un modelo útil para estudiar los mecanismos moleculares de los LATs y junto a ello, descifrar las mutaciones patológicas que afectan a los homólogos humanos, así como para el diseño de moléculas inhibitoras.

Las estructuras fueron obtenidas a partir de la cristalización de BasC con un nanocuerpo anti-BasC (Nb74) que reconoce la región intracelular, en ausencia (PDB 6F2G) y presencia (PDB 6F2W) del análogo de aminoácido 2-AIB y que presentan una resolución de 2,9 y 3,4 Å, respectivamente (Errasti-Murugarren *et al.*, 2019).

Al igual que las subunidades ligeras resueltas previamente, la arquitectura general del transportador presenta 12 hélices transmembrana dispuestas en el típico plegamiento LeuT de la superfamilia APC con los extremos N y C-terminal ubicados hacia el interior celular, y donde los segmentos TM1a y TM6b se encuentran inclinados abriendo el vestíbulo del transportador hacia el citoplasma. Por último, los TM11 y TM12 forman una V en el lado externo de TM10 (Errasti-Murugarren *et al.*, 2019).

Aunque la arquitectura general no muestre diferencias con las estructuras previamente resueltas, debido a la alta resolución, al estar resuelto con y sin sustrato y a los múltiples ensayos funcionales y de dinámica molecular, el estudio de BasC ha aportado avances en la comprensión de los mecanismos de transporte de los aminoácidos (Errasti-Murugarren *et al.*, 2019), así como diferencias entre los LATs y homólogos bacterianos como AdiC o GkApcT (Fang *et al.*, 2009; Jungnickel *et al.*, 2018).

El nanocuerpo (región específica de cadena simple de un anticuerpo) Nb74 reconoce residuos del TM6b, TM8 y TM9 lo que sugiere un posible papel de este en la inhibición de la actividad de BasC. Por ello, al usarlo en ensayos de transporte bloquea las moléculas de BasC que están insertadas en liposomas de adentro hacia afuera. Los resultados de estos ensayos sugieren que la afinidad por el sustrato por ambas caras del transportador es asimétrica, es diferente a cada lado de la membrana (Errasti-Murugarren *et al.*, 2019).

Ello explicaría como los LATs no modifican el gradiente general de concentración de aminoácidos entre los dos lados de la membrana, ya que actúan sobre la distribución proporcional de los aminoácidos que son afines; siendo así eficientes en el intercambio de aminoácidos entre el exterior (a concentración μM) e interior (a concentración mM) (Errasti-Murugarren, *et al.*, 2019). Por ello, este artículo resulta de relevante interés al comenzar a explicar los mecanismos moleculares bajo la interacción asimétrica de los sustratos por parte de los LATs por la cual permiten altas concentraciones intracelulares (mM) de estos sustratos.

Mediante ensayos de función con mutantes en BasC y su homólogo Asc1, ensayos con proteína reconstituida y ensayos de dinámica molecular (MD por sus siglas en inglés *Molecular Dynamics*), muestran que los residuos Tyr 236 (TM7) y Lys 154 (TM5) son los responsables de la aparente asimetría de la afinidad del sustrato (Errasti-Murugarren *et al.*, 2019), una característica clave en el papel fisiológico de los LATs como anteriormente se ha mencionado. Los residuos Tyr 236 y Lys 154

(altamente conservados en LATs) están ubicados en posiciones equivalentes a los sitios de unión a iones sodio (Na1 y Na2) de los transportadores de la superfamilia APC dependientes de sodio, donde el ion de sodio participa en la unión del sustrato.

La caracterización cinética del mutante BasC Tyr 236 Phe mostró una afinidad citoplásmica aparente aumentada por el sustrato L-alanina, sin encontrarse alterada la afinidad extracelular. En el mismo sentido, ensayos de unión basados en termoestabilidad entre el tipo salvaje y el mutante no insinuaron diferencias significativas en los valores de Kd (constante de disociación) aparentes para la L-alanina, sugiriendo un papel de este residuo en la traslocación del sustrato, pero no en su reconocimiento y unión (Errasti-Murugarren *et al.*, 2019).

Por otro lado, la caracterización funcional del mutante Lys 154 Ala disminuiría en unas 10 veces la afinidad externa del sustrato L-alanina, así como la afinidad extracelular por dicho sustrato (Errasti-Murugarren *et al.*, 2019). Estos resultados sugerían, tal como se observó por dinámica molecular, que el residuo Lys 154 interactuaba con el sustrato durante el proceso de translocación, explicando por primera vez para la superfamilia APC la relevancia funcional de este residuo.

En cuanto a la estructura de BasC resuelta con el sustrato 2-AIB, éste interactúa con BasC en los segmentos desenrollados de los TM1 y TM6 (Figura 7), de tal modo que el grupo α -carboxilo forma enlaces de hidrógeno con los residuos Ala 20 y Gly 21 (TM1) y el α -amino forma enlaces de hidrógeno con los residuos Val 17 (TM1) y Phe 199, Ala 200 y Asp 202 (TM6) (Errasti-Murugarren *et al.*, 2019), tal y como había sido previamente descrito en GkApcT (Jungnickel *et al.*, 2018).

La conformación resultante de la unión de 2-AIB a BasC, hacia adentro no ocluida, amplía conocimientos sobre el ciclo de transporte de la superfamilia APC (Figura 5). Además, a pesar de ser similar a otras estructuras ya resueltas, al superponerlas se pueden destacar ciertas diferencias como en la inclinación de los TM1a, TM5 y TM7, que la inclinación de TM1a y TM6b es más abierta en BasC y que entre TM1a y TM5 hay más separación facilitando de este modo la entrada del sustrato (y viceversa) (Errasti-Murugarren *et al.*, 2019).

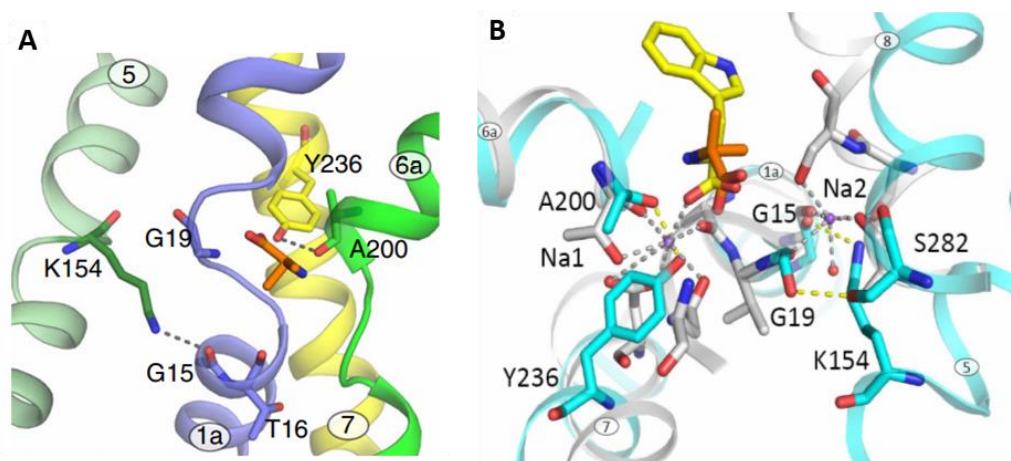


Figura 7: Modelo de BasC para la liberación del sustrato al citoplasma. A) Estructura de BasC unida a 2-AIB (naranja) (PDB 6F2W), detallándose las interacciones de Lys 154 del TM5 con Gly 15 del TM1a y Tyr 236 del TM7 con Ala 200 del TM6. B) Comparación de BasC con 2-AIB (naranja) unido (cian) y de la estructura de MhsT con triptófano (amarillo) unido (gris claro, PDB 4US4). Imagen procedente de Errasti-Murugarren *et al.*, 2019.

1.2.3.6. MhsT

La proteína MhsT de *Bacillus halodurans* es un transportador de aminoácidos hidrofóbicos pertenecientes a la familia SLC6 (por lo que, como tal, no es un homólogo LAT), y que presenta un transporte tipo cotransporte dependiente de sodio, de aminoácidos, osmolitos, neurotransmisores y creatina.

Hace tan solo un año se publicó un exhaustivo estudio de 6 nuevas estructuras de MhsT unido a diferentes sustratos, que junto a estudios funcionales, permitieron avanzar en el conocimiento de cómo el sitio de unión es capaz de reconocer y transportar sustratos tan diferentes, aminoácidos alifáticos y aminoácidos aromáticos, y con ello qué regiones son clave para tal propósito (Focht *et al.*, 2020).

Las estructuras de MhsT que presentaban una conformación cerrada hacia adentro permitieron identificar los elementos estructurales del sitio de unión S1; en el caso de MhsT, diseñado para albergar aminoácidos de cadena hidrofóbica, alifáticos más pequeños (L-valina, L-leucina y L-isoleucina) y para aromáticos más grandes (L-triptófano, L-fenilalanina y L-tirosina).

En el sitio de unión, las estructuras muestran que el grupo amino del sustrato forma enlaces de hidrógeno con la cadena principal de Ala 26 (TM1), Phe 230, Thr 231 (TM6) y la cadena lateral de Ser 233 (TM6); mientras que el grupo carboxilo interactúa a través de enlaces de hidrógeno con la cadena lateral de Tyr 108 (TM3), la cadena principal de Gly 30, y el ion de sodio en el sitio de Na1 (Focht *et al.*, 2020). Además, las cadenas laterales de los sustratos hidrofobos están ubicadas en un bolsillo separado definido por las cadenas laterales de Ile 104 (TM3), Phe 229, Phe 230, Ser 233, Met 236, Ala 238 (TM6), Val 331, Ser 324, Ser 327 y Leu 328 (TM8), Leu 393 (TM10), y la columna vertebral de Ala 26, Leu 29 (TM1), Phe 229, Thr 231 (TM6) y Leu 324 (TM8) (Focht *et al.*, 2020).

La comparación de las estructuras de los complejos con sustratos alifáticos y aromáticos reveló que el fragmento no helicoidal del TM6 cambiaba su posición relativa dentro del sitio de unión dependiendo del tamaño del sustrato. Este bucle es el denominado motivo GMG, ya que el desplazamiento de estos tres residuos es el más significativo y además se encuentran altamente conservados. En las estructuras se observaba que un sustrato pequeño en el sitio de unión provocaba el movimiento hacia adentro del bucle GMG compensando así las cadenas laterales de los sustratos más pequeños. Los mutantes MhsT, que albergan sustituciones dentro del motivo GMG y el sitio de unión, mostraron un transporte de aminoácidos aromáticos grandes deficiente (Focht *et al.*, 2020).

En conjunto, las estructuras describen un sitio de unión bimodal que distingue entre aminoácidos alifáticos y aromáticos apolares mediante un movimiento de la cadena principal del motivo GMG y mediante el ajuste de la posición de las cadenas laterales individuales a través de cambios de rotámeros del residuo Met 236 (TM6) (Focht *et al.*, 2020).

Por tanto, los cambios generales en el volumen de la cavidad hidrofoba de MhsT tras la unión de diferentes sustratos podrían seguir un mecanismo de "ajuste inducido" (Klingenberg *et al.*, 2005; Nyola *et al.*, 2010) o selección conformacional (Hammes *et al.*, 2009; LeVine & Weinstein, 2014) que han sido descritos con anterioridad.

También desvelaron cómo la flexibilidad del motivo glicina - metionina - glicina (²³⁵GMG²³⁷) situado en la región desenrollada del TM6 es fundamental para el reconocimiento de sustratos de diferente tamaño adaptando la forma y el volumen del sitio de unión a ellos (Focht *et al.*, 2020). Estos residuos tienen la capacidad de determinar el grado de flexibilidad del bucle, que, combinado con la

diversidad de la secuencia del segmento desenrollado del TM6, podrían tener un papel en un mecanismo común para el reconocimiento y translocación del sustrato por transportadores de SLC6 de amplia selectividad de sustrato.

Una vez explicados algunos de los ejemplos de transportadores bacterianos de los HATs, gracias a los cuales se han podido estudiar características estructurales básicas y residuos o motivos clave en la selectividad de sustrato de los LATs, pasaré a detallar los recién adquiridos conocimientos estructurales sobre transportadores HATs. Como recientemente he mencionado, durante el transcurso de esta tesis fueron publicadas las estructuras de dos transportadores HATs; 4F2hc/LAT1 y rBAT/ b⁰⁺AT.

1.2.3.7. 4F2hc/LAT1

La estructura del heterodímero 4F2hc/LAT1 humano fue resuelta por crio-microscopía electrónica (crio-ME) a una resolución de 3,4 Å, lo que revela la arquitectura hasta ahora sin precedentes de un heterocomplejo de glicoproteína-transportador.

Al ser el transportador 4F2hc/LAT1 una proteína de membrana relativamente pequeña (unos 130 kDa) y sin simetría es un desafío para un estudio estructural por crio-ME por lo que se emplearon dos anticuerpos monoclonales de ratón, HBJ127 y MEM-108, para aumentar su tamaño (Figura 8) (Lee *et al.*, 2019). Durante el mismo tiempo, un segundo artículo mostró la estructura de 4F2hc/LAT1 solo y unido al inhibidor en resoluciones de 3,3 Å y 3,5 Å, respectivamente (Yan *et al.*, 2019). En ambos casos LAT1 exhibe una conformación abierta hacia adentro.

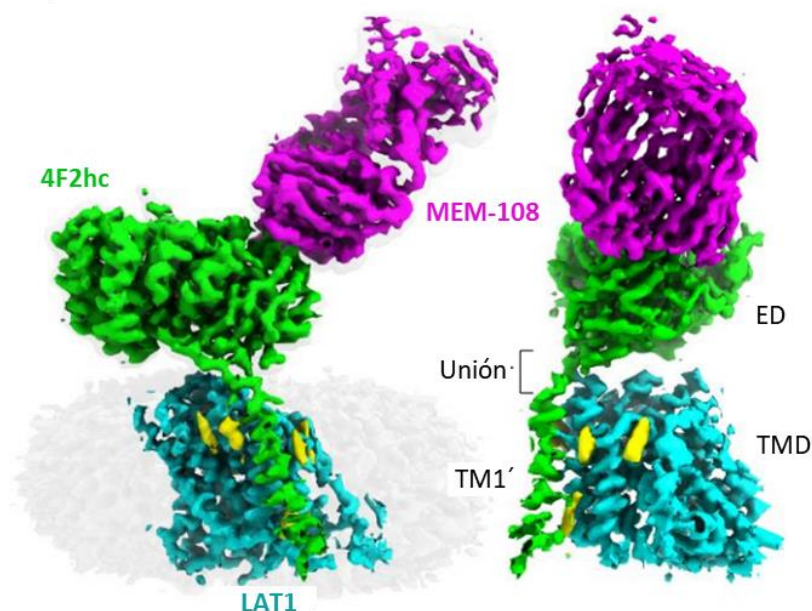


Figura 8: Mapa de crio-microscopía de h4F2hc/LAT1. Se observa 4F2hc en verde, LAT1 en cian, el anticuerpo MEM-108 en morado y ciertas moléculas de esterol en amarillo. Imagen procedente de Lee *et al.*, 2019.

Estos resultados arrojaron luz sobre los principios del ensamblaje estructural entre la glicoproteína 4F2hc y un transportador de aminoácidos abriendo la puerta al diseño de fármacos preclínicos y anticuerpos terapéuticos dirigidos a LAT1 y 4F2.

A grandes rasgos, la estructura revelaba la posición de 4F2hc sobre LAT1 (exactamente desplazado unos 20 Å desde el centro), tal y como habíamos descrito en nuestro laboratorio en la reconstrucción 3D a baja resolución de h4F2hc/LAT2 (Rosell *et al.*, 2014). Además, el cálculo del potencial electrostático de superficie mostraba que la superficie inferior de 4F2hc, la que mira hacia LAT1, está cargada positivamente, como ya había sido previamente descrito (Fort *et al.*, 2007). En el mismo sentido la superficie correspondiente de LAT1 estaba cargada negativamente, lo que indicaba la interacción electrostática entre las dos subunidades (Lee *et al.*, 2019).

Dentro de la bicapa lipídica se observaba una única hélice transmembrana de 4F2hc (TM1'), adyacente al TM4 de LAT1 que creaba una interfase lateral. Mientras, el anticuerpo empleado MEM-108 se unía a 4F2hc en el lado opuesto de esta interfase lateral, extendiéndose hacia el espacio extracelular unos 40 Å y una inclinación de unos 45° (Lee *et al.*, 2019). Además, el heterodímero presentaba múltiples moléculas de esteroides, lo que corroboraba los datos bioquímicos previos sobre su papel en la estabilización del heterodímero, representando en mayor parte por colesterol (Dickens *et al.*, 2017).

En el caso de la estructura resuelta con BCH (un inhibidor tipo sustrato de baja afinidad), este se encontraba unido en el centro del sitio de unión, en una ubicación similar al sitio de unión al sustrato en los transportadores GkApC, AdiC y BasC (Jungnickel *et al.*, 2018; Fang *et al.*, 2009; Errasti-Murugarren *et al.*, 2019). La fracción hidrófoba de BCH participaba en interacciones hidrófobas con el anillo de benceno de Phe 252, mientras que el grupo carboxilo y el grupo amino forman enlaces de hidrógeno con los residuos de la cadena principal de TM1 y TM6, respectivamente (Yan *et al.*, 2019).

LAT1 cuenta con 12 TMs, los diez primeros muestran una topología tipo LeuT (repetición invertida 5 + 5) que es típica de la superfamilia APC (Jack *et al.*, 2000), mientras que los TM11 y TM12 están dispuestos en horquilla, como en BasC (Errasti-Murugarren *et al.*, 2019) y GkApC (Jungnickel *et al.*, 2018). Por el lado extracelular, LAT1 tiene seis bucles extracelulares (EL1 - 6 por sus siglas en inglés *Extracellular Loop*) y por el lado intracelular cinco (IL1 - 5 por sus siglas en inglés *Intracellular Loop*) y los extremos N y C-terminales. Entre ellos, destaca el bucle EL2 que se pliega en un bucle estructurado, el EL4 que forma dos hélices cortas (EL4a y EL4b) y el IL1 que forma una hélice corta; denominadas H2 y H3 y H1 respectivamente. Además, en el bucle en la región C-terminal que sigue al TM12 hay una hélice anfipática, H4, cuyo extremo C-terminal se acerca al segmento transmembrana de 4F2hc, ubicado por encima de la hélice corta H1' en el bucle N-terminal que precede a este segmento transmembrana (Yan *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2019).

La estructura de 4F2hc/LAT1 revelaba que su sitio de unión al sustrato situado en la zona desenrollada de los TM1 y TM6 consta de tres elementos estructurales, equivalentes a los descritos en las estructuras anteriores (Jungnickel *et al.*, 2018; Focht *et al.*, 2020; Errasti-Murugarren *et al.*, 2019). En primer lugar, los polos positivo y negativo de las dos hélices cortas que podrían reconocer las cargas complementarias de los grupos carboxilo y amino del sustrato; en segundo lugar, en la zona más central, el bolsillo proximal que podría acomodar las cadenas laterales primarias; y en tercer lugar y más alejado, el bolsillo distal que proporcionaría un sitio de unión para las cadenas laterales largas e hidrófobas de los sustratos grandes (Lee *et al.*, 2019).

En el dominio de la zona *bundle*, la estructura muestra que los TM1 y TM6 se dividen en dos hélices discontinuas (1a, 1b, 6a y 6b) como todas las estructuras anteriormente descritas (Jungnickel *et al.*, 2018; Focht *et al.*, 2020; Errasti-Murugarren *et al.*, 2019)). El mapa ME mostraba que las regiones citoplásmicas de tales transmembranas (TM1a y TM6b) se disponían formando una cavidad expuesta al citoplasma, mostrando por tanto una conformación abierta hacia el interior (*inward facing*). Ensayos funcionales con varios residuos situados a lo largo de esta región Tyr 117, Phe 252, Trp 257, Asn 258, Tyr 259 y Arg 348, que fueron mutados a alanina, mostraron una reducción drástica de la actividad de transporte en comparación con la forma salvaje (Yan *et al.*, 2019).

Por el lado extracelular, esta cavidad se encuentra cerrada por numerosos residuos hidrofóbicos e hidrofílicos de TM1b, TM3, TM6a y TM10, que forman una puerta gruesa que es finalmente sellada por el EL4a. Por encima de esta puerta hay un vestíbulo extracelular, que corresponde a un espacio vacío entre las dos subunidades.

Por su lado, 4F2hc, descrita previamente (Fort *et al.*, 2007), se acopla con LAT1 a través de múltiples interacciones, no solo en los dominios extracelular y transmembrana, sino también en la interfase enlazadora que conecta el ectodominio de 4F2hc con el TM1' de 4F2hc. Lo importante de esta estructura respecto a la resolución del ectodominio de 4F2hc es que se visualiza el dominio transmembrana TM1', ambas zonas unidas por un conector corto denominado "cuello" (Figura 9 - A). Sin embargo, la larga cola citosólica N-terminal (unos 180 residuos en la isoforma c) no ha sido resuelta lo cual puede deberse a su alto grado de flexibilidad (Lee *et al.*, 2019; Yan *et al.*, 2019).

Tal como han sugerido publicaciones mencionadas anteriormente, el puente disulfuro formado por Cys 210' y Cys 164 de LAT1 no es el único punto de anclaje entre ambas subunidades (Estévez *et al.*, 1998; Pfeiffer *et al.*, 1998). La estructura de 4F2hc/LAT1 muestra hasta cuatro interfases entre la cadena pesada y la cadena ligera: TM1' - TM4, enlazadores C β 2 / C β 3 / C β 8-EL2, A α 8 - EL4a y A α 1 / A α 2 - EL3 (Figura 9 - A) que en conjunto contribuyen a que la interacción entre la subunidad ligera y pesada del heterodímero sea estable (Yan *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2019). Ensayos funcionales realizados con los mutantes de los residuos participantes en estas interacciones mostraban reducción de la actividad de transporte (Yan *et al.*, 2019).

En la Interfase TM1' - TM4 participan una gran cantidad de residuos hidrófobos como Ile 203', Ala 200', Met 196' y Leu 197' y Ala 170, Leu 173, Val 174 y Leu 177 (TM4) de LAT1 (residuos conservados) (Figura 9 - B). La interfase enlazadora comprendida entre C β 2 / C β 3 / C β 8 - EL2 involucra el puente disulfuro entre Cys 210' y Cys 164 y el enlace de hidrógeno entre Arg 511' y Thr 163 (Figura 9 - C). Aunque está poco conservado, EL2 exhibe características compartidas, 9 residuos de longitud flanqueados por prolinas conservadas (Pro 159 y Pro 167) con un residuo de Phe o Tyr en la tercera posición y un residuo hidrófilo en la quinta posición. La interfase A α 8 - EL4a consta de dos pares de residuos hidrófilos que forman enlaces polares; Lys 532' y Arg 534' y Glu 303 y Gln 304 en LAT1 (poco conservados) (Figura 9 - D). Y, por último, la interfase comprendida por A α 1 / A α 2 - EL3, aunque solo parcialmente resuelta, muestra residuos cargados en el EL3 que pueden formar interacciones iónicas con los residuos de superficie Lys 255', Lys 299' y Lys 300' en 4F2hc (Figura 9 - D) (Yan *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2019).

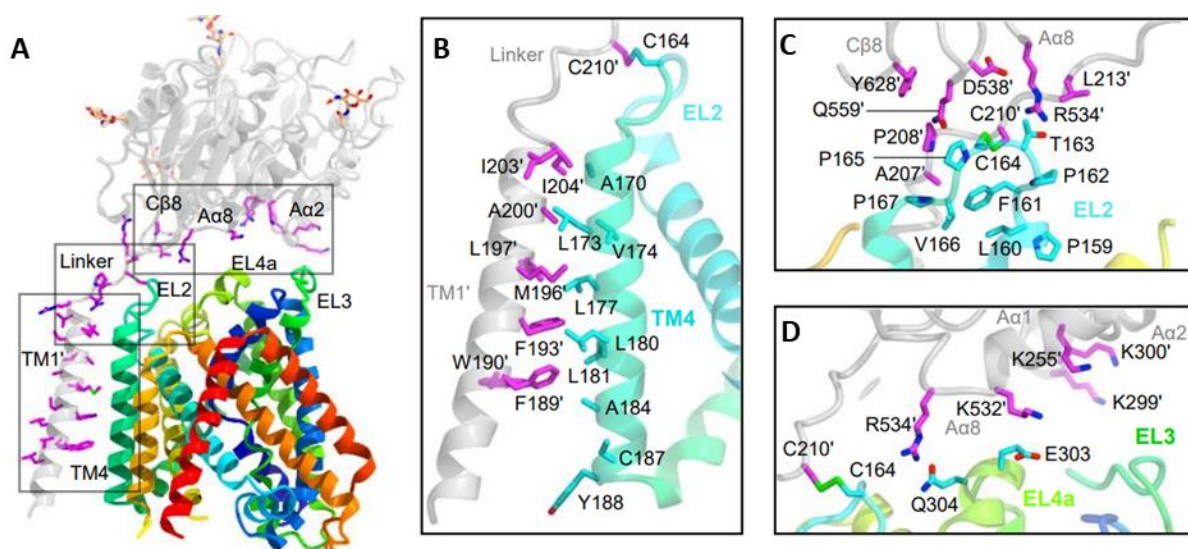


Figura 9: Interfases que participan en la interacción entre 4F2hc y LAT1. Las regiones son denominadas como los ejemplos mostrados C β 8 o A α 2, y siguen el siguiente significado; primera letra hace referencia al dominio A, B o C, la letra griega hace referencia a si la estructura es α -hélice o lámina- β y el número al orden de aparición. A) Arquitectura general de la interacción entre 4F2hc y LAT1. B) Interfase de la región TM1' - TM4. C) Interfase de la unión formada por C β 2 / C β 3 / C β 8 - EL2. D) Interfase de las uniones A α 8 - EL4a y A α 1 / A α 2 - EL3. Imagen procedente de Lee *et al.*, 2019.

Hasta la fecha se seguían empleando modelos HATs de homólogos procariontas para el diseño de inhibidores debido a la falta de una estructura en una conformación orientada hacia afuera. No obstante, muy recientemente la publicación de tres estructuras de 4F2hc/LAT1 humanas con una conformación cerrada hacia afuera abre la oportunidad de realizar tales estudios de una manera directa (Yan *et al.*, 2021). Los autores diseñaron tres inhibidores bicíclicos basados en la meta-tirosina (JX-075, JX-078 y JX-119) con los cuales se resolvió por crio-ME 4F2hc/LAT1 a 2,7 Å. Estas estructuras (muy similares entre ellas) mostraban cambios conformacionales significativos en comparación con la conformación abierta hacia adentro, con la excepción de gran parte de la interacción entre LAT1 y 4F2hc.

Los grupos carboxilo y α -amina de los inhibidores se unen a la región desenrolladas de los TM1 y TM6 como el resto de los sustratos y BCH (Jungnickel *et al.*, 2018; Errasti-Murugarren *et al.*, 2019; Yan *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2019; Focht *et al.*, 2020); pero la cadena lateral se sitúa entre el sitio de unión al sustrato y el TM10 impidiendo la rotación de la Phe 252 del TM6 que actúa como puerta externa bloqueando de este modo el transporte (Yan *et al.*, 2021). Adicionalmente, el grupo carboxílico también se encuentra unido a la Tyr 289 del TM7 como el homólogo bacteriano GkApcT (Jungnickel *et al.*, 2018).

Además, junto a la estructura unida de diiodo-Tyr propusieron un modelo de trabajo para los HATs (Yan *et al.*, 2021). La transición de la conformación orientada hacia adentro a la orientada hacia afuera podría ser desencadenada por la unión del sustrato donde el dominio central rota hacia el dominio *hash* a través del movimiento coordinado de los TM1, TM2, TM6 y TM7 cerrando así las puertas interiores (Forrest *et al.*, 2009; Kazmier *et al.*, 2017; Yan *et al.*, 2021). Para acomodar el sustrato en el sitio de unión los TM1b y TM6a rotan induciendo la transición a la conformación abierta hacia afuera empujando el residuo de la puerta externa, Phe 252, y desencadenando la liberación del sustrato (Yan *et al.*, 2021).

1.2.3.8. rBAT/b⁰⁺AT

Un año después de que la estructura del primer heterodímero HAT fuera publicada, la estructura de rBAT/b⁰⁺AT fue también resuelta. La estructura de este transportador fue resuelta por criomicroscopía electrónica a una resolución de 3,4 Å (Wu *et al.*, 2020). Además, como también fue resuelto con sustrato, se observaba que tal interacción estaba regida por los mismos principios ya descritos (Yan *et al.*, 2020a).

La densidad general del mapa revelaba un complejo de proteínas heterotetraméricas compuesto por dos subunidades rBAT y dos transportadores b⁰⁺AT (Wu *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2020a). Previamente, mediante estudios bioquímicos ya había sido caracterizada la interacción entre dos unidades HATs, produciéndose tal dimerización a través de las cadenas pesadas (rBAT) (Fernández *et al.*, 2006).

Al igual que la otra subunidad pesada de la familia, rBAT es una glicoproteína de membrana de tipo II compuesta por una pequeña región citosólica N-terminal que está conectada al dominio extracelular (ED) por una hélice que atraviesa la membrana (TM1') y un enlazador extracelular de 13 Å de longitud que conecta ambas partes (Wu *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2020a).

La estructura general muestra un gran parecido a la cadena pesada 4F2hc, estando la diferencia más significativa en el enlazador extracelular que en rBAT posee cinco residuos menos produciendo que este ED muestre una orientación diferente respecto a b⁰⁺AT en comparación con 4F2hc y LAT1. En cuanto a las glicosilaciones, aunque rBAT también presenta cuatro de ellas en superficie, los residuos de las que parte no están conservados respecto a 4F2hc; lo cual sugiere que procesos de maduración o tráfico sean diferentes (Wu *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2020a).

La interacción entre ambas subunidades, al igual que entre 4F2hc y LAT1, se concentra en el TM1' de rBAT y el TM4 de b⁰⁺AT en donde se dan una serie de contactos de van der Waals formados por cadenas laterales no polares (Wu *et al.*, 2020). Del mismo modo, también se producen una serie de contactos en la superficie, formando una interfase crucial entre el EL2 de b⁰⁺AT y la región enlazadora de rBAT donde se encuentra el puente disulfuro característico de la familia, entre Cys 144' y Cys 114. Además, en la hendidura entre EL2 y EL4b existe una protuberancia del bucle $\alpha 4 / \beta 5$ de rBAT que es donde se producen más interacciones extracelulares; algunas de ellas son contactos tipo van der Waals entre Pro 375' de rBAT y Val 142 de b⁰⁺AT o interacciones electrostáticas entre cadenas laterales de Glu 374' de rBAT y Arg 296 y Asp 295 de b⁰⁺AT (Wu *et al.*, 2020).

Al igual que su homólogo 4F2hc, no todo el segmento N-terminal pudo resolverse, y en el caso del extremo C-terminal de rBAT solo fueron resueltos los 30 primeros residuos, por tanto, el resto carece de estructura secundaria predicha. Se observaba, al final de la zona sí resuelta, un bucle que parecía estabilizar el puente disulfuro existente entre Cys 673 y Cys 685 así como varias interacciones electrostáticas. Este bucle se coloca cerca del extremo C-terminal de la hélice transmembrana de rBAT y EL2 de b⁰⁺AT, en donde participa en contactos tipo van der Waals entre Ile 680 y Pro 147 de b⁰⁺AT, sugiriendo que este bucle participaría en la formación del heterodímeros (Chillarón *et al.*, 1996, Wu *et al.*, 2020).

Por su lado, la subunidad b⁰⁺AT adopta el plegamiento LeuT característico y la disposición de las transmembranas le confiere al transportador una conformación abierta orientada hacia adentro, al igual que LAT1 (Lee *et al.*, 2019; Yan *et al.*, 2019).

Los conocimientos sobre estos transportadores de aminoácidos se encuentran en continua expansión y ello da pie a un abanico de nuevos estudios que se están desarrollando a partir de esta nueva información. Durante los últimos años se han publicado numerosas estructuras, homólogos de LATs humanos, que han arrojado luz a diferentes aspectos que han permitido entender de mejor modo los mecanismos de transporte y los residuos clave que configuran el sitio de unión al sustrato, y que nos han servido de referencia para poder esclarecer los determinantes de la selectividad de sustrato de los transportadores LATs de aminoácidos neutros.

El trabajo realizado durante la presente tesis ha resuelto la estructura de 4F2hc/LAT2 humano con el núcleo transmembranal a nivel atómico, que, junto con aproximaciones multidisciplinares, nos ha permitido entender los principios de selectividad de sustrato entre los transportadores HATs de aminoácidos neutros. Además, nos ha permitido desentrañar el mecanismo molecular del cambio de selectividad de sustrato asociado mutaciones en regiones lejanas al sitio de unión de sustrato de LAT2. Esto último ha facilitado la generación de modelos mecanísticos destinados a explicar las bases moleculares de mutaciones en LAT2 asociadas a sordera y cataratas (Espino-Guarch *et al.*, 2018; Knöpfel *et al.*, 2019).

OBJETIVOS

El principal y primer objetivo de la presente tesis pasa por resolver la estructura de un transportador heteromérico de aminoácidos (HATs) de origen humano mediante la técnica de crio-microscopía electrónica. Para acometer este objetivo es necesario realizar un cribado entre varios candidatos de proteínas HATs y seleccionar la proteína que mayor calidad y estabilidad presente para la realización de estudios estructurales.

Según la información extraída del primer objetivo se podrá llevar a cabo el segundo objetivo que consiste en caracterizar la proteína funcionalmente para así estudiar y establecer los determinantes funcionales de la selectividad de sustrato del sistema de transporte que presente. A partir de los resultados obtenidos del primer objetivo y por la proteína finalmente seleccionada, este estudio funcional se ha centrado en la selectividad de sustrato de los HATs transportadores de aminoácidos neutros.

A continuación, se enumerarán los pasos que se han realizado durante esta tesis para poder completar los objetivos anteriormente descritos:

1. Identificar el HAT de origen humano con la mejor combinación de nivel de expresión y de estabilidad y optimizar los protocolos de expresión y purificación de la proteína seleccionada para obtener una proteína estable, pura y funcional para resolver su estructura por crio-microscopía electrónica.
2. Resolver la estructura del transportador HAT humano seleccionado, 4F2hc/LAT2.
3. Identificar determinantes estructurales del perfil de selectividad de sustrato del transportador partir de su estructura.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN Y OBTENCIÓN DEL ADN

En la presente sección de Materiales y Métodos se tratarán en primer lugar un gran número de técnicas relacionadas con la obtención de aquel ADN que será empleado para producir las proteínas con las que se ha trabajado durante esta tesis. Nos referimos a aquellas técnicas que permiten manipular fragmentos de ADN, crear fragmentos recombinantes utilizando enzimas de restricción o la amplificación de estos fragmentos mediante su transformación en bacterias.

Por tanto, se detallarán los protocolos utilizados en la generación tanto de las construcciones de 4F2hc/LAT2 como del resto de los HATs estudiados. Todas estas técnicas han sido realizadas en el servicio de Expresión Proteica del IRB por los doctores Nick Berrow, M^a Carmen Romero y M^a Queralt García, razón por la cual tales técnicas no serán explicadas tan exhaustivamente como las realizadas por una misma.

El trabajo con ADN y bacterias requiere la utilización de material estéril para evitar contaminaciones que ya sean debidas a ADNasas, otras bacterias y microorganismos y/o ADNs ajenos. El material de trabajo debe ser previamente esterilizado en una autoclave a 1 atmósfera de presión y 120 °C durante 20 min. Las bacterias, del mismo modo, deben ser manipuladas en una campana extractora o junto a un mechero *Bunsen*, el cual proporciona un área estéril de trabajo alrededor suyo. Y los reactivos, a su vez, aparte de ser preparados con un agua de calidad ultrapura (empleando un sistema Q de Millipore) deben ser finalmente esterilizados en una autoclave o por filtración mediante filtros de 0,22 µm de diámetro de poro (Millipore express plus Merck para el caso de volúmenes grandes y FP 30/0,2 CA-S de GE Health care para el caso de volúmenes pequeños).

3.1.1. Diseño de los constructos

La obtención de nuevas construcciones es posible gracias a las técnicas de ADN recombinante, las cuales permiten aislar un gen de un organismo para su posterior manipulación e inserción en otro diferente, en nuestro caso en un plásmido circular. Por tanto, se denomina ADN recombinante a aquellas moléculas que provienen de la unión artificial de dos fragmentos de ADN.

Las construcciones empleadas durante el recorrido de esta tesis han sido modificadas en el laboratorio o en la plataforma de Expresión Proteica a partir de plásmidos que contenían el ADN de la proteína con la que nos interesa trabajar y que procedían a su vez de un vector vacío comercial y el ADN copia (ADNc) de tal proteína.

3.1.1.1. Elección de las dianas de restricción y diseño de cebadores

Una vez obtenido el ADNc de la proteína de interés se debe buscar un vector que tenga las propiedades adecuadas para el tipo de experimento. En nuestro caso utilizamos vectores de expresión destinados a producir proteínas en células de mamíferos.

Para introducir el inserto deseado en el vector, en primer lugar, es necesario decidir las dianas de restricción mediante las cuales se subclonará el inserto, el cual se encuentra circularizado en otro vector. Por lo general, se tiende a emplear una de las dianas presentes en el sitio de clonaje (*multicloning site*) del propio vector destino, siempre teniendo en cuenta que estas dianas no se encuentren en el inserto de la proteína que queramos expresar. Además, es conveniente que las enzimas seleccionadas sean diferentes entre ellas, controlando de este modo la dirección del inserto,

e, igualmente, que generen extremos cohesivos entre el plásmido y el inserto reduciendo de este modo las posibilidades de recircularización del vector que daría lugar a plásmidos vacíos.

En esta tesis se ha empleado el vector de 6,5 kb, pPEU4xTT (*plasmid Protein Expression Unit 4xTT*) construido en la plataforma de Expresión Proteica para las proteínas humanas LAT2, xCT, y+LAT1 y y+LAT2, y el vector pPEU22TT, de 6 kb, para la proteína 4F2hc (Figura suplementaria 1). Las dianas de restricción empleadas para abrir el vector, así como para añadir en los extremos de los ADN que se quieren incorporar, fueron KpnI y BmtI para las proteínas de las subunidades ligeras y KpnI y PmeI para la proteína de la subunidad pesada.

Se emplean dos tipos de vectores ya que cada uno contiene en su propia secuencia las etiquetas que emplearemos para purificar o analizar la proteína (*Strep-tag*, *His-tag* y GFP); mientras que el vector pPEU4xTT contiene una fusión en el extremo C-terminal de la diana proteasa 3C seguida de la secuencia de eGFP y cola de histidinas (10xHis), el vector pPEU22TT contiene en el extremo N-terminal la etiqueta denominada OneStrep formada por StrepII - espaciador - StrepII (*twin Strep-tag*) (Figura 10). Ambas variantes del plásmido pPEUTT derivan del plásmido que contiene el origen de replicación OriP para permitir la replicación episomal en las células HEK293-6E (Loignon *et al.*, 2008) (para más detalles del plásmido consultar <https://www.irbbarcelona.org/en/research/protein-expression>).

Todos estos insertos fueron clonados desde el vector en el que se encontraban originalmente, el vector pcDNA3.1+ para el caso de las subunidades ligeras (Rossel *et al.*, 2014) y el vector pcDNA4-His-MaxC (Fort *et al.*, 2007) mediante PCR de alta fidelidad. Tras la reacción de la PCR por la cual se han amplificado los ADNc extraídos de los plásmidos, cada muestra fue tratada con la enzima DpnI (Agilent Technologies) durante 1 hora a 37 °C para eliminar las copias de ADN parentales (destruye el ADN metilado o hemimetilado). A continuación, el producto de PCR fue purificado mediante perlas magnéticas AmPure según las instrucciones del fabricante (Beckman Coulter).

El producto de PCR purificado fue introducido mediante InFusion (Takara) según indicaciones del fabricante, en el vector pPEU4xTT a través de las dianas de restricción seleccionadas (KpnI y BmtI) que fueron previamente introducidas por PCR al encontrarse en la propia secuencia de los *primers* o cebadores diseñados (Tabla Suplementaria 1 - A). De igual forma, la introducción de 4F2hc al vector pPEU2e62TT se realizó mediante InFusion a través de las dianas KpnI y PmeI.

Todas las construcciones de ADN se verificaron completamente mediante secuenciación antes de su uso.



Figura 10: Construcción modelo de las proteínas estudiadas. Todas las subunidades ligeras con las que se ha trabajado han sido diseñadas siguiendo el mismo esquema que el mostrado para el constructo de LAT2, solo cambia el ADNc insertado en el vector (región azul).

Las técnicas empleadas para producir las construcciones de ADN que serán empleadas para producir las proteínas a estudiar que ya se han mencionado son relatadas más detalladamente a continuación.

No obstante, tal construcción de ADN inicial también ha sido usada sin modificaciones para realizar ensayos funcionales en células, siendo el caso de las construcciones para las proteínas LAT2 y Asc1 humanas (Rossel *et al.*, 2014; Errasti-Murugarren *et al.*, 2019).

3.1.1.2. Digestión de los fragmentos de ADN con endonucleasas

La digestión con enzimas de restricción permite la escisión de fragmentos de ADN necesarios para las técnicas de ADN recombinante. Una vez realizado el corte, los productos son analizados en un gel de 1% de agarosa.

Reactivos y Material:

- Enzimas de restricción (2-12 U/ μ l, New England Biolabs).
- Tampón de reacción 10X.
- Incubador a 37 °C.

Procedimiento:

En todos los casos se han seguido los protocolos suministrados por las casas comerciales de las enzimas de restricción. De forma general, una reacción de digestión necesita un ADN de cadena doble, en este primer caso, para extraer el inserto de interés del vector de origen, se deben emplear las enzimas de restricción que previamente se emplearon para introducir el inserto en tal vector.

A continuación, se detalla un ejemplo de protocolo de digestión por Kpn I:

- 6 μ g de ADN,
- 2 μ l de tampón A 10X (New England Biolabs), es dependiente de cada enzima,
- 2 μ l de Kpn I (10 U/ μ l, New England Biolabs),
- X μ l de agua Mili-Q (hasta 20 μ l de volumen final).

La concentración de las enzimas se acostumbra a dar en UI (Unidad Internacional); se define una UI como la cantidad de enzima necesaria para digerir 1 μ g de ADN a 30 °C en una hora. Aunque hay que tener en cuenta que el volumen final de la reacción dependerá de la cantidad de enzima; deben diluirse al menos 10 veces para disminuir la concentración del glicerol que contienen, el exceso podría inhibir la actividad enzimática y por consiguiente la correcta digestión del ADN.

3.1.1.3. Ligación de fragmentos de ADN mediante InFusion

El protocolo de incorporación de fragmentos de ADN en un plásmido, proceso conocido como ligación, consiste en la unión de dos cadenas de ADN entre los grupos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo de los nucleótidos situados en extremos romos o cohesivos resultantes de la digestión (del inserto y el vector) con enzimas de restricción.

Para nuestras construcciones se ha empleado el kit comercial InFusion (Takara) y el protocolo se ha realizado siguiendo las instrucciones del fabricante (para saber más acudir a In-Fusion® HD Cloning Kit User Manual - takarabio.com).

Al finalizar se debe corroborar que la reacción de ligación ha introducido nuestro inserto deseado en el vector, para ello se transforman células competentes con el producto de la ligación. La selección de las bacterias que han incorporado el vector se realiza por resistencia a antibiótico; los vectores empleados contienen los genes de resistencia a ampicilina. De modo que, aquellas bacterias (Omnimax) que han sido capaces de crecer en presencia de antibiótico es porque contienen el inserto deseado. También se ha realizado una segunda comprobación mediante secuenciación del inserto a través de cebadores (Tabla suplementaria 1 - B) que reconocen secuencias situadas cerca del sitio de clonaje de estos vectores.

3.1.2 Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (*Polymerase Chain Reaction*) es un método *in vitro* que permite la amplificación enzimática de un fragmento de ADN a partir de un ADN molde (Mullis *et al.*, 1986). Para llevar a cabo una reacción de PCR se debe añadir un molde de ADN o *template*, una enzima termoestable con actividad ADN polimerasa, D-desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), una pareja de cebadores específicos de la zona que quiera ser amplificada y el tampón correspondiente.

Es posible usar dos polimerasas diferentes en función del objetivo final de la reacción de amplificación, ya que la tasa de error de cada una es diferente. La enzima Taq polimerasa es altamente efectiva en dirección 5'-3', no tiene actividad exonucleasa 3'-5' y es estable durante incubaciones prolongadas a elevadas temperaturas; y la enzima Taq polimerasa de alta fidelidad (*Expand High Fidelity*), que sí posee actividad exonucleasa 3'-5' y que se utiliza para amplificar fragmentos de ADNc que deben mantener una elevada fidelidad en su secuencia.

La reacción requiere la utilización de un termociclador que realice ciclos de cambios de temperatura que permitirán la desnaturalización del ADN molde, el alineamiento de los cebadores y la elongación de la cadena. Como los productos de extensión de los cebadores sintetizados de cada ciclo pueden servir como ADN molde en la siguiente reacción, el número de copias de ADN se duplica en cada ciclo; por tanto, y siempre dependiendo de la cantidad y calidad del ADN molde inicial, 20 ciclos de PCR representan aproximadamente un millón de copias del ADN original.

3.1.2.1. Reacción de amplificación

En el transcurso de la presente tesis esta técnica ha sido empleada para expandir el ADNc de las proteínas de interés (si es desde una mezcla de ARN tisular se emplea una polimerasa reversa que amplifica el ADN tomando como molde ARN), para secuenciar el vector construido con el fin de comprobar que contenía el inserto de interés o para introducir mutaciones.

De nuevo, durante todos estos procesos es muy importante trabajar siempre con guantes, con soluciones completamente puras y con material de plástico estéril; todo ello con el objetivo de evitar la presencia de cualquier molécula de ácido nucleico contaminante ya que la PCR es una técnica potente y por ello muy sensible a la contaminación. Por tal motivo estas reacciones van siempre acompañadas de controles.

Reactivos y materiales:

- Polimerasa KOD (Toyobo).
- Tampón de reacción 10x libre de MgCl₂.
- Agua Mili-Q.
- MgCl₂ 25 mM (Sigma).
- dNTPs Mix (*Deoxynucleoside Triphosphate Set PCR Grade, sodium salt* – Sigma Aldrich) Concentración stock 10 mM, repartida equitativamente en dATP, dCTP, dGTP, dTTP.
- Cebadores específicos (Merck). Concentración stock 100 μM (Tabla Suplementaria 1).
- Termociclador *GeneAmp PCR system 2700* (Applied Biosystem)
- Puntas de PCR (con filtro) y material de plástico estéril (no reciclable).

Procedimiento:

Para preparar la mezcla de reacción se añaden:

- 5 μl de tampón 10x,
- 3 μl de MgCl₂ 25 mM,
- 1 μl de dNTPs 10 mM,
- 1 μl de cada uno de los cebadores (concentración de uso 5 - 10 pmol/μl),
- 2,5-5 μl de ADNc,
- X μl de agua Mili-Q (hasta 49,5 μl de volumen final),
- 0,5 μl Tag polimerasa (añadida justo antes de iniciar la reacción).

Las temperaturas o tiempos elegidos en los ciclos para realizar la reacción de PCR dependerán del tamaño de la muestra, los cebadores y la enzima polimerasa. El programa del termociclador se elaborará teniendo en cuenta los siguientes parámetros fisicoquímicos: la temperatura de fusión de los cebadores depende de su T_m (Temperatura de *melting*), la temperatura de extensión es característica de cada enzima polimerasa y el tiempo de extensión debe ser al menos de 1 minuto para sintetizar 1 kilobase (kb) de ADN, aunque puede variar en función de la polimerasa que se utilice. Se emplearon diferentes programas en el termociclador según las características de los cebadores o la dificultad de la reacción (en todas ellas la muestra se mantiene a 4 °C tras la reacción). Finalmente, el rendimiento y la especificidad de la reacción se comprueban en un gel de agarosa no desnaturizante.

3.1.2.2. Introducción de dianas de restricción mediante PCR

Durante el proceso de clonación de ciertos fragmentos de ADN, entre la extracción de tal inserto del vector de origen y su inserción en el vector de destino, ha sido necesario introducir las dianas de restricción a través de las cuales se realizará la ligación. La introducción de tales dianas se lleva a cabo a través de una reacción de PCR, pero utilizando unos cebadores que contienen en sus extremos las dianas de restricción de interés.

Una vez decididas las enzimas de restricción con las que queremos subclonar el inserto de interés (ya elegidas a partir del vector), es necesario diseñar los cebadores que tendrán como finalidad añadir al inserto las dianas de restricción necesarias (Tabla Suplementaria 1).

3.1.2.3. Mutagénesis dirigida

La primera fase de los estudios para relacionar estructura y función de 4F2hc/LAT2 humano se ha realizado mediante la mutagénesis dirigida de residuos concretos de la secuencia de la proteína transportadora (puesto que las mutaciones solo se encuentran en LAT2), utilizando para ello el kit comercial QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies). El método se basa en una amplificación del ADN por PCR con una pareja de cebadores complementarios a cada una de las cadenas del ADN parental que contienen la mutación deseada (Tabla Suplementaria 1 - C).

Para la generación de la mutación se prepara una mezcla que contiene entre 5 y 50 ng del ADN molde, 5 µl del tampón de reacción 10x, 1 µl de cada uno de los dos cebadores diseñados (a 100 µM por lo que se emplean 125 ng), 1 µl de dNTPs (10 mM) y la ADN polimerasa Pfu turbo que replica ambas cadenas del plásmido con alta fidelidad.

El programa de PCR para una mutagénesis dirigida se diferencia en que se realizan pocos ciclos de PCR para evitar posibles mutaciones al azar (la estimación es 12 ciclos para una mutación puntual, 16 para cambio de aminoácido y 18 para deleciones o inserciones). La temperatura de fusión es de 55 °C, y la temperatura de elongación es de 68 °C, y el tiempo requerido dependerá de la longitud del ADN estimándose que se necesitarán 2 min por cada Kb.

A continuación, el producto de PCR se digiere con la enzima Dpn I, añadiendo 1 µl de enzima por cada punto de reacción e incubándose durante una hora a 37 °C, para eliminar los fragmentos que no poseen la mutación añadida (ADN parentales). Por último, el producto de la PCR se transforma en bacterias supercompetentes *Escherichia coli* XL1-Blue. El plásmido producido por las bacterias seleccionadas positivamente es extraído y analizado por secuenciación para corroborar la mutación insertada.

Características de los cebadores:

Los cebadores que son empleados en una mutagénesis dirigida poseen ciertas características diferentes a los cebadores empleados en una PCR convencional. Como sus secuencias no son totalmente fidedignas a la secuencia del ADN molde al que complementan, para su diseño se deben tener en cuenta ciertas consideraciones:

- Cada par de cebadores debe unirse a la misma secuencia en ambas cadenas del plásmido molde.
- Los cebadores deben tener entre 25 y 45 bases de longitud, con una Tm superior o igual a 78 °C. Si los cebadores poseen más de 45 bases, la probabilidad de formación de estructuras secundarias aumenta, disminuyendo la eficacia de la mutagénesis.

Para calcular la Tm se utiliza la siguiente fórmula:

$$Tm = 81,5 + 0,41(\%GC) - 675/N - \% \text{ desparejamiento}$$

→ N: es el número de bases que contiene el cebador

→ % *desparejamiento*: hace referencia a las bases del cebador mutagénico que difieren del ADN molde.

- La mutación deseada debe estar en medio del cebador.
- Idealmente, los cebadores deberían tener un mínimo de un 40% de bases guanina y citosina y finalizar en una o varias bases de citosina o guanina.
- No es necesario que los cebadores estén fosforilados en 5'.

3.1.2.4. Gel de agarosa no desnaturalizante

La electroforesis en gel de agarosa es un método simple, rápido y eficiente para separar e identificar fragmentos de ADN los cuales son separados en función de su tamaño; de modo que la migración de estos fragmentos es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular. El porcentaje de agarosa que se utiliza es variable y depende del tamaño de los fragmentos a separar; generalmente se trabaja a una concentración del 1% para fragmentos entre 0,4 y 6 kb, siendo necesario aumentar tal concentración si se requiere separar fragmentos de ADN menores a 300 pb (o usar un gel de acrilamida).

Durante esta tesis se ha empleado esta técnica para determinar la presencia de cierta o ciertas dianas de restricción en los plásmidos.

Materiales y reactivos:

- Agarosa (BMA).
- Tampón TAE. Compuesto por 40 mM Tris, 20 mM ácido acético y 1 mM EDTA.
- Tampón de carga (*Loading Dye*) (Thermo Scientific). Se conserva a 4 °C.
- SYBR *safe* (Invitrogen).
- ADN Ladder, marcador de peso molecular para conocer los tamaños de los fragmentos de ADN (Invitrogen).

Procedimiento:

La mezcla para preparar un gel de agarosa pequeño está formada por 0,3 g de agarosa en 30 ml de TBE 1x que se calienta al microondas, se deja atemperar y se le añaden 1,5 µl de SYBR. Entonces la mezcla es añadida a la cubeta, se coloca el peine y se deja polimerizar.

Por su lado las muestras se mezclan con tampón de carga en una proporción 9:1 y se cargan paralelamente con el marcador de peso molecular que nos permitirá identificar la banda. El tampón de carga confiere a la muestra un color para facilitar su carga y además, como migra independientemente a estas, permite estimar la migración de los ácidos nucleicos más pequeños.

3.1.2.5. Secuenciación por PCR

La reacción de PCR también puede usarse para secuenciar los fragmentos de ADN procedentes de otras y así conocer la secuencia de un fragmento de ADN. En el laboratorio empleamos los servicios de secuenciación realizados por GATC (perteneciente a su vez a *Eurofins genomics*) o por Macrogen, que consiste en enviar 20 µl a una concentración de 100 ng/µl y los cebadores específicos de la secuencia que se quiere secuenciar (tabla suplementaria 1 - B).

3.1.3. Amplificación de las construcciones plasmídicas

Una vez ya tenemos los plásmidos contruidos a partir de los vectores y los insertos de interés y se ha corroborado su secuencia, el siguiente paso consiste en amplificar estas construcciones para futuros usos.

La reacción de PCR amplifica fragmentos de ADN lineal inferiores a 1000 pb sin cometer mutaciones; por lo que cuando requerimos la amplificación de secuencias de ADN mayores y además, circulares,

como ocurre con los plásmidos que hemos construido, se recurre a la capacidad que tienen las bacterias de multiplicar copias de ADN exógeno.

Las células bacterianas son capaces de introducir en su interior una secuencia circular de ADN exógeno y aumentar su número de copias mediante su propia clonación; por ello las técnicas relacionadas con la producción a gran escala de plásmidos se conocen como *cloning*.

3.1.3.1. Crecimiento bacteriano y obtención de bacterias competentes

El proceso de introducción de un fragmento de ADN en bacterias se denomina transformación, ya sea con la finalidad de aumentar el número de copias del ADN introducido o para expresar la proteína (utilizándose las bacterias en este caso como sistema de expresión). Para ambas finalidades, es necesario que las bacterias se encuentren en un estado en el que permitan que el ADN exógeno sea introducido, en este estado las bacterias son llamadas bacterias competentes.

Existen algunas cepas de bacterias comerciales ya competentes que es necesario guardar a - 80 °C, sin embargo, en nuestro laboratorio se producen bacterias competentes (por nuestro técnico Jordi Seco Oller) siguiendo el protocolo diseñado por Cohen en el que las bacterias se tratan con una solución de cloruro de calcio para alterar la pared bacteriana y entonces así, facilitar la entrada de ADN exógeno (Cohen *et al.*, 1972).

El trabajo con cultivos bacterianos requiere condiciones de esterilidad, por ello su manipulación se lleva a cabo bajo la llama de un mechero *Bunsen* y utilizándose material y reactivos previamente autoclavados o filtrados.

Reactivos y materiales:

- Stock de bacterias (*E. coli*) congeladas en glicerol 20% a - 80 °C.
- Medio líquido Luria-Broth (LB) estéril. Compuesto por triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), NaCl 1% (p/v) y NaOH 2 mM a pH 7.
- Medio SOB: Compuesto por triptona 2% (p/v), extracto de levadura 0,5%, NaCl 10 mM y KCl 2,5 mM. Debe ser autoclavado y suplementado con 5 mM de MgCl₂ 2M y 5 mM de MgSO₄, que son previamente esterilizados por filtración.
- Medio RF1 (*TFBI*): 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM KAc, 10 mM CaCl₂, 15% glicerol. Ajustar a pH 5,8.
- Medio RF2 (*TFBI*): 10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15% glicerol. Ajustar a pH 6,8.
- Tubos de propileno para crecimiento de bacterias (Greiner-bio-one, GBO).

Procedimiento:

Se inoculan bacterias de la cepa *E. coli* XL1-Blue, TOP10, BL21 o Gold en 3 ml de medio líquido LB y se incuban en agitación a 37 °C durante toda la noche. Es aconsejable incubar un tubo con medio sin bacterias a fin de tener un control de esterilidad (recomendación extrapolable a todos los crecimientos bacterianos).

Al día siguiente se inocula 1 ml del medio anterior crecido en 50 ml de medio LB en un erlenmeyer estéril de 500 ml y se mantiene en agitación a 37 °C. Cada 15 - 30 min se toman alícuotas del crecimiento para medir la absorbancia a 550 nm mediante un espectrofotómetro. Cuando la

densidad óptica (OD) medida llega a valores de 0,375 - 0,4, el cultivo se encuentra en crecimiento exponencial y es óptimo para convertirlas en competentes.

Se traspasa el crecimiento a dos tubos de polipropileno estériles y se dejan en hielo 15 min. Se centrifugan a 300 xg 15 min a 4 °C, se decanta el sobrenadante y se resuspende el *pellet* (precipitado) celular en un tercio del volumen inicial con medio RF1 y suavemente con el vortex. De nuevo, se incuban los tubos 20 min en hielo y se realiza una centrifugación a 300 xg 15 min a 4 °C. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el *pellet* en un volumen 1/12,5 del volumen inicial con medio RF2. Se incuban finalmente en hielo 15 min y ya están listas para ser congeladas o transformadas. Para congelarlas, se alicuotan en tubos eppendorf en volúmenes pequeños (100 - 200 µl) y se congelan directamente en nitrógeno líquido para ser almacenadas a - 80 °C.

3.1.3.2. Transformación de bacterias competentes

Consiste en la incorporación de ADN exógeno por parte de las bacterias. Para la selección de aquellas bacterias que han incorporado correctamente el ADN exógeno, en nuestro caso, los ADNs que trabajamos poseen un gen de resistencia al antibiótico ampicilina.

El protocolo de transformación de células competentes se basa en el choque térmico, el cual consiste en mezclar el ADN que se quiere introducir con las bacterias, someterlas a frío y a continuación a un choque rápido de calor para seguidamente ser incubadas en hielo un breve tiempo antes de añadir medio de crecimiento.

Materiales y reactivos:

- Bacterias competentes.
- Plásmido.
- MgSO₄ 1M (esterilizado por filtración).
- Medio líquido Luria-Broth (LB) estéril.
- Placas de Agar/LB suplementadas con ampicilina (100 µg/ml), al ser el gen de resistencia del plásmido. Se añade al medio LB líquido un 1,5% de agar bacteriológico europeo (Condalab) (p/v), se autoclava y una vez se ha enfriado hasta unos 60 °C, se añade el antibiótico y se distribuye en placas. Se deja solidificar las placas y se conservan a 4 °C hasta su utilización.
- Tubos de propileno para el crecimiento de las bacterias.

Procedimiento:

Las bacterias competentes deben ser descongeladas en hielo, se necesita una alícuota de 100 µl de bacterias por transformación. La cantidad de ADN a emplear dependerá de su procedencia, si son plásmidos purificados por mini, midi o maxi-prep (kits de extracción de plásmidos) es necesaria una cantidad de 50 - 200 ng de ADN; pero si proceden de una ligación o mutagénesis es preferible emplear todo el producto resultante.

La transformación comienza con la mezcla de bacterias y ADN con suavidad que debe ser incubada en hielo 30 min. El choque térmico se realiza a 42 °C durante 1 min y 45 segundos (el tiempo puede variar según la cepa empleada). Inmediatamente después se pone la muestra 2 min en hielo, se añaden 0,8 ml de LB atemperado y estéril, y entonces se incuba a 37 °C en agitación durante 1 o 2 horas para que las bacterias crezcan en ausencia de antibiótico.

Una vez finalizada la incubación, se procede a la siembra de todo el cultivo en placas de agar LB con antibiótico, para así seleccionar las bacterias que hayan incorporado el plásmido. Se pueden añadir diferentes volúmenes de la transformación para conseguir un crecimiento de colonias aisladas. El cultivo es extendido con un asa de siembra (esterilizada con etanol al 70% y la llama en cada uso), y las placas son incubadas toda la noche (16 horas) a 37 °C.

Las colonias positivas al gen de resistencia pueden ser crecidas a su vez en medio LB líquido suplementado con el antibiótico adecuado a fin de amplificarlas y entonces aislar el plásmido y/o criopresevar las bacterias que lo contienen.

3.1.4. Obtención del ADN clonado

Para purificar los plásmidos a partir de cultivos bacterianos se utilizan kits comerciales; estos protocolos de aislamiento de ADN plasmídico pueden clasificarse con relación a la cantidad y pureza del plásmido que se obtiene. El kit mini-prep ofrece un protocolo rápido, pero con una cantidad pequeña e impura de plásmido, mientras que las midi o maxi-prep ofrecen más cantidad y más pureza. La obtención de grandes cantidades de ADN es realizada por nuestro técnico Jordi Seco Oller.

Para realizar una mini-prep (siguiendo el protocolo descrito del kit Macherey-Nagel) se requiere partir de un tubo con 3 ml de medio LB estéril suplementado con el antibiótico adecuado con bacterias transformadas con el plásmido de interés (y crecidas a 37 °C durante toda la noche).

Básicamente, los protocolos de extracción se basan en resuspender el *pellet* bacteriano, realizar una lisis alcalina y una neutralización en la que se descartan los restos celulares. Seguidamente, se une el ADN plasmídico a una resina de intercambio aniónico bajo las condiciones idóneas de pH y fuerza iónica, se realizan diversos lavados para eliminar el ARN, las proteínas y otras impurezas y entonces se eluye. Finalmente, se precipita el ADN con isopropanol y finalmente se resuspende en agua o tampón Tris-EDTA pH 8 en un volumen adecuado.

Los protocolos detallados son accesibles en la web y acompañan a los kits comerciales.

3.2. EXPRESIÓN HETERÓLOGA EN CULTIVOS CELULARES

El cultivo celular es la técnica por la cual las células procariontas o eucariotas son cultivadas en un entorno artificial *in vitro* sobre el cual es posible ejercer un control variable con la finalidad de preservar al máximo las propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas originales. El crecimiento controlado permite la caracterización y homogeneidad de la muestra y que por tanto tiene múltiples aplicaciones relacionadas con la actividad celular, estudios de interacción celular, terapia génica y una larga lista en la que se incluye nuestra finalidad, la expresión heteróloga a través de la cual produciremos nuestras proteínas recombinantes. Sin embargo, se ha de tener en cuenta que es una técnica sensible cuya manipulación requiere un alto nivel de esterilidad.

3.2.1. Cultivos celulares

Aunque de forma rutinaria el término “cultivo celular” se designa para nombrar a los cultivos de células de mamíferos, realmente engloba a todas las células como se acaba de mencionar. En esta

tesis se ha trabajado con células humanas, tanto de crecimiento en suspensión como adheridas; el uso de una u otra dependerá de los objetivos.

Condiciones de esterilidad:

La manipulación de cultivos celulares implica la adopción de toda una serie de medidas para poder garantizar al máximo las condiciones de esterilidad necesarias, para lo cual se deben seguir unas normas estrictas de limpieza. Tanto el material que entra en contacto con las células como la superficie de trabajo han de ser estériles, por eso es necesario trabajar bajo una campana de flujo laminar previamente esterilizada con radiación ultravioleta y limpiada con etanol al 70%.

Del mismo modo, todos los medios de cultivo, soluciones y materiales han de ser estériles, ya sea por filtración, autoclave o irradiación; por lo que para mantener estas condiciones en fundamental abrir todos estos materiales dentro de la campana.

Al terminar la manipulación de las células, la campana debe ser limpiada con etanol y expuesta a luz ultravioleta. Los restos biológicos que serán desechados deben ser tratados previamente con lejía al 30% y los materiales que se requieran usar a posteriori deberán ser autoclavados o esterilizados. Siguiendo todas estas medidas nos aseguramos mantener la viabilidad y la esterilidad del cultivo.

Instrumentación necesaria general:

- Campana de flujo laminar vertical con sistema de luz ultravioleta, sistema de aspiración de líquido mediante vacío y corriente eléctrica (Bio-II-A, Telstar).
- Congeladores (- 20 °C y - 80 °C).
- Instalación de criogenia (depósito de congelación gradual de células y tanque de nitrógeno líquido).
- Baño con termostato.

3.2.1.1. Células de mamífero

En el trabajo con células de mamíferos se puede distinguir entre una línea celular que consiste en cultivos sometidos a procesos de transformación que le permiten multiplicarse, y un cultivo primario que procede de células disgregadas a partir de un tejido original de un animal recientemente sacrificado.

Entre las líneas celulares más frecuentes en el campo de producción de proteínas se encuentran HEK293 y HeLa que han sido usadas para expresar las mismas proteínas recombinantes, pero con finalidad diferente.

Se ha decidido producir las proteínas en células humanas debido que las modificaciones post-traduccionales suelen ser diferentes en otros sistemas, y de este modo nos aseguramos que las proteínas recombinantes de origen humano se plegarán correctamente.

Sin embargo, siempre se suele intentar que el sistema de células de mamíferos no sea el elegido para producir la proteína recombinante de interés, ya que supone ser un sistema cuyas células crecen despacio, requieren un suministro constante de CO₂ (maquinaria para el crecimiento exigente), reactivos de crecimiento y transfección más costosos, y además presentan un rendimiento de expresión bajos y mayor tiempo de producción. Todo ello supone que sean sistemas altamente costosos en comparación con otros sistemas de expresión.

Los cultivos de células animales se pueden clasificar según su capacidad de adherencia. Es decir, que pueden crecer formando una monocapa, como es el caso de la mayoría de las células que provienen de órganos, o, al contrario, que pueden crecer en suspensión, como las células del sistema inmunitario o células mutantes producidas con el fin de usarlas como sistemas de expresión más económicos.

Material general:

- Incubador de células con una atmósfera controlada (5% CO₂, 95% O₂ y 37 °C de temperatura) con estantes para el trabajo con células adheridas e incubadores-agitadores (*shaker*) para el trabajo con células en suspensión (Anicell - N-Biotek Inc. Korea).
- Microscopio invertido (Nikon eclipse TS100).
- Cámara de Neubauer.
- Contador automático de células (*Countess II FL automated cell counter*, Invitrogen) y su correspondiente cámara (Invitrogen).
- Otros materiales como pipetas Pasteur de vidrio, puntas de micropipetas de diferentes tamaños, placas multi-pocillo de poliestireno de diferentes tamaños, placas de poliestireno de diferentes tamaños, frascos de poliestireno y erlenmeyers de poliestireno con tapa de filtro de diferentes tamaños (solo estas últimas son reciclables).

Mantenimiento general:

Aunque el trabajo, material y reactivos que requieren las células que crecen adheridas o en suspensión es por lo general diferente, hay algunos procesos que se realizan de la misma forma; son el caso de la congelación y descongelación de las células y la detección de contaminantes como micoplasma.

Los medios que se utilizan dependen de cada tipo celular; pero todos ellos se guardan a 4 °C hasta la fecha de caducidad que indica la casa comercial y, una vez suplementados, se mantienen como máximo un mes a esta temperatura. La suplementación consiste en la adición de sustancias como L-glutamina (aminoácido inestable con una vida media de 15 días a 4 °C), antibióticos o suero (stock mantenido a -20 °C). Antes de su uso, los medios celulares deben ser calentados a 37 °C en un baño para evitar someter a las células a estrés térmico.

Los antibióticos utilizados rutinariamente son la penicilina y la estreptomina; la primera es un agente bacteriostático que sólo elimina bacterias en crecimiento (inhibe la síntesis de peptidoglicanos de la pared bacteriana), y la segunda es un aminoglucósido que inhibe específicamente la síntesis proteica del ribosoma bacteriano 70S.

En nuestro caso, para las células crecidas en suspensión empleamos la geneticina, un antibiótico análogo a la neomicina que actúa sobre las células eucariotas inhibiendo la síntesis proteica y además se utiliza para seleccionar líneas celulares transfectadas de manera estable.

Congelación-Descongelación:

Aunque las líneas celulares están formadas por células que pueden multiplicarse de forma ilimitada, a medida que se van sucediendo los pases, estas van perdiendo sus características propias, y por razones prácticas y técnicas, es aconsejable mantener una reserva de células congeladas en nitrógeno líquido.

Para realizar la congelación manteniendo la viabilidad de las células es necesario el uso de crioprotectores como el glicerol o el DMSO (dimetilsulfóxido). Como norma general se utiliza como medio de congelación el propio medio de cultivo de la célula o el suero con el que se suplementa dicho medio, y al cual se le añade un 10% de DMSO estéril. Para el caso de las células en suspensión la congelación se ha realizado en su propio medio (recién añadido y sin antibiótico), pero para las células HeLa se ha empleado suero.

Materiales y reactivos:

- Medio de congelación.
- DMSO estéril (Sigma).
- Tanque de congelación gradual de isopropanol.
- Criotubos de 2 ml (Sigma-Aldrich, Merck).

Procedimiento:

En el proceso de congelación se requiere que las células estén en suspensión; para el caso de las células adheridas se requerirá realizar una tripsinización y resuspensión en el medio de congelación (se explicará más adelante). Para cualquiera de los casos, el volumen del medio de congelación dependerá de la capacidad de las células para dividirse, así, para de una línea celular altamente proliferativa como HeLa, cada frasco se puede resuspender en 4 - 6 ml de medio de congelación, pero si la línea celular se caracteriza por tener poca capacidad proliferativa, se empleará 1,5 - 3 ml de medio de congelación. Por su lado, las células que crecen en suspensión serán crecidas hasta una concentración de 1×10^6 de células por ml de medio y centrifugadas para ser resuspendidas en 1/10 del volumen inicial, sobre al cual se añadirá un 10% de DMSO.

Hay que tener en cuenta que el DMSO, así como otros crioprotectores, resulta tóxico para las células, por lo que será necesario realizar toda esta manipulación lo más rápido posible hasta que los criotubos con las células sean guardados en el depósito de congelación gradual y finalmente trasladadas a un congelador de - 80 °C; también es posible almacenarlas en un tanque de nitrógeno líquido. Además, para aumentar la supervivencia celular, es muy importante que el proceso de congelación sea lento, por lo que se recomienda el uso del tanque de isopropanol en el que la temperatura disminuye 1 °C por minuto.

Cuando se requiera volver a crecer los cultivos celulares congelados; la descongelación, por lo contrario, debe ser rápida para que las células estén el mínimo tiempo posible con el DMSO. Para ello se descongelan en un baño a 37 °C y se traspasan a un tubo tipo Corning de 15 ml que previamente hemos llenado con 10 ml del medio de cultivo atemperado. Las células se precipitan por centrifugación a 350 xg durante 5 min, el sobrenadante es eliminado (donde se encuentra DMSO) y finalmente se resuspende el *pellet* celular con medio fresco (y atemperado) para entonces sembrarlas.

Detección de micoplasma:

Las contaminaciones de los cultivos celulares por lo general son fácilmente detectables ya que se producen cambios de turbidez, color, olor y comportamiento; pero el parásito celular micoplasma puede afectar a los cultivos celulares sin mostrar indicios aparentes de contaminación. Por ello, es aconsejable realizar periódicamente una prueba que sea capaz de detectarlo.

En este trabajo (realizado por nuestro técnico Jordi Seco Oller) se ha utilizado el *EZ-PCR Mycoplasma Test Kit* (Biological, Industries Co.) o el *LookOut mycoplasma PCR detection kit*, ambos basados en la amplificación por PCR del genoma del parásito. Estos kits contienen oligonucleótidos capaces de amplificar una secuencia en las ocho especies más comunes de micoplasma y para lo cual solo se requiere 1 ml de medio de cultivo que ha estado al menos 48 h en contacto con las células.

3.2.1.2. Células con crecimiento adherido

La línea celular de crecimiento adherido que se ha trabajado durante la presente tesis es la línea celular **HeLa** (ATCC CCL-2) (Dubbs y Scherer, 1969) que procede de un adenocarcinoma de cérvix humano y tiene incorporadas secuencias del papilomavirus humano 18 (HPV-18). Se han empleado para la expresión de diferentes proteínas recombinantes, nativas y mutantes, con la finalidad de realizar estudios funcionales.

Reactivos:

El medio de crecimiento empleado es el medio DMEM *Dulbecco's modified Eagle medium* (Gibco), un medio basal consistente en aminoácidos, vitaminas, D-glucosa (4,5 g/l), L-glutamina, piruvato, sales y un indicador de pH. Debe ser suplementado con:

- 10% (v/v) de Suero Bovino Fetal, FBS, (Life Technologies - ThermoFisher) previamente inactivado 3 min a 56 °C.
- Penicilina/estreptomicina (100x) (Life Technologies - ThermoFisher). Concentración stock 10.000 U/ml. Concentración de uso 50 U/ml.
- HEPES 1,25 M y pH 7,4; filtrado a través de filtros 0,22 µm y guardado a - 20 °C.

Estas células son ampliamente utilizadas para el estudio de diferentes proteínas expresadas de manera heteróloga ya que proliferan muy rápido; es necesario pasarlas un mínimo de dos veces por semana. Es importante tener en cuenta que el número de pases afecta a la eficiencia de transfección transitoria, de modo que a partir del pase 35 - 40, el porcentaje de células transfectadas disminuye considerablemente. El pase de las células adheridas se debe realizar mediante tripsinización y replaqueo para poder renovar el medio.

Pase celular: tripsinización y replaqueo

El cultivo de líneas celulares adheridas implica la propagación de células en superficie, las cuales se adhieren formando una monocapa celular. Cuando el cultivo llega a confluencia o el medio ha perdido sus nutrientes es necesario realizar un replaqueo para asegurar su viabilidad. La tripsinización es el proceso por el cual se produce la disgregación de las células enzimáticamente permitiendo el replaqueo y renovación del medio.

Medios y reactivos:

- Tripsina Versene (Life Technologies - ThermoFisher). Compuesta por EDTA 200 mg/l y tripsina 500 mg/l (1:250).
- Tampón PBS: NaCl 140 mM, KH₂PO₄ 2,7 mM, Na₂PO₄ 8,1 mM; pH 7,4.
- Medio de cultivo correspondiente al tipo celular empleado, en nuestro caso DMEM suplementado.

Procedimiento:

Las células se mantienen dentro de un incubador a 37 °C en frascos de 75 cm² de superficie. Una vez las células llegan a la confluencia deseada, se extrae el medio que cubre las células con la bomba de vacío y se hace uno o dos lavados con 10 ml de PBS a temperatura ambiente para evitar que el suero del medio interfiera con la tripsina.

Una vez aspirado el último lavado, se añaden entre 1 y 3 ml de tripsina (según el tipo celular) dejándose actuar a 37 °C un tiempo entre 2 y 20 minutos (según también el tipo celular) hasta que se observa que la monocapa de células se ha desenganchado completamente de la superficie (para facilitar este proceso se puede someter a la placa a ligeros golpes). Este tiempo nunca puede ser superado ya que la tripsina puede causar daño celular.

A continuación, se añaden 10 ml del medio correspondiente inhibiendo así cualquier acción enzimática posterior, entonces comienza la disgregación mecánica intercelular con una pipeta de plástico y con el fin de obtener una suspensión homogénea.

Estas células son añadidas de nuevo a los frascos o placas de cultivo en función de la cantidad y del tiempo en el que necesitemos las células. Si lo que se pretende es el mantenimiento de la línea celular, se traspasan entre 0,5 - 1 ml de dicha suspensión a frascos de 75 cm² (y añadiendo 10 ml de medio de cultivo fresco). Si en cambio lo que queremos es realizar ensayos, se siembran placas de diferente medida según el ensayo que se quiera realizar, teniendo en cuenta el número de células por mililitro que corresponda en cada caso. Normalmente para hacer ensayos de transporte, como en nuestro caso, se siembran placas multi-pocillo de 24 pocillos que se llenan con 0,5 ml de medio por pocillo.

3.2.1.3. Células con crecimiento en suspensión

Las líneas celulares de crecimiento en suspensión trabajada durante esta tesis como sistema de expresión son la línea **HEK293-6E** (CVCL HF20) (Loignon *et al.*, 2008) y la línea **HEK293-6E-del-MGAt** (proporcionada amablemente por el Dr. Joop van den Heuvel de la instalación de producción de muestras de proteínas de Helmholtz (PSPF)); nombrada a partir de ahora como **HEK293-MGA**.

Las células HEK293 proceden de células de riñón embriogénico humano y son ampliamente utilizadas debido a su alto ratio de transfección y rápido crecimiento. Además, las líneas que estamos utilizando difieren de la línea original ya que están adaptadas a un crecimiento en suspensión, a su vez las células HEK293-MGA presentan déficit de glicosilación. Para producir estas últimas, se generó una deleción de 406 pb en el gen MGAT1 utilizando tecnología CRISPR / Cas9 para eliminar el gen (manuscrito en preparación).

El crecimiento en suspensión es mucho más económico si nuestro objetivo es producir proteína, puesto que al mismo tiempo se tiene mayor cantidad de células por mililitro de cultivo, mayor volumen de cultivo por espacio en el incubador, y además supone un gran ahorro en plásticos (no solo se emplea menos plásticos sino que los erlenmeyers que se emplean pueden ser reutilizados varias veces).

Reactivos:

El medio de crecimiento empleado es un medio de expresión, F17 Freestyle (Gibco), un medio sin suero específico y de expresión de cultivos cuyo crecimiento es en suspensión. Debe ser suplementado con:

- 4 mM de L-glutamina 200 mM (Life Technologies - ThermoFisher).
- 1% ácido plurónico 100x (Sigma Aldrich - Merck).
- 50 mg/ml geneticina (G-418 sulfato, Gibco). Guardada a 4 °C y protegida de la luz.

Debido a la rápida proliferación de estas células es necesario sub-clonarlas unas tres veces por semana, en la mayoría de los casos cada 48 horas. La primera diferencia entre un cultivo que crece en adhesión y uno que crece en suspensión son los criterios utilizados para decidir cuál es el momento adecuado para realizar un pase celular, nombrado como tripsinización y replaqueo en el apartado de células adheridas.

Al crecer en suspensión y no poder ver directamente en el frasco que contiene el cultivo qué confluencia presentan las células; resulta obligatorio contar las células para calcular la concentración. El conteo celular se puede realizar manualmente con la cámara de Neubauer (Merck) o de forma automática mediante el *Cell counter*; para ambos métodos se prepara una disolución 1:1 con el cultivo celular y el tinte azul tripano (0,4% - Gibco). El tinte azul se introduce en las células que presentan la membrana plasmática rota, facilitando así la identificación de las células muertas.

Pase celular:

Hemos seguido los parámetros de pase y renovación de esta línea celular cada vez que alcanzaba la concentración de 2×10^6 cel/ml, aunque pueden tolerar concentraciones de hasta 5×10^6 cel/ml antes de que los nutrientes del medio escaseen y la mortalidad aumente considerablemente. El pase de las células crecidas en suspensión es mucho más sencillo que el de las células adheridas, ya que consiste únicamente en diluir las células hasta una concentración de $0,5 \times 10^6$ cel/ml (aunque toleran mínimo de $0,35 \times 10^6$ cel/ml). De modo que, en este caso, el paso celular consiste en diluir el cultivo celular 4 veces.

Si nuestro objetivo es mantener la línea celular solo hay que añadir a un erlenmeyer pequeño 7,5 ml de cultivo celular y 22,5 ml de medio F17 Freestyle suplementado. Si por lo contrario queremos expandir las células para tener mayor cantidad, se añadirá todo el volumen de cultivo y 3 veces este volumen de medio F17; si las células están en un erlenmeyer pequeño con 30 ml a 2×10^6 cel/ml de concentración, se trasvasa este volumen a un erlenmeyer mediano con 90 ml de medio F17 suplementado.

Al igual que con las células adherentes, es importante tener en cuenta que el número de pases afecta a la eficiencia de transfección transitoria, de modo que a partir del pase 20, el porcentaje de células transfectadas disminuye considerablemente.

3.2.2. Introducción del ADN exógeno

Una vez tenemos el plásmido con la proteína recombinante de interés y las células donde vamos a realizar la expresión están preparadas, pasamos a introducir este ADN en su interior. Los vectores en donde se encuentran insertadas estas proteínas deben ser vectores que induzcan la expresión del inserto (con secuencia de iniciación que promuevan la expresión) y ser específicos del tipo celular al

que se van a introducir, puesto que la maquinaria de transcripción es diferente según el sistema de expresión.

Este proceso se conoce generalmente como transformación, aunque cuando se trata de células eucariotas es denominado más específicamente como transfección. Cualquiera de los métodos supone la entrada del ADN y su expresión directa (nuestro objetivo en este caso, aunque existe una variante por la cual la célula incorpora el ADN en su propio genoma convirtiéndose en una línea celular estable).

Además, en nuestro caso, las proteínas recombinantes poseen al final de su secuencia proteica y antes del codón de parada (*stop*), una secuencia que codifica una proteína fluorescente verde, la molécula GFP (por sus siglas en inglés, *Green Fluorescent Protein*) y que permite monitorizar la eficacia de transfección (y posteriormente la de purificación).

Existen varios métodos generales de transfección de las células de mamíferos; en sentido amplio se pueden clasificar en métodos químicos, físicos y biológicos. Los primeros aglutinan técnicas como aquellas que emplean fosfato cálcico o el de lipofección entre otros y están basados en la formación de complejos que las células pueden adquirir. Entre los métodos físicos se encuentran los de microinyección, electroporación y biobalística, en donde se introduce el ADN exógeno de forma mecánica. Y, por último, los métodos biológicos están basados en procesos naturales como la infección vírica.

3.2.2.1 Transfección transitoria

Para poder expresar las proteínas transportadoras que se han estudiado durante esta tesis, la introducción del ADN en las células de mamíferos se ha realizado de forma transitoria. En este trabajo se ha utilizado el método de transfección mediado por lipofectamina para las células HeLa adherentes y el método basado en la introducción de un co-precipitado de ADN exógeno y PEI MAX para el caso de las células en suspensión.

Transfección por Lipofectamina (Invitrogen):

Como ya se ha anunciado, para las células adheridas de la línea celular HeLa se ha empleado el reactivo de transfección lipofectamina, que se basa en la lipofección para introducir el ADN en el interior celular mediante la formación de liposomas catiónicos. La lipofectamina contiene partículas de lípidos que pueden formar liposomas en un ambiente acuoso, permitiendo así la introducción del ADN en la célula sin la propia repulsión electrostática que este ocasionaría si no se encontrara embebido por lípidos.

Procedimiento:

En el momento de la transfección con lipofectamina las células deben encontrarse a un 70% de confluencia y el medio se debe cambiar por uno sin suero y sin antibiótico para evitar interferencias con la eficiencia de transfección o la viabilidad celular.

La cantidad de ADN y lipofectamina que es necesario usar depende de la línea celular con que se esté trabajando, en nuestro caso, HeLa. HeLa es una línea celular en monocapa que se transfecta con facilidad por lo que requiere entre 0,1 - 0,2 µg de ADN por cm² de cultivo celular (si se trata de una transfección doble o triple, se mezclan cantidades equimolares de ADN).

Para el caso de una placa p24 (24 pocillos de 2 cm² cada uno) se prepara un volumen total de 100 µl de medio sin suplementar por pocillo y se añade la cantidad de ADN y lipofectamina necesarias en cada caso; se agita bien la mezcla de ADN y lípidos y se deja reposar durante 20 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se distribuye la solución de transfección gota a gota sobre las células, se agitan y se incuban 4 horas (lo cual depende del tipo celular), entonces se cambia el medio de cultivo por medio suplementado.

Transfección por PEI MAX:

El único reactivo necesario para este tipo de transfección es el PEI MAX mw 40.000 (Polysciences Europe GMBH). Es un producto que se encuentra en polvo y contiene polietilenimina, que gracias a su carácter policatiónico carga positivamente el ADN facilitando que este se una a la superficie aniónica de las células y así esta pueda endocitarlo. Su concentración de stock es 1 mg/ml, que debe ser filtrado y guardado a 4 °C.

La transfección de las células HEK293-6E se puede realizar cuando las células se encuentran en fase de crecimiento exponencial y además presentan una homogeneización en el tamaño de unas 20 µm de diámetro; este tamaño es medido en el *cell counter*.

En busca del protocolo de transfección en el que haya una menor mortalidad con una mayor cantidad de proteína expresada (calculada a partir del porcentaje de células transfectadas y la medida de señal por partícula a través del análisis en el citómetro de flujo, gracias a la GFP que tienen incorporada las subunidades ligeras), se han realizado transfecciones con modificaciones en la concentración celular de los cultivos, la ratio ADN:PEI MAX, el tiempo de pre-incubación de esta mezcla y la cantidad de PEI MAX necesario por ml de cultivo celular.

Procedimiento:

El procedimiento representativo de este tipo de transfección se inicia con la preparación de las células a la concentración y volumen necesarios y la mezcla de transfección con 1 µg de ADN y 4 µl de PEI MAX (4 µg de PEI MAX por ml de cultivo celular). Esta mezcla se deja reposar entre 3 y 5 min a temperatura ambiente para promover el recubrimiento del ADN de cargas positivas y entonces se añade de forma proporcional a todo el cultivo celular.

3.2.3. Expresión de la proteína heteróloga

Una vez se ha introducido el plásmido que contiene la proteína recombinante de interés, la célula está preparada para comenzar el proceso de expresión, el cual puede ser inducido o no.

Cuando la expresión de la proteína recombinante esté en marcha, ya sea inducida o no, la tasa de reproducción de las células desciende drásticamente, y por ello es esencial que el volumen de cultivo sea de la escala requerida antes de que la expresión comience. En ambos casos, la expresión de la proteína tendrá un momento máximo de producción, momento en el que se realizará la recogida del cultivo celular (*harvesting*).

Las expresiones realizadas en esta tesis en células de mamíferos ya sean HeLa o HEK293, no son inducibles, lo que quiere decir que una vez ha sido introducido el ADN, la maquinaria de síntesis proteica comienza a producir la proteína recombinante.

Para las células HeLa este tiempo de expresión ha sido de 24 horas, mientras que para las proteínas expresadas en HEK293-6E se han realizado expresiones con diferentes tiempos, de 24, 42, 48 y 72 horas con el fin de determinar el tiempo de expresión exacto para obtener mayor cantidad de proteína.

Recogida del cultivo celular:

Para el caso de las células HeLa como la finalidad de las proteínas recombinantes expresadas es realizar ensayos funcionales con radiactividad no es necesario recoger las células, ya que estos ensayos se realizan sobre la placa.

Por su parte, la proteína expresada en las células HEK293 debe ser purificada para realizar estudios estructurales, de estabilidad y de función mediante su reconstitución en liposomas, por lo que una vez ha terminado el tiempo de expresión, el cultivo celular debe ser recogido.

En todas las expresiones se han recogido alícuotas de la suspensión celular, así como esta misma suspensión lavada con PBS en el mismo volumen, ambas para ser analizadas por citometría de flujo, por fluorescencia en placa en el fluorímetro de placas (Tecan), así como por el *cell counter* para medir la mortalidad y por tanto la cantidad de células vivas. Tener estos datos nos permitirá tener monitorizadas las expresiones y poder comparar sus distintas eficacias.

El citómetro de flujo (Gallios - Beckman Coulter) emplea una luz láser para realizar un recuento y clasificación de las células según sus características morfológicas o presencia de marcadores, en nuestro caso GFP. Gracias a ello, obtenemos el porcentaje de células del grupo de supervivientes, así como la intensidad de señal de GFP que emite cada una de estas células (el resultado es la media). Por su lado, el fluorímetro Tecan mide la fluorescencia debida a la GFP en una placa oscura; estas mediciones se realizan sobre duplicados de 100 µl de medio de cultivo y de células lavadas con PBS (el medio emite fluorescencia intrínseca).

El resto del cultivo celular es trasvasado a vasos de centrifuga (diferentes tamaños según el volumen de cada expresión) y centrifugados a 500 xg durante 15 min a 4 °C; el sobrenadante es descartado y el *pellet* celular es lavado suavemente por PBS el cual será separado mediante una centrifuga a 500 g durante 15 min a 4 °C. Este último *pellet* es congelado y guardado en el congelador de - 80 °C hasta su uso.

3.3. ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS HETERÓLOGAS

El objetivo principal de esta tesis es caracterizar, estructural y funcionalmente, la proteína transportadora de aminoácidos humana 4F2hc/LAT2, para lo cual esta debe ser purificada. Además, para que en los estudios realizados tengamos la certeza de que la proteína con la que se está trabajando tiene una alta calidad se deben realizar una serie de análisis de estabilidad.

3.3.1. Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad

La técnica de purificación por cromatografía de afinidad consiste en la unión de la proteína de interés (a través de sus *tags*, etiquetas) a una resina para así ser separada del resto de la mezcla de proteínas y entonces ser recuperada al añadir un reactivo que sea competidor de esta unión. Por tanto, esta técnica se basa en una separación física de la proteína desde una mezcla líquida a través de una interacción fuerte (entre proteína y resina; sustancia diana y ligando) pero reversible.

Por lo general, todas las purificaciones realizadas en este laboratorio constan de varios pasos; lisis o solubilización con detergente de las células o extracto membranal, separación de la fracción rota o solubilizada seguida de la doble cromatografía por afinidad al estar la proteína formada por dos subunidades.

Material y reactivos:

- Tris pH 7,4 (Sigma Aldrich) y NaCl (Sigma Aldrich), para preparar la solución tamponadora (*tampón*) con las concentraciones específicas de cada purificación.
- Glicerol (Sigma Aldrich).
- Detergentes: decilmaltósido (DM, Anatrace), dodecilmaltósido (DDM, Anatrace) y digitonina (Calbiochem - Merck) y suplementos como el colesterol hemisucinato (CHS) (*Cholesteryl Hemisuccinate tris salt*, Quimigen). Los detergentes son solubilizados en agua, pero el colesterol requiere ser sometido a varios ciclos de sonicación.
- Inhibidores como ADNasas (Life technologies - Thermofisher) y proteasas (PefabloC - Sigma Aldrich).
- Resina Streptactin-superflow (IBA) y resina Ni-NTA de agarosa (Werfen España S.A.U.).
- D-destiobiotina (IBA) e imidazol 5M (Sigma Aldrich) para eluir las proteínas unidas a las resinas.
- Tampón 3C (Tris/HCl 20 mM, NaCl 100 mM, imidazole 20 mM, DTT 1 mM y EDTA 0,5 mM) y proteasa HRV-3C (IRB Barcelona Protein Expression Core Facility, Barcelona, Spain) (enzima de corte de la diana 3C, situada en las subunidades ligeras).
- Kit comercial de desalado en columna, *PD-10 desalting column* (VWR International Eurolab).
- Sonicador Branson SFX550 para la preparación de detergentes.
- Columnas cromatográficas de 50 ml y 25 ml de capacidad (Bio-rad Laboratories).
- Tubos de 25 ml de ultracentrífuga (Beckman Coulter).
- Concentradores Amicon de 15 ml, de 4 ml y de 2 ml con tamaño del poro de 30 y 100 kDa (Sartorius y Merck).
- Filtradores por centrifugación de 1,5 ml y tamaño del poro 0,2 μm (Corning).
- Placas de 96 pocillos negra y fluorímetro Safire 2 (Tecan Austria GmbH).

3.3.1.1. Purificación del heterodímero

Con el objetivo de obtener una mayor cantidad de proteína purificada estable, en la purificación del heterodímero formado por 4F2hc y una subunidad ligera se han realizado varias modificaciones dentro del protocolo general de una purificación por cromatografía de afinidad.

Se ha variado el detergente, los tiempos de solubilización, la ratio entre la cantidad de células (en unidad) por cantidad de detergente (en mg) y la concentración de Tris y de sales. El resultado de todos estos cambios ha sido monitorizado a través de la medida de la fluorescencia de las fracciones

recogidas de cada paso de la purificación, para así obtener fácilmente conclusiones sobre la conveniencia de tales cambios.

Procedimiento:

Un protocolo de purificación típico parte de las células congeladas que han expresado la proteína de interés, que son resuspendidas en tampón Tris/NaCl con cierta cantidad de detergente y ADNasas. Este periodo de solubilización de las células (sin lisis celular ni fraccionamiento membranal) se debe realizar en movimiento (con un orbital vertical, horizontal o una muesca metálica que gira) un tiempo determinado.

A continuación, antes de la doble y secuencial cromatografía de afinidad se debe realizar un paso de ultracentrifugación a 200.000 xg durante 1 hora a 4 °C para separar la fracción no solubilizada de la fracción solubilizada que consistirá en micelas de detergente con proteínas sumergidas en él, en su interior. A partir de este momento el tampón que se empleará contendrá las mismas concentraciones de Tris y de NaCl, pero una concentración mucho menor de detergente, por lo general 2xCMC (*critical miceller concentration*); este es denominado tampón de purificación.

Antes de realizar la cromatografía de afinidad, las resinas (Streptactin y Ni-NTA) deben ser preparadas, para ello se coloca la cantidad que requiramos de cada una en una columna de cromatografía, se deja eluir el etanol que las mantenía en stock y se lava con agua y tampón Tris/NaCl que se está empleando durante la purificación (un volumen de columna cromatográfica para cada de lavado).

Entonces, en primer lugar, la muestra (sobrenadante de la ultracentrifugación) es incubada con la resina Streptactin durante 2 horas a 4 °C y en movimiento. Transcurrido ese tiempo, se vierte todo el volumen de la muestra en la columna cromatográfica, se deja eluir todo el volumen (correspondiente a todas las proteínas no afines a esta resina, que no poseen etiqueta Strep), se lava la resina con un volumen de columna con tampón de purificación y la recuperación de las proteínas afines a esta resina se realiza con un volumen de columna de tampón de purificación con 2,5 mM de D-destiobiotina (reactivo competidor).

Esta elución es incubada con la resina Ni-NTA para realizar el mismo proceso, se deja en movimiento durante 2 horas a 4 °C y se vierte a la columna. La resina precipita mientras cae la parte de la muestra que no se une a esta resina (por no poseer cola de histidinas), se lava la resina con un volumen de columna con tampón de purificación con 20 mM de imidazol (es una resina menos específica) y entonces se lava con tampón 3C ya que se procederá a cortar la diana del mismo nombre.

La resina Ni-NTA con las proteínas unidas por la cola de histidinas son recogidas con un volumen de resina de tampón 3C, para ser colocadas en un eppendorf adonde se añadirá la proteasa 3C. Se incuba toda la noche a 4 °C y en movimiento.

Al día siguiente se vierte todo el volumen en una columna y el primer volumen eluido corresponderá a la proteína purificada pero que no posee cola de histidinas (y por ello tampoco GFP) ya que acaba de ser separada de estas secuencias por el corte realizado en la diana 3C. Realizar este corte es una forma de obtener una proteína mucho más pura al separar aquellas proteínas que han podido unirse a la resina Ni-NTA de manera inespecífica.

Una vez eluída la proteína cortada, esta es concentrada en el concentrador de 1,5 ml con un tamaño de poro de 100 kDa; finalmente la muestra debe ser filtrada previamente a la cuantificación. La cuantificación de las proteínas es realizada por NanoDrop (ThermoFisher scientific); la medida es dada en mg/ml sin embargo debe ser corregida por el coeficiente de extinción molar, 1,52 en el caso del transportador con el que estamos trabajando.

En el caso de que no se requiera eliminar el GFP de la proteína la parte final de protocolo es diferente. Una vez lavada la muestra en resina Ni-NTA, en vez de emplear tampón 3C para recuperar la proteína, se añade el mismo tampón de purificación pero con 350 mM de imidazol. Sin embargo, el imidazol puede inestabilizar la proteína de interés y debe ser eliminado; para cambiar el tampón en el que se encuentra la proteína por el tampón de purificación inicial se realiza un desalado con el kit *PD-10 desalting column*, siguiendo el protocolo del fabricante.

3.3.2. Análisis de expresión y de estabilidad

Para que en los estudios estructurales se alcance una resolución alta es fundamental partir de una muestra altamente homogénea para lo cual se requiere que la proteína de estudio presente un nivel alto de estabilidad. Además, el presente proyecto comenzó con varios heterodímeros humanos con el fin de encontrar el candidato que presentara una mayor expresión y estabilidad para proceder a su estudio.

Para realizar de una forma más eficiente, rápida y directa los análisis de expresión y estabilidad de estos candidatos, estos presentan unida a la secuencia proteica de la subunidad ligera la moléculas GFP, que como anteriormente se ha mencionado, permite su seguimiento/monitorización a través de la expresión y la purificación.

3.3.2.1. Análisis de fluorescencia por cromatografía de exclusión por tamaño (FSEC)

El análisis conocido comúnmente como FSEC (*Fluorescence Size Exclusion Chromatography*) (Kawate y Gouaux, 2006; Drew *et al.*, 2008) nos permite conocer la capacidad de solubilización que pueden tener diferentes detergentes o, como la variación de su cantidad o tiempo de acción afecta a la proteína de interés a través de una diferente distribución en una cromatografía de exclusión por tamaño.

El análisis FSEC es una técnica rápida que, partiendo de una baja cantidad de cultivo celular analiza la homogeneidad de la muestra. Sin embargo, como realmente la proteína no se encuentra pura en la muestra, su estabilidad no viene representada por la curva mostrada en el *AKTA purifier* (Marshall scientific). Las fracciones recogidas deben ser analizadas por fluorescencia para poder obtener la curva real de tamaño de la proteína que revelará su homogeneidad y estabilidad. Por tanto, también mediante este análisis es posible analizar el comportamiento de diferentes muestras bajo las mismas condiciones o de una misma proteína bajo diferentes condiciones.

Esta técnica también permite analizar la cantidad de proteína que es posible solubilizar a través de la diferencia entre la fluorescencia que presenta la muestra al inicio de la solubilización y tras una ultracentrifugación por la cual se separa la fracción no solubilizada (*pellet*) de la sí solubilizada (sobrenadante). Es este sobrenadante el que es separado por cromatografía de exclusión por tamaño (en el AKTA) para a continuación analizar la fluorescencia que emite.

Para realizar un análisis FSEC se parte de una pequeña cantidad de cultivo celular, se han realizado varias pruebas que podían partir de 2 ml o de 15 ml de cultivo ya que esta técnica ha sido empleada para determinar qué cantidad de células (en millones) era óptima para cierta cantidad de detergente. Del mismo modo, para determinar el diferente comportamiento de la proteína bajo diferentes condiciones se han empleado diferentes detergentes y tiempos de solubilización, y siempre a 4 °C. Una vez transcurrido el tiempo de solubilización, las muestras son ultracentrifugadas a 200.000 xg durante 1h a 4 °C; el sobrenadante es recogido y analizado por SEC empleando la columna Superose 6 10/300 GL (GE Healthcare) de 24 ml de capacidad y flujo de 0,500 ml/ml. Se recogen fracciones de 100 µl en una placa oscura de 96 pocillos que es analizada en el fluorímetro Safire 2 Tecan; la fluorescencia es medida en RFUs (*Relative Fluorescence Units*) y representada en tablas Excel.

3.3.2.2. Análisis por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

En análisis por cromatografía de exclusión por tamaño o SEC (*Size Exclusion Chromatography*) muestra una curva representativa de la homogeneidad de la muestra de la cual podemos deducir que cuanto más estrecho y simétrico sea el pico mostrado, más monodispersa es la muestra. Si por lo contrario el pico mostrado es ancho o presenta hombros o dobles picos querrá decir que la proteína presenta polidispersión, que la muestra está formada por diferentes conformaciones o estados de la proteína.

Del mismo modo, la monodispersión mostrada en la SEC y la estabilidad suelen estar correlacionadas, por lo que si la dispersión de la proteína es mala, quiere decir que no presenta una única conformación estable, sino que se desestabiliza y presenta varias conformaciones o estados. Como ya se ha mencionado, para los estudios estructurales es fundamental una proteína monodispersa de modo que el análisis de SEC es fundamental para saber si la proteína es una buena candidata para este tipo de estudios.

Al contrario que el análisis por FSEC, el cual partía de una muestra solubilizada de una pequeña cantidad de cultivo, para la SEC se debe partir de una cantidad mayor y purificada para así tener un buen análisis de la dispersión por tamaño de la proteína. La máquina empleada para realizar el análisis por SEC es el *AKTA purifier* el cual requiere una cantidad mínima de 0,01 mg de proteína para poder detectarla. Durante esta tesis se ha trabajado con cantidades desde 0,1 a 2 mg.

Según el tamaño de la proteína a la cual queremos hacer un análisis, la cantidad de muestra de partida o la capacidad de separación que requerimos se han empleado la columna Superdex 5/150, de 3 ml de capacidad.

3.3.3. Detección de la proteína

Tras todos los análisis anteriormente descritos es importante realizar alguna técnica que determine que efectivamente estamos trabajando con nuestra proteína de interés, y no, por ejemplo, con contaminaciones. Del mismo modo, a través de estas técnicas conoceremos el grado real de pureza de la proteína o si, al tratarse de un heterodímero formado por dos subunidades, el grado de rotura en sus dos componentes.

3.3.3.1. Electroforesis en SDS-PAGE

La electroforesis de proteínas en un gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) es uno de los sistemas más utilizados para separar proteínas en función de su masa molecular (Laemmli *et al.*, 1970). Previamente a la electroforesis, se añade tampón de carga a la muestra de proteínas, que contiene una cantidad de SDS (sodio-dodecilsulfato) suficiente para desnaturalizarlas y conferirles carga negativa, pero manteniendo la relación carga/masa constante. Así, cuando las muestras, una mezcla de proteínas que puede tener diferentes grados de pureza, son sometidas a un campo eléctrico establecido es posible resolverlas en función de su tamaño.

En este tipo de electroforesis se deben preparar dos geles de diferente pH y concentración de acrilamida: gel concentrador (*stacking*) y gel separador (*running*). En el gel concentrador las proteínas se mueven muy rápido debido al gran tamaño de poro, tiene como objetivo que todas ellas entren en el gel separador a la vez. Por otro lado, el porcentaje de acrilamida del gel separador es modificable según la masa molecular de las proteínas que interese separar; del modo que se emplearán geles con porcentaje alto de acrilamida (12 - 15%) cuando las proteínas de interés sean pequeñas (20 - 50 kDa) y geles con porcentaje bajo (6 - 8%) cuando las proteínas sean más grandes (120 - 150 kDa).

Además, es esencial que, en paralelo a las muestras, sea cargado lo que conocemos como *ladder*, un marcador de peso/tamaño molecular para así calcular el tamaño molecular de las proteínas que se han separado. Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas del gel pueden ser detectadas específicamente mediante Western blot o el gel puede ser teñido completamente para que todas las proteínas presentes sean mostradas.

Reactivos y materiales:

- Tampón de electroforesis: Compuesto por Tris 250 mM, glicina 1,9 M y 1% SDS.
- Tampón de carga (tampón de carga Laemmli, LSB): Compuesto por Tris 320 mM pH 6,8, 10% SDS, 0,01% azul de bromofenol y 50% glicerol. Antes de su uso, se debe añadir como agente reductor 10% 2-mercaptoetanol.
- Marcador molecular o *ladder* (Life Technologies – Thermofisher). Contiene pesos moleculares entre 10 y 260 kDa.
- DTT (ditiotreitól).
- Isopropanol.
- Aparato de PAGE: Sistema MiniProtean (Biorad) equipado con una fuente de voltaje.
- Geles de acrilamida: Se preparan al momento con una solución comercial de acrilamida-bis-acrilamida al 8 o 15% según preferencias (Sigma Aldrich).
 - Gel separador: Compuesto por acrilamida (porcentaje según intereses), Tris 375 mM pH 8,8, 0,1% SDS; 0,1% persulfato amónico y TEMED 2,2 mM.
 - Gel concentrador: Compuesto por 3,3% acrilamida, Tris 125 mM pH 6,8, 0,1% SDS; 0,1% persulfato amónico y TEMED 6,6 mM.

Procedimiento:

- 1) Preparación de las muestras: La cantidad necesaria de proteína ha de ser determinada experimentalmente en cada caso (su origen, su pureza o la sensibilidad de sus anticuerpos lo determinan). Se debe tener en cuenta el volumen máximo que es posible cargar en cada pocillo,

aquellos procedentes de un peine de 10 huecos cabe un máximo de 50 μ l y en uno procedente de un peine con 15 huecos, caben unos 20 μ l.

Además, las muestras deben contener tampón de carga LSB que suele estar preparado a 4x o 2x. Es importante que la valoración de proteína de las muestras sea precisa para garantizar una carga homogénea, generalmente se añaden entre 2 y 50 μ g de proteína. Cuando las muestras se tratan con DTT (para eliminar puentes disulfuro), éste se añade sobre la muestra con LSB a una concentración final de 100 mM.

Antes de cargar las muestras, se deben hervir a 95 °C durante 5 min.

- 2) Preparación de los geles: El sistema de electroforesis empleado es el MiniProtean II SDS-PAGE de Biorad y el montaje de los vidrios se realiza siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez añadido el TEMED (agente catalizador de la polimerización), se introduce el gel separador con una pipeta Pasteur entre los dos vidrios hasta que ocupe $\frac{3}{4}$ partes de ellos. Entonces, se enrasa con isopropanol favoreciendo así que la superficie del gel quede bien nivelada y no tenga contacto con el aire, lo que facilita y acelera la polimerización. Una vez que el gel ha polimerizado (a los 10 - 15 min), se retira el isopropanol con un papel de filtro y se añaden unos 2 - 3 ml de gel concentrador. Inmediatamente después se introduce un peine de 10 o 15 pocillos del mismo grosor que los separadores, sumergiéndose en el gel y dejando que polimerice a temperatura ambiente.
- 3) Electroforesis: Una vez polimerizado se retira el peine y se monta en el sistema, dentro de la cubeta de electroforesis; se llena el sistema con el tampón de electroforesis y se conectan los electrodos. Entonces, se cargan las muestras y el marcador, se cierra el circuito eléctrico y se conecta a la fuente de alimentación aplicando un voltaje de 120 - 150 V durante 1 hora y 30 min. Una vez finalizado, se desmonta el sistema, se separan los vidrios y se recoge el gel.

3.3.3.2. Ensayo de inmunoblot

La técnica de western blotting (WB) o inmunoblot (Burnette *et al.*, 1981) consiste en la transferencia electroforética de proteínas desde geles de SDS-PAGE a membranas de nitrocelulosa donde quedan inmobilizadas, y seguida de la detección auto-radiográfica de una determinada proteína mediante anticuerpos específicos.

El anticuerpo primario reconoce específicamente la proteína y el secundario reconoce el primario que, al encontrarse conjugado a una peroxidasa, en presencia de sustrato genera un producto luminiscente. Por tanto, esta técnica permite la identificación específica de las proteínas separadas por electroforesis mediante un anticuerpo.

1) Electro-transferencia de proteínas:

Reactivos y Materiales:

- Tampón de transferencia pH 8,3: Tris 25 mM, glicina 192 mM y 20% metanol.
- Metanol.
- Papel de filtro Whatman 3mm (GE healthcare – Life Science).
- Membrana de transferencia Immobilon-P con tamaño de poro 0,45 μ m (Merck - Milipore).
- Aparato de transferencia de geles a membrana: Sistema Mini Protean (BioRad).

Procedimiento:

Se deben preparar con anterioridad la membrana Immobilon y los papeles de filtros, dos por cada gel y de un tamaño aproximado de 5x9 cm. La membrana debe ser sumergida durante 1 min en metanol para activarla y se deja sumergida junto con los papeles y las esponjas del sistema en el tampón de transferencia hasta su uso.

Entonces, cuando la separación de las proteínas por electroforesis ha terminado, se cogen los geles, se sumergen en el tampón de transferencia y se procede a montar el sistema de transferencia.

Sobre la parte negra del sistema y en el siguiente orden se colocan: esponja, papel Whatman, gel, membrana, papel Whatman y esponja; es muy importante evitar la formación de burbujas entre el gel y la membrana de nitrocelulosa ya que impediría la transferencia correcta de las proteínas en esa zona. A continuación, el sistema de transferencia es colocado en una cubeta de transferencia orientado hacia el polo negativo de manera que las proteínas migren del gel a la membrana al desplazarse hacia al polo positivo (coloreado en rojo).

La cubeta, con ya el sistema montado, se llena con tampón de transferencia y un recipiente con hielo para mantener el montaje refrigerado. Finalmente se cierra el circuito y es aplicado un voltaje de 250 mA durante 1 hora y 30 min. Una vez acabada la transferencia se desmonta el sistema procurando que la membrana no se seque.

2) Inmunodetección:

La inmunodetección se basa en un procedimiento indirecto en el que el antígeno fijado en la membrana es detectado por el anticuerpo primario específicamente para a continuación ser detectado mediante la reacción de la peroxidasa de rábano que se encuentra unida al anticuerpo secundario (afín al anticuerpo primario).

Reactivos y Material:

- Solución de PBS-Tween-20 (Sigma) al 0,5%, empleado para lavar la membrana tras las incubaciones con anticuerpo.
- Solución de bloqueo: Su composición depende del anticuerpo primario usado; ya sea un 5 - 10% (p/v) de leche descremada en polvo (Asturiana) o por un 5% de albúmina bovina, BSA (Sigma Aldrich), ambos disueltos en PBS-Tween-20 (Sigma Aldrich).
- Agitador orbital (J.P. selecta).

Anticuerpos utilizados: Preparados en una solución de bloqueo diluida, su concentración depende del anticuerpo.

- Anticuerpo primario conjugado a HRP *anti-Strep-MAB-classic-HRP* (IBA): Preparado a una concentración de 1:1.000 en PBS con 5% de BSA y 0,1% de Tween-20. No requiere incubación con anticuerpo secundario.
- Anticuerpo primario *anti-His-tag clone His.H8* (Merck): Preparado a una concentración de 1:1.000 en PBS con 1% de leche y 0,1% de Tween-20.
- Anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a HRC (Biorad): Dependen de la especie en la que se ha desarrollado el anticuerpo primario, preparado a 1:25.000 en PBS con 1% de leche y 0,1% de Tween-20.

Procedimiento:

Una vez terminada la transferencia, se introduce la membrana de nitrocelulosa en una cubeta de su tamaño en donde se añaden 10 ml de la solución de bloqueo y se incuba con agitación suave 1 hora a temperatura ambiente. El objetivo del bloqueo es evitar la unión inespecífica del anticuerpo primario (sobre todo porque los anticuerpos anti-tags no son tan específicos como otros).

Una vez finalizado el bloqueo, se lava el exceso de este con tampón de lavado (compuesto con PBS y 0,1% de Tween-20) y se realiza la incubación con 10 ml de la solución del anticuerpo primario correspondiente con una agitación suave. El tiempo de incubación depende del anticuerpo utilizado, en nuestro caso toda la noche a 4 °C. Una vez incubado el primario, para eliminar el exceso de anticuerpo y las interacciones inespecíficas, se realizan 3 lavados de la membrana con tampón de lavado durante 10 min a temperatura.

Por último, se prepara una dilución del anticuerpo secundario (según cada uno) en la solución de bloqueo diluida y se realiza una incubación de una hora a temperatura ambiente; y para terminar se vuelven a realizar tres lavados con el tampón de lavado.

3) Revelado con el método del ECL:

El ECL es un método de detección luminiscente para antígenos específicos inmovilizados que estén conjugados de manera directa o indirecta con anticuerpos marcados con peroxidasa de rábano. Así la detección del anticuerpo secundario permite localizar la unión específica del anticuerpo primario a la proteína de interés.

Los resultados se visualizan mediante una auto-radiografía, ya sea empleando una película fotográfica o una máquina Odissey Fc (detecta las bandas con luz UV y las digitaliza).

Material y reactivos:

- Casete de exposición.
- Película fotográfica de alta sensibilidad Amersham Hyperfilm ECL (GE healthcare).
- Reactivo comercial Amersham ECL (GE healthcare). Este reactivo permite la detección de los anticuerpos conjugados con HRP, la peroxidasa cataliza una reacción química que produce un sustrato luminiscente, el luminol.

Procedimiento:

Mediante una pipeta Pasteur se añaden 2 ml de ECL (preparado según las instrucciones del fabricante) sobre la membrana cubriéndola en totalidad, se deja actuar durante 1 min y se elimina el exceso. Se coloca la membrana dentro de un casete y se expone una película auto-radiográfica durante un tiempo variable según la sensibilidad del anticuerpo y las muestras utilizadas; estas condiciones son determinadas empíricamente.

En el caso de revelar las proteínas a través de la máquina Odissey Fc (Li-cor), se coloca la membrana sobre la base, dentro es expuesta el tiempo pre-determinado a la luz.

3.3.3.3. Determinación de la concentración de proteínas

Existen distintos métodos para la valoración de la concentración de proteínas. En esta tesis se ha utilizado el método de BCA, su uso es el recomendado cuando se trabaja en presencia de detergente, ya que evita interferencias en la lectura de la absorbancia.

El método de BCA se basa en la reacción de Biuret en donde las proteínas reaccionan con el cobre en la forma Cu^{2+} y formando Cu^{1+} en medio alcalino, este reacciona con el reactivo BCA (ácido bicinónico) formando un compuesto de color púrpura. La estructura macromolecular de la proteína, junto con el número de enlaces peptídicos y la presencia de determinados aminoácidos (cisteína, triptófano y tirosina) son los responsables de la formación del color por su interacción con el BCA.

La lectura de la absorbancia se hace a 562 nm, es prácticamente lineal entre concentraciones de 20 a 2.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína y requiere de una solución de albúmina para realizar la curva patrón a partir de la cual se podrá relacionar una señal de color con μg de proteína.

Material y reactivos:

- Pierce BCA - *Protein Assay Reagent* (Thermo Scientific).
- Albúmina (Thermo Scientific).
- Placas de plástico de 96 pocillos (Nirco).
- Lector de placas Tecan Sunrise.

Procedimiento:

El reactivo Cu^{2+} (denominado reactivo B por el fabricante) se diluye 1:50 con la solución de dilución (denominada reactivo A); se añade 200 μl de esta solución por punto de muestra. Los puntos de las muestras se deben realizar por duplicado o triplicado, y para poder determinar los μg medidos de la muestra hay que realizar paralelamente una curva patrón con albúmina, de 0 a 20 μg , con tal de poder extrapolar los valores de las absorbancias de cada muestra.

Tras una incubación mínima de 10 min a 37 °C se procede a la lectura de la absorbancia.

3.3.3.4. Métodos de tinción de geles

La detección de proteínas en geles de poliacrilamida es esencial para la purificación y el análisis de proteínas, como ya se ha mencionado, se puede realizar mediante la detección específica de la proteína mediante el uso de anticuerpos o mediante una tinción completa del gel para que sean mostradas todas las proteínas que contiene.

Aunque existen dos métodos de tinción; el *Coomassie Brilliant blue* que es un método barato, sencillo y capaz de detectar 0,1 μg (100 ng) de proteína y la tinción plata (*silver staining*) que es un método más sensible con la capacidad de detectar hasta 1 - 10 ng de proteína, en la presente tesis solo se ha empleado la tinción con plata.

Tinción con plata:

Material y reactivos:

- Solución de ácido acético.
- Metanol.
- Kit comercial Pierce *Silver stain* (Thermo Scientific).

Procedimiento:

Es recomendable realizar toda la tinción con el gel en una caja con tapa, ya que ciertas disoluciones tienen un olor fuerte y tóxico. Todos los pasos se realizarán a temperatura ambiente y agitación.

Primero hay que lavar 2 veces el gel procedente de la electroforesis con agua Mili-Q durante 5 min. La fijación de las proteínas al gel se realiza con 2 incubaciones de 15 min con una solución de 30% ácido acético y 10% metanol, seguida de dos lavados con 10% de ácido acético de 5 min y otros 2 lavados con agua Mili-Q de 5 min. Entonces, es preparada la solución *sensibilizer* (0,01% tiosulfato sódico) tal como indica el fabricante, la incubación es de 1 min y seguidamente se lava con agua Mili-Q durante 2 min.

A continuación, se incuba 30 min el gel con la solución teñidora denominada en el kit como *Silver Stain* (0,1% nitrato de plata), preparada tal y como indica el fabricante. Se retira la solución de tinción, se lava con agua Mili-Q durante 5 min y, por último, el gel es revelado con una solución de 2% de carbonato sódico con formalina al 0,04% (denominado *Silver Stain Developer* en el kit). Cuando las proteínas han alcanzado una intensidad de señal suficiente, la reacción se para con un 10% de metanol, a los 10 min se puede cambiar por agua.

3.4. ACTIVIDAD FUNCIONAL

Una caracterización proteica completa debe también abarcar el aspecto funcional de la proteína; lo que a su vez completa el estudio estructural ya que la estructura viene dada por su función. Estudiar la dinámica funcional de una proteína permite averiguar el porqué de su estructura.

El análisis funcional de las proteínas de estudio de este trabajo se ha realizado mediante ensayos de transporte, con la proteína, tanto en su forma salvaje (WT por sus siglas en inglés *wild type*) como mutada, en un ambiente celular y reconstituida en liposomas. Estos ensayos consisten en medir la cantidad de aminoácido marcado radiactivamente que entra al sistema tras ser incubado en el medio de transporte, permitiendo así estudiar la actividad transportadora.

3.4.1. Transporte en liposomas

La finalidad de los ensayos de transporte de proteínas reconstituidas en liposomas es determinar su funcionalidad tras un proceso de purificación. Los procesos de purificación pueden ser lesivos para las proteínas, pueden conferirles estados estructurales no fidedignos. Por lo que para demostrar que la proteína, de la cual se está realizando un estudio estructural, posee una estructura tridimensional nativa se debe corroborar que continúa siendo funcional.

Del mismo modo, también se emplean estos ensayos para verificar ciertos comportamientos proteicos ante inhibidores o mutaciones, o simplemente testar la funcionalidad de un inhibidor para reducir el 100% (por ejemplo) la actividad transportadora (estudios no realizados durante esta tesis).

Los liposomas consisten en un sistema vacuolizado formado por una membrana lipídica que mimetiza la membrana plasmática celular y que crea un ambiente compartimentalizado. Es un sistema controlable pero su reproducibilidad es baja y requiere una gran cantidad de proteína.

La determinación de la actividad transportadora por parte de la proteína testada, con transporte tipo cambiador obligatorio, se realiza a partir de la actividad de transporte superior por parte de los liposomas reconstituidos con la proteína en cuyo interior poseen aminoácido frío, en comparación con los liposomas reconstituidos con la proteína, pero sin aminoácido en su interior y los liposomas no reconstituidos.

La actividad es calculada a partir de la señal emitida por los aminoácidos marcados radiactivamente y normalizada por la cantidad de proteína reconstituida en el liposoma. Se toman varios puntos de transporte a diferentes tiempos para mostrar una curva de actividad transportador en el tiempo.

El protocolo de reconstitución en el que nos hemos basado procede del artículo *Yan et al., 2019* donde realizan una reconstitución en liposomas del LAT 4F2hc/LAT1 humano y del artículo *Errasti-Murugarren et al., 2019* en donde realizan la reconstitución del LAT bacteriano BasC de *Carnobacterium*.

Toda la sección de reconstitución se ha realizado con la guía y colaboración de la Doctora Paola Bartocioni.

Material y reactivos:

- *Brain lipids* (Avanti), mezcla comercial de triturado de cerebro, por lo que no es necesario añadir colesterol. Stock de uso 20 mg/ml en tampón de reconstitución (fosfato potásico 20 mM pH 6,5, NaCl 150 mM).
- Jeringuilla Extruder (Hamilton), con capacidad extrusora.
- Termomixer (Eppendorf).
- Membrana para diálisis de 50 Kda MWCO (Spectrum Europe B.V.).
- Tampón de diálisis (Na₂HPO₄ 20 mM pH 6,5 y NaCl 150 mM).
- Ultracentrifuga *Optima TM MAX-XP* (Beckman Coulter).
- Aminoácido L-Valina frío (Sigma Aldrich).
- Isótopo radiactivo, aminoácido L-valina marcado radiactivamente con [³H] a 40 Ci/mmol (American radiolabeled chemical Inc).
- Filtros de 0,22 µm GSTF (Millipore) para los ensayos de radiactividad.
- Tubos de centelleo (*pony bial*) de 6 ml (Perkin Elmer).
- Líquido de centelleo *Ultima Gold* (Perkin Elmer).

Procedimiento:

En primer lugar, los liposomas deben ser preparados, estos pueden estar vacíos o contener 5 mM de L-valina (ya que en nuestro caso se ha elegido este aminoácido). Una vez se ha pesado la cantidad de lípidos requerida, son disueltos en cloroformo y secados con nitrógeno en la campana de extracción de gases; a continuación, son resuspendidos en tampón de reconstitución (fosfato potásico 20 mM pH 6,5 y NaCl 150 mM).

La introducción del aminoácido se realiza durante la apertura y cierre de los liposomas cuyo principal objetivo es convertirlos en unilaminares. Para ello hay que realizar 10 ciclos de congelación descongelación con nitrógeno líquido y un termobloque a 26 °C. Para los liposomas que deban tener

aminoácido frío en su interior este proceso se realizará con una concentración de 5 mM del aminoácido.

Por último, para que los liposomas estén listos se deben pasar repetidas veces a través de un Extruder que equilibra los tamaños existentes a unas 0,4 μm de diámetro. Este stock de lípidos se puede guardar a - 80 °C hasta su uso.

Una vez que la proteína está purificada y preparada para ser introducida en los liposomas, estos deben ser abiertos mediante una incubación de 30 min a temperatura ambiente con un 1% de β -OG (n-octil- β -D-glucósido). Los ratios empleados entre proteína y lípido han oscilado entre 1:30 y 1:100 (mg proteína : mg lípidos).

Para reconstituir la proteína esta es incubada junto a la cantidad requerida de liposomas a 4 °C durante 1 hora. También se debe preparar un control negativo en el que en vez de proteína se añadirá tampón de purificación. El siguiente paso consiste en eliminar el detergente (tanto de las micelas que rodean la proteína como del β -OG) para lo cual se emplea la técnica de diálisis. Una diálisis consiste en introducir las muestras en una vaina de membrana para diálisis y en un vaso con 1.000 veces el volumen de cada muestra de tampón de diálisis; la incubación debe ser en movimiento y durante toda la noche (16h) a 4 °C.

Al día siguiente se recogen los proteoliposomas mediante una ultracentrifugación de 200.000 xg 1h a 4 °C, en donde se descarta el sobrenadante y el *pellet* es resuspendido en 1/3 del volumen inicial para concentrar la cantidad de proteoliposomas 3 veces.

Para el ensayo de transporte se emplean 10 μl de cada muestra de proteoliposomas por punto (cada medida del transporte se realizará por triplicados o cuatriplicados) y al que se le añaden 180 μl de tampón de transporte (con el aminoácido radiactivo a 1 $\mu\text{Ci/ml}$, y fosfato potásico 20mM pH 6,5, NaCl 150 mM). Es fundamental mezclar correctamente cada punto, es empleado un vortex.

Una vez transcurrido el tiempo de cada punto, se recoge la muestra y se coloca en un filtro GSTF conectado a aspiración y sobre el que se realizan 3 lavados con tampón de parada a 4 °C con 5 mM de aminoácido frío.

Para realizar la medida del aminoácido marcado que ha sido transportado al interior de la célula, los filtros se colocan en tubos de centelleo y sobre el que se añade 3 ml de líquido de centelleo. El protocolo de medida se realiza en la máquina *Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2900 TR* (Packard) que miden las CPM (cuentas por minuto) en tres estadios diferentes (A, B y C), los cuales emplea para realizar un algoritmo y obtener las DPM (desintegraciones por minuto). Las medidas han tenido una duración de 3 min.

3.4.2. Transporte *in vivo*

El transporte realizado *in vivo*, a diferencia del transporte realizado en proteoliposomas, permite tener resultados mucho más rápido y directos, ya que la medida de la actividad es realizada directamente sobre una proteína que se encuentra en su ambiente endógeno, en la membrana plasmática de la célula. El inconveniente que tiene es que el transportador se encuentra en un sistema celular completo y por tanto no tan controlado como el caso de los liposomas en el que solo existe la proteína que se reconstituye.

El método empleado para la medida de actividad transportadora en cultivos celulares en monocapa es una variación del método descrito por *Quamme et al., 1989*. Consiste en la incubación de las células en presencia de sustrato frío y sustrato marcado radiactivamente a unas concentraciones conocidas durante un tiempo determinado. Para medir la cantidad de sustrato radiactivo incorporado por las células se para el transporte y se lleva a cabo la lisis de estas.

En este trabajo se han utilizado células HeLa transfectadas transitoriamente y sembradas en placas de 24 pocillos; cada pocillo refleja un punto de transporte. El valor de cada condición de transporte es determinado por la media de los valores obtenidos en cuatro pocillos \pm el error estándar.

Toda la sección de ensayos funcionales con células se ha realizado con la guía y colaboración del Doctor Ekaitz Errasti-Murugarren.

Medios de transporte, reactivos y materiales:

- Medio Colina: Cloruro de colina 137 mM, KCl 5,4 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgSO₄ 1,2 mM, HEPES 10 mM. Se ajusta el pH a 7,4 con Tris 1M.
- Medio de parada (*stop*): Cloruro de colina 137 mM, KCl 5,4 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgSO₄ 1,2 mM, HEPES 10 mM. Se ajusta el pH a 7,4 con Tris 1M y se guarda a 4 °C.
- Stock de L-aminoácidos: L-alanina, glicina, L-valina, L-isoleucina, L-glutamina, L-histidina y L-triptófano (Sigma Aldrich). Son guardados a - 20 °C.
- Tampón de transporte: Se prepara a partir del medio colina al que se le añade la concentración deseada de aminoácido frío. Es muy importante que se encuentre atemperado antes de comenzar el ensayo. Antes de añadir el tampón a las células se añade el isótopo radiactivo correspondiente a una concentración de 1 μ Ci/ml (1 μ l isótopo/ml tampón).
- Isótopo radiactivo: [³H] L-alanina, [³H] glicina, [³H] L-valina, [³H] L-isoleucina, [³H] L-glutamina, [³H] L-histidina y [³H] L-triptófano. Concentración stock 40 Ci/mmol (American radiolabeled chemical Inc).
- Líquido de centelleo *Ultima Gold* (Perkin Elmer).
- Solución de lisis: Tritón x-100 0,5%, NaOH 100 mM.
- Cabina termoestabilizadora a 37 °C.

Transporte de células en monocapa

Se considera un transporte *in vivo* ya que una vez las células expresan el transportador, son incubadas con sustrato marcado radiactivamente para que sea introducido en el interior celular. Este tipo de ensayo aporta información sobre la funcionalidad de la proteína expresada, en primer lugar, si esta ha sido plegada adecuadamente (condición que es importante chequear si se emplea un sistema de expresión diferente al sistema nativo de la proteína), y, en segundo lugar, si esta puede realizar adecuadamente su función, dato que indica que la proteína tiene una estructura tridimensional adecuada para realizar su función correctamente.

Adicionalmente, este tipo de ensayos también permiten el estudio de mutaciones; realizando el mismo tipo de ensayo de transporte es posible estudiar cómo ciertas mutaciones afectan a la función transportadora.

Procedimiento:

Para medir la captación de aminoácidos por parte de las células durante el transporte, se suplementa el medio de colina atemperado con el sustrato deseado frío a una concentración de 20 μM y con el sustrato radiactivo que corresponda a 1 $\mu\text{Ci/ml}$. El ensayo con el medio colina indica la tasa de transporte independiente de sodio y la difusión simple.

Se prepara la cantidad necesaria de medio de transporte teniendo en cuenta que se requieren 300 μl de medio por pocillo de placa de 24 pocillos.

Los ensayos de transporte se realizan a temperatura ambiente, debido a lo cual hay que atemperar previamente los medios de lavado (medio colina) y de transporte en una cabina termoestabilizadora a 37 $^{\circ}\text{C}$, con el mismo sentido las células se mantienen dentro del incubador hasta el inicio del ensayo.

Una vez todo preparado, se extrae el medio de cultivo y se lavan las células dos veces con 2,5 ml de medio colina, con cuidado de que las células no se despeguen. El transporte se inicia en el momento en el que se sustituye este medio de lavado por 280 μl de medio de transporte. Una vez pasado el tiempo deseado se para el transporte mediante dos lavados de 3,5 ml de medio de parada (medio de transporte frío) a 4 $^{\circ}\text{C}$.

A continuación, se añaden 100 μl de la solución de lisis que promoverá la lisis celular y la liberación del contenido intracelular. Para promover la rotura de las células se incuba la placa en un agitador horizontal durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez homogenizadas, de cada pocillo se recoge una alícuota de 10 μl que se usará posteriormente para determinar la concentración de proteína por el método BCA. El resto del lisado se traspassa a viales de centelleo llenos con 3 ml de líquido de centelleo para a continuación realizar el recuento de la radiactividad.

Los viales con las muestras radiactivas se miden en el contador *Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2900 TR* (Packard) con el programa que proporciona desintegraciones por minuto (DPM) de tritio, pero que a continuación hay que transformar tal resultado en picomoles de aminoácido transportado por mg de proteína en un tiempo determinado ($\text{pmol } [^3\text{H}] \text{ AA} / \text{mg proteína} / \text{min}$).

Es importante que las medidas de transporte se realicen bajo condiciones de velocidad inicial. Esto implica la caracterización previa del sistema, mediante el seguimiento a lo largo del tiempo de la incorporación de una concentración fija de sustrato (experimentos de *time course*). Una vez definido el intervalo en que la captación del sustrato se mantiene lineal en función del tiempo, se escoge el tiempo de trabajo. Generalmente en el caso del transporte de aminoácidos se trabaja a tiempos cortos de entre 1-3 minutos.

Es el mismo protocolo realizado previamente en nuestro laboratorio (Espino-Guarch *et al.*, 2018).

Cálculos:

A pesar de que se intenta que la siembra de las células sea homogénea, el número de células por pocillo nunca es idéntico. Es necesario tener en cuenta esta diferencia para que los resultados de las diferentes medidas de transporte y del flujo vectorial sean normalizadas y así, comparables entre sí.

Por ello, los valores de las medidas de captación son corregidas por la concentración de proteína presente en cada muestra. La valoración de la concentración proteica se realiza mediante el método del BCA, explicado anteriormente, con 10 μl separados del homogenado. Por esta razón, las DPMs

obtenidas no son una medida con una relación directa a la concentración proteica, ya que la cantidad de homogenado dedicado a cada una de las medidas ha sido de 9:1; entonces, para equiparar tales datos es necesario multiplicar x9 la concentración obtenida.

En primer lugar, es necesario calcular la actividad específica (AE) del medio de transporte radiactivo según la fórmula:

$$\text{Actividad específica (dpm/pmol)} = \text{dpm Std/vol Std} \cdot [\text{sustrato}]$$

Con este valor y teniendo en cuenta el tiempo del transporte (en minutos), se obtiene el valor de transporte para cada muestra, expresado en pmol sustrato / mg proteína · min:

$$\text{Actividad de la muestra (pmol/mg proteína} \cdot \text{min)} = \text{DPM} \cdot 10^3 / \text{volumen} \cdot \text{AE} \cdot [\text{proteína } \mu\text{g}/\mu\text{l}] \cdot \text{min}$$

3.5. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

En el campo de la biología estructural se emplean dos tipos de técnicas generales para resolver estructuras de proteínas, la cristalografía por la cual se difracta un cristal formado por la proteína ordenada con rayos X y la microscopía electrónica. Tal como se ha detallado en la Introducción, el empleo de una o de otra es determinado principalmente por la proteína con la que se está trabajando, por ello, si nuestra proteína de interés es asimétrica, heterogénea y aparentemente flexible es más indicado realizar el estudio estructural por microscopía electrónica.

Un microscopio electrónico usa electrones en lugar de fotones para formar imágenes de objetos microscópicos, desde células hasta proteínas aisladas. Gracias a la longitud de onda de los electrones, los microscopios electrónicos alcanzan amplificaciones mayores que los microscopios ópticos. La imagen se forma a partir de los electrones emitidos por el microscopio que rebotan y atraviesan la muestra; por ello, la muestra debe ser inferior a 2.000 ángstroms para que los electrones puedan ser “transmitidos”.

Respecto a la cristalografía, donde los datos analizados corresponden a la densidad dada por los electrones de la muestra, en microscopía electrónica se analiza la densidad de los potenciales electroestáticos.

Toda esta sección de la tesis ha sido realizada por los doctores Óscar Llorca y Carlos Fernández-Rodríguez del laboratorio de Complejos Macromoleculares en la Respuesta a daños en el ADN, y Jasminka Boskovic y Carmen García-Martín de la Unidad de Microscopía Electrónica, desde el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas localizado en Madrid, España.

3.5.1. Preparación de muestras

Las muestras que han sido sometidas a un estudio estructural por microscopía electrónica pertenecen al heterodímero 4F2hc/LAT2 humano expresado en HEK293-6E y purificado en digitonina. Una vez purificada, la proteína es analizada por SEC para separar las fracciones centrales del pico las cuales se emplean para preparar las rejillas que son visualizadas en el microscopio.

Las muestras requieren ser tratadas para poder ser visualizadas en el microscopio debido a que las muestras biológicas no poseen contraste. Se conocen dos tipos de tratamientos, la tinción negativa realizada con carbón y la criogenización que consiste en la vitrificación de la muestra.

La preparación de las rejillas con la muestra para que fueran visualizadas al microscopio electrónico fue realizada en el CNIO por parte de Carmen García-Martín.

3.5.1.1. Tinción negativa

El tratamiento de tinción negativa (*negative staining*) es ampliamente utilizado en la microscopía electrónica debido a dos grandes ventajas, la baja cantidad de proteína que requiere (unas 10 veces menor que la criogenización) y el alto contraste que aporta a las biomoléculas.

Para realizar esta tinción se emplean sales de metal pesado que son evaporadas sobre la muestra, situada previamente en rejillas formadas por carbón. Por lo general, estos tintes son derivados de tungsteno o de uranio entre otras sales; en este trabajo se ha empleado acetato de uranilo. Sin embargo, siempre existe el riesgo de que tales sales produzcan precipitados en la rejilla, contaminando la muestra y aumentando el ruido o que interaccionen con la proteína y la modifiquen.

Aunque la tinción negativa, debido a que la resolución alcanzada pasa a depender de las moléculas de sal (en vez de en los electrones) no puede ser muy alta (6 - 8 Å de resolución máxima), resulta ser una técnica rápida y económica para chequear al microscopio la calidad, cantidad, distribución y homogeneidad de la muestra cuyo estudio estructural se quiere realizar.

Materiales y reactivos:

- Rejillas de malla 400 (400 *mesh*) cubiertas por una capa de colodión y otra de carbón.
- *Glow Discharger EM grid* (Quantifoil).
- Papel de filtro Whatman.
- Acetato de uranilo 1%.

Procedimiento:

La concentración óptima para el análisis mediante microscopía electrónica de transmisión de las muestras de 4F2hc/LAT2 cuyas rejillas han sido tratadas con tinción negativa fue determinada empíricamente mediante la dilución seriada de los mismos en su tampón correspondiente.

Las rejillas de carbón-colodión empleadas en la tinción negativa deben ser ionizadas previamente a la aplicación de la muestra. Las rejillas deben ser hidrofílicas para no repulsar la muestra y para lo cual se tratan mediante una descarga luminiscente en el *Glow*. Por rejilla se han depositado 3 - 4 µl de muestra sobre la que se realiza *blotting* (secado) y pase de 1 gota de agua Milli-Q (*blotting* es el procedimiento por el cual se presiona la rejilla con papel de filtro para que este absorba el exceso de tampón). Este mismo procedimiento se realiza 3 veces más con acetato de uranilo (p/v) al 1%, el *blotting* tras la última gota no se realiza inmediatamente, en su lugar se deja incubar 1 min a temperatura ambiente y entonces se blotea por última vez para dejar la rejilla preparada para ser introducida al microscopio.

3.5.1.2. Criogenización

Sin embargo, para el análisis de 4F2hc/LAT2 en el microscopio electrónico, el tratamiento que mejores resultados ha dado es la criogenización. La criogenización consiste en una congelación instantánea de la muestra en etano líquido a temperaturas de nitrógeno líquido para que así la muestra se encuentre en un estado cercano al nativo al estar embebido en hielo amorfo (no cristalino).

Este procedimiento consiste en la congelación rápida de la muestra mediante el proceso de vitrificación; se emplea etano líquido al tener este la capacidad de bajar la temperatura a alta velocidad impidiendo el daño en la muestra por los cristales de agua que se producirían si la congelación no fuera rápida.

Materiales y reactivos:

- Rejillas de malla 300 (300 *mesh*) de cobre con una capa de plástico que forma una malla con agujeros formados por carbón (Quantifoil holey grids). Para los diferentes cribados se han probado rejillas de los diferentes tamaños 1,2 μm - 1,3 μm y 0,6 μm - 1 μm (μm del diámetro de los agujeros - μm de distancia entre ellos).
- *Glow Discharger EM grid* (Quantifoil).
- Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher Scientific)
- Papel de filtro Whatman.

Procedimiento:

El carbón que forman los agujeros de las rejillas, dentro de los cuales se vitrificará la muestra, deben ser ionizados mediante una descarga luminiscente (del mismo modo que el descrito para la tinción negativa), un paso esencial para que la rejilla no repulse la muestra.

La clave para que las muestras se vitrifiquen adecuadamente es tratarlas casi en ausencia de agua (se recomienda el uso de mascarilla para reducir la humedad). Y por ello, en la vitrificación es muy determinante el tiempo de *blotting*, ya que cuanto más largo sea, menor será la cantidad de agua en la muestra. Es un parámetro que se ajusta según cada muestra puesto que existen una gran cantidad de variables que lo determinan.

Junto al tiempo de *blotting*, la propia morfología del Vitroblot también determina cómo será este hielo vítreo y cómo se dispondrá este a lo largo de la rejilla. Las orejeras en donde se colocan los papeles de filtro que quitan el exceso de agua de la muestra presentan cierto ángulo, lo cual al *blotear* la muestra hará que el hielo de un extremo sea más grueso y se afine a medida que avanza hacia el extremo contrario. El tiempo de *blotting* determina en qué zona de la rejilla estará el grosor de hielo que es adecuado para la proteína en concreto, primando que esta zona se encuentre en el centro. Es un parámetro cuyo estudio es muy importante ya que según qué grosor de hielo se forme, la distribución de la proteína será diferente, pudiendo así emplear una misma rejilla para encontrar la mejor zona para la proteína.

Tras la preparación de una rejilla es necesario mantener la muestra en frío, por lo cual se emplea nitrógeno o helio líquido en el microscopio; además, que el sistema se encuentre en vacío favorece a su vez que se mantengan temperaturas bajas manteniendo el hielo vítreo de la muestra.

Se realizaron varias preparaciones de rejillas con diferentes concentraciones de proteína y con diferentes condiciones de vitrificación. Las rejillas de las cuales se tomaron las imágenes que nos han permitido resolver la estructura poseen 3 μl de 4F2hc/LAT2 recién purificado. Las rejillas de tamaño 0,6 μm - 1 μm se secaron durante 2 segundos con una humedad del 95% y se congelaron por inmersión en etano líquido.

3.5.2. Toma de imágenes

Las imágenes que fueron procesadas con éxito y con las cuales se resolvió la estructura proceden de un único microscopio y de una única toma de imágenes (Tabla 5).

Crio-ME y modelaje de 4F2hc/LAT2	(EMD-11952)	(PDB 7B00)
Recolección de datos y procesado		
Microscopio	FEI Titan Krios	
Detector	Gatan K3 (modo de conteo)	
Magnificación calibrada	105.000	
Voltaje (kV)	300	
Exposición de electrones ($e^-/\text{\AA}^2$)	45	
Rango de desenfoque (μm)	-1,2 --2,2	
Tamaño del píxel (\AA)	0,85	
Simetría impuesta	C1	
Imágenes de partículas iniciales (n°)	319.613	
Imágenes de partículas iniciales (n°)	176.132	
Umbral FSC	0,143	
Mapa de resolución (\AA)	3,91	
Rango de resolución del mapa (\AA)	2,5 – 5,5	
Refinamiento		
Software de refinamiento	phenix.real_space_refine	
Modelo inicial utilizado (código PDB)	Modelo de homología de I-tasser	
Factor B de nitidez del mapa (\AA^2)	-112	
Composición del modelo		
Átomos distintos a hidrógeno	7379	
Residuos proteicos	926	
Ligandos	1 Digitonina (AJP)	
Desviaciones R.m.s.		
Longitudes de enlace (\AA)	0,005	
Ángulos de enlace ($^\circ$)	0,962	
Validación		
Puntuación MolProbity	1,91	
Puntuación de choque (clashscore)	6,8	
Rotámeros pobres (%)	0,39	
Rotámeros favorables (%)	99,61	
Parcela de Ramachandran		
Favorecido (%)	90,46	
Permitido (%)	9,54	
No permitido (%)	0,00	
Máscara CC	0,78	

Tabla 5: Parámetros y estadísticas de la adquisición de datos crio-ME y del procesamiento digital de las imágenes.

Para cargar las muestras criogenizadas en el microscopio se empleó un criobrazo con sistema de refrigeración y se visualizaron en un microscopio Titan Krios G2 operado a 300 kV equipado con un GIF (Gatan) y un detector de electrones directos K3 Summit (Gatan) en modo de conteo en el

Electron Bio-Imaging Center (eBIC) (Reino Unido) y en las instalaciones de la Universidad de Leicester (Reino Unido).

Las imágenes se registraron a una magnificación nominal de 105.000x bajo condiciones de mínima dosis de electrones de 45 e-/Å, un valor de defocus entre -1,2 y -2,2 μm y un tamaño de píxel de 0,85 Å. Los parámetros y estadísticas de la adquisición de datos crio-ME y del procesamiento se muestran en la Tabla 5.

3.5.3. Procesamiento digital de las imágenes

El procesamiento digital de las imágenes, las cuales dieron lugar a la construcción 3D y al refinamiento de tal estructura fue realizado en exclusiva por Carlos Fernández-Rodríguez en el CNIO. El procesamiento se encuentra dividido en corrección de las imágenes y recolección de partículas, clasificación de las partículas en clases 2D, y, por último, reconstrucción 3D de la estructura y refinamiento.

Los fotogramas de película del detector K3 se alinearon usando el programa *MotionCor2* (Zheng *et al.*, 2017) con 35 parches por imagen, aplicando ponderación de dosis. Los parámetros de la función de transferencia de contraste (CTF) se determinaron utilizando *Gctf* (Zhang *et al.*, 2016). Las partículas se seleccionaron usando el programa Topaz, después de entrenar al programa usando un subconjunto de partículas seleccionado manualmente (Zivanov *et al.*, 2018) (Figura 11 - A).

El procesamiento posterior de las imágenes se realizó utilizando los programas *RELION 3.1* (Zivanov *et al.*, 2018), *cryo-SPARC* (Punjani *et al.*, 2017) y *cisTEM* (Grant *et al.*, 2018). El conjunto de datos inicial se sometió a varias rondas de clasificación 2D sin referencia para obtener 319.613 partículas que generaron promedios 2D con una excelente relación señal / ruido para las hélices transmembrana y que muestran diferentes vistas de 4F2hc/LAT2 (Figura 11 - B).

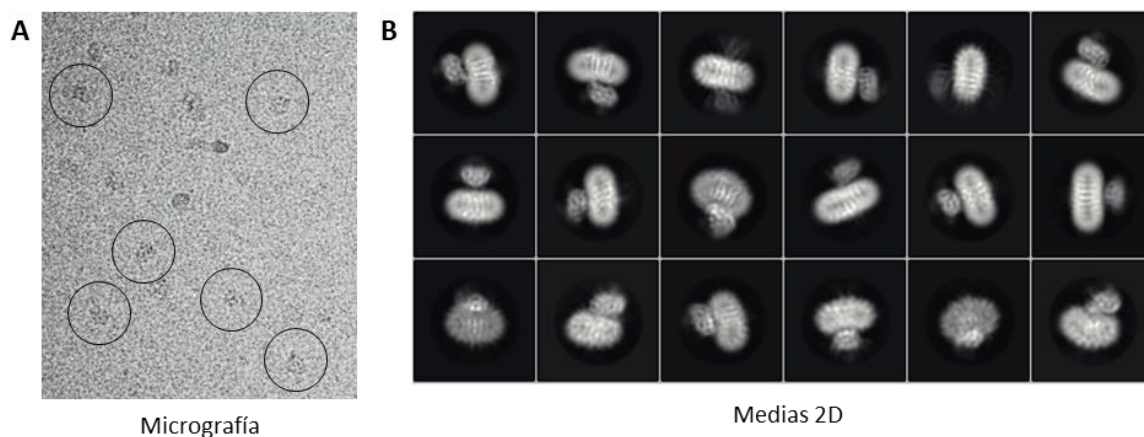


Figura 11: Imágenes de crio-microscopía de la proteína 4F2hc/LAT2 humano. A) Micrografía representativa de 4F2hc/LAT2. Los círculos resaltan algunas de las partículas. B) Promedios 2D de la muestra 4F2hc/LAT2. Se muestra, en varias orientaciones, el ectodominio de 4F2hc y las hélices transmembrana de LAT2 integradas dentro de la micela.

Las partículas seleccionadas finalmente se utilizaron para generar un modelo *ab initio* en *cryoSPARC* que se utilizó para realizar el primer refinamiento de consenso en *RELION 3.1* (Figura 12). A partir de

esta reconstrucción 3D previa, las partículas se clasificaron en seis subgrupos usando la acción de clasificación 3D en *RELION 3.1*. La calidad de cada subgrupo se evaluó mediante el análisis de los detalles estructurales en secciones a lo largo del eje z (Figura 12).

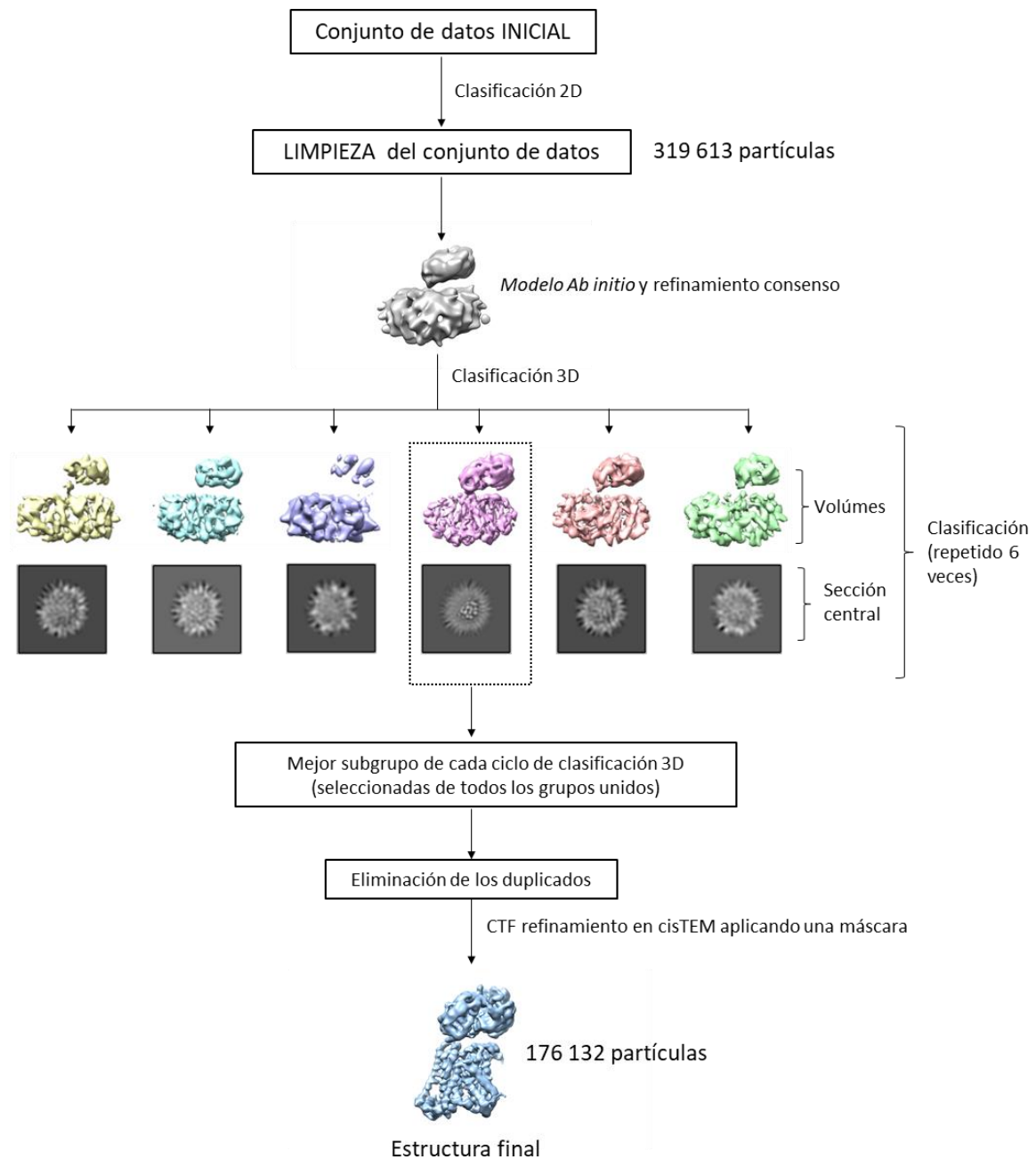


Figura 12: Flujo de partículas durante el procesamiento de las imágenes de 4F2hc/LAT2 humano. El conjunto de datos inicial se sometió a múltiples rondas de clasificación 2D y promediado para eliminar las partículas de baja calidad. Entonces, un conjunto de datos limpio, de 319.613 partículas, se utilizó para generar un modelo *ab initio* y un volumen refinado de consenso. Tal volumen fue empleado como referencia para varias rondas de clasificación 3D. El mejor subgrupo se clasificó a continuación mediante múltiples rondas de clasificación 3D de las mismas imágenes, agrupando los mejores grupos y eliminando duplicados. Un subconjunto final de 176.132 partículas fue refinado a alta resolución y fue seleccionado como el mapa crio-ME final.

El mejor grupo de partículas (Figura 12, volumen rosa) se refinó a una densidad de resolución media que representa todas las hélices transmembrana en el complejo 4F2hc/LAT2. A continuación, este

paso de clasificación 3D se repitió seis veces, seleccionando la mejor clase en cada ejecución y combinando todas las partículas seleccionadas en un grupo.

Después de eliminar todas las partículas duplicadas, el conjunto de datos final, compuesto por 176.132 partículas, fue pulida usando *RELION 3.1* y dos rondas de refinamiento CTF en el programa *cisTEM*. En este último paso se utilizó una máscara para excluir la micela de detergente y aplicando un filtro de paso bajo fuera de la máscara.

En el *RELION 3.1* también se realizó el post-procesamiento y el afilado del factor B; aunque los volúmenes también se procesaron posteriormente con *SPoC* (Beckers *et al.*, 2020), lo que facilitó visualizar la conectividad de las densidades y la interpretación del volumen resultante.

La resolución final promedio de la estructura se estimó en 3,9 Å usando *Fourier Shell Correlation* (FSC) mediante criterio estándar y un límite de 0,143 en *RELION 3.1* (Zivanov *et al.*, 2018) y 3,7 Å usando el programa *ResMap* (Kucukelbir *et al.*, 2014) (Figura 26 - B, sección Resultados, página 136). Las estimaciones de resolución local utilizando *ResMap* mostraron que la mayor parte de LAT2 está resuelta con una resolución entre 2,5 y 3,0 Å (Figura 26 – B).

3.5.4. Construcción del modelo atómico

El modelado se inició preparando un modelo de LAT2 basado en las estructuras atómicas de LAT1 (PDB 6IRS) utilizando I-TASSER para el modelado de homología y coincidencia automática (Yang *et al.*, 2015). Este modelo de homología de LAT2 formando el heterocomplejo con el 4F2hc del PDB 6IRS se instaló como un cuerpo rígido en nuestra densidad crio-ME de 4F2hc/LAT2 de alta resolución.

De forma general, el registro de la secuencia de aminoácidos sobre el modelo construido fue realizado manualmente con el programa *Coot* (Emsley *et al.*, 2010) mediante la asignación de densidades compatibles con cadenas laterales voluminosas a modo de puntos de anclaje de la secuencia. La posición de las cadenas principales y las cadenas laterales fue ajustada manualmente. El refinamiento del espacio real Phenix se realizó utilizándose como paso de refinamiento final para mejorar las geometrías del modelo (Adams *et al.*, 2010).

Por último, los residuos N-terminales del 1 al 40 para LAT2 y del 1 al 60 para 4F2hc no fueron visibles en nuestra densidad del crio-ME y, por lo tanto, no se incluyeron en el modelo atómico. Adicionalmente, se añadió una molécula de digitonina junto a los dominios transmembrana (TM) 3, 9, 10 y 12, ajustados en la densidad adicional.

3.5.4.1. Números de acceso de las estructuras de crio-microscopía electrónica

Los mapas de densidad calculados para 4F2hc/LAT2 han sido depositados en la base de datos *EM DataBank* (*Electron Microscopy Data Bank*, <http://www.emdatbank.org>), con el número de acceso EMD-11952. Mientras, las coordenadas atómicas de la proteína de 4F2hc/LAT2 han sido depositadas en la base de datos del PDB (*Protein Data Bank*) con número de acceso 7B00.

3.6. ESTUDIOS POR SIMULACIÓN

Los estudios por simulación permiten obtener información adicional a partir de la información estructural dada. Al poder observar el comportamiento de los residuos implicados en el sitio de unión al sustrato cuando uno u otro sustrato es añadido son facilitados por los estudios funcionales que tienen como objetivo determinar qué residuos resultan claves para el reconocimiento y el transporte del sustrato.

Además, si en un mismo estudio se comparan la forma salvaje de la proteína con una mutada es posible observar en la propia estructura los efectos que simuladamente puede tener tal mutación.

Durante esta tesis, las técnicas de simulación por PELE y dinámica molecular (MD por sus siglas en inglés *Molecular Dynamics*) han permitido ampliar el entendimiento de los resultados de los ensayos funcionales realizados.

Todos estos estudios han sido realizados en su totalidad por los Doctores Lucía Díaz, Joan G. Gilabert y Víctor Guallar del Centro Supercomputacional y del Nostrum Biodiscovery y del Barcelona Supercomputing Center (BSC), ambos situados en Barcelona, España.

3.6.1 Modelado de interacción proteína - sustrato por PELE

La estructura de la subunidad ligera hLAT2 obtenida por crio-microscopía fue empleada para realizar varias simulaciones por PELE empleando la herramienta *Protein Preparation Wizard* (PrepWizard) implementada en Schrödinger (Sastry *et al.*, 2013).

La estructura no mostraba densidad debido a los átomos de hidrógeno, los cuales tuvieron que ser agregados empleándose la herramienta *PrepWizard*. El predictor de valores pKa, PROPKA 3.0 calculó el estado de protonación de residuos titulables a pH 7,4 y, sobre la base de los valores de pKa predichos, se optimizó la red de los enlaces de hidrógeno. Finalmente, la estructura resultante fue sometida a un paso de minimización restringido con el campo de fuerza OPLSAA (FF), manteniendo los átomos pesados en su lugar y optimizando solo las posiciones de los átomos de hidrógeno.

Para mapear la interacción proteína - sustrato fue utilizado el software PELE (*Protein Energy Landscape Exploration*) (Lecina *et al.*, 2017). PELE es un procedimiento heurístico de Monte Carlo diseñado para mapear interacciones de ajuste inducidas por ligando - proteína, y que es ampliamente utilizado en el diseño de fármacos (Gilabert *et al.*, 2018) y la ingeniería enzimática (Acebes *et al.*, 2016).

Cada paso del análisis conlleva una serie compleja de eventos, incluida la perturbación de ligandos y proteínas (de sus columnas vertebrales), muestreo de la cadena lateral y una minimización. Por lo general, es necesario utilizar de decenas a cientos de miles de pasos para explorar el espacio de unión (o migración) del sustrato; son registrados los parámetros estructurales y el *OPLS2005 force field* de la energía de interacción proteína - sustrato.

Los resultados se muestran en gráficas XY; presentando la energía de interacción en el eje de ordenadas, y la distancia (en RMSD) del movimiento del sustrato respecto a la posición original dada en el eje de abscisas. Cada punto representando en la gráfica hace referencia a un archivo PDB que muestra la posición de tal sustrato en el sitio de unión.

Más en detalle, para este proyecto se han realizado dos conjuntos de simulaciones. Primero, a partir de una estructura inicialmente acoplada obtenida con el *software Glide* (Friesner *et al.*, 2004; Halgren *et al.*, 2004), se realizó una exploración local por PELE para cada sustrato en la forma tipo salvaje de la proteína. Y segundo, se empleó la estructura apo resuelta y varios mutantes seleccionados con el objetivo de comparar el diferente comportamiento y posición de los sustratos testados. En este último caso, se les permitieron a los sustratos explorar un espacio más amplio del binding site, hasta una distancia de 8 Å.

Para cada evento de la interacción proteína - sustrato, las simulaciones involucraron 128 núcleos de computación que se ejecutaron para 1.250 pasos de PELE de Monte Carlo cada uno, lo que involucró en promedio unas 36 horas en la supercomputadora MareNostrum IV en el BSC.

3.6.2. Simulaciones por dinámica molecular

La dinámica molecular es una técnica de simulación por ordenador en la que se permite que átomos y moléculas interactúen por un período de tiempo predeterminado, permitiendo una visualización del movimiento de las partículas a lo largo del tiempo. Por tanto, estos estudios consisten en analizar la proteína a través del tiempo aplicando diferentes sustratos y captando los diferentes movimientos que este realiza dentro del sitio de unión y cómo los residuos de la proteína se ven afectados por él. Es una técnica más completa y veraz que el análisis de interacción por PELE.

Partiendo de la estructura de LAT2 unida a los sustratos L-alanina o L-triptófano generada por PELE se prepararon varias simulaciones por dinámica molecular, tanto de la forma original (apo) como de las formas mutantes Tyr 93 Ala.

Para realizar tales análisis previamente se debe colocar la proteína en la membrana, para modelar tal sistema se pre-orientaron las coordenadas hLAT2 con respecto a la membrana (colocándose paralelas al eje z) por alineación con el LAT bacteriano BasC (PDB 6F2W) de la base de datos OPM (<http://opm.phar.umich.edu>) (Lomize *et al.*, 2006). A continuación, la proteína fue integrada en una bicapa de lípidos POPC utilizando el generador de membranas CHARMM-GUI (Lee *et al.*, 2016, Wu *et al.*, 2014, Jo *et al.*, 2007, Jo *et al.*, 2009) mediante el método de reemplazo. Y entonces, se colocaron 192 moléculas de lípidos en la bicapa de lípidos (más concretamente 100 y 92 entre la capa superior e inferior, respectivamente) con su centro en Z = 0. Luego, usando una capa de agua TIP3PM de 225 Å de espesor por encima y debajo de la bicapa lipídica se integró el sistema (proteína y sustrato). Adicionalmente, se añadieron al sistema iones de NaCl correspondientes a 0,15 M (47 negativos y 45 positivos) mediante un muestreo de Monte Carlo.

Finalmente, con el generador de membranas CHARMM-GUI, se generaron los *scripts* necesarios para realizar ejecuciones de minimización, equilibrado y producción en AMBER, utilizando el *CHARMM36 force field* (C36 FF). Por tanto, las simulaciones se realizaron para los cuatro sistemas utilizando el modelo C36 FF para lípidos y el modelo de agua CHARMM TIP3P, a temperatura constante (300 K) y presión (1 bar), en condiciones de contorno periódicas y con electrostática *Particle Mesh Ewald*.

El paso del tiempo de simulación se estableció en 2 fs junto con el algoritmo SHAKE para restringir los enlaces covalentes que involucraban átomos de hidrógeno. Después de la minimización estándar del *Membrane Builder* (2,5 ps) y el equilibrio (375 ps en 6 pasos), se ejecutó la simulación de producción (1.000 ns para cada trayectoria).

RESULTADOS

4.1. ELECCIÓN, OPTIMIZACIÓN Y ANÁLISIS DE 4F2hc/LAT2

Para alcanzar el objetivo de resolver la estructura de un transportador heteromérico de aminoácidos es esencial realizar un estudio previo de varias proteínas candidatas para, así, encontrar aquella que presente un equilibrio entre una alta expresión y producción de la proteína de interés y una alta estabilidad. Cabe tener en cuenta que cuanto mayor sea la estabilidad de esta proteína, mayor será la calidad de la muestra que se empleará para realizar el estudio estructural, y por tanto, mayor posibilidad habrá de alcanzar una alta resolución.

En este sentido, esta proteína también será empleada para realizar los estudios funcionales que permitan demostrar que la proteína se encuentra en estado nativo y, según la resolución alcanzada, se podrá empezar a vislumbrar el mecanismo de acción. En definitiva, una elevada resolución junto con estudios funcionales permitirá obtener las claves que gobiernan el funcionamiento del transportador.

4.1.1. Cribado de los transportadores humanos candidatos

Nuestro objetivo inicial consistía en resolver la estructura de un HAT humano para lo cual el proyecto debía comenzar con un cribado de varios candidatos. Todos ellos se encontraban formados por la subunidad pesada 4F2hc conjugada con diferentes subunidades ligeras, LAT2, y+LAT1, y+LAT2 y xCT; cada uno de ellos con un diferente interés, tal y como se ha detallado en la Introducción.

La expresión de estas proteínas fue realizada en células humanas crecidas en suspensión, en las líneas celulares HEK293-6E y HEK293-MGA que resultaban en una expresión de proteína estándar o con déficit de glicosilación respectivamente.

Para realizar un cribado solo se requería un volumen pequeño de cultivo celular, ya que el análisis de estas proteínas fue realizado por cromatografía de exclusión molecular fluorescente (FSEC), tal como se ha detallado en la sección de Materiales y Métodos (sección 3.3.2.1).

4.1.1.1. Expresión en células HEK293-6E y MGA

Para la expresión de los candidatos HAT en las células humanas HEK293-6E se transfectaron 20 ml de cultivo celular cuya transfección fue realizada a una concentración de 2×10^6 cel/ml, 50 μ l de PEI-MAX y 10 μ g de cada construcción (4F2hc y subunidad ligera); empleando el ratio 1:4 de ADN:PEI-MAX. En paralelo, se realizaron dos incubaciones más, células transfectadas con un constructo control con la molécula GFP o células sin transfectar. La transfección de células HEK293-MGA fue realizada también en 20 ml de cultivo celular del mismo modo que las células anteriores, pero a una concentración de $1,47 \times 10^6$ cel/ml. Las transfecciones fueron realizadas por triplicado pudiéndose realizar así un cribado del tiempo de expresión (24, 48 y 72 horas).

La eficiencia de la transfección fue seguida a través de la fluorescencia emitida por la molécula GFP (situada en las subunidades ligeras, Figura 10, Materiales y Métodos) por microscopía óptica de fluorescencia tras la recogida del cultivo (Figura Suplementaria 2).

Entre todos los constructos HAT expresados, los heterodímeros con las subunidades ligeras xCT (para ambas células) y LAT2 (para las células HEK293-E6) presentaban mayor señal de fluorescencia, lo que se traducía en una mayor expresión. En la Figura Suplementaria 2 se muestran micrografías de las células en el momento de la recogida; al no ser una prueba cuantitativa no era posible determinar

que la mayor cantidad de expresión se debiera a un mayor porcentaje de transfección o a una mayor expresión por célula; razón por la cual, a partir de esta expresión las células recogidas se analizarían por citometría de flujo.

En el caso de las células HEK293-MGA, todas las proteínas fueron expresadas en un nivel menor que con las células anteriores; un porcentaje mucho menor de células presentaba fluorescencia como resultado de transfección (incluso en el control de transfección con GFP). En la Tabla 6 se muestran las RFU (R.F.U. *Relative Fluorescence Units*) de tales células solubilizadas, mostrando que la señal de las células HEK293-MGA es inferior a las células HEL293-6E.

Al comparar la diferente cantidad de fluorescencia según el tiempo de expresión apenas se observaron diferencias entre las expresiones de 48 y 72 horas. Mientras, una expresión de 24 horas resultaba insuficiente para alcanzar un nivel alto de expresión.

4.1.1.2. Análisis de fluorescencia por cromatografía de exclusión

El análisis conocido comúnmente como FSEC nos permite conocer, de forma rápida, la cantidad y la estabilidad de la proteína en cierto detergente a través de una solubilización y extracción de la fracción de interés que a su vez es separada por cromatografía de exclusión molecular y analizada por fluorescencia.

Paralelamente, a través de estos análisis también se realizaron UDS (por sus siglas en inglés *Ultracentrifugation Dispersity Sedimentation*) a partir de los cuales fue calculada la capacidad o eficiencia de solubilización de los diferentes detergentes empleados. Para realizar el ensayo UDS solo es necesario tomar las medidas de fluorescencia de las muestras ya solubilizadas, antes y después de un periodo de ultracentrifugación para, así, obtener el porcentaje de fluorescencia que se dispone en la fracción soluble (proteína solubilizada en el detergente de interés) (Tabla 6).

Se emplearon detergentes que suelen mostrar una buena eficiencia de solubilización y estabilidad para proteínas transmembranales, como los maltósidos (dodecilmaltósido o DDM y decilmaltósido o DM) y la digitonina.

Los dos primeros son detergentes comunes en el trabajo con proteínas de membrana, aunque ambos deben ser suplementados con colesterol hemisuccinato (CHS) (ratio 1:5 CHS:detergente,) ya que este resulta esencial en la estabilidad de proteínas transmembranales humanas. Por su lado, la digitonina es más peculiar y su uso es más inusual debido principalmente a su coste y dificultad de manipulación (altamente volátil y tóxico), pero recientemente se está empleando con éxito en estudios estructurales realizados en microscopía electrónica (Yan *et al.*, 2019).

Cada precipitado celular (*pellet*) procedente de 2 - 3 ml de cultivo de cada constructo HAT y los controles positivo y negativo fueron solubilizados en volúmenes finales de 700 µl de tampón de solubilización con cada combinación de detergente. Todos estos cultivos celulares procedieron de expresiones de 48 - 72 horas. Los medios tamponadores en los que se realiza la solubilización se componían de Tris-base 150 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, 10% de glicerol y cada tipo de detergente según el caso, DDM 1% / CHS 0,2%, DM 1% / CHS 0,2% o digitonina 2%. La solubilización de los dos primeros fue realizada durante 1h a 4 °C en agitación orbital, mientras que para la digitonina la solubilización se llevó a cabo durante 2h.

Trascurrido el tiempo de solubilización, las muestras fueron ultracentrifugadas a 200.000 xg durante 1h a 4 °C y cada sobrenadante fue analizado por SEC en una columna Superosa 200 10/30 equilibrada con Tris-base 20 mM, NaCl 150 mM y DDM 0,05% / CHS 0,01% para todos los casos.

Se recogieron fracciones de 200 µl que fueron analizadas por fluorescencia en el fluorímetro. Paralelamente, se recogieron las muestras de cada detergente, antes y después de ser centrifugadas, para realizar el análisis UDS.

	E6	MGA	E6	MGA	E6	MGA	E6	MGA		
A	DDM 1%/CHS 0,2%		4F2hc/y+LAT1		4F2hc/y+LAT2		4F2hc/LAT2		4F2hc/xCT	
	Solubilización	326	152	304	142	439	104	487	124	
	SN ultracentrifugación	227	102	137	52	236	104	285	97	
	Porcentaje	69,3%	66,2%	45,1%	36,6%	53,6%	100%	58,5%	78,2%	
B	DM 1%/CHS 0,2%		4F2hc/y+LAT1		4F2hc/y+LAT2		4F2hc/LAT2		4F2hc/xCT	
	Solubilización	455	187	238	73	582	184	381	104	
	SN ultracentrifugación	365	104	176	62	383	127	220	77	
	Porcentaje	80,1%	55,6%	73,8%	84,9%	65,8%	69%	57,7%	74%	
C	DG 2%		4F2hc/y+LAT1		4F2hc/y+LAT2		4F2hc/LAT2		4F2hc/xCT	
	Solubilización	493	370	301	147	515	243	395	237	
	SN ultracentrifugación	200	181	154	109	426	79	192	123	
	Porcentaje	40,6%	48,9%	51,1%	74,1%	82,7%	32,5%	48,6%	51,9%	

Tabla 6: Medidas RFUs de los ensayos UDS de las expresiones en HEK293-E6 y HEK293-MGA. Los resultados procedentes de las células HEK293-E6 se sitúan en la columna izquierda y los que proceden de las células HEK293-MGA se sitúan en la columna derecha. Al medir la diferencia entre las medidas de después y de antes de la solubilización obtenemos el porcentaje de muestra solubilizada, gracias a los cuales conocemos la capacidad de solubilización de los detergentes empleados. Las RFUs (*Relative Fluorescence Units*) mostradas corresponden a la fluorescencia de la GFP presente en las subunidades ligeras; están normalizadas a 1 ml. Los resultados coloreados en rojo son considerados artefactuales (posteriores experimentos lo sugieren). A) HATs procedentes de 3 ml de cultivo celular de la expresión de 48 horas solubilizados en DDM 1% / CHS 0,2%. B) HATs procedentes de 2 ml de cultivo celular de la expresión de 48 horas solubilizados en DM 1% / CHS 0,2%. C) HATs procedentes de 2 ml de cultivo celular de la expresión de 72 horas solubilizados en digitonina 2%.

Los ensayos UDS con cada uno de los detergentes empleados mostraron resultados muy dispares. En primer lugar, las medidas de fluorescencia mostradas en la Tabla 6 corroboraban que las mismas construcciones en las células HEK293-MGA se expresaban a menor nivel (de entre 2 y 4 veces). Entre las células HEK293-E6 era destacable que 4F2hc/y+LAT2 presentaba en general una menor expresión en comparación con, por ejemplo, 4F2hc/LAT2, el cual mostraba una media de unas 200 unidades (70% - 100%) más de RFU.

En las células HEK293-E6, los resultados mostraban que la combinación DM/CHS era la que mayor cantidad de transportador solubilizaba; los resultados revelaban una eficiencia de solubilización entre el 58 y el 80% con una media de 70,2%. Por otro lado, la solubilización obtenida en DDM/CHS reportó unas solubilizaciones situadas entre el 45% y el 69%, con una media de eficiencia de solubilización del 56,2%. Por último, la digitonina presentaba una eficiencia de solubilización baja sin

importar la proteína solubilizada; a excepción de 4F2hc/LAT2 cuyo resultado es de un 80% de solubilización lo que resulta anormal, atípico y que ha sido considerado como artefactual (a partir de los resultados de las solubilizaciones realizadas con posterioridad).

Por otro lado, los datos de fluorescencia de las expresiones en HEK293-MGA mostraban, en la mayoría de los casos, una eficiencia de solubilización superior a las proteínas expresadas en las células HEK293-6E.

El análisis de estabilidad en diferentes detergentes es un parámetro esencial para seleccionar las condiciones de purificación posteriores. La solubilización con diferentes detergentes no solo muestra cuáles de ellos tienen mayor capacidad de obtener una mayor cantidad de proteína, también muestra la estabilidad que aporta a la proteína sugiriendo cuáles de ellos resultan en una proteína de mayor calidad y en una mayor homogeneidad de la muestra.

Por tanto, para conocer la diferente estabilidad que pueden mostrar las proteínas solubilizadas según el detergente empleado debemos observar las gráficas procedentes de la fluorescencia medida de las fracciones separadas por SEC (Figura 13).

En general, las curvas de FSECs de las proteínas expresadas en las células HEK293-E6 mostraban un perfil cuyos picos se encontraban entre los 11 y 13 ml del volumen de elución de la SEC. Mientras que aquellas procedentes de las células HEK293-MGA presentaban estos máximos ligeramente desplazados a volúmenes de elución más altos (Figura 13).

Esta diferencia de tamaño puede deberse a la ausencia de glicosilaciones en las células HEK293-MGA que resultaba en proteínas de menor peso molecular. Además, los perfiles de fluorescencia procedentes de las células HEK293-E6 presentaban mayor número de diferencias entre detergentes respecto a las células HEK293-MGA cuyos perfiles de FSEC eran muy similares entre ellos. Los ensayos UDS mostraban mayores valores de solubilización cuando se empleaban las combinaciones DDM/CHS y DM/CHS, lo cual se correlaciona con los análisis de FSEC, donde son estas las que presentaban picos más altos (Figura 13, líneas continuas). Del mismo modo, los resultados de los ensayos UDS eran muy similares entre ellos para el caso de las células HEK293-MGA, cuyos resultados en los análisis FSEC también mostraban la misma similitud.

En el caso de las células HEK293-6E solubilizadas en DDM/CHS, las proteínas 4F2hc/xCT y 4F2hc/y+LAT2 presentaban una heterogeneidad más alta al mostrar dos picos principales, aunque tales proteínas mostraban un perfil más homogéneo para el resto de los detergentes usados (Figura 13 - B y D). Por su lado, la proteína 4F2hc/y+LAT1 mostraba un perfil de FSEC aceptablemente homogéneo y similar para todos los detergentes analizados; sin embargo, su nivel de expresión (según la altura del pico de fluorescencia) no era el mejor de todos.

Por último, entre todas las solubilizaciones se observó que la proteína 4F2hc/LAT2 presentaba el pico más alto y homogéneo, en todos los detergentes testados, destacando DDM/CHS (Figura 13 - A). Por tanto, era esta proteína la que presentaba un mayor equilibrio entre expresión y solubilización (aunque no para todos los detergentes analizados).

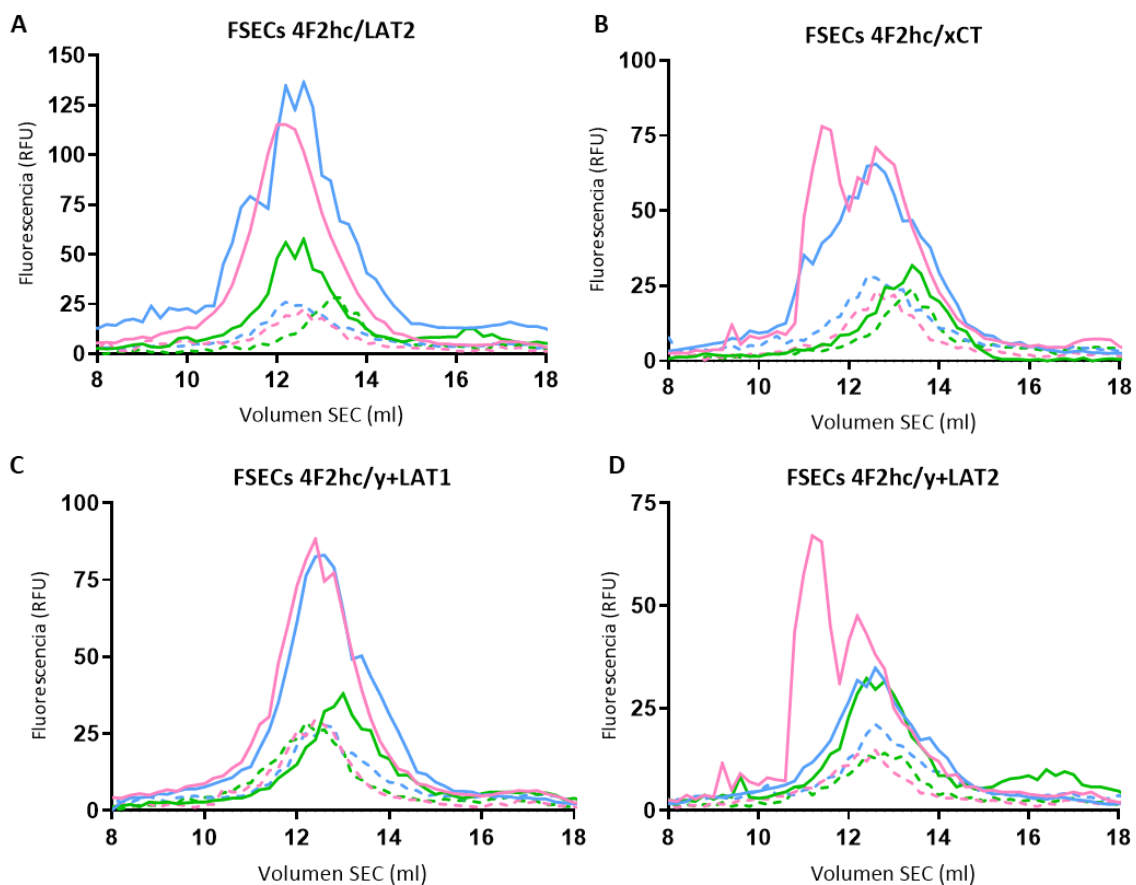
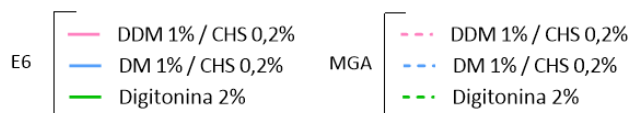


Figura 13: Comparación de los perfiles FSEC de las proteínas HAT candidatas. Representación de la señal de fluorescencia de GFP en RFUs de las muestras solubilizadas en DDM 1% / CHS 0,2% (rosa), DM 1% / CHS 0,2% (azul) y digitonina 2% (verde); gráficas normalizadas por 1 ml de cultivo celular. La separación de la muestra se ha realizado por SEC. (A) 4F2hc/LAT2, (B) 4F2hc/xCT, (C) 4F2hc/y+LAT1 y (D) 4F2hc/y+LAT2 expresados en HEK293-E6 (líneas continuas) y células HEK293-MGA (líneas discontinuas).

4.1.1.3. Comparación y elección de las proteínas candidatas

A partir de la comparación entre los HATs solubilizados con diferentes detergentes y a su vez expresados en ambas líneas de HEK293 empleadas, obtuvimos suficientes resultados para decidir qué sistema de expresión sería más provechoso usar y qué candidatos de los HATs cribados podrían dar mejores resultados. Para todo ello, se debía tener en cuenta el equilibrio entre una alta expresión y una adecuada estabilidad.

En este sentido, los HATs expresados en las células con déficit de glicosilación fueron expresados en menor cantidad, entre 3 y 4 veces menos en comparación con las células HEK293-E6 (se ha tomado los picos máximos de fluorescencia para realizar esta comparación), lo que resultaba ser un gran inconveniente. Sin embargo, a la vista de los resultados de FSEC, las células HEK293-MGA dieron mejores resultados al mostrar un único pico en los perfiles y una solubilización mayor al 70%.

A continuación, se detallan las conclusiones particulares de cada heterodímero:

- **4F2hc/y+LAT2** es la proteína que presentaba mayor heterogeneidad y base más ancha en todos los casos, siendo además la proteína que menor expresión mostraba (sobre todo en las células HEK293-6E) (Figura suplementaria 2).
- **4F2hc/xCT** expresado en células HEK293-6E presentaba picos de fluorescencia muy bajos y/o muy anchos y heterogéneos; aunque en las células HEK293-MGA los picos del perfil de FSEC mejoraron y fueron más similares a los resultados de otros HATs.
4F2hc/y+LAT1 mostraba un comportamiento similar en ambas células, pudiendo ser un buen candidato para realizar una expresión y purificación a mayor escala. Esta purificación podría ser probada con diferentes detergentes puesto que los picos resultantes no fueron muy diferentes entre ellos.
- **4F2hc/LAT2** presentaba el mejor perfil de SEC en DDM/CHS de todos los candidatos analizados con las células HEK293-6E; pero lo más importante es que el resultado con otros detergentes también era aceptable lo que da lugar a varias posibles condiciones de trabajo hasta alcanzar una proteína con calidad suficiente para estudios estructurales.

En definitiva, los mejores candidatos con los que se continuó trabajando eran 4F2hc/LAT2 y 4F2hc/y+LAT1, que, como ya se ha mencionado, mostraron un nivel de expresión aceptable y unos buenos perfiles de FSEC con diferentes detergentes.

Estos HATs fueron finalmente expresados en las células HEK293-6E, ya que, aunque su eficiencia de solubilización o sus perfiles de FSEC no resultaban tan buenos como en el caso de las células HEK293-MGA, sus niveles de expresión eran muy superiores.

4.1.2. Análisis de estabilidad de 4F2hc/LAT2 y 4F2hc/y+LAT1

A partir del cribado anterior, se seleccionaron 4F2hc/y+LAT1 y 4F2hc/LAT2 como los heterodímeros que mejores resultados presentaban en los diferentes detergentes testados. Sin embargo, estos análisis se realizaron en presencia de GFP unida a la subunidad ligera.

Por lo que, para continuar con el estudio de estabilidad, era necesario analizar la estabilidad de las proteínas candidatas purificadas y en ausencia de GFP. Estas proteínas fueron expresadas en células HEK293-6E a mayor escala y cada *pellet* celular fue empleado para realizar las oportunas purificaciones para ver su homogeneidad en ausencia de GFP en micelas formadas por diferentes detergentes.

En la primera purificación realizada se usó la combinación DDM/CHS ya que en el cribado de solubilización y estabilidad anterior era el que mejores resultados mostraba.

4.1.2.1. Purificación de 4F2hc/LAT2 con DDM/CHS

La purificación de 4F2hc/LAT2 fue realizada como se encuentra descrito en el apartado 3.3.1. En cada paso de la purificación realizada se recogieron 100 µl de muestra para realizar posteriormente el seguimiento por fluorescencia de la proteína que se estaba purificando.

La purificación fue realizada a partir de un *pellet* celular congelado procedente de 200 ml de cultivo celular, cuya transfección fue realizada cuando la concentración celular era de $2,1 \times 10^6$ cel/ml. El

pellet fue resuspendido en 25 ml de tampón Tris-base 20 mM, NaCl 150 mM y DDM 1% / CHS 0,2% para realizar una solubilización de 1 hora a 4 °C en agitación orbital.

Tras la ultracentrifugación, la muestra fue incubada con las diferentes resinas de afinidad, (Streptactin y Ni-NTA), donde el tampón de purificación pasó a estar formado por Tris-base 20 mM, NaCl 150 mM y DDM 0,02% / CHS 0,004%. Una vez lavadas y eluidas las respectivas resinas y realizado el corte por la diana proteolítica de la proteasa 3C, se obtuvo el heterodímero 4F2hc/LAT2 con la secuencia *twin-Strep-tag* en la subunidad pesada, pero sin cola de histidinas ni GFP en la subunidad ligera (no pudiendo ser a partir de tal momento cuantificado por fluorescencia). La muestra eluida de la resina Ni-NTA como resultado del corte con 3C fue concentrada, filtrada, cuantificada y analizada por SEC empleando la columna Superdex 200 5/150.

La fracción correspondiente a la proteína no cortada por la proteasa 3C y que quedaba retenida en la resina Ni-NTA también contenía la GFP cortada y la proteasa 3C, y para ser eluidas se empleó 350 mM de imidazol, disociándose todo aquello que poseía una cola de histidinas. Esta fracción fue concentrada hasta un volumen aproximado de 100 µl que fue filtrado, cuantificado y analizado por SEC empleando la columna Superdex 200 5/150.

Por tanto, a partir de 200 ml de cultivo celular de 4F2hc/LAT2 que fue purificado en DDM 1% /CHS 0,2% y filtrado para eliminar agregados se obtuvo:

- 4F2hc/LAT2: 0,12 mg totales (1,2 mg/ml en 0,090 ml). La concentración bajó un 40% tras el filtrado, lo cual indica que la proteína presentaba una baja estabilidad formando agregados.
- 4F2hc/LAT2-GFP y GFP: 0,068 mg totales (0,4 mg/ml en 0,170 ml).

La proteína 4F2hc/LAT2 purificada en DDM/CHS presentaba un perfil de SEC asimétrico (Figura 14, azul oscuro). Sin embargo, al ser la cantidad de proteína obtenida aceptable, se podría considerar optimizar las condiciones de purificación con el objetivo de mejorar el perfil de SEC de la proteína.

En referencia al perfil de la SEC de la fracción eluida no cortada, no se observaba proteína en el volumen de elución correspondiente al heterodímero (Figura 14, azul claro), lo que sugiere que toda la proteína 4F2hc/LAT2 retenida en la resina Ni-NTA era cortada de manera eficiente por la proteasa 3C bajo estas condiciones.

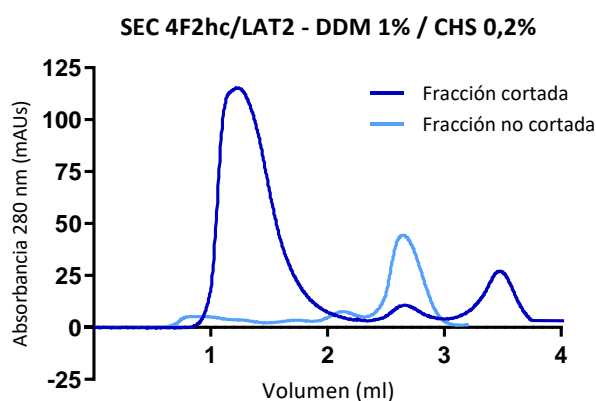


Figura 14: Perfil de SEC correspondiente a 4F2hc/LAT2 purificado en DDM/CHS. En azul oscuro se muestra la fracción cortada con la proteasa 3C y en azul claro la fracción no cortada y eluida con imidazol 350 mM.

La tabla A de la figura 15 resulta de gran utilidad para realizar un seguimiento de la proteína a través del proceso de purificación gracias a la fluorescencia emitida por la GFP; nos indica que la solubilización ha presentado una elevada eficiencia, aunque más de la mitad de esta proteína se perdía al no unirse a la resina Streptactin (volumen que pasa a través de la resina) (y correspondiendo al 45% de la fluorescencia inicial). Sin embargo, en esta ocasión al no haberse medido la cantidad de fluorescencia presente en el volumen eluído de la resina de Streptactin, no fue posible calcular la cantidad de fluorescencia que se queda unida a la resina de Ni-NTA.

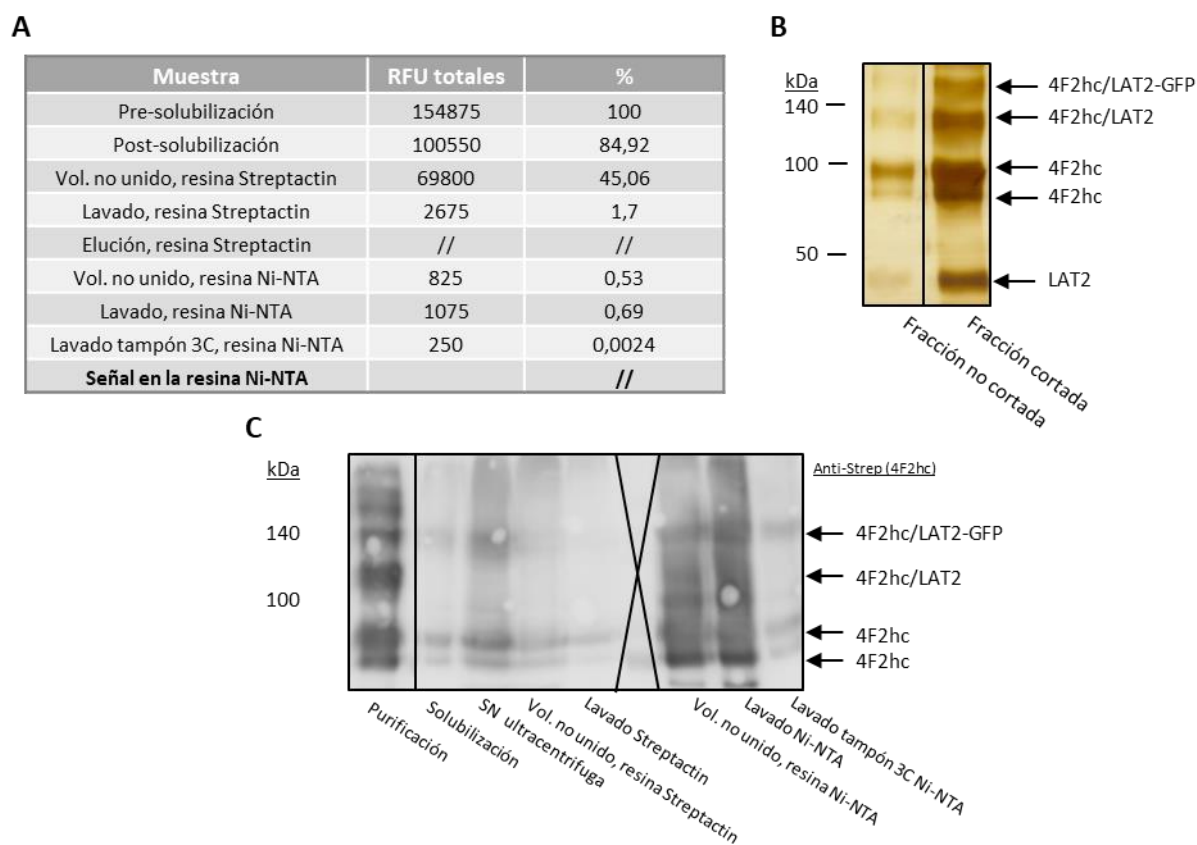


Figura 15: Detección de 4F2hc/LAT2 purificado en DDM/CHS. A) Detección de la proteína por fluorescencia en cada paso de la purificación. Calculando el porcentaje de fluorescencia que queda en cada paso con respecto a la fluorescencia inicial se conoce la eficiencia de la purificación. El cálculo de la señal que queda en la resina Ni-NTA proviene de restar la señal que existe en la elución de la resina Streptactin, lo que se pierde por no unirse a esta y por los lavados de la resina Ni-NTA. B) Gel de electroforesis al 8% teñido con plata, contiene los picos de las muestras que han sido analizadas por SEC, muestras eluídas cortada y no cortada. C) WB con gel del 8% de acrilamida, detección del heterodímero a lo largo de la purificación con anticuerpo *anti-Strep-tag*. No fue cargada la muestra procedente de la elución de la resina Streptactin (carril tachado).

La imagen del gel teñido con plata (Figura 15 - B) mostraba que gran parte del heterodímero se ha roto y que además hay contaminación de proteína 4F2hc/LAT2 con GFP (no cortada) que se ha eluído de la resina Ni-NTA sin necesidad de una concentración alta de imidazol. La rotura del heterodímero observado puede deberse al proceso de congelación previo a la realización de la electroforesis o que este tipo de micela no aporte la suficiente estabilidad. Sin embargo, también podría deberse al DTT 1 mM que contiene el tampón 3C, que podría romper el puente disulfuro que une ambas subunidades. Para la siguiente purificación el corte fue realizado con un tampón 3C que no contenía DTT para observar si había diferencias de corte o de rotura entre las subunidades.

A través del WB (Figura 15 - C) se corroboraba que, efectivamente, la GFP se cortaba (tal muestra no emitía fluorescencia), observándose una disminución de 20 - 30 kDa del tamaño de la banda correspondiente al heterodímero.

4.1.2.2. Purificación de 4F2hc/y+LAT1 con DDM /CHS

La purificación de 4F2hc/y+LAT1 fue realizada en líneas generales como se encuentra descrito en el apartado 3.3.1.

A partir de 200 ml de cultivo celular de 4F2hc/y+LAT1 que fue purificado en DDM 1% /CHS 0,2% y filtrado para eliminar agregados se obtuvo:

- 4F2hc/y+LAT1: 0,036 mg totales (0,4 mg/ml en 0,090 ml). La concentración bajó un 30% tras el filtrado, lo cual indica que la proteína presentaba una baja estabilidad formando agregados.
- 4F2hc/y+LAT1-GFP y GFP: 0,06 mg totales (0,6 mg/ml en 0,100 ml).

La cantidad de proteína obtenida fue de hasta 3 veces inferior comparada con 4F2hc/LAT2 bajo las mismas condiciones. Las RFUs totales iniciales son hasta 2 veces más bajas que las de 4F2hc/LAT2 (Figura 16 - B), indicando menor expresión. Durante el cribado de varios candidatos HAT también se observó una expresión superior en 4F2hc/LAT2 (Tabla 6).

La purificación con la combinación DDM/CHS parece aportar una similar estabilidad a ambas proteínas; en ambos casos se perdía alrededor del 30% de la cantidad purificada tras la filtración realizada para retirar los agregados.

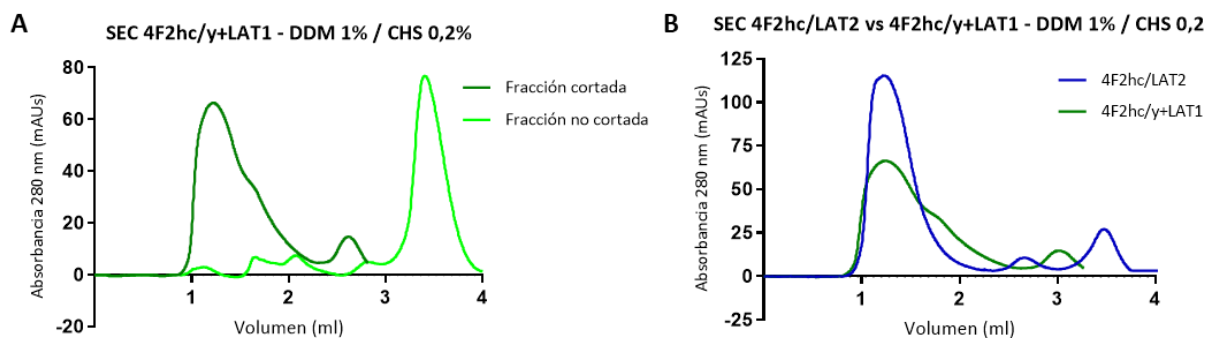


Figura 16: Perfil de SEC correspondiente a 4F2hc/y+LAT1 purificado en DDM/CHS. A) Purificación de 4F2hc/y+LAT1 en DDM/CHS; en verde oscuro se muestra la fracción cortada y en verde claro la fracción no cortada. B) Comparación de la purificación en DDM 1% / CHS 0,2% de 4F2hc/y+LAT1 en verde y 4F2hc/LAT2 en azul.

No obstante, el perfil de la SEC de 4F2hc/y+LAT1 purificada en DDM/CHS mostraba mayor heterogeneidad que el de 4F2hc/LAT2 (Figura 16 - B); es un pico ancho y no homogéneo con un hombro posterior mucho más prominente (Figura 16 - A). Por tanto, la combinación de DDM/CHS no aportaba la suficiente homogeneidad a ninguna de las proteínas probadas para realizar un estudio estructural satisfactorio.

Con el mismo resultado que en la purificación anterior, el perfil de SEC procedente de la proteína no cortada no mostraba proteína en el volumen de elución correspondiente al heterodímero, lo que sugiere que toda la proteína era cortada con la misma eficiencia que la purificación anterior aún incluso utilizando un tampón 3C carente de DTT (Figura 16 - A, verde claro). En el mismo sentido, la ausencia de bandas en el gel teñido con plata (Figura 17 - B) también indicaba que toda la proteína se cortaba eficientemente.

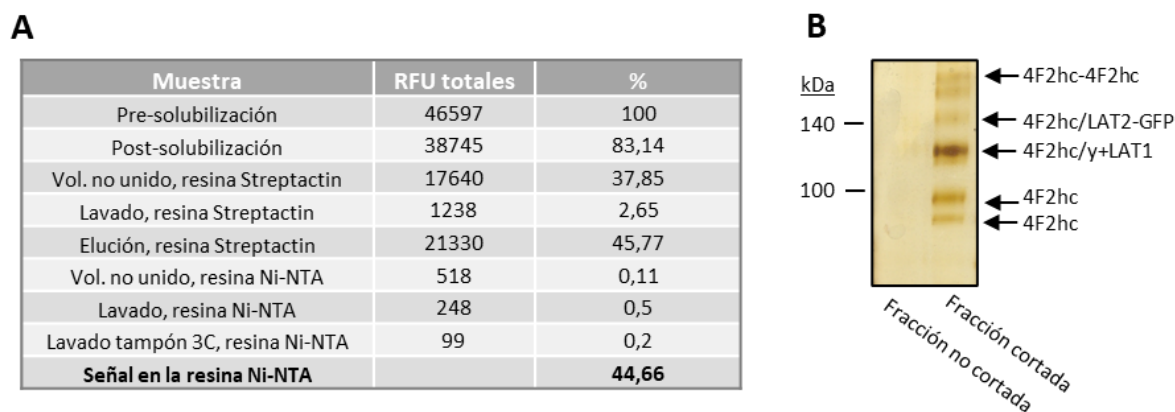


Figura 17: Detección de 4F2hc/y+LAT1 purificado en DDM/CHS. A) Detección de la proteína por fluorescencia en cada paso de la purificación. Calculando el porcentaje de fluorescencia que queda en cada paso con respecto a la fluorescencia inicial se conoce la eficiencia de la purificación. El cálculo de la señal que queda en la resina Ni-NTA proviene de restar la señal que existe en la elución de la resina Streptactin, lo que se pierde por no unirse a esta y por los lavados de la resina Ni-NTA. C) Gel de electroforesis al 8% teñido con plata, contiene las fracciones cortada y no cortada procedentes de la purificación.

La tabla de la figura 17 muestra que la eficiencia de la purificación es bastante similar a la purificación realizada con las mismas condiciones para 4F2hc/LAT2; la solubilización es mayor al 80% pero de nuevo, prácticamente la mitad de esta fluorescencia se perdía al no unirse a la resina Streptactin. Y, la medida que no pudo realizarse en la purificación anterior, la fluorescencia que fue eluída de la resina Streptactin, ha permitido en este caso calcular que la proteína que permanece unida a la resina Ni-NTA para ser cortada corresponde al 45% inicial, lo que indica una aceptable eficiencia de purificación.

Además, la imagen del gel teñido por plata muestra que el heterodímero se rompía en sus dos subunidades, aunque las bandas de las subunidades ligeras eran menos intensas que en el caso de 4F2hc/LAT2 (Figura 17 - B) (al haber empleado un gel del 8% no podemos ver la región donde estaría la subunidad ligera, sobre los 50 kDa). Este gel indicaba además que la muestra procedente de la fracción cortada contenía una pequeña parte de proteína con GFP. Por tanto, al igual que en el caso de 4F2hc/LAT2, en la muestra cortada se observaban bandas superiores al heterodímero que corresponden al heterodímero no cortado (no siendo la muestra homogénea) y también al dímero de 4F2hc (una vez roto el heterodímero purificado, los 4F2hc se pueden unir entre ellos).

En definitiva, todos estos resultados en conjunto nos indican que tanto 4F2hc/LAT2 como 4F2hc/y+LAT1 purificadas en DDM/CHS dan lugar a proteínas inestables y heterólogas que no resultarían ideales para la realización de estudios estructurales. Es por ello, que se decidió continuar

en paralelo con ambos HATs probando otro de los detergentes que en el análisis FSEC había dado resultados prometedores, la digitonina.

4.1.2.3. Purificación de 4F2hc/LAT2 con digitonina

La purificación fue realizada en líneas generales como se encuentra descrito en el apartado de Materiales y Métodos 3.3.1.

La purificación fue realizada a partir de un *pellet* celular congelado procedente de 200 ml del mismo cultivo celular que el utilizado en la purificación con DDM/CHS. La solubilización fue llevada a cabo en 2% de digitonina durante 2 horas a 4 °C en agitación orbital. El tampón de purificación estaba compuesto por Tris-base 20 mM, NaCl 150 mM y 0,1% de digitonina, y, al igual que en la purificación anterior, el tampón 3C ya no contenía DTT.

Por tanto, a partir de 200 ml de cultivo celular de 4F2hc/LAT2 que fue purificado en digitonina 2% y filtrado para eliminar agregados se obtuvo:

- 4F2hc/LAT2: 0,096 mg totales (0,8 mg/ml en 0,120 ml). La concentración no bajó tras el filtrado.
- 4F2hc/LAT2-GFP y GFP: 0,035 mg totales (0,25 mg/ml en 0,140 ml).

La cantidad de proteína purificada final era aceptable, aunque no tanto como cuando fue purificada por DDM/CHS pero suficiente para poder realizar estudios estructurales y funcionales (sobre todo teniendo en cuenta que solo se había partido de 200 ml de cultivo). La diferencia importante respecto a la misma proteína purificada en DDM/CHS es que con digitonina aparentaba tener mayor estabilidad, ya que al realizar el filtrado para eliminar agregados tras la purificación no se perdía proteína, siendo entonces la condición que aportaba mayor estabilidad de las chequeadas.

Aunque lo más destacable era el pico del perfil de la SEC que resultaba ser el mejor de todos; se trataba de un pico alto, estrecho y simétrico (Figura 18). Fue un resultado muy satisfactorio y que cumple nuestras expectativas para realizar estudios estructurales y funcionales.

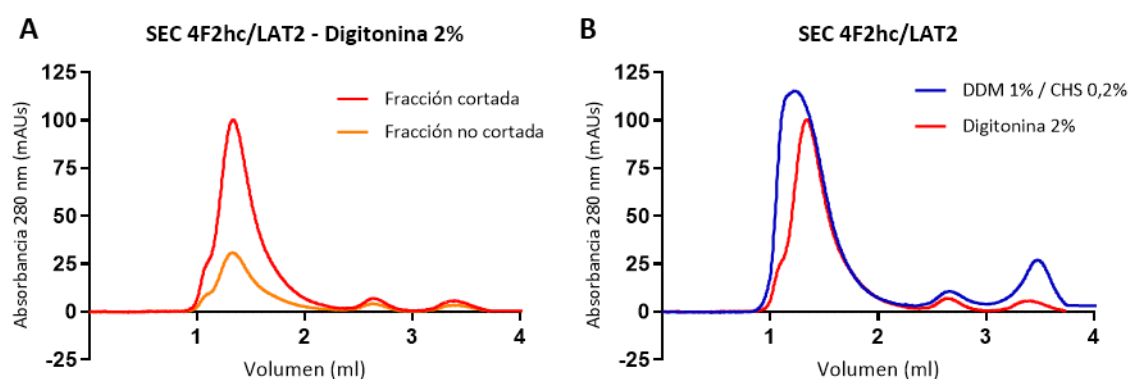


Figura 18: Perfiles de SEC correspondientes a 4F2hc/LAT2 purificado en digitonina 2%. A) SEC de 4F2hc/LAT2 purificado en digitonina, en rojo la fracción cortada y en naranja la fracción no cortada. B) Comparación de 4F2hc/LAT2 purificado con diferentes detergentes, en azul con DDM/CHS y en rojo con digitonina.

La eficiencia de la solubilización de 4F2hc/LAT2 con digitonina era muy inferior a la realizada por DDM/CHS (Figura 15 - A y Figura 19 - A). Al igual que en el caso de emplear DDM/CHS, la muestra que

se perdía al no unirse a la resina Streptactin fue también prácticamente la mitad de la cantidad de muestra solubilizada.

La parte en contra a la buena estabilidad que parece que ha aportado la digitonina a la proteína es que en la resina de Ni-NTA quedaba un 30% de la fluorescencia inicial en comparación con un 45% en el caso de realizar la purificación con DDM/CHS (Figura 19 - A). Sin embargo, aunque finalmente se haya purificado menor cantidad de proteína, esta se encontraba en unas condiciones mucho más estables y satisfactorias.

A parte del pico de SEC, otro punto a favor se encontraba en la pureza de la proteína; a la vista del del gel teñido con plata (Figura 19 - B). De esta manera, visualizamos que, efectivamente, la purificación con digitonina conferiría a la proteína mayor estabilidad en comparación con la purificación en presencia de DDM/CHS; no hay contaminación por parte de proteína no cortada ni subunidades solas por lo que esta proteína no tenía tendencia a disociarse en sus dos subunidades en presencia de digitonina, incluso tras el proceso de congelación. Este hecho es apreciado mucho mejor en las fracciones del pico cargadas en el gel, donde la banda correspondiente al heterodímero era mucho más intensa.

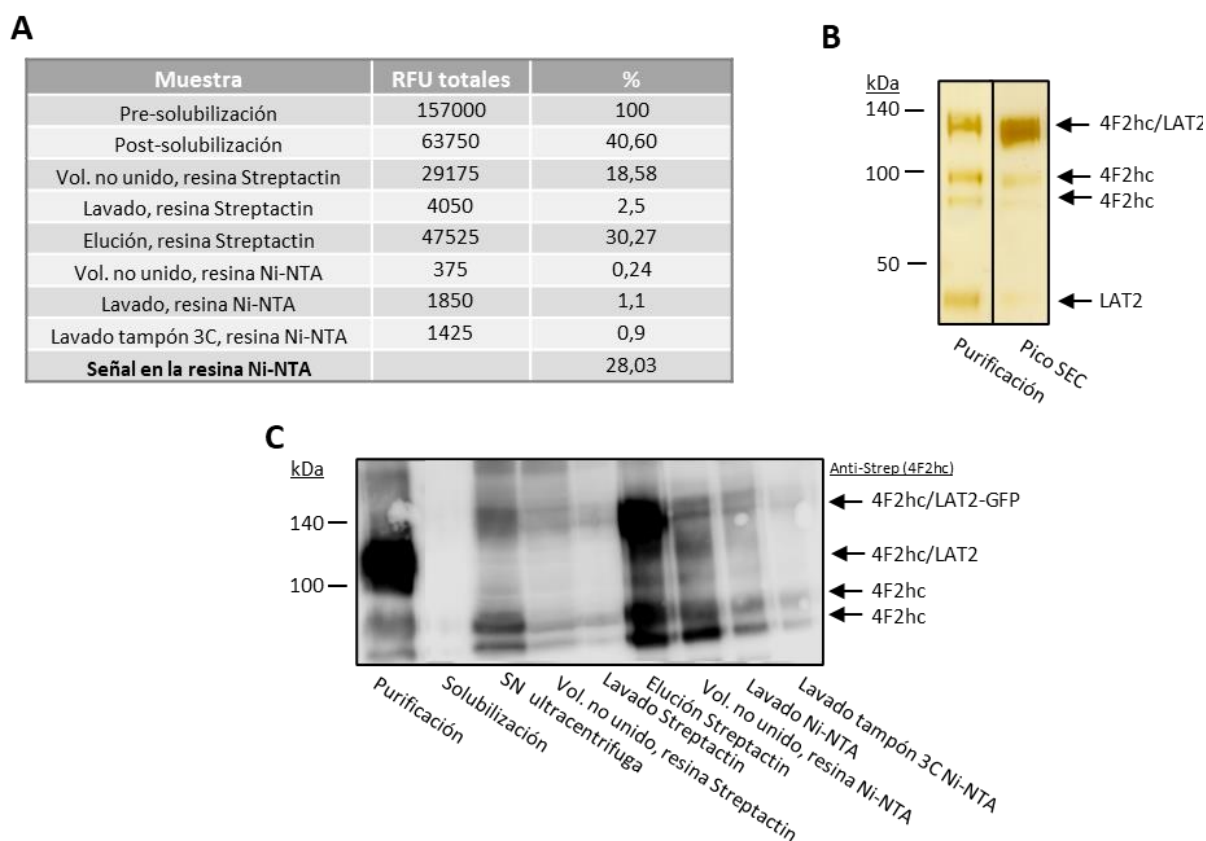


Figura 19: Detección de 4F2hc/LAT2 purificado en digitonina 2%. A) Detección de la proteína por fluorescencia en cada paso de la purificación. Calculando el porcentaje de fluorescencia que queda en cada paso con respecto a la fluorescencia inicial se conoce la eficiencia de la purificación. El cálculo de la señal que queda en la resina Ni-NTA proviene de restar la señal que existe en la elución de la resina Streptactin, lo que se pierde por no unirse a esta y por los lavados de la resina Ni-NTA. B) Gel de electroforesis al 8% teñido con plata, contiene los picos de las muestras que han sido analizadas por SEC, muestras cortadas. C) WB del gel al 8% de acrilamida, detección del heterodímero a lo largo de la purificación con anticuerpo anti-Strep-tag.

Además, a través del WB se corroboraba de nuevo que la GFP se había cortado correctamente (por tanto, el DTT no es esencial para la acción de corte de la proteasa 3C); observamos una bajada de 20 - 30 kDa de la banda correspondiente al heterodímero (Figura 19 - C). Además, se observaba que no había bandas correspondientes al heterodímero no cortado ni al dímero de 4F2hc, lo cual reforzaba el alto nivel de estabilidad de 4F2hc/LAT2 en digitonina.

4.1.2.4. Purificación de 4F2hc/y+LAT1 con digitonina

La purificación fue realizada en líneas generales como se encuentra descrito en el apartado de Materiales y Métodos 3.3.1; las especificaciones fueron las mismas que la purificación realizada anteriormente con 4F2hc/LAT2 en digitonina.

La purificación fue realizada a partir de un *pellet* congelado procedente de 200 ml del mismo cultivo celular que se utilizó para la purificación con DDM/CHS. La solubilización fue llevada a cabo con un 2% de digitonina durante 2 horas a 4 °C en agitación orbital. Al ser otro el detergente empleado, el tampón de purificación estaba compuesto por Tris-base 20 mM, NaCl 150 mM y digitonina 0,1%, y además, para este caso el tampón 3C tampoco contenía DTT.

Por tanto, a partir de 200 ml de cultivo celular con 4F2hc/y+LAT1 que fue purificado en digitonina 2% y filtrado para eliminar agregados se obtuvo:

- 4F2hc/y+LAT1: 0,013 mg totales (0,13 mg/ml en 0,100 ml). La concentración bajó un 80% tras el filtrado.
- 4F2hc/y+LAT1-GFP y GFP: 0,01 mg totales (0,1 mg/ml en 0,100 ml). La concentración bajó un 70% tras el filtrado.

El resultado era muy diferente a 4F2hc/LAT2 purificado del mismo modo, el cual presentaba al contrario que en este caso, tal estabilidad que no había agregados ni pérdida de proteína purificada. La baja cantidad de proteína purificada obtenida también se observaba en la altura del pico de la SEC (Figura 20 - A), que solo alcanza los 20 mUAs (unidades de absorbancia). Además, estos perfiles también han mostrado que la eficiencia del corte no fue perfecta, ya que observamos un pico correspondiente al tamaño del heterodímero con GFP en la fracción eluída con imidazol (Figura 20 - A, rosa).

En la gráfica B de la figura 20 se muestra una comparación de los perfiles de SEC de 4F2hc/y+LAT1 según el detergente empleado; la proteína mostraba un aspecto mucho mejor si la purificación se realizaba con digitonina. Cuando 4F2hc/y+LAT1 era purificado en digitonina se obtenía menor cantidad de proteína (pérdida por agregación) pero la homogeneidad de la muestra era mayor.

Por último, en los paneles C y D se comparan los dos perfiles de SEC de ambas proteínas, 4F2hc/LAT2 y 4F2hc/y+LAT1, purificadas con digitonina. A pesar de que 4F2hc/y+LAT1 perdía una gran cantidad al ser filtrado, el perfil de SEC obtenido en presencia de digitonina resultaba de calidad similar al observado en el caso de 4F2hc/LAT2 (Figura 20 - D), siendo la digitonina un detergente que permite purificar a homogeneidad cualquiera de las dos proteínas de interés, aunque confiere mayor estabilidad en el caso de LAT2.

La eficiencia general de la purificación era similar a la obtenida en el caso de 4F2hc/LAT2; del mismo modo, la mitad de esta proteína solubilizada se perdía al no unirse a la resina Streptactin (Figura 21 - A). Aquí es importante comentar, al igual que en la anterior purificación con 4F2hc/LAT2, que la fluorescencia que se pierde en digitonina podría corresponder únicamente a la subunidad ligera o a heterodímero no correctamente unido, ya que solo entre un 10 y un 15% de pérdida no es excesivo (Figura 19 - A y C).

Por el contrario, para el caso de la purificación con DDM/CHS el perderse el 40% de fluorescencia corresponde a algo más que solo subunidad ligera o heterodímero no correctamente unido. En el caso del DDM/CHS debe existir alguna otra causa por la cual el doble de cantidad de fluorescencia se pierde al no unirse a la resina Streptactin, pero que luego no se ve reflejada como pérdida excesiva del heterodímero en el WB (Figura 15 - C).

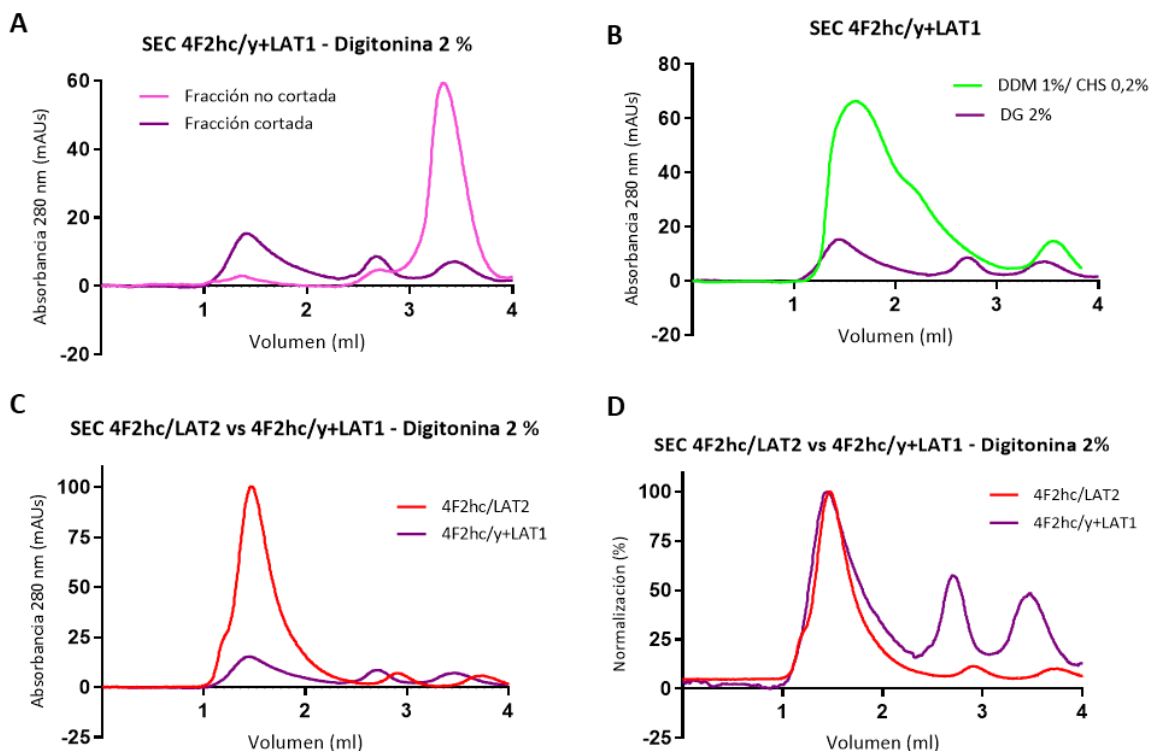


Figura 20: Perfiles de SEC correspondientes a las muestras purificadas de 4F2hc/y+LAT1 en digitonina 2%. A) SEC de 4F2hc/y+LAT1 purificado en digitonina 2%; en morado la fracción cortada y en rosa la fracción no cortada. B) Comparación de 4F2hc/y+LAT1 purificado con diferentes detergentes, en verde con DDM/CHS y en morado con digitonina. C) Comparación de 4F2hc/y+LAT1 en morado y 4F2hc/LAT2 en rojo; la purificación de ambas realizada en digitonina 2%. D) Misma comparación que la gráfica C) pero normalizado por altura, así observamos la diferencia en los perfiles.

El gel teñido con plata muestra que esta proteína en digitonina, al contrario que 4F2hc/LAT2, presentaba una tendencia a romperse en sus dos subunidades (Figura 21 - B) (aunque no tanto como con DDM/CHS; Figura 17- B), Y del mismo modo que en la misma purificación de 4F2hc/LAT2, toda la proteína se ha cortado correctamente; lo cual es indicado por la ausencia de bandas en el carril derecho y de bandas superiores a 140 kDa en el carril izquierdo (Figura 21 - B).

A

Muestra	RFU totales	%
Pre-solubilización	46597	100
Post-solubilización	38745	83,14
Vol. no unido, resina Streptactin	17640	37,85
Lavado, resina Streptactin	1238	2,65
Elución, resina Streptactin	21330	45,77
Vol. no unido, resina Ni-NTA	518	0,11
Lavado, resina Ni-NTA	248	0,5
Lavado tampón 3C, resina Ni-NTA	99	0,2
Señal en la resina Ni-NTA		44,66

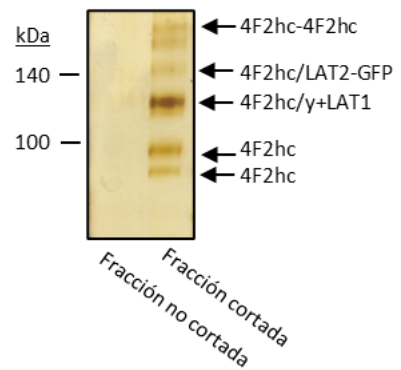
B

Figura 21: Detección de 4F2hc/y+LAT1 purificado en digitonina 2%. A) Detección de la proteína por fluorescencia en cada paso de la purificación. Calculando el porcentaje de fluorescencia que queda en cada paso con respecto a la fluorescencia inicial se conoce la eficiencia de la purificación. El cálculo de la señal que queda en la resina Ni-NTA proviene de restar la señal que existe en la elución de la resina Streptactin, lo que se pierde por no unirse a esta y por los lavados de la resina Ni-NTA. B) Gel de electroforesis al 8% teñido con plata, contiene las fracciones cortada y no cortada procedentes de la purificación.

En definitiva, aunque se pierda gran cantidad de proteína purificada debido a la agregación (algo optimizable), aquella que permanece es mucho más homogénea que la resultante de la purificación con DDM/CHS. Sin embargo, como los resultados no eran del todo satisfactorios, 4F2hc/y+LAT1 no fue seleccionado como candidato para la realización de estudios estructurales y funcionales, objetivo de esta tesis.

Sí es el caso de 4F2hc/LAT2 purificada en presencia de digitonina; no solo se obtuvo una proteína cuyo perfil de SEC resultaba casi inmejorable, sino que además no parecía que se desestabilizara ni formara agregados tras una incubación de 16 horas a 4 °C (durante el corte con la proteasa 3C). No obstante, la cantidad de proteína resultaba claramente optimizable.

4.1.3. Optimización de la expresión de 4F2hc/LAT2

La expresión en células humanas debe ser optimizada para cada tipo de construcción y sistema de expresión empleado. Además, como nuestra expresión es transitoria el primer parámetro que causa variabilidad es la propia transfección de los constructos. Además, al tener que hacer una co-transfección con dos ADNs (subunidad pesada y ligera) se puede dar el caso de que no se expresen al mismo nivel.

En el mismo sentido, se debe tener en cuenta que para realizar los pertinentes estudios estructurales y funcionales es preferible obtener la máxima cantidad de proteína expresada, para que así, los análisis o ensayos procedentes de una misma expresión sean más comparables.

Por ello, resulta un objetivo muy importante encontrar las condiciones de expresión para que sean reproducibles y lo más elevadas posibles, y todo ello, con el objetivo secundario de ahorro de recursos y de tiempo.

Al comienzo del trabajo con las células HEK293 y hasta que fue seleccionada la proteína candidata para realizar los estudios estructurales y funcionales, las expresiones fueron realizadas por el servicio de expresión proteica situado del IRB (*Protein expression core facility* dirigido por Nick Berrow).

El protocolo estándar de transfección consiste en añadir al cultivo celular y en ratio 1:4 de ADN y agente de transfección PEI-MAX, la proporción de 1 µg de ADN total por ml de cultivo celular a una concentración aproximada de 2×10^6 cel/ml; mezcla que es incubada 3 min en medio F17 templado antes de ser añadido a las células. El tiempo de expresión empleado ha sido de 48h (no se observaron diferencias de fluorescencia entre las expresiones de 48h y las de 72h, Figura suplementaria 2).

A través de la monitorización de la fluorescencia de la GFP unida a la subunidad ligera se llevó a cabo un seguimiento de la cantidad de proteína para comparar fácilmente la mejora de la expresión, para lo cual se midió esta fluorescencia cuantitativamente mediante el citómetro de flujo y el fluorímetro Tecan, también se usó el contador automático celular, *Cell counter*, para cuantificar el número de células totales y supervivientes.

4.1.3.1 Concentración celular óptima

La cantidad de ADN empleado se basa en los ml de cultivo que se quieren transfectar, en un inicio a concentración de 2×10^6 cel/ml; para optimizarlo se realizaron varias transfecciones con la misma cantidad de ADN y PEI-MAX pero modificando la concentración celular, desde los $1,5 \times 10^6$ cel/ml hasta los 5×10^6 cel/ml. La mezcla de transfección de las variantes fue incubada 3 min, a excepción de una condición que se preparó en duplicado para que una de ellas se transfectara con una mezcla incubada durante 30 min.

Además, las células fueron recogidas a las 42 horas desde el momento de la transfección. Anteriormente se observó que recoger las células a las 42h en vez de las 48h horas mejoraba en un 20 - 30% la supervivencia celular.

El PEI-MAX es un agente de transfección que resulta tóxico para las células y causa un incremento de la mortalidad; sin embargo, en nuestro caso no hacemos cambio de medio ya que ello supondría un alto gasto en medio F17. La mortalidad obtenida realizando un cambio del medio tras el periodo de transfección fue del 80. En este sentido, hay que tener en cuenta que cierto porcentaje celular muere debido al sobrecrecimiento y al agotamiento de recursos presentes en el medio, y no al propio PEI-MAX, por lo que decidimos que el gasto que suponía cambiar el medio no justificaba el incremento en supervivencia celular.

Por ello, el porcentaje de supervivencia fue otro parámetro que ha sido optimizado junto a los niveles de transfección y expresión.

Comparando las diferentes expresiones se observó que entre una cantidad de células de 1,5 a 2,1 millones por ml tenía lugar el máximo porcentaje de transfección en comparación con las condiciones con mayor concentración celular (Tabla 7, A y B). Se desconoce si en las condiciones de mayor cantidad celular la misma cantidad de mezcla de transfección (ADN y PEI-MAX) era suficiente o por el contrario limitante; tal vez para un mayor nivel de transfección se requería mayor cantidad de ADN y PEI-MAX.

Las expresiones de 1,5 y $2,1 \times 10^6$ cel/ml mostraban similar porcentaje de transfección, pero la condición A presentaba un 20% más de fluorescencia (señal) por partícula y de RFUs por

fluorescencia en placa; sugiriendo que realizar una transfección sobre una concentración celular de $1,5 \times 10^6$ cel/ml resultaba más eficaz.

El resto de las condiciones (Tabla 7, C, E y F) indicaban que las células estaban excesivamente concentradas para la cantidad de mezcla de transfección empleada, lo que se traducía en un porcentaje muy bajo de transfección, aunque, las células transfectadas presentaban una señal por partícula aceptable.

Por tanto, a partir de este experimento se determinó que la concentración celular del medio de cultivo que va a ser transfectado podía disminuirse de 2 a $1,5 \times 10^6$ cel/ml. Sin embargo, queda recorrido de mejora, ya que el porcentaje de transfección del 65 - 70% se sitúa por debajo de la expresión realizada en el servicio de Expresión de Proteínas que tomamos de referencia (80% de células transfectadas).

Condición	Porcentaje de supervivencia	Citómetro de flujo Galios		Fluorímetro Tecan
		Porcentaje de transfección	Señal por partícula única	Fluorescencia en placa (RFU)
Control positivo	58,76	78,48	70,2	550
Control negativo	63,89	3,28	1,79	80
A: $1,5 \times 10^6$ cel/ml	60,99	50,55	92,8	928
B: $2,1 \times 10^6$ cel/ml	57,88	43,42	80	764
B ₃₀ : $2,1 \times 10^6$ cel/ml	65,48	25,37	81,2	616
C: $2,5 \times 10^6$ cel/ml	67,33	5,17	55,9	175
D: 3×10^6 cel/ml	66,57	6,16	58,8	167
E: 5×10^6 cel/ml	44,05	7,76	73,4	174

Tabla 7: Medidas de fluorescencia de la optimización de la concentración celular. Las medidas proceden de 1 ml de muestra recogida del cultivo celular que ha sido centrifugada durante 15 min a temperatura ambiente y 500 xg para entonces ser resuspendida en 1 ml de PBS. Se requieren 10 µl de muestra para realizar la medida en el contador automático, 200 µl de muestra para el citómetro de flujo y 100 µl para el fluorímetro Tecan. La medida de la fluorescencia en placa se realiza sobre todas las células, mientras que la del citómetro de flujo solo sobre las supervivientes. El control positivo hace referencia a una expresión que es tomada como modelo, la realizada por el servicio de Expresión de Proteínas, y el control negativo a células transfectadas con un constructo que no posee GFP. En la muestra B₃₀ la incubación del agente transcriptor PEI-MAX con el ADN ha sido de 30 min en vez de 3 min como el resto.

4.1.3.2. Concentración ADN y PEI-MAX

Una vez establecida la concentración celular más adecuada para realizar la transfección, se determinó si la ratio 1:4 de ADN y PEI-MAX era la adecuada para, así, saber si era posible disminuir su cantidad a favor de una mayor supervivencia celular. Paralelamente, se aprovechó tal experimento para averiguar si una concentración mayor a $1,5 \times 10^6$ cel/ml podría dar mejores resultados si era aumentada proporcionalmente la mezcla de transfección.

Los siguientes cultivos celulares de las pruebas de expresión realizadas en este apartado poseen los siguientes parámetros en común; una concentración de $2,2 \times 10^6$ cel/ml o $1,5 \times 10^6$ cel/ml, viabilidad del 95% y tamaño medio de 20,15 y 22,46 µm de diámetro respectivamente a la concentración.

A excepción del caso C (Tabla 8), cuya supervivencia ha sido muy buena (casi de un 70%) el resto de las condiciones mostraban una supervivencia aceptable y similar a la prueba de expresión anterior. En el lado contrario se encontraba la condición F cuya supervivencia fue inferior, debido posiblemente a la presencia del doble de mezcla de transfección demostrando la toxicidad del PEI-MAX a concentraciones altas. Además, a pesar de la mayor cantidad de PEI-MAX, las células supervivientes de la condición F no presentaban un aumento de transfección (el porcentaje de transfección se determina desde el total de células supervivientes).

No obstante, en conjunto, los niveles de transfección fueron buenos, todos superiores al 50 % y varios casos alrededor del 80% (Tabla 8, B, D y E). Del mismo modo, la señal por partícula también era en general alta (150 RFU en las condiciones B, D y E), incluso superior a resultados de referencia (110 RFU). En un sentido similar, la fluorescencia medida en el fluorímetro indicó que las muestras C, D y E eran las que presentaban mayor señal de fluorescencia, lo que correspondía a mayores niveles de expresión proteica.

Condiciones de transfección					Contador automático	Citómetro de flujo Galios		Fluorímetro Tecan
(cel/ml)	Relación ADN	Volumen cultivo celular	Concentración celular	Ratio ADN : PEI-MAX	Porcentaje de supervivencia	Porcentaje de transfección	Señal por partícula única	Fluorescencia en placa (RFU)
Control negativo	Control negativo	30 ml	2,2.10 ⁶ cell/ml	//	91% (2,1x10 ⁶)	0,17%	2	285
A	ADN por célula	120 ml	2,2.10 ⁶ cell/ml	1:4	56% (3,2x10 ⁵)	58,7%	107	940
B	ADN por volumen	120 ml	1,6.10 ⁶ cell/ml	1:4	56% (5,0x10 ⁵)	84,9%	149	1260
C	ADN por vol. -20%	30 ml	1,6.10 ⁶ cell/ml	1:4	69% (6,1x10 ⁶)	67,2%	127	1752
D	ADN por volumen	30 ml	1,6.10 ⁶ cell/ml	1:4	52% (1,0x10 ⁷)	84,5%	161	1677
E	ADN por volumen	30 ml	1,6.10 ⁶ cell/ml	1:3	53% (1,2x10 ⁷)	79,5%	156	1710
F	ADN x2 por volumen	30 ml	1,6.10 ⁶ cell/ml	1:4	40% (1,8x10 ⁵)	50,1%	115	691

Tabla 8: Medidas de fluorescencia de la optimización de relación de ADN, volumen de cultivo celular, concentración celular y ratio ADN:PEI-MAX. Las medidas proceden de 1 ml de muestra recogida del cultivo celular que ha sido centrifugada durante 15 min a temperatura ambiente y 500 xg para entonces ser resuspendida en 1 ml de PBS.

Los resultados de las condiciones B y E son destacables, su única diferencia es el volumen presente en el erlenmeyer y mostraban el mismo nivel de transfección indicando que la eficiencia de la transfección no dependía del tamaño del recipiente usado.

Por otro lado, las condiciones A y B nos indican que, para estimar la cantidad de ADN a emplear, este debe ajustarse al volumen del cultivo celular siempre y cuando la concentración se encuentre alrededor de 1,5x10⁶ cel/ml. En el caso de ajustar la cantidad de ADN (y PEI-MAX según la ratio) a la cantidad de células, como en la condición A con 2,2x10⁶ cel/ml, resultaba en una menor tasa de transfección.

Este resultado sugiere que este exceso de concentración celular dificultaba la transfección. Sin embargo, esta baja transfección también podría deberse a que la cantidad de células supervivientes era hasta 10 veces inferior ($3,2 \times 10^5$ en comparación con $5,0 \times 10^6$) a pesar de que el porcentaje de supervivencia realmente fuera el mismo, lo que sugiere que en el primer caso se hayan replicado a mayor velocidad.

Por el lado contrario, en la condición C se redujo la cantidad de ADN y PEI-MAX en un 20%; con el objetivo de tener una mezcla de transfección proporcional a la cantidad de células, respecto a esta condición, las condiciones A y B se prepararon con una diferencia del 20% ADN y PEI-MAX. Esta condición presentaba un aumento de la supervivencia en un 20% y a su vez una disminución de la transfección en un 15%, tal y como era esperado.

En resumen, las conclusiones son:

- Las condiciones óptimas de transfección son: 1 μg de ADN por ml de cultivo con una concentración celular cercana a los $1,5 \times 10^6$ cel/ml.
- Hay más células totales supervivientes si el ratio DNA:PEI-MAX es de 1:3 en vez de 1:4, a igualdad de transfección.
- La eficiencia de las transfecciones no depende del tamaño de los erlenmeyers usados.

4.1.4. Optimización de la purificación de 4F2hc/LAT2

A medida que se iban optimizando las condiciones de transfección, se iban probando al mismo tiempo diferentes modificaciones en el protocolo de purificación con el mismo objetivo de obtener mayor cantidad de proteína final.

Entre las modificaciones que se analizaron se encuentran: 1) la composición del tampón de purificación, 2) la ratio entre los millones de células del *pellet* inicial por ml de detergente durante la solubilización, 3) la extracción de la fracción membranal previa a la purificación, 4) los intercambios de detergentes durante la purificación para aprovechar la mejor solubilización del DDM pero la mejor estabilidad aportada por la digitonina, 5) así como otra serie de modificaciones que tienen principalmente el fin de mejorar la eficiencia de unión de la resina Streptactin.

La resina Streptactin es altamente exigente y a la hora de diseñar un protocolo de purificación que emplee esta cromatografía de afinidad se deben de tener en cuenta una serie de parámetros que afectan a la unión de la proteína con la resina. Por todo ello, existen varias recomendaciones.

- Diferencias de afinidad debidas al detergente: Según las recomendaciones del fabricante de la resina Streptactin, las concentraciones testadas de los detergentes que estamos empleando durante esta tesis son de 0,5% para digitonina y de 0,1% para DDM. Como la incubación de la proteína con esta resina se lleva a cabo tras la ultracentrifugación de la solubilización, la concentración de estos detergentes se encuentra a 2 y 1% respectivamente, lo que quiere decir que se encuentran 4 y 10 veces más concentrados que la concentración óptima de incubación con la resina.
- El imidazol a una concentración mayor de 250 mM: En el protocolo estándar usado, la resina Streptactin no se encuentran nunca en presencia de imidazol, ya que es la cromatografía de

afinidad que se realiza primero. Pero es un punto que se debe tener en cuenta en el caso de que pensemos en cambiar el orden de incubación de estas cromatografías, en cuyo caso, la muestra debe ser desalada si la forma de elución de la resina de Ni-NTA no es por corte de la diana 3C.

- El glicerol a una concentración mayor al 25%: A partir de esta concentración la afinidad de esta resina desciende drásticamente, en nuestro caso en algunas solubilizaciones se ha empleado glicerol al 10% (las referentes a los análisis FSEC).
- El pH óptimo de actividad es de 7,5 - 8: En las purificaciones ya realizadas se midió el pH del sobrenadante de la ultracentrífuga, encontrándose en todos los casos a pH 7. Por tanto, el pH se podría subir levemente para intentar aumentar la capacidad de unión de la resina Streptactin.
- La concentración óptima del tampón Tris-base es de 100 mM: Este hecho, junto al anterior, nos insta a aumentar la concentración empleada de Tris-base (actualmente es del 20 mM), no solo por minimizar la distancia hasta la concentración óptima de afinidad, sino también para que tenga mayor capacidad tamponadora y el pH suba hasta su rango óptimo.
- La secuencia colindante a la etiqueta de Strep debe evitar la presencia de residuos aromáticos (Phe, Tyr y Met) y cargados (His, Lys, Arg, Asp y Glu): En el mismo sentido de poner distancia entre estos aminoácidos y la etiqueta de Strep se recomienda añadir un espaciador con aminoácidos neutros (Ser, Ala y Gly). El diseño de 4F2hc y las etiquetas de Strep es adecuado, posee un espaciador formado por aminoácidos neutros. No obstante, en la región terminal de 4F2hc donde se encuentran las etiquetas, existen algunos residuos que podrían interferir en la afinidad de la resina Streptactin. Sin embargo, desconocemos si la distancia existente y la añadida es suficiente o están provocando algún tipo de interferencia con su capacidad de unión.

Todo ello se ha tenido en cuenta en las siguientes modificaciones probadas.

4.1.4.1. Purificación de 4F2hc/LAT2 con digitonina desde extracto membranal

Nuestro primer obstáculo para tener una mayor cantidad de proteína purificada consistía en mejorar el porcentaje de proteína solubilizada, ya que en el caso de emplear digitonina, que confiere una buena estabilidad a 4F2hc/LAT2, la eficiencia de la solubilización es solo del 40%. Una de las estrategias que resultaba más obvia consistía en extraer la fracción membranal antes de empezar la purificación.

4F2hc/LAT2 es una proteína de membrana de modo que si realizamos la separación de esta del resto de la célula facilitaríamos la solubilización por parte de la digitonina al estar las propias membranas ya fragmentadas y una muestra sin fracción soluble.

Junto con este experimento se diseñó el “rescate de la proteína no unida”, aquella que no se une a la resina Streptactin, con la intención de averiguar cuánta proteína de interés contenía la fracción no unida. El rescate consistía en incubar esta muestra con la resina Ni-NTA, para después eluir mediante

el corte de la proteasa 3C. La única proteína que posiblemente se purificara y no fuera de interés era la subunidad LAT2, pero que podría ser separada por SEC.

El protocolo de extracción membranal consiste en la previa lisis de las células mediante rotura mecánica, seguida de una centrifugación a baja velocidad para separar las células rotas y una ultracentrifugación para separar la fracción soluble; el precipitado contiene las membranas que serán homogeneizadas.

De una forma más esquemática, el protocolo seguido consistió en:

- El precipitado procedente del cultivo celular de 200 ml es resuspendido con 25 ml de tampón de lisis formado por Tris-base 50 mM pH 8, NaCl 150 mM e inhibidores de proteasas.
- Rotura de las células por sonicación; ciclos de 30s on/off durante 4 min on, a 20% de amplitud.
- Centrifugación a 20.000 xg, 10 min, a 4 °C.
- Ultracentrifugación a 200.000 xg, 1h, a 4 °C del sobrenadante de la centrifugación anterior.
- Homogenización del precipitado de membranas con 20 ml de Tris-base 20 mM y NaCl 150 mM (empleando el homogeneizador RZR 2051 control - Heidolph).

La purificación fue realizada en líneas generales como se encuentra descrito el apartado de Resultados 4.1.2.3, con la excepción de comenzar desde extracto membranal y de continuar de manera paralela la purificación de la muestra que no se ha unido a la resina Streptactin.

Por tanto, a partir de 200 ml de cultivo celular de 4F2hc/LAT2, cuyo extracto membranal fue purificado en digitonina 2% y filtrado para eliminar agregados se obtuvo:

- 4F2hc/LAT2: 0,023 mg totales (0,23 mg/ml en 0,100 ml). La concentración bajó un 15% tras el filtrado.
- 4F2hc/LAT2-GFP y GFP: 0,024 mg totales (0,26 mg/ml en 0,090 ml). La concentración bajó un 60% tras el filtrado.
- 4F2hc/LAT2 (rescatada): 0,055 mg totales (0,46 mg/ml en 0,120 ml).
- 4F2hc/LAT2-GFP y GFP (rescatada): 0,033 mg totales (0,33 mg/ml en 0,100 ml).

En comparación con lo que conoceremos a partir de ahora como el protocolo estándar para 4F2hc/LAT2 (apartado 4.1.2.3), la purificación a partir de la fracción de membranas resultaba en una menor cantidad de proteína purificada a pesar de haber partido del mismo volumen de cultivo celular y del mismo cultivo celular que la vez anterior. Este descenso de efectividad se explica mayoritariamente por la pérdida de proteína en el fraccionamiento membranal (Figura 23 - A), pero también de la existencia de heterodímero en la muestra eluída por imidazol (eficiencia de corte menor) y la pequeña pérdida durante el filtrado para eliminar agregados.

A pesar de los malos resultados, sobre todo por la peor estabilidad mostrada por esta proteína (Figura 22 - A), este experimento nos ha mostrado que la muestra que no se une a la resina Streptactin, apenas contenía proteína de interés. Tras ser purificada por resina Ni-NTA y cortada en la diana 3C, en el perfil de SEC apenas había señal, lo que quiere decir que apenas se pierde proteína de interés por no unirse a la resina Streptactin (Figura 22 - B). Efectivamente, tal como muestra también

el gel teñido en plata (Figura 23 - D), las muestras procedentes de la no unión a la resina Streptactin no presentaban ninguna banda (el WB también lo corrobora).

En conjunto, estos resultados nos indican que no es necesario realizar ningún rescate ya que la fluorescencia que no se une a la resina Streptactin no parece que contenga proteína de interés.

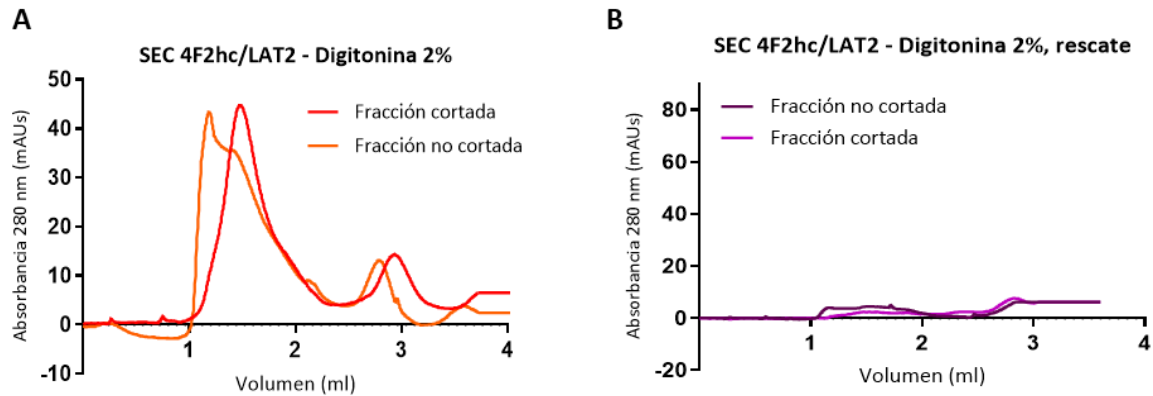


Figura 22: Perfiles de SEC correspondientes a las muestras purificadas de 4F2hc/LAT2 en digitonina 2% con previa extracción membranal. A) SEC de la muestra purificada, en rojo la fracción cortada y en naranja la fracción no cortada. B) SEC de las fracciones cortada (lila) y no cortada (morada) procedentes del rescate de la muestra no unida a la resina Streptactin.

La eficiencia de la solubilización con digitonina al 2% continúa siendo la misma que en las solubilizaciones anteriores, del 40% aproximadamente (Figura 23 - B). De modo que la previa extracción de la membrana no solo no ha mejorado la actividad solubilizadora de la digitonina, como ya se ha mencionado, sino que ha empeorado la estabilidad de la proteína resultante.

Por otro lado, la muestra procedente de la elución no cortada mostraba la banda a la misma altura que la banda de 4F2hc/LAT2 cortada (Figura 23 - D), sugiriendo que la proteína cortada no se había eluido correctamente y no a que el corte hubiera tenido una eficiencia menor que en otras ocasiones. No obstante, el perfil de SEC de esta muestra no era tan homogéneo en comparación con las purificaciones anteriores (Figura 18 - A).

Por último, hay que destacar que en la comparación con la purificación estándar había, proporcionalmente, más cantidad de subunidades sueltas (Figura 23 - D).

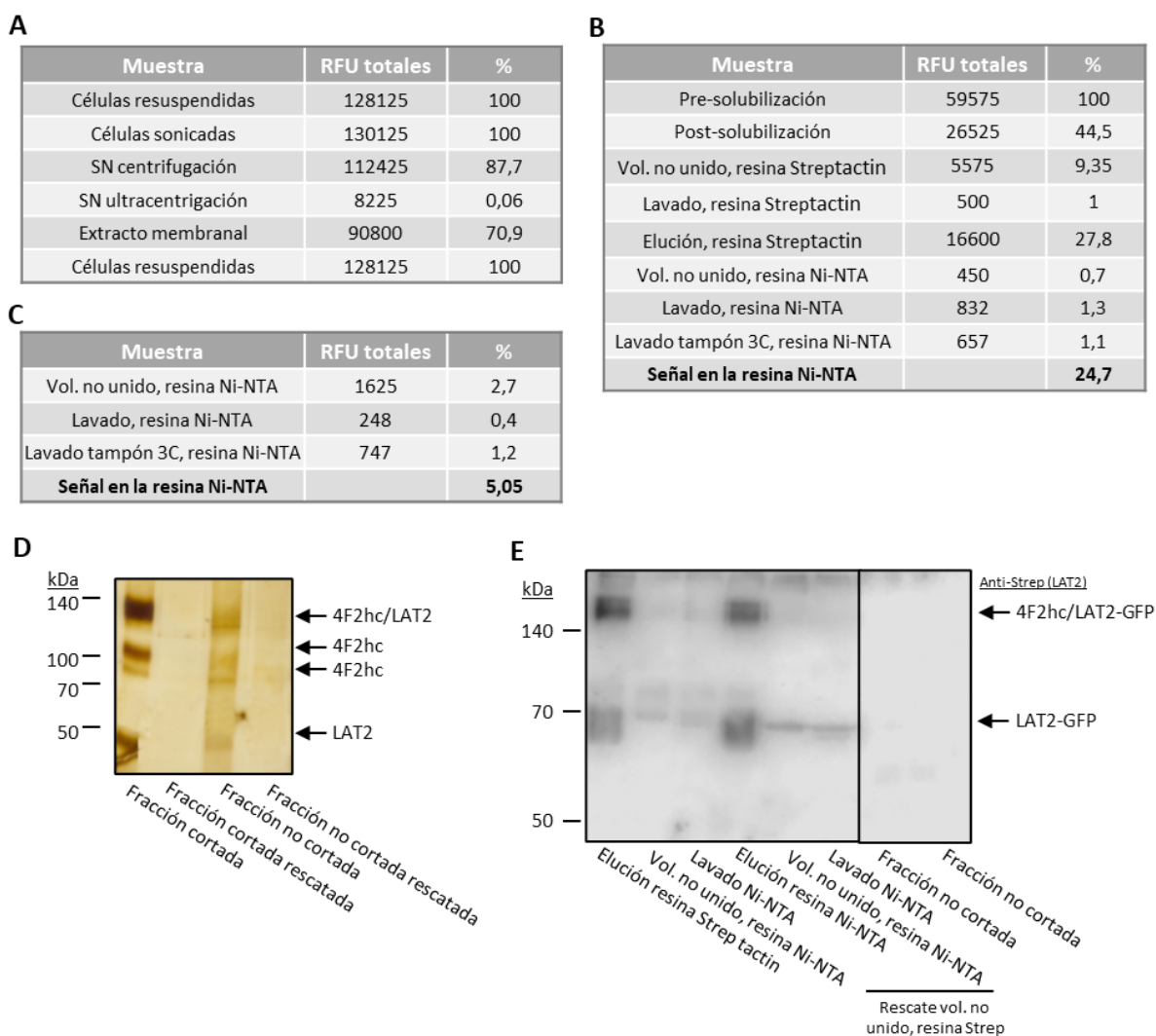


Figura 23: Detección de 4F2hc/LAT2 purificado en digitonina 2% con previa extracción membranal. A) Detección de la proteína por fluorescencia durante la extracción membranal, se calcula la eficiencia de la extracción, durante este proceso se pierde hasta un 30% de fluorescencia. B) Detección de la proteína por fluorescencia en cada paso de la purificación. Calculando el porcentaje de fluorescencia que queda en cada paso con respecto a la fluorescencia inicial se conoce la eficiencia de la purificación, se ha normalizado la primera medida al 100% para no tener en cuenta la pérdida de fluorescencia en la extracción de membrana. El cálculo de la señal que queda en la resina Ni-NTA proviene de restar la señal que existe en la elución de la resina Streptactin, lo que se pierde por no unirse a esta y por los lavados de la resina Ni-NTA. C) Detalle de la fluorescencia medida de la purificación realizada a partir del rescate del volumen no unido a la resina Streptactin. D) Gel de electroforesis al 8% teñido con plata, contiene los picos de las muestras que han sido analizadas por SEC, cortada y no cortada, directa y rescatada desde el volumen no unido a la resina Streptactin. E) WB con gel del 8% de acrilamida, detección del heterodímero a lo largo de la purificación con anticuerpo *anti-His-tag*.

4.1.4.2. Optimización de la solubilización por digitonina

Varios experimentos realizados durante esta tesis tenían como objetivo aprovechar la capacidad solubilizadora de la combinación DDM/CHS y la capacidad estabilizadora de la digitonina, en donde la solubilización fue realizada en DDM/CHS, pero el tampón de purificación contenía digitonina. De este

modo, las micelas de detergente formadas en un primer lugar por DDM/CHS se intercambiarían por digitonina a medida que transcurría la purificación.

Sin embargo, los resultados indicaban que estos cambios no eran favorables para la proteína; la cuantificación de la medida y el perfil de la SEC mostraban una proteína con una estabilidad tan baja que prácticamente todo se perdía durante el filtrado de la muestra, no apareciendo ningún pico en la SEC (razón por la que los resultados no se muestran).

De modo que ante una situación en la que la proteína debe ser purificada en digitonina, la meta a alcanzar consistía en mejorar la capacidad solubilizadora de esta. Con tal objetivo se realizaron pruebas para determinar los tiempos, temperaturas, ratio entre cantidad de células y cantidad de detergente y concentraciones de Tris-base y de NaCl. Para analizar los efectos de los cambios que pueden producir estas variantes se realizaron ensayos UDS, pruebas mucho más sencillas y rápidas para calcular la eficiencia en la solubilización de cada cambio (todas las condiciones probadas y resultados obtenidos se encuentran en la tabla suplementaria 2).

Pruebas según tiempo y temperatura

A pesar de haber realizado diferentes tiempos de solubilización, si la solubilización se realizaba a 4 °C el porcentaje de fluorescencia era prácticamente el mismo a todos los tiempos ensayados (Tabla Suplementaria 2 - A).

La gran diferencia se encuentra cuando esta incubación se realizaba a temperatura ambiente (RT, *room temperature*). No obstante, mantener la proteína a temperatura ambiente podría afectar negativamente a su estabilidad, dificultando la obtención de una proteína de calidad.

Pruebas según concentración celular y concentración Tris/NaCl

Es muy importante encontrar la ratio óptima entre los millones de células y gramos de detergente para mejorar al mismo tiempo la eficiencia de la solubilización, controlar el grado de deslipidación de la muestra y ahorrar detergente. Adicionalmente, se han probado diferentes concentraciones de Tris-base y de NaCl, los cuales se sabe que pueden afectar a la eficiencia solubilización, así como alterar la estabilidad de la proteína resultante.

En el ensayo UDS n1 (Tabla suplementaria 2 - B) se probaron diferentes condiciones para encontrar la mejor concentración celular durante la solubilización y las concentraciones de Tris/NaCl, aunque sus resultados no mostraron una linealidad clara. De forma general, parece que cuanto mayor era la cantidad de células por ml de tampón de solubilización, la eficiencia de esta mejoraba; los porcentajes de solubilización se encontraban entre el 50 y el 60%. Mientras, respecto a las diferentes concentraciones de Tris-base y NaCl, las combinaciones que presentaban mayor eficiencia contenían entre NaCl 50 - 100 mM y entre Tris-base 40 - 60 mM.

A pesar de que los resultados no eran del todo determinantes sobre si era necesaria más o menos concentración celular para que la solubilización con digitonina fuera más efectiva; sugieren que se podría alcanzar una eficiencia similar empleando hasta 3 veces menos cantidad de digitonina respecto a la misma cantidad de células. La digitonina es un detergente muy costoso y el punto del ahorro es importante.

El ensayo UDS n2 (Tabla suplementaria 2 - C) procedía del mismo del cultivo celular empleado en la purificación con DDM - digitonina y del ensayo UDS anterior, por lo que los resultados no dependieron de la eficiencia de la expresión. De nuevo, muchos de los resultados presentaban una eficiencia de solubilización del 60%. Se obtuvieron porcentajes de solubilización mejores y en más combinaciones de Tris/NaCl a medida que la ratio de células/detergente aumentaba, hasta alcanzar los 50×10^6 cel/ml de tampón de solubilización en donde la eficiencia comenzaba a disminuir.

Como los dos ensayos anteriores procedían de una misma expresión existía la duda de que estas altas solubilizaciones se debían a la propia expresión, por lo que el siguiente ensayo de UDS (n3) (Tabla suplementaria 2 - D) debía resolver la duda de si estos buenos resultados eran reproducibles entre diferentes expresiones. Para ello, se repitieron las combinaciones que mejores resultados habían mostrado.

Desgraciadamente, si los ensayos anteriores parecían indicar que las mejores solubilizaciones se producían entre los 35 y 45×10^6 cel/ml; los resultados del ensayo n3 indicaban lo contrario, que no hay reproducibilidad entre las diferentes expresiones. No obstante, aunque la tendencia en cuanto a la concentración celular fue contraria, siguieron existiendo combinaciones con buenas eficiencias de solubilización.

La falta de reproducibilidad entre expresiones nos indicó que se requerían más pruebas para corroborar si este aumento de la solubilización era realmente un aumento de proteína disponible para ser purificada. Hubo que asegurar que este aumento de la fluorescencia en la solubilización no se perdía por no poder unirse a la resina Streptactin.

Para completar estos resultados, en el siguiente ensayo de UDS se realizó un paso de la purificación, la incubación con resina Streptactin para, así, analizar el porcentaje de fluorescencia que no se unía a esta. Adicionalmente una de las condiciones siguió el protocolo de purificación completo para analizar también la estabilidad de la proteína.

Los resultados mostraron que la fluorescencia que había aumentado en la solubilización proporcionalmente también había aumentado en la muestra que no se unía a la resina Streptactin (Tabla suplementaria 2 - E). Podemos describir el ejemplo de dos purificaciones procedentes de diferentes expresiones y totalmente diferentes. Una purificación procedía de 600 ml de cultivo, cuya solubilización se realizó con una concentración celular de $21,3 \times 10^6$ cel/ml y con Tris-base 60 mM y NaCl 100 mM, mientras que la otra purificación procedía de 280 ml de cultivo, cuya solubilización se realizó con una concentración de $34,1 \times 10^6$ cel/ml y con Tris-base 100 mM y NaCl 250 mM. En ambas aumentó la capacidad de solubilización, pero ello no se vio reflejado en una mayor cantidad de proteína purificada final (al menos sí presentaban una estabilidad similar a la purificación con digitonina estándar).

En ambos casos el porcentaje de solubilización fue mayor del 40%, sin embargo, también aumentaba proporcionalmente la fluorescencia medida que no se unía a la resina Streptactin. Por tanto, la gran mayoría de este aumento en la fluorescencia que se ha obtenido en algunas solubilizaciones no se traduce en una mayor cantidad de proteína unida a la resina Streptactin.

Con el mismo objetivo de aumentar la solubilización de la proteína, pero sin que aumentara la cantidad de fluorescencia perdida al no unirse a la resina Streptactin, se realizaron varias

purificaciones en la que el orden de las resinas de purificación fue inverso. De este modo la proteína fue solubilizada en diferentes concentraciones celulares y aunque el porcentaje de fluorescencia tras la ultracentrifugación (ensayo UDS) fue superior al 40%, el porcentaje de fluorescencia perdido al no unirse a la resina, en este caso la resina de Ni-NTA, también aumentaba del mismo modo que las pruebas realizadas anteriormente incubando la muestra primero con la resina Streptactin (Tabla 9).

A

Muestra	RFU totales	%
Pre-solubilización	28290	100
Post-solubilización	8745	30,9
Vol. no unido, resina Ni-NTA	2135	7,5
Lavado, resina Ni-NTA	1075	3,7
Lavado tampón 3C, resina Ni-NTA	40	0,14
Señal en la resina Ni-NTA		19,56

B

Muestra	RFU totales	%
Pre-solubilización	20152	100
Post-solubilización	15290	75,87
Vol. no unido, resina Ni-NTA	8426	41,81
Lavado, resina Ni-NTA	2050	1,02
Lavado tampón 3C, resina Ni-NTA	3678	1,83
Señal en la resina Ni-NTA		33,04

Tabla 9: Detección de la proteína por fluorescencia en cada paso de la purificación con orden inverso en el empleo de las resinas cromatográficas. Calculando el porcentaje de fluorescencia que queda en cada paso con respecto a la fluorescencia inicial se conoce la eficiencia de la purificación. El cálculo de la señal que queda en la resina Ni-NTA proviene de restar la señal que existe en la elución de la resina Streptactin, lo que se pierde por no unirse a esta y por los lavados de la resina Ni-NTA. A) Purificación realizada con digitonina. B) Purificación realizada con DDM/CHS. Ambas purificaciones mostraron porcentajes de solubilización y de muestra no unida a la resina (Ni-NTA en este caso) muy similares a si la primera resina empleada es Streptactin.

Esto quería decir que el protocolo de purificación original era adecuado, no necesitaba cambios y, además, al tener la misma eficiencia de purificación con diferentes concentraciones celulares durante la solubilización nos permitía ahorrar digitonina.

Fluorescencia no debida al heterodímero:

Los resultados incongruentes de los ensayos de solubilización o de las purificaciones nos hacía sospechar que había algo que estaba dando señal de fluorescencia que no parecía proceder de una proteína formada por LAT2 y GFP-*His-tag*. La falta de mejoras reales de la solubilización o que la señal de fluorescencia de la muestra que no se une a resina fuera la misma con cualquiera de las dos resinas (sobre todo la que era afín a la parte que poseía fluorescencia) (Tabla 9) fue lo que nos dio pie a sospechar que aquello que estaba dando fluorescencia tal vez no poseía ninguna de las etiquetas unidas a las subunidades.

La secuencia previa a la región del ADN del constructo que transcribe para GFP-*His-tag* contiene ciertas metioninas que podrían actuar como codones de inicio, pudiéndose expresar no solo Strep-Strep-4F2hc y LAT2-GFP-His sino también hasta dos moléculas de GFP con diferente longitud. Así, la expresión de la molécula de GFP suelta ocasiona que cierto porcentaje de la fluorescencia medida equivaliera a solo GFP y que por tanto se estuviera sobrecuantificando la señal de fluorescencia creyendo falsamente que toda ella perteneciera al heterodímero (o en su defecto a LAT2).

La cantidad de GFP expresada debería resultar más o menos o constante entre las diferentes expresiones, pero la dispersión observada en la eficiencia de la solubilización entre expresiones (Tabla suplementaria 2) parecía indicar lo contrario.

Por tanto, es posible que todos los aumentos observados a partir del 40% en la eficiencia de solubilización a 4 °C en presencia de digitonina se debieran a una mayor expresión de GFP sola que permanece soluble antes y después de la ultracentrifugación. Esto quiere decir que tal vez la digitonina solo sea capaz de solubilizar un 40 % del heterodímero y que un porcentaje mayor provoque por consiguiente una pérdida de fluorescencia mayor, proporcional, al no unirse a la resina Streptactin ya que no posee la etiqueta específica (el unido a 4F2hc).

Sin embargo, esto no explicaba las diferencias en solubilización observadas entre DDM y digitonina. En este sentido podemos explicar que posiblemente la combinación de DDM/CHS solubilizara mayor cantidad de esta molécula de GFP que la digitonina.

Para validar nuestra sospecha de que era la GFP suelta la que nos estaba provocando esta confusión a la hora de analizar los resultados se realizó un WB (Figura 24). Hasta ahora, en los WB anteriores no había sido localizado esta GFP ya que se estaban empleando geles de porcentaje bajo para separar las proteínas de gran tamaño y la GFP, al pesar solo unos 20 kDa, se estaba perdiendo en el frente del gel. Por tanto, se realizó un WB a alto porcentaje de acrilamida para poder ver esta GFP suelta en varias de las purificaciones realizadas.

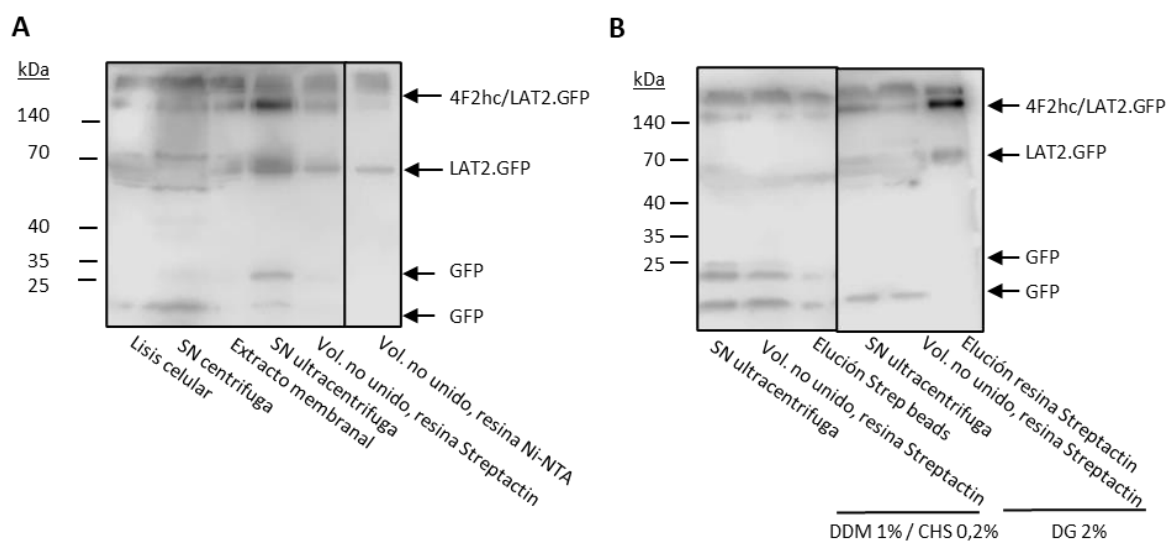


Figura 24: Detección de GFP en purificaciones de 4F2hc/LAT2. WB de los geles del 12% con inmunodetección con anticuerpos *anti-His-tag*. A) Purificación de 4F2hc/LAT2 en digitonina 2% con previa extracción membranal. B) Purificación de 4F2hc/LAT2 en DDM 1% / CHS 0,2% y en digitonina 2%

Los WB indicaban en primer lugar que, sí, existe cierta cantidad de hasta dos moléculas diferentes de GFP suelta en las muestras (Figura 24). Además, en los carriles pertenecientes a la purificación desde extracto membranal se observó que las señales correspondientes a esta GFP son menores o están ausentes, por lo que este paso, que separa la parte soluble de la parte membranal de la célula, deja la GFP en la primera fracción (Figura 24 - A).

4.1.5. Análisis funcional de 4F2hc/LAT2

Para terminar de preparar una proteína para un estudio estructural hay que determinar que efectivamente continúa siendo funcional. Un alto nivel de estabilidad es esencial para que la muestra pueda ser observada al microscopio de manera homogénea y ello permita alcanzar una alta

resolución cuando sean procesadas las imágenes, pero hay que cerciorarse que la proteína continúa manteniendo su actividad nativa.

Para tal objetivo, se expresó y purificó la proteína utilizando el mismo protocolo previamente establecido y tras lo cual fue reconstituida en liposomas. En este sistema se integrarán las proteínas a estudio y se determinará la diferencia de actividad del transporte del aminoácido marcado radiactivamente entre los proteoliposomas que contengan aminoácidos en su interior, los que no y liposomas tanto sin proteína como sin aminoácidos. Este es el caso de 4F2hc/LAT2 al tratarse de un intercambiador obligatorio.

No obstante, es importante mencionar que la proteína utilizada para los estudios funcionales mantiene la GFP-*His-tag* a diferencia de la proteína utilizada para estudios estructurales mediante microscopía electrónica. Esto es debido a que el protocolo de reconstitución incluye un paso de diálisis de la proteína durante 16h, lo cual podría afectar a su estabilidad (en el caso de haber realizado el corte con 3C que supone otras 16h de incubación con la proteasa) por tanto, la razón de no realizar el corte es que la proteína solo sea sometida a una incubación de 16h y no a dos.

La reconstitución en liposomas es una técnica poco reproducible y cuya preparación requiere de una gran cantidad de proteína y de tiempo. Por esta razón, de forma previa a realizar los ensayos funcionales para determinar si la proteína continuaba siendo activa, se realizaron por un lado ensayos de transporte *in vivo* en células HeLa con el objetivo de seleccionar el aminoácido a transportar y, por otro lado, se optimizó el protocolo de reconstitución a pequeña escala.

4.1.5.1. Transporte en células HeLa

Este tipo de ensayo será utilizado más adelante en esta tesis para el análisis de los mutantes de LAT2, pero al tratarse de una técnica sencilla y rápida para el análisis de la actividad del transportador, se ha elegido para, en primer lugar, determinar que efectivamente en la propia superficie celular el heterodímero 4F2hc/LAT2-GFP era funcional y, en segundo lugar, para seleccionar el aminoácido que es transportado de manera más efectiva.

Entre los diferentes aminoácidos probados se observó que L-valina era el que presentaba mayor actividad, mayor señal respecto al ruido de fondo del ensayo (resultados no mostrados).

4.1.5.2. Determinación de la actividad de 4F2hc/LAT2 reconstituido en liposomas

Para calcular la actividad de transporte del heterodímero en liposomas era necesario cuantificar la cantidad de proteína que se había reconstituido. Sin embargo, debido al protocolo seguido (sección 3.4.1 de Materiales y Métodos) no es posible averiguar si la proteína localizada en la muestra de proteoliposomas corresponde a proteína reconstituida correctamente o proteína agregada.

Por ello y tras determinar que la digitonina que forma las micelas en la que se encuentra la proteína era eliminada correctamente mediante el protocolo de diálisis (mediante la no visualización de proteínas disueltas en el ultracentrifugación que separa los proteoliposomas del medio), había que saber cuánta proteína estaba reconstituida y no agregada (Figura 25 - A y B).

Con tal objetivo se preparó un gradiente de sacarosa para separar la proteína reconstituida en liposomas de la proteína agregada. La posición de las diferentes moléculas a lo largo del gradiente depende de su densidad y no de su tamaño, debido a lo cual un liposoma se sitúa en fracciones superiores a la zona donde se localizarían las proteínas agregadas (Figura 25 - A). Los lípidos son visibles por lo que solo hay que fraccionar el gradiente y detectar en un gel teñido por tinción plata dónde se localizaba el heterodímero.

El gradiente de sacarosa (65, 45, 35, 28, 23, 18, 13, 8 y 3%) fue preparado en tubos de gradiente. Tras la diálisis, los proteoliposomas fueron diluidos en un 3% de sacarosa y añadidos cuidadosamente sobre el gradiente preformado. La ultracentrifugación necesaria para que se forme el gradiente debe alcanzar las 145.000 xg con aceleración y desaceleración mínimas durante 19h a 4 °C.

El resultado obtenido fue óptimo, ya que únicamente había presencia de heterodímero en las fracciones correspondientes a los lípidos (Figura 25 - B), lo cual quiere decir que toda la proteína había sido reconstituida. No había proteína ni en la fracción superior que correspondería a proteína disuelta en detergente, ni proteína en las zonas inferiores que sería aquella que se habría agregado.

4.1.5.3. Ensayo de actividad de 4F2hc/LAT2 en liposomas

En cuatro ensayos independientes procedentes de diferentes preparaciones de la proteína 4F2hc/LAT2 (procedentes de diferentes expresiones y con proteína fresca o congelada) se observó una actividad superior en aquellos liposomas reconstituidos con la proteína y aminoácidos en su interior respecto a los liposomas reconstituidos, pero sin aminoácidos en su interior y los liposomas no reconstituidos con el transportador.

En la figura 25 (con un resultado representativo de 4 experimentos independientes), la línea morada del panel C muestra como los proteoliposomas reconstituidos con 4F2hc/LAT2 con 5 mM de L-valina fría en su interior presentaban un transporte de la L-valina radiactiva con una actividad máxima (*overshoot*) a las 3h. A partir de este punto, la actividad comenzaba a descender hasta llegar al equilibrio de los controles de proteoliposomas sin aminoácido en su interior (línea azul-verdosa) y liposomas no reconstituidos (línea roja). Por tanto, la proteína 4F2hc/LAT2 purificada en digitonina era funcional.

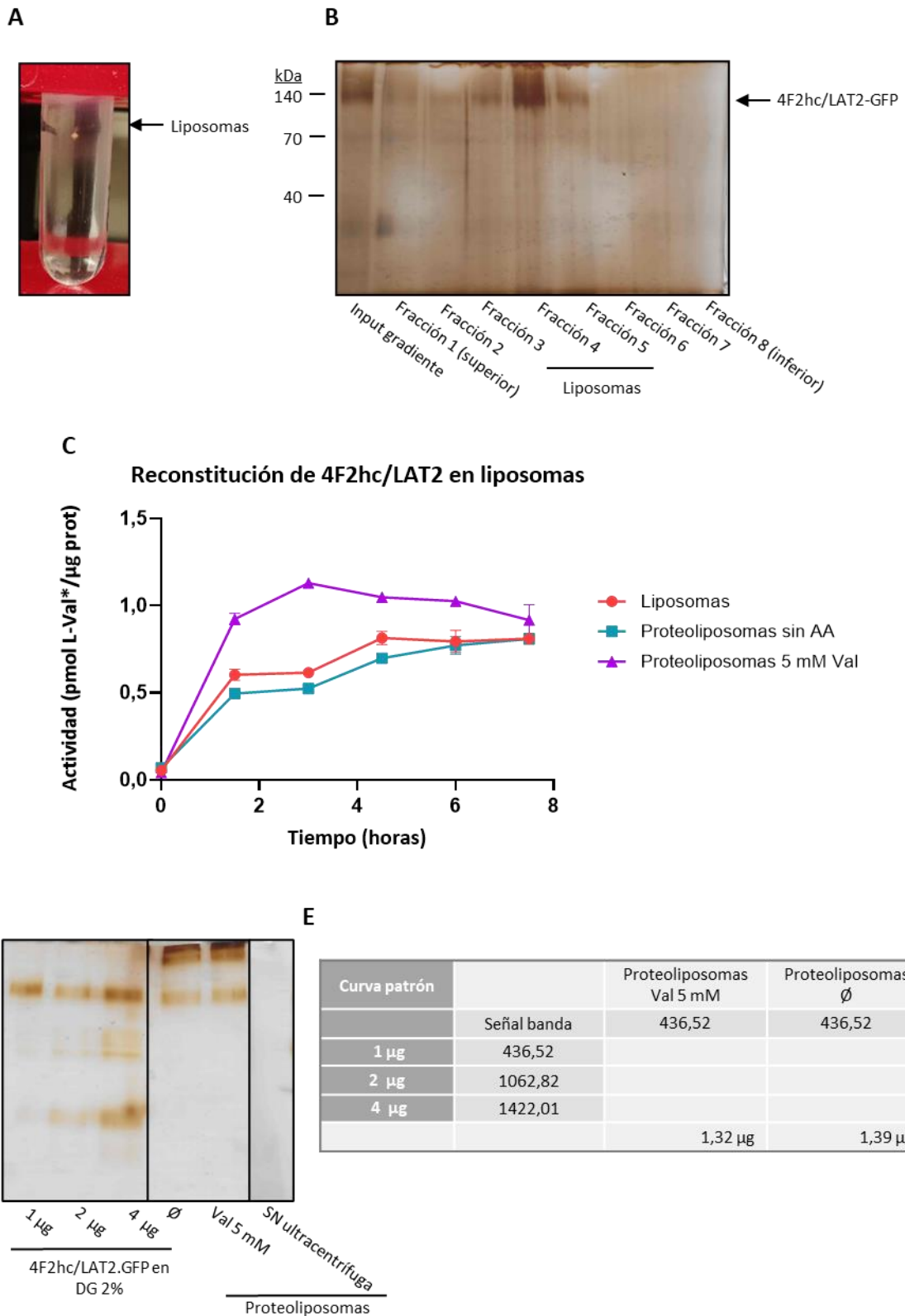


Figura 25: Ensayo de actividad de 4F2hc/LAT2 reconstituido en liposomas. A) Gradiente de sacarosa. B) Determinación de la cantidad de proteína reconstituida por gradiente de sacarosa. C) Ensayo funcional de 4F2hc/LAT2 reconstituido en liposomas formado por un extracto de lípidos cerebrales. D) Gel del 8% de acrilamida teñido con plata, empleado para cuantificar la cantidad de 4F2hc/LAT2 que está reconstituido en liposomas por punto de transporte y así convertir la señal radiactiva medida en actividad (pmol L-Val/µg proteína). E) Medición de la intensidad de las bandas de la curva patrón del gel para cuantificar las bandas de los proteoliposomas y obtener los µg de 4F2hc/LAT2 reconstituidos en los liposomas

4.2. DETERMINANTES ESTRUCTURALES DE 4F2hc/LAT2

Caracterizar estructuralmente la proteína 4F2hc/LAT2 humana resultaba ser un reto en la microscopía electrónica debido a dos razones, su pequeño tamaño (alrededor de 125 kDa) y ser una proteína transmembrana. Al ser una proteína de membrana toda su manipulación fuera de la célula se debía realizar rodeada por una micela de detergente que proteja los dominios transmembrana; no obstante, tener la proteína embebida en una micela de detergente dificultaba el procesamiento de las imágenes.

Sin embargo, al resolverse durante el transcurso de esta tesis tres HATs (Lee *et al.*, 2019; Yan *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2020a; Yan *et al.*, 2020b) en micelas de detergente a alta resolución nos demostraba la posibilidad de poder resolver la proteína que estábamos estudiando a buena resolución si su calidad resultaba adecuada.

Se tuvieron que tomar imágenes en diferentes microscopios y con diferentes técnicas para obtener un set de datos que contuviera suficiente información y calidad para alcanzar una alta resolución. Las partículas de 4F2hc/LAT2 se encontraban distribuidas en diferentes orientaciones (Figura 11, página 99) dando lugar a diferentes vistas tras la clasificación de las partículas.

Los promedios 2D resultantes mostraron dos densidades, una pequeña en forma de cabeza y correspondiente a 4F2hc y una más grande en forma de óvalo que correspondía a la micela de detergente y en cuyo interior se podían visualizar con definición los dominios transmembrana de LAT2 (Figura 11 - B, página 99).

Tras varias rondas de clasificación 2D por las cuales fueron seleccionados los promedios 2D con mejor calidad y que se emplearon para realizar varias rondas de clasificación 3D, se extrajeron finalmente un total de 176.132 partículas que participaron en la reconstrucción 3D final de la estructura (Figura 12, página 100). La resolución media obtenida del mapa de crio-ME de la proteína 4F2hc/LAT2, dependiendo del programa empleado en esta última fase de procesado, es de 3,9 Å con Relion (Zivanov *et al.*, 2018) y de 3,7 Å con ResMap (Kucukelbir *et al.*, 2014) (Figura 26 - A y B).

Las estimaciones promedio del mapa se muestran en la figura 26 - B y C; las estimaciones incorporan el efecto de la micela y la disparidad de resolución entre el ectodominio de 4F2hc y la región transmembranal, tanto de 4F2hc como de LAT2. Las resoluciones locales revelaban que la subunidad LAT2 poseía una resolución superior al resto de la proteína, siendo visible el centro (*core*) transmembranal a una resolución entre 2,5 y 3,0 Å (Figura 26 - C).

La disparidad de resolución entre estas dos subunidades del heterodímero sugería que existe cierta flexibilidad de posición del ectodominio de la subunidad pesada respecto a la subunidad ligera. La estructura resuelta de 4F2hc/LAT1 humano (Lee *et al.*, 2019) presentaba la subunidad pesada a una mayor resolución, al también mostrar una disparidad de resolución entre ambas subunidades que nos hace sugerir la existencia de flexibilidad entre ambas subunidades.

Durante el procesamiento de las imágenes se focalizó un centro de comparación a partir del cual se colocaron las partículas, tal centro es resuelto a la máxima resolución posible (ya que la coincidencia de la información de las partículas en tal punto es máxima) a costa de empeorar la resolución obtenida de aquellos elementos que presentan diferente posición respecto a este centro. Debido a que la estructura de Lee y colaboradores fue resuelta con un anticuerpo de 4F2hc, ellos centraron la resolución en este punto, mientras que nosotros la centramos en LAT2, al tener mucha mayor

importancia conocer su estructura atómica para revelar los determinantes funcionales de la subunidad transportadora.

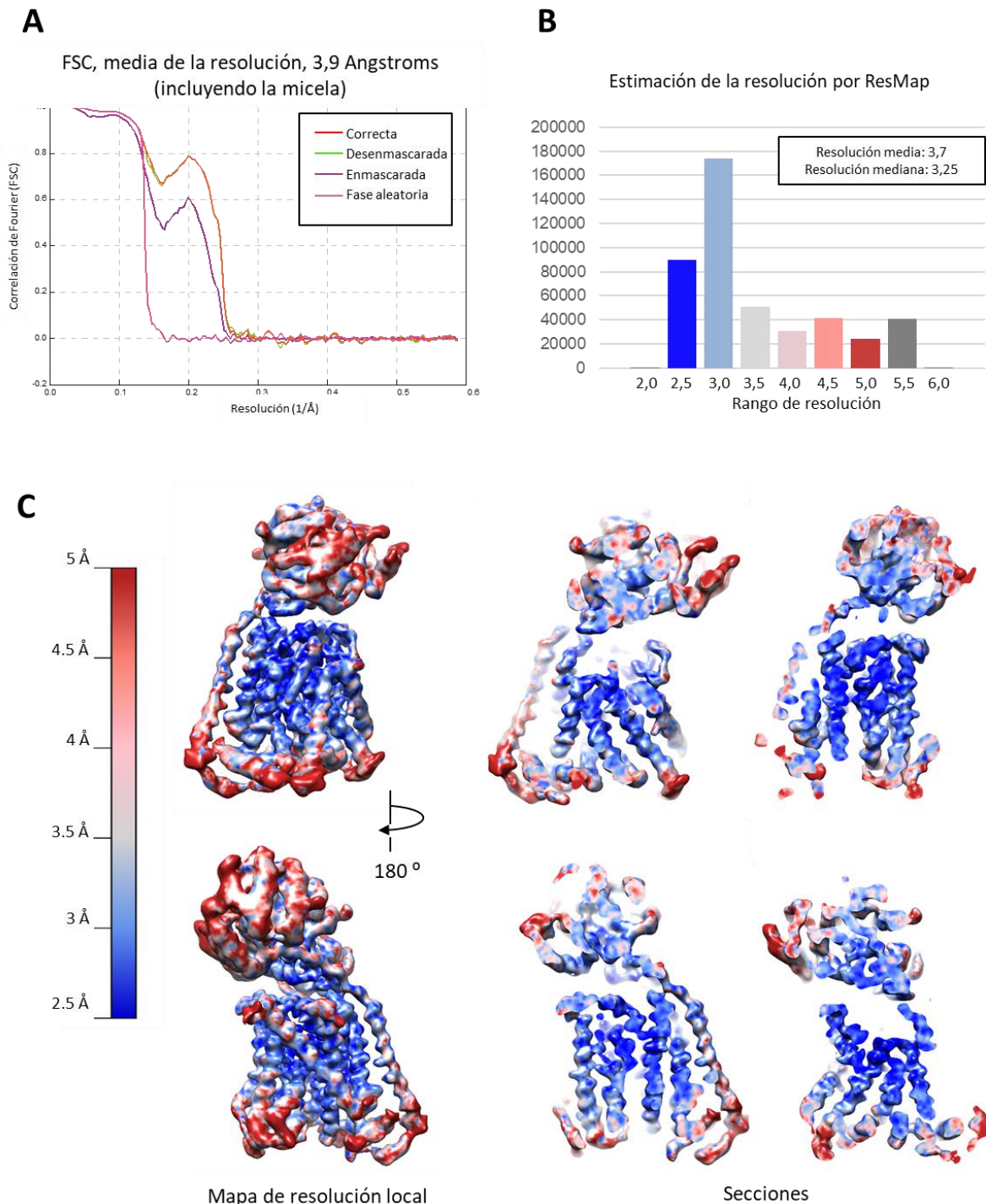


Figura 26: Estimación de la resolución de 4F2hc/LAT2 humano. A) Curva de correlación de Fourier Shell (FSC, por sus siglas en inglés *Fourier Shell Correlation*) estima la resolución promedia del volumen en crio-ME de 4F2hc/LAT2, en este caso usando una máscara que incluye la proteína completa y la densidad de la micela. B) Gráfico del número de vóxeles en cada rango de resolución en el volumen de crio-ME de h4F2hc/LAT2. Se muestran las estimaciones de resolución promedio y mediana calculadas usando el programa ResMap. C) Estimaciones de resolución local del mapa de crio-ME de h4F2hc/LAT2, procedentes del programa RELION.

Así, la alta resolución del mapa y la calidad de la densidad de las cadenas laterales obtenidas permitieron la asignación de los residuos en cada elemento helicoidal durante el modelado de la estructura atómica, tanto de LAT2 como del dominio transmembrana de 4F2hc (Figura 27). El modelaje de la estructura nos ha permitido realizar un estudio exhaustivo de la disposición de residuos de interés como aquellos que participan en los contactos entre ambas subunidades o en la formación del sitio de unión de los sustratos.

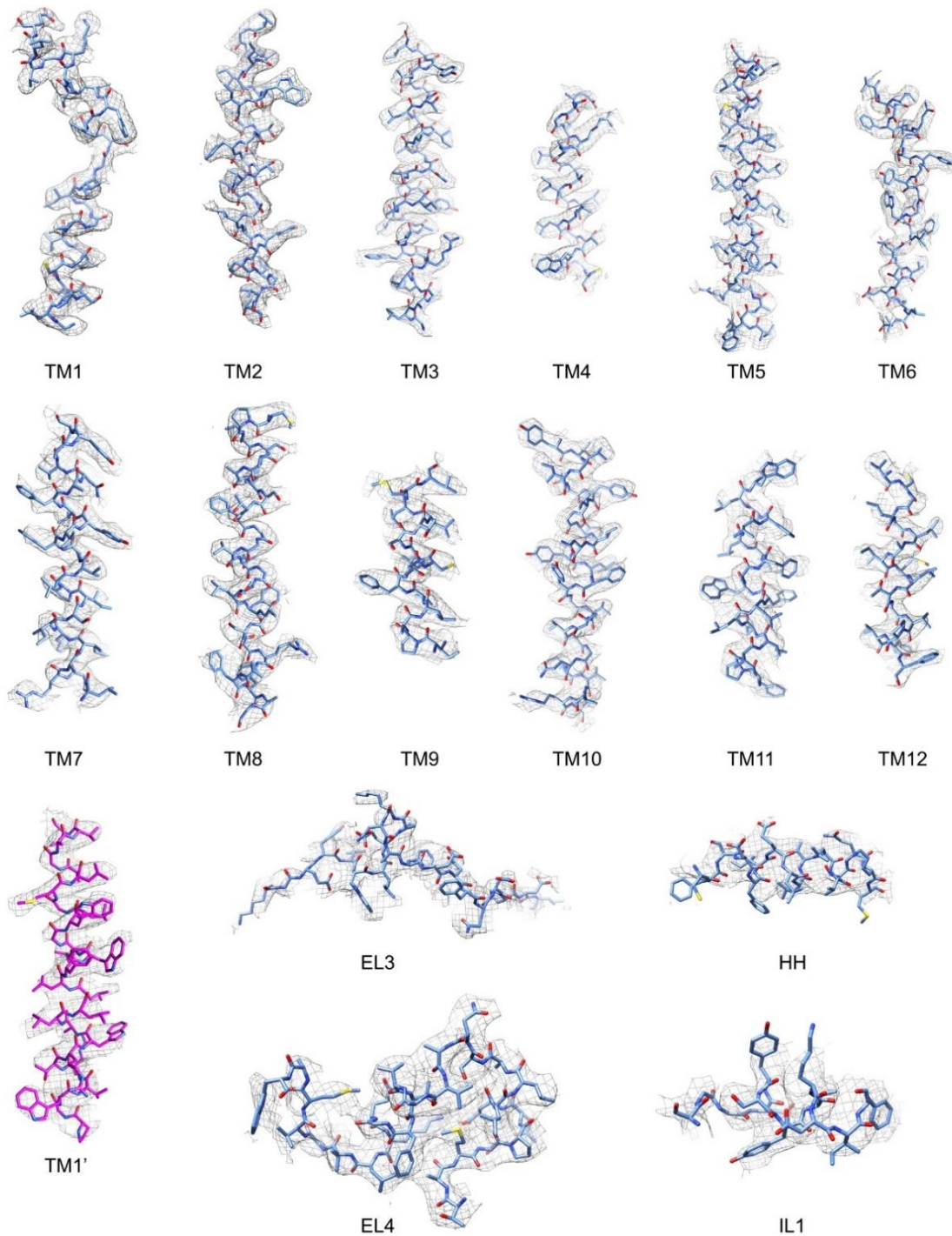


Figura 27: Detalle de los dominios transmembrana y bucles intra y extracelulares del mapa de crio-ME de 4F2hc/LAT2 humano con modelaje incluido. En malla gris se muestran las densidades de crio-EM. La arquitectura de la región transmembrana de 4F2hc/LAT2 se muestra dividida en hélices transmembrana (TM), bucles externos (EL), bucles internos (IL) y la hélice α horizontal (HH).

De hecho, se pudieron modelar las secuencias de 4F2hc y LAT2 humanos con claridad en ausencia de sustrato, a excepción de parte de las regiones N-terminal de ambas proteínas por falta de densidad; los residuos 1 - 60 de 4F2hc (isoforma f) y los residuos 1 - 40 de LAT2.

4.2.1. Arquitectura general

Desde lo más externo y general, el mapa de crio-ME de la proteína 4F2hc/LAT2 reveló la disposición de una subunidad respecto a la otra. El ectodominio extracelular de 4F2hc se colocaba inmediatamente encima de LAT2 y se anclaba a la membrana por la hélice transmembrana (TM1') que interactuaba con LAT2 y cruzaba hasta el lado citoplasmático donde se encontraba su extremo N-terminal (no resuelto totalmente debido a la escasa densidad que posee como resultado de su movilidad) (Figura 28). Es la misma arquitectura general descrita en 4F2hc/LAT1 (Lee *et al.*, 2019; Yan *et al.*, 2019).

Además, se observó una densidad alargada cerca de las hélices transmembrana (TM) 3, 9, 10 y 12 que fue interpretada como una molécula de digitonina (Figura 28, morado). En las estructuras de 4F2hc/LAT1 que fueron purificadas en una combinación de detergente y colesterol también se encontraron densidades similares (Lee *et al.*, 2019; Yan *et al.*, 2019). Sin embargo, aunque la digitonina posee una densidad más grande y alargada hacia la región extracelular, la molécula encontrada en nuestro mapa de crio-ME presenta la misma posición que los esteroides en el mapa de 4F2hc/LAT1.

En cuanto a la arquitectura presentada por cada una de las subunidades, el ectodominio de la subunidad 4F2hc mostraba una estructura secundaria idéntica a la resuelta anteriormente en nuestro laboratorio (Fort *et al.*, 2007). Se encuentra formada por el dominio A en forma de tipo barril TIM, el dominio B compuesto por largos bucles situados entre la tercera hebra y la tercera hélice del dominio A y el dominio C (en el extremo C-terminal) que posee una estructura de lámina β formada por 8 láminas antiparalelas.

Al igual que la subunidad pesada, la subunidad ligera LAT2 presentaba un plegamiento anteriormente descrito, el conocido como LeuT, el plegamiento de la superfamilia APC. Este plegamiento presenta una repetición doble inversa 5+5 en donde los dominios transmembranas TM1 - TM5 y TM6 - TM10 se posicionan frente a un eje binario de pseudo-simetría doble situado en el centro de la membrana y paralelo a la misma (Yamashita *et al.*, 2005).

Los dominios TM1 y TM6 (situados en el centro del eje de simetría) no presentan hélices continuas, se desenrollan en el centro formando dos hélices discontinuas denominadas TM1a, TM1b y TM6a, TM6b (Figura 28 - A, azul oscuro y verde respectivamente). Los dominios no incluidos en la parte simétrica de la proteína, los TM11 y TM12, se disponen entre ellos formando una V en el lado externo de TM10 (Figura 28).

Los segmentos transmembranales 1 y 6 participan en el reconocimiento y transporte del sustrato y es su disposición la que confiere a la estructura una conformación u otra. En nuestro caso, la proteína 4F2hc/LAT2 ha sido resuelta en una conformación sin sustrato abierta hacia adentro, debido a que los segmentos TM1a y TM6b se encontraban inclinados abriendo un vestíbulo que conecta el centro del transportador con el interior celular (Figura 29 - A).

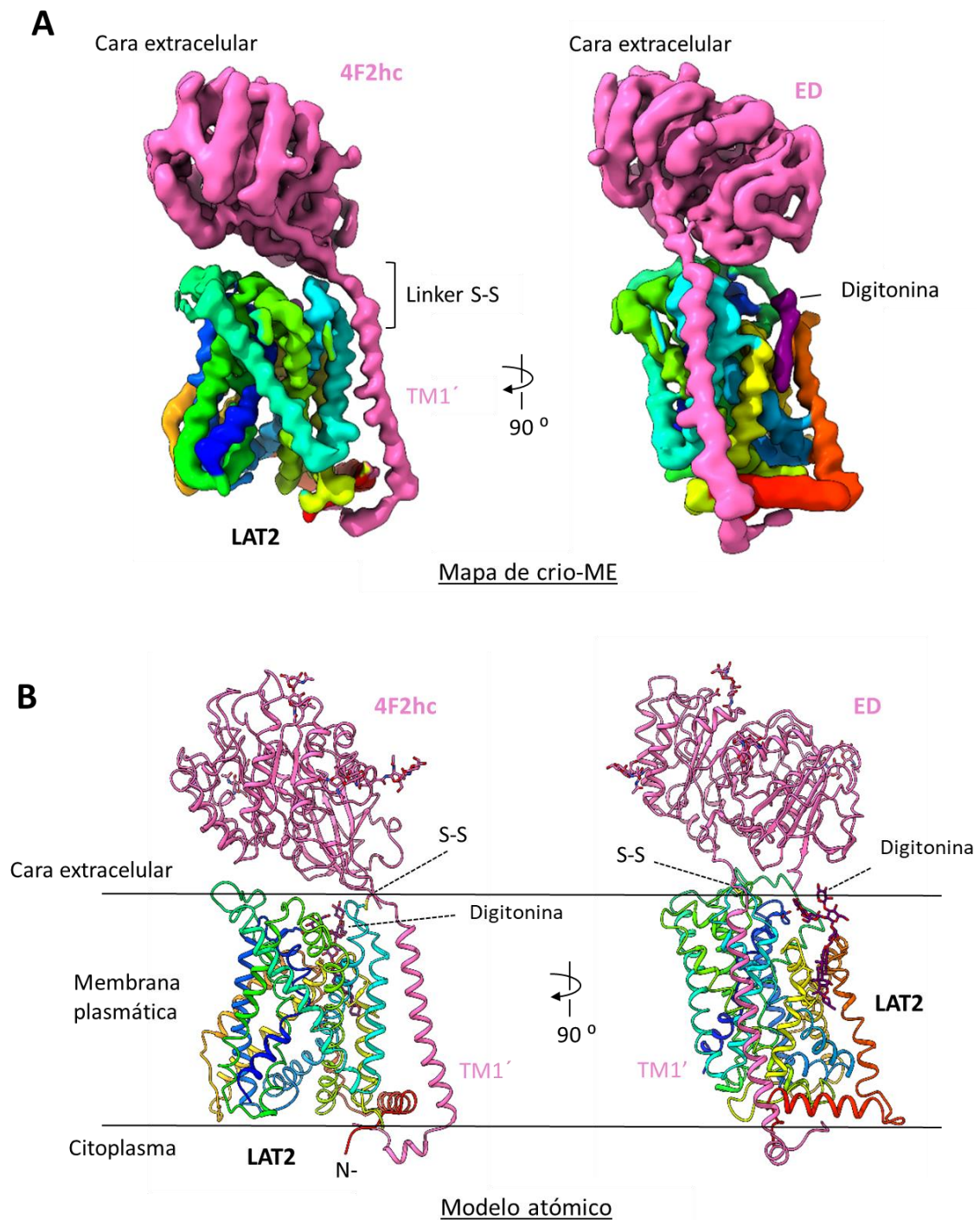


Figura 28: Mapa de densidad de crio-ME y modelo atómico de 4F2hc/LAT2 humano. A) Mapa de crio-ME de 4F2hc/LAT2 mostrado con un giro de 90°, con 4F2hc en rosa, LAT2 en arcoíris (azul oscuro, cian, verde, amarillo y rojo desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal) y una molécula de digitonina en morado. B) Modelo atómico de 4F2hc/LAT2 mostrado con un giro de 90°. Mismo patrón de color que la sección A).

Por el contrario, el vestíbulo central no se encontraba conectado con el espacio extracelular (las puertas gruesas y finas mencionadas en la Introducción que impiden un canal de transporte directo), cerrando el transportador hacia el exterior celular (Figura 29 - A). La puerta hacia el exterior celular se encuentra cerrada por residuos hidrofóbicos en el TM1b (Val 60), el TM6a (Phe 243) y el TM10 (Met 384 e Ile 388), y por residuos polares en el TM1b (Lys 63), el TM3 (Thr 141), así como el bucle extracelular 4 (Asn 300) y el TM10 (Tyr 385) (Figura 29 - B).

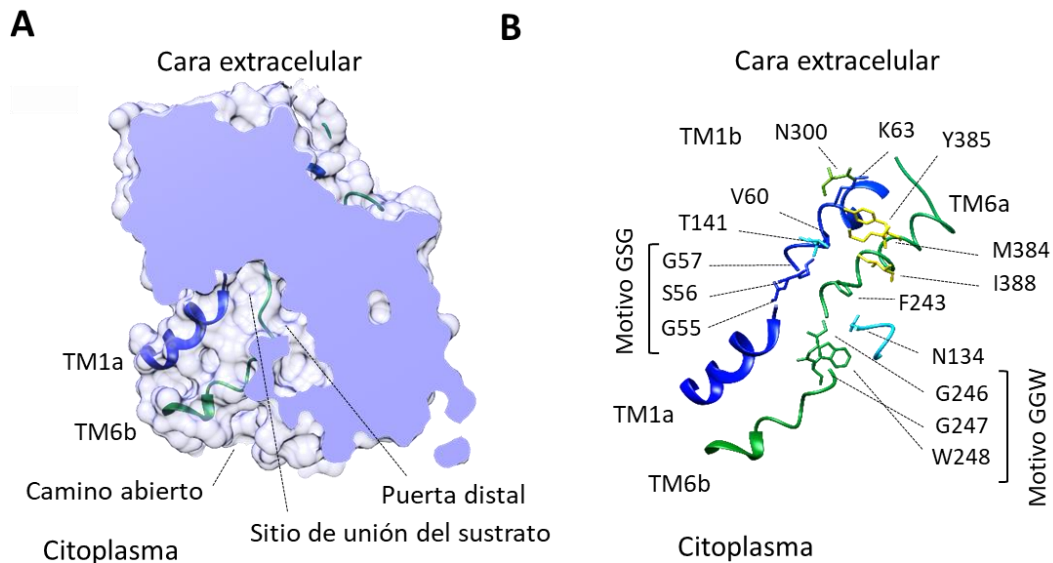


Figura 29: Sitio de unión al sustrato. El patrón de color es el mismo que en la figura anterior 28 . Los átomos de oxígeno están coloreados en rojo y los átomos de nitrógeno en azul. A) Representación de LAT2 en superficie con un corte para mostrar que el sitio de unión se encuentra abierto hacia el interior celular pero cerrado hacia el exterior. La disposición y ángulos de los TM1a y TM6b producen que la conformación del transportador sea abierta hacia el citoplasma. B) Representación de los dominios transmembranas que forman el sitio de unión del sustrato de LAT2, TM1 en azul y TM6 en verde. En forma de *sticks* se encuentran representados los residuos que forman parte del sitio de unión como los motivos GSG y GGW y los residuos clave que forman parte del cierre del canal a la cara extracelular.

4.2.2. Contactos entre 4F2hc y LAT2

Los transportadores heteroméricos de aminoácidos son el único ejemplo dentro de los transportadores en el que sus dos subunidades se encuentran unidas por un puente disulfuro. Las subunidades LAT2 y 4F2hc están unidas por un puente disulfuro entre los residuos situados en el cuello que conecta la región de ectodominio con el TM1', Cys 154 y Cys 109 (LAT2 e isoforma f de 4F2hc, respectivamente), pero también por un número variable de interacciones entre el TM1' de 4F2hc y regiones transmembrana de la subunidad LAT2, así como varias regiones situadas entre la región superior de LAT2 y la región inferior de 4F2hc.

Mientras el dominio transmembrana de 4F2hc, TM1', atraviesa la bicapa lipídica, lo hace realizando varios contactos hélice - hélice con residuos del TM4 de LAT2, situado en el dominio *hash* (formado por los TM3, TM4, TM8 y TM9) y el extremo extracelular de TM3 de LAT2. En esta interfase formada por TM1' - TM4 participan residuos hidrófobos como Ile 204', Ala 201', Met 197' y Leu 198' de 4F2hc (isoforma f) y Gly 160, Leu 163, Leu 164 y Ile 167 (TM4) de LAT2 (Figura 30).

De las tres interfaces que también participan en la conexión de ambas subunidades se encuentran los enlazadores C β 2 / C β 3 / C β 8-EL2, A α 8 - EL4a y A α 1 / A α 2 - EL3 (en referencia a los códigos de las regiones de 4F2hc, la primera letra se refiere al dominio A, B o C, la letra griega a si la estructura es α -hélice o lámina- β y el número al orden de aparición).

La interfase enlazadora comprendida entre C β 2 / C β 3 / C β 8 - EL2 involucra el mencionado puente disulfuro entre Cys 211' y Cys 154 y el enlace de hidrógeno entre Asp 559' y Thr 153. La región del EL2 está poco conservado entre los HATs pero exhibe características compartidas, 9 residuos de

longitud flanqueados por prolina conservadas (Pro 149 y Pro 157), con un residuo de Phe o Tyr en la tercera posición y un residuo hidrófilo en la quinta posición (ambos conservados entre LAT1 y LAT2). La interfase referente a $\text{A}\alpha 8$ - EL4a consta de dos pares de residuos hidrófilos, poco conservados, que forman enlaces polares; Lys 533' y Arg 535' y Gln 294 y Glu 295 en LAT2.

La conservación es alta excepto en la interfase comprendida por $\text{A}\alpha 1$ / $\text{A}\alpha 2$ - EL3, donde parece presentar más diferencias respecto a 4F2hc/LAT1 (Lee *et al.*, 2019), ya que mientras Lee menciona tres interacciones iónicas, en nuestra estructura solo observamos una posible entre Lys 301' y Asn 221.

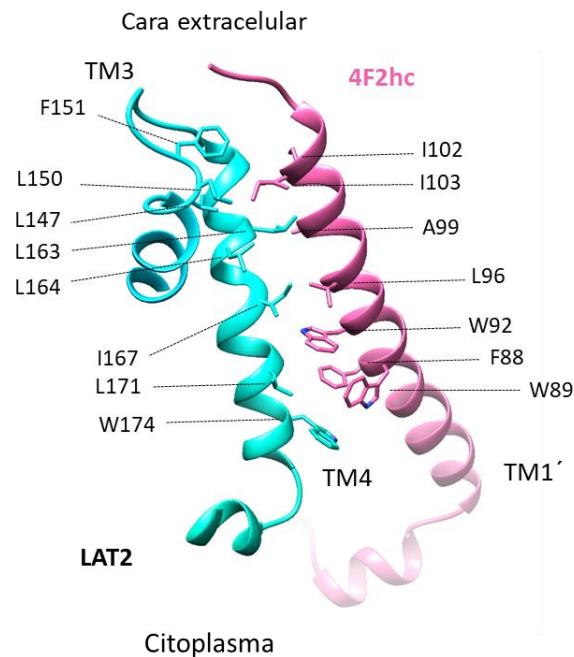


Figura 30: Contactos entre 4F2hc y LAT2 en la región transmembranal. Se muestran los contactos entre la hélice transmembrana TM1' de 4F2hc con el TM4 de LAT2. Los dominios transmembranales son presentados como cintas y los residuos involucrados en las interacciones entre las dos subunidades como *sticks* que unen sus átomos. Los códigos de color son los mismos que para la figura 28 con los átomos de nitrógeno coloreados en azul. Los átomos de hidrógeno no son mostrados.

4.2.3. El sitio de unión del sustrato

El sitio de unión a sustrato en los transportadores de la superfamilia APC está situado en el desenrollamiento que presentan los TM1 y TM6 (región conocida en inglés como *unwound*). Estas regiones sin estructura en hélice forman un espacio, un bolsillo cuyos residuos, así como enlaces de hidrógeno y otras interacciones que forman con los TM3 y TM8, determinan las propiedades fisicoquímicas del bolsillo y con ello la selectividad de sustrato de cada transportador (Kowalczyk *et al.*, 2011; Jungnickel *et al.*, 2018; Errasti-Murugarren *et al.*, 2019; Yan *et al.*, 2019; Yan *et al.*, 2020a).

Por tanto, la selectividad de sustrato reside en los dominios conservados de los segmentos desenrollados del TM1 (motivo GSG) y TM6 (motivo GGW), así como en algunos residuos del TM3 y TM8 con los cuales los sustratos establecen contacto (Figura 29 - B).

Las regiones desenrolladas requieren de otros residuos para mantener el nivel de estabilidad adecuado para realizar el correcto reconocimiento y transporte de los aminoácidos. En este sentido, en 4F2hc/LAT2 se establecían interacciones hidrofóbicas entre los residuos Ile 58 y Phe 59 del TM1, Leu 198 e Ile 201 del TM5 y Val 322 del TM8 estabilizando la región desenrollada de TM1 (Figura 31 -

A). Adicionalmente, los enlaces de hidrógeno formados entre los grupos hidroxilo de Ser 56 del TM1 y Ser 325 del TM8, el grupo carbonilo del Ile 53 del TM1 y el grupo hidroxilo de Tyr 280 del TM7 y la cadena lateral de Lys 194 del TM5 y el grupo carbonilo del Ile 54 del TM1 también participarían en esta estabilización mediante contactos directos (Figura 30 - A).

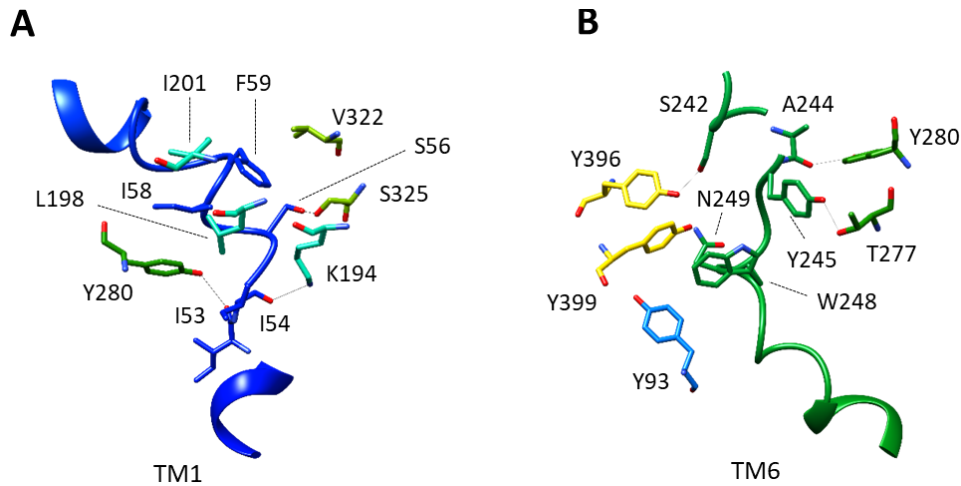


Figura 31: Dominios transmembrana pertenecientes al sitio de unión al sustrato y sus interacciones. El patrón de color es el mismo figuras anteriores. Los átomos de oxígeno están coloreados en rojo y los átomos de nitrógeno en azul. A) Región del sitio de unión del TM1 con los residuos que mediante su interacción contribuyen a la conformación del sitio de unión al sustrato. B) Región del sitio de unión del TM6 con los residuos que contribuyen a la conformación del sitio de unión al sustrato.

De manera similar al TM1, la región desenrollada de TM6 establecía varias interacciones con residuos del TM7 y TM10 (Figura 31 - B). Más concretamente, las cadenas laterales de los residuos Ser 242, Tyr 245 y Asn 249 del TM6 formaban una red de enlaces de hidrógeno con grupos hidroxilo de los residuos Tyr 396 del TM10, Thr 277 del TM7 y Tyr 399 del TM10, respectivamente.

Además, el residuo Trp 248 del TM6 establecía interacciones aromáticas con la Tyr 399 del TM10 y la Tyr 93 del TM2, así como interacciones hidrófobas con residuos del TM2 (Figura 31 - B). Finalmente, como también es el caso del TM1, el grupo hidroxilo del residuo Tyr 280 del TM7 interactuaba con el carbonilo del residuo Ala 244 del TM6.

4.3. DETERMINANTES FUNCIONALES DE 4F2hc/LAT2

Una caracterización proteica completa debe también abarcar aspectos funcionales de la proteína. Estudiar la dinámica funcional de una proteína permite averiguar el porqué de su estructura y así poder relacionar las diferentes posiciones de, por ejemplo, una hélice en una misma familia, puesto que puede ser la clave en la variación funcional dentro de tal familia.

4.3.1. Residuos implicados en la selectividad del sustrato

A partir del conocimiento estructural del sitio de unión del sustrato se han podido realizar una serie de estudios para poder determinar los residuos que pueden ser clave para el perfil de selectividad de sustrato en LAT2 humano. LAT2 es un transportador heteromérico con afinidad por los aminoácidos

neutros, tanto pequeños como grandes incluyendo L-glutamina. Sin embargo, para poder revelar qué residuos tomaban parte en el reconocimiento de los sustratos, un estudio individual de la estructura de LAT2 resultaba insuficiente.

Si nuestro objetivo era caracterizar los determinantes de la selectividad de sustrato por parte de los transportadores LATs de aminoácidos neutros humanos (4F2hc/LAT1, 4F2hc/LAT2 y 4F2hc/Asc1) resultaba necesario realizar un estudio comparativo, tanto de secuencia como de estructura, así como ensayos funcionales con mutantes de los residuos de interés, y de esta manera y en conjunto, establecer qué residuos eran clave dentro de las pequeñas diferencias de reconocimiento que existen dentro de este subconjunto de LATs.

Al final de la realización de esta tesis la estructura de 4F2hc/LAT2 humana fue publicada unida a dos sustratos (Yan *et al.*, 2020b). No obstante, al ser estos sustratos L-leucina y L-triptófano no relevaban los mecanismos moleculares por los cuales LAT2 transporta aminoácidos neutros pequeños o L-glutamina.

Para comenzar a entender los mecanismos moleculares que gobiernan la selectividad de sustrato en este grupo de transportadores se realizaron estudios de acoplamiento molecular y PELE sobre la estructura apo del LAT2 recién refinado. Se analizó la posición de un conjunto de sustratos de LAT2; los aminoácidos glicina, L-alanina, L-triptófano y L-glutamina.

PELE (por sus siglas en inglés *Protein Energy Landscape Exploration*) es un tipo de estudio que permite la exploración de los sustratos y ver cómo son capaces de situarse, en nuestro caso, en el sitio de unión. Cada uno de los sustratos es colocado en el sitio de unión mediante acoplamiento molecular. Posteriormente, el sustrato es desplazado aleatoriamente y mediante dinámica molecular se identifican poses del sustrato estimando la energía de unión. De cada sustrato se obtienen decenas de miles de poses.

La energía de interacción permite identificar las más probables como aquellas que presentan energías más pequeñas (comúnmente denominado mínimos) y que a la postre son las poses estudiadas. Los PELE son representados en gráficas con una medida de la distancia entre las distintas poses exploradas y un átomo de referencia de LAT2 (eje de abscisas en RMSD, por sus siglas en inglés *Root-Mean-Square Deviation*) y la energía de interacción calculada en el eje de ordenadas.

4.3.1.1. Estudios PELE para determinar residuos clave para la selectividad de sustrato

Los estudios de acoplamiento de sustrato y PELE han mostrado mínimos para todos los sustratos analizados (glicina, L-alanina, L-triptófano y L-glutamina), siendo los sustratos grandes en los que más movimiento y mínimos de energía de interacción más profundos se ha observado.

Estas posiciones con energía de interacción mínima correspondían a la pose canónica de cada aminoácido que consisten en la interacción con la columna vertebral de las regiones desenrolladas del TM1 y TM6. Estas poses canónicas coincidían con las ya descritas en los casos de otros transportadores pertenecientes a la familia SLC7 como BasC (Errasti-Murugarren *et al.*, 2019), GkApcT (Jungnickel *et al.*, 2018), LAT1 (Lee *et al.*, 2019; Yan *et al.*, 2019), LAT2 (Yan *et al.*, 2020b) y b0 + AT (Wu *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2020a).

La pose canónica sitúa el grupo amino del sustrato a distancia de puente de hidrógeno del grupo carbonilo de los residuos Gly 55, Ser 56 y Gly 57 de la región desenrollada de TM1 (el motivo GSG anteriormente descrito). Mientras que el grupo α -carboxilo de los sustratos establece contactos con diferentes residuos de la región desenrollada del TM6 en la pose canónica (Figura 32).

Adicionalmente, las cadenas laterales de alguno de los sustratos mostraban interacciones con residuos más alejados del sitio activo descrito. Por ejemplo, la cadena lateral de L-alanina establecía un contacto hidrofóbico con el anillo aromático del residuo Phe 243 (Figura 32 - B), mientras, las cadenas laterales de L-glutamina y L-triptófano través de un puente de hidrógeno establecían contactos con el grupo amida de la cadena lateral del residuo Asn 134 (situado en el TM3) (Figura 32 - C y D).

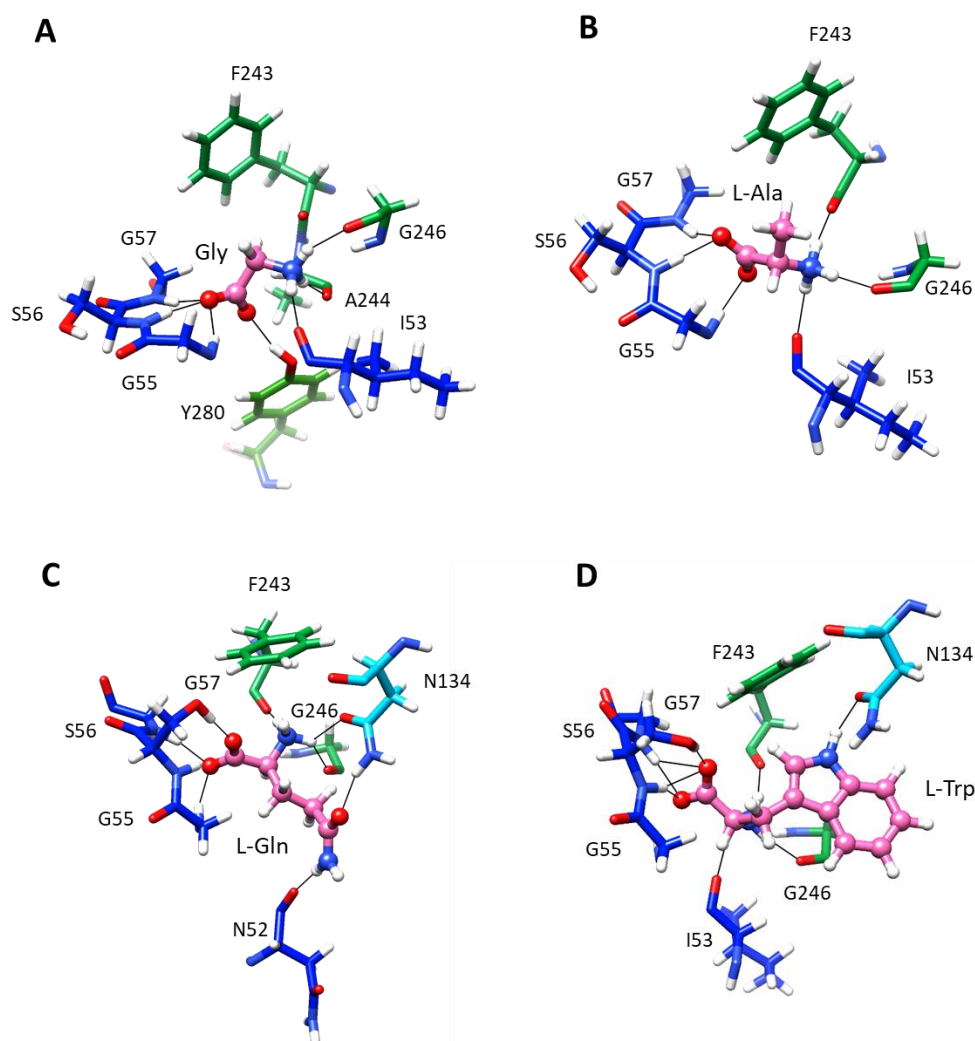


Figura 32: Poses canónicas de los sustratos glicina, L-alanina, L-triptófano y L-glutamina procedentes de los análisis de PELE de LAT2. Los átomos de carbono de los residuos indicados siguen los códigos de color para las hélices y residuos de las figuras anteriores. Los átomos de carbono de los sustratos están coloreados en rosa, mientras que los átomos de oxígeno y de nitrógeno, tanto de los sustratos como de los residuos, están coloreados en rojo y azul, respectivamente. Las líneas negras conectan los átomos ubicados a una distancia de puente de hidrógeno; estas interacciones indican que tales residuos podrían ser relevantes en la selectividad de sustrato por parte de la familia de transportadores LATs. A) Glicina, B) L-alanina, C) L-glutamina y D) L-triptófano.

Estos estudios proporcionaban información sobre las interacciones entre los sustratos y los residuos del sitio de unión de LAT2, revelando qué residuos resultaban estar involucrados en el reconocimiento de tales sustratos y en este sentido, en la selectividad de LAT2.

No obstante, al existir otros miembros de la subfamilia LAT que también transportan aminoácidos neutros, con diferentes especificidades y afinidades, estos han estudiado en conjunto para caracterizar los determinantes de este perfil de selectividad en concreto.

4.3.1.2. Comparación de secuencia entre transportadores de aminoácidos neutros

El estudio estructural de LAT2 y el estudio de cómo los residuos interactúan con el sustrato resultaba insuficiente en la determinación de tal selectividad si no era ampliado con estudios funcionales de proteínas con similar perfil de transporte o con la comparación de sus secuencias de aminoácidos.

Junto con LAT2, los transportadores HAT formados por la subunidad ligera LAT1 y Asc1 muestran un perfil de selectividad hacia los aminoácidos neutros, pero con especificidades distintas (Pineda *et al.*, 1999; Pineda *et al.*, 2004; Yanagida *et al.*, 2001). LAT1 transporta en su mayoría aminoácidos neutros grandes, Asc1 transporta los pequeños y LAT2 todos, incluyendo L-glutamina; por el contrario, Asc1 y LAT1 son transportadores poco afines por L-glutamina.

La información estructural disponible (únicamente para LAT1 y LAT2 humanos) y la secuencia de aminoácidos de los tres transportadores en el sitio de unión al sustrato han sido comparados para identificar las bases moleculares que participan en el reconocimiento del sustrato.

La comparación de los segmentos que forman parte del sitio de unión al sustrato revelaba ciertas diferencias de secuencia, cambios de residuo que podrían ser claves para explicar el distinto perfil de sustratos de LAT2, Asc1 y LAT1 (Figura 33).

Es fácilmente observable que los residuos pertenecientes al TM1 son los mismos en las tres proteínas LATs comparadas, es el mencionado motivo GSG altamente conservado en la subfamilia LAT. No obstante, se observaban diferencias puntuales muy significativas en los TM3 y TM6; en el caso del dominio GSG del TM6 LAT2 y LAT1 presentaban una glicina en la posición 246, mientras que Asc1 contenía una serina; y en el caso del TM3, LAT1 y Asc1 presentaban una serina en la posición 134 mientras que LAT2 contenía una asparagina.

	TM1		TM3		TM6
LAT1	(63) IIGSGIF (69)	--	S144	--	(252) FAYGGW (257)
LAT2	(53) IIGSGIF (59)	--	N134	--	(243) FAYGGW (248)
Asc1	(53) IIGSGIF (59)	--	S134	--	(243) FAFGSW (248)
	Motivo GSG				Motivo GGW

Figura 33: Alineación de la secuencia de LAT2 con LAT1 y Asc1 humanos. Se muestran las regiones desenrolladas de TM1 y TM6, así como Asn 134 del TM3, un residuo que interacciona con los sustratos grandes (Figura 32). Los residuos en rojo son residuos altamente conservados dentro de la subfamilia LAT.

Los cambios encontrados en la secuencia de aminoácidos de estos LATs podrían ser relevantes ya que, según los estudios en PELE, los mencionados residuos interaccionaban con el sustrato (Figura

32) y podrían resultar clave para explicar los distintos perfiles de selectividad dentro de los transportadores de aminoácidos neutros.

Para el caso del residuo 246, una serina en Asc1 podría dar una explicación a por qué Asc1 no transporta aminoácidos neutros grandes, mientras que el residuo 134, diferente entre LAT1/Asc1 y LAT2 podría ser la causa de la diferente afinidad por L-glutamina (Pineda *et al.*, 1999; Pineda *et al.*, 2004; Yanagida *et al.*, 2001).

Por tanto, para definir la implicación que tienen estos residuos en la selectividad del sustrato en este grupo de transportadores se realizaron varios ensayos de transporte para determinar el efecto del cambio de aminoácido en las localizaciones 246 y 134 para LAT2 y para Asc1 humanos.

4.3.1.3. Análisis mutacional del sitio de unión

Los ensayos funcionales se realizaron en células HeLa transfectadas con los mutantes de LAT2 y de Asc1 humanos con los sustratos marcados [³H] glicina, [³H] L-alanina, [³H] L-valina, [³H] L-Isoleucina, [³H] L-histidina, [³H] L-glutamina y [³H] L-triptófano. El objetivo de estos estudios funcionales era estudiar el efecto de tales cambios de residuo sobre la actividad transportadora respecto a la forma salvaje (WT, por sus siglas en inglés *wild type*) de la proteína.

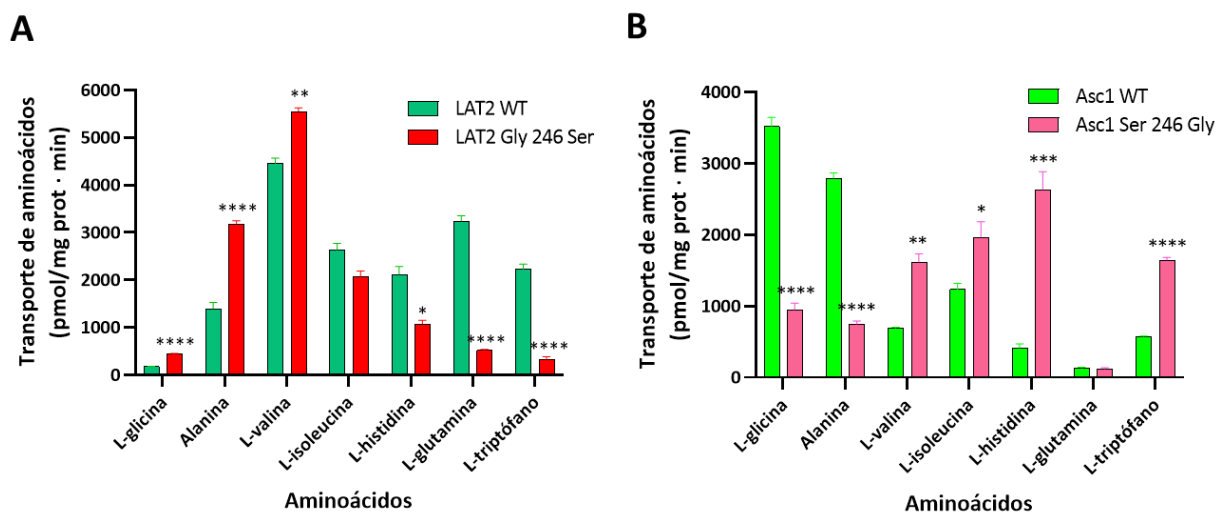


Figura 34: Ensayo de transporte de mutantes de 4F2hc/LAT2 y 4F2hc/Asc1 humanos para el residuo 246. Los transportes se han realizado con los sustratos glicina, L-alanina, L-valina, L-isoleucina, L-glutamina, L-histidina y L-triptófano marcados radiactivamente [³H] a 10 μ M en células HeLa y ordenados de izquierda a derecha de menor a mayor tamaño. Los datos se expresan como media \pm s.e.m. de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por cuadruplicado. A) Transporte de la proteína 4F2hc/LAT2, salvaje (verde) y mutante (rojo), mostrados en pmol/mg de proteína por minuto de transporte. B) Transporte de la proteína 4F2hc/Asc1, salvaje (verde) y mutante (rosa), mostrados en pmol/mg de proteína por minuto de transporte.

La mutación Gly 246 Ser en LAT2 afectaba gravemente a los sustratos grandes como [³H] L-triptófano, [³H] L-glutamina y [³H] L-histidina cuyo transporte se redujo hasta el 15 % en comparación con la forma nativa (Figura 34 - A). Mientras que, para los aminoácidos pequeños, la mutación Gly 246 Ser en LAT2 resultaba en un incremento de su actividad de transporte (Figura 34 - A).

Por el contrario, la mutación inversa en Asc1, Ser 246 Gly, afectaba al transporte de manera inversa. El transporte de los sustratos más pequeños ([³H] glicina y [³H] L-alanina) disminuía hasta el 30% de la

actividad de la proteína nativa, mientras que la actividad de los sustratos grandes aumentaba, con la excepción de [³H] L-glutamina cuyo transporte no variaba (Figura 34 - B).

Para visualizar cómo afectaban estas mutaciones respecto a la posición de los sustratos en el sitio de unión para, así, dar una explicación al efecto en la actividad de estos mutantes, se realizaron los mismos estudios PELE anteriores, pero empleando el modelo de LAT2 humano con la mutación Gly 246 Ser introducida.

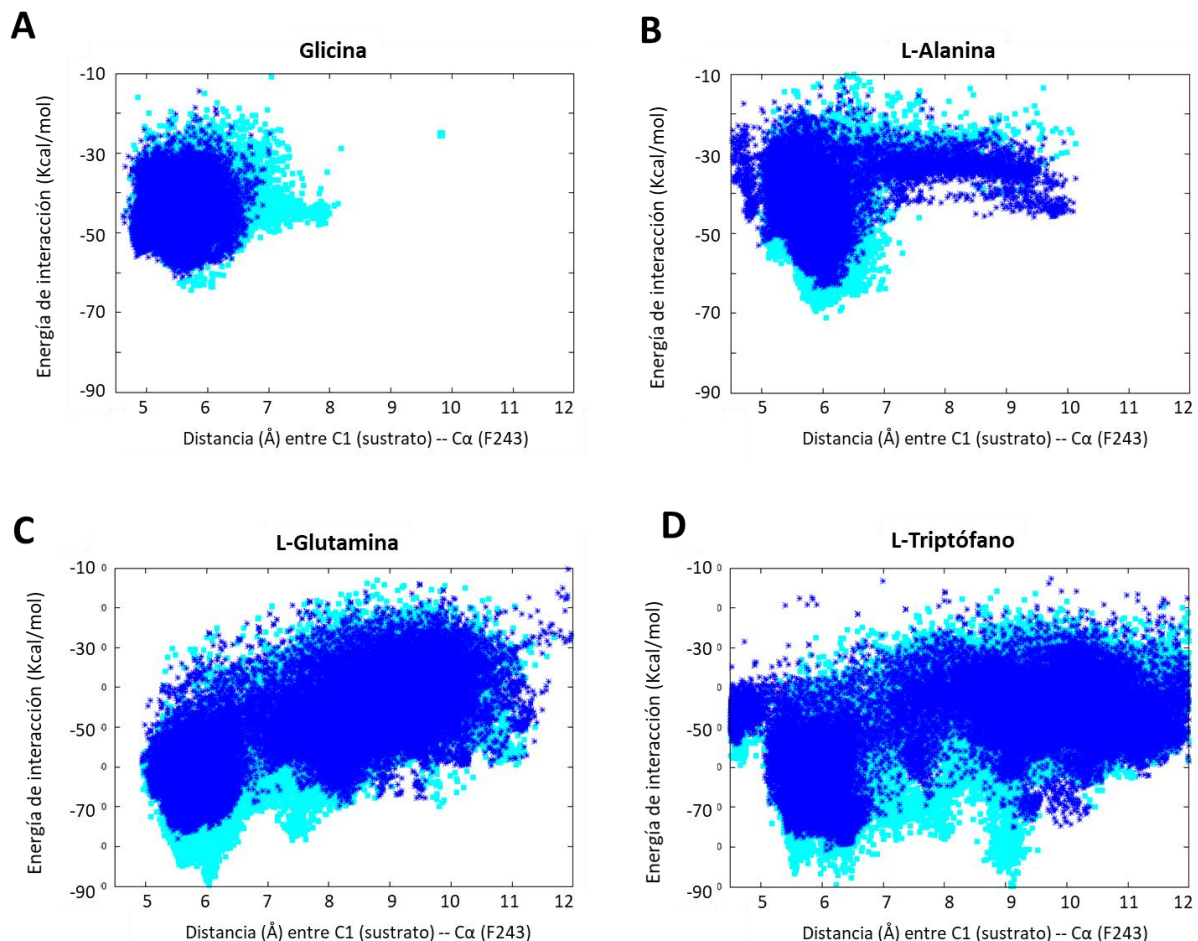


Figura 35: Simulación PELE de la unión de los sustratos glicina, L-alanina, L-glutamina y L-triptófano a LAT2 humano en conformación abierta hacia el citosol, salvaje y mutante Gly 246 Ser. Las simulaciones realizadas en LAT2 salvaje se muestran en azul oscuro y aquellas realizadas en el mutante Gly 246 Ser en azul cian. Estas gráficas muestran las energías de interacción (en Kcal/mol) para las distintas poses de los sustratos indicados frente a la distancia entre el carbono 1 (del grupo carboxilo) del sustrato y el carbono α (carbonilo de los grupos CO) del residuo Phe 243 (Armstrong). Cada punto en la gráfica da lugar a una pose del sustrato dentro del sitio de unión. Si la distancia medida se encuentra alrededor de los 6 Å, la pose corresponde al sitio de enlace canónico y por tanto no es considerado un movimiento significativo. Se realizaron 160.000 pasos de simulación PELE Monte Carlo por condición (aproximadamente 55.000 modos de unión muestreados). A) Glicina, B) L-alanina, C) L-glutamina y D) L-triptófano.

El análisis PELE reveló que las poses de los sustratos en LAT2 Gly 246 Ser mostraban mínimos de energía inferiores al PELE de la proteína nativa (Figura 35, Gly 246 Ser, azul cian, y nativo, azul oscuro), lo que quería decir que se había incrementado la energía de unión para todos los sustratos. Un análisis más en profundidad de las poses para los diferentes mínimos observados en PELE

mostraba que los sustratos ensayados interactuaban con el grupo hidroxilo de la serina añadida en la posición 246 mediante un puente de hidrógeno adicional entre grupo carbonilo y el grupo α -amino del sustrato (Figura 36).

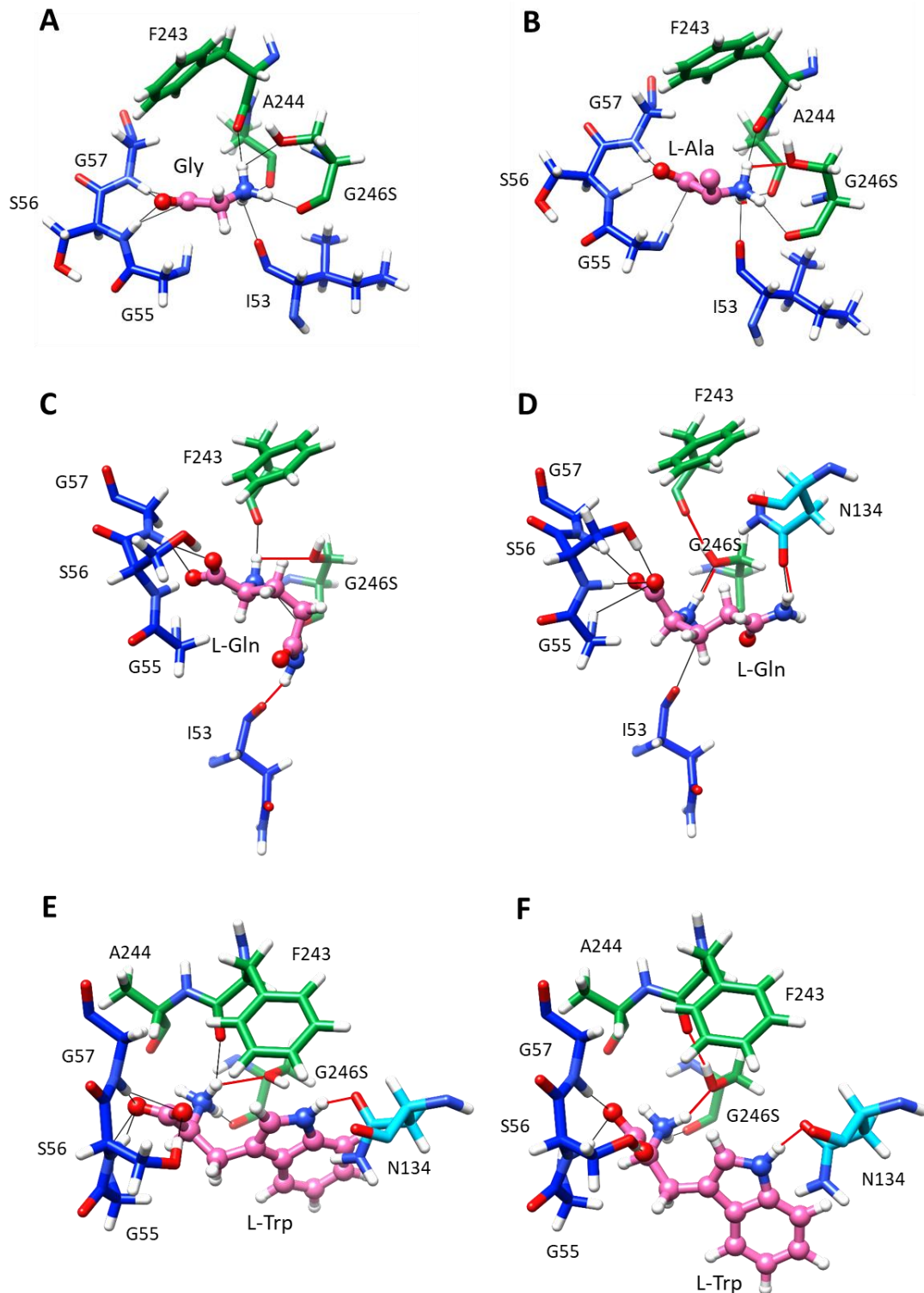


Figura 36: Poses canónicas de los sustratos glicina, L-alanina, L-triptófano y L-glutamina procedentes de los análisis de PELE de 4F2hc/LAT2 humano Gly 246 Ser. Los átomos de carbono, oxígeno y nitrógeno de los sustratos y residuos siguen los códigos de color de las figuras anteriores. Al igual que en la figura 32, las líneas negras con sombras conectan los átomos ubicados a una distancia de puente de hidrógeno en la pose canónica y las líneas rojas hacen referencia a los puentes de hidrógeno adicionales debido a la mutación Gly 246 Ser. A)

Glicina. B) L-alanina. C) L-glutamina antes del desplazamiento del sustrato. D) L-glutamina después del desplazamiento del sustrato. E) L-triptófano antes del desplazamiento del sustrato. F) L-triptófano después del desplazamiento del sustrato. En las posiciones desplazadas (D y F), el grupo hidroxilo del mutante G246S conecta el grupo α amino de cada sustrato con el residuo Phe 243, y la cadena lateral establece puentes de hidrógeno con el residuo Asn 134.

Además, se observaba que para los sustratos grandes (L-glutamina y L-triptófano) el residuo serina en la posición 246 en LAT2 añadiría una interacción intraproteica en forma de puente de hidrógeno entre su grupo hidroxilo y el grupo carbonilo del residuo Phe 243 (del TM6) debido a la rotación del carbono α de la Ser 246 (Figura 36 - D y F). Este modo adicional de anclaje del sitio de unión podría facilitar el movimiento de los sustratos grandes desde la pose canónica al forzar un ligero movimiento de la cadena lateral de tales sustratos hacia fuera del sitio de unión (Figura 36 - C, D, E y F; se observa que el nuevo puente de hidrógeno entre la Ser 246 y la Phe 243 dificulta la formación de interacciones canónicas del sustrato). Esta nueva pose permitiría a los sustratos grandes formar nuevas interacciones mediante su cadena lateral (Figura 36 – D y F). Sin embargo, a pesar de que estas nuevas interacciones adicionales eran observadas en los estudios de PELE de todos los sustratos solo se estabilizarían y ocasionarían un movimiento fuera de la pose canónica en los sustratos grandes (Figura 36 - D y F).

Por tanto, estas nuevas interacciones en las que participan las cadenas laterales de los sustratos grandes y el desplazamiento del sustrato debido a la nueva interacción intraproteica explicarían como la mutación Gly 246 Ser produce un aumento de la actividad de transporte de los sustratos pequeños ($[^3\text{H}]$ glicina, $[^3\text{H}]$ L-alanina y $[^3\text{H}]$ L-valina) por aumento de la energía de unión en la pose canónica y una disminución en el caso de los sustratos grandes ($[^3\text{H}]$ L-histidina, $[^3\text{H}]$ L-glutamina y $[^3\text{H}]$ L-triptófano) al desplazar estos sustratos de la pose canónica (Figura 32 y 36).

El otro residuo que podría ser clave en el reconocimiento del sustrato por LAT2 es la asparagina 134. El ensayo de actividad realizado en LAT2 con la mutación Asn 134 Ser (el residuo equivalente en LAT1 y Asc1) mostraba una actividad de transporte para los aminoácidos pequeños (glicina, L-alanina y L-valina) y el sustrato L-glutamina reducida hasta el 30% de la actividad mostrada por la forma nativa, mientras que no se observaba afectación para los sustratos grandes (L-isoleucina, L-histidina y L-triptófano) (Figura 37).

El mutante opuesto en Asc1 (Ser 134 Asn) resultaba en una forma inactiva de la proteína para todos los sustratos ensayados. Probablemente esta mutación, al aumentar significativamente el tamaño del residuo 134 provocaba problemas estéricos en Asc1 (Figura 37).

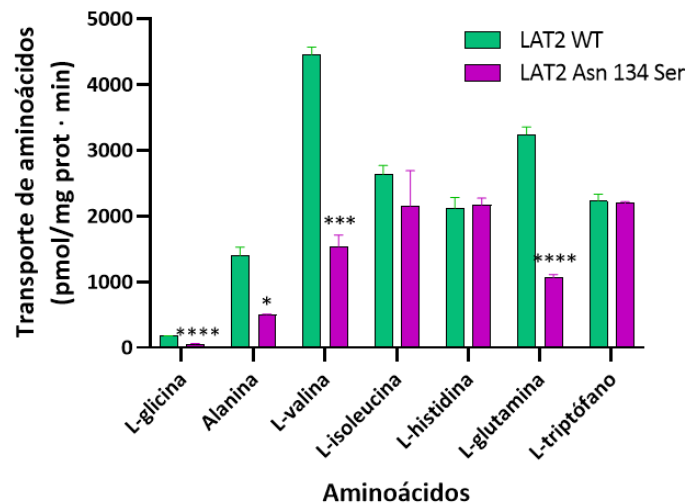


Figura 37: Ensayo de transporte de mutantes de 4F2hc/LAT2 para el residuo 134. Los transportes se han realizado con los sustratos glicina, L-alanina, L-valina, L-isoleucina, L-glutamina, L-histidina y L-triptófano marcados radiactivamente (^3H) a $10\ \mu\text{M}$ en células HeLa. Los datos se expresan como media \pm s.e.m. de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por cuadruplicado. Transporte de la proteína 4F2hc/LAT2, mutante y salvaje, mostrado en pmol/mg de proteína por minuto de transporte.

De la misma manera que en el caso del mutante Gly 246 Ser, fue realizado un estudio PELE con diferentes sustratos con la proteína LAT2 con la mutación Asn 134 Ser para visualizar si este cambio de aminoácido podía modificar la posición de los sustratos en la proteína mutada respecto a la salvaje (Figura 38).

El análisis estructural de los PELE de la proteína nativa revelaba que el residuo Asn 134 interactuaba con los sustratos L-glutamina y L-triptófano en la pose canónica (a través de su cadena lateral), pero no con los sustratos pequeños. Las gráficas de PELE de la figura 38 mostraban una comparación de las energías de interacción calculadas de los PELE del WT y del mutante Asn 134 Ser, observándose que ambos perfiles presentaban diferencias significativas.

De este modo, el mutante favorecía la exploración por el sustrato L-alanina de sitios de unión alternativos, pero con una energía de unión similar a la de la unión canónica, lo que contribuiría a la disminución del transporte de L-alanina mostrado por el mutante Asn 134 Ser (Figura 37). Además, también se ve reducido el rango de energía de unión del sustrato L-glutamina dentro del sitio canónico que podría ocasionar por tanto una reducción de la entropía y por ello de la afinidad de unión (Figura 38 - C).

Por el contrario, la mutación no provocaba alteraciones significativas en el rango de energía de unión para el sustrato L-triptófano (Figura 38 - D), razón por la cual el mutante Asn 134 Ser no altera el transporte de este sustrato (Figura 37). Finalmente, la mutación no provocaba alteraciones significativas en el rango de energía de unión para el sustrato glicina (Figura 38 - A) que pudieran explicar el descenso del transporte de glicina por este mutante.

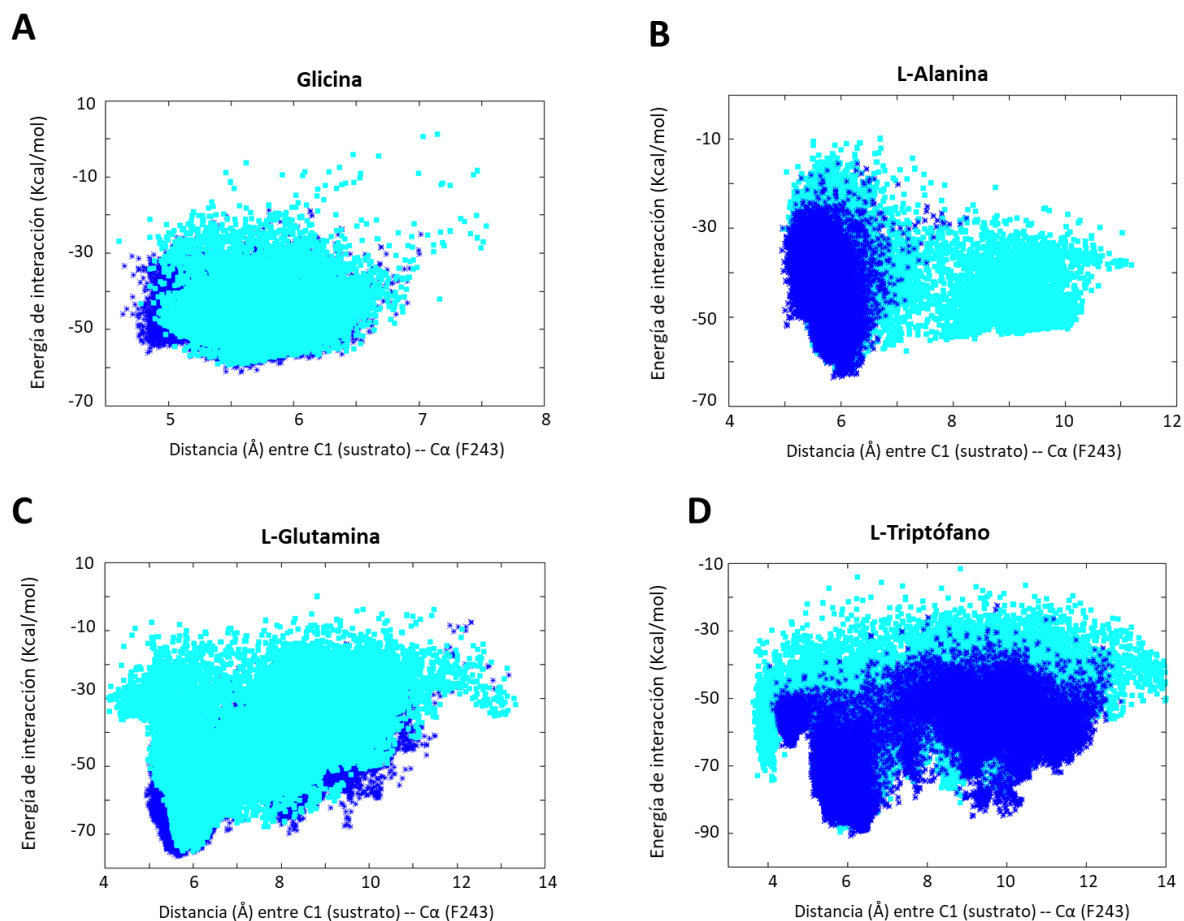


Figura 38: Simulación PELE de la unión de los sustratos glicina, L-alanina, L-glutamina y L-triptófano a LAT2 humano en conformación abierta hacia el citosol, salvaje y mutante Asn 134 Ser. Las simulaciones realizadas en LAT2 salvaje se muestran en azul oscuro y aquellas realizadas en el mutante Asn 134 Ser en azul cian. Estas gráficas muestran las energías de interacción (en Kcal/mol) para las distintas poses de los sustratos indicados frente a la distancia entre el carbono 1 (del grupo carboxilo) del sustrato y el carbono α (carbonilo de los grupos CO) del residuo Phe 243 (Armstrong). Cada punto en la gráfica da lugar a una pose del sustrato dentro del sitio de unión. Si la distancia medida se encuentra alrededor de los 6 Å, la pose corresponde al sitio de enlace canónico y por tanto no es considerado un movimiento significativo. Se realizaron 160.000 pasos de simulación PELE Monte Carlo por condición (aproximadamente 55.000 modos de unión muestreados). A) Glicina, B) L-alanina, C) L-glutamina y D) L-triptófano.

4.3.2. Residuos implicados en la pérdida auditiva asociada a la edad

Hasta hace pocos años no se conocía ninguna patología asociada con la proteína de estudio LAT2, pero recientemente se identificaron una serie mutaciones en el gen humano de LAT2 (*SLC7A8*) asociadas a la pérdida auditiva asociada a la edad (ARHL) (Espino-Guarch *et al.*, 2018).

La relación entre los mutantes encontrados de LAT2 y la ARHL no es directa, aunque en ciertos pacientes se hayan descrito tales mutaciones, estas no son causantes directas ya que la ARHL es multifactorial. No obstante, resulta de gran interés para entender los mecanismos moleculares del funcionamiento de LAT2 estudiar las mutaciones descritas en el gen de LAT2 humano que causan pérdida de función.

Dos de las cuatro mutaciones identificadas (Val 460 Glu y Thr 402 Met) muestran una reducción casi completa de la actividad de transporte de L-alanina y L-tirosina (Espino-Guarch *et al.*, 2018), pero en tal estudio no se pudo dar explicación ni describir las bases moleculares causantes de estos defectos.

La información estructural obtenida tras el estudio por microscopía electrónica permite el entendimiento del perfil de sustrato de LAT2 y de las bases moleculares por las que una mutación alejada del sitio de unión al sustrato podría afectar a la actividad transportadora de LAT2, objetivo al que nos hemos dedicado bajo el presente epígrafe.

Por tanto, el mapeo de tales mutaciones no solo permitía saber su localización exacta sino también estudiar los mecanismos moleculares que puedan tener estos residuos mutados para producir pérdida de actividad de la proteína.

4.3.2.1. Mutación Val 460 Glu

El residuo Val 460 se encuentra en la cara citoplasmática del TM12, orientándose la cadena lateral hacia las cadenas alifáticas de los lípidos de la membrana (Figura 39). Al encontrarse los dominios transmembranas 11 y 12 fuera del plegamiento de pseudo-simetría doble inversa 5 + 5 siempre se había sugerido que al tener estos dominios menor grado de conservación (su disposición respecto al centro de la proteína es algo variable entre las proteínas resueltas) tendrían un papel menos importante en la función transportadora. La localización de este mutante en el TM12 sugiere que estos TMs también poseen una función clave para el correcto funcionamiento del transportador.

El dominio TM12 se encuentra compuesto por unas ocho vueltas de hélices formadas por residuos cuyas cadenas laterales son por lo general hidrófobas. En este ambiente, si los residuos dentro de la hélice transmembrana se cargan se reduciría la estabilidad de la hélice pudiendo incluso inhibirse su inserción en la bicapa lipídica.

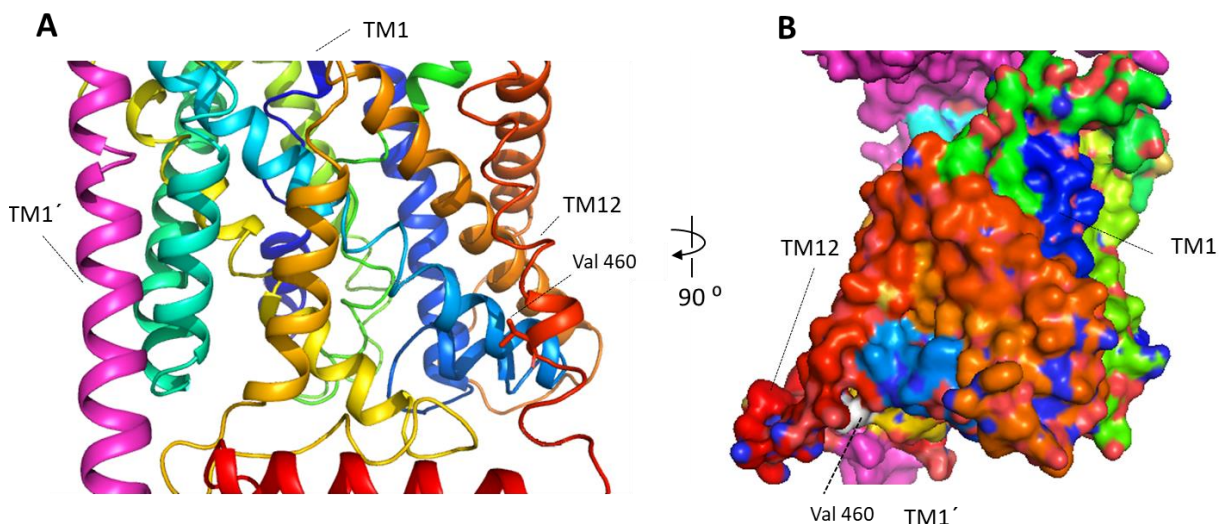


Figura 39: Localización del residuo Val 460. Los códigos de color son los mismos que para las figuras anteriores, con los átomos de nitrógeno coloreados en azul y los de oxígeno en rojo. A) Representación de los TMs de LAT2 y de 4F2hc en forma de α -hélices con el residuo de Val 460 mostrado en forma de *stick*. B) Representación en superficie de LAT2 y el dominio transmembrana de 4F2hc. El residuo de Val 460 está coloreado en blanco para mejorar su visibilidad.

En este sentido, está justificado que el mutante Val 460 Glu mostrara una expresión de proteína inferior a la forma LAT2 nativa, así como una localización alterada al ser la proteína retenida en el retículo endoplasmático (Espino-Guarch *et al.*, 2018). Por tanto, el cambio de un aminoácido neutro apolar (valina) por un aminoácido ácido (ácido glutámico) ocasionaría una reducción en la estabilidad de la hélice alterando su correcta inserción en la membrana plasmática.

Con el objetivo de conocer si este cambio impedía la inserción de la proteína en la membrana se calculó una predicción de la diferencia aparente de energía libre (ΔG) de ambas secuencias de LAT2 humano, salvaje y mutante Val 460 Glu, para su inserción en la membrana (Hessa *et al.*, 2007).

Los valores de ΔG obtenidos fueron de -0,291 y 1,359 Kcal/mol para el tipo salvaje y el mutante Val 460 Glu, respectivamente. Estos resultados tan diferentes sugieren que la inserción de la proteína mutante en la membrana del retículo endoplasmático mediada por el translocón Sec61 estaría claramente alterada, explicando de esta manera la falta de localización en membrana plasmática y por ende de actividad de transporte.

4.3.2.2. Mutación Thr 402 Met

Otro de los residuos que se encuentra mutado en pacientes con ARHL y que muestra una reducción casi completa de la actividad transportadora es la Thr 402 (Espino-Guarch *et al.*, 2018), residuo situado hacia el extremo intracelular del TM10. En el volumen de potencial electrostático de LAT2 humano obtenido en el transcurso de esta tesis se observaban una serie de densidades que conectan el residuo Thr 402 con otras regiones de la proteína (Figura 40 - A y B).

En este sentido, se observó una densidad correspondiente a un puente de hidrógeno entre los residuos Thr 402 y Tyr 93 y otra menos intensa entre los residuos Tyr 93 y Asp 106. La existencia de conexiones entre estos residuos podría estabilizar esta región de la proteína mediante conexiones entre las zonas citoplasmáticas del TM10, el TM2 y el bucle intercelular 1 (IL por sus siglas en inglés *intercellular loop*), razón por la cual una mutación que alterara la formación de estos enlaces desestabilizaría esta zona pudiendo afectar a la correcta actividad transportadora, siendo así una posible base molecular de la patología asociada al mutante Thr 402 Met.

Para comprobar si la existencia de puentes de hidrógeno entre los residuos anteriormente mencionados resultaba relevante para la actividad de LAT2 se caracterizaron funcionalmente los siguientes mutantes; Thr 402 Ala, Tyr 93 Ala y Asp 106 Ala.

El mutante Thr 402 Ala (mutación al residuo equivalente en LAT1) mostraba un perfil de transporte de todos los sustratos probados casi idéntico al de la forma salvaje (Figura 40 - C, rojo). Por tanto, la ausencia de un puente de hidrógeno entre el residuo Thr 402 (TM10) y el residuo Tyr 93 (TM2) no explicaba por sí solo el efecto del mutante Thr 402 Met, mostrando además que tal conexión no resultaba esencial para la actividad de transporte de LAT2. No obstante, este ensayo de transporte mostraba un resultado curioso, es el que hace referencia al L-triptófano cuyo transporte aumentaba significativamente.

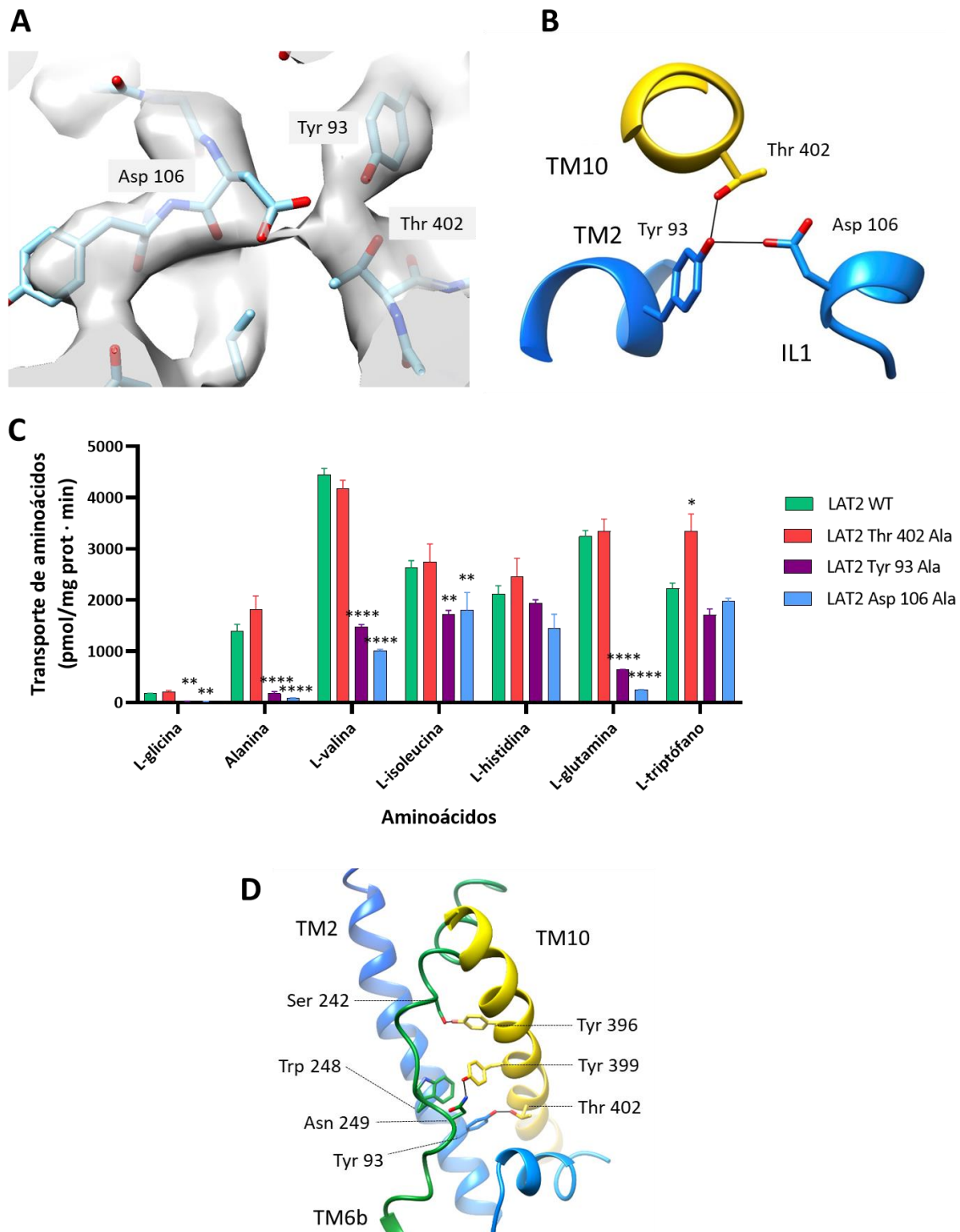


Figura 40: Tríada formada por Tyr 93, Asp 106 y Thr 402. A) Detalle de la densidad (en gris) de la triada de los residuos Tyr 93, Asp 106 y Thr 402 de 4F2hc/LAT2 con ajuste del modelo. B) Detalle de la triada de los residuos Tyr 93, Asp 106 y Thr 402 de 4F2hc/LAT2 mostrando los posibles puentes de hidrógeno. C) Ensayo de transporte de mutantes de 4F2hc/LAT2 para los residuos Tyr 93, Asp 106 y Thr 402 mostrado en pmol por mg de proteína por minuto. Los transportes se han realizado con los sustratos glicina, L-alanina, L-valina, L-isoleucina, L-glutamina, L-histidina y L-triptófano marcados radiactivamente (^3H) a $10 \mu\text{M}$ en células HeLa. Los datos se expresan como media \pm s.e.m. de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por cuadruplicado. D) Región implicada en la mutación Thr 402 Met, TM2, TM10 e IL1 y la implicación sobre el sitio de unión al sustrato, los contactos que mantienen la conformación de la región desarrollada del TM6. Los códigos de color para las hélices y residuos son los que se utilizan en las figuras anteriores.

El cambio de una treonina a una metionina (un residuo en la posición 402 más largo) podría producir problemas estéricos en la zona entre los TM10, TM2 e IL1. Tal metionina se podría posicionar entre los residuos Tyr 93 y Asp 106, los cuales se encuentran a una distancia de puente de hidrógeno (Figura 40 - B). Si la Met 402 se posicionara sobre este posible puente de hidrógeno bloquearía una conexión entre el TM2 y el IL1.

Así, se realizaron ensayos de transporte, con los mutantes Tyr 93 Ala y Asp 106 Ala para comprobar el efecto de ambos mutantes sobre la actividad de transporte de LAT2 (Figura 40 - C, morado y azul). Estos ensayos mostraron una reducción completa de la actividad de transporte de [³H] glicina y casi completa de la captación de [³H] L-alanina y [³H] L-glutamina; teniendo curiosamente un efecto mínimo en el transporte de los aminoácidos grandes probados (Figura 40 - C). El perfil de selectividad mostrado por ambos mutantes era prácticamente idéntico entre ellos y además se parecía al perfil mostrado por LAT1 (Meier *et al.*, 2002).

Estos resultados sugerían que la interacción entre los residuos Asp 106 y Tyr 93 eran esenciales para el transporte de aminoácidos neutros pequeños y L-glutamina en LAT2.

Los residuos (Tyr 93 y Asp 106) se encuentran alejados del sitio de unión al sustrato. En este sentido, el TM6 presentaba varios contactos con residuos adyacentes en el espacio que estabilizaban la conformación de la zona desenrollada de este dominio transmembrana (Figura 31 - B), esencial para el reconocimiento del sustrato. Entre ellos, el Trp 248 del TM6 mostraba una interacción de tipo π - π con la Tyr 93 del TM2 (Figura 31 - B), dando pie a hipotetizar que la interacción entre ambos residuos podría regular la conformación del TM6, modificando de esta manera el perfil de selectividad de sustrato del transportador hLAT2.

Por tanto, el enlace de apilamiento π - π entre Tyr 93 y Trp248 podría ser necesario para la función de transporte, regulando la conformación del TM6 y de esta manera, participando en la selectividad del transportador (Figura 40 - C).

Con el objetivo de estudiar la interacción entre los residuos Trp 248 y Tyr 93 y cómo afectaría la mutación Tyr 93 Ala a la posición del residuo Trp 248 y a la conformación de la zona desenrollada del TM6 se realizó un análisis de dinámica molecular (MD según sus siglas en inglés *molecular dynamics*) del mutante Tyr 93 Ala en presencia de sustrato (alanina o L-triptófano), así como de la forma salvaje de LAT2 para comparar los resultados (Figura 41).

El análisis de las distancias entre los residuos Ser 56 del TM1 y Gly 246 del TM6, así como las distancias entre estos residuos y el sustrato mostraban grandes diferencias, especialmente al comparar los resultados en presencia de L-alanina como sustrato (Figura 41 - A-C). En este sentido, los análisis de MD mostraban una disposición y forma del segmento desenrollado del TM6 significativamente diferente entre la proteína salvaje y la mutada.

Para el caso particular de la L-alanina, en la forma salvaje, el sustrato contactaba con las regiones desenrolladas del TM1 y TM6 del sitio de unión a través de sus grupos α -amino y carboxilo (como se ha mostrado en la Figura 32 - B), mientras que, en el mutante, el sustrato no era capaz de interactuar de forma simultánea con ambos dominios transmembrana.

De hecho, la MD mostraba que el sustrato L-alanina no podía interactuar a través del grupo α -amino con el grupo carboxilo del residuo Gly 246 (Figura 41 - B), que como hemos demostrado

anteriormente resulta ser clave para la selectividad de sustrato en LAT2 para aminoácidos pequeños. Así, el grupo amino de L-alanina se desprende de Gly 246 en TM6 (Figura 41 - B) y después, la conexión entre el carboxilato de L-alanina con TM1 se pierde (Figura 41 - C).

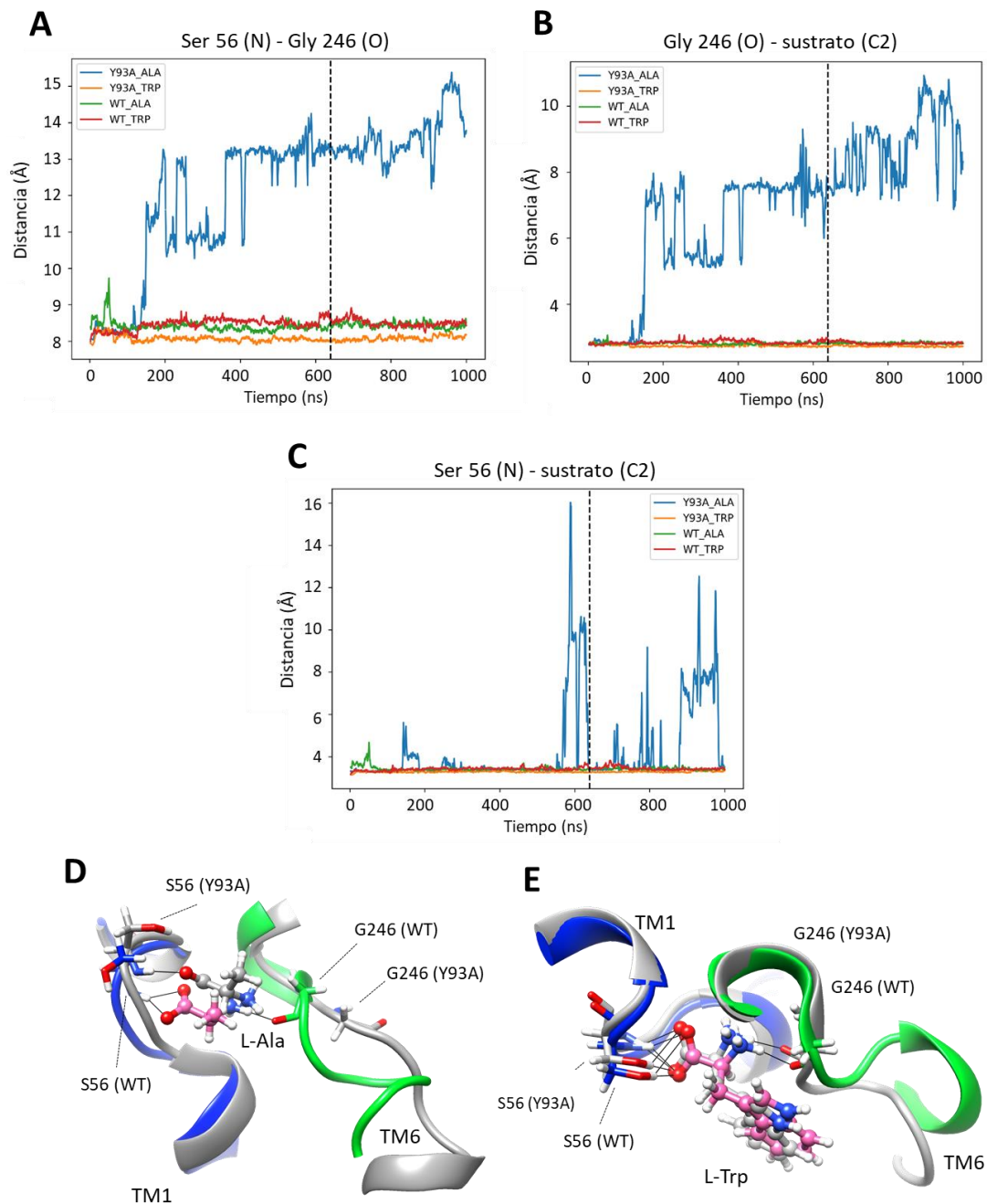


Figura 41: Análisis de dinámica molecular de 4F2hc/LAT2 humano, forma salvaje y mutante Tyr 93 Ala, unido a L-alanina o L-triptófano, residuo Gly 246 - sustrato. A), B) y C) Evolución de la distancia del átomo N de la serina 56 y el C2 del sustrato en la forma salvaje en presencia del sustrato L-alanina (verde) o L-triptófano (rojo) y el mutante Tyr 93 Ala en presencia del sustrato L-alanina (azul) o L-triptófano (naranja). Las líneas verticales indican el momento de cada trayectoria de las MD (a los 640 ns) de donde se han tomado las estructuras que se muestran en los paneles D y E. D) Estructura de la trayectoria de la MD del mutante Tyr 93 Ala en color y de la forma salvaje en gris, en presencia de L-alanina. E) Estructura de la trayectoria de la MD del mutante Tyr 93 Ala en color y de la forma salvaje en gris, en presencia de L-triptófano. El patrón de colores es el mismo que en las figuras anteriores.

La falta de interacción ocasionaba que el sustrato de L-alanina posea mayor movilidad en el sitio de unión debilitando la unión canónica de L-alanina, reduciendo así la actividad de transporte de este sustrato (Figura 40 - C). El desprendimiento de L-alanina del mutante Tyr 93 Ala ocasiona que la distancia entre las regiones desenrolladas del TM1 y del TM6 aumente (Figura 41 - A) mostrando una clara deformación del lugar de unión del sustrato.

En el caso de las dinámicas realizadas en presencia de L-triptófano, en ambos casos (salvaje y mutante) el sustrato interaccionaba de forma simultánea con ambas regiones (Figura 41 - A-C). Esta diferencia en la interacción de los sustratos con la proteína mutante explicaría la diferente selectividad de sustrato observada para ambas proteínas.

Estos resultados de MD del mutante Tyr 93 Ala en presencia del sustrato L-triptófano sugiere que la cadena lateral de los sustratos voluminosos establecería interacciones hidrofóbicas con residuos del sitio de unión (como por ejemplo Asn 134), o mediante interacciones hidrofóbicas con los residuos Gly 246 y Gly 247 del TM6, estabilizando así su posición canónica en el sitio de unión (Figura 41 - A, C y E).

Por tanto, a través de estos enlaces adicionales que le permiten adquirir la pose canónica se evitaría la migración del residuo Gly 246 promovida por el mutante Tyr 93 Ala. De esta forma, se justificaría por qué el mutante Tyr 93 Ala no afecta a la actividad de los sustratos grandes, pero sí a la de los pequeños (Figura 40 - C).

El análisis de MD de la forma salvaje mostraba que el residuo Trp 248 se movía de manera coordinada al residuo Tyr 93 (con el cual está unido mediante una interacción de apilamiento π - π). De hecho, la distancia entre los residuos Tyr 93 y Trp 248 era estable con ambos sustratos en la proteína salvaje (Figura 42 - A).

Por el contrario, esta distancia se alteraba en el mutante Tyr 93 Ala, aunque de forma más drástica cuando estaba unido al sustrato de L-alanina que al de L-triptófano (Figura 42 - A). En el mutante Tyr 93 Ala con L-alanina unida, el residuo Gly 246 modifica su posición y se disocia del sustrato, y el Trp 248 ocupa el lugar de la Tyr 93 mutada a Ala (Figura 42 - B). Por otro lado, los análisis con L-triptófano unido conserva la posición del residuo Gly 246 unido al sustrato en la región desenrollada del TM6 y el Trp 248, estabilizándose en una posición más alejada del residuo Tyr 93 (Figura 42 - C).

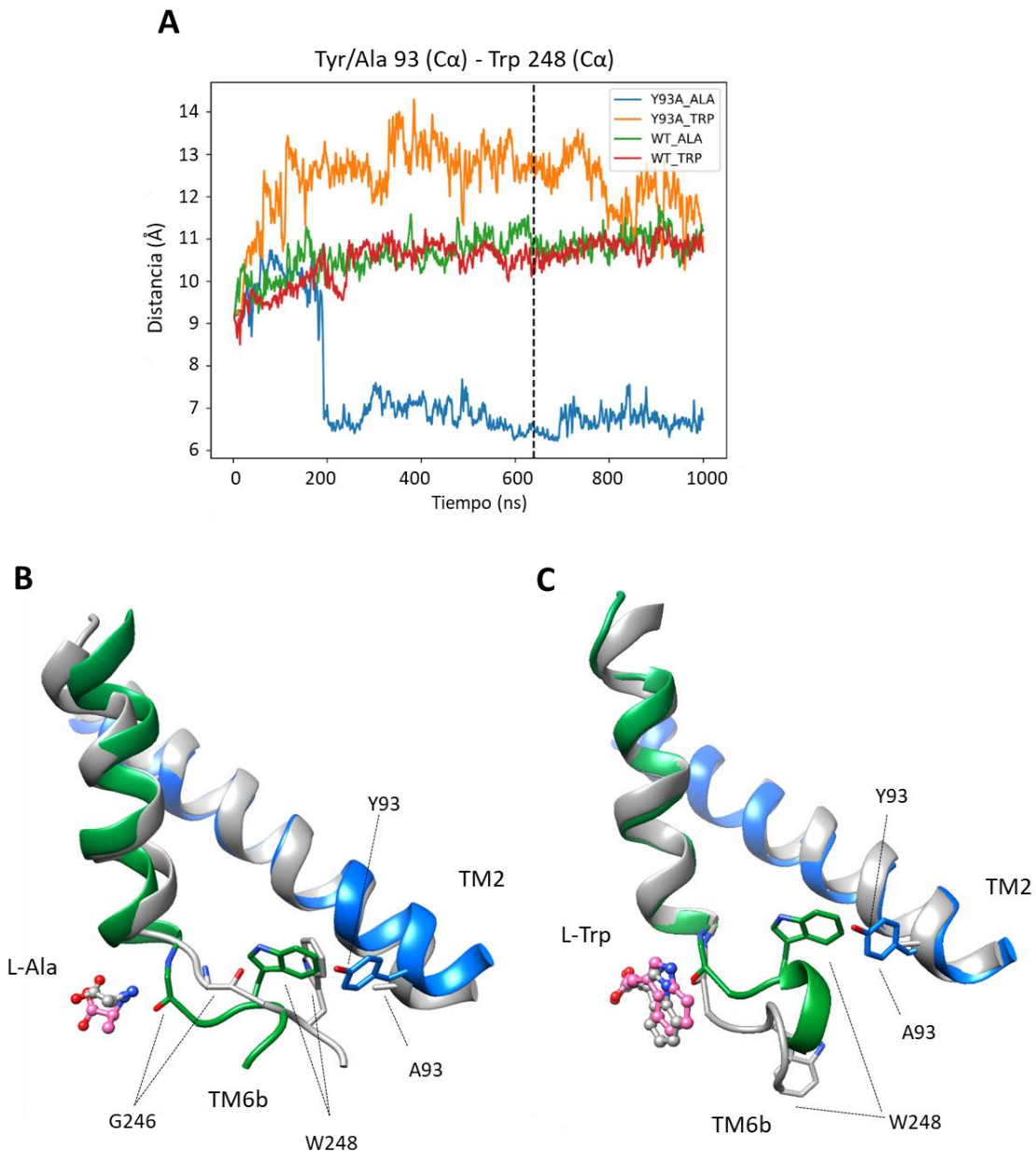


Figura 42: Análisis de dinámica molecular de 4F2hc/LAT2 humano, forma salvaje y mutante Tyr 93 Ala, unido a L-alanina o L-triptófano, Tyr/Ala 93 - Trp 248. A) Evolución de la distancia del átomo C α de la posición 93 y el átomo C α del residuo Trp 248 para la forma salvaje en presencia del sustrato L-alanina (verde) o L-triptófano (rojo) y el mutante Tyr 93 Ala en presencia del sustrato L-alanina (azul) o L-triptófano (naranja). La línea vertical muestra el momento de cada trayectoria de las MD (a los 640 ns) que se ha captado y mostrado para los paneles B y C. B) Estructura de la trayectoria de la MD del mutante Tyr 93 Ala en color y de la forma salvaje en gris en presencia de L-alanina. El patrón de colores es el mismo que en las figuras anteriores. C) Estructura de la trayectoria de la MD del mutante Tyr 93 Ala en color y de la forma salvaje en gris en presencia de L-triptófano.

DISCUSIÓN

Curiosamente, cada transportador heteromérico de aminoácidos (HAT) evolucionó para especializarse en el transporte de un subconjunto de sustratos y esta especialización es la que impulsa las diferencias significativas en las funciones fisiológicas de cada miembro de la familia (Errasti-Murugarren y Palacín, 2021). Es importante destacar que las alteraciones en la especificidad del sustrato en algunos de estos transportadores causadas por mutaciones están asociadas con algunas enfermedades humanas (Knöpfel *et al.*, 2019; Espino-Guarch *et al.*, 2018). Sin embargo, las bases moleculares de la variada selectividad de sustrato mostrada por los diferentes HATs no se conoce del todo.

Aquí proporcionamos un avance significativo en nuestra comprensión de la base estructural y molecular que define la especificidad del sustrato en los transportadores HAT utilizando como punto de partida la estructura atómica de 4F2hc/LAT2 humano en la conformación apo orientada hacia adentro determinada por crio-ME.

Los estudios complementarios de caracterización funcional de diversos mutantes, así como los análisis *in silico*, nos han permitido definir, no solo residuos particulares esenciales en la diferente selectividad por aminoácidos neutros, sino también mostrar, por primera vez para los HATs, la existencia de regiones alejadas del propio sitio de unión al sustrato con un papel en la modulación de la selectividad de sustrato.

No obstante, la resolución de la estructura de 4F2hc/LAT2 en conformación abierta hacia adentro no completa el estudio estructural de este transportador, puesto que conocer la estructura en una conformación abierta hacia afuera permitiría usarla para la búsqueda y diseño o mejora de moléculas inhibitoras específicas con aplicaciones médicas. En esta línea, recientemente se ha definido LAT2 como una posible diana terapéutica para el tratamiento de cáncer de páncreas, ya que su sobreexpresión promueve proliferación, inhibe la apoptosis, activa la glicolisis y altera el metabolismo de glutamina a través de la vía mTOR (Feng *et al.*, 2018).

La proteína 4F2hc/LAT2 es un transportador de aminoácidos neutros y L-glutamina (Pineda *et al.*, 1999; Rossier *et al.*, 1999; Meier *et al.*, 2002) que se localiza principalmente en el intestino delgado y los túbulos renales por lo que tiene una alta implicación en la reabsorción de aminoácidos en estos tejidos (del Amo *et al.*, 2018; Kanai *et al.*, 2001; Rossier *et al.*, 1999; Vilches *et al.*, 2018). Sin embargo, su disfunción no ha sido asociada con ninguna anomalía relacionada con la mala-absorción o defectiva reabsorción de aminoácidos ya que existen otros transportadores, como TAT1 o 4F2hc/y+LAT1, que compensan su función (Bauch *et al.*, 2003; Braun *et al.*, 2011, Vilches *et al.*, 2018).

Aparte de su localización en los tejidos anteriormente mencionados, la expresión de LAT2 en determinadas células resulta esencial, es el caso de aquellas que forman el cuerpo ciliar del ojo, la cóclea del oído, la placenta o el cerebro (Braun *et al.*, 2011; del Amo *et al.*, 2018; Rossier *et al.*, 1999; Kanai *et al.*, 2001; Widdows *et al.*, 2015; Knöpfel *et al.*, 2019; Espino-Guarch *et al.*, 2018).

Esta localización específica en el cerebro indica que la ausencia del transportador puede conducir potencialmente a trastornos neurológicos; no obstante, la falta de función de LAT2 solo se ha visto asociada a cataratas (Knöpfel *et al.*, 2019), pérdida auditiva asociada a la edad (Espino-Guarch *et al.*, 2018) y autismo, probablemente a través de restringir la disponibilidad de aminoácidos esenciales en el cerebro en desarrollo (Cascio *et al.*, 2020), como es el caso de 4F2hc/LAT1 (Tarlungeanu *et al.*, 2016).

En este sentido, la resolución de la estructura de este transportador nos ha permitido aproximar, por primera vez, las bases moleculares de las mutaciones en LAT2 humano asociadas a enfermedad.

No obstante, aunque esta tesis se haya desarrollado alrededor del estudio de LAT2, el resto de HATs candidatos analizados durante su trascurso también son importantes dianas de estudio. Desde y+LAT1 y su implicación en lisinuria con intolerancia proteica (LPI) (Borsani *et al.*, 1999; Torrents *et al.*, 1999), a y+LAT2 y su capacidad de compensar la acción del sistema de transporte y+ en pacientes con LPI (Dall'Asta *et al.*, 2000), pasando por xCT que debido a su implicación con el ciclo redox y la defensa celular antioxidativa se ha definido en los últimos años como una posible diana tumoral (Reddy *et al.*, 2008; Seiler *et al.*, 2008; Takeuchi *et al.*, 2013).

Los resultados mostrados en esta tesis sugieren que, a pesar de no resultar óptimos para entrar en el proceso de resolución estructural, todos ellos tienen margen de mejora pudiéndose convertir en potenciales buenos candidatos para estudios estructurales en un futuro.

Para resolver la estructura de una proteína, esta se debe producir en cantidad suficiente, siendo esencial expresarla de una manera fidedigna en un sistema heterólogo y purificarla del modo que mantenga el mismo plegamiento y conformación tridimensional que tendría en un sistema nativo. Los sistemas de expresión utilizados de manera más amplia debido a su coste y rapidez son los bacterianos. Sin embargo, dependiendo del origen de la proteína que se quiera expresar, la falta de modificaciones postraduccionales, la ausencia de orgánulos subcelulares o la ausencia de determinadas proteínas con las que formar complejos, pueden provocar un plegamiento incorrecto y la agregación de la proteína de interés.

Como se ha detallado en la Introducción, mientras que las subunidades ligeras no muestran ninguna modificación post-traducciona, la subunidad pesada 4F2hc tiene hasta cuatro regiones de glicosilación (Fort *et al.*, 2007) lo cual puede conferir heterogeneidad entre las subunidades. La eliminación o reducción de la glicosilación es una estrategia recomendada en los estudios de cristalografía al incrementar la homogeneidad de la muestra como se ha demostrado con los transportadores GLUT1 y GLUT4 (Alisio y Mueckler, 2010). Por su lado, el éxito en la resolución de una estructura a través de crio-ME también se basa en la homogeneidad de la muestra (cuanto mayor sea el número de partículas idénticas, mayores resoluciones se podrán alcanzar) (Serna, 2019).

Sin embargo, las modificaciones post-traduccionales que pueda requerir la proteína pueden tener cierta implicación en su correcto plegamiento y función pudiendo de esta forma disminuir sus niveles de expresión, como se ha observado para el receptor LILR (Terry *et al.*, 2013) o el transportador de serotonina (Tate *et al.*, 2003). Por tanto, cabe la posibilidad de que la ausencia de glicosilaciones pudiera tener un efecto negativo en la expresión y/o estabilidad de la proteína en estudio.

No obstante, la correcta expresión de una forma no glicosilada de 4F2hc humana en *Pichia pastoris*, capaz de formar heterodímeros correctamente (Costa i Torres, 2012) abriría la puerta a la utilización de sistemas de expresión deficientes en glicosilación como resultan ser los sistemas bacterianos. En esta línea, la subunidad ligera LAT1 ya ha sido expresada en células de *Escherichia coli* (Indiveri *et al.*, 2013); no obstante, el éxito parcial obtenido y la falta de determinación de la formación del heterodímero de manera correcta (Indiveri *et al.*, 2013) dejó fuera de debate la posibilidad de expresar el heterodímero de interés en *E. coli*.

No obstante, a pesar de que existieran varias publicaciones que proponían que sistemas de expresión como *Pichia pastoris* eran capaces de producir transportadores heteroméricos de aminoácidos de procedencia humana con relativa calidad (Meury *et al.*, 2014; Rossel *et al.*, 2014; Costa *et al.*, 2012), las proteínas cuya estructura queríamos determinar fueron finalmente expresadas en células humanas debido a los satisfactorios resultados de Lee y Yan en la resolución de 4F2hc/LAT1 (Yan *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2019).

Sin embargo, los autores de la estructura de 4F2hc/LAT1 emplearon sistemas de expresión de mamíferos que presentaban diferencias significativas en cuanto a modificaciones post-traduccionales; Lee empleó células con deficiencia de glicosilación mientras que Yan empleó células cuyas modificaciones post-traduccionales no estaban alteradas (Yan *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2019).

Nosotros nos planteamos analizar la calidad de la proteína obtenida al expresarla en ambos tipos de células (células HEK293-6E y células HEK293-MGA) ya que existen multitud de artículos con diferentes puntos de vista respecto al efecto de las glicosilaciones en la expresión y purificación de diversas proteínas de membrana (Terry *et al.*, 2013; Tate *et al.*, 2003; Rossel *et al.*, 2014; Costa *et al.*, 2012).

El acoplamiento de una molécula de GFP a la región codificante de la proteína de interés es una estrategia ampliamente utilizada en nuestro laboratorio (Álvarez-Marimón, 2014; Errasti-Murugarren *et al.*, 2019) que facilita la tarea de optimización tanto de las condiciones de expresión como de la purificación de la proteína que tiene la GFP fusionada (Kawate *et al.*, 2006; Cai *et al.*, 2020), tareas que suelen ser largas y complicadas (Sonoda *et al.*, 2011; Kotov *et al.*, 2019).

De hecho, el análisis de la fluorescencia total expresada en las células, junto con técnicas como los ensayos UDS (Gutmann *et al.*, 2007) y los análisis por FSEC (Kawate y Gouaux, 2006), permite realizar un cribado rápido del nivel de expresión (Drew *et al.*, 2008), de la eficiencia de solubilización en diversos detergentes o de la estabilidad de la proteína, respectivamente, y sin necesidad de purificar la proteína (Kawate *et al.*, 2006; Cai *et al.*, 2020).

Estos análisis determinaron que las células HEK293-MGA presentaban un perfil de exclusión molecular más homogéneo en los diferentes detergentes probados que las células con glicosilación estándar (Figura 13), corroborando que la ausencia de glicosilaciones incrementaba la homogeneidad de la muestra (Alisio y Mueckler, 2010). Sin embargo, su nivel de expresión fue muy inferior a las mismas proteínas expresadas sin alteración de la glicosilación lo que muestra que, aunque la estabilidad de la proteína final fuera superior, las proteínas sin glicosilaciones no eran procesadas del mismo modo por la célula dificultando su producción (Terry *et al.*, 2013; Tate *et al.*, 2003).

Estos resultados sugieren que si bien las células HEK293-MGA no resultaban un sistema ideal en términos de cantidad de proteína expresada, la calidad de la misma sugiere plantearse la posibilidad de optimizar este sistema de expresión para proyectos futuros en donde las células estándar no confieran a las proteínas de estudio suficiente calidad como para resolver su estructura.

En el mismo sentido, las optimizaciones realizadas para aumentar la cantidad de células transfectadas y la cantidad de expresión de cada una de ellas se basaban en el aumento de una fluorescencia que finalmente se determinó que no era debida a la proteína 4F2hc/LAT2-GFP. Así, una correcta construcción del plásmido de interés que limitara la expresión de esta molécula de GFP suelta facilitaría la interpretación de los resultados derivados de la expresión de los ensayos UDS, donde los únicos datos en los que nos basamos son los de fluorescencia.

Sin embargo, la expresión de GFP suelta y la expresión de la proteína de interés podría estar relacionada de tal modo que un aumento de la fluorescencia total significaría un aumento tanto de la GFP como de 4F2hc/LAT2-GFP. No obstante y a pesar de que la fluorescencia no indique de manera exacta la cantidad de proteína que produce una célula, los estudios realizados en células nos han aportado conocimientos muy importantes; entre ellos, la determinación de las condiciones óptimas de transfección y expresión.

A continuación, los análisis por FSEC nos permitieron no solo seleccionar el sistema de expresión idóneo, sino también las proteínas candidatas (4F2hc/LAT2 y 4F2hc/y+LAT1) y las mejores condiciones para su purificación (DDM/CHS y digitonina). La calidad de una muestra se debe a múltiples factores, desde el propio sistema de producción proteica, el pH del medio, la presencia de sustancias estabilizadoras como el glicerol o las micelas de detergente que rodean la proteína.

La cantidad de la proteína obtenida y el perfil de SEC para 4F2hc/LAT2 era mucho mejor que para el caso de 4F2hc/y+LAT1. Además, en ambos casos se observó que la proteína tenía tendencia a agregarse y a disociarse en sus dos subunidades con la combinación DDM/CHS. No obstante, a pesar de que el resultado no fuera satisfactorio, había posibilidades de optimización empleando moléculas estabilizadoras.

Como los transportadores HAT tienden a disociarse durante la homogenización de la muestra, es recomendable usar N-etil maleimida (NEM) para bloquear la acción de las enzimas disulfuroisomerasas que pueden participar en este proceso (Fernández *et al.*, 2006). Otra de las estrategias es emplear un 10% de glicerol para optimizar la estabilidad de la proteína, alternativa de uso común en nuestro laboratorio (Errasti-Murugarren *et al.*, 2019). El glicerol es una molécula hidrosoluble que tiene la capacidad de inhibir la agregación de las proteínas al estabilizar el plegamiento proteico y evitar que las superficies hidrofóbicas interactúen entre sí (Vagenende *et al.*, 2009). No obstante, si tal muestra va a ser usada para preparar rejillas de microscopía, el uso de glicerol complica que las rejillas se preparen adecuadamente y reduce el contraste (Drulyte *et al.*, 2018), por lo que, aunque su uso esté contraindicado también puede ser eliminado antes de preparar tales rejillas.

En definitiva, a pesar de que la muestra obtenida con la combinación DDM/CHS podía optimizarse, los buenos resultados obtenidos de la proteína 4F2hc/LAT2 en digitonina cerró tal línea de investigación.

Los resultados obtenidos han mostrado que los detergentes seleccionados, DDM y digitonina, han aportado diferencias tanto de eficiencia de solubilización como de homogeneidad. En este sentido, al mostrar la digitonina una eficiencia de solubilización más baja que el DDM, en uno de los estudios de 4F2hc/LAT1 se siguió la estrategia de emplear DDM para la solubilización y a continuación realizar un cambio de detergente a digitonina (Lee *et al.*, 2019). De este modo se aprovecharía la capacidad solubilizadora del DDM y la estabilizadora de la digitonina, suponiendo además una reducción del consumo de digitonina.

El primer detergente testado, el DDM, es ampliamente utilizado en el estudio estructural de las proteínas transmembranales (Jungnickel *et al.*, 2018; Errasti-Murugarren *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2019; Garaeva *et al.*, 2019). Es un detergente largo con una CMC (por sus siglas en inglés *critical micelle*

concentration, que se define como la concentración de detergentes por encima de la cual se forman espontáneamente las micelas) muy pequeña (0,0087%) (Chae *et al.*, 2010), lo que quiere decir que la concentración de molécula en estado monomérico es muy baja, ocasionando que el intercambio de moléculas de DDM de la micela al medio sea lento (Stetsenko y Guskov, 2017).

Este hecho provoca que por encima de la CMC, la gran mayoría de moléculas de detergente se encuentren en forma de micelas. Si a este punto le añadimos que se trata de un detergente que da lugar a micelas de gran tamaño (Slotboom *et al.*, 2008; Strop *et al.*, 2005), es habitual obtener muestras con exceso de detergente, lo cual dificulta alcanzar una alta resolución tanto si el método usado para resolver la estructura es mediante cristalografía como si es por microscopía electrónica (Guan *et al.*, 2006; Kampiut *et al.*, 2021).

Por otro lado, la digitonina es un detergente que actualmente se está empleando en la resolución de una gran cantidad de proteínas por microscopía electrónica (Yan *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2020; Walter *et al.*, 2019) debido a los buenos niveles de estabilidad que aporta. La digitonina es un derivado del colesterol, razón por la cual no es requerida la adición de este como en el caso del detergente anterior. Además, cuenta con una CMC más alta (0,03%) (Baker *et al.*, 2015; Abeyrathne *et al.*, 2012) y un menor tamaño de micela (Chaptal *et al.*, 2015), que en conjunto reduce los problemas de exceso de detergente en las muestras purificadas con DDM/CHS.

Además, a diferencia de las muestras purificadas con DDM/CHS, el heterodímero en presencia de digitonina no se rompe en sus dos subunidades tras un proceso de congelación-descongelación, sugiriendo que la proteína resulta más estable en presencia de este detergente. Es por ello, que la digitonina fue el detergente de elección para los estudios estructurales presentados en la presente tesis.

A pesar de ello, la digitonina, al tratarse de un compuesto de origen natural (producida por la planta *Digitalis purpurea*), muestra variaciones importantes de un lote a otro, lo que puede complicar los procesos de puesta a punto de determinados protocolos. En este sentido, se ha observado que algunas purificaciones puntuales resultaban en proteínas totalmente inestables, lo que podría explicar el diferente resultado de estabilidad por parte de 4F2hc/y+LAT1 a pesar de mostrar un perfil de SEC bueno.

El protocolo de purificación con digitonina puesto a punto en esta tesis ha resultado en una aceptable cantidad de proteína que presentaba una buena estabilidad y excelente pureza. Sin embargo, según la fluorescencia medida a lo largo de la purificación, solo se purificaba el 30% de la proteína inicial, habiendo camino de mejora mediante la identificación de los pasos menos eficientes. En este sentido destacan por un lado la baja eficiencia de solubilización (apenas un 40%) y por otro lado la gran cantidad de proteína perdida durante el proceso de purificación con la resina Streptactin. Si cierta señal de fluorescencia no se unía a la resina Streptactin era porque no posee etiqueta de Strep, correspondiendo teóricamente a LAT2 suelto (con GFP y etiqueta de histidinas), a GFP sola (etiqueta de histidinas) o a un heterodímero formado por la proteína LAT2-GFP-His10x sobreexpresada y 4F2hc endógeno. La proteína 4F2hc se expresa en gran cantidad en las células sin unirse a ninguna subunidad ligera (Fernández *et al.*, 2006). En esta línea, el análisis por WB identificó tanto heterodímeros como moléculas de GFP sueltas (causante de la señal de fluorescencia no correspondiente a LAT2) en la muestra procedente de la fracción no unida a la resina Streptactin.

Por otro lado, y debido a que se ha localizado heterodímero en el volumen no unido a la resina Streptactin, este podría estar formado por un Strep-4F2hc pero que no se ha unido correctamente a la resina Streptactin. Una baja eficiencia de unión podría deberse a la isoforma de 4F2hc empleada es la más corta en el extremo donde está fusionada la etiqueta de Strep (extremo N-terminal), por lo que tal vez no sea del todo accesible para la resina. Existen varias isoformas de la proteína 4F2hc/LAT2 que depende del tipo celular pero que se desconoce la implicación fisiológica que poseen; Lee y Yan emplearon la isoforma b (NP_001012680.1), más larga en este extremo que la empleada para este proyecto, isoforma f (NP_001013269.1).

Un aspecto fundamental asociado al sistema de expresión pasa por definir si la construcción de la proteína de interés expresada mantiene la actividad en el sistema en cuestión.

El análisis de la actividad de nuestra construcción en células eucariotas mostraba un perfil de actividad idéntico al previamente descrito para la isoforma humana (Rosell *et al.*, 2014). De igual manera, la proteína purificada y reconstituida en liposomas también mostraba actividad, corroborando que el proceso de purificación no había alterado la función del transportador.

En este sentido, estos ensayos de transporte mostraron una actividad máxima a las 3 horas desde el inicio del ensayo del aminoácido chequeado, en este caso L-valina, en los proteoliposomas que contenían 4F2hc/LAT2 y valina en su interior respecto aquellos proteoliposomas que no contenían aminoácido en su interior o liposomas no reconstituidos con proteínas (Figura 25 - A). La ausencia de actividad mostrada en los proteoliposomas sin aminoácidos en su interior, asemejándose a la actividad de los liposomas no reconstituidos, es un resultado característico de los transportadores del tipo intercambiador obligatorio (Errasti-Murugarren *et al.*, 2019; Rosell *et al.*, 2014; Reig *et al.*, 2007).

Nuestro resultado coincide con el mismo ensayo realizado en nuestro laboratorio con proteína 4F2hc/LAT2 solubilizada en DDM/CHS y cuyo ensayo de transporte con L-leucina marcada mostró puntos máximos de actividad a las 2 horas, equilibrándose el sistema a partir de las 3 horas (Rosell *et al.*, 2014).

De este modo podemos asegurar que la proteína purificada en digitonina y cuya estructura ha sido resuelta continuaba teniendo capacidad de transportar aminoácidos y que, por tanto, la disposición tridimensional de los dominios que la forman no había sido alterada.

Como resultado de la primera parte de la presente tesis, donde se trabajó en la purificación de 4F2hc/LAT2 humano, se consiguió suficiente cantidad de una proteína pura, estable y funcional que permitió la resolución de su estructura por criomicroscopía electrónica. La proteína fue resuelta en ausencia de sustrato en una conformación abierta hacia el citosol de manera similar a las estructuras de HATs humanos recientemente resueltas (Lee *et al.*, 2019; Yan *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2020a; Yan *et al.*, 2020b).

La resolución promedio del heterodímero fue de 3,7 Å sin embargo el punto fuerte de nuestra estructura radica en la región transmembranal de LAT2 que mostraba una resolución entre 2,5 y 3 Å, lo que nos confería la posibilidad de realizar un estudio preciso del sitio de unión al sustrato. El alcance de una resolución superior en el centro de LAT2 se debió a que durante el procesamiento de las imágenes se focalizó el centro de comparación en esta región a partir del cual se colocaron las partículas, de este modo, tal centro fue resuelto a la máxima resolución.

Al contrario que nuestros resultados, la estructura resuelta de 4F2hc/LAT1 con anticuerpo (Lee *et al.*, 2019) presentaba su punto más alto de resolución en la región de ectodominio de 4F2hc (Figura 8, página 53). La disparidad de la resolución entre estas dos regiones sugiere que existe cierta flexibilidad de posición del ectodominio de la subunidad pesada respecto a la subunidad ligera.

La arquitectura general de la estructura presentaba a la subunidad 4F2hc encima del transportador LAT2 y cuyo dominio transmembrana (TM1') cruza la membrana plasmática adyacente al TM4 de LAT2, tal como se había descrito en la estructura de 4F2hc/LAT1 (Lee *et al.*, 2019; Yan *et al.*, 2019) y parcialmente en la estructura de baja resolución de la misma proteína 4F2hc/LAT2 (Rosell *et al.*, 2014). El enlace característico entre las subunidades de los HATs es el puente disulfuro formado por la Cys 211' del 4F2hc (isoforma f) y la Cys 154 del LAT2 humano, pero, antes incluso de la resolución del primer HAT ya se determinó bioquímicamente que no era el único anclaje existente entre ambas subunidades (Estévez *et al.*, 1998; Pfeiffer *et al.*, 1998).

Al igual que las estructuras resueltas de 4F2hc/LAT1 (Yan *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2019), nuestra estructura de 4F2hc/LAT2 también mostraba cuatro interfases entre la subunidad pesada y la subunidad ligera; reagrupados en TM1' - TM4, enlazadores C β 2 / C β 3 / C β 8-EL2, A α 8 - EL4a y A α 1 / A α 2 - EL3 y que ya han sido previamente mostrados en la figura 9 (página 56). Tal como muestran los ensayos funcionales realizados en 4F2hc/LAT1 humano (Yan *et al.*, 2019) estas interacciones hacen que el heterodímero sea estable; mutantes de los residuos participantes en estas interacciones muestran reducción de la actividad de transporte, pero no porque participen en el reconocimiento y transporte del sustrato, sino como ya se ha mencionado, por participar en el tráfico y/o estabilidad de la proteína a/en la membrana (Yan *et al.*, 2019).

Al comparar las interacciones establecidas entre las proteínas 4F2hc/LAT1 y 4F2hc/LAT2, observamos que prácticamente todas las interacciones se encuentran conservadas. No obstante, en la interfase comprendida por A α 1 / A α 2 - EL3 parece presentar más diferencias respecto a 4F2hc/LAT1 humano (Lee *et al.*, 2019), ya que mientras Lee menciona tres interacciones iónicas, en nuestra estructura solo observamos una posible entre Lys 301' y Asn 221.

En cuanto a la subunidad ligera, los dominios transmembrana del 1 al 10 están dispuestos formando el plegamiento conocido como LeuT o pseudo-simetría inversa doble 5+5 descrito en otros miembros de la superfamilia APC (Jack *et al.*, 2000; Yamashita *et al.*, 2005; Jungnickel *et al.*, 2018; Errasti-Murugarren *et al.*, 2019).

Los TMs 11 y 12 se disponen fuera de esta región, formando entre ellos una V como en los casos de LAT1 y b⁰AT (Errasti-Murugarren *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2019; Yan *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2020a). La disparidad de posición de los TM11 y TM12 viene dada por la diferente identidad de secuencia; mientras que entre los TM1 y TM10 existe una alta identidad de secuencia entre los diferentes LATs, los TM11 y TM12 son los que menor conservación de secuencia presentan (Errasti-Murugarren *et al.*, 2019). Los transportadores más remotos, solo cuentan con los 10 TMs primeros, indicando la alta implicación de estos en la función del transportador, por lo que se sugiere que los TM11 y TM12 poseen una función más relacionada con el andamiaje general del transportador, contribuyendo en su estabilidad y su inserción en la membrana plasmática.

Respecto a las regiones desenrolladas centrales de las hélices transmembrana 1 y 6 central participan en el reconocimiento del sustrato, (Shi *et al.*, 2008; Kowalczyk *et al.*, 2011; Jungnickel *et al.*, 2018; Errasti-

Murugarren *et al.*, 2019), y es por tanto donde se encuentran los residuos clave en la determinación de la selectividad de sustrato. En este sentido, los estudios de PELE demuestran que el grupo α -amino y α -carboxilo de todos los sustratos ensayados interaccionan con la región desenrollada de los TMs 1 y 6. De hecho, dentro de la cavidad que forma el sitio de unión, los residuos Gly 55, Ser 56 y Gly 57 del TM1 y Phe 243 y Gly 246 del TM6 se posicionan colocando los átomos de la cadena principal hacia esta cavidad, sirviendo como plataforma de acoplamiento para los grupos α -carboxilo y α -amino de cada sustrato.

Estos resultados no solo se refuerzan por la cantidad de estructuras ya resueltas de miembros de la familia APC en presencia de sustrato (Jungnickel *et al.*, 2018; Errasti-Murugarren *et al.*, 2019; Yan *et al.*, 2019; Yan *et al.*, 2020a), sino también por los estudios funcionales realizados en nuestro laboratorio que sugieren que los grupos α -amino y carboxilo son necesarios para una unión adecuada y / o para desencadenar el ciclo de transporte en los LATs (Errasti-Murugarren *et al.*, 2019).

No obstante, aunque los estudios estructurales y funcionales previos realizados en LATs o en homólogos bacterianos nos ayudaron a centrar la zona de estudio, no daban respuestas específicas al funcionamiento de LAT2. Durante la parte final de esta tesis se resolvió la estructura de 4F2hc/LAT2 humano en presencia de L-leucina y de L-triptófano (Yan *et al.*, 2020b), pero los escasos estudios funcionales que acompañaban a esta publicación apenas vislumbraban los residuos clave para la unión de sustratos en LAT2 y en ningún caso definía las claves para el reconocimiento de aminoácidos pequeños ni L-glutamina.

Por tanto, una vez resuelta la estructura de 4F2hc/LAT2 en ausencia de sustrato acudimos a análisis simulados que nos dieran la información suficiente para guiar correctamente los estudios funcionales. A partir de varios análisis de acoplamiento y de PELE (Borelli *et al.*, 2005; Cossins *et al.*, 2012) cuyo potencial ya fue usado anteriormente en nuestro laboratorio (Errasti-Murugarren *et al.*, 2019), así como un estudio comparativo de secuencia de transportadores humanos LATs de aminoácidos neutros (LAT1, LAT2 y Asc1) se encontraron varios residuos que podrían participar en el reconocimiento y transporte del sustrato y que por tanto su estudio resultaba esencial para localizar los determinantes funcionales de LAT2.

En este sentido, un análisis detallado de las secuencias de los LATs humanos muestra que los residuos del TM6 están menos conservados que los del TM1 (Errasti-Murugarren *et al.*, 2019), sugiriendo que parte de la selectividad de sustrato entre los diferentes LATs se focalizaría en esta región menos conservada.

En particular, el residuo de LAT2 Gly 246 es el menos conservado en esta región de los LATs humanos siendo por ejemplo una serina en el transportador Asc1 el cual, a diferencia de LAT2, no transporta aminoácidos neutros grandes.

Los ensayos de transporte realizados en LAT2 con la mutación Gly 246 Ser mostraban un descenso de la actividad para los sustratos grandes y un aumento para los pequeños, emulando el perfil de selectividad de Asc1; mientras que una glicina en la posición 246 de Asc1 resultaba en un perfil de selectividad de sustrato similar al de LAT2 (Figura 34, página 146). Estos resultados sugieren que la presencia de un residuo más voluminoso en la parte central de la región desenrollada del TM6

favorecería el transporte de sustratos pequeños, dificultando por el contrario el de los sustratos voluminosos.

Así, LAT1, que también cuenta con una glicina en esta posición, no transporta ningún aminoácido neutro pequeño, pero el mutante en LAT1 Gly 255 Ala (posición 246 de LAT2) incrementa el transporte de L-alanina y L-valina reduciendo a su vez el transporte de sustratos grandes (Lee *et al.*, 2019). Por lo tanto, el residuo Gly 246 del TM6 de LAT2 y la posición equivalente en otros LATs de aminoácidos neutros es parte del mecanismo que contribuye a discriminar los sustratos pequeños de los grandes.

Los estudios de PELE muestran que el grupo hidroxilo de la serina en posición 246 estabilizaría la unión del grupo α -amino de los aminoácidos pequeños aumentando su transporte (Figura 36, página 148). Algo similar se propuso para explicar el efecto del mutante Gly 255 Ala en hLAT1 sobre el transporte de L-alanina y L-valina, sugiriendo que el grupo metilo de la alanina en posición 255 añadiría una interacción extra en el sitio de unión que estabilizaría la unión de sustratos pequeños (Lee *et al.*, 2019).

Por el contrario, el grupo hidroxilo de la serina 246 desestabilizaría la pose canónica de los sustratos grandes, permitiendo la interacción de sus cadenas laterales con otros residuos en el vestíbulo del sustrato y afectando negativamente a su transporte.

Por otro lado, tampoco es descartable un efecto de las mutaciones en la posición 246 (LAT2 y Asc1) o 255 (LAT1) respecto al volumen del sitio de unión de sustrato. En esta línea, recientemente se ha descrito para MhsT (transportador bacteriano de la familia SLC6 que cuenta con un plegamiento de tipo LeuT) que la naturaleza de determinados residuos del TM6, cercanos al centro de unión, definiría el perfil de selectividad del transportador, mediante la regulación del volumen del sitio de unión (Focht *et al.*, 2021). Manera por la cual, el volumen de la cadena lateral de los residuos en esta región determinaría el tamaño de los sustratos.

Así, el mutante Met 236 Phe en MhsT (que se localiza a escasos residuos de la posición equivalente a la Gly 246 de LAT2) bloquea la actividad de transporte de L-triptófano mediante impedimentos estéricos, sin afectar al transporte de L-leucina (Focht *et al.*, 2021). Un análisis de los volúmenes de las cavidades de unión a sustrato para los HATs y los LATs resueltos demuestra que esta se podría relacionar con la selectividad de sustrato (Figura 43).

En este sentido, la selectividad de sustrato en los HATs de aminoácidos neutros (LAT1, LAT2 y Asc1) podría depender del espacio existente en la cavidad del sitio de unión que queda configurado en gran medida por los residuos situados en la posición 246 y 134 (Figura 43).

De este modo, se entiende que una serina en posición 246 (como en Asc1) haría la cavidad más pequeña, más adaptada a sustratos pequeños, mientras que una glicina (como en LAT1 y LAT2) resultaría en una cavidad más grande. Así se entiende que una mutación a alanina o serina en LAT1 o LAT2 respectivamente forme una cavidad más pequeña, lo que podría favorecer el transporte de los aminoácidos más pequeños y por tanto explicar los resultados del mutante Gly 255 Ala en 4F2hc/LAT1 (Lee *et al.*, 2019) y Gly 246 Ser en LAT2 (Figura 34).

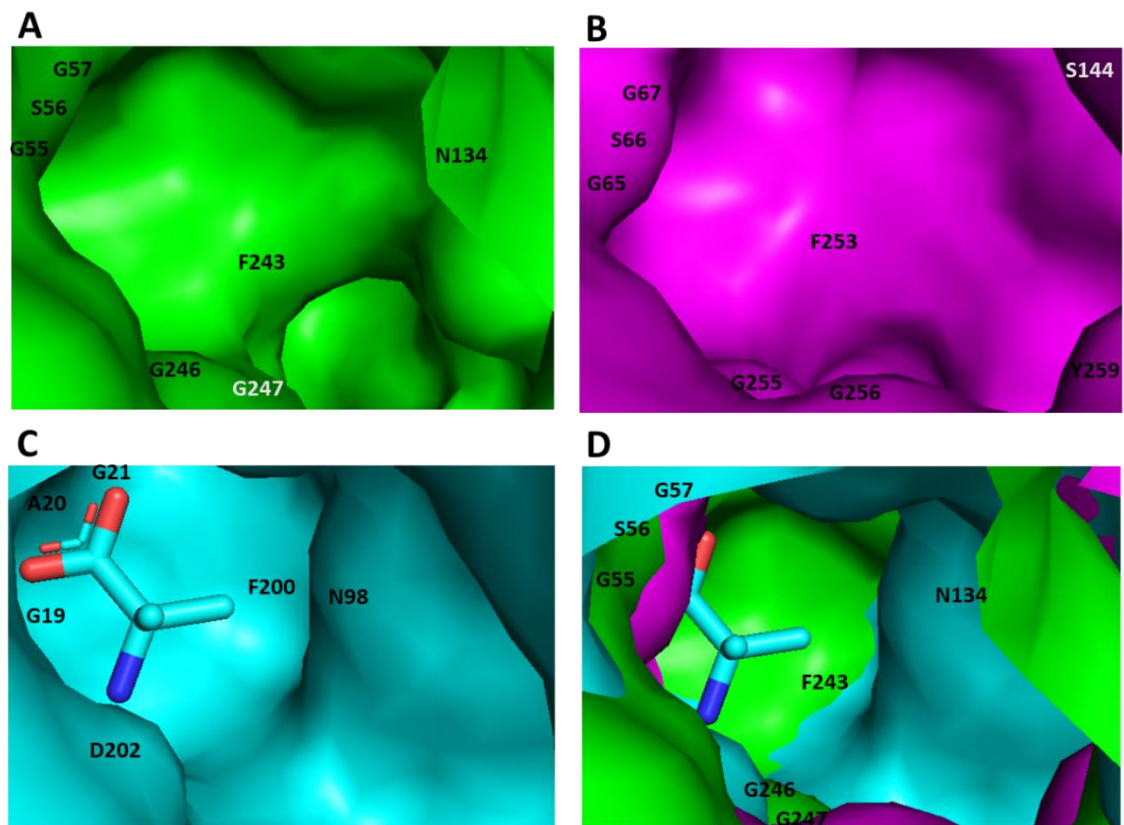


Figura 43: Comparación de la cavidad formada por los sitios de unión al sustrato de LAT1, LAT2 y BasC. Cuanto más restrictiva es la selectividad por el sustrato, la cavidad del sitio de unión es más pequeña. La cavidad en sí no solo viene dada por los residuos de las posiciones 246 y 134 y equivalentes, depende de la combinación de ellos, así como de otros residuos. A) Cavidad de LAT2 (PDB 7B00). B) Cavidad de LAT1 (PDB 6IRS). C) Cavidad de BasC (PDB 6F2W). D) Comparación de la cavidad formada por LAT2, LAT1 y BasC. Estructura de BasC en presencia de sustrato AIB para identificar el sitio de unión al sustrato. Los residuos marcados hacen referencia a LAT2.

Otro de los residuos estudiados e identificado a partir del análisis del volumen de la cavidad del sitio de unión a sustratos y de los estudios PELE es el residuo Asn 134, situado en el TM3 y alejado de los residuos centrales del sitio de unión identificados anteriormente (en particular Gly 246). Este residuo podría tanto interactuar con las cadenas laterales de los sustratos más grandes (L-glutamina y L-triptófano) (Figura 32 - C y D), como regular el volumen de la cavidad de unión al sustrato (Figura 43). Entre los transportadores HATs para aminoácidos neutros, LAT2 es el que cuenta con un residuo diferente en la posición 134, ya que LAT1 y Asc1 tienen una serina en la posición equivalente. El ensayo funcional con el mutante Asn 134 Ser en LAT2 mostraba una reducción en la actividad transportadora para los sustratos pequeños y L-glutamina no siendo afectados el resto de los sustratos grandes (L-triptófano y L-histidina) (Figura 37).

El perfil de selectividad de sustrato mostrado por este mutante es idéntico al de LAT1; lo que podría indicar en un primer momento que la Asn 134 es determinante en LAT2 para el transporte de aminoácidos neutros pequeños y L-glutamina.

Los resultados de PELE daban una explicación plausible para el cambio de selectividad de sustrato observado en el mutante Asn 134 Ser de LAT2, excepto para el caso de la glicina (Figura 38, página 151). En esta línea, el transportador Asc1 también cuenta con una serina en la posición 134 como

LAT1, sugiriendo que una asparagina en LAT2 no es responsable único del transporte de aminoácidos neutros pequeños. No hay que descartar que la implicación que pueda tener el residuo de la posición 134 en referencia a los sustratos pequeños se deba a la combinación que presentan LAT1, LAT2 y Asc1 en las posiciones 246 y 134 que configuran el espacio de la cavidad del sitio de unión (Figura 43).

Realizar ensayos funcionales mutando la serina 134 de Asc1 a asparagina podría arrojar luz sobre la implicación que tiene dicho residuo para la selectividad de sustratos pequeños. Sin embargo, tal mutante no resultó viable; lo que podría deberse a que la tirosina de la posición 333 que es una serina en LAT2, y que podría estar interfiriendo; por lo que se requeriría la estructura de Asc1 para confirmarlo.

Otra posibilidad para explicar el papel de la Asn 134 en el transporte de aminoácidos pequeños, especialmente glicina, la encontramos al estudiar el transportador bacteriano AgcS (cotransportador sodio o protón dependiente de la familia APC y procedente de *Methanococcus maripaludis* que transporta L y D-alanina y glicina). Este transportador contiene una glutamina en el TM3 (a una vuelta de hélice de distancia de la posición equivalente de Asn 134 en LAT2) que forma un puente de hidrógeno con el grupo α -amino del sustrato en la conformación ocluida (Ma *et al.*, 2019). Esto sugiere que la Asn 134 en LAT2 podría ser clave para la unión de sustratos pequeños en la conformación cerrada durante el ciclo de transporte.

No obstante, basándonos en la estructura recientemente publicada de LAT1 en presencia de inhibidor y ocluida (Yan *et al.*, 2021), se observa que el residuo equivalente a Asn 134 (Ser 144) no interacciona con el sustrato, lo que sugiere que este residuo no está implicado en la interacción con los aminoácidos pequeños en la conformación ocluida.

Así, con la intención de entender las bases moleculares de la alteración del transporte de glicina por el mutante Asn 134 Ser en LAT2 se debería llevar a cabo un análisis dinámico más complejo. En conjunto, estos resultados sugieren que el residuo de asparagina en la posición 134 para LAT2 podría ser relevante para la unión y/o para la translocación de aminoácidos neutros pequeños en otras conformaciones del transportador LAT2.

Por otro lado, los resultados con los que disponemos sugieren que la asparagina en la posición 134 determina la capacidad de esta de transportar L-glutamina, cuyo transporte, al contrario que para el resto de los aminoácidos grandes sí se vio reducido (Figura 37). Este sustrato es el único aminoácido neutro que no es transportado ni por Asc1 ni por LAT1 (Pineda *et al.*, 1999; Yanagida *et al.*, 2001), lo que sugiere que una asparagina en la posición 134 es determinante para el transporte del sustrato L-glutamina por parte de LAT2.

La relevancia fisiológica de LAT2, en comparación con LAT1, radica en el transporte de glutamina. Estudios recientes han demostrado que LAT2, en cooperación con SNAT3 (que junto a SNAT1 dominan el transporte de glutamina en esta zona), es clave para la liberación luminal de aminoácidos no esenciales, en particular glutamina, en el líquido cefalorraquídeo (Dolgodilina *et al.*, 2020). En este sentido, con su función intercambiadora, LAT2 parece volver a captar los aminoácidos neutros esenciales del líquido cefalorraquídeo (expulsados por SNAT3 o SNAT1) y así, participar en el mantenimiento del gradiente de concentración de aminoácidos (McGale *et al.*, 1977; Perry *et al.*, 1975)

que resulta ser crucial para la homeostasis de los aminoácidos cerebrales y, por lo tanto, de la función cerebral.

Los mutantes identificados en LAT2 relacionados con autismo aportan mayor fuerza a la importancia que tiene mantener la concentración adecuada de los aminoácidos para una correcta función cerebral (Cascio *et al.*, 2020).

Sin embargo, los trastornos del sistema nervioso central (como la esquizofrenia, la depresión y la enfermedad de Parkinson) parecen depender de la captación cerebral de aminoácidos neutros grandes como L-triptófano y L-tirosina, cuyo transportador propuesto sería LAT1, sugiriendo una función complementaria entre LAT1 y LAT2. En esta línea, LAT2 mediaría en el transporte hacia el exterior de los sustratos no transportados de manera eficiente por LAT1, como es el caso de la glutamina (Haining *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015).

Así, se ha demostrado que LAT2 participa en la salida de glutamina de los astrocitos como parte del ciclo de glutamato / GABA-glutamina en el cerebro (Heckel *et al.*, 2003). Dado que LAT2 se expresa en la membrana plasmática de los astrocitos, puede participar en la liberación de glutamina del líquido extracelular del cerebro para su recaptación por las neuronas presinápticas tras la excitación (Leke y Schousboe, 2016).

El ciclo de glutamato / GABA-glutamina es de gran importancia para la fisiología cerebral debido a que la absorción de glutamato de la sangre es mínima y debido a que la desregulación de los niveles de glutamato puede desencadenar condiciones patológicas (Conway, 2020).

Durante los últimos años se han identificado una serie de mutaciones en el gen humano de LAT2 (*SLC7A8*), en pacientes con cataratas, con sordera asociada a la edad (ARHL) y con autismo (Knöpfel *et al.*, 2019; Espino-Guarch *et al.*, 2018, Cascio *et al.*, 2020). Durante esta tesis se ha estudiado la base molecular de la mutación asociada a ARHL Thr 402 Met al ser la que produce una modificación del perfil de sustrato más espectacular, cayendo el transporte de alanina y tirosina al 20% (Espino-Guarch *et al.*, 2018).

Las otras mutaciones identificadas en ARHL son Val 302 Ile, Arg 418 Cys y Val 460 Glu (Figura 44) (Espino-Guarch *et al.*, 2018). La mutación Val 302 Ile se encuentra situada en la región extracelular, en el bucle EL4, y cuyo transporte de L-alanina no se ve alterado mientras que el de L-tirosina cae al 50%. La L-isoleucina añade un grupo metilo que podría presionar el TM1b pudiendo alterar así el transporte de los sustratos grandes (Espino-Guarch *et al.*, 2018). La mutación Arg 418 Cys se encuentra en la región intracelular, en el bucle IL5, y reduce el transporte de L-alanina y de L-tirosina al 50%. Por último, la mutación Val 460 Glu, situada en el lateral de la proteína, en el TM12, afectando a la inserción de la proteína en la membrana (sección 4.3.2.1. en Resultados). También han sido descritas mutaciones que afectan al marco de lectura de la proteína, las cuales han permanecido fuera de estudio durante esta tesis debido a que su implicación en la alteración del transporte no resolvería dudas sobre la función de LAT2.

En cuanto a las cataratas, la mutación en LAT2 asociada que causa una variación de la actividad de transporte es Ala 94 Thr (Figura 44), que, aunque no afecta al transporte de L-alanina ni al de L-tirosina, produce una reducción del 50% del transporte de L-triptófano (Knöpfel *et al.*, 2019). El residuo Ala 94 presenta una alta conservación y muestra una interacción hidrofóbica con el residuo Leu 265 del TM7; a su vez, el residuo contiguo, Glu 95 forma puentes salinos con los residuos del bucle IL5

Arg 418, Arg 410 (totalmente conservado) y Lys 421, por lo que una mutación a treonina podría desestabilizar tales conexiones.

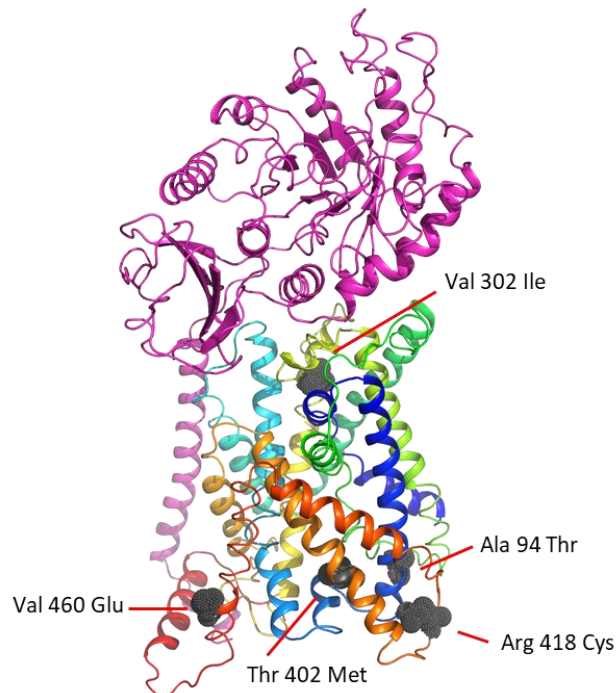


Figura 44: Localización de los mutantes identificados en el gen LAT2 humano y asociados a ARHL y cataratas. El patrón de colores para LAT2 es el mismo empleado en las figuras anteriores. Los residuos de interés están representados en esferas grises para mejorar su visibilidad.

Por otro lado, las mutaciones en LAT2 definidas en pacientes con autismo (Cascio *et al.*, 2020) no han sido estudiadas durante esta tesis puesto que se encuentran localizadas en el extremo N-terminal de la proteína, el cual, desafortunadamente no ha podido ser resuelto debido a la flexibilidad que presenta.

A partir de estas mutaciones se ha desarrollado el segundo punto de estudio de esta tesis; entender la estructura de 4F2hc/LAT2 resuelta en relación a la base molecular de la mutación Thr 402 Met de ARHL (Espino-Guarch *et al.*, 2018) y a través de la cual se ha revelado una conexión relevante estructural y funcional entre los residuos Tyr 93 en TM2, Trp 248 en TM6 y Asp 106 en el bucle intracelular 1 (IL1) (Figura 45).

Al localizar en nuestra estructura el residuo Thr 402 observamos que existía una densidad que conectaba los residuos Thr 402 (TM10) y Tyr 93 (TM2) (Figura 40 - A, página 154). Curiosamente, la disrupción del enlace entre ambos no parecía afectar al perfil general de selectividad, a pesar de que el transporte de L-triptófano del mutante Thr 402 Ala (el residuo equivalente en LAT1) era mayor que el de la proteína nativa (Figura 40 - C), por lo que este mutante podría estar afectando ligeramente al transporte de L-triptófano como resultado de la modificación de la posición del TM2 respecto al TM10 (Figura 45).

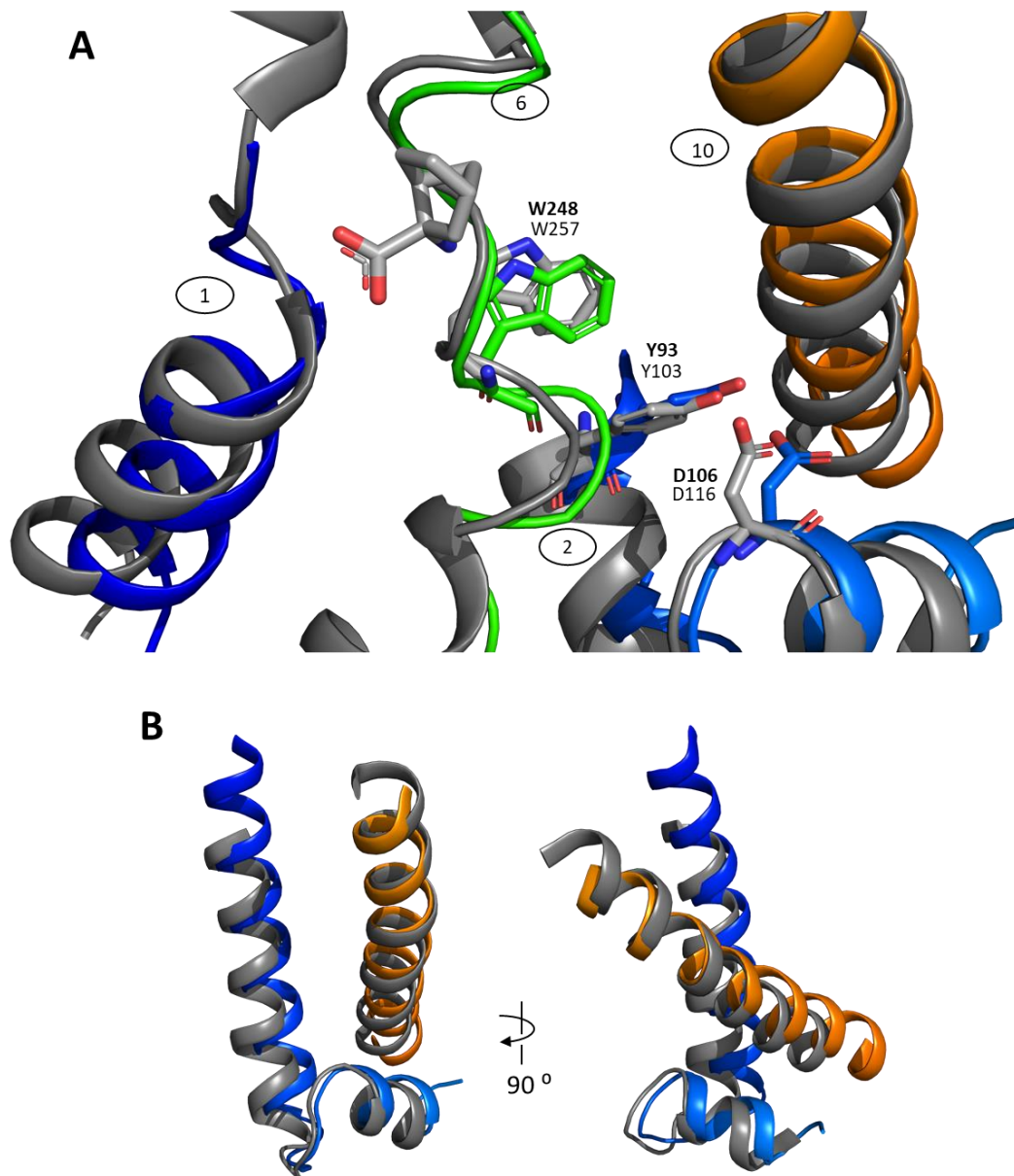


Figura 45: Representación de los TM2, IL1 y TM10 de LAT1 y LAT2. El patrón de colores para LAT2 es el mismo empleado en las figuras anteriores, LAT1 es mostrado en gris. Los residuos de interés son representados en forma de *sticks*, en negrita hacen referencia a LAT2 (PDB 7B00) y sin negrita a LAT1 (PDB 6IRT). A) Relación de los residuos Tyr 93 y Asp 106 con el sitio de unión al sustrato. B) Comparación de la posición de los TMs.

En cualquier caso, la interrupción de la conexión entre el TM10 y el TM2 mediante el puente de hidrógeno entre Tyr 93 y Thr 402 no sería causante de la pérdida de actividad de transporte de L-alanina observada para el mutante Thr 402 Met (Espino-Guarch *et al.*, 2018). La introducción de un residuo largo como la metionina en la posición 402 podría fácilmente afectar a la conexión entre los residuos Asp 106 en el IL1 y la Tyr 93 en el TM2, situados a una distancia de puente de hidrógeno. Así, la disrupción de este puente de hidrógeno (mutantes Tyr 93 Ala y Asp 106 Ala) resultaba en un descenso del transporte de sustratos pequeños y L-glutamina, pero no afectaba al transporte de los sustratos grandes (Figura 40 - C).

Por tanto, la interrupción de la conexión entre los residuos Tyr 93 y Asp 106 en LAT2 provoca que LAT2 presente el perfil de selectividad de sustrato del transportador LAT1, que es eficiente en el transporte de aminoácidos neutros grandes, pero no pequeños ni L-glutamina (Pineda *et al.*, 1999;

Yanagida *et al.*, 2001). Resulta de interés que a pesar de que la triada descrita se encuentra a unos 12 Å del sitio de unión del sustrato en pose canónica, sus mutaciones puedan afectar a la conexión entre ellas produciendo un cambio del perfil de sustrato.

Los segmentos desenrollados del TM1 y del TM6 conforman la gran parte de las paredes de la cavidad a la que se une el sustrato, siendo por ello, la disposición de cada residuo de esta región esencial para que el reconocimiento de los sustratos se realice de manera perfecta. Por esta razón es posible que residuos que forman la cavidad del sitio de unión no sean los únicos con la capacidad de influir en el perfil de sustrato.

A diferencia del TM1, la secuencia del TM6 se encuentra menos conservada entre los distintos LATs (Errasti-Murugarren *et al.*, 2019), del mismo modo, las interacciones estabilizadoras de la región desenrollada del TM6 también son diferentes (Figura 31, página 142). Esta diversidad de interacciones se traduce en una conformación espacial diferente del TM6 en los diferentes LATs y que podrían ser parte del mecanismo de selectividad de sustrato para los diferentes transportadores HAT (Figura 45).

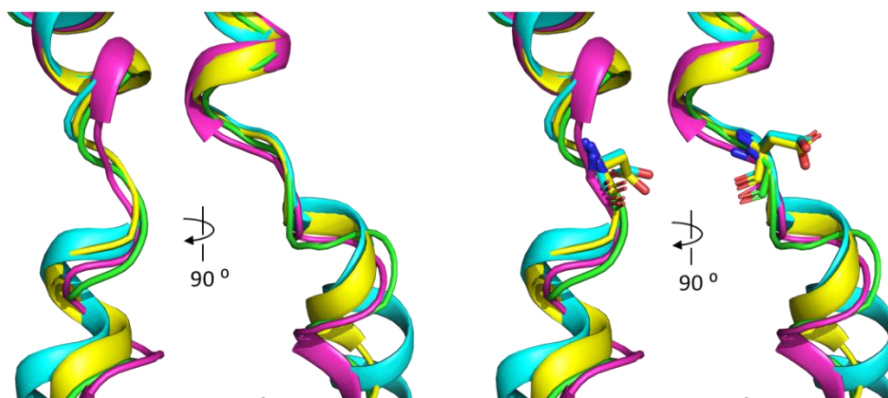


Figura 46: Comparativa de los TM6 de las estructuras resueltas de LAT1, LAT2, b⁰+AT y BasC. LAT2 en verde (PDB 7B00), LAT1 en rosa (PDB 6IRS), BasC en azul (PDB 6F2W) y b⁰+AT en amarillo (PDB 6IL9). En el panel de la derecha se muestra en forma de *stick* el residuo Gly 246 (enumeración LAT2 humano).

Un análisis de la secuencia de la región desenrollada del TM6 de LAT2 revela que los residuos Ser 242, Tyr 245, Trp 248 y Asn 249 interactúan con residuos de los dominios TM2, TM7 y TM10 (Figura 31 - B); interacciones que en algunos casos serían básicas para la función del transportador. Así, los residuos Tyr 396 y Tyr 399 del TM10 interactúan con la Ser 242 (mediante un puente de hidrógeno) y el Trp 248 (mediante un apilamiento π) del TM6, respectivamente (Figura 47), mostrando por ello los mutantes Tyr 396 Ala y Tyr 399 Ala una caída drástica del transporte de L-triptófano y L-leucina (Yan *et al.*, 2020b).

Estos resultados sugerirían que el mantenimiento de determinadas interacciones entre el segmento desenrollado del TM6 y el resto de la proteína serían esenciales para la función del transportador. En este mismo sentido, el residuo Tyr 93 presentaba una interacción π - π con el Trp 248 del TM6 (Figura 40 - D) y la mutación Tyr 93 Ala resultaba en una pérdida casi total de la capacidad de transporte de aminoácidos pequeños y L- glutamina (Figura 40 - C).

Los estudios de MD permitieron analizar la interacción de la Tyr 93 con los residuos Asp 106 y Trp 248, observándose que el puente de hidrógeno entre los residuos Tyr 93 y Asp 106 resultaba

altamente inestable. Este resultado sugería que posiblemente la interacción por puente de hidrógeno entre ambos residuos no resultaba tan relevante como se había propuesto inicialmente. Sin embargo, el análisis de la estructura de LAT1 humano en conformación abierta hacia fuera recientemente publicada (Yan *et al.*, 2021) muestra que la interacción entre ambos residuos se encuentra conservada en esta conformación.

Estas observaciones en conjunto sugerirían que, si bien la interacción entre Tyr 93 y Asp 106 parecería importante en la estabilización espacial del IL1 y el TM2, la transición entre ambas conformaciones (abierta hacia dentro – abierta hacia fuera) como resultado de la unión del sustrato, no requeriría del mantenimiento de esta unión. Por el contrario, el seguimiento del contacto entre los residuos Trp 248 y Tyr 93 a lo largo del tiempo de la simulación en presencia de los sustratos (L-alanina y L-triptófano) y cómo afectaba la mutación Tyr 93 Ala a la posición del Trp 248 y a la conformación de la región desenrollada del TM6, reveló resultados interesantes.

De esta manera, la disposición y forma de la región desenrollada del TM6 era significativamente diferente entre la forma salvaje y la mutada; observándose que el Trp 248 se movía coordinadamente con la Tyr 93, cambiando su trayectoria y produciendo a su vez un reordenamiento de la región del TM6 que participa en el sitio de unión.

Tal reordenamiento en la forma mutada afectaba también a la trayectoria de Asn 249 que pasaba de interactuar con el residuo del TM10, Tyr 399, a interactuar preferentemente con el Asp 106 del IL1; así como la Gly 246 cuya interacción con los residuos Phe 243 y Ser 56 también se veía afectada.

Todos estos cambios ocurridos como resultado de la mutación Tyr 93 Ala provocaban, según el análisis por MD, que el sustrato L-alanina no pudiera interactuar con la Gly 246 y con los residuos del TM1 (⁵⁵GSG⁵⁷) de manera simultánea al ocupar el residuo Trp 248 el espacio que debía ocupar la cadena lateral de la Tyr 93, expandiéndose de este modo la cavidad del sitio de unión al sustrato (Figura 42 - A, página 158).

Dado que la interacción simultánea del sustrato con los TMs 1 y 6 es esencial para desencadenar el mecanismo de translocación (Errasti-Murugarren *et al.*, 2019), esta falta de interacción en el mutante Tyr 93 Ala explica la falta de actividad de transporte de L-alanina (Figura 40 - C). Por su parte, el transporte de sustratos grandes como el L-triptófano apenas se ve afectado en este mutante (Figura 40 - C), ya que, en su pose canónica la cadena lateral realiza contactos adicionales con otros residuos como la Asn 134 e interacciones hidrofóbicas con los residuos Gly 246 y Gly 247 del TM6, lo que estabiliza su posición en el sitio de unión.

Sin embargo, la L-glutamina a pesar de tratarse de un sustrato con una cadena lateral grande, la cual según el análisis PELE de la forma salvaje interacciona con el residuo Asn 134, así como también con el residuo Ile 53 (Figura 31 - B), no es apenas transportada por el mutante Tyr 93 Ala (Figura 40 - C).

No obstante, cabe la posibilidad que esta interacción no sea suficiente para estabilizar la posición de la región desenrollada del TM6, dificultando la pose canónica del sustrato L-glutamina, explicando la clara pérdida de transporte de este sustrato por parte de la mutación Tyr 93 Ala (Figura 40 - C).

Dado que la mutación Tyr 93 Ala cambiaba la selectividad de sustrato a un perfil similar al del transportador 4F2hc/LAT1, analizamos los residuos cuya posición, trayectoria o conexión se han visto modificados en el análisis de MD por la mutación Tyr 93 Ala y los comparamos con sus respectivos residuos en LAT1 (Figura 47).

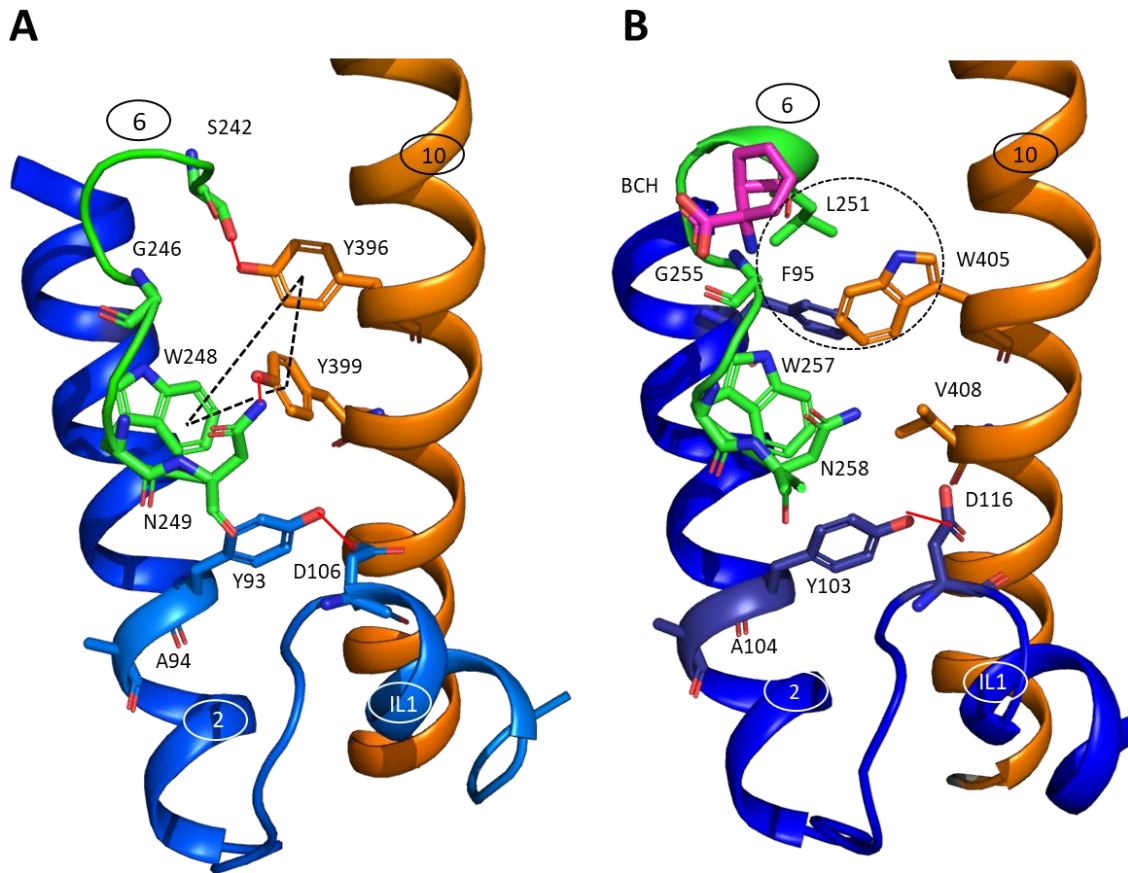


Figura 47: Andamiaje del TM2, IL1 y TM10 que sostiene el segmento desenrollado del TM6. El patrón de colores es el mismo empleado en las figuras anteriores, tanto para las estructuras secundarias (TM2 e IL1 en azul, TM6 en verde y TM10 en naranja) como para los residuos en forma de *sticks* que se muestran con los átomos de O y N en rojo y azul respectivamente. A) LAT2 humano (PDB 7B00). Los puentes de hidrógeno están marcados por líneas rojas. Las interacciones π - π entre los residuos Trp 248, Tyr 399 y Tyr 396 están marcadas por líneas negras discontinuas. B) LAT1 humano (PDB 6IRT). El puente de hidrógeno entre los residuos Tyr 103 y Asp 116 está marcado por una línea roja. Las interacciones hidrofóbicas en la tríada Phe 95, Leu 251 y Trp 405 se destacan por un círculo de línea discontinua. Se muestra el sustrato BCH (átomos de C, O y N en rosa, rojo y azul respectivamente). También se muestran los residuos Gly 246 (LAT2) y Gly 255 (LAT1) que unen el grupo α -amino del sustrato.

Por un lado, la Tyr 93 contacta con el residuo Trp 248 anclando la región desenrollada del TM6, de tal manera que la mutación a alanina produce un cambio de trayectoria del Trp 248 que afecta a su vez a la conexión que mostraba la Asn 249 con la Tyr 399, todos conservados entre LAT1 y LAT2 excepto la Tyr 399 (Figura 47).

En LAT1, el residuo equivalente a la Tyr 399 es la Val 408, modificando en LAT1 la interacción con el Trp 257 (Trp 248 de LAT2). De esta manera, mientras que en LAT2 la Tyr 399 interacciona con el Trp 248 mediante una interacción de tipo π - π , en hLAT1, esta interacción tendría lugar entre el Trp 405 y el Trp 257 y mediante una interacción hidrofóbica entre la Val 408 y el Trp 257 (Figura 47).

A su vez, la Trp 405, equivalente a Tyr 396 de LAT2, interaccionaría con la Leu 251 (Ser 242 en LAT2) y con la Phe 95 (Ile 85 en LAT2 que no interacciona con la Tyr 396; no mostrada en la Figura 47). Estas diferencias en el anclaje entre los TMs 6 y 10 podrían también participar en la diferente conformación del TM6 entre los diferentes LATs (Figura 46) y de esta manera en el diferente perfil de selectividad de sustrato.

El análisis por MD revelaba que la mutación Tyr 93 Ala provocaría que en LAT2 la Asn 249 dejara de contactar con la Tyr 399 (interacción que no tendría lugar en LAT1 puesto que Tyr 399 es una valina en este transportador) y pasara a contactar con el Asp 106, que en la forma salvaje de LAT2 se encontraban a unos 7 Å de distancia. En LAT1, estos residuos (Asn 258 y Asp 116) se encuentran a una distancia cercana al puente de hidrógeno (4 Å), e incluso se aproximan en la conformación cerrada (Yan *et al.*, 2021).

Por otro lado, el grupo hidroxilo de la Tyr 253 en LAT2 está a distancia de puente de hidrógeno del grupo carbonilo de la Tyr 93. Esta interacción no ocurre en LAT1, puesto que el residuo equivalente, Phe 262 (carente de grupo hidroxilo), y cuya cadena lateral no puede participar en un puente de hidrógeno. Esta diferencia entre LAT2 y LAT1 también puede contribuir al cambio de perfil de sustrato debido al mutante Tyr 93 Ala en LAT2.

En la estructura de LAT1 cerrada se muestra que el residuo Phe 262 se desplaza totalmente, alejándose aún más de la Tyr 93, para realizar el cierre intracelular (Yan *et al.*, 2021); por lo que habría que visualizar si la conexión entre Tyr 93 y Tyr 253 en LAT2 se mantiene cuando el transportador se cierra.

Puede parecer contra intuitivo que la alteración de una conexión en LAT2 (mutaciones Tyr 93 Ala y Asp 106 Ala) que existen tanto en LAT2 (Tyr 93 - Asp 106) como en LAT1 (Tyr 103 - Asp 116) asemeje el perfil de sustratos al de LAT1. Probablemente esto es debido a que la modificación del andamiaje del segmento desenrollado del TM6 en este punto revele el impacto funcional de las diferentes conexiones del andamiaje en otros puntos, específicamente las conexiones del andamiaje con el Trp conservado en el TM6 (Trp 248 en LAT2 y Trp 257 en LAT1) (Figura 47).

Así, sugerimos varias posibilidades que explicarían el efecto de las mutaciones Asp 106 Ala y Tyr 93 Ala sobre el perfil de selectividad de LAT2: 1) que el Asp 106 fijaría la posición de la Tyr 93 que a su vez fijaría la posición del Trp 248; 2) que las diferentes interacciones entre Tyr 93, Asp 106, Asn 249 y Tyr 399, que son diferentes en LAT1 y que su alteración como resultado de las mutaciones Tyr 93 Ala y Asp 106 Ala, podrían modificar la conformación de la región desenrollada del TM6; y 3) la interacción entre Tyr 93 y Tyr 253 en LAT2, que no se da en LAT1, podría alterar la conformación de la región desenrollada del TM6 y afectar así a la selectividad de sustrato.

En este sentido, un análisis de MD del mutante Asp 106 Ala ayudaría a definir si efectivamente el cambio de perfil de selectividad de sustrato se debe a la disociación entre el Asn 249 y la Tyr 399 debido, conjuntamente, al cambio de trayectoria del Trp 248 y la liberación del Asn 106 al disociarse de la Tyr 93. No obstante, al contrario que en LAT1 o en el mutante Tyr 93 Ala, el nuevo residuo en la posición 106, una alanina, tampoco tendría la capacidad de interactuar con el Asn 249, desvelándose de este modo la importancia de tal interacción para conferir al sitio de unión de la proteína un perfil de selectividad de sustrato similar a LAT1.

En cualquier caso, nuestros resultados sugieren que el TM2, el TM10 y el IL1 actuarían como un andamio de la región desenrollada del TM6, manteniendo la conformación del sitio de unión y pudiendo así regular la selectividad de sustrato en función de las uniones que sustentan el TM6.

La posible interacción entre Tyr 93 y Asp 106 se torna incluso más interesante cuando se comparan con otros miembros LATs con perfil de sustrato diferente, e incluso con transportadores homólogos remotos como AdiC, donde las combinaciones de residuos que tienen la capacidad de formar interacciones para conectar el TM2 y el IL1 son diferentes y se pueden agrupar según el tipo de sustrato que transportan (Figura 48).

LAT2	GALC	Y AELGVTIPKSGG	D YSY	109
LAT1	GALC	Y AELGTTISKSGG	D YAY	119
Asc-1	GSLC	Y AELGVAI PKSGG	D YAY	109
y+LAT1	GALC	Y AELGTTIKKSGA	S YAY	106
y+LAT2	GALC	Y AELGTTITKSGA	S YAY	114
xCT	GALS	Y AELGTTIKKSGG	H YTY	113
b ⁰ , +AT	GALC	F AELGTMITKSGG	E YPY	99
AGT1	STLC	S AEISISFPCSGA	Q YYF	83
mAsc2	SALC	N AEIATTYPLSGA	S YYF	77
BasC	GGLT	V AEIGTIYPQTGG	M MIY	73
AdiC	LSMV	Y AKMSFLDPSGG	S YAY	76

TM2

Figura 48: Alineamiento de la secuencia de LAT2 humano entre el TM2 y el IL1 con otros LATs y transportadores homólogos más remotos. La secuencia conservada GALCYAEL se localiza en el extremo C-terminal del TM2.

Así, para el caso de transportadores HAT de aminoácidos neutros (LAT1, LAT2 y Asc1) (Pineda *et al.*, 1999; Meier *et al.*, 2002; Fukasawa *et al.*, 2000), los tres miembros cuentan con una tirosina en posición 93 y un aspartato en posición 106 (numeración LAT2 humano). Las diversas estructuras existentes para 4F2hc/LAT1 muestran que ambos residuos se encuentran a distancia de puente de hidrógeno (Lee *et al.*, 2019; Yan *et al.*, 2019; Yan *et al.*, 2021). Sin embargo, las dificultades asociadas a crio-ME para resolver cadenas laterales cargadas negativamente, dificultan resolver la posición exacta del grupo carboxilo de aspartato con respecto al grupo hidroxilo de la tirosina.

Para el caso del sistema y+L, que media el cotransporte de aminoácidos neutros con sodio y aminoácidos catiónicos (Torrents *et al.*, 1998; Deves y Boyd, 1998), los transportadores humanos y+LAT1 y y+LAT2 tienen una tirosina en la posición 93 y una serina en la posición 106 (numeración LAT2). Los transportadores HAT de cistina-glutamato xCT y AGT1 (Sato *et al.*, 1999; Matsuo *et al.*, 2002) presentan una tirosina en la posición 93 y una histidina en la posición 106 y una serina en la posición 93 y una glutamina en la posición 106 (numeración LAT2), respectivamente.

Para el caso de rBAT/b⁰⁺AT (intercambiador cistina-arginina y algunos aminoácidos neutros) (Bertran *et al.*, 1992), cuenta con una fenilalanina en la posición 93 y un glutamato en la posición 106 (numeración hLAT2). Las estructuras resueltas para este heterodímero muestran que ambos residuos se situarían a distancia de formar una interacción de tipo π -anión (Wu *et al.* 2020; Yan *et al.*, 2020a). En la misma línea, el homólogo bacteriano de la familia LAT, BasC, cuyos residuos en posiciones equivalentes a Tyr 93 y Asp 106 son Val 57 y Met 70, también se encuentran a distancia de interactuar de manera hidrofóbica (Errasti-Murugarren *et al.*, 2019).

Todo ello sugiere que los LATs, de humanos a bacterianos, y con muy diversos perfiles de selección de sustrato cuentan con parejas de residuos diversas con capacidad de interactuar y de este modo,

regular la posición relativa en la estructura del IL1 y el TM2. Dado que estas dos regiones, junto con el TM10, actuarían regulando la conformación de la región desenrollada del TM6, la diferente posición del IL1 y el TM2 por las diferentes parejas de residuos podría, en última instancia, afectar a la conformación del TM6 y así a su perfil de selectividad de sustrato.

En LAT2, el residuo Tyr 93 se encuentra dentro de un motivo conservado en LATs (⁸⁹G/S, A/S/T/G, L, C/S/T, Y/F/S/N/V, A, E, L/I⁹³; donde la primera letra es el residuo más frecuente, numeración de hLAT2) y se encuentra involucrado en diferentes conexiones con los dominios TM6, TM7 y el bucle entre los dominios TM10 y TM11. En esta zona existen una serie de conexiones que parecen estabilizar el sitio de unión al sustrato y que, debido a ello, una mutación que produzca una variación en su disposición podría producir un cambio en el perfil de selectividad de sustrato.

Dentro de este motivo se encuentra altamente conservado el residuo Ala 94 que muestra una interacción hidrofóbica con los residuos Leu 265 del TM7, así como Glu 95 que presenta interacciones con los residuos completamente conservados dentro del bucle del TM10 - TM11, Arg 418, Arg 410 y Lys 421 a través de puentes salinos.

La mutación en LAT2 Ala 94 Thr, identificada en pacientes de cataratas, afecta al transporte de L-triptófano, pero no de L-alanina y L-tirosina (Knöpfel *et al.*, 2018). Por tanto, en la misma línea, este estudio muestra que una mutación en otro residuo del motivo conservado del TM2 afecta al andamiaje constituido por residuos en TM6 y TM10 y resulta en un cambio del perfil de sustrato de transportador LAT2 humano.

En conjunto, la estructura de 4F2hc/LAT2 con alta resolución en la zona transmembranal de LAT2 nos ha permitido no solo encontrar los residuos claves para entender la selectividad de sustrato exhibida por LAT2, sino también desvelar las bases moleculares de varias mutaciones patológicas en LAT2 (Knöpfel *et al.*, 2018; Espino-Guarch *et al.*, 2018) y que, gracias a las cuales, hemos revelado la importancia que pueden tener las interacciones de residuos externos al sitio de unión para estabilizar tal región y mantener el perfil de selectividad de sustrato.

Hemos descrito, a través de la estructura de 4F2hc/LAT2, los análisis PELE y MD y los estudios funcionales en 4F2hc/LAT2 y 4F2hc/Asc1 como mutaciones situadas en residuos no pertenecientes al sitio de unión pueden modificar las interacciones intramoleculares con las regiones desenrolladas del TM1 y TM6 modificando el perfil de sustrato.

Por tanto, el trabajo presentado durante esta tesis proporciona la base estructural que regula la selectividad de sustrato en la subfamilia LAT de transportadores de aminoácidos neutros. Tales transportadores presentan un diseño del sitio de unión similar, pero con una combinación de residuos única que da lugar a una conformación específica de la región desenrollada del TM6 (debido a la interacción con los dominios transmembrana adyacentes) y así, a los principales determinantes del perfil de selectividad del sustrato. En esta línea, hemos determinado la importancia del TM2, del IL1 y del TM10 sobre la conformación del TM6, y por tanto su influencia en la capacidad de la proteína de transportar ciertos sustratos.

CONCLUSIONES

Sobre la producción de transportadores HAT para estudios estructurales mediante crio-microscopía electrónica:

1. La expresión de HATs en las células HEK293 da lugar a proteínas de buena calidad para estudios estructurales.
2. Las células HEK293-MGA, que presentan déficit de glicosilación, dan lugar a muestras más homogéneas a pesar de resultar en menor cantidad de proteína purificada. La optimización de las condiciones de expresión de estas células podría resultar de interés para la resolución estructural de otros candidatos HAT.
3. La digitonina resulta ser un detergente ideal tanto en términos de calidad como de estabilidad para la solubilización y purificación de HATs.
4. La doble purificación realizada a partir de la etiqueta de Strep y cola de histidinas resulta en una proteína 4F2hc/LAT2 pura, estable y funcional, ideal para estudios estructurales.
5. El análisis por fluorescencia de GFP permite una rápida puesta a punto de los protocolos y las optimizaciones de expresión y purificación de HATs, aunque hay que tener en cuenta la posibilidad de dificultades derivadas de la presencia de GFP soluble.
6. El heterodímero 4F2hc/LAT2 purificado en digitonina muestra actividad como intercambiador de L-valina una vez reconstituido en liposomas.

Sobre la estructura y bases estructurales de la selectividad de sustrato de 4F2hc/LAT2 humano:

1. Se ha resuelto la estructura de 4F2hc/LAT2 humano en una conformación sin sustrato (apo) abierta hacia el citosol con una resolución general de 3,7 Å y una resolución local del núcleo de la región transmembranal de LAT2 entre 2,5 y 3 Å.
2. El residuo Gly 246 (numeración de LAT2 humano) determina la selectividad de los HATs de aminoácidos neutros por sustratos grandes y el residuo Asn 134 (numeración de LAT2 humano) por L-glutamina y presumiblemente por aminoácidos pequeños.
3. El análisis de las regiones afectadas por mutantes de sordera asociada a la edad y cataratas ha revelado la existencia de interacciones alejadas del sitio de unión al sustrato que regulan la selectividad de sustrato. Así, la falta de interacción simultánea del sustrato L-alanina con las regiones desenrolladas del TM1 y del TM6 en el mutante Tyr 93 Ala sería la responsable de la falta de actividad para aminoácidos pequeños en este mutante. Por el contrario, la cadena lateral del L-triptófano facilita la interacción de este sustrato con las dos regiones desenrolladas del TM1 y del TM6, lo que explica la selectividad por L-triptófano en el mutante Tyr 93 Ala.

4. Proponemos que el andamiaje específico de LAT2 formado por el IL1 y los TMs 2 y 10 es esencial para la selectividad de sustrato de LAT2 al determinar su particular conformación de la región desenrollada del TM6.

BIBLIOGRAFÍA

Abeyrathne, P.D., M. Arbeit, F. Kebbel, D. Castano-Diez, K.N. Goldie, M. Chami, H. Stahlberg, L. Renault, W. Kühlbrandt, Chapter (2012). Analysis of 2-D Crystals of Membrane Proteins by Electron Microscopy. *In Comprehensive Biophysics*, 119–1.15.

Acebes, S. , E. Fernandez-Fueyo, E. Monza, M.F. Lucas, D. Almendral, F.J. Ruiz-Dueña, H. Lund, A.T. Martinez, V. Guallar (2016). Rational Enzyme Engineering Through Biophysical and Biochemical Modeling. *ACS Catal*, 6: 1624-1629.

Adams, P.D., P.V. Afonine, G. Bunkóczi, V.B. Chen, I.W. Davis, N. Echols, J.J. Headd, L.W. Hung, G.J. Kapral, R.W. Grosse-Kunstleve, A.J. McCoy, N.W. Moriarty, R. Oeffner, R.J. Read, D.C. Richardson, J.S. Richardson, T.C. Terwilliger, P.H. Zwart (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 66(Pt 2):213-21.

Alisio, A. y M. Mueckler (2010). Purification and Characterization of Mammalian Glucose Transporters Expressed in *Pichia Pastoris*. *Protein Expr Purif*, 70(1): 81–87.

Álvarez-Marimón, M. E. (2014). Structural studies of Heteromeric Amino acid Transporters (HATs): Validation of the first 3D structural model of a HAT (human 4F2hc/LAT2) and identification of new HAT targets for 3D-crystallization. *Doctoral thesis, Universitat de Barcelona*.

Arinaminpathy, Y., Khurana, E., Engelman, D. M., & Gerstein, M. B. (2009). Computational analysis of membrane proteins: the largest class of drug targets. *Drug Discov. Today*, 1130-1135.

Baker, M.R., G. Fan, I.I Serysheva (2015). Single-particle cryo-EM of the ryanodine receptor channel in an aqueous environment. *Eur. J. Transl. Myol*, 25, 35–48.

Baker, D.A., K. McFarland, R.W. Lake, H. Shen, X.C. Tang, S. Toda, P.W. Kalivas (2003). Neuroadaptations in cystine-glutamate exchange underlie cocaine relapse. *Nat Neurosci*, 6(7): 743-749.

Baker, M.L., J. Zhang, S.J. Ludtke, W. Chiu (2010). Cryo-EM of macromolecular assemblies at near-atomic resolution. *Nat Protoc*, 5(10), 1697-1708.

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

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

Barilli, A., B.M. Rotoli, R. Visigalli, O. Bussolati, G.C. Gazzola, Z. Kadija, G. Rodi, F. Mariani, M.L. Ruzza, M. Luisetti, V. Dall'Asta (2010). In Lysinuric Protein Intolerance system γ +L activity is defective in monocytes and in GM-CSF-differentiated macrophages. *Orphanet J Rare Dis*, 5: 32

Bartoccioni, P., C. Del Rio, M. Ratera, L. Kowalczyk, J.M. Baldwin, A. Zorzano, M. Quick, S.A. Baldwin, J.L. Vazquez-Ibar, M. Palacin (2010). Role of transmembrane domain 8 in substrate selectivity and

translocation of SteT, a member of the L-amino acid transporter (LAT) family. *J Biol Chem*, 285(37): 28764-28776.

Bartoccioni P., J. Fort, A. Zorzano, E. Errasti-Murugarren, M. Palacín (2019). Functional characterization of the alanine-serine-cysteine exchanger of *Carnobacterium* sp AT7. *J Gen Physiol*, 151(4):505-517.

Bassi, M. T., E. Gasol, M. Manzoni, M. Pineda, M. Riboni, R. Martin, A. Zorzano, G. Borsani, M. Palacín (2001). Identification and characterisation of human xCT that co-expresses, with 4F2 heavy chain, the amino acid transport activity system xc. *Pflugers Arch*, 442(2): 286-296.

Bauch, C., N. Forster, D. Loffing-Cueni, V. Summa y F. Verrey (2003). Functional cooperation of epithelial heteromeric amino acid transporters expressed in madin-darby canine kidney cells. *JBiol Chem*, 278(2): 1316-1322.

Beckers, M. Y C. Sachse (2020). Permutation testing of Fourier shell correlation for resolution estimation of cryo-EM maps. *J Struct Biol*, 1;212(1):107579

Berman, H. M., G.J. Kleywegt, H. Nakamura, J.L. Markley (2012). The future of the protein data bank. *Biopolymers*.

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

Bertran, J., A. Werner, M.L. Moore, G. Stange, D. Markovich, J. Biber, X. Testar, A. Zorzano, M. Palacín, H. Murer (1992). Expression cloning of a cDNA from rabbit kidney cortex that induces a single transport system for cystine and dibasic and neutral amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(12): 5601-5605.

Bhatnagar, R.S. y J.I. Gordon (1997). Understanding covalent modifications of proteins by lipids: where cell biology and biophysics mingle. *Trends Cell Biol*, 7(1): 14-20

Bill, R.M., P.J.F. Henderson, S. Iwata, E.R.S. Kunji, H. Michel, R. Neutze, S. Newstead, B. Poolman, C.G. Tate, H. Vogel (2011). Overcoming barriers to membrane protein structure determination. *Nat Biotech.* 29, 335–340.

Billard J.M., T. Freret (2018). Asc-1 transporter activation: an alternative to rescue age-related alterations in functional plasticity at rat hippocampal CA3/CA1 synapses. *J Neurochem*, 147(4):514-525

Borrelli, K. W.; A. Vitalis, R. Alcantara, V. Guallar (2005). PELE: Protein Energy Landscape Exploration. A Novel Monte Carlo Based Technique. *J. Chem. Theory Comput*, 1 (6), 1304–1311.

Borsani, G., M.T. Bassi, M.P. Sperandeo, A. De Grandi, A. Buoninconti, M. Riboni, M. Manzoni, B. Incerti, A. Pepe, G. Andria, A. Ballabio, G. Sebastio (1999). SLC7A7, encoding a putative permease-related protein, is mutated in patients with lysinuric protein intolerance. *Nat Genet*, 21(3): 297-301.

Braun, D., E.K. Wirth, F. Wohlgemuth, N. Reix, M.O. Klein, A. Gruters, J. Kohrle, U. Schweizer (2011). Aminoaciduria, but normal thyroid hormone levels and signalling, in mice lacking the amino acid and thyroid hormone transporter Slc7a8. *Biochem J*, 439(2): 249-255.

Brilot, A. F., J.Z. Chen, A. Cheng, J. Pan, S.C. Harrison, C.S. Potter, B. Carragher, R. Henderson, N. Grigorieff (2012). Beam-induced motion of vitrified specimen on holey carbon film. *Journal of structural biology*, 177(3): 630-637.

Broer, S. y M. Palacín (2011). The role of amino acid transporters in inherited and acquired diseases. *Biochem J*, 436(2): 193-211.

Broer, A., C. Wagner, F. Lang, S. Broer (2000). Neutral amino acid transporter ASCT2 displays substrate-induced Na⁺ exchange and a substrate-gated anion conductance. *Biochem J*, 346 Pt 3: 705-710.

Burnette, W.N. (1981). Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, Apr;112(2):195-203

Busch, A.E., T. Herzer, S. Waldegger, F. Schmidt, M. Palacín, J. Biber, D. Markovich, H. Murer, F. Lang (1994). Opposite directed currents induced by the transport of dibasic and neutral amino acids in *Xenopus* oocytes expressing the protein rBAT. *J Biol Chem*, 269(41): 25581-25586.

Cai, H., H. Yao, T. Li, C.A.J. Hutter, Y. Li, Y. Tang, M.A. Seeger, D. Li (2020). An improved fluorescent tag and its nanobodies for membrane protein expression, stability assay, and purification. *Commun. Biol*, 3, 1–16.

Calonge, M.J., P. Gasparini, J. Chillaron, M. Chillon, M. Gallucci, F. Rousaud, L. Zelante, X. Testar, B. Dallapiccola, F. Di Silverio y *et al.* (1994). Cystinuria caused by mutations in rBAT, a gene involved in the transport of cystine. *Nat Genet*, 6(4): 420-425.

Campbell, E.A., O. Muzzin, M. Chlenov, J.L. Sun, C.A. Olson, O. Weinman, M.L. Trester-Zedlitz, S.A. Darst (2002). Structure of the Bacterial RNA Polymerase Promoter Specificity σ Subunit. *Molecular Cell* 9(3): 527-539.

Cantor, J., C.D. Browne, R. Ruppert, C.C. Feral, R. Fassler, R.C. Rickert, M.H. Ginsberg (2009). CD98hc facilitates B cell proliferation and adaptive humoral immunity. *Nat Immunol*, 10(4): 412-419.

Casagrande, F., M. Ratera, A.D. Schenk, M. Chami, E. Valencia, J.M. López, D. Torrents, A. Engel, M. Palacín, D. Fotiadis (2008). Projection structure of a member of the amino acid/polyamine/organocation transporter superfamily. *J Biol Chem*, 283(48): 33240-33248.

- Cascio L., C.F. Chen, R. Pauly, S. Srikanth, K. Jones, C.D. Skinner, R.E Stevenson, C.E. Schwartz, L. Boccuto (2020). Abnormalities in the genes that encode Large Amino Acid Transporters increase the risk of Autism Spectrum Disorder. *Mol Genet Genomic Med* 8 (1):e1036.
- Chae, P.S., S.G.F. Rasmussen, R.R. Rana, K. Gotfryd, R. Chandra, M.A. Goren, A.C. Kruse, S. Nurva, C.J. Loland, Y. Pierre, *et al.* (2010) Maltose–neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins. *Nat. Methods*, 7, 1003–1008.
- Chaptal, V., F. Delolme, A. Kilburg, S. Magnard, C. Montigny, M. Picard, C. Prier, L. Monticelli, O. Bornert, M. Agez *et al* (2017). Quantification of Detergents Complexed with Membrane Proteins. *Sci. Rep*, 7, 41751
- Chillarón, J., M. Font-Llitjos, J. Fort, A. Zorzano, D.S. Goldfarb, V. Nunes, M. Palacín (2010). Pathophysiology and treatment of cystinuria. *Nat Rev Nephrol*, 6(7): 424-434.
- Chillarón, J., R. Estevez, C. Mora, C.A. Wagner, H. Suessbrich, F. Lang, J.L. Gelpi, X. Testar, A.E. Busch, A. Zorzano, M. Palacín (1996). Obligatory amino acid exchange via systems bo,+ -like and y+L-like. A tertiary active transport mechanism for renal reabsorption of cystine and dibasic amino acids. *J Biol Chem*, 271(30): 17761-17770.
- Chillarón, J., R. Roca, A. Valencia, A. Zorzano, M. Palacín (2001). Heteromeric amino acid transporters: biochemistry, genetics, and physiology. *Am J Physiol Renal Physiol*, 281(6): F995- 1018.
- Cohen, S.N., A.C. Chang, L. Hsu (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 69:2110-2114.
- Conway M.E. (2020). Alzheimer's disease: targeting the glutamatergic system. *Biogerontology* 21, (3):257-274.
- Cooper, G.M. (2000). *The Cell: A Molecular Approach*. Sunderland (MA) *Sinauer Associates*, 2nd edition.
- Cosco, J., M. Scalise, C. Colas, M. Galluccio, R. Martini, F. Rovella, T. Mazza, G.F. Ecker, C. Indiveri (2020). ATP modulates SLC7A5 (LAT1) synergistically with cholesterol. *Sci Rep*, 10: 16738.
- Cossins, B.P., A. Hosseini, V. Guallar (2012). Exploration of Protein Conformational Change with PELE and Meta-Dynamics. *J. Chem. Theory Comput*, 8 (3), 959–965.
- Costa i Torres, M. (2012). The first 3D structural model of an eukaryotic heteromeric amino acid transporter. *Doctoral thesis, Universitat de Barcelona*.
- Costa, M., A. Rosell, E. Álvarez-Marimón, A. Zorzano, D. Fotiadis, M. Palacín (2012). Expression of human heteromeric amino acid transporters in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.*, 87(1):35-40.

Dall'Asta, V., O. Bussolati, R. Sala, B.M. Rotoli, G. Sebastio, M.P. Sperandeo, G. Andria, G.C. Gazzola (2000). Arginine transport through system $\gamma(+)$ L in cultured human fibroblasts: normal phenotype of cells from LPI subjects. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279(6): C1829-1837.

Del Amo E.M., A. Urtti, M. Yliperttula (2008). Pharmacokinetic role of L-type amino acid transporters LAT1 and LAT2. *Eur J Pharm Sci*, 35 (3):161-174. doi:10.1016/j.ejps.2008.06.015.

De Bundel, D., A. Schallier, E. Loyens, R. Fernando, H. Miyashita, J. Van Liefferinge, K. Vermoesen, S. Bannai, H. Sato, Y. Michotte, I. Smolders, A. Massie (2011). Loss of system $x(c)^-$ does not induce oxidative stress but decreases extracellular glutamate in hippocampus and influences spatial working memory and limbic seizure susceptibility. *J Neurosci*, 31(15): 5792-5803

Deves, R. y C.A. Boyd (1998). Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. *Physiol Rev*, 78(2): 487-545.

Deves, R. y C.A. Boyd (2000). Surface antigen CD98(4F2): not a single membrane protein, but a family of proteins with multiple functions. *J Membr Biol*, 173(3): 165-177.

Dickens, D. *et al.* (2017). Modulation of LAT1 (SLC7A5) transporter activity and stability by membrane cholesterol. *Scientific Reports*, 7, 43580.

Dixon, S.J., D.N. Patel, M. Welsch, R. Skouta, E.D. Lee, M. Hayano, A.G. Thomas, C.E. Gleason, N.P. Tatonetti, B.S. Slusher, B.R. Stockwell (2014). Pharmacological inhibition of cystineglutamate exchange induces endoplasmic reticulum stress and ferroptosis. *Elife*, 3: e02523.

Dolgodilina E., S.M. Camargo, E. Roth, B. Herzog, V. Nunes, M. Palacín, F. Verrey (2020). Choroid plexus LAT2 and SNAT3 as partners in CSF amino acid homeostasis maintenance. *Fluids Barriers CNS*, 17 (1):17. doi:10.1186/s12987-020-0178-x

Domínguez, F., C. Simón, A. Quiñonero, M.A. Ramírez, E. González-Muñoz, H. Burghardt, A. Cervero, S. Martínez, A. Pellicer, M. Palacín, F. Sánchez-Madrid, F., M. Yáñez-Mó (2010). Human endometrial CD98 is essential for blastocyst adhesion. *PLoS One*, 5, e13380.

Drew, D., S. Newstead, Y. Sonoda, H. Kim, G. von Heijne, S. Iwata (2008). GFP-based optimization scheme for the overexpression and purification of eukaryotic membrane proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Protoc.*, 3, 784–798.

Drulyte, I., R.M. Johnson, E.L. Hesketh, D.L. Hurdiss, C.A. Scarff, S.A. Porav, N.A. Ranson, S.P. Muench, R.F. Thompson (2018). Approaches to altering particle distributions in cryo-electron microscopy sample preparation. *Acta Crystallogr D Struct Biol.*, 1;74(Pt 6):560-571.

Dubbs, D.R. y W.F. Scherer (1969). Variants of Japanese encephalitis virus cytopathic for L mouse fibroblasts and lass human epithelial cells. *Jpn. J. Med. Sci. Biol*, 22:253-261.

Dubyak, G.R. (2004). Ion homeostasis, channels, and transporters: an update on cellular mechanisms. *Adv Physiol Educ*, 28(1-4): 143-154.

Dye, J.F., S. Vause, T. Johnston, P. Clark, J.A. Firth, S.W. D'Souza, C.P. Sibley, J.D. Glazier (2004). Characterization of cationic amino acid transporters and expression of endothelial nitric oxide synthase in human placental microvascular endothelial cells. *FASEB J*, 18(1): 125-127.

Ehmsen J.T., Y. Liu, Y. Wang, N. Paladugu, A.E. Johnson, J.D. Rothstein, S. du Lac, M.P. Mattson, A. Höke (2016). The astrocytic transporter SLC7A10 (Asc-1) mediates glycinergic inhibition of spinal cord motor neurons. *Sci Rep*, 6:35592.

Emsley, P., B. Lohkamp, W.G. Scott, K. Cowtan (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr*, 66, 486–501.

Errasti-Murugarren E., J. Fort, P. Bartoccioni, L. Diaz, E. Pardon, X. Carpena, M. Espino-Guarch, A. Zorzano, C. Ziegler, J. Steyaert *et al* (2019). L amino acid transporter structure and molecular bases for the asymmetry of substrate interaction. *Nat Commun*, 10: 1807.

Errasti-Murugarren, E. y M. Palacín (2021). Heteromeric Amino Acid Transporters in Brain: from Physiology to Pathology. *Neurochem Res*.

Espino Guarch, M., M. Font-Llitjos, S. Murillo-Cuesta, E. Errasti-Murugarren, A.M. Celaya, G. Girotto , D. Vuckovic, M. Mezzavilla, C. Vilches, S. Bodoy *et al* (2018). Mutations in L-type amino acid transporter-2 support SLC7A8 as a novel gene involved in age-related hearing loss. *Elife*, 7.

Estevez, R., M. Camps, A.M. Rojas, X. Testar, R. Deves, M.A. Hediger, A. Zorzano, M. Palacín (1998). The amino acid transport system γ -L/4F2hc is a heteromultimeric complex. *FASEB J*, 12(13): 1319-1329.

Faham, S., A. Watanabe, G.M. Besserer, D. Cascio, A. Specht, B.A. Hirayama, E.M. Wright, J. Abramson (2008). The crystal structure of a sodium galactose transporter reveals mechanistic insights into Na⁺/sugar symport. *Science*, 321(5890): 810-814.

Fang, Y., H. Jayaram, T. Shane, L. Kolmakova-Partensky, F. Wu, C. Williams, Y. Xiong, C. Miller (2009). Structure of a prokaryotic virtual proton pump at 3.2 Å resolution. *Nature*, 460(7258): 1040-1043.

Feliubadalo, L., M. Font, J. Purroy, F. Rousaud, X. Estivill, V. Nunes, E. Golomb, M. Centola, I. Aksentijevich, Y. Kreiss, B. Goldman, M. Pras, D.L. Kastner, E. Pras, P. Gasparini, L. Bisceglia, E. Beccia, M. Gallucci, L. de Sanctis, A. Ponzzone, G.F. Rizzoni, L. Zelante, M.T. Bassi, A.L. George Jr., M. Manzoni, A. De Grandi, M. Riboni, J.K. Endsley, A. Ballabio, G. Borsani, N. Reig, E. Fernandez, R. Estevez, M. Pineda, D. Torrents, M. Camps, J. Lloberas, A. Zorzano, M. Palacín (1999). Non-type I cystinuria caused by mutations in SLC7A9, encoding a subunit (bo,+AT) of rBAT. *Nat Genet*, 23(1): 52-57.

Feng, M., G. Xiong, Z. Cao, G. Yang, S. Zheng, J. Qiu, L. You, L. Zheng, T. Zhang, Y. Zhao (2018). LAT2 regulates glutamine-dependent mTOR activation to promote glycolysis and chemoresistance in pancreatic cancer. *J Exp Clin Cancer Res.*, 12;37(1):274

Feral, C.C., N. Nishiya, C.A. Fenczik, H. Stuhlmann, M. Slepak, M., M.H. Ginsberg (2005). CD98hc (SLC3A2) mediates integrin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 355–360

Ferentz, A.E. y G. Wagner (2000). NMR spectroscopy: a multifaceted approach to macromolecular structure. *Q Rev Biophys*, 33(1), 29-65.

Fernandez, E., M. Jimenez-Vidal, M. Calvo, A. Zorzano, F. Tebar, M. Palacín, J. Chillarón (2006). The structural and functional units of heteromeric amino acid transporters. The heavy subunit rBAT dictates oligomerization of the heteromeric amino acid transporters. *J Biol Chem*, 281(36): 26552-26561.

Fernández, E., D. Torrents, J. Chillarón, R. Martín Del Rio, A. Zorzano, M. Palacín (2003). Basolateral LAT-2 has a major role in the transepithelial flux of L-cystine in the renal proximal tubule cell line OK. *J Am Soc Nephrol*, 14(4): 837-847.

Fernández-Leiro, R. y S.H.W. Scheres (2016). Unravelling biological macromolecules with cryo-electron microscopy. *Nature*, 537: 339.

Fitzgerald, G.A., D.S. Terry, A.L. Warren, M. Quick, J.A. Javitch, S.C Blanchard (2019). Quantifying secondary transport at single-molecule resolution. *Nature*, 575(7783):528-534

Focht, D., C. Neumann, J. Lyons, A. Eguskiza Bilbao, R. Blunck, L. Malinauskaite, I.O. Schwarz, J.A. Javitch, M. Quick, P. Nissen (2021). A non-helical region in transmembrane helix 6 of hydrophobic amino acid transporter MhsT mediates substrate recognition. *EMBO J*, 40: e105164.

Fogelstrand, P., C.C. Feral, R. Zargham, M.H. Ginsberg (2009). Dependence of proliferative vascular smooth muscle cells on CD98hc (4F2hc, SLC3A2). *J Exp Med*, 206(11): 2397-2406.

Fotiadis, D., Y. Kanai, M. Palacín (2013). The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters. *Mol Aspects Med*, 34(2-3): 139-158.

Forrest, L.R. y G. Rudnick (2009). The rocking bundle: a mechanism for ion-coupled solute flux by symmetrical transporters. *Physiology* 24, 377–386.

Fort, J., L.R. de la Ballina, H.E. Burghardt, C. Ferrer-Costa, J. Turnay, C. Ferrer-Orta, I. Uson, A. Zorzano, J. Fernández-Recio, M. Orozco, M. A. Lizarbe, I. Fita, M. Palacín (2007). The structure of human 4F2hc ectodomain provides a model for homodimerization and electrostatic interaction with plasma membrane. *J Biol Chem*, 282(43): 31444-31452.

Fuchs, BC. y B.P. Bode (2005). Amino acid transporters ASCT2 and LAT1 in cancer: partners in crime? *Semin Cancer Biol*, 15(4): 254-266.

Friesner, R.A., J.L. Banks, R.B. Murphy, T.A. Halgren, J.J. Klicic, D.T. Mainz, M.P. Repasky, E.H. Knoll, M. Shelley, J.K. Perry *et al* (2004). Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J Med Chem* 47: 1739-1749.

Fukasawa, Y., H. Segawa, J.Y. Kim, A. Chairoungdua, D.K. Kim, H. Matsuo, S.H. Cha, H. Endou, Y. Kanai (2000). Identification and characterization of a Na(+)-independent neutral amino acid transporter that associates with the 4F2 heavy chain and exhibits substrate selectivity for small neutral D- and L-amino acids. *J Biol Chem*, 275(13): 9690-9698

Gabriško, M., Š Janeček (2009). Looking for the ancestry of the heavy-chain subunits of heteromeric amino acid transporters rBAT and 4F2hc within the GH13 α -amylase family. *FEBS J*, 276, 7265-7278.

Gao, X., F. Lu, L. Zhou, S. Dang, L. Sun, X. Li, J. Wang, Y. Shi (2009). Structure and mechanism of an amino acid antiporter. *Science*, 324(5934): 1565-1568.

Gao, X., L. Zhou, X. Jiao, F. Lu, C. Yan, X. Zeng, J. Wang, Y. Shi (2010). Mechanism of substrate recognition and transport by an amino acid antiporter. *Nature*, 463(7282): 828-832.

Garaeva, A.A., A. Guskov, D.J. Slotboom, C. (2019). A one-gate elevator mechanism for the human neutral amino acid transporter ASCT2. *Nat Commun* 31;10(1):3427.

García-Cazorla A., A. Oyarzabal, J. Fort, C. Robles, E. Castejón, P. Ruiz-Sala, S. Bodoy, B. Merinero, A. Lopez-Sala, J. Dopazo, V. Nunes, M. Ugarte, R. Artuch, M. Palacín, P. Rodríguez-Pombo, P. Alcaide, R. Navarrete, P. Sanz, M. Font-Llitjós, M.A. Vilaseca, A. Ormaizabal, A. Pristoupilova, S.B. Agulló (2014) Two novel mutations in the BCKDK (branched-chain keto-acid dehydrogenase kinase) gene are responsible for a neurobehavioral deficit in two pediatric unrelated patients. *Hum Mutat*, 35 (4):470-477. doi:10.1002/humu.22513

Gasol, E., M. Jimenez-Vidal, J. Chillaron, A. Zorzano, M. Palacín (2004). Membrane topology of system xc- light subunit reveals a re-entrant loop with substrate-restricted accessibility. *J Biol Chem*, 279(30): 31228-31236.

Gilabert, J.F., D. Lecina, J. Estrada, V. Guallar (2018). Monte Carlo Techniques for Drug Design: The Success Case of PELE. "*Biomolecular Simulations in Structure-Based Drug Discovery*".

Gong, S., H. Richard, J.W. Foster (2003). YjdE (AdiC) is the arginine:agmatine antiporter essential for arginine-dependent acid resistance in Escherichia coli. *J Bacteriol*, 185(15): 4402-4409.

Timothy Grant, Alexis Rohou, Nikolaus Grigorieff. *cisTEM, user-friendly software for single-particle image processing Structural Biology and Molecular Biophysics 2018*

Grigorieff, N., S.C. Harrison (2011). Near-atomic resolution reconstructions of icosahedral viruses from electron cryo-microscopy. *Curr Opin Struct Biol*, 21(2), 265- 273.

Guan L., I.N. Smirnova, G. Verner, S. Nagamori, H.R. Kaback (2006). Manipulating phospholipids for crystallization of a membrane transport protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103:1723–1726.

Guntert, P. (1998). Structure calculation of biological macromolecules from NMR data. *Q Rev Biophys*, 31(2), 145-237

Stetsenko, A. y A. Guskov (2017). An Overview of the Top Ten Detergents Used for Membrane Protein Crystallization. *Crystals*, 7(7), 197

Gutmann, D.A.P., E. Mizohata, S. Newstead, S. Ferrandon, P.J.F. Henderson, H.W.V.A.N. Veen, B. Byrne (2007). A high-throughput method for membrane protein solubility screening: The ultracentrifugation dispersity sedimentation assay. *Protein Sci*, 16, 1422–1428.

Haining, Z., N. Kawai, K. Miyake, M. Okada, S. Okubo, X. Zhang, Z. Fei, T. Tamiya (2012). Relation of LAT1/4F2hc expression with pathological grade, proliferation and angiogenesis in human gliomas. *BMC Clin Pathol*, 12:4. doi:10.1186/1472-6890-12-4

Halgren, T.A., R.B. Murphy, R.A. Friesner, HS. Beard, L.L. Frye, W.T. Pollard, J.L. Banks (2004). Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. *J Med Chem*, 47: 1750-1759

Hammes, G.G., Y.C. Chang, T.G. Oas (2009). Conformational selection or induced fit: a flux description of reaction mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 13737 – 13741.

Hashimoto, A., T. Oka (1997). Free D-aspartate and D-serine in the mammalian brain and periphery. *Prog Neurobiol*, 52(4): 325-353.

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

Heckel, T., A. Broer, H. Wiesinger, F. Lang, S. Broer (2003). Asymmetry of glutamine transporters in cultured neural cells. *Neurochem Int*, 43 (4-5):289-298.

Hediger, M.A., B. Clemencon, R.E. Burrier, E.A. Bruford (2013). The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction. *Mol Aspects Med*, 34(2-3): 95-107

Hediger, M.A., M.F. Romero, J.B. Peng, A. Rolfs, H. Takanaga, E.A. Bruford (2004). The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteinsIntroduction. *Pflugers Arch*, 447(5): 465-468.

Hessa, T., N.M. Meindl-Beinker, A. Bernsel, H. Kim, Y. Sato, M. Lerch-Bader, I. Nilsson, S.H. White, G. von Heijne (2007). Molecular code for transmembrane-helix recognition by the Sec61 translocon. *Nature*, 450: 1026-1030

Helboe, L., J. Egebjerg, M. Moller, C. Thomsen (2003). Distribution and pharmacology of alanineserine- cysteine transporter 1 (asc-1) in rodent brain. *Eur J Neurosci*, 18(8): 2227-2238.

Hryc, C.F., D.H. Chen, W. Chiu (2011). Near-atomic-resolution cryo-EM for molecular virology. *Curr Opin Virol*, 1(2), 110-117.

Huang, S., D.E. Ingber (2005). Cell tension, matrix mechanics, and cancer development. *Cancer Cell*, 8(3): 175-176.

Ilgü, H., J.M. Jeckelmann, V. Gapsys, Z. Ucurum, B.L. de Groot, D. Fotiadis (2016). Insights into the molecular basis for substrate binding and specificity of the wild-type L-arginine/ agmatine antiporter AdiC. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 13;113(37):10358-63.

Isnard, A.D., D. Thomas, Y. Surdin-Kerjan (1996). The study of methionine uptake in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a new family of amino acid permeases. *J Mol Biol*, 262(4): 473- 484.

Iyer, R., C. Williams, C. Miller (2003). Arginine-agmatine antiporter in extreme acid resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 185(22): 6556-6561.

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

Jeckelmann, J. M., M. Palacín, D. Fotiadis (2011). A tool for the qualitative comparison of membrane-embedded and detergent-solubilized membrane protein structures in projection. *J Struct Biol*, 173(2): 375-381.

Jersin, R.A., D.S.P. Tallapragada, A. Madsen, L. Skartveit, E. Faere, A. McCann, L. Dyer, A. Willems, J.I. Bjune, M.S. Bjune, V. Våge, H.J. Nielsen, H.L. Thorsen, B.G. Nedrebo, C. Busch, V.M. Steen, M. Blüher, P. Jacobson, P.A. Svensson, J. Ferno, M. Rydén, P. Arner, O. Nygard, M. Clausnitzer, S. Ellingsen, L. Madsen, J.V. Sagen, G. Mellgren, S.N. Dankel (2021). Role of the Neutral Amino Acid Transporter SLC7A10 in Adipocyte Lipid Storage, Obesity, and Insulin Resistance. *Diabetes*, 70(3):680-695.

Jiang, L., N. Kon, T. Li, S.J. Wang, T. Su, H. Hibshoosh, R. Baer, W. Gu (2015). Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression. *Nature*, 520(7545): 57-62.

Jo, S., J.B. Lim, J.B. Klauda, W. Im (2009). CHARMM-GUI membrane builder for mixed bilayers and its application to yeast membranes. *Biophys. J.*, 97, 50–58 (2009).

Jo, S., T. Kim, W. Im (2007). Automated builder and database of protein/ membrane complexes for molecular dynamics simulations. *PLoS One* 2, e880.

Ju, T., M.L. Baker, W. Chiu (2007). Computing a family of skeletons of volumetric models for shape description. *Comput Aided Des*, 39(5), 352-360.

Jungnickel, K.E.J., J.L. Parker, S. Newstead (2018). Structural basis for amino acid transport by the CAT family of SLC7 transporters. *Nat Commun*, 7;9(1):550

Kageyama, T., M. Nakamura, A. Matsuo, Y. Yamasaki, Y. Takakura, M. Hashida, Y. Kanai, M. Naito, T. Tsuruo, N. Minato, S. Shimohama (2000). The 4F2hc/LAT1 complex transports LDOPA across the blood-brain barrier. *Brain Res*, 879(1-2): 115-121.

Kaira, K., N. Oriuchi, H. Imai, K. Shimizu, N. Yanagitani, N. Sunaga, T. Hisada, O. Kawashima, Y. Kamide, T. Ishizuka, Y. Kanai, T. Nakajima, M. Mori (2009). CD98 expression is associated with poor prognosis in resected non-small-cell lung cancer with lymph node metastases. *Ann Surg Oncol*, 16(12): 3473-3481

Kaira, K., N. Oriuchi, H. Imai, K. Shimizu, N. Yanagitani, N. Sunaga, T. Hisada, S. Tanaka, T. Ishizuka, Y. Kanai, H. Endou, T. Nakajima, M. Mori (2008). I-type amino acid transporter 1 and CD98 expression in primary and metastatic sites of human neoplasms. *Cancer Sci*, 99(12): 2380-2386.

Kaira, K., N. Oriuchi, T. Takahashi, K. Nakagawa, Y. Ohde, T. Okumura, H. Murakami, T. Shukuya, H. Kenmotsu, T. Naito, Y. Kanai, M. Endo, H. Kondo, T. Nakajima, N. Yamamoto (2011). L-type amino acid transporter 1 (LAT1) expression in malignant pleural mesothelioma. *Anticancer Res*, 31(12): 4075-4082.

Kampjut, D., J. Steiner, L.A. Sazanov (2021). Cryo-EM grid optimization for membrane proteins. *IScience*, 5;24(3):102139.

Kanai, Y., H. Endou (2001). Heterodimeric amino acid transporters: molecular biology and pathological and pharmacological relevance. *Curr Drug Metab*, 2 (4):339-354. doi:10.2174/1389200013338324

Kanai, Y., Y. Fukasawa, S.H. Cha, H. Segawa, A. Chairoungdua, D.K. Kim, H. Matsuo, J.Y. Kim, K. Miyamoto, E. Takeda, H. Endou (2000). Transport properties of a system y⁺L neutral and basic amino acid transporter. Insights into the mechanisms of substrate recognition. *J Biol Chem*, 275(27): 20787-20793.

Kanai, Y., H. Segawa, K. Miyamoto, H. Uchino, E. Takeda, H. Endou (1998). Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J Biol Chem*, 273(37): 23629-23632.

Kashiwagi, K., S. Shibuya, H. Tomitori, A. Kuraishi, K. Igarashi (1997). Excretion and uptake of putrescine by the PotE protein in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 272(10): 6318-6323.

Kau, K.S., A. Madayag, J.R Mantsch, M.D Grier, O. Abdulhameed, D.A. Baker (2008). Blunted cystine-glutamate antiporter function in the nucleus accumbens promotes cocaine-induced drug seeking. *Neuroscience*, 155(2):530–537

Kawate, T. y E. Gouaux (2006). Fluorescence-detection size-exclusion chromatography for precrystallization screening of integral membrane proteins. *Structure*, 14, 673–681.

Kazmier, K., D.P. Claxton, H.S. McHaourab (2017). Alternating access mechanisms of LeuT-fold transporters: trailblazing towards the promised energy landscapes. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 45, 100–108.

Khafizov, K., R. Staritzbichler, M. Stamm, L.R. Forrest (2010). A study of the evolution of inverted topology repeats from LeuT-fold transporters using AlignMe. *Biochemistry*, 49(50): 10702-10713.

Kim, J.Y., Y. Kanai, A. Chairoungdua, S.H. Cha, H. Matsuo, D.K. Kim, J. Inatomi, H. Sawa, Y. Ida, H. Endou (2001). Human cystine/glutamate transporter: cDNA cloning and upregulation by oxidative stress in glioma cells. *Biochim Biophys Acta*, 1512(2): 335-344.

Kinne, A., R. Schulein, G. Krause (2011). Primary and secondary thyroid hormone transporters. *Thyroid Res*, 4 Suppl 1: S7.

Klingenberg, M. (2005). Ligand-protein interaction in biomembrane carriers. The induced transition fit of transport catalysis. *Biochemistry* 44: 8563 – 8570

Knopfel, E.B., C. Vilches, S.M.R. Camargo, E. Errasti-Murugarren, A. Staubli, C. Mayayo, F.L. Munier, N. Miroschnikova, N. Poncet, A. Junza *et al* (2019). Dysfunctional LAT2 Amino Acid Transporter Is Associated With Cataract in Mouse and Humans. *Front Physiol*, 10: 688.

Kobayashi, K., A. Ohnishi, J. Promsuk, S. Shimizu, Y. Kanai, Y. Shiokawa, M. Nagane (2008). Enhanced tumor growth elicited by L-type amino acid transporter 1 in human malignant glioma cells. *Neurosurgery*, 62(2): 493-503; discussion 503-494.

Kotov, V.; K. Bartels, K. Veith, I. Josts, U.K.T Subhramanyam, C. Günther, J. Labahn, T.C. Marlovits, I. Moraes, H. Tidow, *et al* (2019). High-throughput stability screening for detergent-solubilized membrane proteins. *Sci. Rep.*, 9, 1–19.

Kowalczyk, L., M. Ratera, A. Paladino, P. Bartoccioni, E. Errasti-Murugarren, E. Valencia, G. Portella, S. Bial, A. Zorzano, I. Fita, M. Orozco, X. Carpena, J.L. Vazquez-Ibar, M. Palacín (2011). Molecular basis of substrate-induced permeation by an amino acid antiporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(10): 3935-3940

Krause, G. y K.M. Hinz (2017). Thyroid hormone transport across L-type amino acid transporters: what can molecular modelling tell us? *Mol Cell Endocrinol*, 458:68–75.

Krogh, A., A. Krogh, B. Larsson, G. von Heijne, E.L. Sonnhammer (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.*, 305, 567–580.

Kucukelbir, A., F.J. Sigworth, H.D. Tagare (2014). Quantifying the Local Resolution of Cryo-EM Density Maps. *Nature Methods*, 11(1):63-5.

Kühlbrandt, W. (2014). The Resolution Revolution. *Science*, 343(6178): 1443.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.

Lecina, D., J.F. Gilabert, V. Guallar (2017). Adaptive simulations, towards interactive protein-ligand modeling. *Sci Rep*, 7: 8466.

Lee, J. *et al* (2016). CHARMM-GUI input generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM simulations using the CHARMM36 additive force field. *J. Chem. Theory Comput*, 12, 405–413.

Lee, T.H., A. Mitchell, S. Liu Lau, H. An H, P. Rajeaskariah, V. Wasinger, M. Raftery, K. Bryant, N. Tedla (2013). Glycosylation in a mammalian expression system is critical for the production of functionally active leukocyte immunoglobulin-like receptor A3 protein. *J Biol Chem.*, 288(46):32873-85.

Lee, Y., P. Wiriyasermkul, C. Jin, L. Quan, R. Ohgaki, S. Okuda, T. Kusakizako, T. Nishizawa, K. Oda, R. Ishitani *et al* (2019). Cryo-EM structure of the human L-type amino acid transporter 1 in complex with glycoprotein CD98hc. *Nat Struct Mol Biol* 26: 510-517.

Leke, R., A. Schousboe (2016). The glutamine transporters and their role in the glutamate/GABA-glutamine cycle. *Adv Neurobiol* 13:223-257.

LeVine, M.V., H. Weinstein (2014). NbIT—a new information theory-based analysis of allosteric mechanisms reveals residues that underlie function in the leucine transporter LeuT. *PLoS Comput Biol*, 10: e1003603.

Lewerenz, J., S.J. Hewett, Y. Huang, M. Lambros, P.W. Gout, P.W. Kalivas, A. Massie, I. Smolders, A. Methner, M. Pergande, S.B. Smith, V. Ganapathy, P. Maher (2013). The cystine/glutamate antiporter system x(c)(-) in health and disease: from molecular mechanisms to novel therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signa,l* 18(5):522–555

Lo, M., V. Ling, Y.Z. Wang, P.W. Gout (2008). The xc- cystine/glutamate antiporter: a mediator of pancreatic cancer growth with a role in drug resistance. *Br J Cancer*, 99(3): 464-472.

Lodish, H., A. Berk, S.L. Zipursky., P. Matsudaira, D. Baltimore, J. Darnell (2000). Cotransport by Symporters and Antiporters. *Molecular Cell Biology* (4^º edición). Nueva York: W.H. Freeman Freeman. ISBN 0-7167-3136-3. Sección 15.6

Loignon, M. *et al* (2008). Stable high volumetric production of glycosylated human recombinant IFNalpha2b in HEK293 cells. *BMC Biotechnol*, Aug 27; 8():65.

Lomize, A.L., I.D. Pogozheva, M.A. Lomize, H.I. Mosberg, (2006) Positioning of proteins in membranes: a computational approach. *Protein Sci*, 15, 1318–1333.

Ma, J., H.T. Lei, F.E. Reyes, S. Sanchez-Martinez, M.F. Sarhan, J. Hattne, T. Gonen (2019). Structural basis for substrate binding and specificity of a sodium-alanine symporter AgcS. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116: 2086-2090.

Makowske, M. y H.N. Christensen (1982). Hepatic transport system interconverted by protonation from service for neutral to service for anionic amino acids. *J Biol Chem*, 257(24): 14635-14638.

Mastroberardino, L., B. Spindler, R. Pfeiffer, P.J. Skelly, J. Loffing, C.B. Shoemaker, F. Verrey (1998). Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family. *Nature*, 395(6699): 288-291

Matsuo, H., Y. Kanai, J.Y. Kim, A. Chairoungdua, D.K. Kim, J. Inatomi, Y. Shigeta, H. Ishimine, S. Chaekuntode, K. Tachampa, H.W. Choi, E. Babu, J. Fukuda, H. Endou (2002). Identification of a novel Na⁺-independent acidic amino acid transporter with structural similarity to the member of a heterodimeric amino acid transporter family associated with unknown heavy chains. *J Biol Chem*, 277(23): 21017-21026.

McGale, E.H., I.F. Pye, C. Stonier, E.C. Hutchinson, G.M. Aber (1977). Studies of the inter-relationship between cerebrospinal fluid and plasma amino acid concentrations in normal individuals. *J Neurochem*, 29 (2):291-297. doi:10.1111/j.1471-4159.1977.tb09621.x.

McLaughlin, S. y A. Aderem (1995). The myristoyl-electrostatic switch: a modulator of reversible protein-membrane interactions. *Trends Biochem Sci*, 20(7): 272-276.

McMullan, G., A.R. Faruqi, D. Clare, R. Henderson (2014). Comparison of optimal performance at 300keV of three direct electron detectors for use in low dose electron microscopy. *Ultramicroscopy*, 147: 156-163.

Meier, C., Z. Ristic, S. Klauser, F. Verrey (2002). Activation of system L heterodimeric amino acid exchangers by intracellular substrates. *EMBO J*, 21(4): 580-589.

Meury, M., M. Costa, D. Harder, M. Stauffer, J.M. Jeckelmann, B. Brühlmann, A. Rosell, H. Ilgü, K. Kovar, M. Palacín, Fotiadis (2014). Detergent-induced stabilization and improved 3D map of the human heteromeric amino acid transporter 4F2hc-LAT2. *D.PLoS One*, Oct 9;9(10):e109882.

Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Erlich (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1986;51 Pt 1:263-73.

Mykkanen, J., D. Torrents, M. Pineda, M. Camps, M.E. Yoldi, N. Horelli-Kuitunen, K. Huoponen, M. Heinonen, J. Oksanen, O. Simell, M.L. Savontaus, A. Zorzano, M. Palacín, P. Aula (2000). Functional analysis of novel mutations in $\gamma(+)$ LAT-1 amino acid transporter gene causing lysinuric protein intolerance (LPI). *Hum Mol Genet*, 9(3): 431-438.

Nagamori, S., P. Wiriyasermkul, ME. Guarch, H. Okuyama, S. Nakagomi, K. Tadagaki, Y. Nishinaka, S. Bodoy, K. Takafuji, S. Okuda, J. Kurokawa, R. Ohgaki, V. Nunes, M. Palacín, Y. Kanai (2016). Novel cystine transporter in renal proximal tubule identified as a missing partner of cystinuria-related plasma membrane protein rBAT/SLC3A1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(3): 775-780.

- Nakamura, E., M. Sato, H. Yang, F. Miyagawa, M. Harasaki, K. Tomita, S. Matsuoka, A. Noma, K. Iwai, N. Minato (1999). 4F2 (CD98) heavy chain is associated covalently with an amino acid transporter and controls intracellular trafficking and membrane topology of 4F2 heterodimer. *J Biol Chem*, 274(5): 3009-3016.
- Nakauchi, J., H. Matsuo, D.K. Kim, A. Goto, A. Chairoungdua, S.H. Cha, J. Inatomi, Y. Shiokawa, K. Yamaguchi, I. Saito, H. Endou, Y. Kanai (2000). Cloning and characterization of a human brain Na(+)-independent transporter for small neutral amino acids that transports D-serine with high affinity. *Neurosci Lett*, 287(3): 231-235.
- Nicklin, P., P. Bergman, B. Zhang, E. Triantafellow, H. Wang, B. Nyfeler, H. Yang, M. Hild, C. Kung, C. Wilson, V.E. Myer, J.P. MacKeigan, J.A. Porter, Y.K. Wang, L.C. Cantley, P.M. Finan, L.O. Murphy (2009). Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell*, 136(3): 521-534.
- Nyola, A., N.K. Karpowich, J. Zhen, J. Marden, M.E. Reith, D.N. Wang (2010). Substrate and drug binding sites in LeuT. *Curr Opin Struct Biol*, 20: 415 – 422
- Oda K., Y. Lee, P. Wiriyasermkul, Y. Tanaka, M. Takemoto, K. Yamashita, S. Nagamori, T. Nishizawa, O. Nureki (2020). Consensus mutagenesis approach improves the thermal stability of system x c - transporter, xCT, and enables cryo-EM analyses. *Protein Sci*, 29(12):2398-2407.
- Ohgimoto, S., N. Tabata, S. Suga, M. Tsurudome, M. Kawano, M. Nishio, K. Okamoto, H. Komada, N. Watanabe, Y. Ito (1996). Regulation of human immunodeficiency virus gp160-mediated cell fusion by antibodies against fusion regulatory protein 1. *J Gen Virol*, 77 (Pt 11): 2747-2756.
- Oyanagi, K., M. Nagao (1998). Lysinuric protein intolerance and other cationic aminoacidurias. *Ryoikibetsu Shokogun Shirizu*, (19 Pt 2): 562-564.
- Palacín, M., E. Fernández, J. Chillarón, A. Zorzano (2001). The amino acid transport system bo,+ and cystinuria. *Mol. Membr. Biol.*, 18, 21-26.
- Palacín, M. y Y. Kanai (2004). The ancillary proteins of HATs: SLC3 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch*, 447(5): 490-494.
- Palacín, M., V. Nunes, M. Font-Llitjos, M. Jimenez-Vidal, J. Fort, E. Gasol, M. Pineda, L. Feliubadalo, J. Chillaron, A. Zorzano (2005). The genetics of heteromeric amino acid transporters. *Physiology (Bethesda)*, 20: 112-124.
- Park, S.Y., J.K. Kim, I.J. Kim, B.K. Choi, K.Y. Jung, S. Lee, K.J. Park, A. Chairoungdua, Y. Kanai, H. Endou, D.K. Kim (2005). Reabsorption of neutral amino acids mediated by amino acid transporter LAT2 and TAT1 in the basolateral membrane of proximal tubule. *Arch Pharm Res*, 28(4): 421-432.
- Parmacek, M.S., B.A. Karpinski, K.M. Gottesdiener, C.B. Thompson, J.M. Leiden (1989). Structure, expression and regulation of the murine 4F2 heavy chain. *Nucleic Acids Res*, 17(5): 1915-1931.

Perez, C., C. Koshy, O. Yildiz, C. Ziegler (2012). Alternating-access mechanism in conformationally asymmetric trimers of the betaine transporter BetP. *Nature*, 490(7418): 126-130.

Perry, T.L., S. Hansen, J. Kennedy (1975). CSF amino acids and plasma--CSF amino acid ratios in adults. *J Neurochem*, 24 (3):587-589.

Pfeiffer, R., B. Spindler, J. Loffing, P.J. Skelly, C.B. Shoemaker, F. Verrey (1998). Functional heterodimeric amino acid transporters lacking cysteine residues involved in disulfide bond. *FEBS Lett*, 439(1-2): 157-162

Pfeiffer, R., G. Rossier, B. Spindler, C. Meier, L. Kuhn, F. Verrey (1999). Amino acid transport of γ -L-type by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of the glycoprotein-associated amino acid transporter family. *EMBO J*, 18(1): 49-57

Pineda, M., E. Fernández, D. Torrents, R. Estevez, C. López, M. Camps, J. Lloberas, A. Zorzano, M. Palacín (1999). Identification of a membrane protein, LAT-2, that Co-expresses with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transport activity with broad specificity for small and large zwitterionic amino acids. *J Biol Chem*, 274(28): 19738-19744.

Pineda, M., M. Font, M.T. Bassi, M. Manzoni, G. Borsani, V. Marigo, E. Fernández, R.M. Ríó, J. Purroy, A. Zorzano, V. Nunes, M. Palacín (2004). The amino acid transporter asc-1 is not involved in cystinuria. *Kidney Int.*, 66(4):1453-64.

Pujadas, G. y J. Palau (2001). Evolution of alpha-amylases: architectural features and key residues in the stabilization of the (beta/alpha) (8) scaffold. *Mol Biol Evol*, 18(1): 38-54.

Prager, G.W., C.C. Feral, C. Kim, J. Han, M.H. Ginsberg (2007) CD98hc (SLC3A2) interaction with the integrin beta subunit cytoplasmic domain mediates adhesive signaling. *J Biol Chem*, 282(33):24477–24484.

Punjani, A., J.L. Rubinstein, D.J. Fleet, M.A. Brubaker. cryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination. *Nat Methods.*, 14(3):290-296

Quackenbush, E., M. Clabby, K.M. Gottesdiener, J. Barbosa, N.H. Jones, J.L. Strominger, S. Speck, J.M. Leiden (1987). Molecular cloning of complementary DNAs encoding the heavy chain of the human 4F2 cell-surface antigen: a type II membrane glycoprotein involved in normal and neoplastic cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(18): 6526-6530.

Quick, M., A.M. Abramyan, P. Wiryasermkul, H. Weinstein, L. Shi, J.A. Javitch (2018). The LeuT-fold neurotransmitter: sodium symporter MhsT has two substrate sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(34):E7924–e7931.

Reddy, P., L. Liu, D. Adhikari, K. Jagarlamudi, S. Rajareddy, Y. Shen, C. Du, W. Tang, T. Hamalainen, S. L. Peng, Z.J. Lan, A.J. Cooney, I. Huhtaniemi, K. Liu (2008). Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science*, 319(5863): 611-613.

Reig, N., J. Chillarón, P. Bartoccioni, E. Fernández, A. Bendahan, A. Zorzano, B. Kanner, M. Palacín, J. Bertran (2002). The light subunit of system b(o,+)⁺ is fully functional in the absence of the heavy subunit. *EMBO J*, 21(18): 4906-4914.

Ressl, S., A.C. Terwisscha van Scheltinga, C. Vorrhein, V. Ott, C. Ziegler (2009). Molecular basis of transport and regulation in the Na⁽⁺⁾/betaine symporter BetP. *Nature*, 458(7234): 47-52.

Rosell, A., M. Meury, E. Álvarez-Marimon, M. Costa, L. Pérez-Cano, A. Zorzano, J. Fernández-Recio, M. Palacín, D. Fotiadis (2014). Structural bases for the interaction and stabilization of the human amino acid transporter LAT2 with its ancillary protein 4F2hc. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(8): 2966-2971

Rosenberg, D., S. Artoul, A.C. Segal, G. Kolodney, I. Radzishovsky, E. Dikopoltsev, V.N. Foltyn, R. Inoue, H. Mori, J.M. Billard, H. Wolosker (2013). Neuronal D-serine and glycine release via the Asc-1 transporter regulates NMDA receptor-dependent synaptic activity. *J Neurosci* 33(8):3533–3544.

Rossier, G., C. Meier, C. Bauch, V. Summa, B. Sordat, F. Verrey, L.C. Kuhn (1999). LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine. *J Biol Chem*, 274(49): 34948-34954.

Russ, W.P. y D.M. Engelman (2000). The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association. *J Mol Biol*, 296(3): 911-919.

Rutter A.R., R.L. Fradley, E.M. Garrett, K.L. Chapman, J.M. Lawrence, T.W. Rosahl, S. Patel (2007) Evidence from gene knockout studies implicates Asc-1 as the primary transporter mediating d-serine reuptake in the mouse CNS. *Eur J Neuroscience*, 25(6):1757-66.

Safory, H., S. Neame, Y. Shulman, S. Zubedat, I. Radzishovsky, D. Rosenberg, H. Sason, S. Engelender, A. Avital, S. Hülsmann, J. Schiller, H. Wolosker (2015). The alanine-serine-cysteine-1 (Asc-1) transporter controls glycine levels in the brain and is required for glycinergic inhibitory transmission. *EMBO Rep*, 16 (5):590-598.

Sanders, C.R. y J.K. Myers (2004). Disease-related misassembly of membrane proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 33: 25-51.

Sason, H., J.M. Billard, G.P. Smith, H. Safory, S. Neame, E. Kaplan, D. Rosenberg, S. Zubedat, V.N. Foltyn, C.T. Christoffersen, C. Bundgaard, C. Thomsen, A. Avital, K.V. Christensen, H. Wolosker (2017). Asc-1 transporter regulation of synaptic activity via the tonic release of d-Serine in the forebrain. *Cereb Cortex*, 27 (2):1573–158

Sastry, G.M., M. Adzhigirey, T. Day, R. Annabhimoju, W. Sherman (2013). Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 27, 221–234.

Sato, H., M. Tamba, T. Ishii, S. Bannai (1999). Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. *J Biol Chem*, 274(17): 11455-11458.

Scalise M.F., L. Pochini, M. Galluccio, L. Console, C. Indiveri (2020). Glutamine transporters as pharmacological targets: From function to drug design. *Asian J Pharm Sci*, 15(2): 207–219.

Schlessinger, A., S.W. Yee, A. Sali, K.M. Giacomini (2013). SLC classification: an update. *Clin Pharmacol Ther*, 94(1): 19-23.

Sebastio, G., M.P. Sperandeo, G. Andria (2011). Lysinuric protein intolerance: reviewing concepts on a multisystem disease. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 157C(1): 54-62.

Segawa, H., Y. Fukasawa, K. Miyamoto, E. Takeda, H. Endou, Y. Kanai (1999). Identification and functional characterization of a Na⁺-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J Biol Chem*, 274(28): 19745-19751.

Seib, T.M., S.A. Patel, R.J. Bridges (2011). Regulation of the system x(C)- cystine/glutamate exchanger by intracellular glutathione levels in rat astrocyte primary cultures. *Glia*, 59(10): 1387- 1401.

Seiler, A., M. Schneider, H. Forster, S. Roth, E.K. Wirth, C. Culmsee, N. Plesnila, E. Kremmer, O. Radmark, W. Wurst, G.W. Bornkamm, U. Schweizer, M. Conrad (2008). Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death. *Cell Metab*, 8(3): 237-248.

Senes, A., D.E. Engel, W.F. DeGrado (2004). Folding of helical membrane proteins: the role of polar, GxxxG-like and proline motifs. *Curr Opin Struct Biol*, 14(4): 465-479.

Senes, A., M. Gerstein, D.M. Engelman (2000). Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with betabranched residues at neighboring positions. *J Mol Biol*, 296(3): 921-936.

Sengupta, S., T. R. Peterson, D.M. Sabatini (2010). Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol Cell*, 40(2): 310-322.

Serna, M. (2019). Hands on Methods for High Resolution Cryo-Electron Microscopy Structures of Heterogeneous Macromolecular Complexes *Front. Mol. Biosci.*, 15 May.

Shaffer, P.L., A. Goehring, A. Shankaranarayanan, E. Gouaux (2009). Structure and mechanism of a Na⁺-independent amino acid transporter. *Science*, 325(5943): 1010-1014.

Shchors, K. y G. Evan (2007). Tumor angiogenesis: cause or consequence of cancer? *Cancer Res*, 67(15): 7059-7061

- Shi, L., M. Quick, Y. Zhao, H. Weinstein, J.A. Javitch. The mechanism of a neurotransmitter: sodium symporter--inward release of Na⁺ and substrate is triggered by substrate in a second binding site (2008). *Mol Cell.*, 30(6):667-77
- Simell O. (2002). Lysinuric protein intolerance and other cationic aminoacidurias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Vogelstein B, eds. *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease (OMMBID)*. New York, NY: McGraw-Hill, Chap 192. 4933-4956.
- Slotboom, D.J., R.H. Duurkens, K. Olieman, G.B. Erkens (2008). Static light scattering to characterize membrane proteins in detergent solution. *Methods* 2008, 46, 73–82.
- Smyth, M. S. y Martin, J. H. (2000). X ray crystallography. *Mol Pathol*, 53(1), 8-14.
- Sonoda, Y., S. Newstead, N.J. Hu, Y. Alguel, E. Nji, K. Beis, S. Yashiro, C. Lee, J. Leung, A.D. Cameron *et al* (2011). Benchmarking Membrane Protein Detergent Stability for Improving Throughput of High-Resolution X-ray Structures. *Structure*, 19, 17–25.
- Strop, P.; A.T. Brunger (2005). Refractive index-based determination of detergent concentration and its application to the study of membrane proteins. *Protein Sci.*, 14, 2207–2211.
- Suga, S., M. Tsurudome, M. Ito, S. Ohgimoto, N. Tabata, M. Nishio, M. Kawano, H. Komada, M. Sakurai, Y. Ito (1997). Human immunodeficiency virus type-1 envelope glycoprotein gp120 induces expression of fusion regulatory protein (FRP)-1/CD98 on CD4⁺ T cells: a possible regulatory mechanism of HIV-induced syncytium formation. *Med Microbiol Immunol*, 185(4): 237-243.
- Takeuchi S., Wada K., Toyooka T., Shinomiya N., Shimazaki H., Nakanishi K., Nagatani K., Otani N., Osada H., Uozumi Y., Matsuo H., Nawashiro H. (2013). Increased xCT expression correlates with tumor invasion and outcome in patients with glioblastomas. *Neurosurgery*, 72, 33-41.
- Tang, L., L. Bai, W.H. Wang, T. Jiang (2010). Crystal structure of the carnitine transporter and insights into the antiport mechanism. *Nat Struct Mol Biol*, 17(4): 492-496.
- Tărlungeanu, D.C., E. Deliu, C.P. Dotter, M. Kara, P.C. Janiesch, M. Scalise, M. Galluccio, M. Tesulov, E. Morelli, F.M. Sonmez, K. Bilguvar, R. Ohgaki, Y. Kanai, A. Johansen, S. Esharif, T. Ben-Omran, M. Topcu, A. Schlessinger, C. Indiveri, K.E. Duncan, A.O. Caglayan, M. Gunel, J.G. Gleeson, G. Novarino (2016). Impaired amino acid transport at the blood brain barrier Is a cause of autism spectrum disorder. *Cell*, 167 (6):1481-1494.e1418. doi:10.1016/j.cell.2016.11.013.
- Tate, C.G., J. Haase, C. Baker, M. Boorsma, F. Magnani, Y. Vallis, D.C. Williams (2003). Comparison of seven different heterologous protein expression systems for the production of the serotonin transporter. *Biochim Biophys Acta*, 17;1610(1):141-53.
- Tate, S.S., N. Yan, S. Udenfriend (1992). Expression cloning of a Na⁽⁺⁾-independent neutral amino acid transporter from rat kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(1): 1-5.

- Tomi, M., M. Mori, M. Tachikawa, K. Katayama, T. Terasaki and K. Hosoya (2005). L-type amino acid transporter 1-mediated L-leucine transport at the inner blood-retinal barrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46(7): 2522-2530.
- Torrents, D., R. Estevez, M. Pineda, E. Fernández, J. Lloberas, Y. B. Shi, A. Zorzano, M. Palacín (1998). Identification and characterization of a membrane protein (γ +L amino acid transporter1) that associates with 4F2hc to encode the amino acid transport activity γ +L. A candidate gene for lysinuric protein intolerance. *J Biol Chem*, 273(49): 32437-32445.
- Torrents, D., J. Mykkanen, M. Pineda, L. Feliubadalo, R. Estevez, R. de Cid, P. Sanjurjo, A. Zorzano, V. Nunes, K. Huoponen, A. Reinikainen, O. Simell, M.L. Savontaus, P. Aula, M. Palacín (1999). Identification of SLC7A7, encoding γ +LAT-1, as the lysinuric protein intolerance gene. *Nat Genet*, 21(3): 293-296.
- Tsai, M.F., Y. Fang, C. Miller (2012). Sided functions of an arginine-arginine antiporter oriented in liposomes. *Biochemistry*, 51(8): 1577-1585.
- Tsumura, H., N. Suzuki, H. Saito, M. Kawano, S. Otake, Y. Kozuka, H. Komada, M. Tsurudome, Y. Ito (2003). The targeted disruption of the CD98 gene results in embryonic lethality. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308, 847–851.
- Turnay, J., J. Fort, N. Olmo, A. Santiago-Gomez, M. Palacín, M.A. Lizarbe (2011). Structural characterization and unfolding mechanism of human 4F2hc ectodomain. *Biochim Biophys Acta*, 1814(5): 536-544.
- Vagenende, V., M.G. Yap, B.L. Trout (2009). Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. *Biochemistry*, 48(46):11084-96.
- Velankar, S., Y. Alhroub, C. Best, S. Caboche, M.J. Conroy, J.M. Dana, M.A. Fernández Montecelo, G. Van Ginkel, A. Golovin, S.P. Gore, A. Gutmanas, P. Haslam, P.M. Hendrickx, E. Heuson, M. Hirshberg, M. John, I. Lagerstedt, S. Mir, L.E. Newman, T.J. Oldfield, A. Patwardhan, L. Rinaldi, G. Sahni, E. Sanz-García, S. Sen, R. Slowley, A. Suárez-Uruena, G.J. Swaminathan, M.F. Symmons, W.F. Vranken, M. Wainwright, G.J. Kleywegt (2012). PDB: Protein Data Bank in Europe. *Nucleic Acids Res*, 40(Database issue), D445-452.
- Verrey, F., E.I. Closs, C.A. Wagner, M. Palacín, H. Endou, Y. Kanai (2004). CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch*, 447(5): 532-542.
- Verrey, F., D.L. Jack, I.T. Paulsen, M.H. Saier Jr, R. Pfeiffer, R. (1999). New glycoprotein-associated amino acid transporters. *J. Memb. Biol.* 172, 181-192.
- Verrey, F., C. Meier, G. Rossier, L.C. Kühn (2000). Glycoprotein-associated amino acid exchangers: broadening the range of transport specificity. *Pflugers Arch.* 440, 503–512.

Vilches, C., E. Boiadjeva-Knopfel, S. Bodoy, S. Camargo, M. López de Heredia, E. Prat, A. Ormazabal, R. Artuch, A. Zorzano, F. Verrey *et al* (2018) Cooperation of Antiporter LAT2/CD98hc with Uniporter TAT1 for Renal Reabsorption of Neutral Amino Acids. *J Am Soc Nephrol* 29: 1624-1635.

Walter, J.D., M. Sawicka, R. Dutzler (2019). Cryo-EM structures and functional characterization of murine Slc26a9 reveal mechanism of uncoupled chloride transport. *Elife*, 8:e46986.

Wang, Q., J. Holst. (2015) L-type amino acid transport and cancer: targeting the mTORC1 pathway to inhibit neoplasia. *Am J Cancer Res*, 5 (2015), pp. 1281-1294.

Wells, R. G. y M. A. Hediger (1992). Cloning of a rat kidney cDNA that stimulates dibasic and neutral amino acid transport and has sequence similarity to glucosidases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(12): 5596-5600.

Weyand, S., T. Shimamura, S. Yajima, S. Suzuki, O. Mirza, K. Krusong, E.P. Carpenter, N.G. Rutherford, J.M. Hadden, J. O'Reilly, P. Ma, M. Saidijam, S.G. Patching, R.J. Hope, H.T. Norbertczak, P.C. Roach, S. Iwata, P.J. Henderson, A.D. Cameron (2008). Structure and molecular mechanism of a nucleobase-cation-symport-1 family transporter. *Science*, 322(5902): 709-713

Widdows, K.L., N. Panitchob, I.P. Crocker, C.P. Please, M.A. Hanson, C.P. Sibley, E.D. Johnstone, B.G. Sengers, R.M. Lewis, J.D. Glazier (2015). Integration of computational modeling with membrane transport studies reveals new insights into amino acid exchange transport mechanisms. *FASEB J* 29 (6):2583-2594. doi:10.1096/fj.14-267773

Wolf, D.A., S. Wang, M.A. Panzica, N.H. Bassily, N.L. Thompson (1996). Expression of a highly conserved oncofetal gene, TA1/E16, in human colon carcinoma and other primary cancers: homology to *Schistosoma mansoni* amino acid permease and *Caenorhabditis elegans* gene products. *Cancer Res*, 56(21): 5012-5022.

Wu, E.L. *et al* (2014). CHARMM-GUI membrane builder toward realistic biological membrane simulations. *J. Comput. Chem.* 35, 1997–2004.

Wu D., T.N. Grund, S. Welsch, D.J. Mills, M. Michela, S. Safarianamand H. Michel (2020). Structural basis for amino acid exchange by a human heteromeric amino acid transporter. *PNAS* 1;117(35):2 1281-21287.

Xi, Z.X., D.A. Baker, H. Shen, D.S Carson, P.W. Kalivas (2002a). Group II metabotropic glutamate receptors modulate extracellular glutamate in the nucleus accumbens. *J Pharmacol Exp Ther*, 300:162–171.

Xi, Z.X., S. Ramamoorthy, D.A. Baker, H. Shen, D.J. Samuvel, P.W. Kalivas (2002b). Modulation of group II metabotropic glutamate receptor signaling by chronic cocaine. *J Pharmacol Exp Ther*, 303:608–615.

- Xie, X., T. Dumas, L. Tang, T. Brennan, T. Reeder, W. Thomas, R.D. Klein, J. Flores, B.F. O'Hara, H.C. Heller, P. Franken (2005). Lack of the alanine-serine-cysteine transporter 1 causes tremors, seizures, and early postnatal death in mice. *Brain Res*, 1052(2): 212-221.
- Yamashita, A., S.K. Singh, T. Kawate, Y. Jin y E. Gouaux (2005). Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters. *Nature*, 437(7056): 215-223
- Yan, N., R. Mosckovitz, S. Udenfriend, S.S. Tate (1992). Distribution of mRNA of a Na⁽⁺⁾-independent neutral amino acid transporter cloned from rat kidney and its expression in mammalian tissues and *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 9982–9985.
- Yan, R., X. Zhao, J. Lei, Q. Zhou (2019) Structure of the human LAT1-4F2hc heteromeric amino acid transporter complex. *Nature* 568: 127-130.
- Yan, R., Y. Li, Y. Shi, J. Zhou, J. Lei, J. Huang, Q. Zhou (2020a). Cryo-EM structure of the human heteromeric amino acid transporter b(0,+)_{AT}-rBAT. *Sci Adv*, 6: eaay6379
- Yan, R., J. Zhou, Y. Li, J. Lei, Q. Zhou (2020b). Structural insight into the substrate recognition and transport mechanism of the human LAT2-4F2hc complex. *Cell Discov* 6: 82
- Yanagida, O., Y. Kanai, A. Chairoungdua, D.K. Kim, H. Segawa, T. Nii, S.H. Cha, H. Matsuo, J. Fukushima, Y. Fukasawa, Y. Tani, Y. Taketani, H. Uchino, J.Y. Kim, J. Inatomi, I. Okayasu, K. Miyamoto, E. Takeda, T. Goya, H. Endou (2001). Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim Biophys Acta*, 1514(2): 291-302.
- Yang, C. R. y Svensson K. A. (2008). Allosteric modulation of NMDA receptor via elevation of brain glycine and D-serine: the therapeutic potentials for schizophrenia. *Pharmacol. Ther.*, 120, 317–332.
- Yang, J., Y. Zhang (2015). I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res.*, 43, W174–81 (2015).
- Yu X., L. Jin, Z.H. Zhou (2008) 3.88 Å structure of cytoplasmic polyhedrosis virus by cryo-electron microscopy. *Nature*, 453, 415-149.
- K. Zhang (2016). Gctf: Real-time CTF determination and correction. *J Struct Biol.* 193, 1–12.
- Zheng, S.Q. *et al* (2017) MotionCor2: anisotropic correction of beam-induced motion for improved cryo-electron microscopy. *Nat Meth.* 14, 331–332.
- Zhou, Z. H. (2008). Towards atomic resolution structural determination by single-particle cryo-electron microscopy. *Curr Opin Struct Biol*, 18(2), 218-228.
- Zhou, Z. H. (2011). Atomic resolution cryo electron microscopy of macromolecular complexes. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 82, 1-35.

Zivanov, J. *et al* (2018). New tools for automated high-resolution cryo-EM structure determination in RELION-3. *Elife*. 7, 163.

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

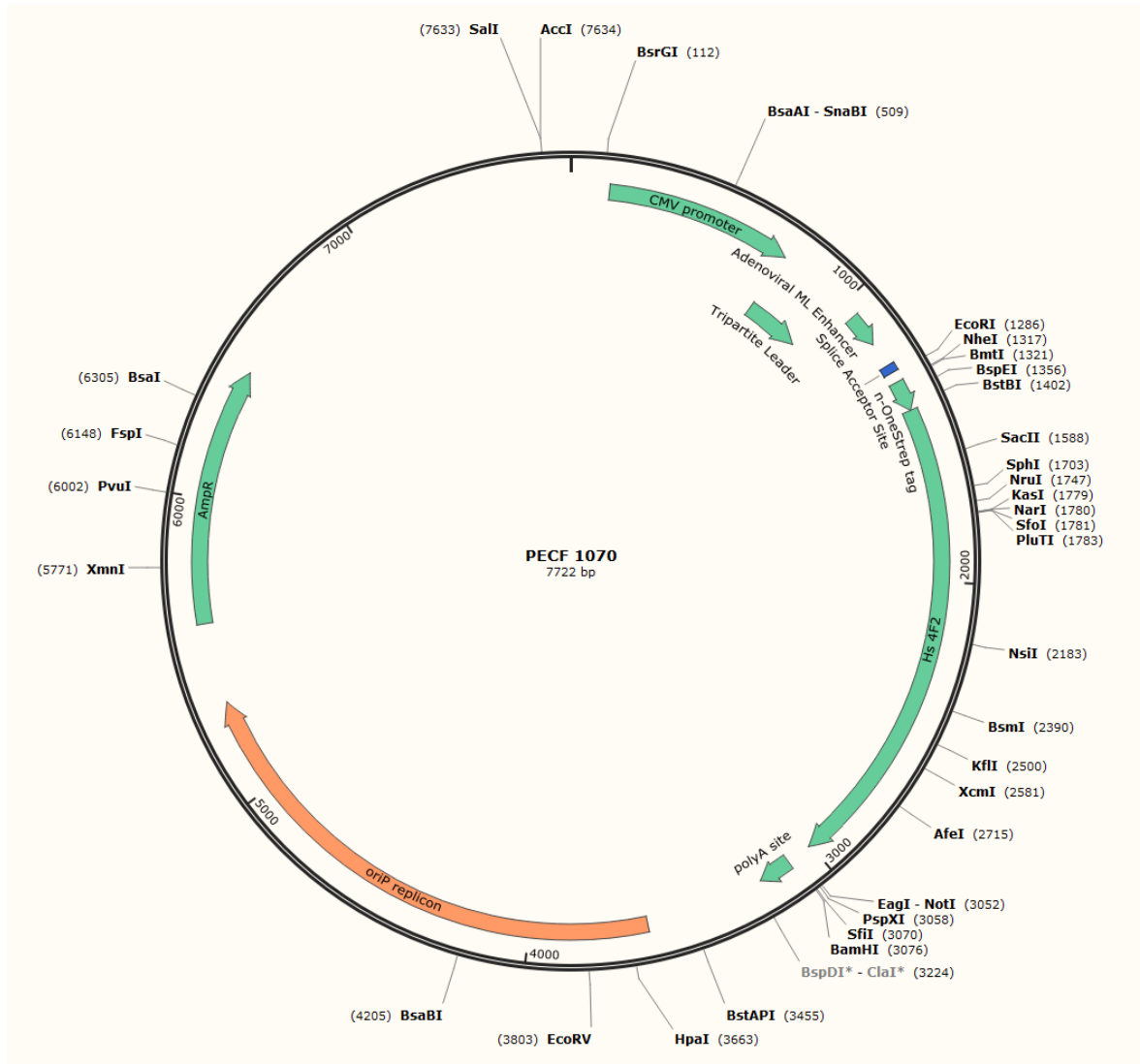




Figura suplementaria 1: Representación de los plásmidos empleados. A) Plásmido formado por el vector pPEU22TT y el inserto 4F2hc, nombrado como 1070. B) Plásmido formado por el vector pPEU4xTT y el inserto LAT2 nombrado como 1064 (representativo de todas las subunidades ligeras trabajadas).

A

Proteína	Cebadores para introducir las dianas de restricción	Tamaño producto PCR (pb)
Xct fwd	AGGAGATATACCATGgtcagaaagcctgttggtccaccatc	1503
y+LAT1 fwd	AGGAGATATACCATGgttgacagcactgagatgaagtggcctc	1533
y+LAT2 fwd	AGGAGATATACCATGgaagccaggagcctgggaggc	1545
LAT2 fwd	AGGAGATATACCATGgaagaaggagccaggcaccgaaacaacaccg	1605
4F2hc fwd	TCGAAAAAAGCAGCGGCatgagccaggacaccgaggtggatag	1600
Xct rev	CTTCCAGACCGCTTGAtaacttatcttctctgtgacaacttcag	1503
y+LAT1 rev	CTTCCAGACCGCTTGAgtagatttggatcccgttgcttgggcatc	1533
y+LAT2 rev	CTTCCAGACCGCTTGAgtcagtttctctcatcctttttcttcggc	1545
LAT2 rev	CTTCCAGACCGCTTGAgggctggggctccccgccac	1605
4F2hc rev	GTGATGGTGATGTTTAggcccgttaggggaagcggag	1503

Proteína de restricción	Diana de corte
KpnI	GGTAC/C – CCAT/G
BmtI	GCTAG/C – CGATC/G
PmeI	AGG/CCT – TCC/GGA

B

Proteína	Cebadores para introducir las dianas de restricción	Inicio	Final
LAT2 fwd 1	CGGAGTAGCCCTGAAGAAAAG	96	115
LAT2 fwd 2	CCCAAATCTGGAGGTGACTACTC	301	323
LAT2 fwd 3	TGGCTGGAGCCAAAGAATGC	646	665
LAT2 fwd 4	CATGGCCTGGATCATGCCCATTTT	939	962
LAT2 fwd 5	GTCACGGTTGCTGGACAGATAG	1201	1222

C

Mutación	Cebadores forward 5' - 3'	Cebadores reverse 5' - 3'
LAT2 - Y93A	GGAGCCCTCTGCGCTGCTGAACTCGG	CCGAGTTCAGCAGCGCAGAGGGCTCC
LAT2 - Y93F	GAGCCCTCTGCTTTGCTGAACTCGG	CCGAGTTCAGCAAAGCAGAGGGCTC
LAT2 - D106A	CCCAAATCTGGAGGTGCCTACTCTATGTCA AGG	CCTTGACATAGGAGTAGGCACCTCCAGATTT GGG
LAT2 - N134S	GATCTACCCACCAGCCAGGCTGTCATC	GATGACAGCCTGGCTGGTGGGGTAGATC
LAT2 - G246S	GGGCTCCTTGCCTATAGCGGCTGAACTTT CTG	CAGAAAGTTCAGCCGCTATAGGCCAAAGGA GCC
LAT2 - T402A	CTCTTCTATGGGGTCGCGTTGCTGGACAG	CTGTCCAGCAACCGCGACCCCATAGAAGAG
Asc1 – S246G	CTCCTTCGCCTTCGGTGGCTGAACTTC	GAAGTTCAGCCACCGAAGGCGAAGGAG

Tabla suplementaria 1: Cebadores utilizados. A) Cebadores empleados para amplificar las proteínas de interés, así como la diana de restricción elegida (para que posteriormente estos insertos sean ligados al vector) y la secuencia de las etiquetas que queremos añadir. Las minúsculas indican la secuencia específica del gen, las mayúsculas la secuencia específica del plásmido. B) Cebadores empleados para secuenciar la proteína, tanto en una corroboración de su estado tras introducirse al vector como para corroborar la mutación añadida. C) Cebadores empleados para realizar mutaciones puntuales en la secuencia proteica.

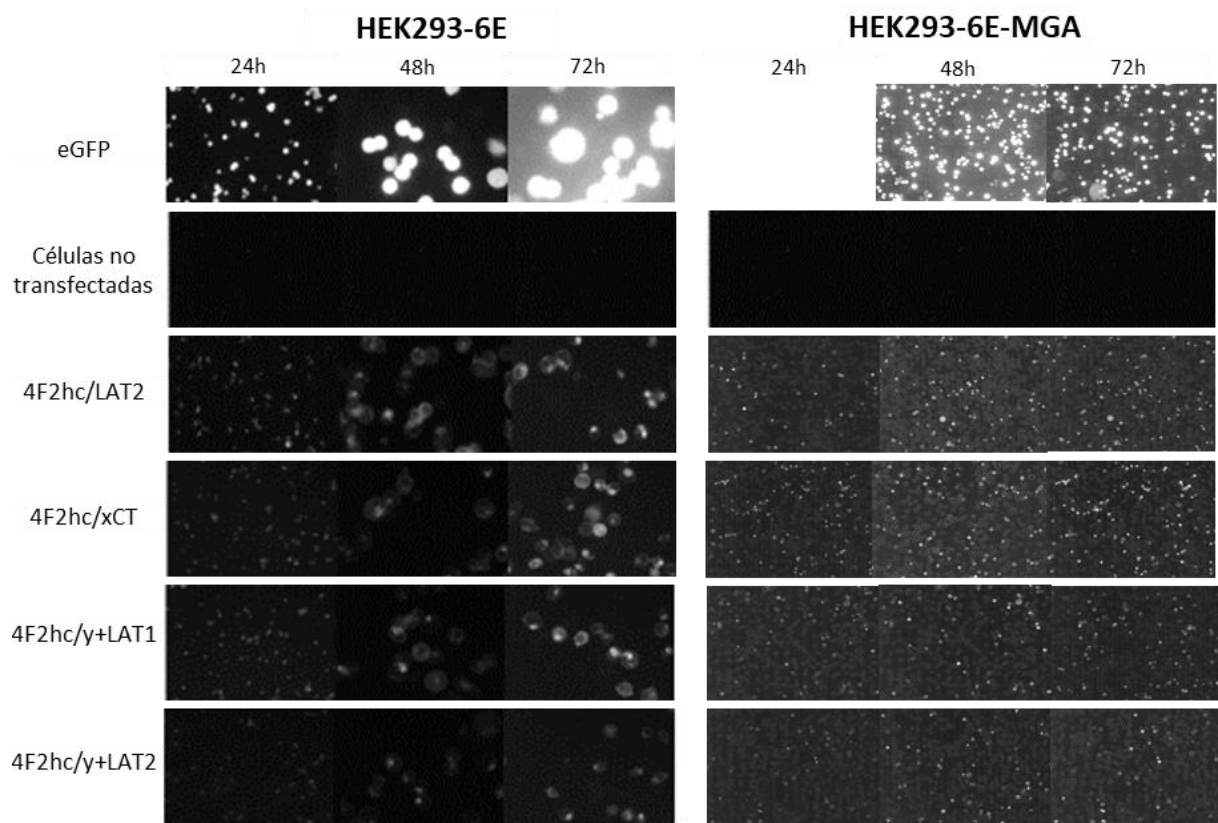


Figura suplementaria 2: Análisis de la eficacia de la transfección por fluorescencia verde. A través de la molécula de GFP unida a la subunidad ligera es posible monitorizar la cantidad de expresión proteica por las células. En esta figura se muestran imágenes de microscopio de la emisión de luz verde por parte de las células en el momento de la recogida.

A

	Tiempo (horas)	Temperatura (°C)	PORCENTAJE DE SOLUBILIZACIÓN
Digitonina 2%	2	25	57,2
	1	25	60,3
	4	4	45,9
	2	4	39,1

B

PORCENTAJE DE SOLUBILIZACIÓN	Tris (mM)	NaCl (mM)	Concentración celular (millones cel/ml)		
			15	29	35
Digitonina 2%	60	//	57,2	50,7	43,9
	60	50	60,3	59,0	50,0
	60	100	45,9	64,6	58,5
	60	150	39,1	53,8	60,7
	20	100	64,2	47,7	44,2
	40	100	41,0	41,8	52,8

C

PORCENTAJE DE SOLUBILIZACIÓN	Tris (mM)	NaCl (mM)	Concentración celular (millones cel/ml)	
			42	50
Digitonina 2%	60	50	51,9	45,0
	60	100	49,5	38,0
	60	150	77,5	63,4
	60	200	82,9	67,9
	20	150	68,1	52,8
	40	100	54,7	62,2

D

PORCENTAJE DE SOLUBILIZACIÓN	Tris (mM)	NaCl (mM)	Concentración celular (millones cel/ml)	
			35	45
Digitonina 2%	60	50	42,4	31,0
	60	100	39,4	48,7
	60	150	28,9	34,9
	60	200	42,4	41,4
	20	150	48,1	40,6
	40	100	51,3	42,9

E

PORCENTAJE DE SOLUBILIZACIÓN --- PORCENTAJE PERDIDO EN RESINA STREP	Tris (mM)	NaCl (mM)	Concentración celular (millones cel/ml)	
			10	42
Digitonina 2%	20	150	75,6	
			19,1	
	60	200	57,6	48,3
			13,3	15,2

Tabla suplementaria 2: Ensayos UDS con el objetivo de optimizar la solubilización por digitonina. Los resultados del porcentaje de solubilización se encuentran recuadrados en negro. A) Cribado de tiempo y temperaturas en la solubilización con digitonina 2%. B) Cribado de concentración celular y concentración Tris/NaCl, n1. C) Cribado de concentración celular y concentración Tris/NaCl, n2. D) Cribado de concentración celular y concentración Tris/NaCl, n3.

APÉNDICE

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	217
1.1. Trabajo previo	218
1.2. Nanodiscos	220
2. OBJETIVOS	221
3. MATERIALES Y MÉTODOS	221
3.1 Manipulación del ADN.....	222
3.1.1. Diseño de los constructos	222
3.2. Expresión y purificación de las proteínas.....	222
3.2.1. 4F2hc/LAT1.....	222
3.2.1.1 Expresión en células de levadura	223
3.2.1.2 Transporte in vivo.....	2235
3.2.1.3 Purificación de 4F2hc/LAT1	2235
3.2.2. BasC y MSP	226
3.2.2.1 Expresión en bacterias.....	226
3.2.2.2. Purificación BasC	227
3.2.2.3. Purificación MSP	227
3.2.3. Reconstitución de proteínas en nanodiscos:.....	228
4. RESULTADOS	229
4.1. Crio-microscopía electrónica:.....	230
4.2. Análisis de estabilidad de h4F2hc/LAT1 58, 586 y x4F2hc/LAT1.....	231
4.2.1. Comparación en DDM/CHS	232
4.2.2. Comparación en DM/CHS.....	233
4.3. Nanodiscos	234
4.3.1. BasC en nanodiscos	237
4.3.2. 4F2hc/LAT1 en nanodiscos.....	238
5. DISCUSIÓN	239
6. BIBLIOGRAFÍA	239

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1: Estructura de los nanodiscos	220
Figura 2: Visualización por crio-ME de x4F2hc/LAT1 en micelas formadas por DDM/CHS.	230
Figura 3: Micrografías de x4F2hc/LAT1 en DDM/CHS.	231
Figura 4: Ensayo funcional de los candidatos de 4F2hc/LAT1 expresados en <i>Pichia pastoris</i> .	231
Figura 5: Perfiles de SEC de los candidatos de 4F2hc/LAT1 purificados en DDM/CHS.	233
Figura 6: Perfiles de SEC de los candidatos de 4F2hc/LAT1 purificados en DM/CHS.	234
Figura 7: SEC de los nanodiscos formados por la MSP 1E3D1 y POPC.	235
Figura 8: Reconstitución de BasC en nanodiscos formados por POPC y 1E3D1.	237
Figura 9: Reconstitución de h4F2hc/LAT1 58 en nanodiscos formados por POPC y 1E3D1	239
Tabla 1: Alineamiento de las secuencias de LAT1 trabajadas en el Apéndice.	219
Tabla 2: Optimizaciones probadas en las proteínas MSP.	135
Tabla 3: Optimizaciones probadas en las proteínas MSP.	136

A pesar de los cambios de proyecto sucedidos durante el desarrollo de la presente tesis, esta siempre ha estado focalizada en el estudio estructural de los transportadores heteroméricos de aminoácidos (HATs) de origen eucariota. El objetivo inicial de la tesis era resolver la estructura del transportador 4F2hc/LAT1, proyecto que fue interrumpido al ser dos estructuras del citado transportador publicadas en 2019 (Lee *et al.*, 2019, Yan *et al.*, 2019). Al quedarnos en una situación en la que teníamos pocas posibilidades para aumentar los conocimientos estructurales de la proteína, se comenzó un nuevo proyecto cribando varios candidatos HATs con el objetivo de caracterizar estructural y funcionalmente el mejor de ellos, y cuyos resultados forman el cuerpo de esta tesis.

No obstante, el trabajo anterior resultó ser una gran experiencia para mi formación, por lo cual también he querido dedicarle un pequeño espacio en la presente tesis en forma de Apéndice.

1. INTRODUCCIÓN

Los HATs, ampliamente descritos en el tronco principal de la tesis, se encuentran formados por dos subunidades, pesada y ligera, unidas por un puente disulfuro. En metazoos, la subunidad pesada es responsable del tráfico del heterodímero a la membrana plasmática y se encuentra compuesto por una región extracelular tipo barril en la región C-terminal, un dominio transmembrana y un dominio intracelular en la región N-terminal (Estévez *et al.* 1998; Pfeiffer *et al.* 1998; Deves y Boyd, 2000; Palacín y Kanai, 2004). Mientras, la subunidad ligera media en la actividad transportadora y es una proteína membranal formada por 12 dominios transmembrana (Reig *et al.*, 2002; Gasol *et al.*, 2004; Fernández *et al.* 2006).

Los HATs se encuentran asociados con varias patologías humanas, como aminoacidurias, crecimiento tumoral, cataratas, excitotoxicidad neuronal o autismo; hechos que justifican la relevancia del conocimiento de su estructura y función (Borsani *et al.*, 1999; Xie *et al.*, 2005; Shchors y Evan, 2007; Knöpfel *et al.*, 2019).

Durante muchos años la única información estructural disponible sobre los HATs correspondía al ectodominio de la subunidad pesada 4F2hc, resuelta en nuestro laboratorio mediante cristalografía a una resolución de 2,1 Å (Fort *et al.*, 2007).

En los años siguientes ninguna estructura referente a la subunidad ligera de metazoos fue resuelta; lo más próximo evolutivamente se encontraba en las estructuras de homólogos bacterianos pertenecientes a la familia APC, como por ejemplo AdiC, resuelto a 3,4 Å (Fang *et al.*, 2009). La estructura de AdiC permitió empezar a resolver cuestiones sobre ciertas características estructurales de los HATs mediante modelos estructurales.

No obstante, la información resultaba ser insuficiente para alcanzar un entendimiento de los HATs que permitiera vislumbrar las bases moleculares de su función y su implicación a las patologías con las que se relacionaban. Por tal razón, nuestro laboratorio comenzó el proyecto de resolución estructural de un HAT eucariota a alta resolución. En el año 2014, se determinó la estructura de la proteína 4F2hc/LAT2 humana mediante reconstrucción 3D desde una tinción negativa a una resolución de sólo 21 Å (Rossel *et al.*, 2014). Una información estructural insuficiente pero que junto a análisis de *crosslinking* y de simulación aportó información relevante sobre la posición del ectodominio 4F2hc sobre LAT2 (Rossel *et al.*, 2014).

1.1. Trabajo previo

La baja resolución obtenida para 4F2hc/LAT2 resultó en un proyecto de búsqueda de los mejores candidatos HATs para realizar estudios estructurales. Se analizaron hasta 24 candidatos diferentes, incluyendo proteínas HATs de diferentes organismos. De este análisis de expresión y estabilidad realizado en *Saccharomyces cerevisiae*, los ensayos FSECs mostraron que el candidato que presentaba mejor calidad era la proteína 4F2hc/LAT1 procedente de *Xenopus laevis*.

No obstante, previamente a mi llegada al laboratorio, dos nuevos candidatos procedentes de la forma humana mutada de la proteína 4F2hc/LAT1 fueron también seleccionados. Estos nuevos candidatos fueron generados en colaboración con el laboratorio de Nicolás Reyes (entonces en el Instituto Pasteur, París).

Las mutaciones fueron seleccionadas mediante la técnica de mutagénesis de consenso (Tusnády y Simón, 1998; Tusnády y Simón, 2001) utilizando para ello un algoritmo por el cual se determina qué mutaciones son necesarias para incrementar la estabilidad de una proteína en concreto. Este tipo de estudios se basan en alineamientos y análisis de secuencias de homólogos de la proteína de interés, definiendo la frecuencia de cada aminoácido para cada posición de la proteína. En base a dichas frecuencias, se pueden definir los residuos más conservados evolutivamente, información que el algoritmo utiliza para proponer mutaciones.

Con este desarrollo, estos nuevos candidatos obtenidos fueron denominados 4F2hc/LAT1 - 58 y 4F2hc/LAT1 - 586, cuyas subunidades ligeras poseen en la secuencia de aminoácidos 38 y 56 sustituciones, respectivamente.

La proteína LAT1 - 58 fue diseñada a partir del análisis de las secuencias de LAT1 y LAT2 (el nombre procede de los genes, SLC7A5 y SLC7A8). De los 38 reemplazos; 22 se encuentran en los dominios transmembrana, 9 en bucles extracelulares, 6 en bucles intracelulares y 1 en el extremo C-terminal.

Mientras, la proteína LAT1 - 586 procede del análisis de los alineamientos de las secuencias de LAT1, LAT2 y γ -LAT2 (por lo que su nombre procede de los genes SLC7A5, SLC7A8 y SLC7A6). De los 56 reemplazos; 38 se encuentran en los dominios transmembrana, 11 en los bucles extracelulares, 5 en bucles intracelulares y 2 en el extremo C-terminal.

Los heterodímeros elegidos fueron expresados en *Pichia pastoris* debido al buen nivel de expresión obtenido en anteriores estudios (Costa *et al.*, 2012). La proteína recombinante se encuentra construida con etiquetas (Strep y cola de histidinas) que permiten su purificación por cromatografías de afinidad.

Las condiciones de purificación testadas que mayor estabilidad aportaban a la proteína consistían en realizar la solubilización de la fracción membranal mediante la combinación DDM 1% / CHS 0,2% (colesterol hemisuccinato) y tras las dos cromatografías de afinidad (con resina Ni-NTA y resina Streptactin), la proteína purificada era analizada mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC).

La actividad de transporte de la proteína expresada en *Pichia pastoris* fue testada mediante un ensayo de transporte con isoleucina marcada radiactivamente. Al realizar una comparación con controles de células de *Pichia pastoris* que no expresaban ninguna proteína exógena, aquellas que expresaban 4F2hc/LAT1 mostraban una actividad superior (datos no mostrados). Estos resultados indican que la proteína expresada en células de levadura era funcional.

LAT1_human	MAGAGPKRRALAAPAAEEKEEAREKMLAAKSADGSAPAGEGEGVTLQRNITLLNGVAIIIV
LAT1_586	MAGAGPKRRALAAPAAEEKEEAREKMLAAKSADGSAPAGEGEGVTLQRNITLLNGVAIIIV
LAT1_58	MAGAGPKRRALAAPAAEEKEEAREKMLAAKSADGSAPAGEGEGVTLQRNITLVNGVAIIIV
LAT1_Xenopus	MAADSVKRRQSGASKTEEDRQAAEKMLHQNGNAEPKSGDGAAVELQRTITLVNGVAIIIV **.*.***.*.:**:.: : : :.: :.: :.*.* **.*.***:*****
LAT1_human	GTIIGSGIFVTPGTGLKEAGSPGLALVVWAAACGVFSIVGALCYAELGTTISKSGGDYAYM
LAT1_586	GTIIGSGIFVSPKXGVLKEAGSPGLALVVWAVCGVFSIVGALCYAELGTTISKSGGDYAYI
LAT1_58	GTIIGSGIFVTPGTGLKEAGSVGLALVVWAVCGVFSIVGALCYAELGTTISKSGGDYAYV
LAT1_Xenopus	GTIIGSGIFVTPGTGLREAGSPGLSLLVWAVCGVFSIVGALCYAELGTTISKSGGDYAYV *.*****.*.***:*** **.*.***:*****:*****:*****
LAT1_human	LEVYGS LPAFLK LK L W I E L L I I R P S S Q Y I V A L V F A T Y L L K P L F P T C P V P E E A A K L V A C L C V L
LAT1_586	LEVYGS LPAFLR L W I E L L I I R P S S Q Y I V A L V F A N Y L L P L F P T C P E P E E A A R L L A A L C L L
LAT1_58	LEVYGS LPAFLK L W I E L L I I R P S S Q Y I V A L V F A T Y L L K P L F P T C P V P E E A A K L V A C L C L L
LAT1_Xenopus	LEVYGA LPAFLK L W V E L L I I R P S S Q Y I V A L V F A T Y L L K P V F P T C P V P D D A A K I V A C L C I L ***.*.*****:***:*****:*** **.*.***:***:*** **.*.***:***:*** **.*.***:***:***
LAT1_human	LLTAVNCYSVKAATRVDQAFAAAKLLALALII LLGFVQIGKGDVSNLDPNFSFEGTKLDV
LAT1_586	LLTAVNCYSVKAATRVDQAFIAAKLLALALIIIMGFVQIQKGDVSNLDPKNAFEGTSLDV
LAT1_58	LLTAVNCYSVKAATRVDQAFAAAKLLALALII LLGFVQIGKGDVSNLDPKNAFEGTKLDV
LAT1_Xenopus	LLTAINCYSVKAATRVDQRFAAAKLLALLLII LLGFVQLGKGGVEDLKPERSFEGTSTNV ***:*** **.*.***:***:*** **.*.***:***:*** **.*.***:***:*** **.*.***:***:***
LAT1_human	GNIVLALYSGLFAYGGWNYLNFVTEEMINPYRNPLAI IISLP I V T L V V L T N L A Y F T T L
LAT1_586	GNIVLALYSGLFAYGGWNYLNFVTEEMINPYRNPLAI IISLP I V T L V V L T N L A Y F T T L
LAT1_58	GNIVLALYSGLFAYGGWNYLNFVTEEMINPYRNLPRAI IISLP I V T L V V L T N L A Y F T T L
LAT1_Xenopus	GQWVLALYSGLFAYGGWNYLNFVVEEMIEPYKNLPRAI IISMP I V T L V V L T N L A Y F T T L *.:*****:*****:*****:***:*** **.*.***:***:*** **.*.***:***:*** **.*.***:***:***
LAT1_human	STEQMLSSEAVAVDFGNHGLVMSWIIPV FVGLSCFGSVNGSLFTSSRLFFVGSREGHLP
LAT1_586	SPQEMLSSEAVAVIFGNHGLVMSWIIPFV FVGLSCFGSVNGSLFTSSRLFFVGSREGHLP
LAT1_58	SPQEMLSSEAVAVDFGNHGLVMSWIIPV FVGLSCFGSVNGSLFTSSRLFFVGSREGHLP
LAT1_Xenopus	TPEQMLNSEAVAVDFGNHGLVMSWIIPV FVGLSCFGSVNGSLFTSSRLFFVGSREGHLP :.:** **.*.***:*****:***:*** **.*.***:***:*** **.*.***:***:*** **.*.***:***:***
LAT1_human	SILSMIHPQLLTPVPSLVFTCVMTLLYAFSKDIFSVINFFSFFNWLCVALAII GMIWLRH
LAT1_586	SILSMIHPKRLTPIPALFPTC I M T L L Y F S K D I F S I N F S F F N W L C V L A I G Q I W L R H
LAT1_58	SVLAMIHPKLLTPIPSLFPTC I M T L L Y A F S N D I F S V I N F F S F F N W L C V A L A I I G M I W L R Y
LAT1_Xenopus	SLLAMIHPRLTPMPSLIFTCAMTLLYAFSD D I F S V I N F F S F F N W L C V A L A I I G M M W L R Y *.:***:***:***:*** **.*.***:***:*** **.*.***:***:*** **.*.***:***:*** **.*.***:***:***
LAT1_human	RKPELERPIKVNALPVFFILACLFLIAVSFWKTPVECGIGFTI ILSGLPVYFFGVWVK
LAT1_586	KKPELERPIKVNALPFFILACLFLIAVLSWSTPVECGIGFAIILSGVPVYFLGVWVK
LAT1_58	KKPELERPIKVNLLPFFILACLFLIAVSFWKTPVECGIGFAIILSGVPVYFLGVWVK
LAT1_Xenopus	KKPELERPIKVNILLPFFILACIFLIVVSFYMTTPVECGIGFIIILSGVPVYFFGVWVK :*****:***:***:*** **.*.***:***:*** **.*.***:***:*** **.*.***:***:*** **.*.***:***:***
LAT1_human	KPKWLLQGIFSTTVLCQKLMQVVPQET
LAT1_586	KPKWLLQGIFSTTVLCQKLMQVVPQES
LAT1_58	KPKWLLQGIFSTTVLCQKLMQVVPQET
LAT1_Xenopus	KPDWILHGIHSSSTALLQKVM E A V P Q E S **.*.***:***:*** **.*.***:***:*** **.*.***:***:*** **.*.***:***:***

Tabla 1: Alineamiento de las secuencias de LAT1 trabajadas en el Apéndice. Subrayadas en rojo se encuentran los reemplazos presentes en las formas mutadas 58 y 586 respecto a la forma salvaje, en verde los cambios que posee la forma salvaje de *Xenopus* respecto a la humana y en azul el residuo de cisteína que participa en el puente disulfuro.

La técnica de resolución estructural finalmente elegida fue la criomicroscopía electrónica en lugar de la cristalografía, debido principalmente a que la muestra podría tener un exceso de detergente que dificultaría la formación de cristales ordenados y debido a que el sistema de expresión seleccionado no aportaba tanta cantidad de proteína como las técnicas cristalográficas requieren. Además, cuando se comenzó este proyecto, la revolución de la resolución (como ya se textualizó en la Introducción principal) amplió las posibilidades de éxito al resolver una estructura de pequeño tamaño mediante la microscopía electrónica.

1.2. Nanodiscos

El problema inicial que se observó en la muestra de proteína obtenida para su análisis por criomicroscopía electrónica era la gran cantidad de detergente presente en la muestra, que dificultaba la identificación de las partículas de proteína. Múltiples alternativas fueron trabajadas con el objetivo de aumentar la calidad de la muestra, ya fuera aumentando la homogeneidad o la estabilidad.

Entre ellas se encontraba el ensamblaje del complejo formado por 4F2hc, LAT1, CD147 y MCT1 conocido comúnmente como complejo Hemler (Xu y Hemler, 2005), el empleo de anticuerpos o una región de ellos como los nanobodies o megabodies, así como inhibidores descritos como el BCH (Mastroberardino *et al.*, 1998) o herramientas como el *crosslinking* o una nueva aproximación con un elevado potencial, los nanodiscos.

Todos estos aspectos fueron trabajados a diferentes niveles durante los más de dos años que trabajé este proyecto, siendo los nanodiscos la alternativa que mejores perspectivas generó.

En el estudio de las proteínas de membrana, el uso de detergentes para formar micelas proporciona un tamaño de partícula pequeño, careciendo la estructura resultante de un entorno nativo y sufriendo fluctuaciones dinámicas (Nichols, 1988). Por lo tanto, para estudiar funcional y estructuralmente las proteínas de membrana *in vitro* con un enfoque más cercano al estado nativo, la reconstitución en proteoliposomas o en nanodiscos (NDs) resulta de gran interés.

Los nanodiscos o discos de bicapa de fosfolípidos nanoparticulados se ensamblan a partir de fosfolípidos y una clase de proteínas helicoidales anfipáticas denominadas proteínas de andamiaje de membrana (MSP, por sus siglas en inglés *Membrane Scaffold Protein*) (Figura 1). Por tanto, son sistemas membranales formados por una bicapa lipídica con la posibilidad de reconstituir proteínas transmembranales en su interior confiriéndoles un ambiente nativo (Brouillette *et al.*, 1984, Jonas, 1986).

Las proteínas que forman los nanodiscos son proteínas derivadas de la apolipoproteína Apo-A1, proteína α -helicoidal anfipática natural presente en las lipoproteínas plasmáticas. Se ha demostrado que los nanodiscos son un medio sólido para estabilizar e investigar las interacciones de proteínas y lípidos de forma nativa (Nath *et al.*, 2007; Schuler *et al.*, 2013).

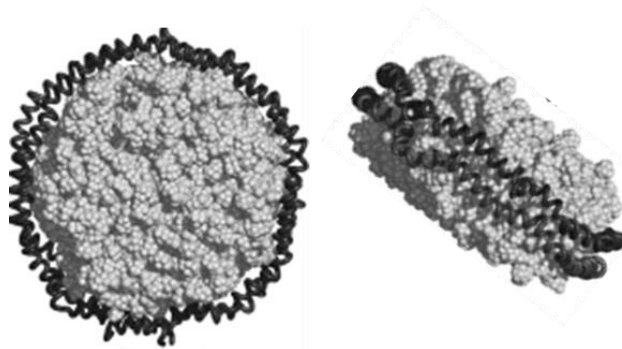


Figura 1: Estructura de los nanodiscos. Estructura de nanodiscos modelada con POPC como lípido. El fragmento de la bicapa lipídica está encerrado por dos hélices anfipáticas de MSP. Figura adaptada de Ritchie *et al.*, 2009.

Los estudios realizados por Sligar han reportado no solo una gran cantidad de MSPs disponibles, sino que han mostrado un gran abanico de posibilidades resultado de aplicar esta herramienta a

diferentes proteínas de membrana (Bayburt *et al.*, 2002; Denisov *et al.*, 2004; Ritchie *et al.*, 2009; Bayburt y Sligar, 2010; Bayburt *et al.*, 2011; Schuler *et al.*, 2013; Denisov y Sligar, 2016, Denisov y Sligar, 2017).

Durante los últimos años, múltiples proteínas de membrana han sido reconstituidas en nanodiscos permitiendo realizar estudios estructurales o funcionales (Palczewski *et al.*, 2000; Boldog *et al.*, 2006; Reddy *et al.*, 2019). Durante este proyecto se han introducido los nanodiscos como una herramienta en el laboratorio; partiendo de los plásmidos de diferentes MSPs con tamaños variables, optimizando la expresión y la purificación de cada uno de ellos. Y junto al homólogo bacteriano BasC trabajado ampliamente en nuestro laboratorio (Bartoccioni *et al.*, 2019), se ha optimizado la formación de nanodiscos con diferentes lípidos.

La MSP utilizada en esta tesis fue MSP-1E3D1, procedente del MSP1 original, con un diámetro de unos 12,1 nm, un peso molecular de 32.600 Da y su ϵ_{280} , 29.910 M⁻¹cm⁻¹ (Ritchie *et al.* 2009).

2. OBJETIVOS

En el mismo sentido que los objetivos finalmente alcanzados durante el desarrollo de esta tesis; los objetivos de este proyecto también consistían en la caracterización estructural y funcional de 4F2hc/LAT1.

Para tal objetivo el proyecto se dividió en varios objetivos secundarios:

1. Elección de la proteína candidata para realizar el estudio estructural entre las diferentes formas de 4F2hc/LAT1 (*Xenopus*, humana 58 y humana 586).
2. Optimización de la preparación de rejillas criogenizadas y visualización en microscopio electrónico de la muestra 4F2hc/LAT1 en detergente para obtener crio-micrografías, y reconstrucción 3D de la proteína 4F2hc/LAT1.
3. Caracterización funcional de 4F2hc/LAT1 reconstituido en liposomas.
4. Reconstitución de 4F2hc/LAT1 en nanodiscos.
5. Visualización al microscopio de 4F2hc/LAT1 reconstituido en nanodiscos y reconstrucción 3D de 4F2hc/LAT1 reconstituido en nanodiscos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La parte referente a los Materiales y Métodos empleados durante este Apéndice son extremadamente similares a los explicados en el tronco principal; razón por la cual durante esta sección solo se hará referencia a todo aquello que no ha sido tratado anteriormente. Del mismo modo, solo se hará referencia a las casas comerciales de productos, reactivos y materiales que no han sido mencionados en el apartado de Materiales y Métodos principal.

3.1 Manipulación del ADN

Los constructos de 4F2hc/LAT1 que han sido utilizados durante este proyecto ya se encontraban en el laboratorio antes de mi llegada, por lo que no fue necesario ningún tipo de manipulación. Razón por la cual en esta sección únicamente se hará referencia a la información básica de su diseño.

3.1.1. Diseño de los constructos

La secuencia de ADN de la proteína cuya estructura se quiere estudiar se encuentra insertada en el vector pPICZb, específico para expresar proteínas en levaduras; para la subclonación se emplearon las enzimas NotI y Xba. Los ADNs transcritos proceden, como ya se ha mencionado, de *Xenopus laevis* y de *Homo sapiens*, y tienen etiquetas que permiten su purificación; la subunidad 4F2hc posee en su región N-terminal una cola de histidinas (8xHis) y la subunidad ligera LAT1 en su región C-terminal una etiqueta de Strep.

El ADN de BasC, empleado en este proyecto como modelo para la optimización del trabajo con nanodiscos, procede de *Carnobacterium* (Bartoccioni *et al.*, 2019) y se encuentra insertado en el vector pTTQ18 a través de las dianas de EcoRI y PstI. Para purificarlo contiene una cola de histidinas en el extremo C-terminal junto a una diana de la proteasa 3C y la secuencia que codifica para el GFP (N-BasC-3C-GFP-10xHis), siendo posible su seguimiento mediante fluorescencia.

Por último, el plásmido con la proteína MSP-1E3D1, cedido por el Dr. Rafael Fernández-Leiro del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) en Madrid, posee en su extremo N-terminal una etiqueta de histidinas (10xHis), junto a una diana proteolítica, primeramente TEV pero que fue sustituido por 3C.

3.2. Expresión y purificación de las proteínas

La obtención de las proteínas que se han trabajado durante este proyecto, 4F2hc/LAT1, BasC y MSP han sido expresadas en diferentes sistemas, utilizando diferentes protocolos al tratarse de proteínas solubles (MSP) y de membrana (4F2hc/LAT1 y BasC).

Durante esta sección se detallarán los protocolos empleados en cada uno de los casos, algunos ya previamente puestos a punto en nuestro laboratorio como es el caso de 4F2hc/LAT1 y BasC, proteínas que ya se estaban trabajando en el laboratorio, y otros, como las MSPs, optimizados desde protocolos estándar para obtener el mayor rendimiento de producción y purificación.

3.2.1. 4F2hc/LAT1

La proteína eucariota 4F2hc/LAT1, tanto procedente de *Xenopus laevis* como humana, ha sido expresada en un sistema eucariota (levadura) para mantener las modificaciones postraduccionales que pueden llegar a ser muy importantes.

3.2.1.1 Expresión en células de levadura

Un sistema eucariota utilizado durante el transcurso de esta tesis son las células de *Pichia pastoris*, una de las células de levaduras más ampliamente utilizadas en la expresión de proteínas eucariotas. Hemos utilizado la cepa KMH71 con la capacidad de realizar expresiones inducidas a través de la adición de metanol (cepa metilotrófica a través del promotor AOX1). Las células de levadura resultan ser un sistema más económico que las células de mamíferos, de alto rendimiento y no exigentes respecto a reactivos y maquinaria. No obstante, las glicosilaciones no son las mismas que las producidas en las células de mamíferos, no poseen colesterol y además tienen tendencia a hiperglicosilar las proteínas.

El protocolo de transfección realizado en células de levadura son los mismos que los llevados a cabo en células de mamíferos, al ser también células eucariotas. Sin embargo, en el presente trabajo, debido a las repetidas expresiones de la proteína recombinante 4F2hc/LAT1 (de *Xenopus laevis* y de los mutantes 58 y 586) era preferible realizar una transfección estable mediante la cual se introducía este ADN exógeno en el propio genoma de la célula y así reducir la variabilidad debida a transfecciones transitorias.

Para realizar esta transfección estable en las células de *Pichia pastoris* se ha empleado el método de electroporación. Este método consiste en provocar un aumento significativo de la conductividad eléctrica y la permeabilidad de la membrana plasmática celular mediante un campo eléctrico aplicado externamente. Las células *Pichia pastoris* transfectadas de manera estable pueden ser almacenadas en glicerol a - 80 °C permitiendo así disminuir la variabilidad entre expresiones al proceder todas del mismo origen.

Para iniciar una expresión se debe raspar y extraer un poco del glicerol en una placa de YPD (de sus siglas en inglés *Yeast extract Peptone Dextrone*) con el antibiótico zeocina (Life Technologies), el gen de resistencia que posee el plásmido empleado. El medio YPD (ya sea sólido o líquido) se encuentra compuesto por un 20% de peptona (Conda) y un 10% de extracto de levadura (Conda), una vez autoclavado, la temperatura debe descender a los 55 °C para poder añadir un 2% de dextrosa y zeocina, si es requerida, a una concentración de 100 µg/ml.

Las células de levadura crecen más lento que las bacterias, por lo que se requieren 72h para que aparezcan colonias en la placa. Se pican unas pocas y se añaden a un pequeño volumen del medio de crecimiento, BMGY (30% de peptona y 15% de extracto de levadura, suplementado con 10 % de glicerol, 100 mM de fosfato sódico pH 6, 1,3% de YNB (por sus siglas en inglés *Yeast Nitrogen base* - Conda) y 0,00004% de biotina). Las células de levadura son incubadas en un incubador I 26 (New Brunswick scientific) a 30 °C y con agitación a 280 rpm. A las 24 horas, a las células crecidas se le añade tanto volumen de BMGY como volumen de expresión se desee.

Tras otras 24 horas, cuando el cultivo alcanza una OD₆₀₀ (densidad óptica) entre 2 y 6 (medición en espectrofotómetro UV mini 1240 – Shimadzu Corporation, a 600 nm de 1/10 parte de la muestra), la expresión puede ser inducida. Se debe trasvasar el cultivo a unos erlenmeyer pestañeados que producen una mayor oxigenación durante la agitación, para lo cual las células son centrifugadas a 3.500 xg durante 15 min y 20 °C y resuspendidas con medio BMMY (30% de peptona y 15% de extracto de levadura, suplementado con 100 mM de fosfato sódico pH 6, 1,3% de YNB, 0,00004% de

biotina y 10 % de metanol). A las 24 horas se vuelve a añadir un 10% de metanol para mantener la expresión, ya que el metanol es evaporable.

Por último y tras las 48 horas desde la inducción de la expresión, las células son recogidas. Para ello, se debe trasvasar todo el volumen del cultivo celular a tubos de centrifuga para separar las células del medio mediante una centrifugación de 3.500 xg durante 15 min a 4 °C. Tras este paso, el *pellet* (precipitado) es lavado con PBS, que es separado a continuación mediante otro ciclo de centrifugación para eliminarlo. Finalmente, los *pellets* celulares pueden ser almacenados a - 80 °C o empleados directamente.

3.2.1.2. Transporte *in vivo*

El transporte realizado en las células de *Pichia pastoris* que expresan la proteína de interés permite conocer la presencia de la proteína en la membrana plasmática y determinar su correcta estructura a través de la demostración de su función.

El protocolo seguido es muy similar al previamente descrito para los proteoliposomas, solo que con células recién recogidas.

Para el ensayo de transporte se emplean 10 µl de células previamente lavadas con PBS por punto (cada medida es realizada por triplicado) y al que se le añaden 180 µl de tampón de transporte (con el aminoácido radiactivo a 1 µCi/ml, y fosfato potásico 20 mM pH 6,5, NaCl 150 mM). Es fundamental mezclar correctamente cada punto empleando un vortex.

Una vez transcurrido el tiempo de cada punto, se recoge la muestra y se coloca en un filtro GSTF conectado a aspiración y sobre el que se realizan 3 lavados con tampón de parada a 4 °C con 5 mM de aminoácido frío.

Para realizar la medida del aminoácido marcado que ha sido transportado al interior de la célula, los filtros se colocan en tubos de centelleo y sobre el que se añade 3 ml de líquido de centelleo. El protocolo de medida se realiza en la máquina *Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2900 TR* (Packard) que miden las CPM (cuentas por minuto) en tres estadios diferentes (A, B y C), los cuales emplea para realizar un algoritmo y obtener las DPM (desintegraciones por minuto). Las medidas han tenido una duración de 3 min.

3.2.1.3. Purificación de 4F2hc/LAT1

Al tratarse de una proteína heteromérica, la purificación se realizó a través de una doble y secuencial cromatografía de afinidad a través de las etiquetas construidas junto al ADN codificante de cada subunidad. La principal diferencia respecto al protocolo de purificación ya relatado durante esta tesis, es que en esta ocasión y debido principalmente a que el sistema de producción usado son levaduras, se requiere extraer previamente la membrana plasmática.

Las células de levadura, así como las bacterias, poseen una pared celular que rodea toda la célula y que impide que los detergentes empleados para solubilizar la membrana puedan acceder a ella. Por tal razón, el protocolo de lisis celular y extracción de la membrana se basa principalmente en procesos mecánicos.

El proceso de extracción membranal comienza con un *pellet* celular con la proteína de interés expresada. Una vez las células han sido separadas del medio, se resuspenden en tampón de rotura (fosfato sódico 50 mM pH 7,5, 5 % glicerol, EDTA 1 mM y una pastilla del cocktail *complete EDTA free* - Roche - por cada 50 ml de buffer).

A continuación, la muestra es sometida a eventos de alta presión en el *Cell Disruptor* (Constant cell) para romper las paredes celulares (2 ciclos a 30 kpsi y 2 ciclos a 40 kpsi). Tras lo cual la muestra es centrifugada a baja velocidad (20.000 xg, durante 15 min a 4 °C) para separar las células enteras rotas y paredes celulares de todo lo demás; para después ultracentrifugar el sobrenadante (250.000 xg, durante 1 hora a 4 °C) situándose en tal caso la fracción membranal en el *pellet*.

El *pellet* es homogeneizado con tampón de resuspensión membranal (Tris 20 mM pH 7,5, sacarosa 300 mM y CaCl₂ 100 mM) empleando el homogeneizador RZR 2051 (Heidolph). El homogenado puede ser congelado o solubilizado con detergente directamente.

Una vez extraídos los fragmentos membranales de las células de levadura que han expresado 4F2hc/LAT1, la purificación comienza con la solubilización de tales membranas en un tampón que contiene Tris 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, DDM 2% y CHS 0,4% durante 1 hora a 4 °C en agitación orbital.

A continuación, antes de la doble y secuencial cromatografía de afinidad se debe realizar un paso de ultracentrifugación a 200.000 xg durante 1 hora a 4 °C para separar la fracción no solubilizada de la fracción solubilizada. A partir de este momento, el tampón que se empleará contendrá las mismas concentraciones de Tris y de NaCl pero una concentración mucho menor de detergente, por lo general 2xCMC (*Critical Micellar Concentration*); este es el denominado tampón de purificación (DDM 0,05% / CHS 0,01%).

Antes de realizar la cromatografía de afinidad, las resinas Streptactin y Ni-NTA son preparadas tal y como se ha descrito anteriormente. En primer lugar, se incuba la muestra con la resina Ni-NTA durante 1 hora a 4 °C en movimiento. Transcurrido ese tiempo, se vierte todo el volumen de la muestra en la columna cromatográfica, se deja eluir todo el volumen (correspondiente a todas las proteínas no afines a esta resina), se lava la resina con cinco volúmenes de columna con tampón de purificación con 20 mM de imidazol y la recuperación de las proteínas afines a esta resina se realiza con dos volúmenes de columna de tampón de purificación con 250 mM de imidazol.

A su vez, esta elución es incubada con la resina Streptactin para realizar el mismo proceso, se deja en movimiento durante 1 hora a 4 °C, se vierte a la columna y la resina precipita mientras cae el volumen no afín a ella. Entonces, la columna es lavada con cinco volúmenes de columna con tampón de purificación y finalmente la muestra unida a la resina es eluída con un volumen de columna de tampón de purificación con 2,5 mM de D-destiobiotina.

Finalmente, la proteína es concentrada en centricones (Amicon Ultra 15 - Merck) de tamaño de poro de 100 kDa. El volumen final de proteína es ultracentrifugado a 200.000 xg durante 1 hora a 4 °C para separar los agregados para entonces ser cuantificado y analizado por SEC. La cuantificación de la proteína es realizada en el *nanodrop*; la medida es dada en mg/ml sin embargo debe ser corregida por el coeficiente de extinción molar, 1,48.

3.2.2. BasC y MSP

Tanto la proteína de membrana BasC como la soluble MSP no presentan modificaciones postraduccionales específicas de las células eucariotas, por lo que el sistema de producción elegido fue *Escherichia coli*, al ser un sistema rápido y de bajo coste.

3.2.2.1 Expresión en bacterias

Las células que con más frecuencia se utilizan como sistemas de expresión de proteínas recombinantes pertenecen a la especie *Escherichia coli*, siendo empleadas diversas cepas en la presente tesis. *E. coli* es el sistema principalmente utilizado en la expresión de proteínas heterólogas ya que permite la producción de grandes cantidades de proteína y en un corto periodo del tiempo debido a su rápido crecimiento, además, sus condiciones de cultivo y transformación son simples y todo en conjunto conlleva que el coste por mg de proteína expresada sea el más bajo en comparación con los sistemas de expresión anteriormente mencionados.

Sin embargo, muchas proteínas no pueden ser expresadas en bacterias ya que estas carecen de modificaciones postraduccionales que, como hemos mencionado, pueden resultar muy importantes para la estructura y funcionalidad de ciertas proteínas eucariotas.

Las cepas bacterianas que se han trabajado durante este Apéndice son BL21 Star y Rosetta, para BasC y proteínas formadoras de nanodiscos (MSP), respectivamente.

El mantenimiento de las células bacterianas ya ha sido introducido durante la explicación de su función en el clonaje de ADN exógeno en los Materiales y Métodos principales. En el caso de emplear bacterias para expresar proteína, el protocolo difiere únicamente en que tras la transformación es necesario expandirlas.

En el actual apartado se está tratando la capacidad de las células para expresar proteínas (de manera inducible), y para lo cual se han empleado cepas bacterianas distintas a las empleadas para expandir plásmidos, pero el método de introducción es el mismo, transformación mediante choque térmico.

Las proteínas MSP y BasC cuentan con un protocolo de expresión similar con algunas particularidades.

Desde la placa donde se han sembrado con anterioridad bacterias transformadas con el vector que codifica para la proteína de interés se realiza un pre-cultivo que consiste en picar varias colonias e inocularlas en un pequeño volumen del medio de cultivo específico (TB, *Terrific broth*, para las proteínas MSP y LB (*Luria Broth*), para BasC), con el antibiótico específico (kanamicina para las MSP y ampicilina para BasC). Se incuban a 37 °C y agitación a 200 rpm toda la noche (incubador I 26).

Al día siguiente, se reparte este cultivo inicial de forma proporcional en erlenmeyers de 2L que contienen 1L de medio de cultivo suplementado con antibiótico, y se deja incubando a 37 °C y 200 rpm hasta que alcanzan la OD₆₀₀ adecuada (OD₆₀₀ 2 - 2,5 para las MSP y 0,6 para BasC) reduciéndose drásticamente la cantidad de proteína expresada si la densidad celular se encuentra fuera de este punto óptimo.

Cuando han alcanzado la densidad óptica adecuada, se añade 0,1 mM del agente inductor IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido) y se incuba el cultivo el tiempo de expresión determinado para

cada proteína en agitación a 200 rpm (1 hora a 37 °C más 3 horas a 28 °C para las MSP y 16 horas para BasC).

Tras el tiempo de expresión, los cultivos celulares se centrifugan a 5.000 xg durante 15 min a 4 °C; el sobrenadante es decantado y el pellet celular congelado y guardado en el congelador de - 80 °C hasta su uso.

3.2.2.2. Purificación BasC

BasC es una proteína localizada en la membrana celular, pero al ser expresada en bacterias esta purificación tendrá que comenzar con la rotura de la pared celular para poder realizar el fraccionamiento de las membranas celulares (Bartocioni *et al.*, 2019).

Las células centrifugadas y lavadas son resuspendidas en 50 ml de tampón Tris 20 mM pH 8 y NaCl 350 mM con 1 pastilla de *complete mini EDTA free* (Roche-Merck), 100 mM Pefabloc (Sigma-Aldrich) y 0,01 mg/ml de ADNasa (Roche-Merck) para así ser sometidas a 4 ciclos de presión en el *Cell disruptor* con una fuerza de 25 Kpsi. Entonces, a través de una centrifugación a 20.000 xg durante 1 hora a 4 °C se separan las células enteras del resto.

A su vez el sobrenadante es ultracentrifugado a 200.000 xg durante 2 horas a 4 °C, modo por el cual se produce la separación de la fracción celular soluble de la membrana. Por último, el *pellet* es homogeneizado con tampón Tris 20 mM pH 8, NaCl 350 mM y 10% de glicerol (estabilizante común de las proteínas con regiones transmembrana).

A continuación, las membranas (3 mg/ml) son solubilizadas con un 1% de DM durante 1 hora a 4 °C en agitación orbital, tras lo cual se ultracentrifuga a 200.000 xg durante 2 h a 4 °C para precipitar las membranas no solubilizadas.

Mientras, se prepara la resina Ni-NTA como se ha descrito con anterioridad. La incubación con la resina y el sobrenadante de la ultracentrifugación se puede realizar durante 2 horas (o toda la noche) a 4 °C en agitación orbital. Una vez pasado este tiempo, la muestra es vertida a la columna de cromatografía y la resina precipita mientras cae la muestra que no se une a la resina, la resina es lavada con tres volúmenes de columna con tampón de purificación con Tris 20 mM, NaCl 150 mM y cantidades crecientes de imidazol (20 y 40 mM) y 0,17 % de DM (2xCMC).

El último lavado se realiza con tampón 3C, tras lo cual la resina es resuspendida con un volumen de resina tampón 3C y colocada en un eppendorf junto a la proteasa 3C, incubándose 16 horas a 4 °C en agitación orbital. Al día siguiente se vierte todo el volumen en una columna, donde el primer volumen eluído corresponde a la proteína BasC purificada sin cola de histidinas ni GFP. Realizar este corte es una forma de obtener una proteína mucho más pura al separar aquellas proteínas que han podido unirse a la resina Ni-NTA de forma inespecífica.

3.2.2.3. Purificación MSP

Las proteínas formadoras de nanodiscos son proteínas solubles y por ello no requieren detergentes ni solubilización. En sustitución de la solubilización, las células son lisadas para que todo el material interno de la célula esté suspendido y pueda acceder a las resinas de afinidad. No obstante, aunque no requieren micelas de detergente, el detergente es mantenido en casi todos los pasos de la

purificación debido a la propia función de estas proteínas; en ausencia de detergente dimerizan y forman el nanodisco, proceso que durante la purificación no resulta de interés.

Se parte de las células *E. coli* congeladas, que son resuspendidas en PBS con 1% de tritón (Sigma-Aldrich), 100 mM de Pefabloc y *complete EDTA-free* (1 pastilla por cada 25 ml). La muestra se incubaba durante 10 min a 4 °C en agitación orbital para que las células se resuspendan adecuadamente. A continuación, al tener las bacterias pared celular, la lisis requiere fuerza mecánica, no solo enzimática. Tal rotura se realizó por sonicación, en donde los pulsos eléctricos se realizaron en volúmenes de 35 - 40 ml con ciclos de 10s on, 10s off durante 5 min a 35% de amplitud. Para separar la fracción soluble se realiza una centrifugación a 20.000 xg durante 30 min a 4 °C.

Mientras, la resina Ni-NTA es preparada como se ha descrito previamente; se emplea 1 ml de resina por cada 100 ml de PBS usado para el lisado. Tras la centrifugación, el sobrenadante es incubado con la resina durante 2 horas a 4 °C en agitación orbital. Una vez transcurrido este tiempo, la muestra es vertida a la columna de cromatografía, se deja precipitar la resina, se elimina la muestra no unida, y entonces se realizan 3 lavados de 200 ml con Tris 40 mM, NaCl 300 mM, 1% de tritón para el primer lavado, 20 mM imidazol y 50 mM colato sódico (Sigma-Aldrich) para el segundo y 20 mM imidazol para el tercero (es el único paso que no contiene detergente, se realiza con el fin de desestabilizar posibles contaminantes).

La recuperación de la proteína se realiza con Tris 40 mM, NaCl 300 mM, imidazol 350 mM y colato sódico 50 mM. No es necesario concentrar la proteína ya que las fracciones eluidas ya se encuentran suficientemente concentradas, pero sí es necesario eliminar el imidazol del medio, ya que puede afectar negativamente a la proteína. Para cambiar el tampón en el que se encuentra la proteína por un tampón compuesto por Tris 20 mM, NaCl 100 mM, EDTA 0,5 mM y colato sódico 40 mM se realiza un desalado con el kit *PD-10 desalting column* (GE healthcare), siguiendo el protocolo del fabricante.

3.2.3. Reconstitución de proteínas en nanodiscos:

Los nanodiscos son sistemas formados por proteínas MSP que delimitan una bicapa lipídica de composición controlada donde poder introducir proteínas transmembranales. Para la preparación de los nanodiscos es necesario incubar las proteínas MSP junto a los lípidos seleccionados y la proteína de interés; las proteínas MSP tienen la capacidad de autoensamblarse en anillos cuando el detergente es eliminado del medio, momento en el que se forma el sistema de nanodiscos.

Durante la optimización del trabajo con nanodiscos se han explorado muchas alternativas hasta encontrar el protocolo de reconstitución que mejor se adaptaba a las proteínas 4F2hc/LAT1 y BasC. Se han probado diferentes lípidos (POPC -1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina- y DPPC -dipalmitoilfosfatidilcolina-; Avanti), diferentes ratios entre lípidos y proteínas MSP, diferentes MSPs (1D1, 1E3D1 y 2N2, ordenadas por tamaño de anillo ascendente), diferentes tiempos y temperaturas de incubación, diferentes detergentes (DDM, DM, colato, sódico, ausencia de detergente, y hasta varias concentraciones), el protocolo de eliminación del detergente y diferentes ratios entre proteína transmembrana y proteína MSP (Tabla 3, página 237).

Durante este Apéndice sólo se hará referencia a los protocolos que han dado buenos resultados en la reconstitución de 4F2hc/LAT1.

La preparación del POPC es iniciada con la dilución de este en 40 mM de colato sódico, se requieren varios ciclos de sonicación para que se disuelva por completo. Una vez el lípido de elección y las MSPs están purificadas, el conjunto se incubaba (con una ratio 1:100 entre MSP y lípidos) durante 1 hora a 4 °C junto con la proteína a reconstituir a la concentración adecuada según la ratio que interese.

Entonces, para eliminar el detergente (tanto el colato sódico, como el DDM o DM) se emplean *biobeads* (Bio-rad). El protocolo de estas consiste en añadir 0,2 g por cada 500 µl de muestra y realizar una incubación de 2 horas a temperatura ambiente en movimiento (el mismo resultado tiene una incubación a 4 °C durante toda la noche). Las *biobeads* deben ser previamente activadas, para ello, una vez pesadas, son lavadas 3 veces durante 10 min con agua y 2 veces durante 5 min con metanol.

Tras el proceso de eliminación del detergente, debido a la capacidad de las MSPs de autoensamblarse, los nanodiscos deben estar formados. Una vez separadas las *biobeads* por decantación, las muestras son filtradas y analizadas por SEC.

Es muy importante preparar controles en paralelo para determinar que la reconstitución se ha producido correctamente. Por ejemplo, para determinar la efectividad de la eliminación del detergente se prepara un control con ausencia de proteínas MSPs, y si la muestra una vez filtrada contiene la proteína de interés indica que el protocolo de eliminación de detergente no ha funcionado; las proteínas transmembranales en este sistema solo pueden permanecer solubles si aún se encuentran en micelas de detergente o reconstituidas en nanodiscos.

Una segunda prueba que determina la calidad de los nanodiscos con proteína es el análisis por DLS (por sus siglas en inglés *Dynamic Light Scattering*) (Nano series, Zetasizer), que mide parámetros como la dispersión de la muestra y el diámetro medio de las partículas que analiza. De este modo, este tipo de medida analiza la homogeneidad de la muestra así como el diámetro, que también resulta ser un parámetro de importancia; no es el diámetro real sino toda la distancia presente en la partícula dada por una única dimensión.

Ambas mediciones en conjunto aportan la información necesaria para conocer la efectividad de la reconstitución de la proteína de interés en los nanodiscos. Los resultados favorables serán aquellos que presenten una buena dispersión, donde a su vez, el diámetro medido dependerá de si los nanodiscos están vacíos o qué proteína contengan (tal medida también dependerá del tamaño de la proteína reconstituida).

4. RESULTADOS

Durante los años previos a mi incorporación en el proyecto que consistía en la resolución de la estructura de un transportador de aminoácidos eucariota, se estuvo trabajando en la preparación de la muestra, en la búsqueda del mejor candidato HAT, del sistema de producción que mayor rendimiento diera y de un protocolo de purificación que mayor estabilidad aportara a la muestra.

Todo ello con el objetivo de obtener una muestra con una elevada pureza y calidad suficiente para poder realizar con éxito un estudio estructural por microscopía electrónica.

4.1. Crio-microscopía electrónica:

La muestra de la proteína 4F2hc/LAT1 de *Xenopus laevis*, obtenida de una expresión de 6 litros de *Pichia pastoris*, fue purificada con la combinación DDM/CHS y analizada por SEC dando lugar a un pico simétrico, fino y homogéneo. La muestra mostraba una dispersión suficientemente buena para ser sometida a un proceso de criogenización y observar su aspecto en un microscopio electrónico.

La muestra congelada fue enviada al laboratorio de nuestro colaborador Óscar Llorca del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO, Madrid), para preparar rejillas criogenizadas y tomar algunas imágenes en el microscopio Titan Krios de 300 kV equipado con un detector directo de electrones K2 en Estocolmo.

Los resultados del microscopio indicaron que la muestra estaba formada por partículas compuestas por dos cuerpos de diferente tamaño, donde la densidad pequeña correspondía al ectodominio de 4F2hc y la densidad grande a la subunidad ligera LAT1 rodeada de la micela de detergente.

Sin embargo, al analizar la muestra en profundidad se observó que la heterogeneidad fue alta debido principalmente a la densidad grande, lo que sugería que las micelas formadas por la combinación DDM/CHS daban lugar a partículas de diferentes tamaños. Adicionalmente, se observó una gran cantidad de partículas de detergente, que dificultaba enormemente la resolución de la estructura.

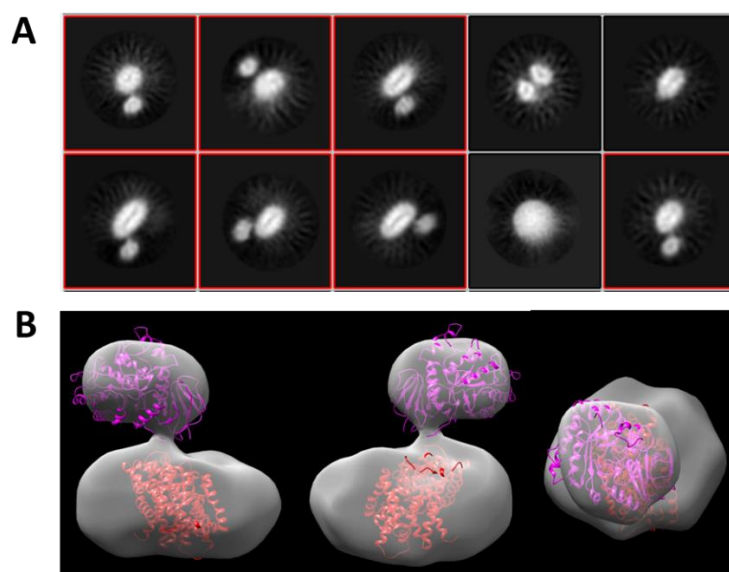


Figura 2: Visualización por crio-ME de x4F2hc/LAT1 en micelas formadas por DDM/CHS. En colaboración con Óscar Llorca y Carlos Fernández-Rodríguez en el CNIO, Madrid. A) Medias 2D de la muestra de x4F2hc/LAT1, se encuentran dispuestas en diferentes posiciones. Se observa la variabilidad de posición entre ambas densidades. B) Reconstrucción 3D de la crio-ME de x4F2hc/LAT1 y ajuste con la estructura atómica de 4F2hc (morado) y BasC (rojo).

La muestra de x4F2hc/LAT1 en DDM/CHS mostraba un exceso de detergente que impedía alcanzar resoluciones suficientes como para empezar a vislumbrar los dominios transmembranas que se encontraban dentro de la micela de detergente.

Estos resultados indicaban que era necesario buscar nuevos procesos de optimización o alternativas que permitieran reducir la cantidad de detergente en la muestra incrementando la homogeneidad de la misma.

En paralelo y para disminuir el ruido de fondo producido por el exceso de detergente, se envió muestra fresca para preparar rejillas, cuya criogenización se realizó de la forma correspondiente para que el grosor del hielo fuera inferior y de este modo el exceso de detergente no tuviera un efecto tan negativo. Esta técnica, de emplear rejillas con hielo fino para reducir el ruido de fondo, está ampliamente recomendada cuando las proteínas a resolver son pequeñas.

Sin embargo, este hielo fino produjo un aumento considerable de la tensión superficial, provocando que la mayoría de las partículas se rompieran en sus dos subunidades (Figura 3), sugiriendo que el protocolo empleado no aportara suficiente calidad a la muestra para un estudio estructural por microscopía electrónica

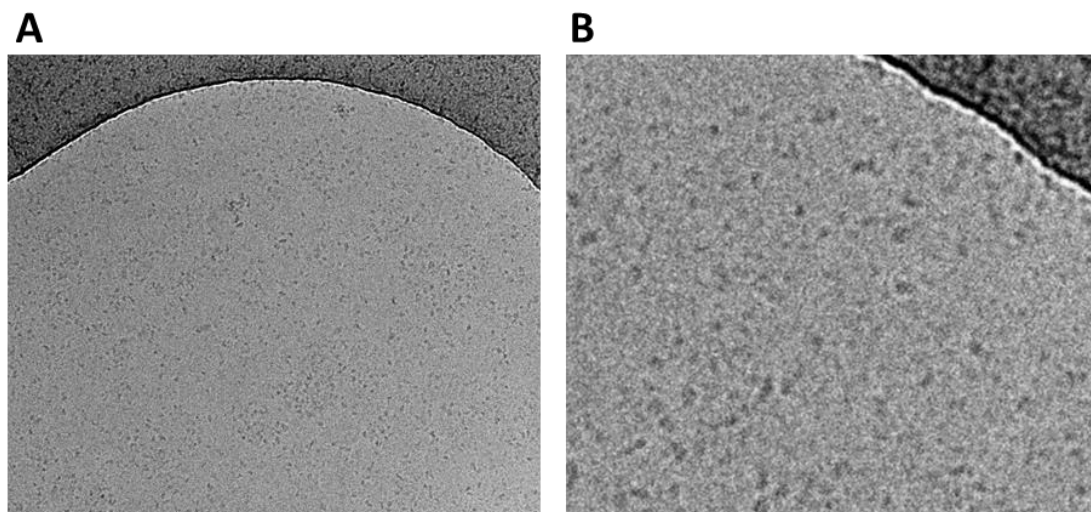


Figura 3: Micrografías de x4F2hc/LAT1 en DDM/CHS. Imágenes tomadas en el microscopio FEI Tecnai G2 12 de 120 kV situado en el CNIO, Madrid. La imagen B) es un aumento de la imagen A). Se observan pocas partículas que contengan dos densidades, sugiriendo que el heterodímero está roto.

4.2. Análisis de estabilidad de h4F2hc/LAT1 58, 586 y x4F2hc/LAT1

La proteína 4F2hc/LAT1 de *Xenopus laevis* no ha resultado ser tan buena candidata para un estudio estructural como los análisis de estabilidad realizados en el laboratorio indicaban. Afortunadamente, paralelamente a los chequeos en microscopio realizados con esta muestra llegaron al laboratorio dos candidatos más de 4F2hc/LAT1. Los mutantes 58 y 586 de h4F2hc/LAT1, presentados anteriormente, ofrecían grandes posibilidades.

Una vez tales ADNs fueron subclonados en el mismo plásmido que x4F2hc/LAT1, se transfectaron células de *Pichia pastoris* para que expresaran estas proteínas de manera estable, se realizó un cribado de clones y de tiempo de expresión con el fin de elegir aquella colonia que mejor rendimiento de producción presentaba.

Adicionalmente, los estudios funcionales sobre las células mostraban actividad de transporte de isoleucina en las células de *Pichia pastoris* que expresaban h4F2hc/LAT1 58 y h4F2hc/LAT1 586 respecto a células transfectadas con solo 4F2hc (subunidad no catalítica) (Figura 4).

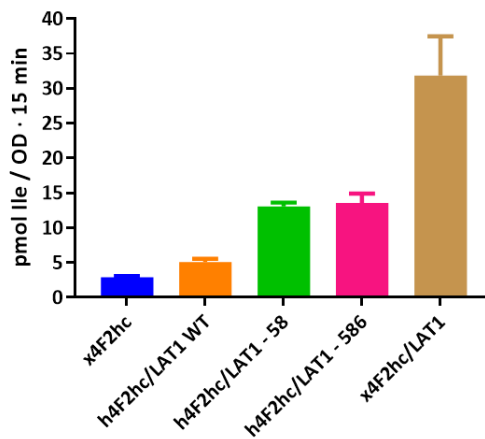


Figura 4: Ensayo funcional de los candidatos de 4F2hc/LAT1 expresados en *Pichia pastoris*. Ensayo de actividad de transporte de 10 μM [H^3] L-isoleucina mostrado en pmol de Ile normalizado por la densidad óptica (OD) del cultivo de *Pichia pastoris* empleado para cada caso; transporte medido a los 15 min. El resultado mostrado es el promedio de dos experimentos individuales realizados bajo las mismas condiciones.

4.2.1. Comparación en DDM/CHS

Con el fin de determinar el nivel de estabilidad que presentaban estos dos nuevos candidatos respecto a x4F2hc/LAT1 se realizaron 3 purificaciones paralelas. Para controlar la mejora de la estabilidad de los mutantes diseñados 58 y 586 también se expresó la proteína humana LAT1 salvaje (Figura 5).

La figura 5 muestra las comparaciones de todas las proteínas testadas. En primer lugar, se muestra que los mutantes h4F2hc/LAT1 58 y 586 habían aumentado considerablemente la estabilidad de la forma humana (Figura 5 - A y B). La forma salvaje de h4F2hc/LAT1 presentaba un pico más bajo y mucho más ancho.

Cuando se realizaba una comparación de tales mutantes respecto al candidato previo, x4F2hc/LAT1 (Figura 5 - C y D), los perfiles mostraban que las formas mutadas se expresaban a un nivel menor (Figura 5 - C), mostrando una estabilidad es casi idéntica (Figura 5 - D).

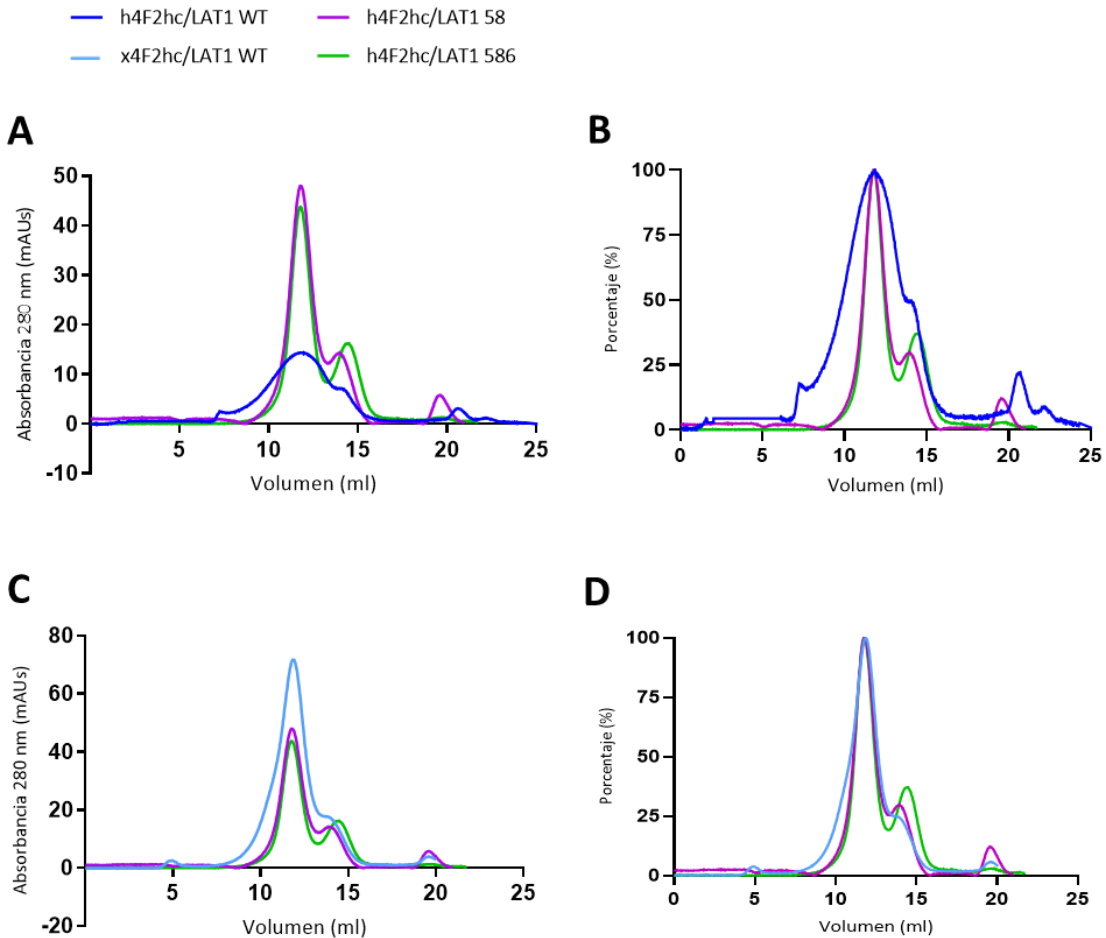


Figura 5: Perfiles de SEC de los candidatos de 4F2hc/LAT1 purificados en DDM/CHS. A) Comparación en absorbancia de h4F2hc/LAT1 (en azul oscuro), h4F2hc/LAT1 58 (en morado) y h4F2hc/LAT1 586 (en verde). B) Comparativa normalizada por altura del pico de h4F2hc/LAT1, h4F2hc/LAT1 58 y h4F2hc/LAT1 586. C) Comparación en absorbancia de x4F2hc/LAT1 (en azul claro), h4F2hc/LAT1 58 y h4F2hc/LAT1 586. D) Comparativa normalizada por altura del pico de x4F2hc/LAT1, h4F2hc/LAT1 58 y h4F2hc/LAT1 586.

4.2.2. Comparación en DM/CHS

Los resultados de la estabilidad de los candidatos con los que se estaba trabajando presentaban una buena estabilidad con la combinación DDM/CHS. No obstante, según los resultados mostrados por crio-ME, este detergente daba problemas relacionados con su tendencia a acumularse en la muestra como resultado del proceso de concentración. Es por ello por lo que se decidió utilizar un detergente de la misma familia que el DDM pero que formara micelas más pequeñas, reduciéndose de esta manera la acumulación de detergente como resultado de la concentración de la proteína.

El DM tiene una CMC más elevada que el DDM, lo que quiere decir que la concentración de detergente a la que se comienzan a formar las micelas es bastante menor.

El protocolo de purificación realizado fue el mismo que con DDM/CHS solo que la muestra era solubilizada en DM 1% / CHS 0,4% y la purificación se realizaba en presencia de DM 0,2% / CHS 0,08%.

Para los casos del heterodímero x4F2hc/LAT1 y de los mutantes de h4F2hc/LAT1, los picos mostrados por SEC (Figura 6) son muy similares a los obtenidos en una purificación con DDM/CHS, presentando un buen perfil de SEC. No obstante, no se tomaron imágenes al microscopio de las muestras bajo estas condiciones.

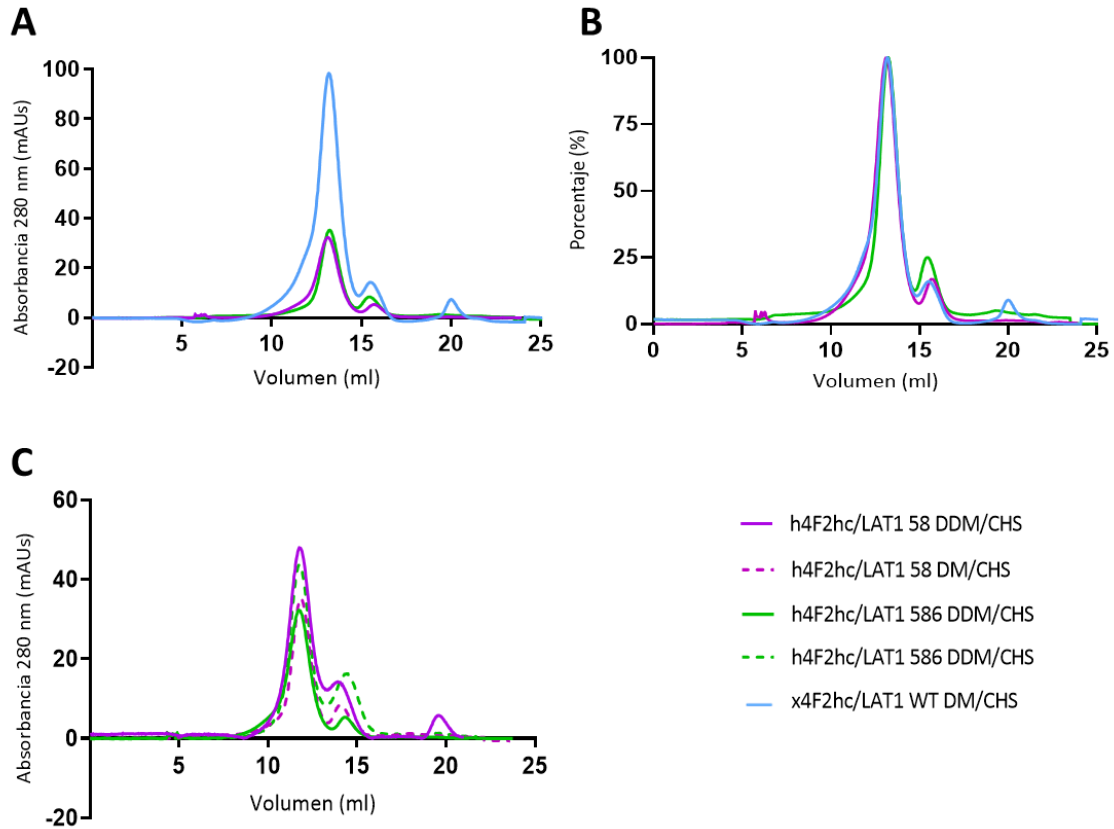


Figura 6: Perfiles de SEC de los candidatos de 4F2hc/LAT1 purificados en DM/CHS. A) Comparación en absorbancia de x4F2hc/LAT1 (en azul claro), h4F2hc/LAT1 58 (en morado) y h4F2hc/LAT1 586 (en verde). B) Comparativa normalizada por la altura de los picos de x4F2hc/LAT1, h4F2hc/LAT1 58 y h4F2hc/LAT1 586. C) Comparación en absorbancia de h4F2hc/LAT1 58 y h4F2hc/LAT1 586 purificados en DM/CHS con ellos mismos purificados en DDM/CHS (líneas discontinuas).

4.3. Nanodiscos

A partir de los resultados obtenidos en el chequeo de la muestra al microscopio, la cual mostraba exceso de detergente y disociación de sus dos subunidades al ser preparada en rejillas con hielo fino, la reconstitución en nanodiscos fue considerada una nueva alternativa para la mejora de la calidad de la muestra.

Los nanodiscos forman un sistema membranal (formado por una bicapa lipídica) con la proteína de interés en su interior. Por tanto, los nanodiscos no solo son una herramienta que incrementa el tamaño para ser resuelta por microscopía electrónica, sino que también le aporta un ambiente nativo.

Los nanodiscos no solo nos permiten eliminar el problema de exceso de detergente, sino que, por su propia arquitectura, le aporta estabilidad y robustez a la proteína de interés protegiéndola de roturas.

Los nanodiscos han sido introducidos en el laboratorio para facilitar el desarrollo de este proyecto, pero antes de poder aplicarlos a nuestros objetivos ha sido necesario adaptar los protocolos estándar a nuestras necesidades y condiciones (Tabla 3).

Ha sido necesario optimizar las expresiones y purificaciones con el objetivo de obtener una elevada cantidad de proteína pura (las porinas son contaminantes habituales de la purificación de las proteínas MSP). A continuación, la elección de los lípidos que formarán la bicapa, el detergente en el que se mantendrán las MSP previniendo que se ensamblen en nanodiscos y la forma en la que se eliminarán los detergentes también son otros puntos muy importantes que deben ser optimizados. Estos últimos puntos son más dependientes de la proteína de interés.

Previamente a la introducción de la proteína de interés en el sistema de nanodiscos, había que corroborar que la formación de estos era la correcta, determinándose que la relación molar entre las moléculas de lípidos (POPC) y de MSP era la adecuada. Las ratios de 1:80 a 1:120 eran los que mejores resultados mostraban en la SEC (Figura 7).

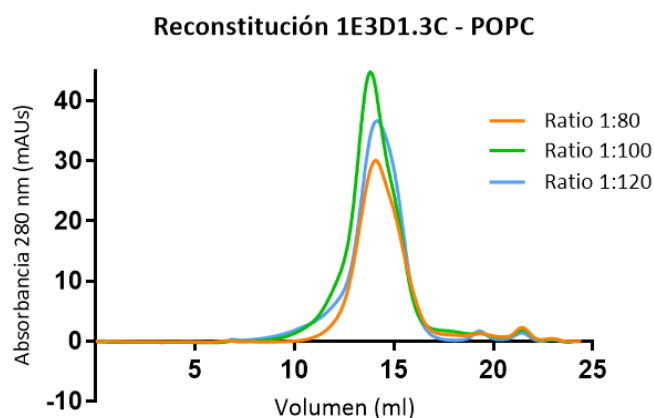


Figura 7: SEC de los nanodiscos formados por la MSP 1E3D1 y POPC.

No obstante, el análisis por DLS, como se esperaba, mostraba que los nanodiscos requerían mayor cantidad de lípidos a medida que el diámetro de estos era mayor. Por ejemplo, para el caso del MSP 1E3D1 con un diámetro de 12 nm, se requería al menos 80 moléculas de POPC por MSP (un nanodisco requiere dos MSPs) para dar buenas dispersiones, pero para el MSP 2N2 con un diámetro de 16 nm, la ratio 1:80 presentaba una mala dispersión, dando buenas dispersiones a partir de las 100 moléculas de POPC. Una mala dispersión en las muestras quiere decir que hay insuficiencia de lípidos y no todos los nanodiscos se forman correctamente (Tabla 2).

Nanodisco	1D1	1E3D1	2N2
Ratio (MSP : POPC) 1:60	Monodispersión	Polidispersión	Polidispersión
Ratio (MSP : POPC) 1:80	Monodispersión	Monodispersión	Polidispersión
Ratio (MSP : POPC) 1:100	Monodispersión	Monodispersión	Monodispersión
Ratio (MSP : POPC) 1:120	Monodispersión	Monodispersión	Monodispersión

Tabla 2: Resultados DLS de nanodiscos vacíos.

Nanodisco	Condición / experimento	Resultado
1E3D1.TEV	Expresión en <i>E. coli</i> BL10	Bueno
	Mantenimiento detergente durante toda la purificación	Bueno
	Stock en detergente DDM	Bueno
	Stock en detergente colato sódido	Bueno
	Stock sin detergente	Bueno
	Corte TEV	Malo
	MSP congelado reconstituido con DPPC, ratio 1:50	Malo
	MSP congelado reconstituido con DPPC, ratio 1:80	Malo
	MSP congelado reconstituido con DPPC, ratio 1:100	Malo
	MSP congelado reconstituido con DPPC, ratio 1:120	Malo
	MSP congelado y fresco reconstituido con POPC, ratio 1:50	Malo
	MSP congelado y fresco reconstituido con POPC, ratio 1:60	Bueno
	MSP congelado y fresco reconstituido con POPC, ratio 1:80	Bueno
	MSP congelado y fresco reconstituido con POPC, ratio 1:100	Bueno
	MSP congelado y fresco reconstituido con POPC, ratio 1:120	Malo
	NDs con POPC (1:100) con BasC reconstituido, ratio 1:2	Bueno
	NDs con POPC (1:100) con BasC reconstituido, ratio 1:5	Bueno
	NDs con POPC (1:100) con BasC reconstituido, ratio 1:10	Bueno
NDs con POPC (1:100) con BasC reconstituido, ratio 1:20	Bueno	
1E3D1.3C	Expresión en <i>E. coli</i> BL10	Malo
	Expresión en <i>E. coli rosseta</i>	Bueno
	Mantenimiento detergente durante toda la purificación	Malo
	Eliminación detergente durante un lavado	Bueno
	Stock en detergente colato sódido	Bueno
	Stock sin detergente	Bueno
	Corte 3C	Bueno
	MSP congelado reconstituido con POPC, ratio 1:80	Bueno
	MSP congelado reconstituido con POPC, ratio 1:100	Bueno
	MSP congelado reconstituido con POPC, ratio 1:120	Bueno
	MSP congelado reconstituido con POPC, ratio 1:150	Malo
	MSP cortado y congelado reconstituido con POPC, ratio 1:80	Malo
	MSP cortado y congelado reconstituido con POPC, ratio 1:100	Malo
	MSP cortado y congelado reconstituido con POPC, ratio 1:120	Malo
MSP cortado y congelado reconstituido con POPC, ratio 1:150	Malo	
2N2.TEV	Expresión en <i>E. coli</i> BL10	Bueno
	Mantenimiento detergente durante toda la purificación	Bueno
	Stock en detergente DDM	Bueno
	Stock en detergente colato sódido	Bueno
	Stock sin detergente	Bueno
	Corte TEV	Malo
	MSP congelado reconstituido con DPPC, ratio 1:80	Malo
	MSP congelado reconstituido con DPPC, ratio 1:100	Malo
	MSP congelado y fresco reconstituido con POPC, ratio 1:60	Malo
	MSP congelado y fresco reconstituido con POPC, ratio 1:80	Bueno
	MSP congelado y fresco reconstituido con POPC, ratio 1:100	Bueno
	MSP congelado y fresco reconstituido con POPC, ratio 1:120	Malo
	Stock guardado sin detergente	Malo
	2N2.3C	Expresión en <i>E. coli</i> BL10
Expresión en <i>E. coli rosseta</i>		Bueno
Mantenimiento detergente durante toda la purificación		Malo
Eliminación detergente durante un lavado		Bueno
Stock en detergente colato sódido		Bueno
Stock sin detergente		Bueno
MSP congelado reconstituido con POPC, ratio 1:80		Bueno
MSP congelado reconstituido con POPC, ratio 1:100		Bueno
MSP congelado reconstituido con POPC, ratio 1:120		Bueno
MSP congelado reconstituido con POPC, ratio 1:150		Malo
1D1.TEV	Expresión en <i>E. coli rosseta</i>	Bueno
	Eliminación detergente durante un lavado	Bueno
	Stock en detergente colato sódido	Bueno
	MSP congelado reconstituido con POPC, ratio 1:80	Bueno
	MSP congelado reconstituido con POPC, ratio 1:100	Bueno
MSP congelado reconstituido con POPC, ratio 1:120	Bueno	

Tabla 3: Optimizaciones probadas en las proteínas MSP. Para algunas de las proteínas se han empleado dos construcciones distintas en las que difieren la diana de corte proteolítico, TEV o 3C.

A continuación, la elección de los diferentes tamaños de proteína MSP depende del tamaño de la proteína que quiera ser introducida. Debido a que la producción de 4F2hc/LAT1 resulta costosa y se obtiene una escasa cantidad, se recurrió a la proteína bacteriana BasC cuya producción es mucho más rápida y que al obtenerse una gran cantidad de proteína permite realizar mayor número de pruebas con una misma producción de proteína.

4.3.1. BasC en nanodiscos

La reconstitución de BasC resultó positiva para todas las ratios (BasC:MSP) analizadas, mostrando los geles teñidos con plata colocalización de ambas proteínas (Figura 8 - C). Sin embargo, el perfil de SEC mostraba que no todas las ratios habían reconstituido BasC con la misma eficacia; el doble pico sugiere que el primero corresponde a nanodiscos con BasC y el segundo a nanodiscos vacíos (Figura 8 - B).

La eliminación de detergente en ausencia de proteína MSP desestabilizaba la proteína de membrana (BasC) y resultaba en agregación (Figura 8 - A). Tal resultado indicaba que si existe colocalización de BasC y el MSP es debido a que BasC se encontraba reconstituido en el nanodisco, única vía por la que se mantendría estable (Figura 8 - C).

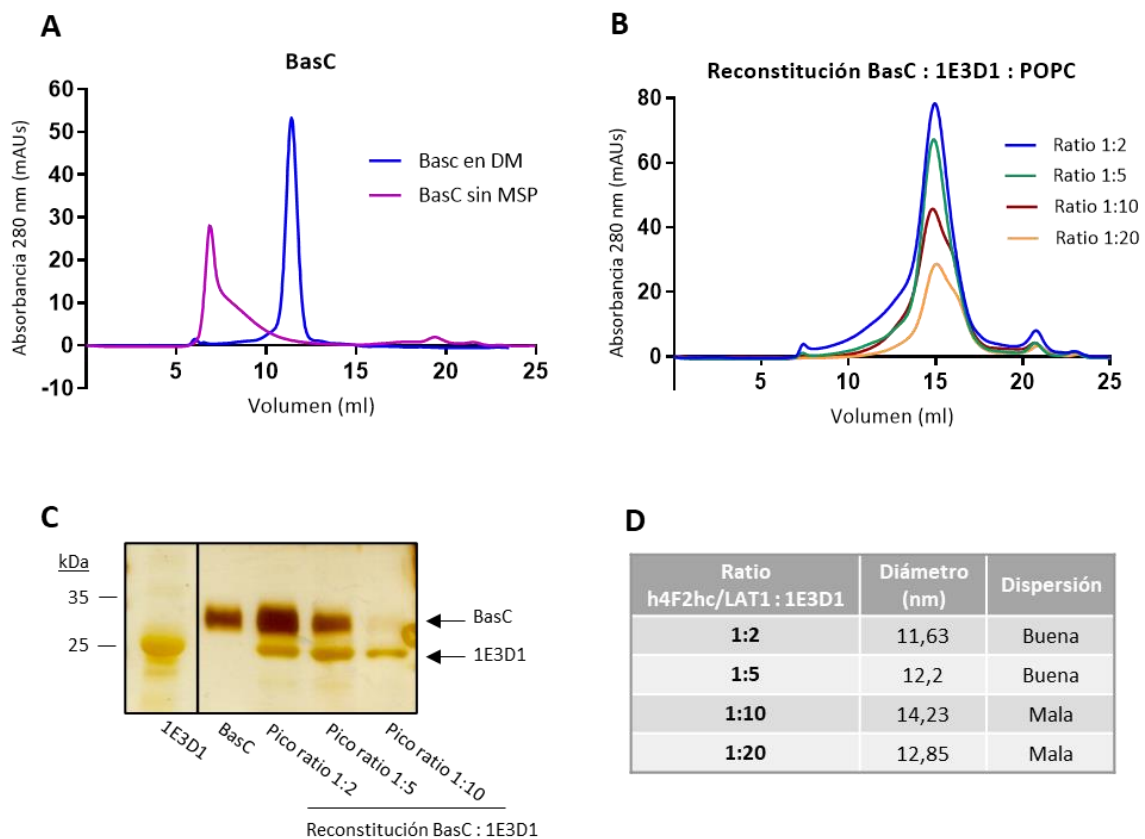


Figura 8: Reconstitución de BasC en nanodiscos formados por POPC y 1E3D1. A) Perfil de SEC del control de BasC, mismo protocolo que el de la reconstitución, pero sin proteína MSP (morado). B) Perfiles de SEC de las reconstituciones con las diferentes ratios probadas (BasC:MSP). La ratio entre lípidos y proteínas MSP es 1:100. C) Gel de acrilamida al 12% teñido con plata de las fracciones recogidas de la reconstitución de BasC. D) Tabla de los resultados del análisis por DLS.

Adicionalmente, el análisis por DLS confirmaba que la muestra procedente de las ratios 1:2 y 1:5 mantenían una buena dispersión (Figura 8 - D). Los complejos con mayor ratio de MSP mostraban una peor dispersión por DLS sugiriendo mezcla entre nanodiscos vacíos y nanodiscos con proteína en su interior (hay contaminación cruzada entre ambos picos).

4.3.2. 4F2hc/LAT1 en nanodiscos

Una vez puesto a punto el protocolo de reconstitución con BasC, este no era tan extrapolable a 4F2hc/LAT1 como era esperado. BasC estaba purificada en DM y al ser purificado mucha mayor cantidad de proteína, no era necesario concentrarlo tantas veces como el caso de 4F2hc/LAT1 (de *Xenopus laevis* y de humano). Además, 4F2hc/LAT1 era purificado en primer lugar en DDM/CHS, condiciones bajo las cuales la proteína no se ha podido reconstituir con éxito.

Ante el mismo protocolo de eliminación del detergente, el control sin proteína MSP mostraba proteína 4F2hc/LAT1 estable (para todos los candidatos, de *Xenopus laevis* y mutantes humanos) (datos no mostrados), lo que indicaba que estas proteínas debían aún encontrarse en micelas de detergente (DDM/CHS).

Para reducir el exceso de detergente se decidió reconstituir 4F2hc/LAT1 purificado en un detergente de micela más pequeña. Por tal razón, se analizó el comportamiento de todas las formas de 4F2hc/LAT1 en el detergente DM. Todos los candidatos de 4F2hc/LAT1 mostraban un buen nivel de estabilidad con la combinación DM/CHS (Figura 6) y bajo estas condiciones de purificación, fueron reconstituidos en nanodiscos formados por POPC y el MSP 1E3D1 con éxito.

En estas nuevas condiciones, el detergente sí que fue correctamente eliminado, ya que toda la proteína no co-incubada con las proteínas MSP se agregaba como resultado de la eliminación del detergente y no se detectaba proteína en la SEC (Figura 9 - A, rosa).

Además, de una manera muy diferente a la reconstitución con BasC, al ser h4F2hc/LAT1 una proteína mucho más grande, el pico resultante de la reconstitución tenía un tamaño mucho más grande en comparación con 4F2hc/LAT1 integrado en micelas de detergente, nanodiscos vacíos y nanodiscos con BasC (Figura 9 - B). El gel teñido en plata corrobora que este pico presentaba co-localización de h4F2hc/LAT1 y la proteína MSP (Figura 9 - C).

El análisis por DLS de la muestra procedente del pico que contiene el heterodímero reconstituido mostraba una alta monodispersión, lo que indicaba que en su mayoría correspondía a nanodiscos llenos con 4F2hc/LAT1. Por su lado, el último pico y más grande, también mostraba una alta monodispersión, ya que estaba compuesto en gran parte por nanodiscos vacíos.

Por último, es interesante destacar que la distancia medida por DLS en cada muestra que presenta una buena monodispersión es diferente según se trate de nanodiscos vacíos (10,26 nm), nanodiscos con BasC (12,2 nm) y nanodiscos con 4F2hc/LAT1 (21,66 nm), ya que la distancia de cada eje en cada caso es diferente.

Todas estas reconstituciones partían de muy poca cantidad de 4F2hc/LAT1 por lo que no era posible enviarlas al microscopio para ver que efectivamente contenían nanodiscos con proteína en su interior.

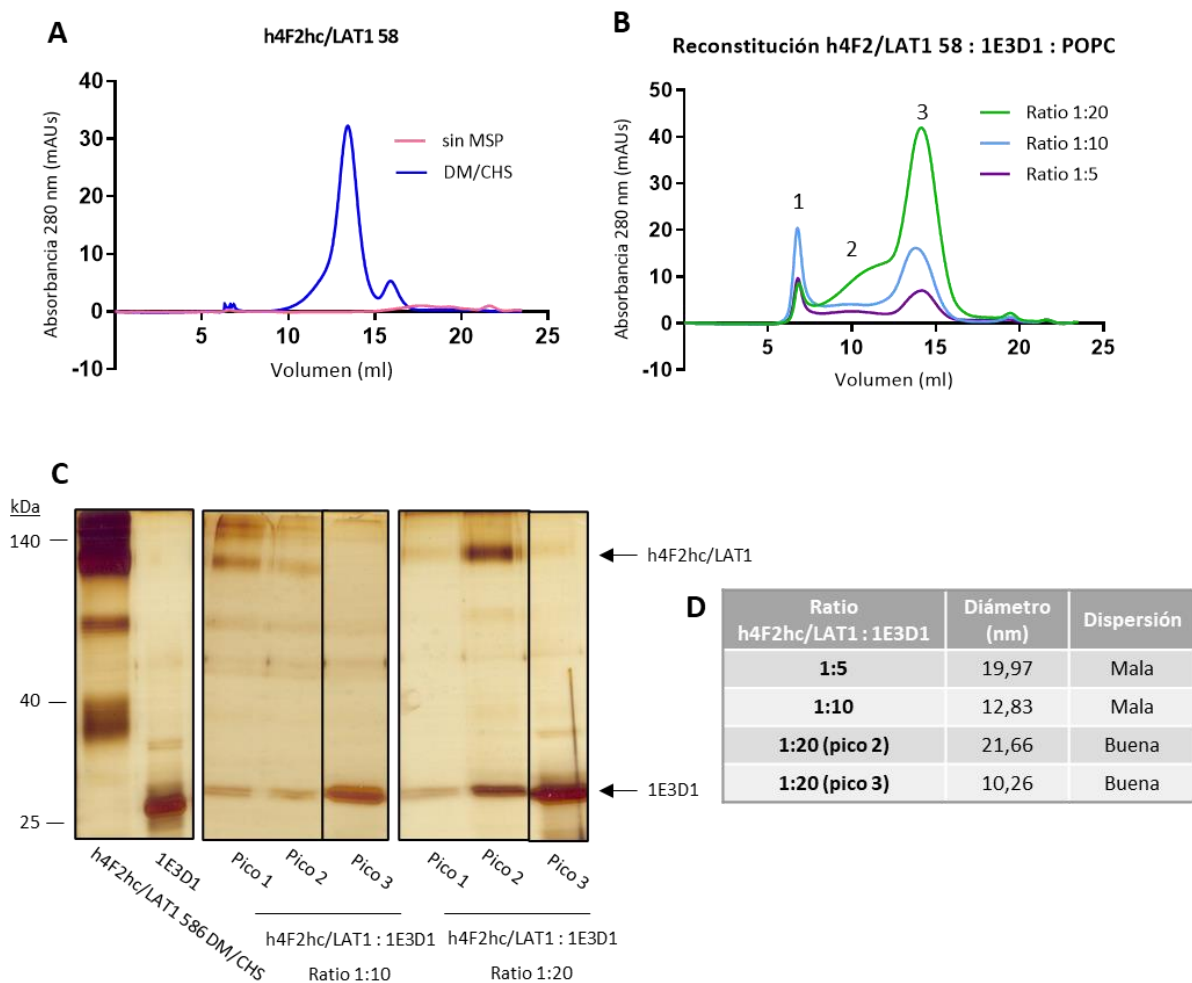


Figura 9: Reconstitución de h4F2hc/LAT1 58 en nanodiscos formados por POPC y 1E3D1. Resultados similares fueron obtenidos con x4F2hc/LAT1 y h4F2hc/LAT1 586. A) Perfil de SEC del control de h4F2hc/LAT1 58, mismo protocolo que el de la reconstitución, pero sin proteína MSP (rosa). B) Perfiles de SEC de las reconstituciones con las diferentes ratios probadas (h4F2hc/LAT1:MSP-1E3D1). La ratio entre lípidos y proteínas MSP es 1:100. C) Gel de acrilamida al 12% teñido con plata de las fracciones recogidas de la reconstitución de h4F2hc/LAT1 58. D) Tabla de los resultados del análisis por DLS.

5. DISCUSIÓN

A pesar de no haber podido alcanzar los objetivos inicialmente planteados a su inicio, el trabajo mostrado en este Apéndice ha ayudado enormemente al éxito del que a la postre se ha convertido en el cuerpo principal de esta tesis, debido a los conocimientos que se han conseguido respecto a manipulación de diversos sistemas de expresión, proteínas de membrana o el uso de detergentes, entre otros.

El análisis de estabilidad de los mutantes 58 y 586 de h4F2hc/LAT1, generados siguiendo la aproximación de *consensus* mutagénesis, ha mostrado la utilidad de este tipo de aproximaciones como herramientas para la estabilización de proteínas de membrana con escasa estabilidad. En este sentido, recientemente se ha publicado la estructura por crio-ME de un HAT (h4F2hc/xCT) a 6,2 Å de resolución optimizado por *consensus* mutagénesis (Oda *et al.*, 2020). La proteína h4F2hc/xCT está

relacionada con la defensa ante el estrés oxidativo y por tanto relacionada con el crecimiento de células tumorales (Takeuchi *et al.*, 2013).

El emplear sistemas de expresión, como las células de levadura *Pichia pastoris*, que no presentan colesterol en su membrana, obliga a tener que añadir colesterol durante la purificación. Debido a como se ha registrado, numerosos estudios avalan que la presencia de colesterol es esencial para las proteínas transportadoras realicen adecuadamente su función (Xu *et al.*, 2001). Tener que suplementar los detergentes con un porcentaje de colesterol puede ser una posible causa de la variabilidad de la estabilidad que presenta la proteína (en algunas ocasiones las SEC aparecían con un hombro en la región ascendente del pico) y que tal heterogeneidad dificultaba la resolución de la estructura.

Durante el desarrollo de este proyecto han sido publicadas las estructuras de numerosos HATs y en todas ellas se han empleado como sistema de expresión células de mamíferos (Yan *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2019, Wu *et al.*, 2020), lo que nos sugiere que tal vez para tener una muestra con la calidad suficiente para realizar un estudio estructural de los HATs, estos requieran ser expresados en sistemas de expresión más fidedignos, ya sea células de mamíferos como ha sido demostrado en múltiples ocasiones (Yan *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2019, Wu *et al.*, 2020), como células de insectos o incluso una cepa de *Pichia pastoris* que produce colesterol de manera endógena (Hirz *et al.*, 2013) cuya eficacia no ha sido testada.

Los estudios realizados con los tres candidatos trabajados nos han permitido entender la diferente aportación de cada uno de los detergentes usados. El detergente DDM posee una CMC alta, lo cual quiere decir que la concentración requerida en el medio a partir de la cual se formarán las micelas alrededor de las proteínas con dominios transmembranales es alta. Por lo contrario, la CMC del DM es hasta 10 veces inferior, además de ser un detergente más pequeño y que por ello da lugar a micelas más pequeñas.

En cuanto a términos de estabilidad, para todos los candidatos apenas se ha observado variabilidad respecto a la misma proteína purificada en DDM/CHS (Figura 5). No obstante, al ser la molécula de DDM mucho más grande que la del DM, durante los procesos de concentración se ha observado que mientras la primera se concentraba junto a la proteína, produciendo finalmente exceso de detergente que empeoraba la calidad de la muestra, el DM no se concentraba puesto que se observaba espuma en el volumen eluido de los concentradores (Errasti-Murugarren *et al.*, 2021).

En el mismo sentido, el protocolo de eliminación de detergente mediante *biobeads* con el objetivo de reconstituir la proteína en los nanodiscos, mostraba una baja eficacia para el caso del DDM. La concentración en el medio del DDM que presentaba la muestra era tal alta que no pudo ser eliminado correctamente.

Los detergentes más exitosamente empleados para resolver transportadores, y aunque es fundamental realizar pruebas sobre cuál de ellos puede resultar más favorable para la proteína de estudio; parecen dar son aquellos que poseen una molécula más pequeña (Parker y Newstead, 2016).

A pesar de no haber visualizado en el microscopio la nueva calidad de la muestra dada por el DM, las perspectivas que nos aportaba trabajar con nanodiscos también resultaban ser muy prometedoras. Pasamos a querer resolver la proteína en un nanodisco en vez de en micelas de detergente no solo

por solventar los problemas con el detergente, sino por estudiar tal proteína en un ambiente lipídico, y, además, con la ventaja de que las MSP aportan tamaño a la proteína.

Hasta la fecha numerosas estructuras han sido resueltas con el sistema de nanodiscos, el canal de protones V-ATPase Vo (Roh *et al.*, 2018), el transportador MalFGK2 (Álvarez *et al.*, 2015) o el transportador K-Ras4B (Mazhab-Jafari *et al.*, 2015) o el receptor rianodina (Efremov *et al.*, 2015); resueltos por microscopía electrónica, cristalografía y NMR (*nuclear magnetic resonance*), aportando algunos de estos estudios información adicional a aquella aportada por la estructura resuelta en micelas de detergente (Álvarez *et al.*, 2015; Mazhab-Jafari *et al.*, 2015).

La publicación a alta resolución de la proteína 4F2hc/LAT1 humana (Lee *et al.* 2019, Yan *et al.* 2019) se produjo en el momento en el que estábamos alcanzando una reconstitución positiva de la proteína en nanodiscos. El proyecto continuó hasta que tal objetivo fue alcanzado.

Aunque la estructura de la proteína con la que estábamos trabajando ya estaba resuelta, lo fue en ambiente de detergente y nosotros acabábamos de conseguir tal proteína en un ambiente lipídico y por tanto nativo.

Poder resolver la estructura de 4F2hc/LAT1 en un ambiente lipídico permitiría poder comparar tal estructura con la ya publicada y poder dar luz a los cambios estructurales a los que podrían estar sometidos los dominios transmembrana periféricos por tener que establecer contactos con moléculas de detergentes en vez de moléculas de lípidos. Adicionalmente, era posible que este nuevo ambiente produjera que la proteína presentara una conformación diferente a las que se habían descrito en otras estructuras ya resueltas.

Y, por otro lado, el segundo objetivo de continuar con este proyecto es que mantener la proteína en un nanodisco podría aplicarse a otros estudios. Los nanodiscos forman un sistema membranal individualizado, pudiendo estudiar sobre ellos la actividad funcional de la proteína tal y como se realiza con los liposomas.

No obstante, debido al rápido y próspero progreso del trabajo relacionado con la resolución de la estructura de 4F2hc/LAT2 humana, este proyecto fue finalmente interrumpido. Aun así, durante todo el trabajo realizado durante este proyecto, ha permitido aportar conocimientos y experiencia, tanto a mí misma como al laboratorio, sobre estas nuevas herramientas con alto potencial. Actualmente, mi compañero Adrià Nicolàs i Aragó ha podido aprovechar todo el trabajo realizado con los nanodiscos para su propio proyecto de tesis.

Como ya se ha mencionado varias veces, emplear nanodiscos para resolver estructuras da alternativas a varios de los problemas que se han dado durante este proceso como exceso de detergente, inestabilidad de la proteína (si esta está formada por varias subunidades) y pequeño tamaño. Junto a ello, es importante mencionar que la herramienta de los nanodiscos se puede usar con multitud de objetivos.

6. BIBLIOGRAFÍA

Álvarez, F.J., C. Orelle, Y. Huang, R. Bajaj, R.M. Everly, C.S. Klug, A. L. Davidson (2015). Full engagement of liganded maltose-binding protein stabilizes a semi-open ATP-binding cassette dimer in the maltose transporter. *Mol. Microbiol*, 98, 878–894.

Bartoccioni, P., J. Fort, A. Zorzano, E. Errasti-Murugarren, M. Palacín (2019). Functional characterization of the alanine-serine-cysteine exchanger of *Carnobacterium* sp AT7. *J Gen Physiol*, 151(4):505-517.

Bayburt, T.H., Y.V. Grinkova, S.G. Sligar (2002). Self-assembly of discoidal phospholipid bilayer nanoparticles with membrane scaffold proteins. *Nano Lett*, 2, 853-856.

Bayburt, T.H y S.G. Sligar (2010). Membrane Protein Assembly into Nanodiscs. *FEBS Lett*, 584(9): 1721–1727.

Bayburt, T.H., S.A. Vishnivetskiy, M.A. McLean, T. Morizumi, C.C Huang, J.J.G. Tesmer, O.P. Ernst, S.G. Sligar, V.V. Gurevich (2011). Monomeric Rhodopsin is Sufficient for Normal Rhodopsin Kinase (GRK1) Phosphorylation and Arrestin-1 Binding. *J. Biol. Chem*, 286:1420–1428.

Boldog, T., S. Grimme, M. Li, S.G. Sligar, G.L. Hazelbauer (2006). Nanodiscs separate chemoreceptor oligomeric states and reveal their signaling properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103, 11509-11514.

Borsani, G., M. T. Bassi, M. P. Sperandeo, A. De Grandi, A. Buoninconti, M. Riboni, M. Manzoni, B. Incerti, A. Pepe, G. Andria, A. Ballabio y G. Sebastio (1999). SLC7A7, encoding a putative permease-related protein, is mutated in patients with lysinuric protein intolerance. *Nat Genet*, 21(3): 297-301.

Brouillette, C.G., J.L. Jones, T.C Ng, H. Kercret, B.H. Chung, J.P. Segrest (1984). Structural studies of apolipoprotein A-I/phosphatidylcholine recombinants by high-field proton NMR, nondenaturing gradient gel electrophoresis, and electron microscopy. *Biochemistry*, 23, 359-367.

Costa i Torres, M. (2012). The first 3D structural model of an eukaryotic heteromeric amino acid transporter. *Doctoral thesis, Universitat de Barcelona*.

Denisov, I.G., Y.V. Grinkova, A.A. Lazarides, S.G Sligar (2004) Directed self-assembly of monodisperse phospholipid bilayer Nanodiscs with controlled size. *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 3477-3487.

Denisov, I.G., y S.G. Sligar (2017). Nanodiscs in Membrane Biochemistry and Biophysics. *Chem Rev*, 117(6):4669-4713.

Deves, R. y C. A. Boyd (1998). Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. *Physiol Rev*, 78(2): 487-545.

Efremov, R.G., A. Leitner, R. Aebersold, S. Raunser (2015). Architecture and conformational switch mechanism of the ryanodine receptor. *Nature*, 517, 39–43.

Estevez, R., M. Camps, A. M. Rojas, X. Testar, R. Deves, M. A. Hediger, A. Zorzano, M. Palacín (1998). The amino acid transport system γ -L/4F2hc is a heteromultimeric complex. *FASEB J*, 12(13): 1319-1329.

Errasti-Murugarren, E., P. Bartoccioni, M. Palacín (2021). Membrane Protein Stabilization Strategies for Structural and Functional Studies. *Membranes (Basel)*, 22;11(2):155

Fang, Y., H. Jayaram, T. Shane, L. Kolmakova-Partensky, F. Wu, C. Williams, Y. Xiong, C. Miller (2009). Structure of a prokaryotic virtual proton pump at 3.2 Å resolution. *Nature*, 460(7258): 1040-1043.

Fernández, E., M. Jiménez-Vidal, M. Calvo, A. Zorzano, F. Tebar, M. Palacín, J. Chillarón (2006). The structural and functional units of heteromeric amino acid transporters. The heavy subunit rBAT dictates oligomerization of the heteromeric amino acid transporters. *J Biol Chem*, 281(36): 26552-26561.

Fort, J., L.R. de la Ballina, H.E. Burghardt, C. Ferrer-Costa, J. Turnay, C. Ferrer-Orta, I. Uson, A. Zorzano, J. Fernandez-Recio, M. Orozco, M. A. Lizarbe, I. Fita y M. Palacín (2007). The structure of human 4F2hc ectodomain provides a model for homodimerization and electrostatic interaction with plasma membrane. *J Biol Chem*, 282(43): 31444-31452.

Gasol, E., M. Jiménez-Vidal, J. Chillarón, A. Zorzano and M. Palacín (2004). Membrane topology of system xc- light subunit reveals a re-entrant loop with substrate-restricted accessibility. *J Biol Chem*, 279(30): 31228-31236.

Hirz, M., G. Richter, R. Leitner, T. Wriessnegger, H. Pichler (2013). A novel cholesterol-producing *Pichia pastoris* strain is an ideal host for functional expression of human Na,K-ATPase $\alpha 3\beta 1$ isoform. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97:9465–9478.

Jonas A. (1986). Reconstitution of high-density lipoproteins. *Methods Enzymol*, 128:553–582.

Knopf E.B., C. Vilches, S.M.R. Camargo, E. Errasti-Murugarren, A. Staubli, C. Mayayo, F.L. Munier, N. Miroshnikova, N. Poncet, A. Junza (2019). Dysfunctional LAT2 Amino Acid Transporter Is Associated With Cataract in Mouse and Humans. *Front Physiol*, 10: 688.

Lee Y., P. Wiryasermkul, C. Jin, L. Quan, R. Ohgaki, S. Okuda, T. Kusakizako, T. Nishizawa, K. Oda, R. Ishitani *et al.*, (2019). Cryo-EM structure of the human L-type amino acid transporter 1 in complex with glycoprotein CD98hc. *Nat Struct Mol Biol*, 26: 510-517.

Mastroberardino, L., B. Spindler, R. Pfeiffer, P. J. Skelly, J. Loffing, C. B. Shoemaker y F. Verrey (1998). Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family. *Nature*, 395(6699): 288-291.

Mazhab-Jafari, M.T., C. B. Marshal, M.J. Smith, G. M.C. Gasmi-Seabrook, P.B. Stathopoulos, F. Inagaki, L.E. Kay, B.G. Neel, M. Ikura (2015). Oncogenic and RASopathy-associated K-RAS mutations relieve

membrane-dependent occlusion of the effector-binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 112, 6625–6630.

Nath A., W.M. Atkins, and S.G. Sligar (2007) Applications of Phospholipid Bilayer Nanodiscs in the Study of Membranes and Membrane Proteins. *Biochemistry*, 27;46(8):2059-69.

Nichols J.W. (1988) Phospholipid Transfer between Phosphatidylcholine-Taurocholate Mixed Micelles"1". *Biochemistry*, 27, 3925-3931.

Oda K., Y. Lee, P. Wiriyasermkul, Y. Tanaka, M. Takemoto, K. Yamashita, S. Nagamori, T. Nishizawa, O. Nureki (2020). Consensus mutagenesis approach improves the thermal stability of system x c - transporter, xCT, and enables cryo-EM analyses. *Protein Sci*, 29(12):2398-2407.

Palacín, M. y Y. Kanai (2004). The ancillary proteins of HATs: SLC3 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch*, 447(5): 490-494.

Palczewski, K., T. Kumasaka, T. Hori, C.A. Behnke, H. Motoshima, B.A. Fox, I. Le Trong, D.C. Teller, T. Okada, R.E. Stenkamp, M. Yamamoto, M. Miyano (2000). Crystal structure of rhodopsin: A xg protein-coupled receptor. *Science*, 289, 739-745.

Pfeiffer, R., B. Spindler, J. Loffing, P. J. Skelly, C. B. Shoemaker and F. Verrey (1998). Functional heterodimeric amino acid transporters lacking cysteine residues involved in disulfide bond. *FEBS Lett*, 439(1-2): 157-162.

Reig, N., J. Chillarón, P. Bartoccioni, E. Fernández, A. Bendahan, A. Zorzano, B. Kanner, M. Palacín, J. Bertran (2002). The light subunit of system b(o,+) is fully functional in the absence of the heavy subunit. *EMBO J*, 21(18): 4906-4914.

Ritchie, T.K., Y.V. Grinkova, T.H. Bayburt, I.G. Denisov, J.K. Zolnerciks, W.M. Atkins, S.G. Sligar (2009). Reconstitution of Membrane Proteins in Phospholipid Bilayer Nanodiscs. *Methods Enzymol*, 464: 211–231.

Roh, S.H., N.J. Stam, C.F. Hryc, S. Couoh-Cardel, G. Pintilie, W. Chiu, S. Wilkens (2018). The 3.5-Å° CryoEM Structure of Nanodisc Reconstituted Yeast Vacuolar ATPase Vo Proton Channel. *Mol Cell*, 69(6):993-1004.e3.

Rosell, A., M. Meury, E. Álvarez-Marimón, M. Costa, L. Pérez-Cano, A. Zorzano, J. Fernandez-Recio, M. Palacín y D. Fotiadis (2014). Structural bases for the interaction and stabilization of the human amino acid transporter LAT2 with its ancillary protein 4F2hc. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(8): 2966-2971.

Schuler, M.A., I.G. Denisov, S.G. Sligar (2013). Nanodiscs as a new tool to examine lipid-protein interactions. *Methods Mol Biol*, 974: 415–433.

Shchor, K. y G. Evan (2007). Tumor angiogenesis: cause or consequence of cancer? *Cancer Res*, 67(15): 7059-7061.

Takeuchi, S., K. Wada, T. Toyooka, N. Shinomiya, H. Shimazaki, K. Nakanishi, K. Nagatani, N. Otani, H. Osada, Y. Uozumi, H. Matsuo, H. Nawashiro (2013). Increased xCT expression correlates with tumor invasion and outcome in patients with glioblastomas. *Neurosurgery*, 72(1): 33-41.

Tusnády, G.E. y I. Simón (1998). Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. *J. Mol. Biol*, 283, 489-506.

Tusnády, G.E. y I. Simón (2001). The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics*, 17, 849-850.

Xu, D. y M.E. Hemler (2005). Metabolic activation-related CD147-CD98 complex. *Mol Cell Proteomics*, 4(8):1061-71.

Xu, X., R. Bittman, G. Duportail, D. Heissler, C. Vilcheze, E. London (2001). Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (rafts). Comparison of cholesterol to plant, fungal, and disease associated sterols and comparison of sphingomyelin, cerebrosides, and ceramide. *J Biol Chem*, 276:33540-6.

Yan, R., X. Zhao, J. Lei, Q. Zhou (2019). Structure of the human LAT1-4F2hc heteromeric amino acid transporter complex. *Nature*, 568: 127-130.