

Doctoral Thesis ETH No. 15797

**HETERODIMERIC AMINO ACID TRANSPORTERS:  
GLYCOPROTEIN DOMAIN(S) INVOLVED IN  
FUNCTIONAL SUBUNIT INTERACTION**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

**RAFFAELLA FRANCA**

Dottore in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

Università di Trieste

Trieste, Italy

born 01.10.1974

citizen of ITALY

accepted on the recommendation of  
Prof. Heidi Wunderli-Allenspach, examiner  
Prof. François Verrey, co-examiner  
Prof. Dario Neri, co-examiner

2004

## SUMMARY

The heterodimeric amino acid transporters form the only amino acid transporter family known to be composed of two covalently linked subunits, a type II glycoprotein heavy chain (4F2heavy chain (4F2*hc*) or rBAT) and a polytopic membrane protein light chain (LAT1, LAT2,  $\gamma^+$ LAT1,  $\gamma^+$ LAT2, xCT, ascAT1 or  $b^{0,+}$ AT). Current evidence suggests that the heavy chain is mainly involved in the trafficking of the complex to the plasma membrane and thus seems to be responsible for the heterodimer localization at the basolateral (4F2*hc*) or apical (rBAT) surface of polarized cells. The function of the light chain is to catalyse the transport process. Whereas rBAT associates with  $b^{0,+}$ AT to form a cystine and cationic amino acid transporter, 4F2*hc* can associate with all other known homologous light chains, for instance with LAT1 to form a neutral amino acid transporter. The existence of a physiological partner of rBAT other than  $b^{0,+}$ AT is hypothesized but not yet demonstrated. To identify such a novel rBAT partner, we performed a yeast-two hybrids screen searching for proteins potentially expressed at the cell surface of kidney proximal tubules that would interact with the intracellular or the extracellular part of rBAT. The proteins identified in these screens did not fulfill the expectation and were not further characterized.

The main part of the present PhD thesis is a structure-function study aimed at identifying, within the glycoproteins, the structural domains 1) involved in the recognition of the partner light chains, 2) required to obtain a functional transporter at the cell surface, and 3) necessary for the heterodimer localization at the apical or basolateral sides of polarized cells. To address the first two questions, chimeric and truncated forms of rBAT and 4F2*hc* were co-expressed in *Xenopus laevis* oocytes with  $b^{0,+}$ AT or LAT1. Heavy chain-light chain association was analyzed by co-immunoprecipitation, and the transport function tested by tracer uptake experiments. The results indicate that the cytoplasmic tail and the transmembrane domain of rBAT play together a dominant role in selective functional interaction with  $b^{0,+}$ AT, whereas the extracellular domain appears to facilitate the L-cystine uptake specifically. In the case of 4F2*hc*, our experimental conditions did not allow us to outline glycoprotein domain(s) *per se* necessary in the association and functional surface expression of LAT1. However, we can conclude that the extracellular glycosidase-like domain of 4F2*hc* is dispensable for the interaction, since a heavy chain truncated form,

comprising the NH<sub>2</sub>-terminal part up to the neck region, promotes a functional expression of LAT1 at the surface.

The heterologous expression system (MDCK epithelial cell line) was used to investigate the interaction of chimeric constructs with b<sup>0,+</sup>AT or LAT1 in a more physiological context. Localization studies of the heterodimers formed are needed. Available data do not yet allow us to clarify the role of the different heavy chain domain(s) in directing the polarity of surface expression.

## ZUSAMMENFASSUNG

Die heterodimeren Aminosäuren-Transporter bilden die einzige bekannte Familie von Aminosäure-Transportern, welche aus zwei kovalent verbundenen Untereinheiten bestehen, einer schweren Kette (Typ II Glykoprotein: 4F2heavy chain (4F2hc) oder rBAT) und einer leichten Kette (Membranprotein: LAT1, LAT2, y<sup>+</sup>LAT1, y<sup>+</sup>LAT2, xCT, ascAT1 oder b<sup>0,+</sup>AT). Die schwere Kette scheint hauptsächlich den Komplex zur Plasmamembran zu dirigieren und ist somit wahrscheinlich für die basolaterale bzw. apicale Lokalisierung des Heterodimers auf der Oberfläche polarisierter Zellen verantwortlich. Die leichte Kette katalysiert den Transport der Aminosäuren. Während rBAT mit b<sup>0,+</sup>AT einen Transporter formt, welcher Cystin und kationische Aminosäuren transportiert, assoziiert 4F2hc mit allen anderen bekannten homologen leichten Ketten; z. B. bildet 4F2hc mit LAT1 einen Transporter, welcher neutrale Aminosäuren transportiert. Es besteht die Hypothese, dass neben b<sup>0,+</sup>AT noch ein weiterer physiologischer Partner für rBAT existiert, dessen Vorhandensein bisher aber nicht nachgewiesen werden konnte. Um diesen möglichen neuen Partner von rBAT zu identifizieren, führten wir „yeast-two-hybrid“-Screenings durch, wobei nach Proteinen gesucht wurde, welche potentiell auf der Zelloberfläche des proximalen Tubulus in der Niere exprimiert werden und mit der intrazellulären bzw. der Ektodomäne von rBAT interagieren. Die identifizierten Proteine dieser Screenings entsprachen nicht den Erwartungen und wurden nicht weiter charakterisiert.

Der Hauptteil dieser Doktorarbeit befasst sich mit Struktur-Funktion-Untersuchungen zur Identifikation struktureller Domänen der Glykoproteine, welche 1) bei der Erkennung der leichten Kette eine Rolle spielen, 2) zur Expression eines funktionellen Transporters an der Zelloberfläche benötigt werden und 3) für die Lokalisierung des Heterodimers auf der basolateralen bzw. apicalen Plasmamembran polarisierter Zellen verantwortlich sind. Um die ersten beiden Punkte zu untersuchen wurden chimäre und verkürzte Formen von rBAT und 4F2hc mit b<sup>0,+</sup>AT oder LAT1 in *Xenopus laevis* Oozyten co-exprimiert. Die Bindung der schweren und leichten Ketten wurde mittels Co-immunopräzipitation und die funktionelle Assoziation mittels Transport-Experimenten untersucht. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass im Falle von rBAT der zytoplasmatische Teil zusammen mit der Transmembrandomäne eine dominante Rolle in der selektiven funktionellen

Interaktion mit  $b^{0,+}AT$  spielt, während die extrazelluläre Domäne speziell die Aufnahme von L-Cystin zu erleichtern scheint. Im Falle von 4F2hc erlaubten uns die experimentellen Bedingungen nicht, eine Glykoproteindomäne zu identifizieren, welche *per se* für die Assoziation und die funktionelle Oberflächenexpression von LAT1 verantwortlich ist. Immerhin war die Schlussfolgerung möglich, dass die extrazelluläre Glykosidase-ähnliche Domäne von 4F2hc für die Interaktion nicht notwendig ist, da eine verkürzte Form der schweren Kette, welche aus dem  $NH_2$ -terminalen Teil bis hin zur „Neck-Region“ besteht, zur funktionellen Expression mit LAT1 an der Zelloberfläche führte.

Um die Interaktion der chimären Konstrukte mit  $b^{0,+}AT$  bzw. LAT1 in einem physiologischeren Zusammenhang untersuchen zu können, wurde mit der Epithelzelllinie MDCK ein zweites heterologes Expressionssystem eingesetzt. Lokalisierungsstudien für die gebildeten Heterodimere sind in Bearbeitung. Bisher erhaltene Daten erlauben aber noch keine Aussage über die Rolle der verschiedenen Domänen der schweren Ketten bei der Expression an der basolateralen bzw. apicalen Zelloberfläche in polarisierten Zellen.