

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
Departamento de Ciencias Biológicas y Animales

***“MECANISMO DE INTERCAMBIO DE AMINOÁCIDOS DEL TRANSPORTADOR y⁺L DE
ERITROCITOS DE POLLO: ESPECIFICIDAD DEL SITIO QUE SE EXPONE AL
COMPARTIMIENTO INTERNO.”***

DANIELLA FORLIVESI CÓRDOVA

Profesor Guía: Dra. Rosa Devés A.

Profesores Consejeros: Dra. Soledad Fernández
Dr. Eduardo Kessi

Santiago de Chile, 2004

RESUMEN

El transportador y^+L es un intercambiador de aminoácidos que pertenece a la familia de transportadores heterodiméricos. El sitio que se expone al medio extracelular, reconoce aminoácidos catiónicos y neutros con alta afinidad en presencia de Na^+ (o Li^+), mientras que en K^+ es específico para aminoácidos catiónicos. En este trabajo se investigó la especificidad del sitio interno, utilizando como modelo experimental membranas reselladas de eritrocitos de pollo.

Se estudió la dependencia de los flujos de entrada de L-[^{14}C]lisina de la concentración de distintos aminoácidos localizados en el compartimento intracelular en presencia de Na^+ , K^+ o Li^+ . Los resultados muestran que el sitio interno presenta una marcada preferencia por L-lisina y que la unión de los aminoácidos neutros estudiados (L-glutamina, L-leucina, L-metionina) es débil. L-lisina, a concentraciones saturantes, aceleró el flujo unidireccional de entrada aproximadamente 8 veces y la constante de saturación media ($K_{0,5}$) para el efecto activador en presencia de Na^+ fue $0,010 \pm 0,001$ mM. L-glutamina, el aminoácido neutro que se unió más fuertemente, causó el mismo efecto a una concentración 80 veces superior ($K_{0,5}$: $0,8 \pm 0,27$ mM). En K^+ , la selectividad por aminoácidos catiónicos es aún mayor. Los resultados indican que el transportador y^+L muestra una marcada asimetría en los sitios de unión externo e interno y que esta cualidad no depende de la presencia o ausencia de Na^+ , además demuestran que el proceso favorecido es el intercambio de aminoácidos neutros (más Na^+), desde el exterior por aminoácidos catiónicos en el interior.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha identificado una familia de transportadores de aminoácidos denominados genéricamente “transportadores heterodiméricos”. La unidad básica de estos transportadores, es un dímero formado por una subunidad reguladora o cadena pesada, (≈ 80 kDa), que se asocia a través de un puente disulfuro a una subunidad catalítica o cadena liviana (40 – 50 kDa). La familia de transportadores heterodiméricos en células de mamíferos está constituida por 7 miembros, estos transportadores poseen especificidad y localización celular característica (revisado en Devés y Boyd, 1998; Verrey et al., 2000, Verrey et al., 2003). Desde el punto de vista de la translocación de los sustratos, los transportadores heterodiméricos funcionan como intercambiadores, es decir, facilitan el intercambio de aminoácidos presentes en compartimientos opuestos. Sin embargo, el mecanismo que subyace a esta forma de operación aún no se comprende.

Uno de los transportadores heterodiméricos descritos con mayor detalle desde el punto de vista funcional es el sistema y^+L , identificado originalmente en eritrocitos humanos (Devés *et al*, 1992). El sistema y^+L transporta aminoácidos catiónicos y neutros, y su especificidad es afectada por la composición iónica del medio: en presencia de Na^+ , el transportador une y transloca aminoácidos neutros y catiónicos, pero si el Na^+ se reemplaza por K^+ o colina, el transportador se vuelve selectivo para aminoácidos catiónicos (Angelo y Devés, 1994; Kanai *et al.*, 2000).

Recientemente se demostró que el transporte de lisina a través de los eritrocitos de pollo ocurre exclusivamente a través del sistema y^+L , y además que los individuos de esta especie pueden clasificarse de acuerdo a dos fenotipos de alta y baja velocidad para el transporte de L-lisina (HT y LT, respectivamente), (Vargas y Devés, 2001). Estas dos

características hacen de los eritrocitos de pollo un muy buen modelo para el estudio del mecanismo de transporte del sistema γ^+L .

En este proyecto se ha estudiado las propiedades funcionales del transportador γ^+L , en particular, la especificidad del sitio de unión intracelular, utilizando como modelo experimental membranas reselladas de eritrocitos de pollo. La preparación de membranas reselladas permite controlar la concentración de aminoácidos y el medio iónico del compartimiento interno.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Descubrimiento del transportador de aminoácidos γ^+L .

Por más de 20 años se pensó que el transporte de aminoácidos catiónicos a través de la membrana de células de mamíferos ocurría a través de un único transportador denominado "sistema γ^+ " que fue definido como un transportador de aminoácidos catiónicos independiente de Na^+ , capaz de unirse más débilmente con aminoácidos neutros en presencia de Na^+ (revisado en White, 1985).

La evidencia que llevó al descubrimiento del sistema γ^+L en eritrocitos humanos fue la observación de que al adicionar L-leucina no radiactiva en el medio extracelular, esta inhibía parcialmente, y con alta afinidad, el flujo de entrada de L-lisina. Se propuso entonces que L-lisina ingresaba a los eritrocitos humanos a través de dos transportadores que se diferenciaban en su interacción con aminoácidos neutros, el sistema γ^+ , específico para aminoácidos catiónicos, y el sistema γ^+L que interactúa con L-lisina y L-leucina con afinidades comparables. También se observó que la fracción inhibida por L-leucina era dependiente de la concentración de lisina radiactiva utilizada en el ensayo. De esta manera,

al utilizar una concentración muy baja (1 μM) de L-[^{14}C]lisina, el efecto inhibitorio máximo causado por L-leucina, correspondía aproximadamente al 50 % del flujo original; pero en presencia de concentraciones altas de lisina radiactiva ($> 100 \mu\text{M}$), el efecto inhibitorio se reducía en forma importante. Se demostró que un modelo de dos transportadores para L-lisina, uno de alta afinidad que reconoce y transporta en forma comparable L-lisina y L-leucina (sistema $y^+\text{L}$) y otro de baja afinidad que es específico para aminoácidos catiónicos (sistema y^+) explica adecuadamente este fenómeno. (Devés *et al.* 1992).

Esta hipótesis fue confirmada posteriormente utilizando el inhibidor de grupos sulfhidrilos *N*-etilmaleimida (NEM). Al pretratar los eritrocitos humanos con NEM se produce una inhibición parcial en la entrada de L-[^{14}C]lisina (1 μM), alcanzándose un flujo del 50 % con respecto de las células sin tratamiento. Además, como se esperaba, al aumentar la concentración de L-[^{14}C]lisina, la sensibilidad a NEM aumentó pues el transportador y^+ , que es el transportador de menor afinidad, cobra más importancia al ser mayor la concentración de lisina en el medio externo (Devés *et al.* 1993). La adición de L-leucina (4mM) a células pretratadas con NEM inhibió el flujo en un 100% y, por lo tanto, se concluyó que NEM era un inhibidor específico del sistema y^+ . De esta manera, NEM hizo posible estudiar la especificidad del sitio externo y las propiedades de intercambio del transportador $y^+\text{L}$ en los eritrocitos humanos. (Devés *et al.* 1993).

Características funcionales del sistema $y^+\text{L}$.

El sistema $y^+\text{L}$ es un transportador de aminoácidos de amplio espectro (transporta aminoácidos catiónicos y neutros) y se distingue de otros transportadores de amplio espectro, sistemas b^{0+} y B^{0+} (Van Winkle *et al.* 1985; Van Winkle *et al.* 1988), porque

su especificidad depende de la composición iónica del medio (Devés *et al.*, 1993). En presencia de Na⁺ o Li⁺ el transportador une y transloca aminoácidos neutros y catiónicos, pero si el Na⁺ se reemplaza por K⁺ o colina, el transportador se vuelve selectivo para aminoácidos catiónicos, disminuyendo dramáticamente su afinidad por aminoácidos neutros (revisado en Devés y Boyd 1998; Verrey *et al.*, 2003).

La interacción del sistema y⁺L con sus sustratos en la superficie externa de la membrana ha sido caracterizada en detalle (Angelo y Devés, 1994; Angelo *et al.*, 1996). El sistema y⁺L en eritrocitos humanos acepta un amplio rango de aminoácidos como sustratos en su sitio de unión extracelular que incluye aminoácidos catiónicos y neutros. Entre los aminoácidos neutros, L-leucina es el que se une más fuertemente en presencia de Na⁺; L-lisina y L-leucina presentan afinidades comparables siendo las constantes de saturación media (K_m) 9.5 ± 0.67 μM y 10.7 ± 0.72 μM, respectivamente. El sistema transporta además otros aminoácidos catiónicos como L-arginina, L-ornitina y N-monometilarginina.

La velocidad de translocación del complejo carrier-sustrato mostró ser menos dependiente de la estructura del aminoácido que la unión. La translocación es más lenta para los aminoácidos de mayor tamaño, L-triptofano y L-fenilalanina, mientras que los aminoácidos pequeños (L-alanina y L-serina) son rápidamente transportados a concentraciones saturantes, si bien su afinidad es comparativamente baja.

El sistema y⁺L, al igual que otros transportadores heterodiméricos, funciona como un intercambiador estrechamente acoplado (Angelo y Devés, 1994; Chillaron *et al.*, 1996). La salida de lisina desde los eritrocitos hacia un medio libre de aminoácidos ocurre muy lentamente, pero es acelerada por la adición de aminoácidos (catiónicos y neutros) al medio externo.

La especificidad del sistema y^+L y su dependencia iónica sugirieron que podía jugar un rol en la salida de aminoácidos catiónicos de células epiteliales (Eleno *et al.*, 1994). Posteriormente, en base a evidencia genética, se ha demostrado que el transportador y^+L juega un importante rol en el transporte de aminoácidos a través de la membrana basolateral del epitelio renal e intestinal, (revisado en Palacín *et al.*, 2001 y Palacín *et al.*, 2003). El transportador y^+L junto con b^{0+} dan cuenta de la reabsorción transcelular de aminoácidos catiónicos y cistina a través del tejido epitelial (Bauch *et al.* 2003).

Características moleculares.

Las dos sub-unidades que conforman el transportador y^+L han sido clonadas y se han identificado dos isoformas que se diferencian por la naturaleza de la subunidad liviana (y^+LAT-1 e y^+LAT-2) (Torrents *et al.*, 1999; Pfeiffer *et al.*, 1999). La especificidad de estas dos isoformas es similar, pero poseen distinta localización tisular: el transportador y^+LAT-1 se expresa altamente en tejidos epiteliales (intestino delgado y riñón) y el transportador y^+LAT-2 es ubicuo (revisado en Verrey *et al.*, 2003).

Estudios genéticos han revelado que mutaciones en el gen que codifica la subunidad y^+LAT-1 , provocan el defecto genético denominado intolerancia proteica lisinúrica o LPI (Torrents *et al.*, 1999; Borsani *et al.*, 1999). Esta enfermedad implica un desorden autosómico recesivo que causa múltiples disfunciones orgánicas, como por ejemplo, retraso en el crecimiento, hipotonía muscular, hepatoesplenomegalia, etc. La LPI se caracteriza por un incremento en la excreción urinaria de aminoácidos catiónicos (lisina, arginina, ornitina) y episodios de hiperamonemia después de la ingesta; todo esto asociado con una baja de la síntesis de urea (revisado por Palacín *et al.*, 2003). El análisis de la actividad de transporte de eritrocitos de pacientes con LPI no mostró alteraciones significativas, lo que sugiere que la subunidad y^+LAT-1 no es responsable del transporte

de lisina en estas células. (Boyd *et al.*, 2000).

Características del transportador y^+L en los eritrocitos de pollo.

Recientemente se ha demostrado que el sistema y^+L da cuenta del flujo de lisina en eritrocitos de pollo, sin observarse evidencia sobre actividad y^+ (Vargas y Devés, 2001). Diferencias en el funcionamiento del sistema y^+L explican la heterogeneidad en los flujos de entrada de aminoácidos a través de la membrana del eritrocito descrita anteriormente (Somes *et al.*, 1981; Vargas y Devés, 2001). Es así como se han identificado en esta especie dos grupos de individuos que se distinguen por la velocidad con que transportan lisina a través de la membrana del eritrocito: grupo de alta velocidad (HT) y grupo de baja velocidad (LT). El flujo de entrada de lisina a una concentración de $1\mu\text{M}$ en animales HT excede aproximadamente 35 veces el flujo determinado en los animales LT. Si bien el transporte de L-lisina observado en ambos grupos de individuos, presenta características propias de la actividad y^+L (amplio espectro, especificidad dependiente de la composición iónica del medio), las dos actividades muestran algunas diferencias entre sí. El transportador descrito en los eritrocitos del grupo LT presenta un patrón de especificidad muy similar al transportador y^+L de eritrocitos humanos, mientras que la selectividad del transportador presente en los eritrocitos del grupo HT muestra una afinidad significativamente menor por L-leucina en relación a lisina ($K_{iLEU} = 920 \pm 100 \mu\text{M}$, $K_{iLIS} = 17.8 \pm 1.3 \mu\text{M}$). La constante de saturación media de L-leucina de los eritrocitos HT es 10 veces mayor que aquella de eritrocitos LT, sin embargo, la constante de saturación media para L-lisina es 3 veces menor que en eritrocitos LT. En otros aspectos, tales como la interacción con otros aminoácidos y las propiedades de intercambio, el transportador de eritrocitos HT se comporta en forma similar al sistema y^+L descrito en otras células y

especies (Vargas y Devés, 2001).

Los parámetros cinéticos determinados dan cuenta de observaciones realizadas en estudios de cruzamiento selectivo de aves respecto a su capacidad para transportar aminoácidos, las cuales no se había logrado explicar (Somes *et al*, 1981; Vargas y Devés, 2001).

Hipótesis:

La afinidad por leucina en el medio intracelular es significativamente menor que la afinidad por L-lisina. La asimetría se debe a la diferente composición iónica de los medios intra y extracelular. Esto facilitaría el intercambio de L-lisina (interna) por L-leucina (externa).

Objetivo General:

Describir la especificidad del sitio que se expone al compartimiento interno en el transportador de aminoácidos y⁺L y el efecto que tienen distintos iones y aminoácidos en el medio interno sobre la interacción del transportador con aminoácidos en el lado opuesto.

Objetivos específicos:

1. Desarrollar y estandarizar una metodología que permita medir el intercambio de aminoácidos a través de la membrana plasmática de eritrocitos de pollo controlando la composición inicial de aminoácidos en los medios intra y extracelular, utilizando como modelo membranas reselladas (fantasmas) de eritrocitos de pollo.
2. Determinar el flujo de entrada de L-[¹⁴C]lisina (1μM) a membranas reselladas que contengan en el medio intracelular aminoácidos catiónicos o neutros, en diferentes

concentraciones y con distintas condiciones iónicas, (Na^+ , K^+ o Li^+ como catión principal).

3. Determinar el flujo de salida de L- ^{14}C]lisina desde membranas reselladas hacia un medio extracelular que contenga distintos aminoácidos catiónicos o neutros y con diferentes condiciones iónicas (Na^+ o K^+ como catión principal).
4. Elaborar un modelo de intercambio que de cuenta de las especificidades del sistema y^+L cuando el sitio de unión está expuesto al compartimiento externo o interno.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales:

Reactivos químicos: [^{14}C]-L-lisina (aproximadamente 300 mCi/mmol) se obtuvo de ARC (American Radiolabeled Chemicals) y los aminoácidos no marcados de SIGMA. Todos los demás reactivos (sales, tampones, ácidos, etc.) son de grado analítico.

Animales: Se utilizaron pollos machos y hembras de raza Leghorn, sanos, de edades variables provenientes de criaderos comerciales y del SAG. Las aves son alimentadas con una dieta comercial.

Métodos:

1. Obtención de las muestras y separación de los eritrocitos.

- a) Obtención de las muestras: las membranas reselladas se prepararon a partir de sangre fresca obtenida por punción cardiaca con jeringa heparinizada. Los animales se anestesiaron usando ketamina (5 mg / Kg.). Debido a que se toma más de una muestra de un mismo animal, se espera un lapso mínimo de 14 días para la siguiente punción.

b) Separación de los eritrocitos: La técnica de preparación de las células se basa en la metodología utilizada por Vargas y Devés (2001). Cada muestra de sangre se centrifuga a $1250 \times g$ por 5 min a 0°C . El plasma y la capa de glóbulos blancos y plaquetas se remueve por aspiración y los eritrocitos se lavan 3 veces con solución de lavado (165 mM de NaCl, KCl o LiCl) y se empaquetan centrifugando a $1250 \times g$ por 15 min a 0°C .

2. Preparación de las membranas reselladas.

La técnica de preparación de las membranas reselladas se basa en la metodología utilizada por Wheeler (1982). Se toma un volumen de células empaquetadas y se suspenden en un volumen igual de NaCl, KCl o LiCl 165 mM. La mezcla se traspara a un matraz que contiene 20 volúmenes de solución de lisis (MgSO_4 [4mM] + Imidazol [10 mM] llevada a pH 6 con ácido acético a temperatura ambiente) a la que se le han adicionado previamente los aminoácidos que se desea introducir al espacio intracelular según sea el caso. Se agita la mezcla suavemente durante 5 min en hielo. Para resellar las membranas se adiciona un volumen (equivalente a la cantidad de células) de NaCl, KCl o LiCl 3 M, la suspensión (300 mosmoles/L) se traslada a un baño termorregulado a 38°C durante 45 min. Las membranas reselladas se centrifugan a $1750 \times g$ por 15 min, luego se lavan 2 veces con una solución de NaCl, KCl o LiCl 165 mM, centrifugando después de cada lavado a $1750 \times g$ por 15 min. Las membranas reselladas son mantenidas en hielo durante cada experimento para evitar la salida de los aminoácidos desde el medio interno.

Al observar microscópicamente los preparados de membranas reselladas se comprobó que conservan su núcleo, la forma y el tamaño del glóbulo rojo; esta cualidad permite confirmar que la membrana celular en las membranas conserva la orientación espacial de la célula entera. La manipulación debió ser muy delicada para evitar rupturas

posteriores al proceso de resellado durante cada experimento.

Se realizaron conteos celulares para determinar el grado de empaquetamiento de los fantasmas con respecto del pellet de glóbulos rojos. Se concluyó que la proporción de glóbulos rojos empaquetados con respecto de membranas es 1,5: 1 respectivamente. Se midió la proporción de agua intra y extracelular comparando los volúmenes de distribución de [^3H]H₂O e [^{14}C]inulina y se utilizó esta información para expresar las velocidades en $\mu\text{moles de lisina/ L membranas/ min}$.

3. Determinación de los flujos de entrada de L- [^{14}C]-lisina.

La medición del flujo de entrada se realizó agregando membranas reselladas (0,3 ml) a 2.7 ml de una solución que contiene L- [^{14}C]-lisina. La composición del medio externo e interno y la concentración de lisina varió dependiendo de la condición experimental. A distintos tiempos (aproximadamente 1, 3 y 5 min), se toman muestras de 0,8 ml de la suspensión. Las muestras se traspasan hacia tubos que contienen 0,5 ml de una mezcla de aceites (dibutilftalato + dinonilftalato, 1.3: 1.0) y se centrifugan de inmediato por 1,5 min a 11000 x g. El sobrenadante acuoso se remueve por aspiración y la pared del tubo se lava 3 veces para eliminar la radiactividad residual, en seguida se remueve el aceite por aspiración y se seca la pared con papel absorbente. Las proteínas se desnaturan con 0,6 ml de ácido tricloroacético al 5 % y la nueva suspensión se centrifuga por 1 min a 11000 x g. Se toma una muestra de 0,5 ml de sobrenadante de cada tubo y se deposita en 5 ml de líquido de centelleo para determinar la radiactividad (L- [^{14}C]lisina) asociada a las membranas reselladas. Las velocidades iniciales se calculan a partir de la relación lineal entre captación y tiempo. Todas las determinaciones se realizan en duplicado.

4. Determinación de los flujos de salida de [^{14}C]-lisina.

El método utilizado se adaptó en la técnica descrita por Vargas y Devés, 2001. Las membranas reselladas se incuban en una suspensión isotónica (1:1) con 10 μM de [^{14}C]-lisina por 1 hora a 38° C. Al final de la incubación la radiactividad externa se elimina lavando las células 4 veces con la solución empleada en la incubación y luego son empaquetadas. A tiempo 0 se agrega 0,3 ml de membranas reselladas a una solución isotónica que varía según el diseño experimental (hematocrito 10 %). Se toman alícuotas de 0,85 ml a distintos tiempos (aproximadamente 1, 3 y 5 min) y se centrifugan a 11000 x g por 1.5 min. con 0,5 ml de la misma mezcla de aceites utilizada en el experimento de entrada de lisina radiactiva. Luego se determina la radiactividad en 0,7 ml de sobrenadante (utilizando 7 ml de líquido de centelleo). Las velocidades iniciales se calcularon a partir de la relación lineal entre la aparición de lisina en el medio extracelular y el tiempo.

5. Determinación de la constante de saturación media de los aminoácidos (K_A) en su interacción con el sitio interno del transportador y^+L .

En un proceso de intercambio acoplado la interacción del transportador con sus sustratos puede estimarse del efecto activador que estos ejercen desde el compartimiento opuesto sobre el flujo de sustrato marcado. Para el transportador y^+L , se ha demostrado que la constante de saturación media de distintos aminoácidos determinada en este tipo de experimento (*trans*-aceleración), es igual a la constante que se mide en experimentos de competencia en los cuales el aminoácido marcado y el aminoácido no radiactivo se encuentran en el mismo compartimiento (*cis*-inhibición) (Angelo y Devés, 1994).

La velocidad de entrada de L-[^{14}C]lisina a un medio que contiene un aminoácido no marcado (A), v^A , se puede expresar como:

$$v^A - v_o = \frac{(V^{Amax} - v_o) [A_o]}{K_A + [A_o]} \quad (1)$$

Donde v_o es la velocidad de salida medida en ausencia de un análogo, V^{Amax} es la velocidad en presencia de una concentración saturante de un análogo externo A y K_A es la constante de saturación media de salida del análogo.

Si V^{Amax} es mayor que v_o , el análogo acelerará la velocidad de entrada de acuerdo a una función tipo Michaelis - Menten y la interacción del transportador con el sustrato en la cara interna se reflejará en K_A (la constante de saturación media para el efecto). En aquellas situaciones en que V^{Amax} no puede determinarse por ser muy baja la afinidad del sustrato (alta K_A) se supuso que esta era igual a la velocidad alcanzada con 2 mM de L-lisina (V^{Lismax}). Existen evidencias de que la especificidad del transportador y^+L para los sustratos estudiados en este trabajo (L-lisina, L-leucina, L-glutamina y L-metionina) se refleja en la fuerza de unión de los sustratos con el sitio del transportador y no en las velocidades de translocación que son similares (Angelo y Devés, 1994).

RESULTADOS

Las velocidades de transporte de L-lisina a través de membranas reselladas de eritrocitos de individuos previamente clasificados como LT (bajo transporte) y HT (alto transporte), se comparan en la Fig.1. Se observa que las diferencias individuales detectadas en células intactas se mantienen en membranas reselladas. En el panel A, se muestra el flujo de entrada de L- $[^{14}C]$ lisina medido en membranas reselladas (HT y LT) previamente cargadas con 2 mM L-lisina. En el panel B, se grafica los promedios de los flujos de entrada de L- $[^{14}C]$ lisina medidos en membranas reselladas de individuos HT y LT, bajo

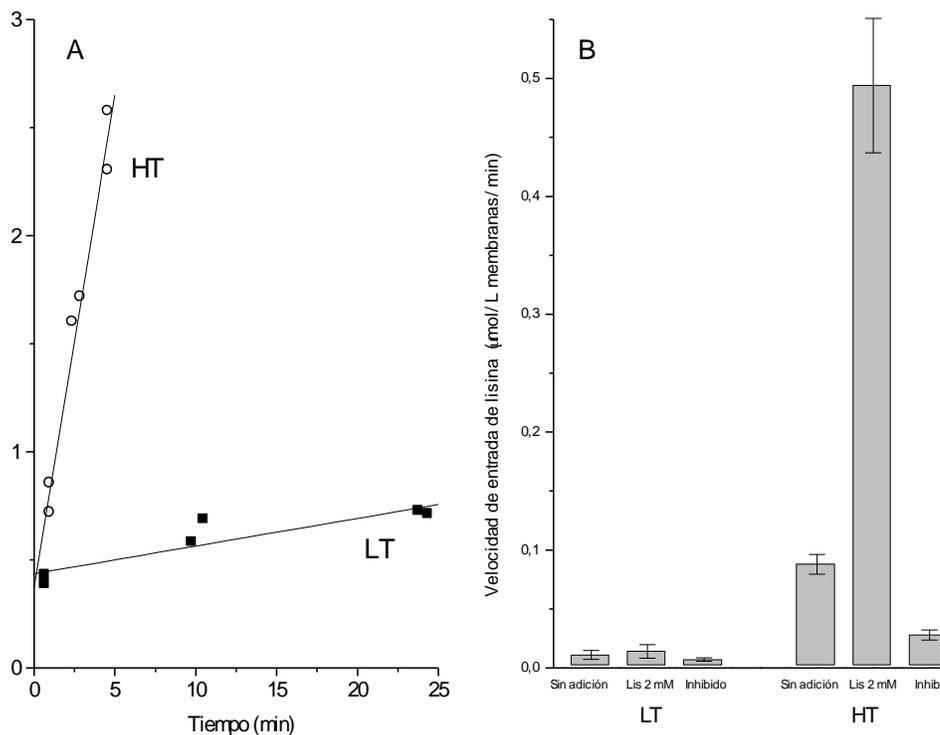


Fig 1. Captación de L-[¹⁴C]lisina en membranas reselladas de eritrocitos de pollo de individuos con alta (HT) o baja (LT) velocidad de transporte. Panel A: Determinación de la velocidad de entrada de L-[¹⁴C]lisina (1 μM) en eritrocitos cargados con 2 mM L-lisina no radiactiva en individuos representativos de cada grupo. Panel B: Velocidad de entrada de L-[¹⁴C]lisina (1 μM) en membranas reselladas de eritrocitos HT (n = 21) y LT (n = 5), en ausencia o presencia de 2 mM L-lisina en el compartimiento intracelular. También se muestra el valor de la velocidad determinada en presencia de 2 mM lisina no radiactiva en el medio externo (inhibido). Promedios de las velocidades (μmol/ L de membranas / min) en membranas reselladas de eritrocitos HT (n = 21) : 0.088 ± 0.0084 (sin adición), 0.494 ± 0.057 (2 mM de L-lisina en el interior) y 0,028 ± 0,0042 (2 mM lisina en el exterior o inhibido). Promedios de las velocidades (μmol/ L de membranas / min) membranas reselladas de eritrocitos LT (n = 5): 0.011 ± 0.004 (sin adición), 0.014 ± 0.06 (2 mM L-lisina en el interior) y 0,007 ± 0,001 (2 mM lisina en el exterior o inhibido). El medio contenía Na⁺ como catión principal.

tres condiciones experimentales diferentes: a) sin adición de aminoácidos en el interior, b) con 2 mM de L-lisina en el interior y c) con 2 mM de L-lisina en el medio extracelular (inhibido). Se observa que mientras las membranas reselladas de eritrocitos LT no manifiestan transporte mediado bajo las condiciones ensayadas, los fantasmas derivados de eritrocitos HT presentan velocidades de entrada comparables a aquellas observadas en eritrocitos intactos ($0,27 \pm 0,025 \mu\text{mol/ L células/ min}$). Este resultado indica que el factor que diferencia a ambos fenotipos es intrínseco de la membrana y no corresponde a una sustancia soluble presente en el citoplasma.

La velocidad de entrada de L-lisina radiactiva, es acelerada por la presencia de L-lisina (2mM) en el medio interno en membranas reselladas de eritrocitos HT (Figs. 1B y 2A). La dependencia del flujo de la presencia de aminoácido en el compartimiento opuesto, también se observa cuando se estudia la velocidad de salida de lisina en presencia o ausencia de aminoácido en el medio externo (Fig 2 B). La asimetría de los flujos en presencia o ausencia de sustrato en el compartimiento opuesto, tanto para la entrada como para la salida de lisina, indica que el transportador mantiene, en la preparación de membranas reselladas, la propiedad de intercambiador que caracteriza al transportador y^+L . Esta propiedad sólo había sido demostrada para la salida de aminoácidos en eritrocitos, pero no para la entrada de aminoácidos.

La Fig. 3 muestra el efecto de L-lisina 0.02 mM, 2 mM y 5 mM presente en el medio interno sobre la velocidad de entrada de L- $[^{14}\text{C}]$ lisina en membranas reselladas de eritrocitos HT, alcanzándose con la concentración de 0,02 mM un 65 % del incremento en la velocidad que se alcanza en presencia de L-lisina 5 mM. Este resultado demuestra que lisina interacciona con el sitio interno del transportador y^+L con alta afinidad. Al aumentar

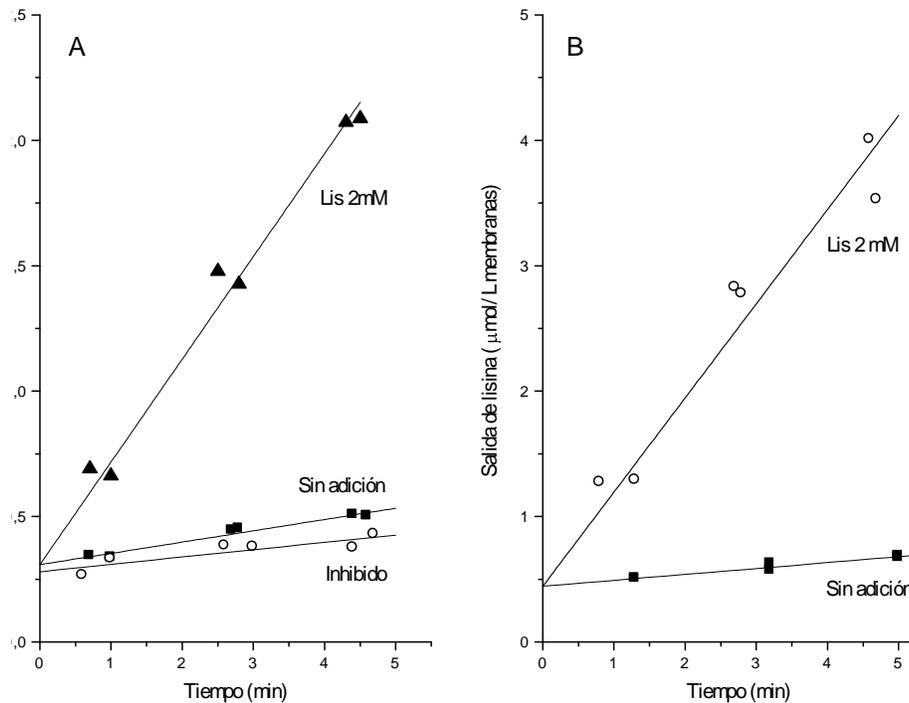


Fig 2. Efecto de L-lisina presente en el compartimiento opuesto sobre los flujos de entrada y salida de L-[¹⁴C]lisina en membranas reselladas. Panel A: Captación de L-[¹⁴C]lisina (1 μM) en membranas reselladas de eritrocitos HT con 2 mM L-lisina en el interior (▲), 2 mM lisina en el exterior (○) o sin adición de aminoácidos (■). La velocidad en presencia de 2 mM lisina interna fue $0.41 \pm 0.12 \mu\text{mol/ L de membranas /min}$. Panel B: Salida de L-[¹⁴C]lisina desde membranas reselladas de eritrocitos HT en ausencia o presencia de L-lisina 2 mM en el medio externo. La velocidad en presencia de 2 mM lisina externa fue $0,75 \pm 0,039 \mu\text{mol/ L de membranas /min}$. La concentración intracelular de L-lisina fue 4,8 μM. El medio contenía Na⁺ como catión principal.

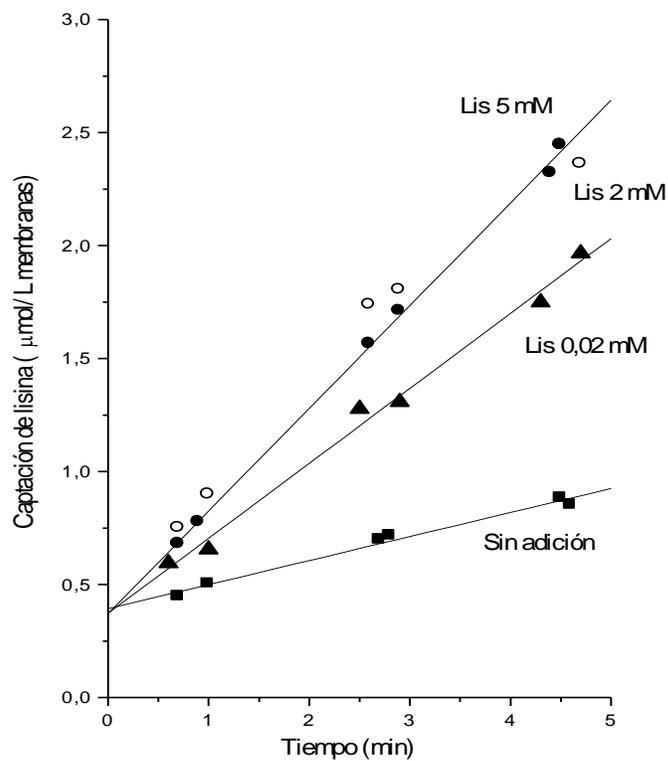


Fig 3: Captación de L-lisina en membranas reselladas de eritrocitos HT en presencia de 5 mM (●), 2 mM (○), 0,02 mM (▲) de L-lisina y en ausencia de aminoácidos (■) en su interior. Las velocidades de entrada de L-[¹⁴C]lisina (μmol/ L membranas/ min) fueron 0.45 ± 0.008 (5mM), 0.46 ± 0.016 (2mM), 0.33 ± 0.015 (0,02 mM) y 0.1 ± 0.006 (sin adición) La concentración de L-[¹⁴C]lisina fue 1 μM y el medio contenía Na⁺ como catión principal.

la concentración de L-lisina desde 2 mM a 5 mM, la velocidad de entrada de L-[¹⁴C] lisina no sigue aumentando, lo que significa que ya se ha obtenido el efecto máximo. La constante de saturación media para la unión de L-lisina en el sitio interno (K_{LIS}), calculada a partir de su efecto activador de la entrada de L-[¹⁴C]lisina fue $10,4 \pm 1,1 \mu\text{M}$.

Para conocer la especificidad del sitio de unión intracelular se estudió el efecto producido por diferentes aminoácidos presentes en el medio interno sobre la velocidad de entrada de L-[¹⁴C] lisina ($1 \mu\text{M}$). En la Fig. 4. se observa que L-leucina en el rango de 2 mM a 15 mM, no es capaz de *trans*-estimular en forma dependiente de la concentración, la entrada de L-[¹⁴C]lisina en un medio que contiene Na^+ . La velocidad de entrada de lisina en presencia de 2, 10 y 15 mM de L-leucina no difiere significativamente y la estimulación por 15 mM L-leucina es aproximadamente 1/9 de la estimulación producida por L-lisina 2 mM. Esta característica difiere con lo observado en eritrocitos para el sitio de unión extracelular, que presenta una mayor afinidad por L-leucina en presencia de Na^+ (K_{IEU} : $0.9 \pm 0.1 \text{ mM}$).

L-glutamina, en cambio, fue capaz de *trans*-estimular la entrada de L-[¹⁴C]lisina desde el compartimiento intracelular en el rango 0,2 mM – 10 mM alcanzándose el 71 % del efecto máximo a una concentración de 2 mM (Fig. 5). La figura muestra que al incrementar la concentración de 5 a 10 mM la velocidad de entrada de L-[¹⁴C]lisina no aumenta en forma significativa.

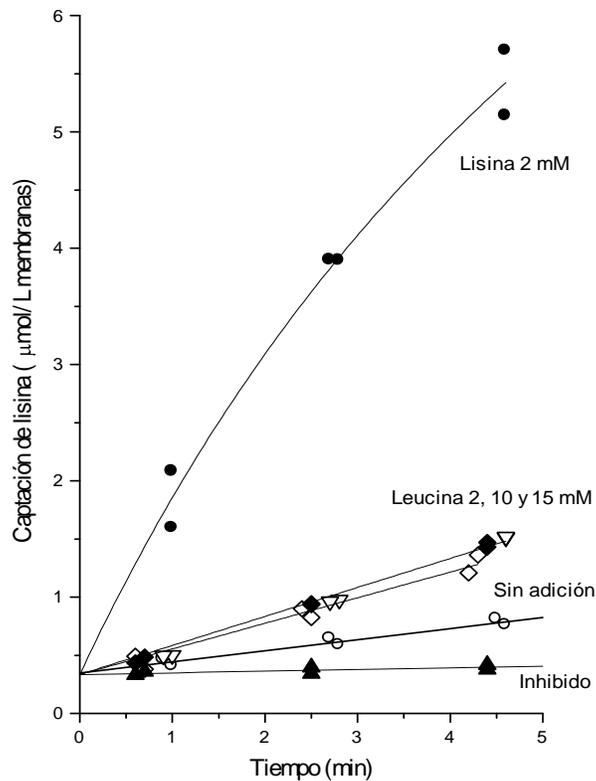


Fig 4: Efecto de L-leucina presente en el compartimiento interno sobre los flujos de entrada de L-[¹⁴C]lisina en membranas reselladas. Se muestra el flujo en membranas que contienen en su interior L-leucina 2 mM (◇), 10 mM (∇), 15 mM (◆), 0 mM (○), 2 mM L-lisina (●) y 0 mM L-lisina con L-lisina 2 mM en el exterior (▲). La concentración de L-[¹⁴C] lisina fue 1 µM. Las velocidades de entrada (µmol/L membranas/ min) de L-lisina fueron: 0.22 ± 0.001 (leucina, 2mM), 0.27 ± 0.0055 (leucina, 10 mM), 0.25 ± 0.0046 (leucina, 15 mM), 0.10 ± 0.011 (sin adición) y 1.5 ± 0.24 (lisina, 2 mM). El medio contenía Na⁺ como catión principal.

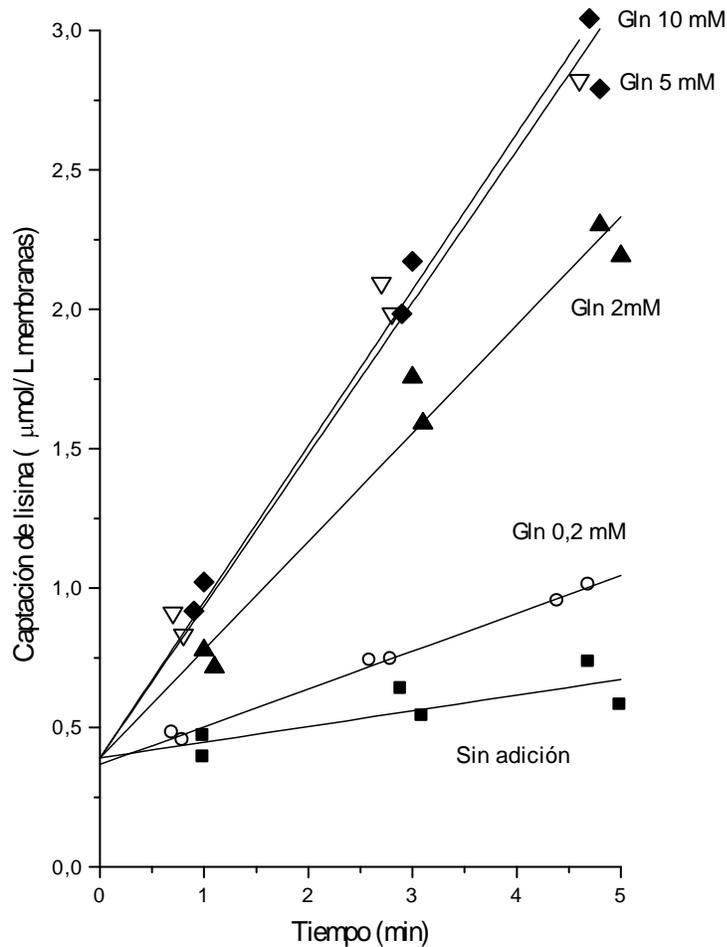


Fig. 5: Efecto de L-glutamina presente en el compartimiento interno sobre los flujos de entrada de L-[^{14}C]lisina en membranas reselladas. Se muestra el flujo en membranas que contienen en su interior L-glutamina 10 mM (\blacklozenge), 5 mM (∇), 2 mM (\blacktriangle), 0.2 mM (O) y 0 mM (\blacksquare). La concentración de L-[^{14}C] lisina extracelular fue de 1 μM y el medio contenía Na^+ . Las velocidades de entrada ($\mu\text{mol/L membranas/min}$) de L-lisina fueron 0.54 ± 0.02 (10 mM), 0.52 ± 0.03 (5mM), 0.39 ± 0.04 (2 mM), 0.14 ± 0.005 (0.2 mM) y 0.056 ± 0.021 (sin aminoácidos).

Los resultados obtenidos en el estudio de la captación de L-[¹⁴C] lisina en presencia de L-leucina, L-glutamina y L-metionina en diferentes concentraciones en el interior de las membranas reselladas en un medio Na⁺ se muestran en la Fig. 6. Las velocidades están normalizadas en relación a la velocidad observada en presencia de L-lisina 2 mM. Las concentraciones de los distintos aminoácidos fueron seleccionadas de acuerdo a las afinidades respectivas. La potencia de los aminoácidos con respecto a su efecto activador fue L-lisina > L-glutamina > L-metionina > L-leucina.

En la Tabla 1 se muestran las constantes de saturación media para el efecto activador calculadas utilizando la Ecuación 1 (Materiales y Métodos) y considerando que el efecto máximo corresponde al alcanzado con 2 mM lisina. Las constantes calculadas reflejan la interacción de los aminoácidos con el sitio interno. Los datos se comparan, en la misma tabla, con las constantes de saturación media determinadas por Vargas y Devés, 2001, a partir de la inhibición de la entrada de lisina radiactiva por aminoácidos no marcados presentes en el medio externo y que reflejan la interacción de los aminoácidos con el sitio expuesto hacia el exterior. Es posible apreciar que el transportador y⁺L presenta una mayor afinidad por aminoácidos neutros en el sitio de unión externo en comparación con el sitio expuesto al compartimiento interno. L-lisina por el contrario, presenta una mayor afinidad por el sitio de unión intracelular.

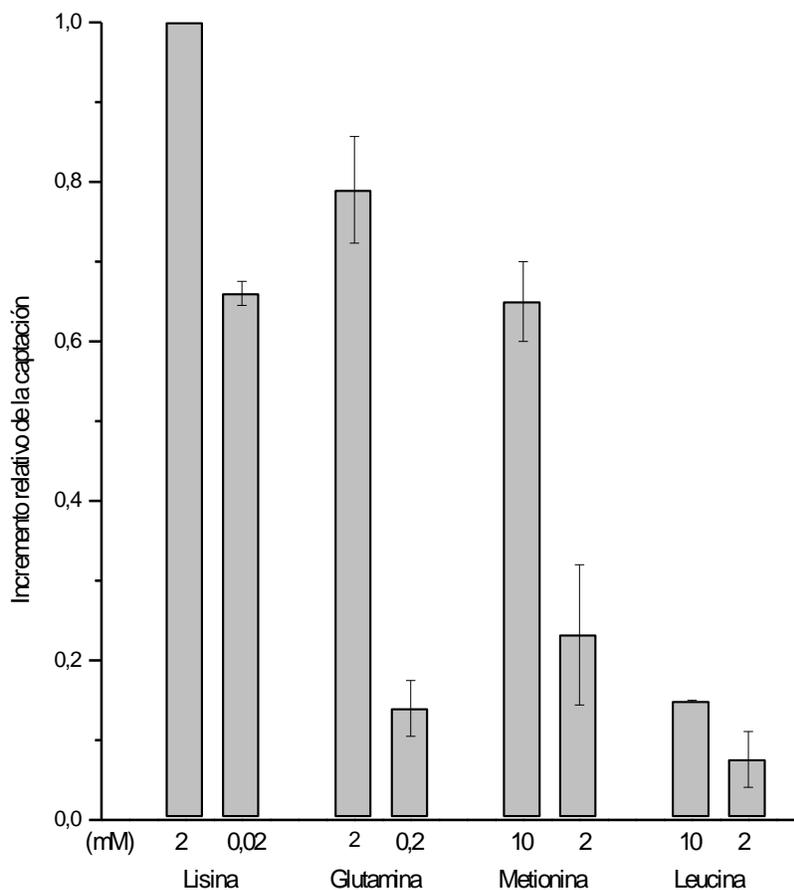


Fig. 6: Comparación del efecto de distintos aminoácidos presentes en el interior de membranas reselladas sobre la entrada de L-[¹⁴C]lisina. Se muestra el incremento relativo causado por los aminoácidos sobre la velocidad de entrada, usando como referencia el efecto de 2 mM L-lisina. La concentración de L-[¹⁴C]lisina externa fue 1 μM. La velocidad promedio (± error estándar) en presencia de L-lisina 2 mM fue: 0.56 ± 0.08 μmol/L membranas /min.

El número de determinaciones independientes en cada caso fue: lisina 0,02 mM (n = 4), glutamina 0,2 mM (n = 2), glutamina 2 mM (n = 4), metionina 2 mM (n = 2), metionina 10 mM (n = 5), leucina 2 mM (n = 3) y leucina 10 mM (n = 2). Cuando n = 2, la barra indica el rango, cuando n > 2 la barra corresponde a la desviación estándar.

Tabla1. Comparación de las constantes de saturación media de L-lisina, L-glutamina, L-metionina y L-leucina estimadas para los sitios de unión intra y extracelular del transportador y⁺L de eritrocitos de pollo en presencia de Na⁺.

Aminoácido	Constantes de saturación media (Na ⁺)		K _{A int} / K _{A ext}
	K _A (mM)		
	Sitio Interno	Sitio Externo	
L-Lisina	0,010 ± 0,001	0,018 ± 0,001	0,56
L-Glutamina	0,82 ± 0,273	0,12 ± 0,027	6,8
L-Metionina	4,43 ± 0,482	0,20 ± 0,004	22,0
L-Leucina	>15	0,92 ± 0,100	>15

Los valores de las constantes de saturación media se calcularon a partir del efecto de una concentración de aminoácido utilizando la Ecuación 1 (Materiales y Métodos). El número de determinaciones independientes en cada caso fue: lisina (n = 7), glutamina (n = 4), metionina 2 mM (n = 5) y leucina (n = 4) y leucina 10 mM (n = 2). Las constantes de saturación media para el sitio de unión extracelular fueron estimadas a partir del efecto inhibitorio de diferentes aminoácidos no radiactivos sobre la entrada de L-[¹⁴C]lisina en eritrocitos de pollo (Vargas y Devés, 2001).

Para estudiar la influencia del medio iónico sobre la afinidad del sitio interno del transportador y⁺L, se estudió el efecto de los distintos aminoácidos en presencia de K⁺ o Li⁺. Los resultados que se presentan en la Fig. 7 muestran que el efecto de L-lisina a concentraciones de 0.02 y 2 mM es similar en presencia de Na⁺ o K⁺. Sin embargo, en la Fig.8, es posible observar que la interacción del sitio interno por los aminoácidos neutros (L-metionina y L-glutamina) se debilita cuando el Na⁺ se reemplaza por K⁺. L-leucina (10 mM) no fue capaz de estimular la entrada de L[¹⁴C]-lisina en presencia de K⁺. Por lo tanto, la selectividad por L-lisina es aún más marcada en presencia de K⁺ en comparación con Na⁺.

En la Fig. 9 se muestra que la afinidad de L-leucina en el medio interno aumenta dramáticamente en presencia de Li⁺, alcanzándose un efecto activador medio de la entrada a una concentración de aproximadamente 0,2 mM y un efecto máximo equivalente al que se produce en presencia de L-lisina 2 mM a una concentración de L-leucina 2 mM. L-lisina, en cambio, no presenta diferencias significativas en sus velocidades de transporte en los tres medios iónicos estudiados. La Fig. 10 compara las velocidades de transporte de los aminoácidos ensayados en presencia de Na⁺ y Li⁺, las velocidades están normalizadas respecto a L-lisina 2 mM en el ión respectivo. La gráfica muestra que mientras L-metionina y L-leucina aumentan su afinidad en presencia de Li⁺, la afinidad del sitio interno por L-glutamina decrece.

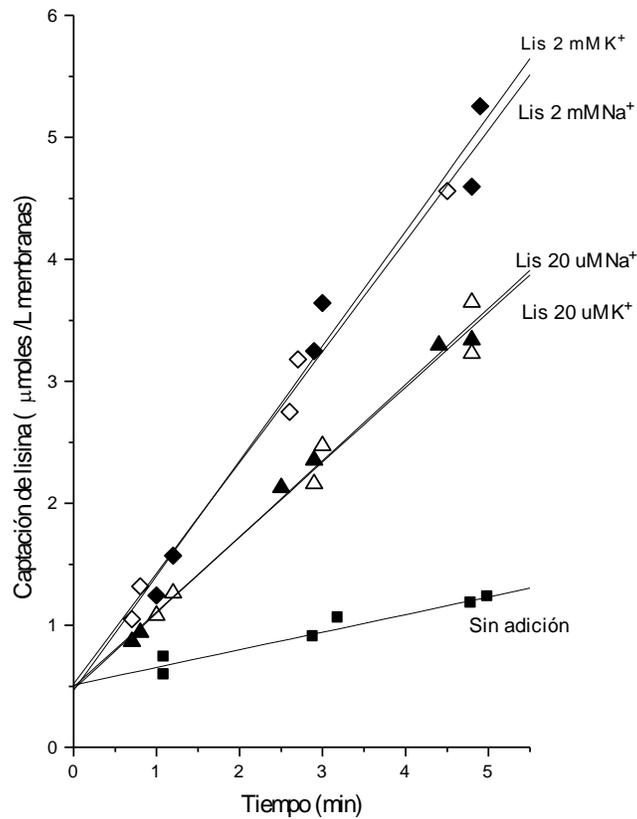


Fig 7: Efecto del reemplazo de Na^+ por K^+ en el medio interno sobre la estimulación de la entrada de $\text{L-}^{14}\text{C}$ lisina causada por lisina intracelular. Se determinó el flujo en presencia de lisina 0.02 mM (\blacktriangle) y 2 mM (\blacklozenge) en medio K^+ ; 0.02 mM (\triangle) y 2 mM (\diamond) de L-lisina en medio Na^+ . La concentración de $\text{L-}^{14}\text{C}$ lisina en el medio extracelular fue de 1 μM . Las velocidades en $\mu\text{mol}/\text{L membranas}/\text{min}$ fueron: 0.144 ± 0.018 (sin aminoácidos), 0.62 ± 0.025 (L-lisina 0.02 mM/ K^+), 0.61 ± 0.046 (L-lisina 0.02 mM/ Na^+), 0.94 ± 0.07 (L-lisina 2 mM/ K^+), 0.9 ± 0.05 (L-lisina 2 mM/ Na^+).

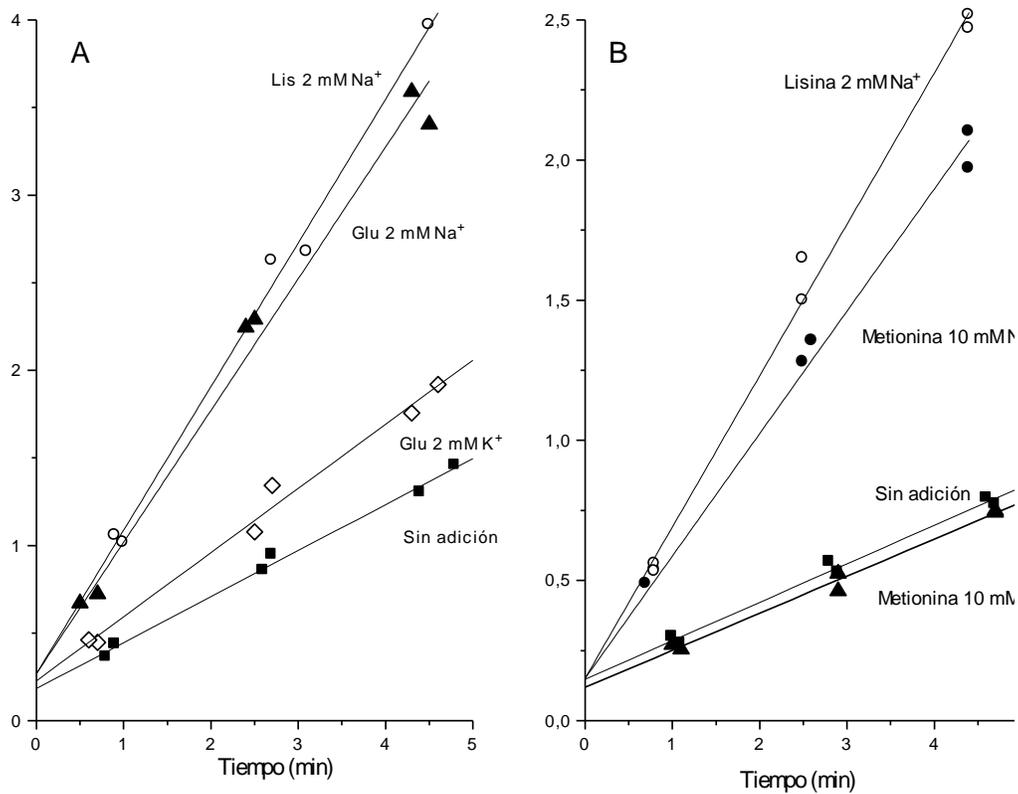


Fig 8: Efecto del reemplazo de Na⁺ por K⁺ en el medio interno sobre la estimulación de la velocidad de entrada de L-[¹⁴C]lisina causada por aminoácidos neutros en el medio intracelular. Panel A: Velocidad de entrada en presencia de glutamina 2mM (▲) y lisina 2 mM (o) en medio Na⁺ y glutamina 2 mM (◇) en medio K⁺. Panel B: Velocidad de entrada en presencia de metionina 10 mM (●) y lisina 2 mM (o) en medio Na⁺ y metionina 2 mM (▲) en medio K⁺. La velocidad sin adición (■) fue estimada en presencia de

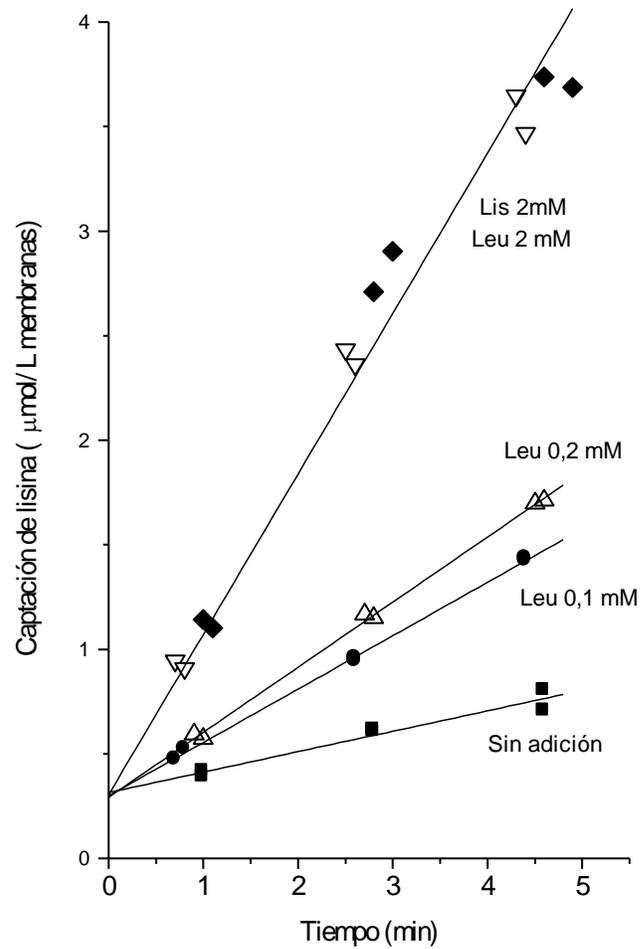


Fig 9: Efecto de L-leucina en el medio interno sobre la velocidad de entrada de L-[^{14}C]lisina en presencia de Li^+ en el medio interno. Se determinó el flujo en presencia L-leucina 0.1 mM (\bullet), 0.2 mM (Δ), 2 mM (∇), L-lisina 2 mM (\blacklozenge) y sin adición de aminoácidos (\blacksquare) en medio Li^+ . La concentración de L-[^{14}C]lisina fue 1 μM y el medio externo contenía Na^+ como catión principal.

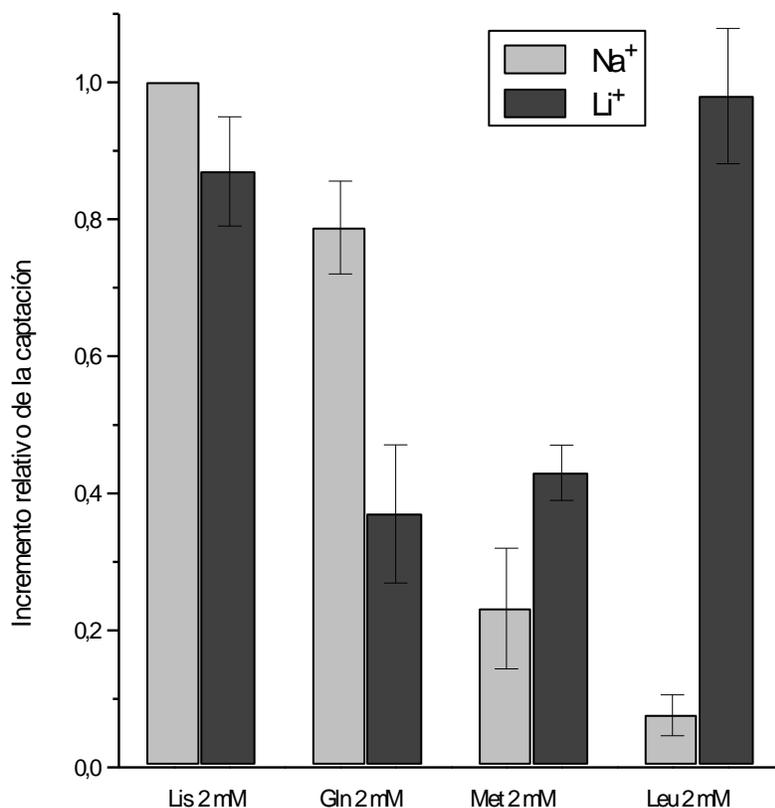


Fig 10: Comparación del efecto de lisina, glutamina, metionina, y leucina sobre la velocidad de entrada de L-[¹⁴C]lisina en presencia de Na⁺ o Li⁺ en membranas reselladas. Se muestra el incremento relativo causado por los aminoácidos sobre la velocidad de entrada, usando como referencia el efecto de 2 mM L-lisina (en el ion respectivo). La concentración de L-[¹⁴C]lisina externa fue 1 μM. Los datos en presencia de Na⁺ son los mismos que en la Figura 7. La velocidad promedio (± error estándar) en presencia de L-lisina 2 mM en medio Li⁺ fue: 0,52 ± 0,07 μmol/ L membranas /min. El número de determinaciones independientes fue: glutamina (n = 3), metionina (n = 2), leucina (n = 3). Cuando n = 2 , la barra indica el rango, cuando n > 2 la barra corresponde a la desviación estándar.

DISCUSIÓN

Los estudios funcionales del transportador y^+L en distintos tipos celulares han llevado a concluir que este transportador acepta como sustratos aminoácidos catiónicos y neutros y que la interacción del sitio externo con los aminoácidos depende de la composición iónica del medio. En presencia de Na^+ o Li^+ el transportador une con alta afinidad aminoácidos catiónicos y neutros, pero en presencia de K^+ o colina, se vuelve selectivo para aminoácidos catiónicos. (Angelo y Devés, 1994; Kanai et al, 2000).

Estas características, sumadas a la observación de que el transportador funciona como un intercambiador de aminoácidos, llevaron a proponer que la función fisiológica del transportador sería facilitar la salida de aminoácidos catiónicos en intercambio con aminoácidos neutros más Na^+ (Eleno *et al.*, 1994).

Posteriormente se descubrió que la isoforma y^+LAT-1 está alterada en pacientes que presentan el desorden genético LPI (intolerancia protéica lisinúrica) que se caracteriza por un defecto del transporte de lisina a través de la membrana basolateral del epitelio renal e intestinal; este hallazgo aportó evidencia sólida en la caracterización de su función fisiológica (Borsani et al., 1999; Torrents *et al.*, 1999).

Se ha postulado que la vectorialidad del transportador y^+L estaría dada por la distribución asimétrica de iones Na^+ y K^+ a ambos lados de la membrana y que la baja concentración relativa de sodio en el compartimiento intracelular sería responsable de la unión preferente de aminoácidos catiónicos en el interior (Eleno *et al.*, 1994; Angelo y Devés, 1994; Kanai *et al.*, 2001; Chillarón *et al.*, 1996). Esta proposición se ha inferido de la información obtenida sobre la especificidad en el sitio extracelular, ya que las propiedades del sitio de unión interno no han sido estudiadas anteriormente.

El objetivo general de esta investigación fue describir la especificidad del sitio de

unión de sustrato que se expone al compartimiento interno del transportador de aminoácidos y^+L y el efecto que tienen distintos iones inorgánicos sobre la interacción de este sitio con sus sustratos.

El estudio de la especificidad del sitio interno del transportador y^+L requiere modificar la composición intracelular no sólo con respecto al contenido de aminoácidos, sino también de iones. En esta tesis el problema se aborda utilizando preparaciones de membranas reselladas de eritrocitos de pollo. Los glóbulos rojos de pollo son un buen modelo para estudiar este problema porque: a) se ha comprobado que a diferencia del eritrocito humano, el transportador y^+L da cuenta del todo el flujo de entrada de lisina en estas células y b) en esta especie se distinguen dos fenotipos de actividad y^+L que tienen la potencialidad de permitir estudios comparativos.

Tomando como referente el trabajo realizado por Wheeler (1982) en eritrocitos de paloma, se prepararon membranas reselladas de eritrocitos de pollo, vaciando el contenido intracelular del eritrocito, a través del rompimiento de las células en un medio hiposmótico y resellando las membranas en medios isotónicos de composición definida (lisina, leucina, metionina o glutamina, en distintas concentraciones y en distintos medios iónicos).

Transporte de lisina en membranas reselladas de eritrocitos de pollo.

En su fase inicial, el estudio consistió en desarrollar un sistema experimental que permitiera estimar la afinidad del sitio expuesto al compartimiento interno por distintos aminoácidos en medios de diferente composición iónica. Como se mencionó en la introducción, existen dos fenotipos de individuos en esta especie que se distinguen por su capacidad para transportar aminoácidos: los individuos LT que exhiben una baja actividad de transporte y los individuos HT que exhiben una actividad aproximadamente 30 veces

mayor. Los ensayos preliminares mostraron que las grandes diferencias en la capacidad de transporte de lisina observadas en los eritrocitos también se observan en las membranas reselladas (Fig.1). Los resultados obtenidos demuestran que el transportador y^+L de eritrocitos de pollo, conserva su característica de LT y HT en la preparación de membranas reselladas, evidenciando que estos dos fenotipos están determinados por algún elemento intrínseco de la membrana celular y no pueden atribuirse a una sustancia soluble presente en el citoplasma, el que sería removido durante el procesamiento de las células.

Mientras que la velocidad de transporte de lisina en membranas HT (cargadas con 2mM de lisina en su interior) fue de magnitud comparable a la velocidad observada en eritrocitos intactos, (0.49 ± 0.057 $\mu\text{moles/ L membranas/ min}$ y 0.27 ± 0.025 $\mu\text{moles/ L cel./ min}$, respectivamente) no fue posible medir una actividad de transporte mediado en membranas preparadas a partir de eritrocitos LT. Por lo tanto, todos los estudios de especificidad se realizaron utilizando eritrocitos provenientes de individuos con fenotipo HT.

Una de las características propias de la familia de transportadores heterodiméricos, es que el transportador y^+L y sus demás miembros, realizan intercambio obligatorio de aminoácidos, es decir, el transporte depende de la presencia de aminoácidos en el compartimento opuesto. Esta propiedad se ha demostrado tanto para el transportador b^{0+} , (Chillarón *et al*, 1996) como para el sistema L (específico para aminoácidos neutros) (Meier *et al*, 2002).

Tal como se muestra en la Figura 2 A, el flujo de entrada de lisina radiactiva hacia membranas reselladas de eritrocitos HT sin adición de aminoácidos en su interior ocurre muy lentamente, mientras que en aquellas membranas cargadas con L-lisina no radiactiva

en concentración 2 mM, la velocidad de entrada de lisina radiactiva es significativamente mayor. Lo mismo ocurre para la salida de lisina radiactiva hacia un medio sin aminoácidos y hacia un medio que contiene lisina 2 mM. (Figura 2 B).

Esta característica ha sido demostrada para la salida de aminoácidos en eritrocitos humanos (Angelo y Devés, 1994), eritrocitos de pollo (Vargas y Devés, 2001) y oocitos (Kanai *et al*, 2000). La presente investigación es la primera en demostrar la propiedad de intercambio obligado del transportador y^+L estudiando la captación de aminoácidos hacia un medio intracelular controlado.

La estimulación de la entrada de lisina por 2 mM de lisina en el compartimiento intracelular fue en promedio de 7.7 veces, pero mostró variaciones en distintas preparaciones. El transporte observado en ausencia de aminoácidos en el interior no representa un flujo pasivo debido a la permeabilización de la membrana, pues puede ser completamente inhibido al agregar lisina no radiactiva al medio extracelular. Una posibilidad es que se deba a la persistencia de aminoácidos endógenos intracelulares en algunas preparaciones o bien a un grado menor de acoplamiento.

Especificidad del el sitio expuesto al compartimiento intracelular.

Las constantes de saturación media para el sitio interno fueron determinadas a partir del efecto de *trans*-aceleración de la entrada de lisina radiactiva en presencia de distintas concentraciones de lisina, glutamina, metionina y leucina no radiactivas en el compartimiento intracelular. En 1994 Angelo y Devés confirmaron que los parámetros medidos a partir del efecto *trans*-estimulante en la salida de aminoácido marcado coinciden con las constantes determinadas en experimentos de *cis*-inhibición de la entrada. Esto significa que es posible medir el efecto de un aminoácido sobre el sitio interno, en forma

indirecta a partir de la *trans*-aceleración que este induce sobre la entrada de un aminoácido radiactivo, en este caso lisina, pues el transportador realiza un intercambio obligatorio y con una estequiometría de 1:1.

Los resultados muestran que el sitio interno es altamente selectivo para lisina y que la afinidad hacia aminoácidos neutros es baja aún en presencia de Na^+ . L-lisina fue capaz de *trans*-estimular la entrada de L-lisina radiactiva y el efecto se observó a concentraciones bajas, revelando una interacción fuerte de este aminoácido con el sitio de unión del transportador ($K_{\text{LIS}} = 0,0104 \pm 0,0010 \text{ mM}$). La velocidad observada en presencia de una concentración saturante (2mM) de lisina se utilizó como patrón de referencia en experimentos con otros aminoácidos, para normalizar los resultados por diferencias en la velocidad de transporte de distintos individuos.

El aminoácido neutro L-leucina, en presencia de Na^+ , no fue capaz de estimular la entrada de L-lisina en forma dosis dependiente. En membranas reselladas, el flujo de L- $[^{14}\text{C}]$ lisina en presencia de 2, 10 y 15 mM de L-leucina no difiere significativamente entre las distintas concentraciones en un medio Na^+ y el efecto observado es pequeño (10% de estimulación). En la superficie externa de la membrana L-leucina se une al transportador y^+L con una constante de saturación media de aproximadamente 1 mM. La baja afinidad por leucina es una característica propia de los eritrocitos HT (Vargas y Devés, 2001). Sin embargo, la selectividad en favor de lisina es aún mucho mayor en el compartimiento interno ($[\text{K}_{\text{LEU}}/\text{K}_{\text{LIS}}]_{\text{extNa}} = 52$; $[\text{K}_{\text{LEU}}/\text{K}_{\text{LIS}}]_{\text{intNa}} >1500$). Glutamina fue el aminoácido neutro que mostró mayor afinidad (K_m 0,82 mM), tal como se observa en el sitio externo, pero, en forma similar a leucina, la afinidad relativa con respecto a lisina fue menor que en el exterior ($[\text{K}_{\text{GLN}}/\text{K}_{\text{LIS}}]_{\text{extNa}} = 7$; $[\text{K}_{\text{GLN}}/\text{K}_{\text{LIS}}]_{\text{intNa}} = 79$). Un comportamiento similar se

observó en el caso de metionina ($[K_{MET}/K_{LIS}]_{extNa} = 11$; ($[K_{MET}/K_{LIS}]_{intNa} = 443$).

En resumen, la investigación demuestra que el sitio interno del transportador y⁺L de eritrocitos HT presenta una marcada preferencia por L-lisina y que su afinidad por aminoácidos neutros es muy débil en presencia de Na⁺; el orden de potencia de la estimulación del transporte es: L-glutamina > L-metionina > L-leucina. Además, como se muestra en la Tabla 1, la afinidad de lisina en el sitio de unión intracelular es mayor que la que exhibe el lado externo del transportador, mientras que por el contrario, glutamina, metionina y leucina presentan afinidades muy inferiores por el sitio interno en comparación con el sitio externo.

Un hallazgo importante es que esta mayor selectividad se observa en presencia de Na⁺. Por lo tanto, el resultado contradice a la hipótesis en cuanto a que esta postula que "la asimetría se debe a la diferente composición iónica de los medios intra y extracelular".

Para verificar si el sitio interno es sensible a los cambios en la sustitución iónica se analizó la capacidad de los aminoácidos para activar el flujo de entrada de lisina en presencia de K⁺ o Li⁺ en el interior. Los resultados revelan que el efecto *trans*-estimulador de L-lisina es igual en presencia de Na⁺ o K⁺, es decir, la alta afinidad por este aminoácido es independiente del medio iónico predominante. Este resultado es consistente con el comportamiento descrito para la interacción de lisina en el compartimiento externo observado en distintos sistemas experimentales (Devés *et al*, 1992; Angelo y Devés, 1994; Chillarón, *et al*, 1996; Kanai *et al*, 2000).

Los aminoácidos neutros, en cambio, disminuyen en forma importante su capacidad de interactuar con el sitio cuando el medio interno contiene K⁺ (las K_A son al menos 10 veces superiores en presencia de K⁺ que en presencia de Na⁺) y en consecuencia, el sitio interno se hace más selectivo aun para aminoácidos catiónicos. Por lo tanto, si bien la

asimetría del sitio interno se observa también en presencia de Na^+ , esta se intensifica cuando el Na^+ se reemplaza por K^+ .

Una de las características singulares del transportador y^+L es que la afinidad por leucina es alta en presencia de Li^+ . Esto es especialmente evidente en el sitio externo de los eritrocitos HT donde la razón de la constante de saturación media (K_A) en Na^+ y Li^+ es 23. En el caso del sitio interno, la afinidad por leucina también aumenta dramáticamente en presencia de Li^+ , la constante de saturación media que no pudo estimarse en Na^+ hasta una concentración de 15 mM, en presencia de ion Li^+ es $K_{\text{LEU}}: 0,53 \pm 0.08$ mM. El efecto del ion Li^+ no fue el mismo para los otros dos aminoácidos neutros ensayados. La unión de L-glutamina fue más débil en presencia de Li^+ , y L-metionina, si bien aumentó su afinidad con respecto a Na^+ , no lo hizo en igual magnitud. No existen evidencias sobre la interacción de glutamina y metionina con Li^+ en el sitio externo del transportador y^+L de eritrocitos de pollo, pero estos resultados son consistentes con los resultados obtenidos para la interacción del sitio externo del transportador y^+L de eritrocitos humanos (Angelo et al., 1996).

Por lo tanto, a pesar de que el sitio interno es más selectivo para aminoácidos catiónicos, este exhibe las mismas propiedades con respecto a la interacción con cationes inorgánicos que el sitio que se expone al exterior.

También se ha observado una asimetría importante en las afinidades de los sitios internos y externos por los sustratos en otros transportadores heterodiméricos. El sistema b^{0+} reconstituido en liposomas muestra afinidades para leucina en el rango micromolar en el exterior y en el rango milimolar en el interior (Reig et al., 2002). Igualmente se ha descrito asimetría para el transportador LAT-1 y LAT-2 que muestra una considerable

menor afinidad por todos los sustratos en el medio interno (Meier et al., 2002). La alta afinidad por lisina interna descrita en este trabajo no ha sido descrita en otros sistemas experimentales.

Rol del transportador y^+L

Los resultados de este trabajo, confirman que el transportador y^+L es un intercambiador de aminoácidos que interactúa preferentemente con lisina en su sitio de unión intracelular, siendo la afinidad por los aminoácidos neutros leucina, glutamina y metionina muy baja incluso en presencia de Na^+ . Los resultados son concordantes con investigaciones previas realizadas en oocitos de *Xenopus* que se aproximaron en forma indirecta a este problema. Chillarón *et al.* en 1996, observaron que al inyectar oocitos con diferentes aminoácidos, la salida de aminoácidos catiónicos fue eficientemente estimulada por la presencia de aminoácidos en el compartimiento extracelular, mientras que la salida de aminoácidos neutros no fue *trans*-estimulada desde el compartimiento externo. Esto sugiere que sólo los aminoácidos catiónicos salen de la célula mediante un mecanismo de intercambio compatible con el transportador y^+L .

La especificidad descrita para el transportar y^+L de eritrocitos de pollo HT es consistente con las características que se ha postulado presentaría el transportador y^+L de epitelios y que darían cuenta del intercambio de lisina interna por aminoácidos neutros más Na^+ desde el medio extracelular (Eleno *et al.*, 1994; Bauch et al., 2003, Torrents et al., 1999). El modelo propuesto para el funcionamiento del sistema y^+L se muestra en la Figura 11.

Como ya se mencionó anteriormente, se ha demostrado que el isotipo y^+LAT-1 del transportador y^+L es el responsable de la enfermedad genética LPI (Torrents, *et al.*, 1999). Los pacientes que padecen esta enfermedad presentan una mutación en el gen que codifica el transportador presente en células epiteliales de riñón e intestino delgado. Esto deriva en

que los pacientes que sufren LPI tienen una reabsorción de aminoácidos catiónicos defectuosa a nivel de riñón y una mala absorción de estos a nivel intestinal, debido al mal funcionamiento del transportador ubicado en la membrana basolateral (Revisado en Palacín *et al*, 2003).

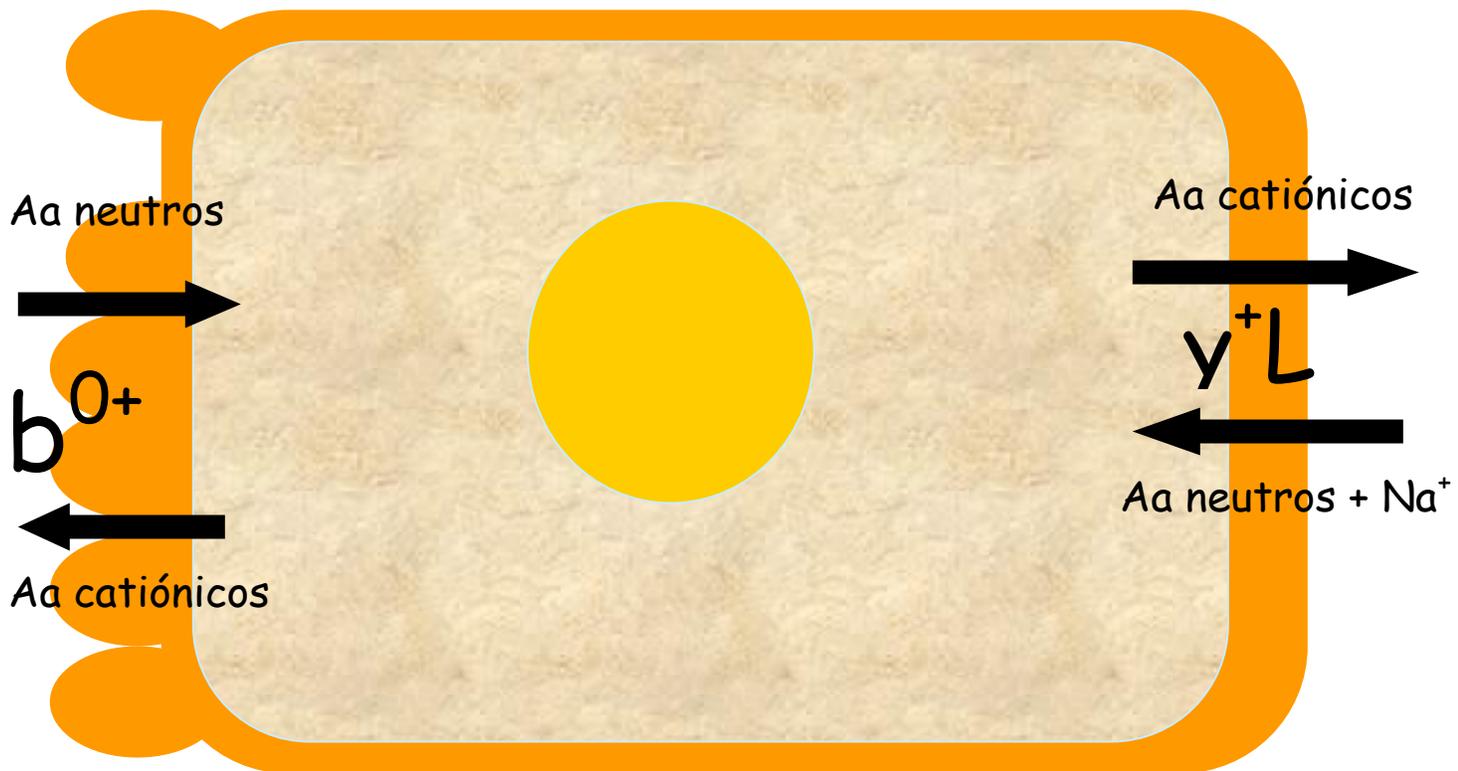
La evidencia genética disponible que ha detectado la presencia de y^+L en una amplia gama de tejidos, es abundante, sin embargo no existe claridad respecto de su función en tejidos no epiteliales. Un hallazgo relevante es que el transportador se encuentra en una variedad de células tumorales y la subunidad pesada (4F2 o CD98) parece estar correlacionada con la proliferación celular en una gran variedad de tejidos, lo que revela que el transportador y^+L es importante en la captación de aminoácidos para estas células (revisado en Devés y Boyd, 2000). Si consideramos que no se detectó la presencia de otros transportadores conocidos que den cuenta de la entrada de L-lisina en el glóbulo rojo de pollo, y por otra parte, y^+L es un intercambiador cuya afinidad por los aminoácidos neutros estudiados es baja, queda abierta la interrogante acerca de cómo ingresa L-lisina al glóbulo rojo. Es posible que existan otros aminoácidos, neutros o catiónicos, no analizados en la presente tesis, que sean capaces de *trans*-estimular la entrada de lisina a través del transportador y^+L con alta afinidad, o bien, que exista otra vía de ingreso de aminoácidos catiónicos que no fue observada bajo las condiciones experimentales manejadas.

Este es el primer estudio que se realiza para caracterizar la función del sitio de captación interna de aminoácidos del transportador y^+L , controlando las condiciones, tanto del medio interno, como del medio extracelular.

Dada la similitud que presenta el transportador y^+L de eritrocitos con las características de y^+L presente en epitelios, (Eleno *et al*, 1994, Vargas y Devés, 2001) los resultados obtenidos en este trabajo, permiten comprender cual es el mecanismo mediante

el cual el transportador y^+L da cuenta del transporte transepitelial de lisina a través de la membrana basolateral del epitelio renal en intestinal.

CÉLULA EPITELIAL



BIBLIOGRAFÍA

- Angelo, S., Devés, R.** 1994. Amino Acid Transporter System y^+L of Human Erythrocytes: Specificity and Cation Dependence of the Translocation Step. *J. Memb. Biol.* 141: 183-192.
- Angelo, S., Irarrázabal, C., Devés, R.** 1996. The binding specificity of amino acid transport system y^+L of human erythrocytes is altered by monovalent cations. *J. Memb. Biol.* 153: 37-44.
- Bauch, C.** Forster, N., Loffing-Cueni, D., Summa, V., Verrey, F. 2003. Functional cooperation of epithelial heterodimeric amino acid transporter expressed in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol Chem.* 278: 2, 1316-1322.
- Borsani, G., Bassi, M.T, Sperandeo, M.P., De Grandi, A., Buoninconti, A., Riboni, M., Manzoni, M., Incerti, B., Pepe, A., Andria, G., Ballabio, A., Sebastio, G.** 1999. SLC7A7, encoding a putative permease-related protein, is mutated in patients with lysinuric protein intolerance, *Nature Genet.* 21: 297 – 301.
- Boyd, C. A. R., Devés, R., Laynes, R., Kudo, Y., Sebastio, G.,** 2000. Cationic amino acid transport through system y^+L in erythrocytes of patients with lysinuric protein intolerance. *Pflügers Arch.* 439: 513 –516.
- Chillarón, J., Estévez, R., Mora, C., Wagner, C. A., Suessbrich, H., Lang, F., Gelpi, J.L., Testar, X., Bush, A. E., Zorzano, A., Palacín, M.** 1996. Obligatory amino acid exchange via system b^{0+} -like and y^+L -like. *J. Biol. Chem.* 271: 17761-17770.
- Devés, R., Chávez, P., Boyd, C.A.R.** 1992. Identification of a new transport system y^+L in human erythrocytes that recognizes lysine and leucine with high affinity. *J. Physiol.* 454: 491- 501.
- Devés, R., Angelo, S., Chávez, P.** 1993. N-ethylmaleimide discriminates between two

- lysine transport systems in human erythrocytes. *J. Physiol.* 468: 753-766.
- Devés, R., Boyd, C.A.R.** 1998. Transporter for cationic amino acids in animal cells: Discovery, Structure, and Function. *Physiological Reviews.* 78: 2, 487-545.
- Devés, R., Boyd, C. A. R.** 2000. Surface antigen CD98(4F2): not a single membrane, but a family of proteins with multiple functions. *J. Memb Biol.* 173: 165-177.
- Eleno, N., Devés, R., Boyd, C.A.R.** 1994. Membrane potential dependence of the kinetics of cationic amino acid transport systems in human placenta. *J. Physiol.* 479: 291-300.
- Kanai, Y. Fukasawa, Y., Ho Cha, S., Segawa, H., Chairoungdua, A., Kim, D. K., Matsuo, H., Kim, J. Y., Miyamoto, K., Takeda, E., Endou, H.** 2000. Transport properties of a system y^+L neutral and basic amino acid transporter. *J. Biol. Chem.* 275: 27, 20787- 20793.
- Meier, C., Ristic, Z., Klauser, S., Verrey, F.** 2002. Activation of system L heterodimeric amino acid exchanger by intracellular substrates. *EMBO J.* 21:4, 580-589.
- Palacín, M., Borsani, G., Sebastio, G.** 2001. The molecular bases of cystinuria and lysinuric protein intolerance. *Curric. Opin. Genet. Dev.* 11: 328-335.
- Palacín, M., Bertran, J., Chillarón, J., Estévez, R., Zorzano, A.** 2003. Lysinuric protein intolerance: mechanisms of pathophysiology. *Molec. genet. and metab.* 81: 27-37.
- Pfeiffer, R., Rossier G., Bauch C., Meier C., Eggermann T., Loffing-Cueni D., Kuhn L. C., Verrey F.** 1999. Amino acid transport of y^+L -type by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of the glycoprotein- associated amino acid transporter family. *EMBO J.* 18: 49-57.
- Reig, N., Chillarón, J., Bartoccioni, P., Fernández, E., Bendahan, A., Zorzano, A., Kanner, B., Palacín, M., Bertran, J.** 2002. The light subunit of system b^{0+} , is fully functional in the absence of the heavy subunit. *EMBO, J.* 21: 4906-4914.
- Somes, R., Smagula, R., Lerner, J.** 1981. Selective breeding of chickens for erythrocytes

with high and low leucine transport activity. *Am. Journal Physiol.* 241: 233-242.

Torrents, D., Estévez, R., Pineda, M., Fernández, E., Lloberas, J., Shi, Y. B., Zorzano, A., Nunes, V., Huoponen, K., Reinikainen, A., Simell, O., Savontaus, M.L., Aula, P., Palacín, M., 1999. Identification of SLC7A7, encoding γ^+ LAT-1, as the lysinuric protein intolerance gene. *Nature Genetics* 21: 293- 296.

Van Winkle, L. J., Chirstensen, H. N., Campione, A. L. 1985. Na^+ -dependent transport of basic, zwitterionic and bicyclic amino acids by a broad-scope system in mouse blastocysts. *J. Biol. Chem.* 260: 12118-12123.

Van Winkle, L. J., Campione, A. L., Gorman J. M. 1988. Na^+ -independent transport of basic and zwitterionic amino acid in mouse blastocysts by a shared system and by processes which distinguish between these substrates. *J. Biol. Chem.* 263:3150- 3163.

Vargas, M., Devés, R., 2001. System γ^+ L – like activities account for high and low amino-acid transport phenotypes in chicken erythrocytes. *J. Memb. Biol.* 183: 183- 193.

Verrey, F., Meier, C., Rossier, G., Kuhn, L. C. 2000. Glycoprotein-associated amino acid exchangers: broadening the range of transport specificity. *Pflügers Arch.* 440: 503-512.

Verrey, F. Closs, E., Wagner, C., Palacín, M., Endou, H., Kanai, Y. 2003. CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflügers Arch.* 424: 1-23.

Wheeler, K.P., 1982. Amino acid transport by resealed ghosts from pigeon erythrocytes. *Biochem J.* 202: 613-621.

White, M. F. (1985). The transport of cationic amino acid across the plasma membrane of mammalian cells, *Bioch. et Bioph. Acta* 822: 355-374.

