

UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA

*Dottorato di Ricerca in
Biologia Animale (XXII ciclo)
Settore BIO/10*

*Ricostituzione Funzionale in Liposomi del
Trasportatore Glutamina-Amminoacidi Neutri,
B^o-like, di Rene di Ratto*

*TUTOR
Dr.ssa Lorena POCHINI*

*DOTTORANDA
Dr.ssa Francesca OPPEDISANO*

*Coordinatore del dottorato
Prof. Marcello Canonaco*

Anno Accademico 2008 - 2009

INDICE

| | |
|----------------------------|----------|
| ABSTRACT | 5 |
| ABBREVIAZIONI | 9 |

CAPITOLO PRIMO

| | |
|---|-----------|
| INTRODUZIONE | 10 |
| 1.1 Premessa | 10 |
| 1.2 Le proteine di trasporto di membrana | 11 |
| 1.3 Lo studio dei sistemi di trasporto di membrana | 12 |
| 1.3.1 Espressione eterologa di sistemi di trasporto di membrana | 14 |
| 1.3.2 Espressione di sistemi di trasporto di membrana plasmatica in batteri | 15 |
| 1.3.3 Approccio bioinformatico nello studio dei sistemi di trasporto ... | 17 |
| 1.3.4 Relazione fra sistemi di trasporto di membrana e patologie umane | 18 |
| 1.4 Classificazione dei sistemi di trasporto (TC) | 19 |
| 1.5 Approccio biochimico nello studio dei sistemi di trasporto | 26 |
| 1.5.1 La glutammina e la membrana plasmatica | 27 |
| 1.5.1.1 I sistemi di trasporto della glutammina di membrana plasmatica | 28 |
| 1.5.1.2 B ⁰ AT1 e la malattia di Hartnup | 37 |
| 1.5.1.3 B ⁰ AT1 e la famiglia SLC6 | 38 |

CAPITOLO SECONDO

| | |
|---|-----------|
| MATERIALI E METODI..... | 42 |
| 2.1 Preparazione di vescicole di membrana di brush-border di rene di ratto..... | 42 |
| 2.2 Determinazione della concentrazione delle proteine nelle preparazioni | 44 |
| 2.3 Solubilizzazione della traslocasi della glutammina di membrana plasmatica | 45 |
| 2.4 Preparazione dei liposomi | 46 |
| 2.4.1 Misura del volume interno dei liposomi. | 47 |
| 2.5 Preparazione delle colonne XAD-4 | 47 |
| 2.6 Incorporazione delle proteine nei liposomi (ricostituzione)..... | 48 |
| 2.7 Preparazione delle colonne Sephadex G-75..... | 49 |
| 2.8 Misure di trasporto | 51 |
| 2.8.1 Misure di trasporto come ingresso di substrato radioattivo nei proteoliposomi..... | 51 |
| 2.9 Misura della radioattività entrata nei proteoliposomi e calcolo dell'attività di trasporto | 53 |
| 2.10 Elaborazione dei dati sperimentali..... | 54 |

CAPITOLO TERZO

| | |
|--|-----------|
| RISULTATI RIGUARDANTI IL TRASPORTATORE B^0AT1 | 56 |
| 3.1 Ricostituzione in liposomi e studi funzionali del trasportatore glutammina/amminoacidi neutri B^0AT1 | 56 |

| | | |
|-------|--|-----------|
| 3.1.1 | Analisi dei parametri della ricostituzione..... | 56 |
| 3.1.2 | Studio della funzione del sistema di trasporto ricostituito..... | 60 |
| 3.1.3 | Specificità per amminoacidi ed inibitori..... | 68 |
| 3.1.4 | Analisi cinetiche | 73 |
| 3.1.5 | Il cotrasporto sodio-glutamina | 77 |
| 3.2 | Discussione..... | 80 |
| | <i>BIBLIOGRAFIA</i> | 87 |
| | <i>PUBBLICAZIONI</i> | |

ABSTRACT

In this work we have studied the functional properties of amino acid transporters using liposomes reconstituted with solubilized renal brush borders.

Among the numerous amino acid transport systems of the plasma membrane, there is a restricted group of transporters that share the specificity for glutamine. In mammals, these transporters play the important function of mediating glutamine trafficking among different tissues and intestinal and renal (re)absorption. In the last decade the genes coding for the glutamine-specific transport systems have been identified and the encoded proteins have been characterized in expressing cell systems. A general feature of the proteins that mediate glutamine transport is the more or less broad specificity towards different amino acids: thus, the glutamine transporters are also designated as amino acid transporters with specificity towards glutamine. The various transporters can be assigned to different protein families on the basis of their structural features. The glutamine specific transporters can be functionally divided in two groups: sodium-dependent (systems ASCT2/ATB⁰, N, B^{0,+}, A and y⁺L) and sodium-independent (systems L and b^{0,+}) transporters. Among the sodium-dependent transporters, a further distinctive feature is the high (N and y⁺L) or low (ASCT2) tolerance towards the substitution of Na⁺ by Li⁺. In general, the transporters are characterized by the different specificity for amino acids and sensitivity to inhibitors; for example, the amino acid analogue MeAIB is used to assess the function of System A. More recently another sodium-dependent amino acid transporter which is also specific for glutamine has been identified: B⁰AT1. This transport system, which belongs to the SLC6 transporter family, is highly expressed in mouse kidney and is specific for all the neutral amino acids, which are cotransported with sodium. B⁰AT1 corresponds to the transport system, previously found in bovine renal epithelial cells, named B⁰. Mutations of the B⁰AT1

gene (SLC6A19) cause the Hartnup disorder. In spite of the very large amount of experimental data deriving from the studies on the glutamine transporters, several aspects of the transporter function and regulation are still unclear or unraveled. The procedure of reconstitution into liposomes has often been helpful in clarifying functional properties of membrane transport systems since it allows some types of experiments that cannot be accurately performed in cell systems.

In the present study a procedure has been pointed out for efficient reconstitution in liposomes of a rat kidney transport system which is specific for glutamine and neutral amino acids. The reconstituted system was optimised with respect to the critical parameters of the cyclic detergent removal procedure, i.e., the detergent used for the solubilization, the protein concentration, the detergent/phospholipid ratio and the number of passages through a single Amberlite column. In the reconstituted system, the transporter showed all the basic functional properties of B⁰AT1; thus, it has been classified as B⁰-like. Novel functional aspects of the transporter have been revealed. Time dependent [³H]-glutamine accumulation in proteoliposomes occurred only in the presence of external Na⁺ and internal K⁺. The transporter showed low if there is any tolerance towards the substitution of Na⁺ or K⁺ for other cations. Valinomycin strongly stimulated the transport indicating that it is electrogenic. Intraliposomal glutamine had no effect. From the dependence of the transport rate on the Na⁺ concentration cooperativity index close to 1 was derived, indicating that 1 Na⁺ should be involved in the cotransport with glutamine. The electrogenicity of the transport originated from the Na⁺ co-transport.

Optimal rate of 0.1 mM [³H]-glutamine uptake was found in the presence of 50 mM intraliposomal K-gluconate. At higher K-gluconate concentrations the transport rate decreased. The activity of the reconstituted transporter was pH dependent with optimal

function in the range pH 6.5–7.0. [³H]-glutamine (and [³H]-leucine) uptake was inhibited by all the neutral but not by the positively or negatively charged amino acids. The sulfhydryl reagents HgCl₂, mersalyl, p-hydroxymercuribenzoate and the substrate analogue 2-aminobicyclo[2,2,1] heptane-2-carboxylate strongly inhibited the transporter, whereas the amino acid analogue α-(methylamino)isobutyrate had no effect. The inhibition by mersalyl was protected by the presence of the substrate.

The dependence of the transport rate on internal glutamine concentration was measured; the K_m value of the transporter for internal glutamine is 2.01 ± 0.4 mM.

The transporter is functionally asymmetrical and it is unidirectionally inserted into the proteoliposomal membrane with an orientation corresponding to that of the native membrane. By a bisubstrate kinetic analysis of the glutamine uniport, a random simultaneous mechanism of transport was found.

The physiological role of the dependence on internal (intracellular) K⁺ of the B⁰-like transporter may be related with the signaling of the metabolic condition of the cell. The intracellular concentration of K⁺ is influenced by a complex regulation of apical K⁺ channel in kidney, which are activated at sub-millimolar and inhibited at higher (millimolar) ATP concentration. Consequently, the intracellular K⁺ concentration will decrease or increase, respectively, at lower or higher ATP level. Thus, K⁺ may modulate the activity of the B⁰-like transporter in response to the level of ATP. Modulation by ATP was previously found for the reconstituted ASCT2, which is directly stimulated by higher intracellular ATP level (Oppedisano et al 2004, 2007). Since B⁰AT1 and ASCT2 mediate uniport or antiport of neutral amino acids, respectively, the complex mechanism of modulation of their activity will regulate the balance between net uptake and exchange of amino acids in response to the metabolic state of the cell.

This cross-talk between B⁰AT1 and ASCT2 together with the peculiar specificity of ASCT2 towards glutamate support the occurrence and the modulation of the tertiary active transport recently proposed by Broer, involving the antiport of external glutamate with internal neutral amino acids mediated by ASCT2, followed by reuptake of the neutral amino acids by B⁰AT1 (Oppedisano and Indiveri 2008).

ABBREVIAZIONI

C_xE_y : alchil (x)-poli (y) ossietilenetere

HEPES : acido 4-(2-idrossietil)-1-piperazinetansulfonico

MeAIB : acido α -(metilammino) isobutirrico

MTSET : [2-(trimetilammonio)etil] metantiosulfonato

NEM : N-etilmaleimmide

NPM : N-fenilmaleimmide

PLP : piridossal-5-fosfato

p-OHMB : p-idrossimercuribenzoato

BCH:2-amminobiciclo[2,2,1]eptano-2-carbossilato

1. INTRODUZIONE

1.1 Premessa

Una delle caratteristiche indispensabili per la vita delle cellule è la delimitazione di uno spazio, separato dall'ambiente esterno, in cui avvengono processi biochimici. Nelle forme più semplici di vita autonoma, quali i procarioti e gli archebatteri, le membrane fosfolipidiche delimitano uno spazio, il citosol, contenente proteine e macromolecole informative. La cellula eucariotica, invece, è caratterizzata dalla compartimentazione endocellulare che delimita spazi interni contenenti il materiale informativo (nucleo) o metabolismi specializzati per la produzione di energia (mitocondri) o per la costruzione di proteine complesse (reticolo endoplasmico e apparato del Golgi). In tutte le forme di vita è fondamentale la separazione fra ambiente esterno ed interno al fine di impedire che materiale indesiderato penetri nella cellula dall'ambiente extracellulare, evitare la perdita di metaboliti necessari, consentire la formazione di gradienti chimici e ionici e mantenere all'interno della cellula la giusta composizione ionica, il giusto pH, la pressione osmotica. E' indubbio, pertanto, che la compartimentazione introduca nel "sistema cellula" una certa complessità: infatti, tante più sono le parti che compongono un sistema, tanto più fine dovrà essere la loro regolazione per mantenere l'omeostasi del sistema stesso. Diventa, quindi, importante la comunicazione fra l'interno e l'esterno delle cellule e, nel caso degli eucarioti, tra i vari compartimenti cellulari; specifiche molecole devono essere selettivamente trasportate all'interno delle cellule e nei compartimenti cellulari appropriati, per lo svolgimento di particolari funzioni (come produzione di energia metabolica, assemblaggio di glicoproteine oppure oloenzimi).

1.2 Le proteine di trasporto di membrana

Il compito di regolare il passaggio di specifiche molecole è svolto da sistemi di trasporto, proteine integrali di membrana, presenti in tutte le membrane biologiche. I sistemi di trasporto di membrana hanno, pertanto, la funzione di rendere selettivamente permeabili le membrane. In alcuni casi essi rappresentano soltanto un via di comunicazione fra due ambienti cellulari, in altri svolgono la funzione di regolare metabolismi cellulari modulando la velocità d'ingresso e di uscita di vari metaboliti. Ciò regola lo svolgimento di particolari reazioni metaboliche, il cui fattore limitante è rappresentato dai livelli di substrato all'interno del compartimento, sede della reazione. Sono note diverse forme di regolazione dei trasportatori. Un esempio è dato dai trasportatori di sostanze nutrienti espressi sulla membrana luminale delle cellule intestinali e delle cellule dei tubuli renali. Queste proteine sono direttamente esposte all'ambiente caratterizzato da grandi fluttuazioni nella tipologia e nei livelli di nutrienti che entrano nel lume. Alcuni di questi trasportatori sono regolati negativamente (down regulation) dagli stessi substrati introdotti con l'alimentazione, altri positivamente (up regulation). Esempi di risposta negativa ad elevati livelli di substrato sono dati dai trasportatori di nutrienti quali vitamine, minerali, sali biliari. Esempi di trasportatori di nutrienti, che vengono "up regolati" in risposta ai substrati introdotti con l'alimentazione, sono il sistema di cotrasporto Na^+ /glucosio, il sistema di trasporto di peptidi e il sistema di trasporto di acidi monocarbossilici. Probabilmente questo tipo di regolazione ha la funzione di mantenere un adeguato assorbimento di nutrienti essenziali e di minimizzare gli effetti di nutrienti con potenziale tossicità (Diamond 1987).

L'interesse per lo studio dei sistemi di trasporto di membrana è aumentato esponenzialmente nell'ultimo decennio per tre ragioni principali: lo sviluppo di tecniche

più avanzate nella sperimentazione sul trasporto di membrana; il completamento di vari progetti genoma, che ha rivelato l'esistenza di un numero di sistemi di trasporto molto più grande di quello che si riteneva sulla base degli studi funzionali precedenti; la correlazione tra il difetto funzionale di sistemi di trasporto e malattie genetiche mono o multifattoriali.

1.3 Lo studio dei sistemi di trasporto di membrana

Lo studio dei sistemi di trasporto di membrana si è sviluppato successivamente rispetto allo studio delle proteine solubili (buona parte degli enzimi). La ragione di ciò è connessa alla difficoltà di maneggiare un sistema di trasporto che, al contrario degli enzimi, è una proteina integrale di membrana. E' infatti necessario affrontare due tipi di problemi: il primo è correlato alla presenza nella struttura della proteina di trasporto di domini idrofobici, che rappresentano la porzione della proteina inserita nella membrana e limitano la solubilità della proteina in acqua; il secondo è rappresentato dalla necessità di creare due compartimenti fra cui seguire il trasporto catalizzato dalla proteina. I primi studi sui sistemi di trasporto sono stati eseguiti in sistemi di membrane native, come le cellule intatte oppure gli organelli subcellulari isolati, come i mitocondri. In questi casi i due compartimenti sono rappresentati dall'ambiente nativo intracellulare, o interno all'organello, e dall'ambiente esterno artificiale. In questo tipo di sperimentazione, il trasporto viene misurato mediante l'utilizzo di molecole marcate con radioisotopi o altri sistemi che permettono di evidenziare, con elevata sensibilità, il passaggio di molecole fra i due lati della membrana, un esempio è dato dalle sonde fluorescenti (Di Virgilio et al 1989). Il principale svantaggio di questo tipo di approccio sperimentale è dato dalle interferenze determinate dalla presenza di enzimi nei compartimenti interni, i quali possono modificare le molecole trasportate, nonché dalla presenza, sulle stesse

membrane, di altri sistemi di trasporto e dalla possibilità di controllare le condizioni sperimentali soltanto nell'ambiente esterno (cis) ma non in quello interno (trans). Questo tipo di studi si è evoluto più recentemente grazie a tecniche di biologia molecolare che permettono l'espressione selettiva di una proteina di trasporto eterologa all'interno di particolari cellule, come per esempio gli oociti. La proteina espressa, se raggiunge la membrana, darà un segnale di trasporto caratteristico e riconoscibile rispetto alle cellule che non la esprimono. Questa tecnica permette di studiare una specifica proteina di cui è noto il gene, tuttavia, presenta le limitazioni tipiche dei sistemi cellulari intatti. Una tecnica più recente per lo studio di sistemi di trasporto di membrana è la ricostituzione in membrane artificiali. La ricostituzione consiste nell'inserimento di proteine di trasporto in sistemi di membrana artificiali costituiti da bilayer fosfolipidici. I sistemi di membrana più largamente utilizzati a questo scopo sono i liposomi, vescicole sferiche il cui diametro varia fra 50 e 250 nm a seconda delle tecniche usate per la preparazione. Le proteine di trasporto vengono inserite nel bilayer fosfolipidico, formando i proteoliposomi, con varie strategie che prevedono, ad esempio, l'eliminazione del detergente utilizzato per la solubilizzazione della proteina dalle membrane cellulari, oppure il Freeze-Thaw-Sonication, congelamento rapido, scongelamento lento e sonicazione (Kramer et al 1986; Palmieri et al 1995). Fra le tecniche basate sulla rimozione del detergente ricordiamo la diluizione, la dialisi, l'adsorbimento su particolari resine idrofobiche. Il trasporto viene, quindi, seguito nei proteoliposomi, analogamente a quanto detto per i sistemi cellulari, utilizzando molecole marcate con radioisotopi o sonde fluorescenti. Nei proteoliposomi è possibile studiare il trasporto in assenza di interferenze che, nel mitocondrio intatto o nelle cellule, sono causate dalla presenza di altri sistemi di trasporto, da enzimi che metabolizzano, o in generale, modificano i substrati, e da interazioni tra i sistemi di trasporto ed altre proteine.

Numerosi sono i vantaggi che il sistema ricostituito presenta come, ad esempio, la possibilità di controllare le condizioni sperimentali nel compartimento interno, che consente di determinare l'affinità per il substrato sul lato interno della proteina; la possibilità di studiare l'effetto di varie molecole su entrambi i lati della proteina; un tempo maggiore per il raggiungimento dell'equilibrio da parte delle molecole radioattive, dovuto al basso rapporto proteina/lipidi (che significa una o poche proteine per liposoma), condizione che conduce ad una migliore risoluzione della cinetica del trasporto; la possibilità di modificare la composizione lipidica della membrana che in molti casi influenza l'attività di trasporto delle proteine (Sharom 1997). La ricostituzione nei liposomi è una tecnica che può essere utilizzata sia per lo studio delle proprietà funzionali di proteine di trasporto estratte dalla propria membrana nativa, sia per lo studio di proteine over-esprese, ad esempio nei batteri (Indiveri et al 1998) o nei lieviti (Kasahara et al 1996).

1.3.1 Espressione eterologa di sistemi di trasporto di membrana

Lo studio dei sistemi di trasporto di membrana è limitato dalla necessità di ottenere membrane native in cui studiare il trasporto o di estrarre le proteine dalle membrane native per ricostituirle in sistemi artificiali. Tali procedure richiedono il sacrificio di animali da laboratorio e tecniche elaborate per la purificazione delle membrane native e soprattutto per l'estrazione delle proteine da esse. Il limite principale di queste procedure si evidenzia particolarmente nel caso in cui si vogliono studiare proteine poco rappresentate nelle cellule native. In questo caso le tecniche di estrazione richiedono grandi quantità di materiale di partenza (animali) e non sempre consentono di ottenere proteine sufficientemente attive, o in quantità adatte alle successive procedure di ricostituzione. Lo svantaggio è particolarmente rilevante nei casi in cui si vogliono

intraprendere studi di tipo strutturale; in questi casi è necessario disporre di grandi quantità di proteine allo stato omogeneo di purificazione. Questi problemi possono essere risolti ricorrendo all'espressione delle proteine in sistemi cellulari di vario tipo. Fino ad ora l'espressione di proteine è stata ottenuta in sistemi cellulari anche eterologhi soprattutto per proteine enzimatiche, ma anche, in alcuni casi, per proteine di membrana. L'espressione eterologa in batteri consente di ottenere quantità di proteine molto più grandi rispetto all'espressione in sistemi cellulari eucariotici, anche se eterologhi come oociti e lieviti. Per le proteine di trasporto di membrana plasmatica, oltre ad alcuni esempi di espressione in sistemi eucariotici, vi sono soltanto pochissimi esempi di espressione eterologa in sistemi batterici (Galluccio et al 2009). Nel caso dei sistemi eucariotici sono stati ottenuti livelli di espressione non controllati ed appena sufficienti per studiare il trasporto negli stessi sistemi cellulari che realizzano il trasferimento delle proteine espresse in membrana plasmatica (Hruz et al 2000; Rogers et al 2003; Hosoyamada et al 2004). In questi casi il trasporto dovuto alle proteine espresse viene quantificato per sottrazione rispetto a quello misurato in cellule di controllo che non esprimono le specifiche proteine. Ovviamente tali metodi non sono esenti da errori dovuti ad interferenze da parte di altri trasportatori, o ad eventuali modifiche nel pattern proteico dei trasportatori endogeni di membrana, che potrebbe essere alterato dall'induzione dell'espressione eterologa. Inoltre questi sistemi di espressione non consentono di ottenere proteine in quantità sufficienti per studi di tipo strutturale.

1.3.2 Espressione di sistemi di trasporto di membrana plasmatica in batteri

Per tutti i motivi detti in precedenza, è importante realizzare sistemi di espressione eterologa di proteine di trasporto eucariotiche, in batteri. Sistemi di questo tipo sono stati realizzati per l'espressione di proteine di trasporto mitocondriali. Invece vi sono

pochissimi esempi di espressione in batteri di sistemi eucariotici di membrana plasmatica. Un esempio è l'over-espressione del co-trasportatore umano Na⁺/glucosio (hSGLT1) in *E. coli* (Quick et al 2003) e del trasportatore umano OCTN1 (Galluccio et al 2009).

Il sistema cellulare d'elezione è rappresentato da *E. coli*, in cui è possibile ottenere grandi quantità di proteina. In alcuni casi, soprattutto per l'espressione di proteine eterologhe di membrana, questo potrebbe dare dei problemi causati dalla tossicità delle proteine eterologhe per il batterio e dal fatto che le proteine di membrana non sono solubili e quindi si accumulano nei batteri in corpi di inclusione. Inoltre, poiché *E. coli* non è in grado di glicosilare le proteine che produce, potrebbe esserci un problema di tipo funzionale, legato alla mancanza della parte glicosidica delle proteine di membrana plasmatica eterologhe. Ma, com'è noto dalla letteratura, la N- glicosilazione per molte proteine non è indispensabile per l'attività, mentre, per altre influenza, esclusivamente, l'inserimento in membrana (Tanaka et al 2004; Diop et al 2005; Straumann et al 2006; Hayashi et al 2005). Vi sono soltanto pochissimi casi di proteine in cui la parte glicosidica è importante anche per l'attività, comunque, in questi casi, l'attività di trasporto non viene totalmente annullata dalla mancanza della parte glicosidica, ma soltanto ridotta (Asano et al 1991; Nunez et al 1994; Li et al 2004; Cai et al 2005).

Pertanto, nel caso in cui si vogliono esprimere proteine per le quali non si conosce il ruolo dei residui glucidici, è preferibile utilizzare come primo approccio *E. coli* che fornisce, rispetto ai sistemi cellulari eucariotici, quantità di proteina sensibilmente superiori e, solo nel caso in cui la proteina over-espressa non sia attiva, realizzare l'espressione in organismi superiori.

Questo approccio consente di condurre studi di mutagenesi sito diretta, in quanto permette l'espressione di proteine il cui cDNA è stato variato per ottenere mutazioni di

amminoacidi e permette di valutare l'importanza e la funzione di specifici residui amminoacidici nel processo di trasporto o la loro collocazione nella struttura tridimensionale della proteina.

1.3.3 Approccio bioinformatico nello studio dei sistemi di trasporto

Il numero delle proteine di trasporto presenti nei sistemi cellulari, sia procariotici che eucariotici, è in continuo aggiornamento in seguito al completamento di un numero sempre maggiore di progetti genoma, fra cui quello umano. In realtà il sequenziamento dei genomi ha semplicemente rivelato che i sistemi di trasporto in un organismo sono più numerosi di quanto si potesse credere. Ad esempio, fino a non molto tempo fa, si riteneva che, piccole molecole quali l'acqua o l'urea entrassero o effluissero dalle cellule mediante diffusione passiva. L'identificazione di specifici geni ha rivelato che esistono sistemi, come quello dell'acquaporina, che permettono il passaggio dell'acqua attraverso le membrane ad una velocità sufficiente per soddisfare le esigenze vitali delle cellule. Dall'analisi dei genomi, mediante approcci bioinformatici, si può notare che in *Homo sapiens* vi è un numero di sistemi di trasporto pari a 805 di cui: 99 ATP dipendenti, 353 canali ionici, 337 trasportatori secondari e 14 sistemi non classificati. In *Arabidopsis thaliana* vi sono 855 sistemi di trasporto di cui: 170 ATP dipendenti, 120 canali, 544 trasportatori secondari e 20 sistemi non classificati. In *Saccharomyces cerevisiae* vi sono circa 324 proteine responsabili del trasporto di substrati: 70 sistemi ATP dipendenti, 22 canali, 223 trasportatori secondari e 6 sistemi non classificati. In un batterio come l'*Escherichia coli* ci sono circa 379 sistemi di trasporto: 33 fosfotransferasi, 236 trasportatori, 16 canali, 90 sistemi ATP dipendenti e 4 sistemi non classificati (www.membranetransport.org). Questi dati indicano che la comunicazione

cellulare è molto più rilevante di quanto si credesse in passato. Ciò ha dato un notevole stimolo ad affrontare lo studio dei sistemi di trasporto di membrana.

1.3.4 Relazione fra sistemi di trasporto di membrana e patologie umane

La dimostrazione dell'essenzialità dei sistemi di trasporto per la vita della cellula, e quindi di un intero organismo, è data in maniera inequivocabile dall'identificazione di patologie genetiche o acquisite, spesso gravi o addirittura incompatibili con la vita, causate da deficienze della funzione di sistemi di trasporto. Ad esempio, a livello intestinale sono stati identificati quattro sistemi di trasporto degli amminoacidi, ciascuno dotato di un'ampia specificità di substrato. Questi sistemi sono presenti anche a livello dei tubuli renali, dove sono adibiti al riassorbimento degli amminoacidi. Una mutazione che interessi il gene che codifica per un trasportatore, intestinale e renale, degli amminoacidi causa patologie piuttosto serie che vanno sotto il nome di amminoacidurie renali ed intestinali. Si conoscono dieci difetti nel trasporto degli amminoacidi: cinque di essi (Cistinuria, Malattia di Hartnup, Imminoglicinuria, Dibasicamminoaciduria, Dicarbossilicoamminoaciduria) mostrano difetti legati al trasporto di amminoacidi strutturalmente correlati e implicano l'esistenza di trasportatori specifici per gruppi di substrati; i restanti cinque (Ipercistinuria, Lisinuria, Istidinuria, Malassorbimento di metionina, Malassorbimento di triptofano) interessano il trasporto di un singolo amminoacido e implicano l'esistenza di sistemi di trasporto substrato-specifici. Un altro esempio di patologie gravi, legate ai sistemi di trasporto, è dato da alterazioni del canale del Cl^- regolato dall'AMP ciclico, una mutazione del gene che codifica per questa proteina (CFTR) è responsabile dell'insorgenza della fibrosi cistica. Questi canali per il Cl^- sono presenti nelle membrane plasmatiche apicali delle cellule epiteliali di polmoni, ghiandole sudoripare, pancreas ed altri tessuti. Un aumento

della concentrazione di cAMP stimola il trasporto di ioni Cl^- da parte di queste cellule negli individui normali, ma non negli individui affetti da fibrosi cistica che hanno una proteina CFTR difettosa. Altri esempi di patologie causate da deficienze di sistemi di trasporto sono alcune miopatie determinate da alterazioni dei geni che codificano per il trasportatore mitocondriale di carnitina (Huizing et al 1997) e per quello di membrana plasmatica OCTN2 (Wang et al 1999).

1.4 Classificazione dei sistemi di trasporto (TC)

Quasi tutti i processi di trasporto attraverso la membrana sono mediati da proteine integrali di membrana in grado, talvolta, di funzionare in associazione a recettori extracitoplasmatici, o a proteine citoplasmatiche. Sistemi di trasporto, trasportatori, sistemi di permeasi, permeasi, carrier, traslocasi, sono tutti termini equivalenti che vengono, in generale, utilizzati per indicare proteine o complessi proteici che catalizzano trasporto attraverso una membrana biologica. Un sistema di trasporto catalizza una reazione vettoriale, a prescindere se catalizza o meno anche una reazione chimica o di trasferimento di elettroni, che guida il processo vettoriale o che dipende da esso, come accade nel caso dell'ATP sintetasi. Pertanto, tutti i sistemi di trasporto sono proteine catalitiche o complessi di proteine analoghi ad enzimi o a complessi enzimatici. Il trasporto può avvenire secondo uno di tre processi distinti ma correlati. Primo, e più semplice, è la diffusione facilitata o mediata da proteina, un processo che non è accoppiato all'energia metabolica e che, quindi, non può generare gradienti di concentrazione del substrato trasportato attraverso la membrana. Nei sistemi biologici sono stati riconosciuti due principali modelli di trasporto facilitato, quello di canale e quello di carrier. Nella diffusione facilitata tipo canale, il soluto passa da un lato all'altro della membrana attraverso un canale, o poro, costituito da porzioni idrofiliche

di residui amminoacidici (per substrati idrofilici), o da porzioni idrofobiche (per substrati idrofobici), o anfipatiche (per substrati anfipatici). Le strutture di diverse proteine canale sono state determinate utilizzando tecniche di cristallografia ai raggi X. Nella diffusione facilitata mediata da carrier si supposeva che qualche parte del trasportatore attraversasse la membrana insieme al substrato. Questa teoria è stata rivista in seguito a recenti studi di tipo strutturale e funzionale sui sistemi di trasporto. I trasportatori, solitamente, mostrano velocità di trasporto di diversi ordini di grandezza più basse rispetto a quelle dei canali. Inoltre, al contrario della maggior parte dei canali, i trasportatori mostrano specificità, e spesso stereospecificità, di substrato. Sebbene sia i canali che i trasportatori possono andare incontro a saturazione, questa è una caratteristica più comune per i trasportatori. Se alla traslocazione del soluto attraverso la membrana è accoppiato consumo di energia, allora un sistema che catalizza la diffusione facilitata può diventare un trasportatore attivo. Tale sistema è considerato come trasportatore attivo primario se, al processo, è accoppiata una fonte di energia primaria (cioè, una reazione chimica, l'assorbimento di luce, o il flusso di elettroni); viene considerato come trasportatore attivo secondario se, al processo, è accoppiata una fonte di energia secondaria, generata a spese di una fonte di energia primaria, cioè un gradiente elettrochimico di ioni, per esempio protoni o ioni sodio. I trasportatori attivi secondari possono funzionare per uniport, symport, antiport. I primi, anche noti come trasportatori di singole specie, o trasportatori di diffusione facilitata, catalizzano il trasporto di una singola specie molecolare, e il trasporto avviene indipendentemente dal movimento di altre specie molecolari. I symporter, anche chiamati cotrasportatori, catalizzano il trasporto di due o più specie molecolari nella stessa direzione. Il fatto che una singola mutazione puntiforme in un symporter possa convertire il trasportatore in un uniporter (Krupka 1994) enfatizza la distinzione superficiale fra questi due tipi di

trasportatori. I trasportatori per antiport, anche chiamati controtrasportatori, trasportatori per scambio o scambiatori, catalizzano il trasporto di una (o più) specie molecolari in scambio con un'altra. I processi di antiport possono essere suddivisi in due categorie: antiport di molecole simili e antiport di molecole del tutto diverse. Molti trasportatori per uniport e per symport catalizzano anche l'antiport soluto:soluto, talvolta a velocità che sono sostanzialmente superiori a quelle raggiunte con uniport o symport. Tra questi trasportatori alcuni catalizzano l'antiport soluto:soluto ad una velocità che supera quelle dell'uniport e del symport di tre o cinque ordini di grandezza, e l'uniport attraverso questi trasportatori ha minime o nessuna influenza fisiologica (Reithmeier 1993). Si dice che tali sistemi siano trasportatori per antiport o scambiatori obbligati. Il controtrasporto accelerato soluto:soluto è stato a lungo considerato come una caratteristica distintiva dei trasportatori. I primi studiosi di cinetica del trasporto conclusero che la sua dimostrazione escludesse la possibilità che un trasportatore funzioni attraverso un meccanismo tipo canale e suggeriva che, fra trasportatori e canali, esistono netti confini (Mawe et al 1965; Stein 1967). Successive osservazioni, sull'eventualità che certi trasportatori possano apparentemente essere convertiti in canali, in seguito a trattamento chimico (Dierks et al 1990 a, b; Brutovetsky 1994, 1996) o ad imposizione di grandi potenziali di membrana (Wallmeier et al 1992; Schwarz et al 1994), hanno condotto molti studiosi del trasporto a considerare questi confini indistinti. In realtà questi esempi rappresentano casi speciali e tendono a rinfatizzare l'importanza della distinzione dei canali dai trasportatori. Pochi trasportatori modificano i loro substrati durante il trasporto. Il sistema meglio caratterizzato è quello della fosfotransferasi batterica (PTS) che fosforila i suoi substrati utilizzando il fosfoenolpiruvato come donatore di gruppi fosfato. Gli zuccheri trasportati da questo sistema vengono pertanto rilasciati nel citosol in forma di zuccheri fosforilati. Qualsiasi

processo in cui il substrato viene modificato durante il trasporto è definito “traslocazione di gruppo”. Per quanto originariamente sia stato proposto in diverse forme da Peter Mitchell come meccanismo generale, in realtà si tratta di un evento molto limitato in natura. In accordo con il sistema di classificazione proposto, i trasportatori sono raggruppati (Saier 1999) sulla base di quattro criteri, ognuno dei quali corrisponde ad una delle quattro cifre che compongono il numero TC di un particolare trasportatore. Pertanto, un numero TC specifico per un trasportatore ha quattro componenti, come segue: W.X.Y.Z., dove W corrisponde al tipo di trasportatore e alla fonte di energia utilizzata per guidare il trasporto (se ve ne è una), X specifica la famiglia (o subfamiglia) di trasportatori, Y rappresenta il gruppo o subfamiglia filogenetica all'interno di una famiglia (o la famiglia in una superfamiglia) cui appartiene un particolare trasportatore, e Z delinea il substrato (i) trasportato oltre alla polarità del trasporto (cis o trans). A due proteine di trasporto qualsiasi appartenenti alla stessa subfamiglia di permeasi, che trasportano il medesimo substrato con uguale meccanismo, viene dato lo stesso numero TC, senza considerare se siano ortologhe (cioè, se sono prodotte da organismi distinti per mezzo della speciazione) o paraloghe (cioè, prodotte all'interno di uno stesso organismo per mezzo della duplicazione genica). La modalità della regolazione non è correlata alla filogenicità e, probabilmente, fu associata ai trasportatori in una fase tardiva del processo di evoluzione. La regolazione non è quindi utilizzata come parametro per la classificazione. Ad omologhi sequenziati di funzione ignota non viene normalmente assegnato un numero TC; fra questi sono inclusi anche trasportatori caratterizzati funzionalmente per i quali non sono disponibili dati di sequenza. Dovrebbe essere noto che ogni categoria di trasportatori è contraddistinta da un numero TC ad una cifra (W), ogni famiglia (o superfamiglia) da un numero TC a due cifre (W.X), ogni gruppo o subfamiglia filogenetica da un numero

TC a tre cifre (W.X.Y.) e ogni tipo di permeasi da un numero TC a quattro cifre (W.X.Y.Z). Attualmente si conoscono tredici categorie principali di trasportatori:

1. Trasportatori tipo canale. Le proteine appartenenti a questa categoria sono canali transmembrana di solito costituiti da α eliche che si estendono attraverso la membrana. I sistemi di trasporto di questo tipo catalizzano la diffusione facilitata (attraverso un processo indipendente dall'energia), consentendo il passaggio di substrato attraverso un poro transmembrana, o canale, senza evidenza di un meccanismo mediato da carrier. Le proteine canale tipo porina, presente nella membrana mitocondriale esterna, sono escluse da questa categoria e sono state collocate nella loro categoria (categoria 9). Poiché è stata risolta la struttura tridimensionale di molti peptidi e proteine che formano canali, la base strutturale della formazione del canale è ben nota.

2. Trasportatori tipo carrier o permeasi. Sono inclusi in questa categoria i sistemi di trasporto che utilizzano un processo mediato da carrier per catalizzare l'uniport (una singola specie viene trasportata per diffusione facilitata in un processo non accoppiato all'utilizzazione di una fonte primaria di energia), l'antiport (due o più specie vengono trasportate in direzioni opposte in un processo strettamente accoppiato, non direttamente legato ad una forma di energia diversa dall'energia chemiosmotica), e/o il symport (due o più specie sono trasportate insieme nella stessa direzione in un processo strettamente accoppiato, non direttamente legato ad una forma di energia diversa dall'energia chemiosmotica). Dati strutturali tridimensionali sono disponibili soltanto per tre di questi trasportatori; la lac permeasi (Abramson et al 2003), il trasportatore del glicerolo 3-P (Huang et al 2003), la traslocasi degli adenin nucleotidi mitocondriale (Pebay-Peyroula et al 2003).

3. Sistemi di trasporto attivo guidato dall'idrolisi (solitamente nell'ATP) del legame del pirofosfato. Sono inclusi in questa categoria i trasportatori che idrolizzano il legame

terminale del pirofosfato nell'ATP, in un altro nucleoside trifosfato, o nel pirofosfato stesso per guidare l'ingresso attivo e/o l'estrusione di un soluto o di più soluti. La proteina di trasporto può o meno essere fosforilata in maniera transitoria, ma il substrato non è fosforilato.

4. Sistemi di trasporto PEP dipendenti. Sono inclusi in questa categoria alcuni sistemi di fosfotransferasi di zuccheri. Il prodotto della reazione è uno zucchero fosforilato citoplasmatico, derivante da uno zucchero extracellulare.

5. Sistemi di trasporto attivo dipendente da acidi carbossilici, guidato dalla decarbossilazione. Sono inclusi in questa categoria i sistemi di trasporto batterici che guidano l'ingresso del soluto (ad es. ioni sodio) o l'estrusione attraverso la decarbossilazione di un substrato citoplasmatico.

6. Sistemi di trasporto attivo guidato da ossidoriduzioni (pompe). Sono inclusi in questa categoria i sistemi di trasporto che guidano il trasporto di un soluto (ad es. uno ione) energizzato dal flusso di elettroni provenienti da un substrato o proteina ridotta, ad un substrato o proteina ossidata. Dati strutturali tridimensionali, disponibili per 3 di questi complessi enzimatici, hanno consentito la comprensione della struttura di queste pompe di protoni e di ioni sodio.

7. Sistemi di trasporto attivo guidato dalla luce. Sono inclusi in questa categoria i sistemi di trasporto che utilizzano l'energia della luce per guidare il trasporto di un soluto (ad es. uno ione).

8. Sistemi di trasporto attivo guidato meccanicamente. Sono inclusi in questa categoria i sistemi di trasporto che guidano direttamente il movimento di una cellula, organello, o altra struttura fisica, consentendo il flusso di ioni (o di altri soluti) attraverso la membrana secondo i loro gradienti elettrochimici.

9. Facilitatori tipo canale della membrana esterna (porine). Le proteine di questa categoria sono costituite da foglietti β transmembrana che formano barili β attraverso i quali passano i soluti. Sono stati trovati nelle membrane esterne di batteri gram-negativi, mitocondri e plastidi eucariotici. Le porine rappresentano uno specifico tipo strutturale di proteina canale e, a causa del largo numero di famiglie tipo porina, essi sono stati assegnati ad un gruppo della classificazione TC distinto dalle altre proteine canale.

10. Sistemi di trasporto attivo guidato da metiltransferasi. Sono inclusi in questa categoria i sistemi di trasporto che utilizzano il trasferimento di metili per guidare il trasporto. Una sola proteina è stata ben caratterizzata, la metiltetraidrometanopterina, che trasporta il sodio.

11. Le proteine di trasporto ausiliarie. Sono incluse in questa categoria le proteine che funzionano con, o sono complessate a, proteine di trasporto note. Un esempio è dato dalle proteine di fusione di membrana che facilitano il trasporto, attraverso le due membrane dell'involucro cellulare dei batteri gram-negativi, in un singolo stadio guidato dalla fonte di energia (ATP) utilizzata da un trasportatore di membrana citoplasmatica. Le proteine regolatrici, o accoppiate ad energia, che non partecipano effettivamente al trasporto, rappresentano altri possibili esempi. In alcuni casi proteine ausiliarie sono considerate parte del sistema di trasporto con cui funzionano.

12. I trasportatori di classificazione ignota. Sono permeasi che fanno parte di famiglie con modalità di trasporto o di meccanismo di accoppiamento all'energia ignoto; ma almeno un membro di ognuna di queste famiglie, funziona come trasportatore. Queste famiglie saranno classificate altrove quando il processo di trasporto e il meccanismo accoppiato all'energia saranno caratterizzati.

13. Probabili trasportatori fra i quali nessun membro appartenente alla famiglia è stato dimostrato essere un trasportatore. Probabili famiglie di proteine di trasporto sono raggruppate in questa classe e saranno classificate altrove quando la funzione del trasporto di un membro verrà dimostrata, o saranno eliminate dal sistema di classificazione TC se la funzione di trasporto proposta non sarà provata. Queste famiglie includono un membro o membri per i quali è stata ipotizzata una funzione di trasporto, ma la dimostrazione di tale funzione non è ancora definitiva. Alcune di queste famiglie sono grandi superfamiglie con centinaia di membri attualmente sequenziati, ad es. la superfamiglia maggiore di facilitatori (MFS); TC No 2.1 (Pao et al 1998) e la superfamiglia ATP binding cassette (ABC); TC No 3.1 (Saurin et al 1999). Altre sono piccole famiglie con soltanto uno o due membri attualmente sequenziati.

1.5 Approccio biochimico nello studio dei sistemi di trasporto

Questo lavoro di tesi ha affrontato alcuni aspetti importanti nello studio dei sistemi di trasporto di membrana. Partendo da un metodo precedentemente utilizzato per sistemi di trasporto mitocondriali e di microsomi (Kramer et al 1986; Palmieri et al 1995, 2000, 2004; Fiermonte et al 2001, 2002; Picault et al 2002; Marrobbio et al 2002; Indiveri et al 1991a, b, 1998; Tonazzi et al 2006), e per due traslocasi di membrana plasmatica, quella per la carnitina, OCTN2, e quella per la glutammina, ASCT2 (Pochini et al 2004; Oppedisano et al 2004, 2007), abbiamo ottimizzato una metodica di ricostituzione nei liposomi per un'altra traslocasi della glutammina di membrana plasmatica, B⁰AT1. Il metodo si è rivelato molto efficace per gli studi funzionali della proteina e presenta buoni presupposti per poter essere applicato, con opportune modifiche, anche ad altri sistemi di membrana plasmatica estratti dalle membrane o over-espressi con tecniche di ingegneria molecolare, ancora non ben caratterizzati o di funzione ignota. Tale

procedura sperimentale consentirebbe di approfondire e chiarire molti aspetti ancora discordanti o non noti dei sistemi di trasporto di membrana plasmatica, compreso le alterazioni funzionali che causano patologie.

1.5.1 *La glutammina e la membrana plasmatica*

Il trasporto di amminoacidi attraverso la membrana plasmatica di cellule di mammifero è mediato da sistemi di trasporto che operano con differenti meccanismi e mostrano specificità variabile verso gli amminoacidi. Questa eterogeneità permette a tutti gli amminoacidi di essere traslocati (Palacin et al 1998; Broer 2002, 2008; Mackenzie et al 2004; Kanai et al 2004; Verrey et al 2005). Fra i numerosi sistemi di trasporto di membrana plasmatica per amminoacidi, ve ne è un gruppo ristretto i cui membri condividono la specificità per la glutammina ma hanno differente selettività verso gli altri amminoacidi e differenti meccanismi di trasporto (Bode 2001; McGivan et al 2007). Questi trasportatori sono responsabili dei processi di assorbimento, di riassorbimento (dal lume intestinale e renale) e di distribuzione di glutammina nei diversi tessuti. Negli ultimi dieci anni sono stati identificati diversi geni che codificano per sistemi di trasporto specifici per la glutammina; questi sistemi sono stati successivamente caratterizzati in cellule in cui sono stati over-espressi (Utsunomiya-Tate et al 1996; Torres-Zamorano et al 1998; Broer et al 1999, 2000; Pollard et al 2002; Dolinska et al 2003, 2004). Sulla base di aspetti strutturali è possibile suddividere questi trasportatori in diverse famiglie: i trasportatori sodio dipendenti, che richiedono il gradiente di Na^+ come fonte di energia per il trasporto di amminoacidi (sistemi ASCT2/ATB^o, N, B^{o+}, A e y^L); i trasportatori sodio indipendenti, che usano il gradiente di concentrazione dell'amminoacido per far avvenire il trasporto (Sistemi L e b^{o+}). Fra i trasportatori sodio dipendenti un ulteriore aspetto distintivo è rappresentato

dall'alta (N e y^+L) o bassa (ASCT2) tolleranza nei confronti della sostituzione del sodio con il litio. In generale, tali trasportatori sono caratterizzati da una diversa specificità per gli amminoacidi e una diversa sensibilità per gli inibitori; ad esempio, l'analogo degli amminoacidi MeAIB (acido α -(metilammino) isobutirrico) viene utilizzato per identificare la funzione del Sistema A (Palacin et al 1998; Bode 2001; Broer 2002; Mackenzie et al 2004; Kanai et al 2004). Recentemente è stato identificato un altro trasportatore di amminoacidi sodio-dipendente che è anche specifico per la glutammina: B⁰AT1 (Broer et al 2004). Questo sistema di trasporto, che appartiene alla famiglia di trasportatori SLC6, è altamente espresso nel rene di topo ed è specifico per tutti gli amminoacidi neutri, che sono cotrasportati con il sodio (Broer et al 2004; Bohmer et al 2005; Camargo et al 2005; O'Mara et al 2006; Romeo et al 2006; Broer 2006). B⁰AT1 corrisponde al sistema di trasporto, precedentemente trovato nelle cellule epiteliali renali bovine, chiamato B⁰ (Doyle et al 1992). Mutazioni del gene di B⁰AT1 (SLC6A19) causano la malattia di Hartnup (Kleta et al 2004; Seow et al 2004). Nonostante la grande quantità di dati provenienti dagli studi sui trasportatori della glutammina, diversi aspetti della funzione e della regolazione del trasportatore di glutammina sono ancora poco chiari o ignoti: fra questi le Km interne, la direzionalità del trasporto, il meccanismo cinetico del trasporto, l'importanza di particolari gruppi funzionali della proteina di trasporto, per esempio i gruppi SH delle cisteine, la regolazione.

1.5.1.1 I sistemi di trasporto della glutammina di membrana plasmatica

La glutammina rappresenta l'amminoacido più abbondante nel sangue dei mammiferi; allo stesso tempo, essa mostra una velocità di turnover cellulare estremamente rapida (e particolarmente accentuata in particolari stati catabolici). Ciò dipende dal fatto che la

glutammina svolge un ruolo pleiotropico estremamente importante per il metabolismo e l'omeostasi dei tessuti. Essa viene, infatti, utilizzata come precursore metabolico essenziale per la biosintesi dei nucleotidi, del glucosio e degli amminozuccheri, per l'omeostasi del glutatione e la sintesi delle proteine. In più, la crescita e la proliferazione di cellule come fibroblasti, linfociti ed enterociti dipende fortemente dalla glutammina come sorgente di energia ossidativa. Partecipa, inoltre, al ciclo glutammina-glutammato che avviene tra i neuroni e le cellule gliali nel cervello, e tra la placenta ed il fegato durante lo sviluppo del feto. Nel rene, l'ammoniaca prodotta dalla conversione della glutammina a glutammato, promuove l'escrezione acida. Sebbene molti testi la classifichino come un amminoacido non essenziale, la glutammina è attualmente considerata "condizionatamente essenziale" perchè, in condizioni patologiche, la domanda fisiologica supera la capacità delle cellule di produrla per via endogena.

Infine, essa rappresenta il principale shuttle interorgani dell'ammoniaca. Di conseguenza, la presenza, a livello della membrana plasmatica, di sistemi di trasporto che possano mediare il suo ingresso nella cellula, rappresenta una condizione indispensabile per la sopravvivenza stessa degli organismi. Negli ultimi anni, lo screening di librerie di cDNA sia di uomo che di mouse, ha portato all'isolamento di vari geni che codificano per queste proteine di trasporto.

I trasportatori della glutammina sono stati suddivisi in due categorie: quelli sodio-dipendenti (sistemi ASC/B⁰, N, A, B^{0,+}, y^{+L}) e quelli sodio-indipendenti (sistemi L, b^{0,+} ed n). I primi sfruttano il gradiente elettrochimico del sodio, mantenuto a livello della membrana plasmatica grazie all'azione della Na⁺/K⁺ ATPasi, per permettere l'ingresso di amminoacidi nella cellula, contro il loro gradiente di concentrazione. I secondi, invece, facilitano il movimento selettivo di amminoacidi attraverso la membrana, indipendentemente dal sodio. Queste traslocasi mediano il movimento di altri

amminoacidi oltre alla glutammina e molte di esse presentano specificità sovrapponibile. Il sistema ASC è stato così denominato per tre dei suoi substrati preferiti (alanina, serina e cisteina), e per distinguerlo dal sistema A. Un sistema con attività di trasporto simile ad esso, formalmente noto come “neutral brush border”, era stato precedentemente descritto nell'epitelio intestinale e renale; questo sistema è stato chiamato B^0 , per distinguerlo da $B^{0,+}$, un trasportatore, ritrovato per la prima volta in blastocisti di topo, che mostra un'identica selettività per gli amminoacidi zwitterionici, ma che trasporta anche amminoacidi cationici in maniera sodio-dipendente. Si pensa che questo sistema di trasporto “apicale”, giochi il ruolo principale nel riassorbimento degli amminoacidi zwitterionici nel rene e nell'intestino piccolo. I sistemi ASCT2 (un'isoforma del sistema ASC) ed ATB^0 , presentano caratteristiche cinetiche e specificità di substrato quasi identiche. Le sequenze amminoacidiche dedotte per ASCT2 del topo (553 aa) e per ATB^0 dell'uomo ($hATB^0$) (541 aa), sono estremamente simili (85%), con il 79% degli amminoacidi identici. Questi studi hanno portato a concludere che ASCT2 ed ATB^0 rappresentano isoforme ortologhe in specie diverse, e non sistemi di trasporto distinti. Molto probabilmente ASCT2 è la controparte murina del sistema ATB^0 umano. Entrambi trasportano glutammina con alta affinità; tuttavia il valore di K_m per la glutammina varia da circa 23 μM a circa 250 μM , a seconda del tessuto analizzato. Il perchè di questo ampio range probabilmente risiede in quei fattori che influenzano le misure di affinità per la glutammina, come ad esempio i livelli di substrato intracellulare ed il potenziale elettrico transmembrana.

L'isoforma ASCT1, invece, non trasporta nè glutammina, nè asparagina. Recentemente è stato dimostrato che sia ASCT1 che ASCT2 sono recettori di retrovirus; essi sono costituiti da 8-10 domini transmembrana, una lunga estremità carbossi-terminale idrofobica, ed un presunto sito intracellulare di fosforilazione per la proteina chinasi C.

Le analisi di Northern blot hanno dimostrato che il sistema ATB⁰ umano è presente nei tessuti epiteliali (a livello della placenta, del polmone, del rene e del pancreas), molto poco nel muscolo scheletrico; esso è inoltre espresso in diverse linee tumorali (Bode 2001; Wasa et al 2002), e a livello dei brush-border delle cellule intestinali e renali. Nel ratto è invece presente a livello delle cellule endoteliali del fegato, ma non negli epatociti, i quali utilizzano il sistema N per promuovere l'ingresso di glutammina. E' stata, inoltre, riscontrata la sua presenza a livello di una linea di cellule epiteliali renali bovine, sia in corrispondenza della membrana apicale, che di quella basolaterale (Doyle et al 1992), nonché a livello dei brush-border delle cellule del tubulo prossimale del rene e degli enterociti nel coniglio (Avisar et al 2001).

Studi nel ratto indicano che ASCT2/ATB⁰ è espresso nelle cellule gliali, ma non nei neuroni, esso potrebbe partecipare al ciclo glutammina-glutammato, mediando il rilascio di glutammina. E' stato anche proposto che *hATB⁰* giochi un ruolo nel mediare il rilascio di glutammina da parte della placenta, in virtù della sua espressione a livello della membrana basolaterale del sinciziotrofoblasto. Grazie a questa sua capacità, esso potrebbe aiutare a guidare lo scambio glutammina-glutammato tra il fegato fetale e la placenta durante lo sviluppo del feto. Gli studi su *hATB⁰* potranno essere di grande interesse per comprendere la biologia del tumore data la sua espressione, apparentemente ubiquitaria, nelle cellule di natura tumorale, il suo presunto ruolo nella trasformazione epatocellulare nell'uomo, e la sua utilità nel mediare la crescita glutammina-dipendente. Le cellule cancerose, infatti, come tutte le cellule, hanno bisogno di azoto per la biosintesi dei nucleotidi, del glutatione, degli ammino-zuccheri e delle proteine. Nel caso delle cellule tumorali, inoltre, lo scheletro carbonioso degli amminoacidi fornisce, insieme al glucosio ed agli acidi grassi, il substrato metabolico per la sintesi di ATP, colesterolo e lipidi. Gli amminoacidi, inoltre, intervengono nella

regolazione della crescita cellulare; non sorprende, quindi, che le cellule tumorali overesprimano, sulla loro membrana plasmatica, trasportatori di amminoacidi, quali ASCT2 e LAT1, soprattutto nella prima fase avascolare di crescita del tumore solido (Fuchs et al 2005).

Il sistema N è stato descritto per la prima volta negli epatociti del ratto, e qualche anno dopo, un'attività analoga è stata riscontrata anche a livello del muscolo scheletrico (N^m) e del cervello (N^b). Negli studi di espressione del trasportatore umano (*hSN1*), i valori di Km per la glutammina variano da 0.7 a 1.5 mM, in accordo con i valori riportati per gli epatociti umani. Il sistema N dunque trasporta glutammina con un'affinità minore rispetto al sistema ATB⁰. Tuttavia, per entrambi i sistemi, l'affinità nei confronti del substrato dipende dal potenziale di membrana. Nel fegato, il sistema N è localizzato preferenzialmente a livello degli epatociti perivenosi, ma è espresso anche dagli epatociti periportal. Esso rappresenterebbe dunque il sistema implicato nella ciclizzazione intercellulare della glutammina. Nel cervello invece, SN1 è presente sulla membrana degli astrociti, ma non su quella dei neuroni; ciò suggerisce un ruolo primario nel mediare l'efflusso di glutammina richiesto dal ciclo glutammina-glutammato. Recentemente la proteina SN1 è stata ritrovata anche a livello delle vescicole di membrana apicale e di membrana basale delle cellule renali, in ratti acidotici (Karinch et al 2002). Dal recente isolamento di SN1 è emerso un dato sorprendente, vale a dire, la sua dimostrata abilità nel mediare sia l'ingresso che il rilascio di glutammina. Questo duplice ruolo era già stato proposto circa quindici anni fa, ma contraddiceva il paradigma secondo il quale i trasportatori sodio-dipendenti possono facilitare solo l'ingresso di amminoacidi, dato il loro intimo legame con il gradiente elettrochimico del sodio. E' adesso evidente che molte forze guidano la direzione del movimento della glutammina e che il gradiente del sodio rappresenta solo

una delle tante. Ad esempio, il trasporto dipende fortemente dal potenziale elettrico di membrana, tanto che una progressiva depolarizzazione della membrana entro un range fisiologico per gli epatociti (da -20 a -30 mV) determina uno switch dall'ingresso, al rilascio di glutammina. Il gradiente di glutammina, influenza altresì la direzione del trasporto; è stato, infatti, osservato l'ingresso ad una concentrazione extracellulare maggiore di 400 μM , e il rilascio a concentrazioni più basse di questo valore. È importante sottolineare il fatto che tutti questi cambiamenti sulle forze che guidano il trasporto avvengono entro un range fisiologico, con ovvie implicazioni sull'omeostasi della glutammina. Il sistema A trasporta preferenzialmente alanina, ma riconosce anche altri amminoacidi con catena laterale corta, polare o lineare, fra cui la glutammina. Analogamente al sistema N, esso è particolarmente sensibile all'inibizione da basso pH. Questo suggerisce che le due proteine, pur differenziandosi nel meccanismo di trasporto, possono mostrare una sequenza molto simile. Effettivamente è stata predetta una sequenza per il sistema A del cervello del ratto, che presenta il 65% di omologia ed il 55% di identità con il sistema N del ratto. Come per SN1, questa sequenza predice undici domini transmembrana, con l'estremità N-terminale rivolta verso il lato citoplasmatico. Esistono tre isoforme del sistema: l'isoforma SA1 (detta anche SAT2 o ATA2) è espressa ubiquitariamente e riconosce, oltre alla glutammina, altri amminoacidi neutri con uguale o migliore affinità. L'isoforma ATA3 (o SAT3) è presente a livello epatico, ma trasporta poco la glutammina. Infine l'isoforma SA2 (o SAT1, GlnT, ATA1) è espressa quasi esclusivamente nel cervello (in particolare dai neuroni) e riconosce preferenzialmente la glutammina e l'asparagina come substrati. Essa media l'ingresso di glutammina nei neuroni, richiesto dal ciclo glutammina glutammato. Il ruolo del sistema $\text{ATB}^{0,+}$ nel mediare l'ingresso di glutammina nelle cellule dei mammiferi è piuttosto limitato. Il cDNA isolato dalla ghiandola mammaria

umana, codifica per una proteina di 642 amminoacidi, con 12 presunti domini transmembrana, un presunto sito di glicosilazione e due siti di fosforilazione per la proteina chinasi C. Questo sistema appartiene ad una famiglia di trasportatori di neurotrasmettitori Na^+/Cl^- dipendenti, di cui fanno parte anche i sistemi hGLYT1 e hGLYT2 per la glicina, ed il sistema hPROT per la prolina.

Il sistema y^+L è stato descritto per la prima volta a livello della membrana plasmatica di eritrociti umani. Esso media con alta affinità l'ingresso di amminoacidi cationici in una maniera sodio-indipendente, mentre richiede sodio per trasportare efficientemente gli amminoacidi zwitterionici come la glutammina. Si pensa che questo sistema media l'estrusione basolaterale di amminoacidi dibasici nell'epitelio intestinale e renale. Non è stata determinata la costante cinetica per l'ingresso di glutammina tramite questo sistema; comunque l'affinità per altri amminoacidi zwitterionici, come la leucina, è nel range micromolare (16 μM). Esso è inoltre l'unico trasportatore, oltre ad SN1, capace di catalizzare il trasporto in presenza di un gradiente di litio, al posto di quello del sodio. Il sistema è molto presente a livello del rene, e sulla base di studi sul topo, potrebbe essere molto abbondante nella zona corticale di questo organo. E' inoltre espresso dai leucociti del sangue periferico, dal polmone, dalla placenta, dalla milza e dall'intestino.

Fra i sistemi che promuovono il trasporto di glutammina senza il coinvolgimento del gradiente del sodio, quello meglio conosciuto è il sistema L. Studi recenti hanno suggerito che il sistema L è un eterodimero composto da una catena pesante e da una catena leggera. Sebbene sia molto diffuso, esso contribuisce molto poco al trasporto di glutammina nelle cellule. L'isoforma codificata dal gene hLAT1 mostra una preferenza per gli amminoacidi con catena laterale ramificata ed idrofobica, mentre quella codificata da hLAT2 dimostra un'affinità maggiore per piccoli amminoacidi zwitterionici, come alanina, serina e treonina. Esperimenti sul sistema umano e del

roduttore hanno dimostrato che la glutammina è trasportata in maniera molto più efficiente da LAT2 che da LAT1, con un valore di Km 151 μ M, 275 μ M e 316 μ M, a seconda che il sistema sia, rispettivamente, del ratto, del topo o del coniglio. Entrambe le isoforme funzionano come scambiatori di amminoacidi.

Infine il sistema $b^{0,+}$, media l'ingresso sia di amminoacidi cationici che zwitterionici. A differenza del sistema $B^{0,+}$, descritto precedentemente, questo trasportatore è sodio-indipendente ed è un trasportatore della glutammina piuttosto debole. La sua espressione è evidente solo nel rene e nell'intestino piccolo; nel rene di ratto, sembra essere localizzato soprattutto a livello del tubulo prossimale, in particolare nella membrana apicale (Bode 2001).

Questa classificazione, basata sulla preferenza di substrato trasportato, è stata successivamente modificata, in seguito al clonaggio dei cDNA corrispondenti ai geni codificanti per queste proteine (McGivan et al 2007). Attualmente, sono quattro i sistemi di trasporto per la glutammina considerati fisiologicamente importanti:

SNAT3: è implicato nell'uptake di glutammina nelle cellule periportali del fegato, nel trasporto a livello della membrana basolaterale delle cellule dei tubuli renali e nel rilascio di glutammina dagli astrociti. Un'isoforma di questo trasportatore è stata descritta, anche, nelle cellule del muscolo scheletrico. SNAT3 corrisponde al sistema SN1, precedentemente descritto, anche se alcuni lavori ipotizzano un meccanismo non elettrogenico ma elettroneutro, con 1 ione Na^+ cotrasportato con la glutammina, in scambio con 1 ione H^+ . In condizioni di acidosi metabolica, i livelli di SNAT3 aumentano di oltre 10 volte, cosa che dimostra il suo ruolo nella regolazione del pH. Recentemente è stato clonato un altro trasportatore, SNAT5, che mostra avere caratteristiche cinetiche analoghe a SNAT3, sebbene la sua funzione fisiologica non sia particolarmente chiarita.

SNAT1: si tratta di una sottoclasse del sistema A (corrisponde al trasportatore ATA1), coinvolta nell'uptake Na^+ -dipendente ed elettrogenico (1 ione Na^+ : 1 glutammina) di glutammina nelle cellule neuronali. Correlato ad esso esiste un altro trasportatore, SNAT2 (corrispondente ad ATA2), che ha una localizzazione tissutale diversa e presenta un'affinità per la glutammina più bassa rispetto a quella di SNAT1.

ASCT2: è espresso, principalmente, nelle cellule epiteliali in crescita e nelle cellule tumorali in coltura nelle quali media l'ingresso della glutammina, essenziale per la sopravvivenza di questi tipi cellulari. È stato dimostrato che, negli epatociti normali, ASCT2 non è espresso in quanto l'uptake di glutammina è regolato dal sistema N; risulta, invece, overespresso nelle cellule cirrotiche e nelle linee di epatoma (sia adulte, che pediatriche) che, infatti, vanno incontro ad apoptosi quando viene usato un RNA antisenso per l'mRNA di ASCT2, allo scopo di impedirne la traduzione. Secondo recenti lavori, sarebbe la stessa glutammina a regolare positivamente l'espressione di ASCT2 nelle cellule tumorali (cellule HepG2) (Bungard et al 2004).

$\text{B}^0\text{AT1}$ (SLC16A19): è stato scoperto recentemente e corrisponde al sistema NBB (Neutral Brush Border). È il sistema utilizzato per il riassorbimento renale ed intestinale di amminoacidi neutri (esclusa la prolina che viene invece riassorbita dal trasportatore H^+ -dipendente PAT1, appartenente al sistema IMINO) a livello della membrana apicale. Il successivo passaggio dalla membrana basolaterale, invece, avviene attraverso i trasportatori TAT1, per gli amminoacidi neutri con catena aromatica, e LAT2-4F2hc per gli altri, esclusa la prolina che, probabilmente, arriva al sangue attraverso ASCT1 (Verrey et al 2005).

In seguito all'espressione dell'mRNA di $\text{B}^0\text{AT1}$ in oociti di *Xenopus laevis*, si è potuto registrare un flusso di corrente diretto verso l'interno degli oociti, dimostrando l'elettrogenicità del trasportatore che consente l'uptake dell'amminoacido neutro in

modo Na⁺-dipendente, senza controtrasporto di altri cationi. L'ibridazione in situ ha mostrato che B⁰AT1 è espresso, oltre che nei reni e nell'intestino, anche a livello della pelle. Questa localizzazione tissutale ha permesso di correlare la malattia di Hartnup (MIM 234500) ad alterazioni a carico del gene codificante per questo trasportatore.

1.5.1.2 B⁰AT1 e la malattia di Hartnup

Si tratta di una patologia autosomica recessiva in cui si riscontrano iperamminoaciduria ed una parziale ipersecrezione di cisteina ed amminocidi dibasici, mostrando un collegamento funzionale con il sistema b^{0,+}. La pompa Na⁺-K⁺ ATPasi sulla membrana basolaterale, infatti, genera e mantiene il gradiente elettrochimico del Na⁺ necessario sia a B⁰AT1, sulla membrana apicale, sia ai sistemi A ed ASC sulla membrana basolaterale, per il cotrasporto degli amminoacidi zwitterionici. Un ridotto funzionamento di B⁰AT1 implica un minore uptake di amminoacidi neutri e, quindi, una riduzione della possibilità di scambiare questi amminoacidi con la cisteina attraverso il sistema b^{0,+}.

I pazienti affetti dalla malattia di Hartnup mostrano, inoltre, fotosensibilità della pelle e rash (correlati alla presenza di B⁰AT1 anche sulla pelle), comportamenti psicotici e atassia.

Queste manifestazioni, tuttavia, sono molto meno intense dell'iperamminoaciduria renale. Clinicamente, infatti, si osservano livelli di gravità diversi di questa patologia legati, probabilmente, al tipo di alterazione genica, agli effetti dell'ambiente (intendendo con questo termine la dieta, ad esempio) ed ai fenomeni compensativi del ridotto assorbimento, quale, ad esempio, l'aumento del trasporto di proteine a livello intestinale.

Il gene codificante per B⁰AT1 è stato mappato nel topo sul cromosoma 13, in una regione sintenica corrispondente alla banda citogenetica 5p15 nell'uomo (Palacin et al 2005).

1.5.1.3 B⁰AT1 e la famiglia SLC6

La famiglia SLC6 (Solute Carrier Family 6) appartiene ad una superfamiglia di trasportatori Na⁺-dipendenti definita NAT, della quale fanno parte trasportatori ritrovati in batteri, insetti ed in organismi eucariotici sia primitivi che superiori. Pare che, inizialmente, questa famiglia si sia evoluta allo scopo di consentire l'uptake di nutrienti ed amminoacidi in organismi unicellulari e pluricellulari; la capacità di trasportare anche neurotrasmettitori, invece, si è evoluta in epoca successiva.

La famiglia SLC è una delle più grandi e nell'uomo comprende circa 20 membri, raggruppati in 4 sottofamiglie: trasportatori delle monoammine, trasportatori del GABA, trasportatori di amminoacidi e trasportatori orfani, così denominati perchè finora non si conosceva il substrato trasportato. L'allineamento di B⁰AT1 con tutti i membri della famiglia SLC6 ha rivelato che, insieme a XT2 (che probabilmente trasporta glicina) e XT3, esso appartiene alla sottofamiglia dei trasportatori orfani, pertanto anche i "trasportatori orfani" possono essere identificati come trasportatori di amminoacidi. B⁰AT1 mostra il 51% di identità con XT2 ed il 43% con XT3, mentre con gli altri membri di SLC6 solo il 21%. L'analisi del profilo idropatico ed il modello topologico indicano la presenza di 12 presunti domini transmembrana, con un grosso loop tra il settimo e l'ottavo dominio.

Recentemente la risoluzione della struttura del trasportatore per la leucina (LeuT_{Aa}) del batterio *Aquifex aeolicus* ha permesso di effettuare allineamenti con B⁰AT1 e B⁰AT2. Tali allineamenti hanno mostrato una buona omologia, soprattutto a livello delle eliche

1, 6 e 8, mentre non è stato possibile effettuare homology modeling per quanto riguarda il loop tra le eliche 7 e 8, perchè i dati cristallografici del trasportatore batterico non danno informazioni riguardo questa regione. La regione compresa tra le eliche 1 e 6 è risultata essere quella responsabile della formazione del sito di legame per il Na⁺. Nella struttura di LeuT_{Aa} il gruppo carbossilico della leucina contribuisce alla coordinazione dello ione Na⁺, perciò esiste una sovrapposizione tra i siti di legame per substrato e cosubstrato. Questo potrebbe spiegare la reciproca influenza delle concentrazioni di ioni Na⁺ e leucina nella valutazione delle Km.

Per quanto riguarda la specificità per i substrati, inizialmente è stato dimostrato che B⁰AT1 è un uniport di L-leucina, Na⁺-dipendente e Cl⁻-indipendente. La sostituzione del Na⁺ con altri cationi, come NMDG (N-metil-D-glucammina) e Li⁺, non riesce ad evocare un'attività di trasporto misurabile.

Sono stati condotti, successivamente, esperimenti di flusso, sempre in oociti di *X. laevis*, ottenendo il seguente ordine di preferenza:
Met=Leu=Ile=Val>Gln=Asn=Phe=Cys=Ala>Ser=Gly=Tyr=Thr=His=Pro>Trp>Lys.

Glutammato ed arginina, invece, non si sono dimostrati inibitori del trasporto della leucina, confermando che non vengono trasportati da B⁰AT1.

La stechiometria del trasporto è di uno ione Na⁺ cotrasportato con un amminoacido, come dimostra la dipendenza iperbolica dalla concentrazione di Na⁺ esterna; la variazione della concentrazione interna di Na⁺, invece, non pare avere alcun effetto sull'attività di trasporto. È stato, inoltre, dimostrato che l'uptake degli amminoacidi zwitterionici dipende dal potenziale di membrana; l'iperpolarizzazione della membrana cellulare, difatti, aumenta l'uptake di leucina all'interno degli oociti. Alcuni studi, infine, hanno posto l'attenzione sulla dipendenza dell'attività di trasporto dalla concentrazione di ioni H⁺ presenti all'esterno delle cellule in coltura, osservando una

diminuzione dell'uptake di leucina al diminuire del valore di pH del mezzo esterno e viceversa. Si pensa che l'effetto degli ioni H^+ sia quello di una modificazione del trasportatore, nella sua porzione extracellulare, e non di una sua implicazione nel meccanismo di trasporto.

Per quanto concerne la cinetica del trasporto, è stato osservato che B^0AT1 non mostra trans-stimolazione e che le K_m dei due substrati si influenzano reciprocamente. La V_{max} , invece, risulta essere indipendente dalla concentrazione degli ioni Na^+ , cosa che suggerisce un meccanismo simultaneo di tipo ordinato. Quest'ultima affermazione, tuttavia, non sembra verificata a basse concentrazioni di ioni Na^+ . Esistono, quindi, conclusioni contrastanti in merito al meccanismo: secondo alcuni studi, B^0AT1 funziona con un meccanismo di tipo simultaneo ordinato, legando prima l'amminoacido e poi il Na^+ ; la velocità massima del trasporto, quindi, risulta indipendente dalla concentrazione dell'amminoacido, quando la concentrazione di Na^+ è saturante. Altri risultati mostrano, invece, un meccanismo simultaneo random, con una preferenza di legame dell'amminoacido prima del Na^+ .

Oltre a B^0AT1 è stato isolato un altro membro della sottofamiglia dei trasportatori orfani, denominato prima $v7-3$ e poi B^0AT2 a causa delle sue caratteristiche funzionali molto simili a quelle di B^0AT1 . B^0AT2 come B^0AT1 , infatti, regola il cotrasporto di uno ione Na^+ ed un amminoacido in modo Cl^- -indipendente ed elettrogenico. I protoni, inoltre, causerebbero modificazioni conformazionali nella porzione extracellulare del trasportatore, con una diminuzione dell'attività di trasporto al diminuire del pH.

La differenza con B^0AT1 riguarda la specificità dei substrati; l'amminoacido trasportato con maggiore affinità, infatti, risulta essere la prolina, con il seguente ordine di preferenza per gli altri amminoacidi zwitterionici: $Pro > Leu = Met = Ala = Val \geq Ile > The > Asn = Ser > Phe > Gln$. Analisi di RT-PCR mostrano, nel topo, una distribuzione

tissutale ristretta esclusivamente a cervello, polmoni e reni. Il ruolo fisiologico di B⁰AT2, comunque, resta da chiarire definitivamente, sebbene sembra essere molto plausibile una sua implicazione nel trasporto dei neurotrasmettitori nei neuroni (Broer et al 2004, 2006; Bohmer et al 2005; O'Mara et al 2006; Utsunomiya-Tate et al 1996).

2. MATERIALI E METODI

2.1 Preparazione di vescicole di membrana di brush-border di rene di ratto

Le membrane di brush border sono state preparate a partire da reni di ratto, come descritto da Biber et al (1981). Da cinque ratti sacrificati, si prelevano i reni, incidendo la pelliccia degli animali con un taglio a “V” con le forbici. Da ciascun rene, con l’ausilio di un bisturi, si tagliano delle fettine corrispondenti alla zona corticale; da ogni rene si ottiene circa un grammo di materiale. I dieci grammi di fettine di corteccia ottenuti vengono trattati con una soluzione isotonica di saccarosio 0.3 M, Tris/HCl 12 mM (pH 7.4) ed EGTA 5mM, alla temperatura di circa 0°C. Il saccarosio è necessario per evitare che ci sia uno sbilanciamento di pressione osmotica e quindi la lisi delle vescicole di membrana plasmatica per ingresso di acqua, il Tris/HCl pH 7.4 consente di mantenere il pH fisiologico (valore di pH al quale è mantenuta la funzionalità e lo stato nativo delle proteine) e, infine, l’EGTA agisce da chelante di ioni. Il tessuto viene triturato con le forbici e lavato con la stessa soluzione di saccarosio, in modo da eliminare la maggior quantità possibile di sangue presente. Vengono quindi aggiunti 60 ml della soluzione di saccarosio diluita 1:5, e il tutto viene frullato per tre minuti alla velocità di 18000 r.p.m.. Il frullatore è costituito da lame d’acciaio inclinate con diversi angoli, per permettere la massima efficienza di mescolamento del campione; tali lame agiscono all’interno di un contenitore in vetro, le cui pareti incavate assicurano la massima turbolenza della sospensione. All’omogenato, così ottenuto, si aggiunge una soluzione di MgCl₂ 12 mM. Si mescola la sospensione con una bacchetta di vetro e si lascia a riposo per quindici minuti in un bagno di acqua e ghiaccio a 4°C. La funzione del MgCl₂ è quella di far precipitare i mitocondri ed i nuclei. Trascorsi i quindici minuti, l’omogenato viene suddiviso equamente in provettoni da centrifuga e sottoposto ad un

campo centrifugo corrispondente a 1600 x g (centrifuga eppendorf 5810R; rotore F 34-6-38). Questo metodo di centrifugazione differenziale si basa sulla differente velocità di sedimentazione di particelle con diversa forma e densità, perciò l'omogenato di tessuto, che deve essere suddiviso nelle sue varie componenti, viene separato in un certo numero di frazioni per centrifugazioni successive, aumentando gradualmente il campo centrifugo applicato. Per ogni passaggio, il valore di campo centrifugo applicato viene scelto in modo da generare, nel tempo predeterminato, la sedimentazione di un particolare componente della miscela. Il sedimento ottenuto da questa prima centrifugazione contiene globuli rossi, cellule intatte, nuclei, frammenti di membrana cellulare e strutture pesanti delle cellule; viceversa le particelle più leggere, tra cui le vescicole di membrana di brush-border, vengono mantenute in sospensione, cioè nel sovrantante. Questo viene versato in provettoni e sottoposto ad un campo centrifugo corrispondente a 20.000 x g per trenta minuti. Il sovrantante ottenuto da questa nuova centrifugazione viene scartato, in quanto contenente i vari organelli, mentre il sedimento è ripreso con 30 ml del tampone di saccarosio diluito 1:2. La sospensione viene omogeneizzata utilizzando un pestello in teflon ad estremità arrotondata del diametro di 2.5 cm, mosso a mano all'interno di un tubo di vetro della stessa dimensione e forma del pestello (potter). Il tessuto è forzato a passare tra le pareti del tubo di vetro che viene mantenuto fermo, ed il pistone mobile ruota. Lo spazio libero tra il pestello e la parete del tubo è mantenuto entro dimensioni precise, di solito comprese fra 0.05 mm e 0.5 mm. Il tubo di vetro è tenuto immerso in ghiaccio durante il processo di omogeneizzazione, in modo da limitare l'innalzamento della temperatura e, quindi, evitare la denaturazione delle proteine. All'omogenato ottenuto si aggiunge la soluzione di MgCl₂ 12 mM e si lascia a riposo per quindici minuti. Trascorso questo lasso di tempo, ha inizio il lavaggio, vale a dire che il solubilizzato viene nuovamente suddiviso

in tubi da centrifuga e sottoposto ad un campo centrifugo corrispondente a 1600 x g, per quindici minuti. Questa volta si recupera il sovrantante, che viene ulteriormente sottoposto ad un campo centrifugo pari a 20.000 x g, per trenta minuti. Il pellet così ottenuto viene ripreso con 30 ml della soluzione di saccarosio diluita 1:2, e sottoposto ad un nuovo ciclo di omogeneizzazione, utilizzando il potter di vetro ed il pestello. Il solubilizzato viene sottoposto ad un'ultima centrifugata a 20.000 x g, per trenta minuti. Viene recuperato il sedimento, che è ripreso con un piccolo volume della soluzione di saccarosio diluita 1:2, e suddiviso in aliquote da 50 µl in provette di tipo eppendorf. Queste preparazioni vengono conservate alla temperatura di - 20°C, anche per lunghi periodi di tempo. Tutte le operazioni devono essere effettuate alla temperatura di 4°C per evitare di compromettere la funzionalità delle proteine.

2.2 Determinazione della concentrazione delle proteine nelle preparazioni

La concentrazione delle proteine presenti nella preparazione è determinata con il metodo del Lowry (Folin-Ciocalteu). Il gruppo fenolico dei residui tirosinici di una proteina, quando reagisce con il reattivo di Folin-Ciocalteu, produce una colorazione blu porpora, con un massimo di assorbanza intorno a 660 nm. Questo reattivo è formato da una miscela di sodio tungstato, molibdato e fosfato. Questo metodo è sensibile fino a concentrazioni di 10 µg/ml ed è probabilmente il più diffuso, malgrado sia un metodo soggetto ad interferenze da parte di alcune sostanze come Tris, tamponi quali Pipes ed Hepes, ed EDTA. La reazione, inoltre, dipende dal pH ed è indispensabile operare in condizioni di pH compreso tra 10 e 10.5.

La soluzione di Lowry è costituita da una miscela contenente:

Na₂CO₃ al 2 % in NaOH 0.1 M;

Tartrato di sodio e potassio all'1 %;

CuSO₄·5H₂O allo 0.5 %;

SDS al 10 %.

Dopo diluizione di un campione della preparazione, si preparano tre prove da 5 µl, 10 µl e 40 µl. A queste prove si aggiunge H₂O fino ad un volume finale di 50 µl. Importante è anche preparare una prova di controllo in cui non sia presente la proteina, ma solo 50 µl contenenti il tampone usato per la preparazione. In questo modo sarà possibile valutare l'assorbanza di questo e quindi sottrarre questo valore all'assorbanza ottenuta dall'analisi dei singoli campioni in cui sono presenti sia proteine che tampone. Ad ogni prova si aggiunge 1 ml del reattivo di Lowry, si attende per 15 minuti e successivamente si aggiungono 100 µl del reattivo di Folin (1 Folin : 2 H₂O). Si attende per altri 30 minuti, facendo avvenire la reazione al buio, ed infine si legge l'assorbanza di ogni prova allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 578 nm. Tramite una scala di taratura si risale alla concentrazione incognita della proteina.

2.3 Solubilizzazione della traslocasi della glutammina di membrana plasmatica

Il processo che precede la ricostituzione prende il nome di solubilizzazione. La traslocasi di membrana plasmatica viene solubilizzata trattando le preparazioni di brush-border, precedentemente congelate a -80°C in aliquote da 50 µl, con 100 µl di C₁₂E₈ al 2%. Questa operazione deve essere molto rapida in modo da evitare qualsiasi processo di denaturazione. Il C₁₂E₈ è un detergente non ionico, ossia una molecola anfipatica formata, nella sua struttura lineare, da una testa polare, costituita da un polietere che prende contatto con l'ambiente idrofilo esterno, ed una coda idrofoba che interagisce con la porzione idrofoba della proteina. In questo processo di solubilizzazione, il

detergente dissolve le membrane, portando alla formazione di micelle costituite dal detergente e dalla proteina, che così viene mantenuta in soluzione nella sua conformazione nativa. Successivamente, la sospensione, dopo agitazione su vortex, viene centrifugata a 13.000 x g, per 4 min. a 4°C. Il sovratanante (estratto) viene utilizzato per la ricostituzione.

2.4 Preparazione dei liposomi

Per preparare i liposomi, 1g di fosfolipidi (Fluka), parzialmente purificati e contenenti il 60% di L- α -fosfatidilcolina, viene sospeso in 10 ml di acqua. La sospensione ottenuta viene agitata per circa 2h. Questa operazione viene effettuata all'interno della camera fredda, ad una temperatura di 4°C. Al termine della procedura, la sospensione deve risultare omogenea allo scopo di facilitare la successiva fase di ricostituzione. La sospensione può, così, essere suddivisa in aliquote di 1 ml in provette di tipo eppendorf e congelata a -20°C. La suddivisione in aliquote ed il congelamento sono necessari per evitare modifiche delle caratteristiche dei fosfolipidi. La sospensione di fosfolipidi, al momento dell'utilizzo, viene scongelata a temperatura ambiente e sonicata con un sonicatore Branson alla potenza di 40 Watt, a 0°C, per circa 2 minuti ad intervalli di 20 secondi di sonicazione e 20 secondi di pausa. La sonicazione è un processo che sfrutta gli ultrasuoni per rompere, in pochi minuti, le strutture multilamellari in cui sono associati i fosfolipidi, creando così liposomi unilamellari, cioè vescicole sferiche a doppio strato fosfolipidico con compartimento acquoso separato dall'ambiente esterno. Il processo sprigiona calore, per cui, per evitare l'alterazione dei fosfolipidi, è necessario eseguire le operazioni in ghiaccio. Tali sistemi artificiali sono molto simili alle membrane biologiche: sono costituiti da fosfolipidi affiancati, con la testa idrofila sporgente verso l'esterno e le code idrofobiche che interagiscono fra di loro all'interno.

2.4.1 Misura del volume interno dei liposomi

Il volume intraliposomiale viene misurato con il metodo dell'eptamolibdato di ammonio:

100 μ l di liposomi preparati in modo da contenere fosfato 50 mM, vengono solubilizzati in presenza di SDS al 10%. A questa miscela sono aggiunti 700 μ l di una soluzione "R" costituita da 10 ml di una soluzione "S" e 166 mg di $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. La soluzione "S" è costituita da 10.8 g di eptamolibdato di ammonio e H_2SO_4 7.7 N + H_2O . La lettura viene realizzata su 3 campioni da 25 μ l, 50 μ l e 100 μ l alla lunghezza d'onda di 578 nm.

2.5 Preparazione delle colonne XAD-4

La resina XAD-4 (Fluka), utilizzata nella preparazione di colonne cromatografiche, è idrofobica e fa parte degli adsorbenti polistirenici non polari, particolarmente usati per l'adsorbimento, dalle soluzioni acquose, di sostanze non polari o agenti tensioattivi. La XAD-4 viene usata per rimuovere detergenti non ionici ed è caratterizzata da pori di diametro pari a 90 Angstrom. L'adsorbente è neutro, composto da un gran numero di microsfere altamente intrecciate, tali da formare una struttura microreticolare che conferisce alla resina un'elevata superficie e una porosità uniforme. Prima di preparare le colonne XAD-4, la resina deve essere lavata per quattro volte in un volume di metanolo pari a circa il doppio del volume della resina, in modo da eliminare l'aria presente nei pori della resina stessa, e poi risciacquata con acqua fino alla scomparsa del metanolo e conservata, sempre in acqua, alla temperatura di 4°C. La resina viene utilizzata per riempire piccole colonne cromatografiche, in quantità sufficiente a trattenere il detergente non ionico, e su di esse si carica la miscela di ricostituzione. È importante, quindi, che la resina sia opportunamente tamponata in modo da avere un opportuno valore di pH e di pressione osmotica, così da evitare la rottura dei

proteoliposomi e l'inattivazione delle proteine. A tal fine la colonna è inizialmente equilibrata con un tampone la cui concentrazione deve essere tale da equilibrare le pressioni osmotiche presenti all'interno della colonna. Per B⁰AT1, in particolare, la colonna è pre-equilibrata con un tampone avente la stessa composizione della miscela di partenza, Hepes/Tris 20 mM all'opportuno valore di pH e gluconato di potassio 50 mM o alla concentrazione indicata nelle legende alle figure, senza, però, fosfolipidi e proteine. Le dimensioni delle colonne sono di 0.5 × 2.5 cm.

Si effettua quindi un tipo di cromatografia per adsorbimento, basata sul principio che alcuni materiali solidi adsorbenti hanno la capacità di trattenere le molecole sulla loro superficie. Questo processo di adsorbimento coinvolge interazione deboli, non elettrostatiche, e si ha solo in corrispondenza di specifici siti di adsorbimento, a livello dei quali si verifica una discriminazione tra le molecole. Il detergente, eluendo più volte in colonna ("n" passaggi), viene trattenuto dalla stessa, e una volta portati a termine i passaggi si otterranno proteoliposomi purificati dal detergente.

2.6 Incorporazione delle proteine nei liposomi (ricostituzione)

Il processo di incorporazione nei liposomi delle proteine solubilizzate prende il nome di ricostituzione. Ciò significa che la proteina verrà inserita all'interno della membrana dei liposomi, in condizioni da riprodurre l'ambiente in cui essa normalmente si trova e svolge la sua funzione fisiologica. Nel nostro caso, la ricostituzione è stata effettuata mediante il metodo della rimozione del detergente attraverso passaggi ripetuti su resina idrofobica XAD-4 (Fluka) (Kramer et al 1986). La procedura consiste nella rimozione del detergente da una miscela di micelle miste, costituite essenzialmente da detergente, proteine e fosfolipidi. Le micelle miste si formano perché i detergenti, possedendo una porzione idrofila ed una porzione idrofobica, possono sostituirsi ai fosfolipidi di

membrana, intercalandosi fra le proteine e quest'ultimi. Ciò accade in quanto i detergenti usati sono piccoli e hanno ridotte teste polari. La composizione della miscela di partenza, in un volume totale di 700 μ l, è specifica per ciascun tipo di traslocasi.

In particolare per la traslocasi della glutammina la composizione è la seguente:

15 μ l di proteina solubilizzata (circa 10 μ g di proteina in 1.3 % C₁₂E₈);

80 μ l di C₁₂E₈ al 10 %;

100 μ l di fosfolipidi sonicati al 10 %;

Gluconato di potassio 50 mM (oppure come differentemente specificato nelle legende delle figure);

Hepes/Tris 20 mM a pH 7.0 o ad eventuale altro pH;

in un volume finale di 700 μ l.

Dopo agitazione, questa miscela è passata venti volte attraverso una colonna di resina XAD-4. Al termine dei venti passaggi, il detergente è allontanato e si passa dalle micelle miste alla formazione dei proteoliposomi, in un tampone avente la stessa composizione di quello della XAD-4. Tutte le operazioni sono effettuate a temperature comprese fra 20° e 30°C.

2.7 Preparazione delle colonne Sephadex G-75

Per separare le molecole, in base a forma e dimensioni, vengono sfruttate le proprietà di "setaccio" di molti materiali porosi. I materiali più utilizzati a questo scopo sono composti organici polimerici che possiedono una rete tridimensionale di pori che conferisce loro le proprietà di un gel. Per tale motivo questo tipo di cromatografia prende il nome di gel-filtrazione. Una colonna di particelle di gel o di granelli di vetro poroso si trova in equilibrio con una fase mobile, adatta per la separazione voluta. Il principio su cui si basa questo processo è l'eluizione, in tempi diversi, delle sostanze

caricate in colonna, in funzione delle differenti dimensioni. Le molecole più grosse sono completamente escluse dai pori e quindi passano attraverso gli spazi interstiziali e compaiono per prime nell'eluato. Le molecole più piccole, invece, si distribuiscono all'interno e all'esterno del setaccio molecolare e perciò transitano in colonna seguendo un percorso più lungo, eluendo quindi per ultime. Pertanto, i proteoliposomi vengono eluiti per primi proprio perché di dimensioni maggiori rispetto a tutte le molecole che possono trovarsi al loro esterno. I gel che vengono più comunemente utilizzati sono destrani con un certo numero di legami crociati. Il destrano, presente in commercio con il nome di Sephadex-G75, è un polisaccaride costituito da unità glucosidiche unite da legami β -1,6. L'agente che determina la formazione dei legami crociati è l'epicloridina. La Sephadex-G75, stabile fino a pH 12 ed altamente idrofila, è una resina secca, sotto forma di sferette, che una volta "svellata" (rigonfiata) forma dei pori che permettono una separazione molecolare compresa tra 3000 e 8000 Da. Per "svellare" la resina, è necessario tenerla in acqua alla temperatura di circa 80°C per tre ore, poi, dopo averla fatta raffreddare, viene degassata mediante una pompa da vuoto ad acqua per un'ora. Segue quindi l'impaccamento della colonna, che viene di norma eseguito introducendo con delicatezza su una colonna di vetro, caratterizzata da un fondo con un setto poroso in grado di trattenere la resina, la sospensione precedentemente preparata. La colonna di vetro utilizzata ha un diametro di 0.75 cm ed un'altezza di 15 cm; tale altezza permette un'opportuna separazione dei proteoliposomi da tutte le molecole di dimensioni minori. La colonna così preparata viene, quindi, pre-equilibrata attraverso due lavaggi con un tampone contenente Hepes/Tris 20 mM a pH 7.0 o ad eventuale altro pH. La funzione del tampone è quella di equilibrare la pressione osmotica. A questo punto è possibile cromatografare i 550 μ l di eluato di proteoliposomi ottenuti dalle colonne di XAD-4. Onde evitare fenomeni di diffusione, si attende che la colonna vada a secco prima di

eluirlo aggiungendo il tampone, goccia a goccia. Lungo la colonna si viene, così, a formare una banda compatta di proteoliposomi che, essendo visibile, permette l'aggiunta di volumi sempre maggiori di tampone. Nel momento in cui l'eluato diventa torbido, si possono raccogliere circa 600 μl di proteoliposomi privi del substrato esterno. La stessa resina è utilizzata per eliminare il substrato radioattivo che rimane fuori dai proteoliposomi al termine del trasporto. Per questo processo, vengono utilizzate colonne aventi dimensioni pari a 0.7×8 cm.

2.8 Misure di trasporto

2.8.1 Misure di trasporto come ingresso di substrato radioattivo nei proteoliposomi

L'eluato torbido ottenuto dalle Sephadex G-75 e contenente i proteoliposomi viene dapprima agitato, in modo da ottenere l'omogeneità della soluzione, e poi suddiviso in aliquote di 100 μl usate come campioni. Su tali campioni vengono effettuate le misure di trasporto secondo il metodo dello "stop inhibitor". Le prove vengono effettuate in doppio. A due campioni di riferimento si aggiungono 10 μl di mersalil 20 μM , che è l'inibitore specifico per la traslocasi B⁰AT1, ed in tutte le prove si aggiungono 10 μl di [³H]-glutammina alla concentrazione finale desiderata. La preparazione della prova di controllo, in cui inibitore e substrato radioattivo sono aggiunti contemporaneamente al tempo zero, è molto importante. Infatti, il valore di radioattività ottenuto da queste prove, indica la quantità di substrato entrato nei proteoliposomi per semplice diffusione ed è, quindi, il valore da sottrarre ad ogni prova per ottenere esclusivamente la quantità di substrato trasportato in maniera specifica dalla proteina.

Prima dell'aggiunta della [³H]-glutammina ai campioni, i proteoliposomi vengono messi a contatto con uno ionoforo che, inserendosi in membrana e trasportando ioni K⁺

all'esterno dei proteoliposomi, crea un potenziale di membrana. Dopo la cromatografia sulle colonne sephadex G-75, infatti, il gluconato di potassio si trova esclusivamente all'interno dei proteoliposomi presenti nell'eluato, poiché la quota di potassio che non è entrata nei proteoliposomi durante la ricostituzione, viene trattenuta dalla resina. Il potenziale di membrana è, quindi, indotto sperimentalmente da una molecola idrofobica solubilizzata in etanolo, la valinomicina. Questo ionoforo è un piccolo peptide ciclico che si comporta come uno shuttle di K^+ trasportandolo da un compartimento ad un altro secondo gradiente di concentrazione. L'interazione con gli ioni K^+ avviene a livello di atomi di ossigeno appartenenti ad alcuni residui amminoacidici che formano la cavità idrofilica centrale; le catene laterali degli amminoacidi idrofobici, invece, sono disposte all'esterno della molecola permettendone l'inserimento in membrana.

Nei nostri esperimenti, la sua azione è quella di veicolare ioni K^+ dall'interno dei proteoliposomi verso l'esterno, creando un potenziale di membrana in grado di attivare il trasporto Na^+ -dipendente di [3H]-glutammina, che è, immediatamente, aggiunta ai proteoliposomi insieme ad opportuni volumi di gluconato di sodio alle concentrazioni scelte per i diversi esperimenti effettuati.

Il trasporto si svolge per il tempo voluto, quindi si blocca mediante aggiunta di 10 μ l dell'inibitore. Queste operazioni vengono effettuate alla temperatura di 25°C. I 100 μ l di ogni prova vengono cromatografati su colonne Sephadex G-75 in modo da rimuovere il substrato radioattivo esterno. I proteoliposomi, eluiti con NaCl 50 mM, vengono raccolti in "vial", a cui si aggiungono 3 ml di miscela scintillante Maxifluor. Dopo agitazione, le prove vengono lette in un contatore a scintillazione liquida (Beckman LS-7500) per misurare la radioattività.

2.9 Misura della radioattività entrata nei proteoliposomi e calcolo dell'attività di trasporto

La radioattività del campione letta è espressa in colpi per minuto (cpm). Il campione è miscelato con una soluzione che contiene uno o più scintillatori (cocktail). Questi contatori sono utilizzati soprattutto per misurare i β -emettitori deboli, quali ^3H , ^{14}C e ^{35}S . La miscela scintillante Maxifluor aggiunta alle prove è costituita da idrocarburi aromatici in grado di trasformare le radiazioni β in fluorescenza. Il segnale (la fluorescenza) viene poi rilevata dai fotomoltiplicatori dello scintillatore e convertito in segnale elettrico, tradotto in cpm. I dati ottenuti vengono elaborati facendo la media dei cpm relativi ai campioni uguali, ed al valore ottenuto si sottrae quello dei campioni di riferimento per ottenere il valore del trasporto reale. L'attività di trasporto, espressa come nanomoli di substrato trasportato per milligrammi di proteina, nel tempo di incubazione, si ricava dalla seguente formula:

$$\text{Attività di trasporto} = \text{cpm} / \text{A.S.} \times \text{mg di proteina}$$

dove:

cpm corrisponde alla radioattività trovata all'interno dei proteoliposomi;

mg è la quantità proteina presente nei campioni;

A.S. è l'attività specifica, che si calcola nel seguente modo:

$$\text{Attività specifica} = \text{radioattività totale} / \text{nmoli di substrato radioattivo}$$

dove:

radioattività totale è il numero di colpi per minuto emessi da 10 μl di soluzione preparata con carrier free (substrato triziato) e substrato freddo, alla concentrazione desiderata;

nmoli di substrato è il numero di nanomoli totali contenute in 10 μl della medesima soluzione di substrato radioattivo, impegnate nelle reazioni di scambio.

2.10 Elaborazione dei dati sperimentali

I dati sperimentali che si ottengono dalle misure di trasporto, devono essere interpolati con equazioni appropriate ed elaborati con specifici sistemi di software. Le equazioni utilizzate per analizzare aspetti funzionali e cinetici del trasporto sono:

1. *Equazione esponenziale di I ordine* per valutare il trasporto nel tempo

$$y = A(1 - e^{-Kt})$$

dove:

t = tempo

k = costante di I ordine

A = radioattività massima interna ai proteoliposomi all'equilibrio

2. *Equazione di Michaelis-Menten*

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{[S] + K_m}$$

dove:

V_{\max} = velocità massima raggiunta quando la proteina è saturata dal substrato

[S] = concentrazione del substrato

K_m = costante di Michaelis-Menten.

3. *Equazione di Lineweaver-Burk*

ovvero l'inverso dell'equazione di Michaelis-Menten

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

4. *Equazione di Hill*

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]^n}{[S]^n + K_m}$$

dove:

V_{\max} = velocità massima raggiunta quando la proteina è saturata con il substrato

[S] = concentrazione del substrato

K_m = costante di Michaelis-Menten

n = coefficiente di Hill che esprime l'indice di cooperatività

nel caso in cui $n = 1$ l'equazione descrive un'iperbole e corrisponde all'equazione di Michaelis-Menten.

5. *Equazione IC50*

$$y = \frac{100\%}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}} \right)^s}$$

dove:

s = fattore di pendenza

x = valore di inibizione

IC_{50} = concentrazione di inibitore alla quale l'attività del trasportatore si riduce del 50%

Il parametro più basso è 0 mentre quello più alto è 100. Si assume che il valore di y diminuisca all'aumentare del valore di x .

3. RISULTATI RIGUARDANTI IL TRASPORTATORE B⁰AT1

3.1 Ricostituzione in liposomi e studi funzionali del trasportatore glutammina/amminoacidi neutri B⁰AT1

3.1.1 *Analisi dei parametri della ricostituzione*

Il sistema di trasporto di membrana plasmatica, di cui vengono di seguito definite nuove proprietà funzionali, è il trasportatore glutammina/amminoacidi neutri (B⁰AT1) estratto dalla membrana plasmatica apicale di rene di ratto (brush-border), dove il trasporto di glutammina è attivo e riveste un importante ruolo fisiologico.

Per solubilizzare il trasportatore della glutammina/amminoacidi neutri in una forma attiva, sono stati saggiati alcuni detergenti non ionici: Triton X-100, Triton X-114, C₁₂E₈, C₈E₄. Gli estratti ottenuti (circa 30 µg di proteina) sono stati ricostituiti in liposomi e l'attività di trasporto è stata misurata come ingresso (uptake) di [³H]-glutammina in proteoliposomi in presenza di K-gluconato 50 mM, nel compartimento interno, e Na-gluconato 50 mM all'esterno. Il detergente più adatto per la solubilizzazione della proteina in forma attiva è il C₁₂E₈ a concentrazione 1.3 %. Il Triton X-100 consente di estrarre la proteina in forma attiva con un'attività di circa il 70% rispetto al C₁₂E₈; il Triton X-114 ed il C₈E₄ sono inefficaci nella solubilizzazione del trasportatore in forma attiva.

La procedura della ricostituzione è stata ottimizzata per il trasportatore della glutammina/amminoacidi neutri modificando i parametri della ricostituzione che influenzano l'efficienza dell'incorporazione del trasportatore nei liposomi, cioè la concentrazione della proteina, il rapporto detergente/fosfolipidi, il numero dei passaggi attraverso la stessa colonna di Amberlite XAD-4. In questi esperimenti l'uptake di [³H]-glutammina (0.1 mM) è stato misurato in 20 minuti in funzione di ciascun parametro. In tutti gli esperimenti è stato, inoltre, misurato il volume interno ai liposomi, che fornisce

informazioni sul processo di formazione dei liposomi stessi. All'aumentare della concentrazione di proteina, il trasporto aumenta fino a 12 $\mu\text{g/ml}$, mentre, oltre questo valore, si osserva una riduzione del trasporto. Il volume interno ai liposomi di 4 $\mu\text{l/mg}$ di fosfolipidi si riduce di poco all'aumentare della concentrazione di proteina, indicando che maggiori concentrazioni di proteina causano la formazione di un numero minore di liposomi o di liposomi più piccoli (Fig. 1).

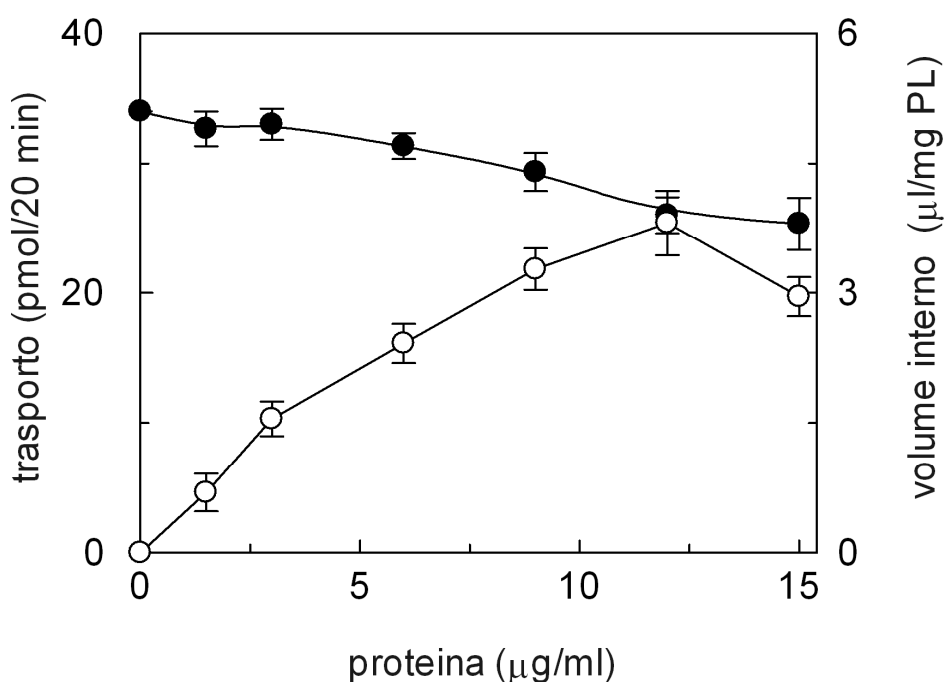


Fig. 1 Dipendenza dell'efficienza della ricostituzione del trasportatore per la glutamina/amminoacidi neutri dalla concentrazione di proteina. La ricostituzione è stata realizzata come descritto nei Materiali e metodi fatta eccezione per le concentrazioni crescenti di proteina usate. Il trasporto è stato misurato come ingresso di [^3H]-glutamina, 0.1 mM, nei proteoliposomi contenenti K-gluconato 50 mM, in presenza di Na-gluconato esterno 50 mM, in 20 min. (○); (●) volume interno dei proteoliposomi. Risultati simili sono stati ottenuti in tre diversi esperimenti.

L'attività di trasporto è fortemente influenzata dal rapporto detergente/fosfolipidi ed essa raggiunge un valore massimo in corrispondenza di un rapporto detergente/fosfolipidi di 0.83 (mg/mg); al di sopra di questo rapporto il trasporto si riduce. Questo parametro influenza, inoltre, il volume interno dei proteoliposomi, anche se ha un'incidenza minore rispetto a quella che ha sull'attività di trasporto. Il massimo

volume interno si osserva in corrispondenza di un rapporto detergente/fosfolipidi di 0.83 (Fig. 2).

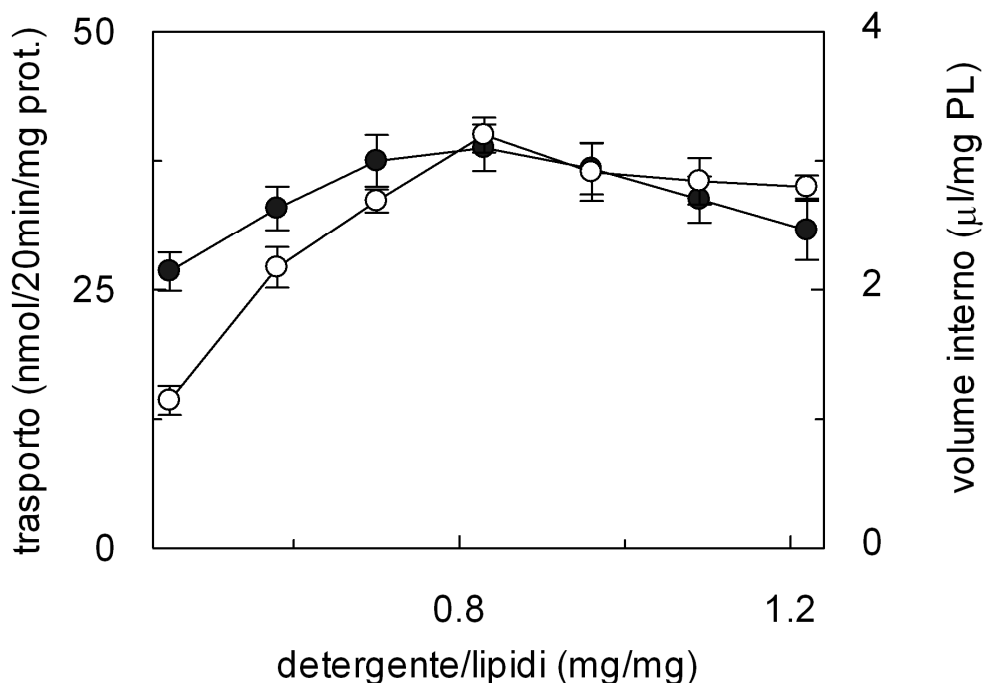


Fig. 2 Dipendenza dell'efficienza della ricostituzione del trasportatore per la glutammina/amminoacidi neutri dal rapporto detergente/lipidi. La ricostituzione è stata realizzata come descritto nei Materiali e metodi in presenza di diversi rapporti detergente/lipidi. Il trasporto è stato misurato come ingresso di [^3H]-glutammina, 0.1 mM, nei proteoliposomi contenenti K-gluconato 50 mM, in presenza di Na-gluconato esterno 50 mM, in 20 min. (○); (●) volume interno dei proteoliposomi. Risultati simili sono stati ottenuti in tre diversi esperimenti.

L'attività del trasporto aumenta all'aumentare del numero dei passaggi su colonna fino a circa $35 \text{ nmol } 20 \text{ min}^{-1} \text{ mg proteina}^{-1}$ in corrispondenza di 18 passaggi; nel range compreso fra 18 e 24 l'attività rimane quasi costante (Fig. 3).

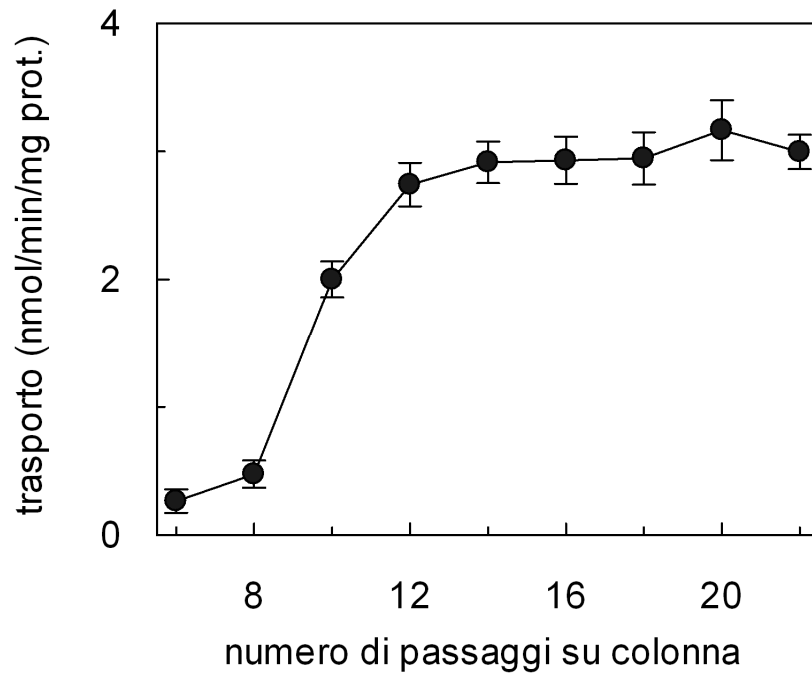


Fig. 3 Dipendenza dell'efficienza della ricostituzione del trasportatore per la glutammina/amminoacidi neutri dal numero di passaggi su colonna. La ricostituzione è stata realizzata come descritto nei Materiali e metodi in funzione del diverso numero di passaggi su colonna. Il trasporto è stato misurato come ingresso di [^3H]-glutammina, 0.1 mM, nei proteoliposomi contenenti K-gluconato 50 mM, in presenza di Na-gluconato esterno 50 mM. Risultati simili sono stati ottenuti in tre diversi esperimenti.

In accordo con i risultati descritti, negli esperimenti è stata utilizzata una concentrazione di proteina di 10 $\mu\text{g/ml}$, un rapporto detergente/fosfolipi di 0.83 e un numero di passaggi su colonna pari a 20.

3.1.2 Studio della funzione del sistema di trasporto ricostituito

E' stata studiata la dipendenza dell'attività di trasporto del trasportatore glutamina/amminoacidi neutri in funzione del tempo di incubazione dei proteoliposomi con [^3H]-glutamina esterna 0.1 mM, in presenza di Na-gluconato, nel compartimento esterno, e diversi cationi nel compartimento intraliposomiale: Na^+ , K^+ o Li^+ (Fig. 4).

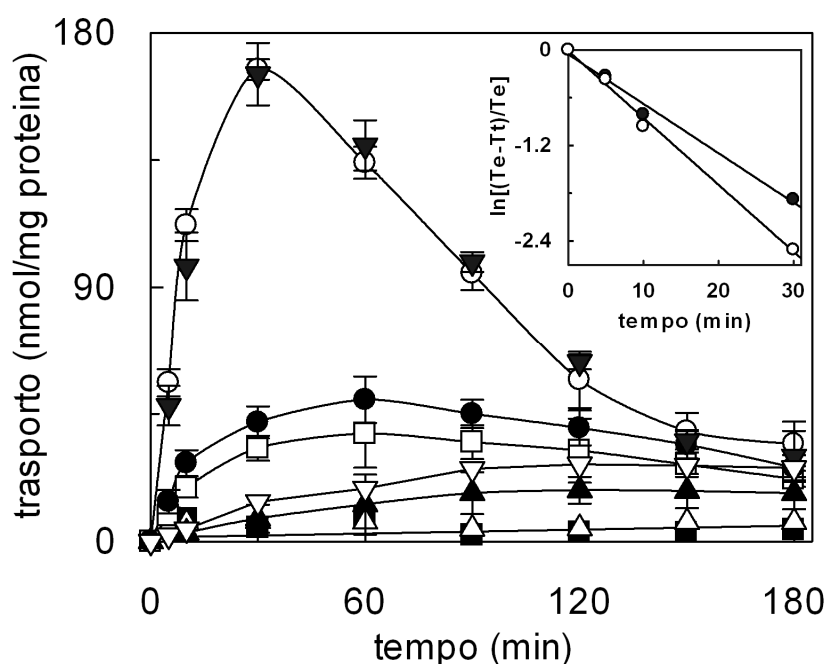


Fig. 4 Dipendenza dal tempo del trasporto di [^3H]-glutamina nei proteoliposomi ricostituiti. [^3H]-glutamina, 0.1 mM, è stata aggiunta, insieme con Na-gluconato 50 mM, a tempo zero ai proteoliposomi contenenti K-gluconato 50 mM (●, ○), KCl (□), LiCl (■), Na-gluconato (Δ), o K-gluconato più glutamina 30 mM (▼); in (▲), il Na-gluconato esterno è stato omesso o in (▽) sostituito dal LiCl; in (○, ▼, ▽) la valinomicina è stata aggiunta ai proteoliposomi insieme con il substrato marcato, come descritto in Materiali e metodi; nell'inserto è stato riportato il replot semilogaritmico di (●) e (○) fino a 30 minuti; T_t e T_e sono, rispettivamente, i valori del trasporto al tempo t ed all'equilibrio. La reazione di trasporto è stata bloccata agli intervalli di tempo indicati, come descritto in Materiali e metodi. I dati rappresentano la media \pm S.D. di tre diversi esperimenti.

L'uptake di [^3H]-glutamina è risultato essere significativo solo in presenza di K^+ all'interno dei proteoliposomi, sia come sale di sodio sia come gluconato; in tali condizioni l'uptake aumenta nel tempo fino a 50 e 39 nmol/mg proteina, in presenza all'interno, rispettivamente, di K-gluconato o KCl; la reazione raggiunge l'equilibrio a

60 minuti; a tempi più lunghi si osserva, invece, una piccola riduzione della radioattività presente all'interno dei proteoliposomi. La stessa tipologia di esperimenti è stata condotta aggiungendo nel compartimento esterno NaCl invece di Na-gluconato; i risultati ottenuti sono simili a quelli descritti in precedenza. L'attività di trasporto misurata è quasi nulla quando nel compartimento interno vengono aggiunti LiCl o Na⁺, sia come gluconato che come sale di cloro; ciò indica che l'uptake di [³H]-glutammina dipende dalla presenza di K⁺ all'interno dei proteoliposomi e non è tollerata la sostituzione del K⁺ né con il sodio né con il litio. In condizioni sperimentali diverse, ovvero in presenza di K⁺ interno, ma in assenza di Na⁺ all'esterno, l'uptake di [³H]-glutammina misurato è molto basso raggiungendo, dopo 180 minuti, lo stesso valore di radioattività residua misurata in presenza di Na⁺ esterno. Risultati simili sono ottenuti in condizioni in cui, all'esterno dei proteoliposomi, sono stati aggiunti LiCl, KCl o K-gluconato 50 mM. L'aggiunta di valinomicina ai proteoliposomi determina una forte stimolazione del trasporto che, a 30 minuti, raggiunge un valore massimo di 167 nmol/mg proteina. Dopo 30 minuti si osserva una forte riduzione della radioattività intraliposomiale (efflusso di [³H]-glutammina), indicando che il cotrasporto di Na⁺ 50 mM con glutammina 0.1 mM causa l'accumulo di glutammina nei proteoliposomi con un gradiente temporaneo di glutammina diretto verso l'esterno (fenomeno noto come overshoot). La presenza di glutammina all'interno dei proteoliposomi non influenza ulteriormente l'uptake di [³H]-glutammina escludendo sia che venga catalizzata una reazione di antiport di amminoacidi, sia una trans-inibizione. In esperimenti in cui il sodio esterno è stato sostituito con il litio, in presenza di valinomicina, il trasporto di glutammina è molto lento, solo leggermente più alto di quello misurato in assenza di Na⁺, indicando una tolleranza molto bassa nei confronti della sostituzione del Na⁺ con il Li⁺.

I risultati ottenuti, fino a 30 minuti, relativamente agli esperimenti condotti in presenza di K-gluconato interno e Na-gluconato esterno, sia in presenza che in assenza di valinomicina, (Fig. 4), sono stati riportati in grafico in forma logaritmica (insetto di Fig. 4). In entrambi i casi è stata trovata una dipendenza lineare caratteristica di processi del primo ordine, cioè, l'attività di trasporto osservata è catalizzata da un singolo sistema di trasporto. Le costanti di velocità del primo ordine, k , derivate dai replot, sono 0.062 min^{-1} o 0.084 min^{-1} e le velocità di trasporto, calcolate come prodotto di k per il trasporto all'equilibrio, sono 3.1 o $15.3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg proteina}^{-1}$, rispettivamente in assenza ed in presenza di valinomicina. I dati ottenuti suggeriscono che nei liposomi ricostituiti viene catalizzata una reazione di symport elettrogenico Na^+ -glutammina che dipende dalla presenza di K^+ nel compartimento intraliposomiale. Gli stessi esperimenti di Fig. 4 sono stati condotti seguendo l'uptake di [^3H]-leucina; anche per il trasporto di leucina si ha un'analogia dipendenza dal K^+ ed una stimolazione da parte della valinomicina.

Sono stati condotti, successivamente, altri esperimenti al fine di chiarire due quesiti fondamentali, ovvero, dove l'elettrogenicità si origina e se il K^+ è trasportato.

L'uptake di [^3H]-glutammina, in presenza di Na^+ , è stato misurato in proteoliposomi contenenti K^+ , come riportato per gli esperimenti di Fig. 4, ma in questo caso, dopo aver raggiunto l'equilibrio apparente a 60 minuti, agli stessi proteoliposomi è stata aggiunta la valinomicina.

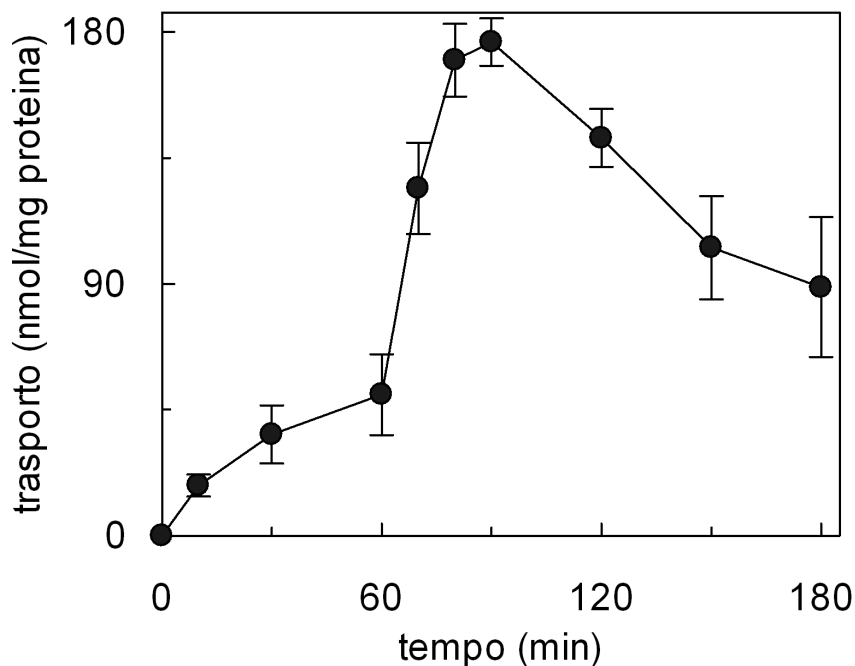


Fig. 5 Dipendenza dal tempo del trasporto di $[^3\text{H}]$ -glutamina nei proteoliposomi ricostituiti. $[^3\text{H}]$ -glutamina, 0.1 mM, è stata aggiunta, insieme con Na-gluconato 50 mM, a tempo zero ai proteoliposomi contenenti K-gluconato 50 mM; dopo 60 minuti di incubazione, la valinomicina è stata aggiunta ai proteoliposomi come descritto in Materiali e metodi. La reazione di trasporto è stata bloccata agli intervalli di tempo indicati. I dati rappresentano la media \pm S.D. di tre diversi esperimenti.

Come si evince dalla figura 5, il trasporto è fortemente stimolato, come negli esperimenti precedenti, e l'uptake di $[^3\text{H}]$ -glutamina raggiunge un valore di 176 nmol/mg proteina, cioè, quasi lo stesso valore riportato per gli esperimenti di Fig. 4, in cui la valinomicina è stata aggiunta ai proteoliposomi a tempo zero. Questi dati indicano che, nei primi 60 minuti, il cotrasporto Na^+ -glutamina genera un potenziale di membrana, positivo all'interno, che si oppone all'uptake accoppiato Na^+ - $[^3\text{H}]$ -glutamina; questo potenziale di membrana viene compensato dall'efflusso di K^+ mediato dalla valinomicina, con la conseguente riattivazione del cotrasporto. Dai dati si evince, anche, che il trasportatore ricostituito non media l'efflusso di K^+ .

E' stata studiata, anche, la dipendenza del trasporto dalla concentrazione di Na^+ (Fig. 6).

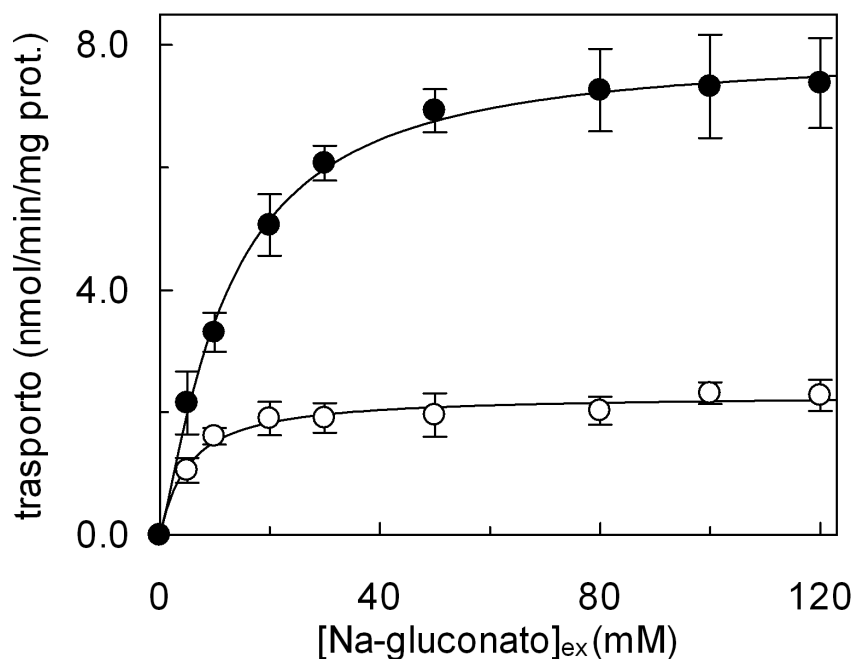


Fig. 6 Dipendenza del trasporto di glutamina dalla concentrazione extraliposomiale di Na^+ . La velocità del trasporto è stata misurata come uptake di [^3H]-glutamina 0.1 mM, in 10 minuti, in proteoliposomi contenenti K-gluconato 50 mM in presenza delle concentrazioni indicate di Na-gluconato esterno; in (●) la valinomicina è stata aggiunta ai proteoliposomi insieme con il substrato marcato, come descritto in Materiali e metodi. I dati rappresentano la media \pm S.D. di tre diversi esperimenti.

Come mostrato in figura, la velocità di trasporto aumenta con l'aumentare delle concentrazioni di Na^+ secondo un processo saturabile. I dati sperimentali sono stati interpolati nell'equazione di Hill da cui si ricavano indici di cooperatività di 1.0 ± 0.29 e 0.97 ± 0.28 (da tre esperimenti), rispettivamente, in presenza o in assenza di valinomicina; ciò indica che, molto probabilmente, uno ione Na^+ è trasportato insieme con la glutamina. I dati ottenuti permettono di determinare i valori di K_m per lo ione Na^+ che risultano essere di 12 ± 0.90 e 5.2 ± 0.91 mM, rispettivamente, in presenza o in assenza di valinomicina.

In esperimenti successivi è stato studiato il trasporto di glutamina in proteoliposomi in funzione del potassio presente nel compartimento interno (Fig. 7).

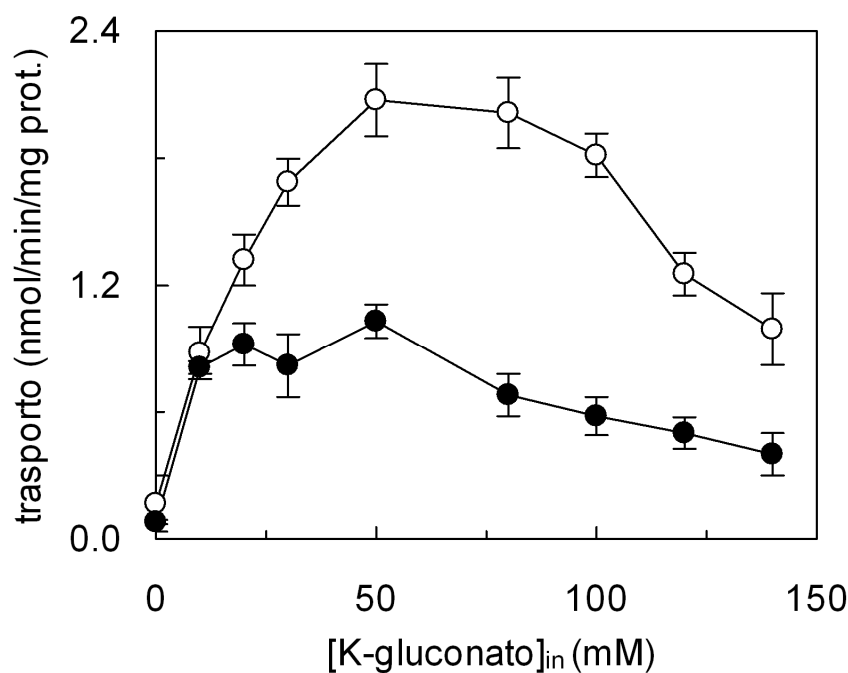


Fig. 7 Dipendenza del trasporto di glutamina dalla concentrazione intraliposomiale di K^+ . La velocità del trasporto è stata misurata come uptake di $[^3H]$ -glutamina 0.1 mM, in 10 minuti, in proteoliposomi contenenti K-gluconato alle concentrazioni indicate, in presenza, all'esterno, di Na-gluconato 50 mM e in (○) K-gluconato 0.5 mM o in (●) la stessa concentrazione di K-gluconato presente all'interno dei proteoliposomi. I dati rappresentano la media \pm S.D. di tre diversi esperimenti.

Come si evince dai dati riportati in figura 7, la velocità di trasporto di $[^3H]$ -glutamina aumenta da 0.1 a 2.1 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg proteina}^{-1}$ in funzione dell'aumento della concentrazione di K^+ fino a 50 mM. A concentrazioni di K^+ più alte la velocità di trasporto si riduce fino ad un valore che è circa il 50% di quello misurato in presenza di K^+ 50 mM. Quando le concentrazioni di K^+ esterno sono le stesse di quelle che si hanno all'interno dei proteoliposomi, cioè in assenza di gradiente di K^+ , l'andamento dei dati è simile a quello che si ha nelle condizioni descritte in precedenza. In quest'ultimo caso, tuttavia, la velocità di trasporto è più bassa di quella che si misura in assenza di potassio esterno, eccetto che ad una concentrazione di K^+ pari a 10 mM. Un comportamento simile è stato osservato sostituendo, nel compartimento esterno, il K^+ con il Li^+ , ciò suggerisce che gli ioni potassio o litio, presenti all'esterno, inibiscono il trasporto in quanto, probabilmente, competono con gli ioni Na^+ . Da questa osservazione si evince

che il K^+ non è trasportato dal compartimento interno a quello esterno, in accordo con i dati riportati in Fig. 5. La dipendenza della velocità di trasporto di $[^3H]$ -glutammina in funzione del K^+ , presente nel compartimento interno, è stata studiata, anche, in presenza di valinomicina (Fig.8).

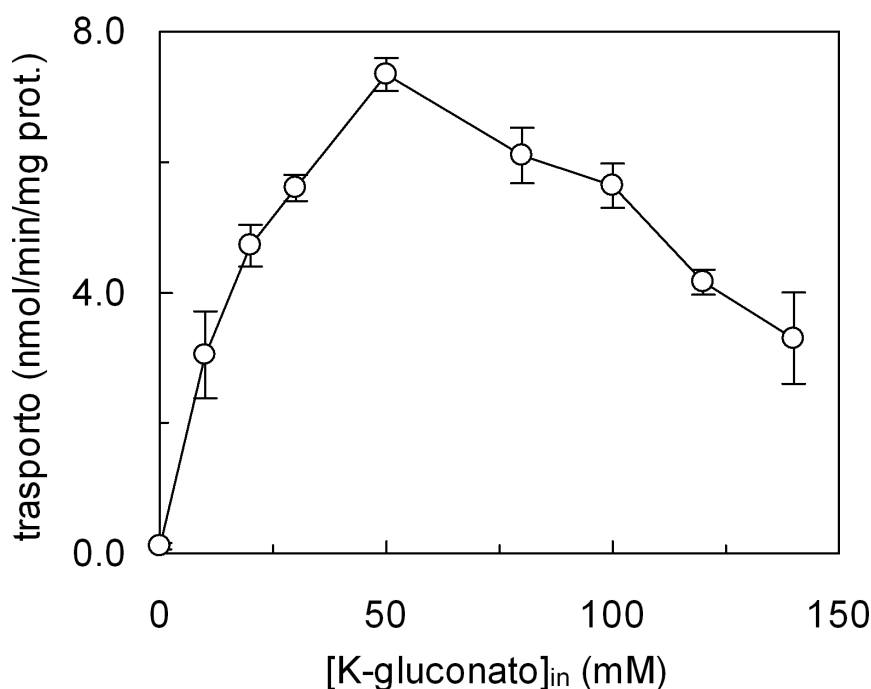


Fig. 8 Dipendenza del trasporto di glutammina dalla concentrazione intraliposomiale di K^+ in presenza di valinomicina. La velocità del trasporto è stata misurata come uptake di $[^3H]$ -glutammina 0.1 mM, in 10 minuti, in proteoliposomi contenenti K-gluconato alle concentrazioni indicate, in presenza, all'esterno, di Na-gluconato 50 mM e K-gluconato 0.5 mM; la valinomicina è stata aggiunta ai proteoliposomi insieme con il substrato marcato, come descritto in Materiali e metodi. I dati rappresentano la media \pm S.D. di tre diversi esperimenti.

I risultati ottenuti presentano lo stesso andamento di quello osservato in assenza di valinomicina, con un valore massimo in corrispondenza di una concentrazione di K^+ di 50 mM. In accordo con i dati riportati in figura 4, in presenza di valinomicina la velocità di trasporto, misurata ad una concentrazione di K^+ 50 mM, è circa 4 volte più alta di quella che si ha in assenza dello ionoforo.

In figura 9 è riportata la dipendenza del rapporto tra la velocità di trasporto in presenza ed in assenza di valinomicina, in funzione delle concentrazioni di Na^+ o K^+ . I dati utilizzati derivano da quelli ottenuti negli esperimenti di Fig. 6, Fig. 7 e Fig. 8.

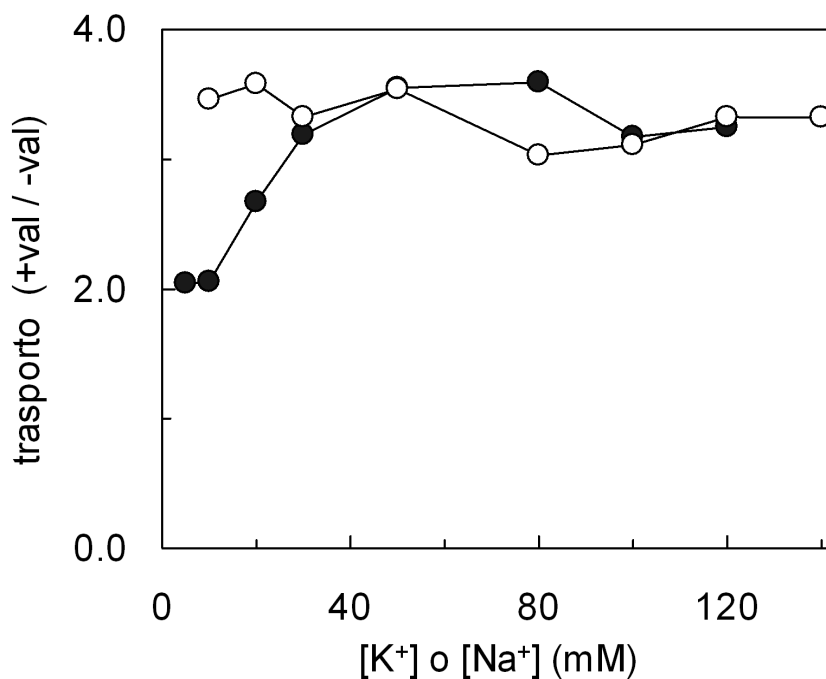


Fig. 9 Dipendenza dalle concentrazioni di Na^+ e K^+ del rapporto tra la velocità del trasporto in presenza ed in assenza di valinomicina. I valori di velocità sono stati calcolati dai dati di Fig. 6 per le concentrazioni di Na^+ (●) e di Fig. 7 e Fig. 8 per le concentrazioni di K^+ (○).

Questo parametro, che rappresenta l'elettrogenicità, non è influenzato dalla concentrazione di K^+ , al contrario, esso dipende dalla concentrazione di Na^+ . Tutto ciò conferma che il ruolo del K^+ è solo quello di stimolare il trasporto, ma esso non è coinvolto in tale processo; gli ioni Na^+ , invece, generano l'elettrogenicità essendo coinvolti nel processo di trasporto.

Per completare la caratterizzazione funzionale del trasportatore $\text{B}^0\text{AT1}$, è stata studiata la dipendenza del trasporto dal pH (Fig. 10).

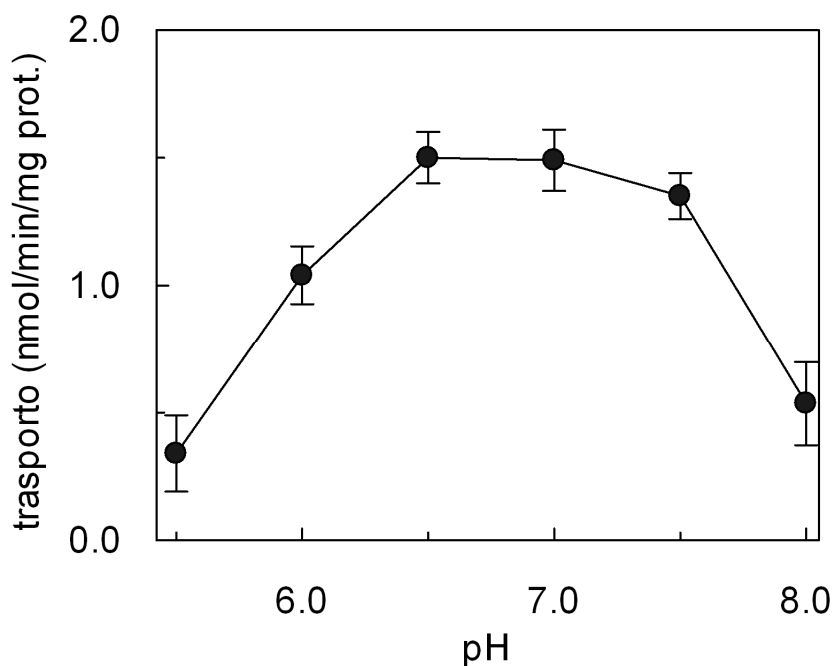


Fig. 10 Effetto del pH sul trasportatore glutamina/amminoacidi neutri ricostituito. Tutte le procedure sperimentali dalla ricostituzione alle misure di trasporto (vedi Materiali e metodi) sono state realizzate in tampone Hepes/Tris 20 mM al pH indicato. La velocità di trasporto è stata misurata come uptake di [^3H]-glutamina 0.1 mM, in 10 min., in proteoliposomi contenenti K-gluconato 50 mM, in presenza di Na-gluconato esterno 50 mM. I risultati sono le medie \pm S.D. di tre esperimenti.

Come si evince dai dati riportati in grafico la velocità di trasporto di [^3H]-glutamina è molto bassa a pH 5.5, aumenta sensibilmente all'aumentare del pH con un trasporto ottimale nel range di pH 6.5–7.0, diminuisce leggermente a pH 7.5, per ridursi drasticamente a pH 8.0.

3.1.3 Specificità per amminoacidi ed inibitori

Un'altra serie di esperimenti è stata condotta per determinare la specificità del trasportatore ricostituito nei confronti degli amminoacidi. Questi esperimenti sono stati realizzati studiando l'effetto che hanno gli amminoacidi, aggiunti nel compartimento extraliposomiale, sull'ingresso, nei proteoliposomi, di [^3H]-glutamina o di [^3H]-leucina (Fig. 11).

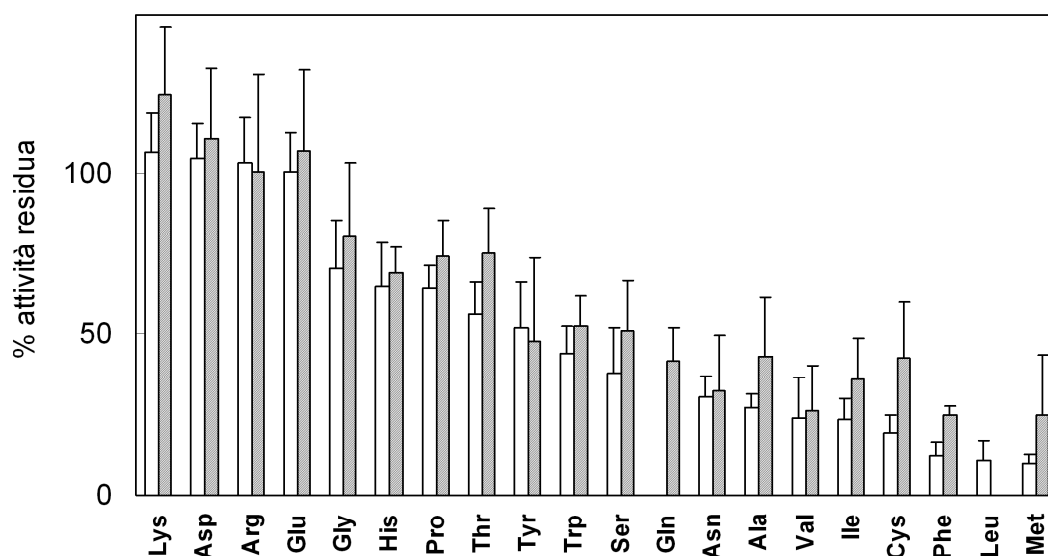


Fig. 11 Specificità per gli aminoacidi del trasportatore ricostituito. Il trasporto è stato misurato come uptake di [³H]-glutamina (istogrammi bianchi), o di [³H]-leucina (istogrammi grigi), 0.1 mM, in proteoliposomi contenenti K-gluconato 50 mM, in presenza, all'esterno, di Na-gluconato 50 mM, in 10 minuti. Gli aminoacidi indicati sono stati aggiunti, alla concentrazione 1 mM, insieme con i substrati marcati. La percentuale dell'attività residua è stata calcolata, per ogni esperimento, rispetto a campioni di controllo (considerati come il 100%), cioè, in assenza di aminoacidi. I dati rappresentano la media \pm S.D. delle percentuali di tre esperimenti. L'attività di trasporto media dei campioni di controllo è 18 ± 2.8 nmol $10 \text{ min}^{-1} \text{ mg proteina}^{-1}$ e 15 ± 6.5 nmol $10 \text{ min}^{-1} \text{ mg proteina}^{-1}$, rispettivamente, per la [³H]-glutamina o la [³H]-leucina.

In figura 11 è riportata l'attività di trasporto residua (rispetto ai campioni di controllo ai quali non sono stati aggiunti gli aminoacidi) in presenza di ciascun aminoacido. Lys, Asp, Arg e Glu non esercitano alcun effetto significativo sul trasporto, una inibizione molto bassa si osserva in presenza di Gly. L'inibizione aumenta in presenza degli altri aminoacidi neutri ed un pattern simile è riportato sia quando il substrato usato è la [³H]-glutamina sia quando è la [³H]-leucina, anche se alcuni aminoacidi esercitano un'inibizione leggermente inferiore sull'ingresso di [³H]-leucina rispetto all'ingresso di [³H]-glutamina. Se Gln, Asn, Ala, Val, Ile, Cys, Phe, Leu e Met, vengono aggiunti ad una concentrazione pari a 5 mM, l'inibizione che si ottiene è quasi completa, mentre Lys, Asp, Arg e Glu, anche a questa concentrazione, sono inefficaci. Risultati sovrapponibili sono stati ottenuti in presenza di valinomicina.

In altri esperimenti si è andati ad analizzare la sensibilità del trasportatore nei confronti di analoghi del substrato e di composti che reagiscono in maniera specifica con i residui amminoacidici delle proteine (Fig. 12).

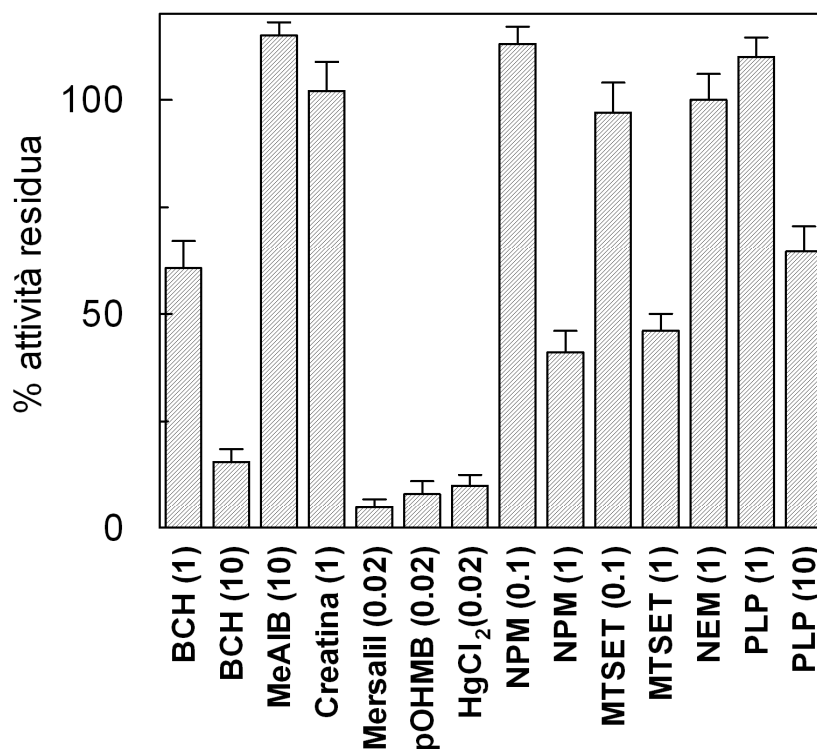


Fig. 12 Specificità per gli inibitori del trasportatore ricostituito. Il trasporto è stato misurato come uptake di [³H]-glutammina, 0.1 mM, in proteoliposomi contenenti K-gluconato 50 mM, in presenza, all'esterno, di Na-gluconato 50 mM, in 10 minuti. Gli inibitori, alle concentrazioni mM indicate in parentesi, sono stati aggiunti 1 minuto prima della glutammina marcata. La percentuale dell'attività residua è stata calcolata, per ogni esperimento, rispetto a campioni di controllo (considerati come il 100%), cioè, in assenza di inibitori. I dati rappresentano la media ± S.D. delle percentuali di tre esperimenti. L'attività di trasporto media dei campioni di controllo dei tre esperimenti analizzati è 17 ± 3.9 nmol 10 min⁻¹ mg proteina⁻¹.

L'analogo dell'amminoacido, BCH, è un inibitore efficace, mentre il MeAIB e la creatina non inibiscono per nulla il trasportatore. I reagenti specifici per i gruppi tiolici, quali mersalil, pOHMB ed HgCl₂, esercitano una forte inibizione sul trasportatore. NPM e MTSET, alle concentrazioni normalmente usate per modificare le proteine, hanno un effetto inibitorio più basso, mentre il NEM non ha alcun effetto sul trasporto.

Il PLP, che reagisce con i gruppi aminici della lisina, testato ad una concentrazione di 10 mM, esercita un effetto inibitorio blando sul trasportatore ed è completamente inefficace a concentrazione più bassa, ovvero 1 mM.

L'inibizione esercitata dall'analogo del substrato, BCH, e quella del reagente dei gruppi tiolici, mersalil, è stata ulteriormente analizzata come dipendenza dalla concentrazione di ciascun reagente (Fig. 13).

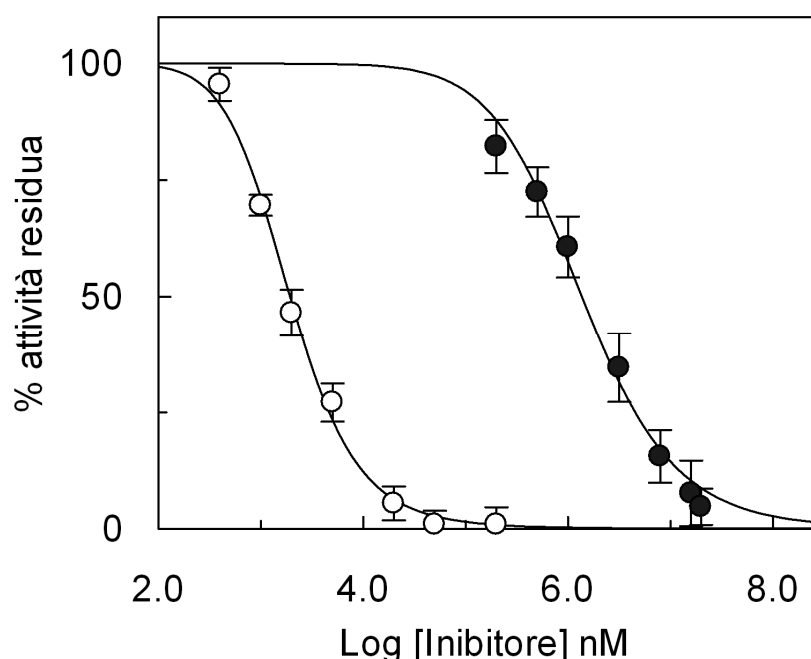


Fig. 13 Curve dose-risposta per l'inibizione del trasportatore ricostituito da parte del mersalil e del BCH. La velocità del trasporto è stata misurata come uptake di [^3H]-glutammina, 0.1 mM, in 10 minuti, in proteoliposomi contenenti K-gluconato 50 mM, in presenza, all'esterno, di Na-gluconato 50 mM. Il mersalil o il BCH sono stati aggiunti ai proteoliposomi alle concentrazioni indicate, 1 minuto prima della glutammina marcata. Sono state riportate le percentuali dell'attività residua rispetto a campioni di controllo. L'attività di controllo (riferita al trasporto non inibito di [^3H]-glutammina), è $2.9 \pm 0.70 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg proteina}^{-1}$; i dati rappresentano la media \pm S.D. di tre esperimenti.

Nel grafico sono riportate le curve dose-risposta per gli inibitori. Ciascun reagente raggiunge una completa inibizione anche se a concentrazioni molto differenti. Sono stati calcolati i valori di IC₅₀ del trasportatore per ciascun reagente, ed essi risultano essere di $1.4 \pm 0.52 \text{ mM}$ o $2.0 \pm 0.5 \text{ }\mu\text{M}$, rispettivamente, per il BCH o il mersalil.

Sono stati condotti, pertanto, alcuni studi atti a determinare l'influenza che ha il substrato sull'inibizione del trasportatore da parte del mersalil (Fig. 14).

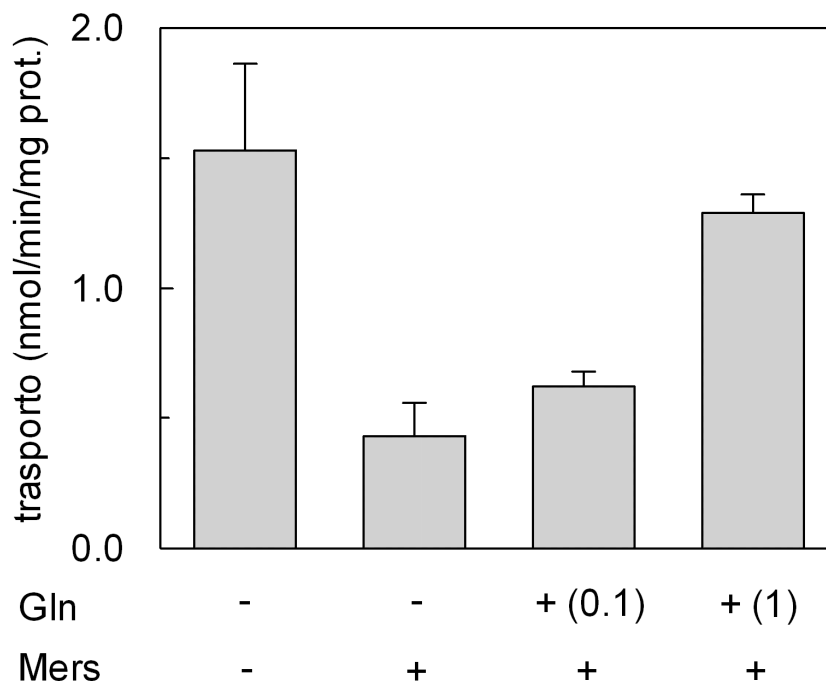


Fig. 14 Influenza del substrato sull'inibizione del trasportatore ricostituito da parte del mersalil. I proteoliposomi ricostituiti sono stati trattati come descritto in figura prima di saggiare il trasporto: la glutamina, alle concentrazioni indicate in parentesi, e/o il mersalil (3 μ M) sono stati aggiunti a campioni di proteoliposomi dove indicato con il segno (+). Tutti i campioni sono stati passati poi attraverso colonne Sephadex G-75 per allontanare il substrato e l'inibitore che non avevano reagito; la velocità del trasporto è stata, poi, misurata come uptake di [3 H]-glutamina, 0.1 mM, in 10 minuti, in proteoliposomi contenenti K-gluconato 50 mM, in presenza, all'esterno, di Na-gluconato 50 mM; i dati rappresentano la media \pm S.D. di tre esperimenti.

Come mostrato in Fig. 14, l'ingresso di [3 H]-glutamina è inibito di circa il 72% quando si aggiunge mersalil 3 μ M, in accordo con i dati riportati nelle figure 12 e 13. La presenza di glutamina 0.1 mM o 1 mM riduce l'inibizione al 60% o al 16%, rispettivamente, indicando che il substrato previene il legame dell'inibitore al trasportatore.

In questi anni di ricerca è stato caratterizzato un altro trasportatore ricostituito, estratto da brush border, che catalizza una reazione di antiport glutamina/amminoacidi, la

proteina ASCT2. Gli studi condotti su questo trasportatore hanno permesso di determinare che esso è attivato dai nucleotidi presenti nel compartimento intraliposomiale (intracellulare) (Oppedisano et al 2004, 2007); pertanto è sembrato opportuno andare a testare l'effetto di ATP, ADP ed AMP sul sistema di trasporto oggetto di questo lavoro di tesi, ovvero B⁰AT1. I nucleotidi sono stati inclusi nel compartimento intraliposomiale o aggiunti all'esterno delle vescicole. L'uptake di [³H]-glutamina non subisce una variazione maggiore del 5% in presenza di ATP, ADP ed AMP, aggiunti a concentrazioni nel range tra 0.1 e 6 mM sia all'interno che all'esterno dei proteoliposomi. Questo indica che nessuno dei nucleotidi esercita un effetto significativo sul trasportatore ricostituito.

3.1.4 Analisi cinetiche

Come descritto in precedenza, il sistema ricostituito, B⁰AT1, catalizza una reazione di uniport Na⁺-dipendente. La direzione del trasporto di glutamina può essere sia dall'esterno verso l'interno che viceversa, per tale ragione sono stati eseguiti alcuni esperimenti atti a determinare la Km che, ciascun sito del trasportatore ricostituito, ha per la glutamina. Per valutare la Km per la glutamina, relativamente al sito esterno del trasportatore, è stata misurata la dipendenza della velocità del trasporto in funzione della concentrazione esterna di glutamina. I dati sperimentali sono stati interpolati mediante l'equazione di Lineweaver-Burk nel grafico dei doppi reciproci (Fig. 15).

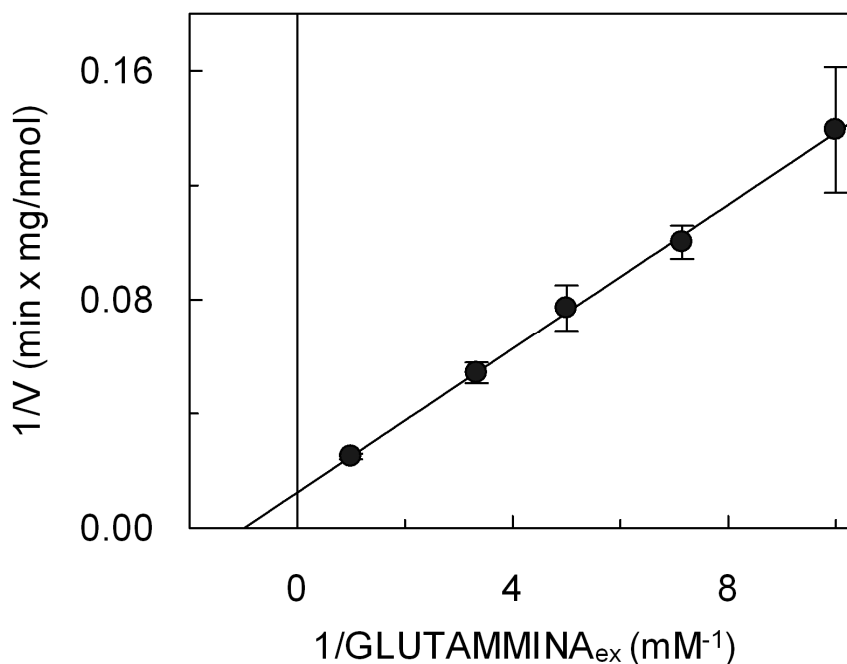


Fig. 15 Dipendenza della velocità di trasporto dalla concentrazione esterna di glutamina. Nel grafico di Lineweaver-Burk è mostrata la dipendenza della velocità di trasporto dalle diverse concentrazioni di [^3H]-glutamina esterna, in 10 minuti, in presenza di K-gluconato 50 mM nel compartimento intraliposomiale, e Na-gluconato esterno 50 mM. Risultati simili sono stati ottenuti in tre differenti esperimenti.

La K_m del trasportatore per la glutamina presente nel compartimento extraliposomiale è stata ricavata dal grafico ed è 1.02 ± 0.84 mM.

Per poter misurare la K_m relativamente al sito interno del trasportatore è stata adottata una procedura differente, in quanto la glutamina marcata con ^3H deve essere aggiunta nello stesso compartimento in cui si trova lo ione Na^+ , ovvero all'esterno dei proteoliposomi. Per tale ragione, prima di tutto, è stato seguito l'ingresso di diverse concentrazioni di [^3H]-glutamina nei proteoliposomi per tempi molto lunghi (420 minuti), cioè fino al raggiungimento dell'equilibrio. Un esempio di questo genere di esperimenti è riportato di seguito in figura 16, in cui l'attività di trasporto è espressa in delta cpm.

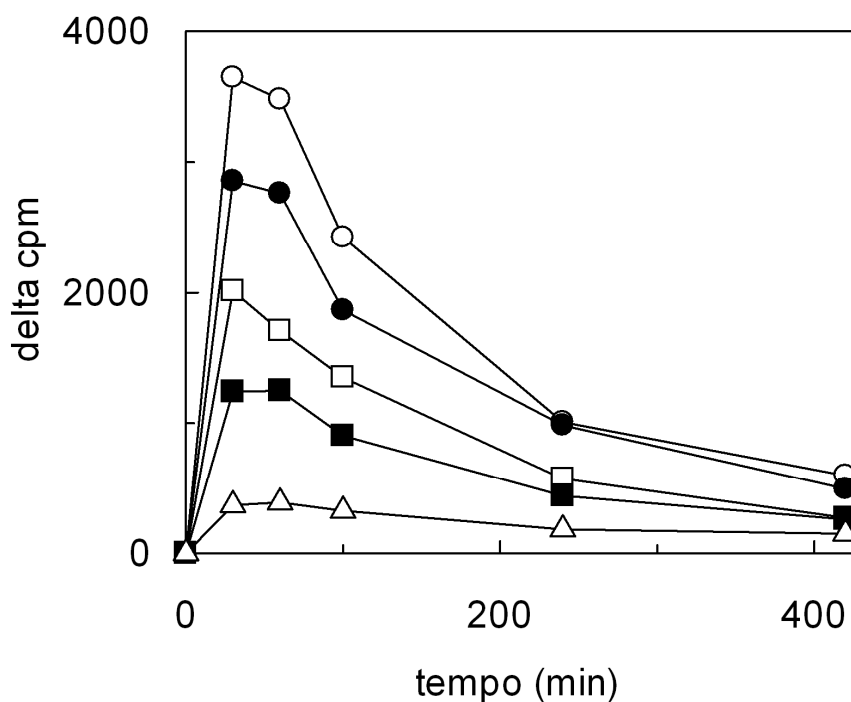


Fig. 16 Dipendenza dal tempo del trasporto di diverse concentrazioni di $[^3\text{H}]$ -glutamina nei proteoliposomi ricostituiti. $[^3\text{H}]$ -glutamina è stata aggiunta, a diverse concentrazioni, insieme con Na-gluconato 50 mM, a tempo zero ai proteoliposomi contenenti K-gluconato 50 mM. Le concentrazioni di $[^3\text{H}]$ -glutamina sono 0.1 (○), 0.2 (●), 0.5 (□), 1 (■) e 5 (△) mM. La reazione di trasporto è stata bloccata agli intervalli di tempo indicati, come descritto in Materiali e metodi.

L'esperimento, riportato sopra, è servito per calcolare i valori di velocità (V) da usare nel grafico dei doppi reciproci al fine di determinare la K_m interna. Dal grafico si evince che, per ogni concentrazione esterna di glutamina, il massimo di attività è registrata a 30 minuti, oltre i quali si assiste al fenomeno di overshoot, descritto in precedenza; in tutte le condizioni l'equilibrio viene raggiunto a 420 minuti. Pertanto, i delta cpm da 30 a 420 minuti sono stati interpolati con un'equazione di decadimento esponenziale da cui, per ciascuna curva, si è ottenuto un valore k , che rappresenta una costante di velocità, ed un *valore iniziale* di cpm. La velocità del trasporto, in ciascuna condizione sperimentale, è stata ottenuta moltiplicando k per il *valore iniziale*, e dividendo tutto per l'*attività specifica* (vedi Materiali e metodi) ed i *mg di proteina*. Per poter interpolare i dati con l'equazione di Lineweaver-Burk ed ottenere il valore di K_m interna, è stato necessario ricavare un altro parametro, ovvero le diverse concentrazioni

di glutammina interna, che sono state ricavate indirettamente da quelle di substrato radioattivo presente nel compartimento extraliposomiale. I valori delle concentrazioni interne usate come *valore iniziale* di substrato sono stati ottenuti dividendo i delta cpm a 30 minuti, condizione nella quale le concentrazioni di glutammina all'interno sono maggiori di quelle all'esterno dei proteoliposomi, per i delta cpm a 420 minuti, stato di equilibrio in cui le concentrazioni di glutammina all'interno dei proteoliposomi eguagliano le concentrazioni esterne; il valore ottenuto è stato moltiplicato per le corrispondenti concentrazioni di [³H]-glutammina aggiunte all'esterno delle vescicole a tempo zero. I dati relativi alle velocità ed alle concentrazioni di glutammina interna, ottenute come descritto, sono state interpolate con l'equazione dei doppi reciproci ottenendo il grafico riportato in figura 17.

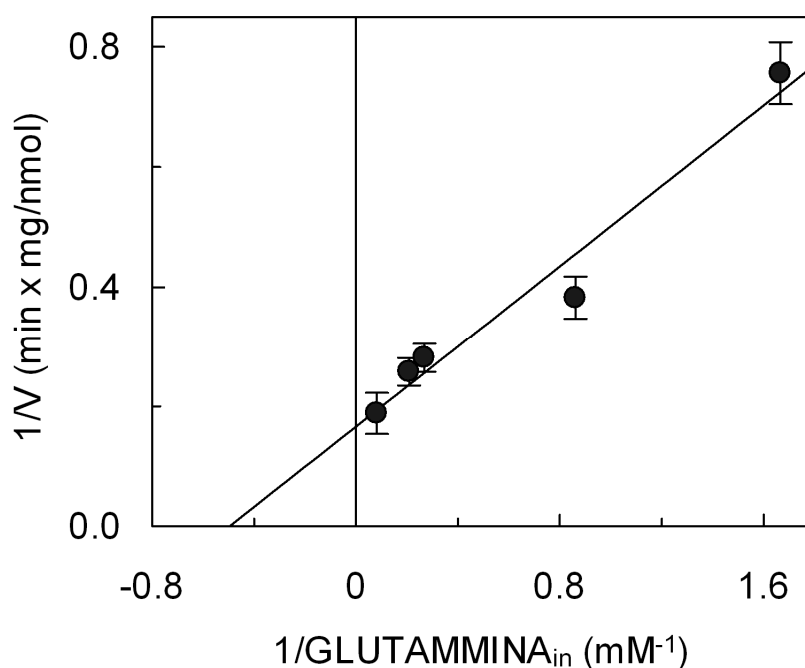


Fig. 17 Dipendenza della velocità di trasporto dalla concentrazione interna di glutammina. Nel grafico di Lineweaver-Burk è mostrata la dipendenza della velocità di trasporto dalle diverse concentrazioni di glutammina interna, in 10 minuti, in presenza di K-gluconato 50 mM nel compartimento intraliposomiale, e Na-gluconato esterno 50 mM. Risultati simili sono stati ottenuti in tre differenti esperimenti.

La K_m del sito interno del trasportatore per la glutammina è 2.0 ± 0.40 mM.

3.1.5 Il cotrasporto sodio-glutammina

Nell'uniport di glutammina Na^+ -dipendente, la concentrazione di Na^+ potrebbe influenzare la K_m per la glutammina e viceversa. Per ottenere chiarimenti su questo aspetto, il cotrasporto glutammina- Na^+ è stato analizzato mediante un'analisi cinetica pseudo bi-substrato (Segel 1975; Cleland 1970; Indiveri et al 2001; Oppedisano et al 2007), variando le concentrazioni dei due substrati esterni, glutammina e Na^+ . Le velocità del trasporto sono riportate in grafici dei doppi reciproci (grafici di Lineweaver-Burk), in funzione della concentrazione di glutammina esterna (Fig. 18) o della concentrazione di Na^+ esterno (Fig. 19).

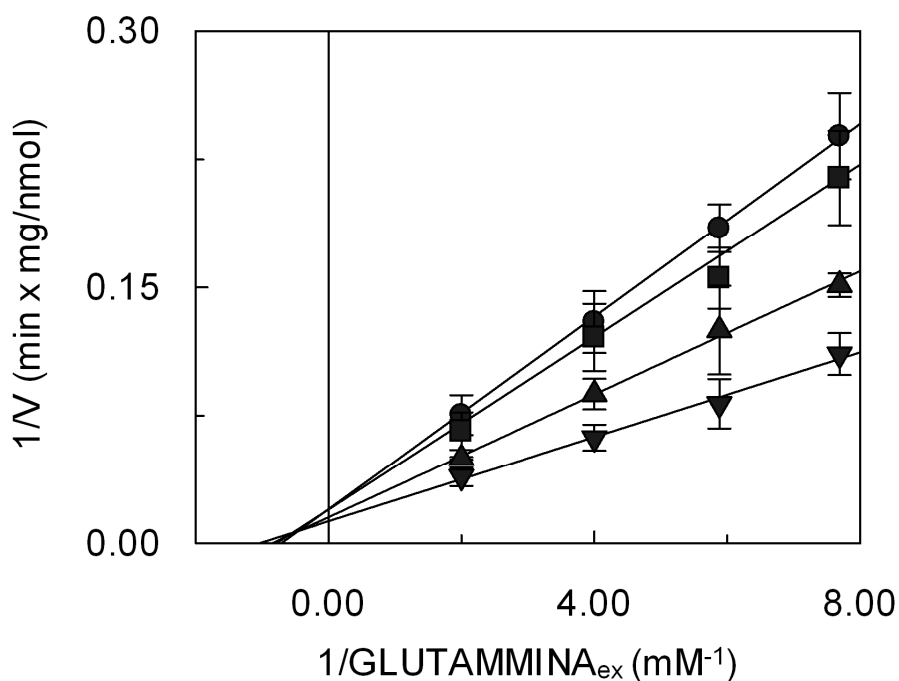


Fig. 18 Analisi a due substrati del cotrasporto glutammina- Na^+ mediato dal trasportatore della glutammina/amminoacidi neutri ricostituito. Nel grafico di Lineweaver-Burk è mostrata la dipendenza della velocità dell'uniport glutammina_{ex}- Na^+ _{ex} dalla concentrazione di glutammina esterna, in presenza di K-gluconato 50 mM nel compartimento intraliposomiale. Le concentrazioni di Na-gluconato sono: 6 (●), 8 (■), 13 (▲) e 25 (▼) mM. Risultati simili sono stati ottenuti in tre differenti esperimenti.

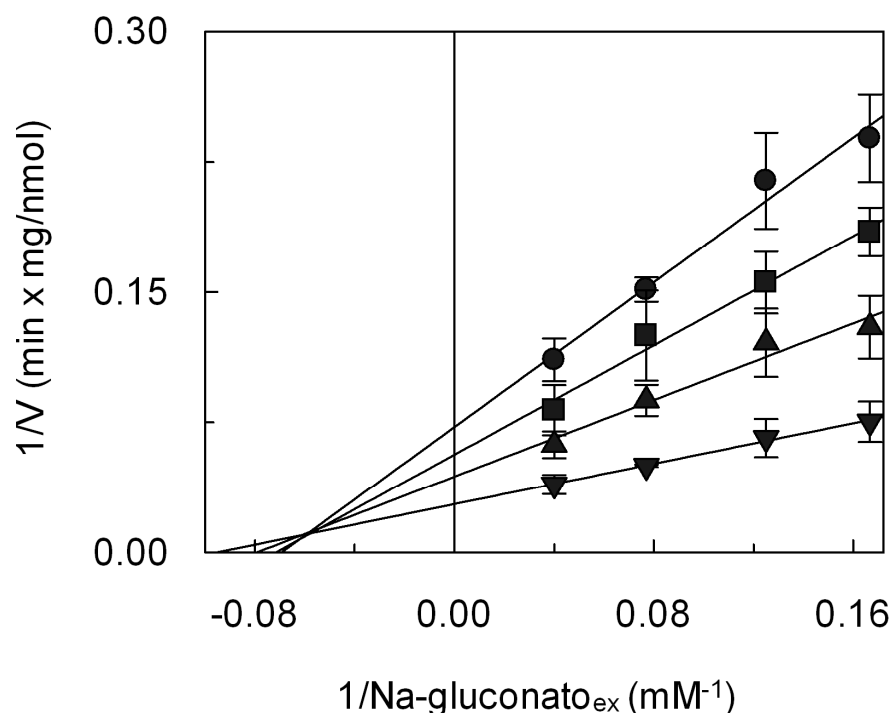


Fig. 19 Analisi a due substrati del cotrasporto glutamina- Na^+ mediato dal trasportatore della glutamina/amminoacidi netri ricostituito. Nel grafico di Lineweaver-Burk è mostrata la dipendenza della velocità dell'uniport $\text{glutammina}_{\text{ex}}-\text{Na}^+_{\text{ex}}$ dalla concentrazione di Na-gluconato esterno, in presenza di K-gluconato 50 mM nel compartimento intraliposomiale. Le concentrazioni di glutamina sono: 0.13 (●), 0.17 (■), 0.25 (▲) e 0.5 (▼) mM. Risultati simili sono stati ottenuti in tre differenti esperimenti.

I valori di K_m per la glutamina e lo ione Na^+ , del sito esterno del trasportatore, sono stati ricavati dai grafici di figura 18 e 19 e sono risultati essere nel range tra 0.97–1.7 mM per la glutamina, e tra 11–14 mM per il sodio.

Le intercette delle rette con l'ascissa, in entrambi i grafici, sono molto vicine tra di loro, indicando che la concentrazione di Na^+ non ha, quasi, nessuna influenza sulla K_m del trasportatore per la glutamina esterna e la concentrazione di glutamina non ha, quasi, nessuna influenza sulla k_m per lo ione Na^+ . I pattern di rette che si intersecano indicano che il cotrasporto glutamina- Na^+ segue un meccanismo di tipo simultaneo. In questo meccanismo i due substrati sono traslocati contemporaneamente sul lato opposto della membrana, in maniera diversa rispetto al meccanismo ping-pong, nel quale la traslocazione dei substrati avviene in diversi step consecutivi. Le K_m concentrazione

indipendente per la glutammina e lo ione Na^+ esterni, e i valori di K_{is} , (costante di dissociazione del complesso pseudo-binario trasportatore-substrato), possono essere dedotti dai grafici secondari, ottenuti riportando in grafico i valori delle intercette sull'asse delle ordinate o le pendenze delle rette di Fig. 18 e 19, in funzione dei reciproci delle concentrazioni di substrato. I valori di K_m e K_{is} , estrapolati dai replot, sono molto vicini ai valori di K_m ottenuti sperimentalmente sia per la glutammina esterna che per lo ione Na^+ . Pertanto, l'affinità del trasportatore per i substrati è simile, sia se esso è in forma libera sia se legato al secondo substrato. Inoltre, il rapporto tra K_m e K_{is} per ciascun substrato è costante e vicino ad 1. Queste caratteristiche, insieme con l'aver trovato intersezioni comuni vicino all'ascissa (Fig. 18 e 19), sono tipiche del meccanismo simultaneo tipo random (Segel 1975; Cleland 1970; Indiveri et al 2001; Oppedisano et al 2007) nel quale, diversamente dal meccanismo ordinato, i substrati si legano al trasportatore senza alcun ordine preferenziale.

3.2 Discussione

Il sistema di trasporto glutammina/amminoacidi neutri (B⁰AT1) di membrana plasmatica è stato studiato in questo lavoro per ottenere informazioni sulla funzione e sul meccanismo di trasporto della proteina. Il sistema di trasporto, solubilizzato dalla membrana plasmatica di cellule renali e ricostituito in liposomi, catalizza un simporto elettrogenico di glutammina con Na⁺. Per monitorare l'attività del trasportatore ricostituito è stata usata, preferenzialmente, la [³H]-glutammina in quanto è più idrofila e, conseguentemente, meno permeabile alle vescicole fosfolipidiche di altri amminoacidi neutri come leucina e fenilalanina. Grazie a questa caratteristica il background di radioattività, cioè, l'uptake non mediato da proteina (diffusione), usando la [³H]-glutammina, è quasi insignificante, ma paragonabile al segnale di trasporto usando [³H]-leucina. Per realizzare gli studi funzionali ci siamo avvalsi di un metodo che si basa sulla ricostituzione della proteina in liposomi mediante una tecnica di rimozione del detergente partendo da micelle miste di proteina, detergente e fosfolipidi (Kramer et al 1986; Palmieri et al 1995). Questa procedura sperimentale, messa a punto per la ricostituzione dei trasportatori mitocondriali, è stata recentemente modificata, dal nostro gruppo di ricerca, ed usata con successo per condurre studi funzionali su due trasportatori di membrana plasmatica, il trasportatore glutammina/amminoacidi (ASCT2) ed il trasportatore di carnitina (OCTN2) (Oppedisano et al 2004, 2007; Pochini et al 2004). Il sistema dei proteoliposomi presenta alcuni vantaggi rispetto ai sistemi cellulari, come la possibilità di controllare le condizioni sperimentali nel compartimento interno, la riduzione di interferenze dovute all'assenza virtuale di enzimi interni ed esterni. Questo tipo di procedura di ricostituzione, inoltre, determina la formazione di proteoliposomi più grandi rispetto a quelli ottenuti con altri metodi quali la freeze-thaw-sonication; questa caratteristica permette di aumentare l'accumulo di

radioattività nelle vescicole (Oppedisano et al 2004, 2007; Kramer et al 1986; Palmieri et al 1995; Pochini et al 2004). Il trasportatore ricostituito è stato classificato come B⁰-like in quanto le sue proprietà funzionali di base corrispondono a quelle di B⁰AT1, espresso e caratterizzato in sistemi cellulari (Broer et al 2004; Camargo et al 2005; O'Mara et al 2006): la dipendenza da Na⁺, la bassa tolleranza per Li⁺, l'indipendenza da Cl⁻, il simporto elettrogenico come modalità di trasporto, la specificità per gli aminoacidi neutri, la mancanza di inibizione da parte di aminoacidi carichi. Inoltre, il grado di inibizione esercitato dagli aminoacidi neutri sia sul trasporto di [³H]-glutamina sia su quello di [³H]-leucina, è simile a quello descritto per il trasportatore B⁰AT1 in cellule intatte. Anche se l'estratto di brush-border ricostituito potrebbe contenere altre proteine di trasporto, l'attività del trasportatore ricostituito B⁰-like è discriminata usando appropriate condizioni sperimentali: la glutamina marcata è usata per testare il trasporto, così da escludere altri trasportatori che non accettano questo aminoacido; il sistema ricostituito è ottimizzato rispetto ai parametri quali il detergente, la concentrazione di fosfolipidi e proteina, che sono critici per ogni singolo trasportatore (Oppedisano et al 2004, 2007; Pochini et al 2004); inoltre, l'uso del reagente tiolico mersalil ha permesso di sottrarre la diffusione non specifica non mediata dal trasportatore. Specifiche differenze funzionali permettono di escludere che il trasportatore ricostituito possa corrispondere ad altri trasportatori conosciuti specifici per la glutamina. In particolare si può escludere, per molte ragioni, che l'attività di trasporto misurata possa essere dovuta, anche se in parte, al trasportatore ASCT2 ricostituito, dal nostro gruppo di ricerca in precedenza (Oppedisano et al 2004, 2007): i) il sistema di trasporto ASCT2 catalizza un antiport di substrati senza nessuna misurabile attività di uptake netto; ii) le condizioni ottimali per la ricostituzione del trasportatore B⁰-like sono diverse da quelle per ASCT2; iii) il glutammato ed il reagente dei gruppi

NH₂, il PLP, che inibiscono ASCT2, non inibiscono il trasportatore B⁰-like; iv) differentemente da B⁰-like, il trasportatore ricostituito ASCT2 è attivato dai nucleotidi presenti nel compartimento intraliposomiale ma non dal K⁺. Può anche essere esclusa la presenza di attività di altri trasportatori conosciuti di glutammina. Differentemente dal trasportatore B⁰-like ricostituito, i sistemi L e b^{0,+} sono Na⁺-indipendenti; il sistema A mostra trans-inibizione e sensibilità per il MeAIB; il sistema y⁺L mostra Li⁺ tolleranza e specificità per gli amminoacidi cationici; il sistema N mostra Li⁺ tolleranza, differente specificità verso gli amminoacidi rispetto al trasportatore B⁰-like ed è elettroneutro; il sistema B^{0,+} mostra specificità verso gli amminoacidi cationici e Cl⁻ dipendenza (Palacin et al 1998; Broer 2002, 2008; Mackenzie et al 2004; Kanai et al 2004; Verrey et al 2005; Bode 2001; McGivan et al 2007); l'isoforma B⁰, B⁰AT2, differentemente dal trasportatore ricostituito, si è dimostrato in precedenza non essere inibito da Cys, Tyr, Trp, Gly, inibito poco da Gln e Ser ma inibito fortemente da Pro (Broer 2006, 2008; Broer et al 2006). La fonte del trasportatore ricostituito corrisponde alla localizzazione cellulare di B⁰AT1. L'alto livello di espressione nel rene (Broer et al 2004; O'Mara et al 2006; Romeo et al 2006) ben si correla con l'attività di trasporto più alta del trasportatore B⁰-like ricostituito rispetto agli altri trasportatori di rene di ratto ricostituiti, ASCT2 ed OCTN2, sotto simili condizioni sperimentali (Oppedisano et al 2004, 2007; Pochini et al 2004).

Il trasportatore B⁰-like è orientato nelle vescicole ricostituite come nella membrana nativa, come si può dedurre dalla dipendenza da Na⁺ presente nel compartimento extraliposomiale, ma non in quello intraliposomiale. I dati sperimentali suggeriscono che 1 ione Na⁺ è cotrasportato con la glutammina, in accordo con i dati riportati per il trasportatore B⁰AT1 nel sistema cellulare (Camargo et al 2005). Un'interessante caratteristica del trasportatore ricostituito è la dipendenza dal K⁺ intraliposomiale che, in

vivo, corrisponde al K^+ intracellulare. Alcune evidenze sperimentali suggeriscono che K^+ non è trasportato ma può agire come un modulatore: i) la velocità di trasporto decresce a concentrazioni di K^+ superiori a 50 mM, indicando che il K^+ interno non è scambiato con [3H]-glutamina esterna; ii) l'attivazione si ha anche in assenza del gradiente K^+_{in}/K^+_{out} ; iii) l'uptake di Na^+ accoppiato alla [3H]-glutamina si ferma dopo circa 1 h anche in presenza di K^+ intraliposomiale, dovuto alla generazione di un potenziale di membrana positivo all'interno e si riprende solo dopo la successiva aggiunta di valinomicina che determina l'efflusso di K^+ ; iv) l'elettrogenicità del trasporto non dipende dalla concentrazione di K^+ . La dipendenza dal K^+ intracellulare è stata, in precedenza, descritta per i trasportatori del glutammato (Kanai et al 2004; Broer 2008). In particolare, è riportato che il K^+ è trasportato nel caso del trasportatore del glutammato neuronale e renale (Kanai et al 2004; Heinz et al 1988; Danbolt 2001), mentre il catione non è trasportato dal trasportatore glutammato/aspartato degli enterociti (Scalera et al 2002).

Il ruolo fisiologico della dipendenza dal K^+ del trasportatore B^0 -like può essere riportata come segnale della condizione metabolica della cellula. La concentrazione intracellulare di K^+ è influenzata da una complessa regolazione dei canali apicali del K^+ nel rene, che sono attivati a concentrazioni di ATP sub-millimolare ed inibiti a concentrazioni più alte (millimolare) (Giebisch 2001). Di conseguenza la concentrazione di K^+ intracellulare diminuirà o aumenterà, rispettivamente, a più bassi o più alti livelli di ATP. In questo modo, il K^+ può modulare l'attività del trasportatore B^0 -like in risposta al livello di ATP. La modulazione da ATP è stata in precedenza trovata per l'ASCT2 ricostituito, che è direttamente stimolato da livelli più alti di ATP intracellulare (Oppedisano et al 2004, 2007). Visto che B^0AT1 ed ASCT2 mediano l'uniport o l'antiport di amminoacidi neutri, rispettivamente, il complesso meccanismo di

modulazione della loro attività regolerà il bilancio tra uptake netto e scambio di amminoacidi in risposta allo stato metabolico della cellula. Questo cross-talk tra B⁰AT1 ed ASCT2 insieme con la peculiare specificità di ASCT2 per il glutammato (Oppedisano et al 2007; Utsunomiya-Tate et al 1996) è a favore del trasporto attivo terziario, recentemente proposto da Broer, trasporto che coinvolge l'antiport di glutammato esterno con amminoacidi neutri interni mediato da ASCT2, seguito dal reuptake di amminoacidi neutri attraverso B⁰AT1 (Broer 2008).

Il range di pH ottimale trovato per il sistema ricostituito è diverso da quello trovato per B⁰AT1 overespresso nel sistema cellulare. Questa discrepanza può essere dovuta all'effetto dell'uptake massivo di amminoacidi sul metabolismo o ad alcune interferenze tra canali o trasportatori nelle cellule, che possono cambiare il pH intracellulare o la composizione ionica.

L'analogo dell'amminoacido BCH inibisce il trasportatore ricostituito in maniera più efficiente rispetto a B⁰AT1 nel sistema cellulare (Broer et al 2004). La differenza potrebbe essere dovuta a condizioni sperimentali modificate dovute all'uptake di BCH mediato da alcuni dei tanti sistemi di trasporto della membrana cellulare.

Reagenti specifici dei gruppi tiolici inibiscono il trasportatore ricostituito, come in precedenza trovato per ASCT2, indicando che alcune Cys potrebbero essere coinvolte nella funzione di trasporto. Il trasportatore è molto sensibile nei confronti dei composti mercuriali, ma non verso maleimmide e MTSET. Si può ipotizzare che i residui SH coinvolti nell'inibizione potrebbero essere localizzati in una piccola porzione della proteina, accessibile ai residui Hg⁺ degli inibitori, ma non alle molecole complete di N-etilmaleimmide o MTSET che, di conseguenza, non possono venire in stretto contatto con i residui SH per l'alchilazione della proteina. Dato che il mersalil è idrofilico, si può dedurre che i residui di Cys responsabili dell'inibizione siano esposti sulla faccia

esterna del trasportatore. Questo è in accordo con il profilo idropatico della proteina B⁰AT1 di topo (Broer et al 2004) (che è per il 96% identica all'ortologa di ratto), che predice la presenza di 4 grandi loop idrofilici esposti verso il lato esterno della cellula, che contiene 6 dei 19 (18 nell'ortologa di ratto) residui di Cys della proteina. La protezione dell'inibizione del mersalil da parte del substrato indica che i residui di Cys responsabili dell'interazione dell'inibitore con la proteina sono localizzati vicino al sito di legame del substrato; sulla base di ciò si può escludere che i composti mercuriali possano interagire con un'ipotetica proteina accessoria del sistema di trasporto.

Con il sistema ricostituito è stato possibile caratterizzare il trasportatore anche da un punto di vista cinetico, andando a misurare la K_m esterna ma, soprattutto, la K_m interna. In questo lavoro di tesi, inoltre, è stato trovato che il cotrasporto glutamina-Na⁺ avviene con una stechiometria di 1:1. La concentrazione di Na⁺ non ha quasi nessuna influenza sull'affinità del trasportatore per la glutamina e viceversa. La reazione catalizzata dal trasportatore glutamina/amminoacidi neutri (B⁰AT1) può essere assimilata ad una reazione a due substrati nella quale la glutamina esterna, lo ione Na⁺ esterno sono i due substrati. Questo caso particolare di meccanismo cinetico può essere analizzato mediante combinazioni di analisi di pseudo bi-substrato nelle quali le concentrazioni dei due substrati esterni sono variate contemporaneamente (Segel 1975; Cleland 1970). Questo tipo di analisi cinetica può essere applicata ad altri sistemi di trasporto (Indiveri et al 2001; Oppedisano et al 2007).

L'analisi pseudo bi-substrato del cotrasporto glutamina/Na⁺ permette una chiara spiegazione del meccanismo cinetico del trasporto catalizzato dal trasportatore glutamina/amminoacidi neutri confermando che esso è simultaneo random. Questo meccanismo implica la formazione di un complesso che coinvolge una molecola di trasportatore con una di glutamina (o altri amminoacidi, sul lato esterno della

proteina) ed una di Na⁺ (sul lato esterno). La formazione di questo complesso non richiede nessun ordine preferenziale per il legame dei substrati e le due molecole sono traslocate contemporaneamente (Segel 1975; Indiveri et al 2001; Oppedisano et al 2007). Quindi, la proteina di trasporto dovrebbe avere due siti esterni, uno per l'amminoacido, l'altro per lo ione Na⁺.

Il sistema ricostituito fornisce un mezzo per l'analisi di trasportatori B⁰-like espressi in maniera eterologa. Ciò aiuterà ad ottenere informazioni sulle proprietà funzionali di trasportatori orfani che potrebbero essere espressi nel rene ed in altri tessuti ed essere filogeneticamente correlati con il sistema di trasporto B⁰AT1 (Romeo et al 2006; Broer 2006). Inoltre, il sistema ricostituito permetterebbe di indagare sul ruolo di subunità accessorie nella funzione di trasportatori di amminoacidi B⁰-like, come per esempio la collectrina per B⁰AT1 (Danilczyk et al 2006).

BIBLIOGRAFIA

Abramson et al (2003) Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science* 301(5633):610-615.

Asano et al (1991) The role of N-glycosylation of GLUT1 for glucose transport activity. *J Biol Chem.* 266(36):24632-24636.

Avissar et al (2001) Na⁺-dependent neutral amino acid transporter ATB^o is a rabbit epithelial cell brush-border protein. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 281:C963-C971.

Biber et al (1981) A high yeald preparation for rat kidney brush border membranes. Different behaviour of lysosomal markers. *Biochim. Biophys. Acta* 647:169-176.

Bode (2001) Recent molecular advances in mammalian glutamine transport. *J. Nutr.* 131:2475S-2485S.

Bohmer et al (2005) Characterization of mouse amino acid transporter B0AT1 (slc6a19). *Biochem. J.* 389: 745–751.

Broer et al (1999) The astroglial ASCT2 amino acid transporter as a mediator of glutamine efflux. *J. Neurochem.* 73:2184- 2194.

Broer et al (2000) Neutral amino acid transporter ASCT2 displays substrate-induced Na⁺ exchange and a substrate-gated anion conductance. *Biochem. J.* 346:705- 710.

Broer (2002) Adaptation of plasma membrane amino acid transport mechanisms to physiological demands. *Pflugers Arch.* 444:457-466.

Broer et al (2004) Molecular cloning of mouse amino acid transport system B⁰, a neutral amino acid transporter related to hartnup disorder. *J. Biol. Chem.* 279: 24467–24476.

Broer (2006) The SLC6 orphans are forming a family of amino acid transporters. *Neurochem. Int.* 48: 559–567.

Broer et al (2006) The orphan transporter v7-3 (slc6a15) is a Na⁺-dependent neutral amino acid transporter (B0AT2). *Biochem. J.* 393: 421–430.

Broer (2008) Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiol. Rev.* 88: 249–286.

Brutovetsky (1994) The reconstituted ADP/ATP carrier can mediate H⁺ transport by free fatty acids, which is further stimulated by mersalyl. *J Biol Chem.* 269(44):27329-27336.

Brutovetsky (1996) Mitochondrial ADP/ATP carrier can be reversibly converted into a large channel by Ca²⁺. *Biochemistry.* 35(26):8483-8488.

Bungard et al (2004) Glutamine availability up-regulates expression of the amino acid transporter protein ASCT2 in HepG2 cells and stimulates the ASCT2 promoter. *Biochem. J.* 382: 27-32.

Cai et al (2005) The role of N-glycosylation in the stability, trafficking and GABA-uptake of GABA-transporter 1. Terminal N-glycans facilitate efficient GABA-uptake activity of the GABA transporter. *FEBS J.* 272(7):1625-1638.

Camargo et al (2005) Steady-state kinetic characterization of the mouse B⁰AT1 sodium-dependent neutral amino acid transporter. *Pflugers Arch – Eur J Physiol* 451: 338–348.

Cleland (1970) in: P.D. Boyer (Ed.), *The Enzymes*, vol. 2, Academic Press, New York, 1–65.C.

Danbolt (2001) Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 65: 1–105.

Danilczyk et al (2006) Essential role for collectrin in renal amino acid transport. *Nature* 444: 1088–1091.

Di Virgilio et al (1989) Organic-anion transport inhibitors to facilitate measurement of cytosolic free Ca^{2+} with fura-2. *Methods Cell Biol.* 31:453-462.

Diamond (1987) Adaptive regulation of intestinal nutrient transporters. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:2242-2245.

Dierks et al (1990a) The mitochondrial aspartate/glutamate and ADP/ATP carrier switch from obligate counterexchange to unidirectional transport after modification by SH-reagents. *Biochim Biophys Acta.* 1028(3):268-280.

Dierks et al (1990b) Pore-like and carrier-like properties of the mitochondrial aspartate/glutamate carrier after modification by SH-reagents: evidence for a performed channel as a structural requirement of carrier-mediated transport. *Biochim Biophys Acta.*1028(3):281-288.

Diop et al (2005) N-Linked glycosylation of the human ABC transporter ABCG2 on asparagine 596 is not essential for expression, transport activity, or trafficking to the plasma membrane. *Biochemistry.* 44(14):5420-5429.

Dolinska et al (2003) Glutamine transport in C6 glioma cells shows ASCT2 system characteristics. *Neurochem. Int.* 43:501– 507.

Dolinska et al (2004) Glutamine uptake and expression of mRNA's of glutamine transporting proteins in mouse cerebellar and cerebral cortical astrocytes and neurons. *Neurochem. Int.* 44:75– 81.

Doyle et al (1992) The bovine renal epithelial cell line NBL-1 expresses a broad specificity $\text{Na}^{(+)}$ -dependent neutral amino acid transport system (System B⁰) similar to that in bovine renal brush border membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta.* 1104(1):55-62.

Fiermonte et al (2001) Identification of the human mitochondrial oxodicarboxylate carrier. Bacterial expression, reconstitution, functional characterization, tissue distribution, and chromosomal location. *J. Biol Chem.* 276 (2001) 8225– 8230.

Fiermonte et al (2002) Identification of the mitochondrial glutamate transporter. Bacterial expression, reconstitution, functional characterization, and tissue distribution of two human isoforms. *J. Biol. Chem.* 277:19289– 19294.

Fuchs et al (2005) Amino acid transporters ASCT2 and LAT1 in cancer: Partners in crime? *Seminars in Cancer Biology* 15: 254-266 Review.

Galluccio et al (2009) Over-expression in *E. coli* and purification of the human OCTN1 transport protein. *Protein Expression and Purification* 68: 215-220.

Giebisch (2001) Renal potassium channels: function, regulation, and structure. *Kidney Int.* 60: 436–445.

Hayashi et al (2005) Two common PFIC2 mutations are associated with the impaired membrane trafficking of BSEP/ABCB11. *Hepatology.* 41(4):916-924.

Heinz et al (1988) Electrogenicity of sodium/L-glutamate cotransport in rabbit renal brush-border membranes: a reevaluation. *Biochim. Biophys. Acta* 937: 300–308.

Hosoyamada et al (2004) Function and localization of urate transporter 1 in mouse kidney. *J Am Soc Nephrol.* 15(2):261-268.

Hruz et al (2000) Cysteine-scanning mutagenesis of transmembrane segment 11 of the GLUT1 facilitative glucose transporter. *Biochemistry.* 39(31):9367-9372.

Huang et al (2003) Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*. *Science* 301(5633):616-620.

Huizing et al (1997) Cloning of the Human Carnitine-Acylcarnitine Carrier cDNA and Identification of the molecular defect in a patient. *Am J Hum Genet* 61:1239-1245.

Indiveri et al (1991a) Characterization of the unidirectional transport of carnitine catalyzed by the reconstituted carnitine carrier from rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 1069(1):110-6.

Indiveri et al (1991b) Kinetic characterization of the reconstituted carnitine carrier from rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1065:231-238.

Indiveri et al (1998) Bacterial overexpression, purification, and reconstitution of the carnitine/acylcarnitine carrier from rat liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 249(3): 589-594.

Indiveri et al (2001) Kinetic mechanism of antiports catalyzed by reconstituted ornithine/citrulline carrier from rat liver mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta* 1503: 303-313.

Kanai et al (2004) The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflugers Arch.* 447:469-479.

Karinch et al (2002) Regulation of expression of the SN1 transporter during renal adaptation to chronic metabolic acidosis in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F1011-F1019.

Kasahara et al (1996) Expression of the rat GLUT1 glucose transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J* 315:177-182.

Kleta et al (2004) Mutations in SLC6A19, encoding B⁰AT1, cause Hartnup disorder. *Nat. Genet.* 36: 999–1002.

Kramer et al (1986) Functional reconstitution of carrier proteins by removal of detergent with a hydrophobic ion exchange column. *Biochim. Biophys. Acta* 863:289-296.

Krupka (1994) Interpreting the effects of site-directed mutagenesis on active transport systems. *Biochim Biophys Acta* 1193(1):165-178.

Li et al (2004) The role of N-glycosylation in function and surface trafficking of the human dopamine transporter. *J Biol Chem.* 279(20):21012-21020.

Mackenzie et al (2004) Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. *Pflugers Arch.* 447:784-795.

Marobbio et al (2002) Identification and reconstitution of the yeast mitochondrial transporter for thiamine pyrophosphate. *EMBO J.* 21:5653–5661.

Mawe (1965) The exchange of ¹⁴C-glucose across the membrane of the human erythrocyte. *J Cell Physiol.*66(1):95-103.

McGivan et al (2007) The transport of glutamine into mammalian cells. *Front. Biosci.* 12: 874–882.

Nunez et al (1994) Structural analysis and functional role of the carbohydrate component of glycine transporter. *J Biol Chem.* 269(24):16920-16924.

O'Mara et al (2006) Mechanism and putative structure of B(0)-like neutral amino acid transporters. *J. Membr. Biol.* 213: 111–118.

Oppedisano et al (2004) Reconstitution into liposomes of the glutamine/amino acid transporter from renal cell plasma membrane: functional characterization, kinetics and activation by nucleotides. *Biochim. Biophys. Acta* 1667: 122–131.

Oppedisano et al (2007) The glutamine/amino acid transporter (ASCT2) reconstituted in liposomes: transport mechanism, regulation by ATP and characterization of the glutamine/glutamate antiport. *Biochim. Biophys. Acta* 1768: 291–298.

Oppedisano and Indiveri (2008) Reconstitution into liposomes of the B⁰-like glutamine-neutral amino acid transporter from renal cell plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1778: 2258-2265.

Palacin et al (1998) Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol. Rev.* 78:969-1054.

Palacin et al (2005) The genetics of heteromeric amino acid transporters. *Physiology* 20:112-24. Review.

Palmieri et al (1995) Mitochondrial metabolite carrier proteins: purification, reconstitution, and transport studies. *Methods Enzymol.* 260:349– 369.

Palmieri et al (2000) Yeast mitochondrial carriers: bacterial expression, biochemical identification and metabolic significance. *J. Bioenerg. Biomembranes* 32:67– 77.

Palmieri et al (2004) The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflugers Arch* 447:689-709.

Pao et al (1998) Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62(1):1-34. Review.

Pebay-Peyroula et al (2003) Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature* 426(6962):39-44.

Picault et al (2002) Identification of a novel transporter for dicarboxylates and tricarboxylates in plant mitochondria. Bacterial expression, reconstitution, functional characterization, and tissue distribution. *J. Biol. Chem.* 277:24204– 24211.

Pochini et al (2004) Reconstitution into liposomes and functional characterization of the carnitine transporter from renal cell plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1661: 78–86.

Pollard et al (2002) Identification of a plasma membrane glutamine transporter from the rat hepatoma cell line H4-IIIE-C3. *Biochem. J.* 368:371– 375.

Quick et al (2003) Employing *Escherichia coli* to functionally express, purify, and characterize a human transporter. *PNAS.* 99(13):8597–8601.

Reithmeier (1993) The erythrocyte anion transporter (band 3). *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3, 515-523.

Rogers et al (2003) Glucose transporter GLUT12-functional characterization in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 308(3):422-426.

Romeo et al (2006) Luminal kidney and intestine SLC6 amino acid transporters of B0AT-cluster and their tissue distribution in *Mus musculus*. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 290: F376–F383.

Saier (1999) Eukariotic Transmembrane Solute Transport System. *International Review of Cytology* 190:60-136.

Saurin et al (1999) Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J Mol Evol* 48(1):22-41.

Scalera et al (2002) The kinetic mechanism of the glutamate-aspartate carrier in rat intestinal brush-border membrane vesicles: the role of potassium. *J. Bioenerg. Biomembr.* 34: 95–103.

Schwarz et al (1994) Ion channel properties of the reconstituted chloroplast triose phosphate/phosphate translocator. *J Biol Chem.*269(47):29481-29489.

Segel (1975) in: *Enzyme Kinetics*, Wiley, New York, 274-320.

Seow et al (2004) Hartnup disorder is caused by mutations in the gene encoding the neutral amino acid transporter SLC6A19. *Nat. Genet.* 36: 1003–1007.

Sharom (1997) The P-glycoprotein multidrug transporter: interactions with membrane lipids, and their modulation of activity. *Biochem Soc Trans.* 3:1088-1096.

Stein (1967) *The movement of molecules across cell membranes.* Academic Press New York.

Straumann et al (2006) Effects of N-linked glycosylation on the creatine transporter. *Biochem J.* 393:459-469

Tanaka et al (2004) Role of glycosylation in the organic anion transporter OAT1. *J Biol Chem.* 279(15):14961-14966.

Tonazzi et al (2006) Functional reconstitution into liposomes and characterization of the carnitine transporter from rat liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1758: 124-131.

Torres-Zamorano et al (1998) Sodium-dependent homo- and hetero-exchange of neutral amino acids mediated by the amino acid transporter ATB⁰. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245:824– 829.

Utsunomiya-Tate et al (1996) Cloning and functional characterization of a system ASC-like Na⁺-dependent neutral amino acid transporter. *J. Biol. Chem.* 271:14883–14890.

Verrey et al (2005) Novel renal amino acid transporters. *Annu. Rev. Physiol.* 67:557–72

Wallmeier et al (1992) Insight into the Structure of the Chloroplast Phosphate Translocator Protein. In “Transport and Receptor Proteins of Plant Membranes” (D.T. Cooke and D.T. Clarkson, eds), Plenum, New York.

Wang et al (1999) Mutations in the organic cation/carnitine transporter OCTN2 in primary carnitine deficiency. *Proc Natl Acad Sci* 96:2356-2360.

Wasa et al (2002) Characterization of L-glutamine transport by a human neuroblastoma cell line. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C1246-C1253.



Reconstitution into liposomes of the B^o-like glutamine-neutral amino acid transporter from renal cell plasma membrane

Francesca Oppedisano, Cesare Indiveri*

Department of Cell Biology, University of Calabria, Via P. Bucci 4c, 87036 Arcavacata di Rende, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 March 2008

Received in revised form 20 May 2008

Accepted 27 May 2008

Available online 3 June 2008

Keywords:

Plasma membrane

Transport

Liposome

Reconstitution

Glutamine

Amino acid

B^o

ABSTRACT

Na⁺ dependent [³H]glutamine uptake was found in liposomes reconstituted with solubilized rat kidney brush border in the presence of intraliposomal K⁺. The reconstituted system was optimised with respect to the critical parameters of the cyclic detergent removal procedure, i.e., the detergent used for the solubilization, the protein concentration, the detergent/phospholipid ratio and the number of passages through a single Amberlite column. Time dependent [³H]glutamine accumulation in proteoliposomes occurred only in the presence of external Na⁺ and internal K⁺. The transporter showed low if there is any tolerance towards the substitution of Na⁺ or K⁺ for other cations. Valinomycin strongly stimulated the transport indicating that it is electrogenic. Intraliposomal glutamine had no effect. From the dependence of the transport rate on the Na⁺ concentration cooperativity index close to 1 was derived, indicating that 1 Na⁺ should be involved in the cotransport with glutamine. The electrogenicity of the transport originated from the Na⁺ transport. Optimal rate of 0.1 mM [³H]glutamine uptake was found in the presence of 50 mM intraliposomal K-gluconate. At higher K-gluconate concentrations the transport rate decreased. The activity of the reconstituted transporter was pH dependent with optimal function in the range pH 6.5–7.0. [³H]glutamine (and [³H]leucine) uptake was inhibited by all the neutral but not by the positively or negatively charged amino acids. The sulfhydryl reagents HgCl₂, mersalyl, *p*-hydroxymercuribenzoate and the substrate analogue 2-aminobicyclo[2,2,1]heptane-2-carboxylate strongly inhibited the transporter, whereas the amino acid analogue α-(methylamino)isobutyrate had no effect. The inhibition by mersalyl was protected by the presence of the substrate. On the basis of the Na⁺ dependence, the electrogenic transport mode and the specificity towards the amino acids, the reconstituted transporter was classified as B^o-like.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Transport of amino acids across the plasma membrane of mammalian cells is carried out by transport systems that operate with different mechanisms and exhibit variable specificity toward amino acids. This heterogeneity allows all the amino acids to be translocated [1–6]. Among the amino acid transport systems expressed in the kidney or intestine cells, there is a restricted group of transporters that share the specificity towards glutamine but have different selectivity towards other amino acids and different mechanisms of transport [7,8]. Besides performing the function of supplying various amino acids to the cells, these transporters play the important function of mediating intestinal and renal (re)absorption of glutamine

that is important both under physiological and physiopathological conditions like metabolic acidosis. The glutamine-specific transporters can be functionally classified in two main groups: the sodium-independent transporters, which use amino acid concentration gradient to drive the transport; the sodium-dependent transporters, which require Na⁺ gradients for driving the transport of amino acids. The most known glutamine transporters are named systems L and b^{o+}, which belong to the first group and systems ASCT2/ATB^o, N, B^{o+}, A and y⁺L, which belong to the second group. These transport systems can be further distinguished on the basis of several properties like the high (N and y⁺L) or low (ASCT2) tolerance towards the substitution of Na⁺ by Li⁺, the different specificity for amino acids, the sensitivity to inhibitors like the amino acid analogue MeAIB (system A) and the mechanism of transport. More recently another sodium-dependent amino acid transporter which is also specific for glutamine has been identified: B^oAT1 [9]. This transport system, which belongs to the SLC6 transporter family, is highly expressed in mouse kidney and is specific for all the neutral amino acids, which are cotransported with sodium [9–14]. B^oAT1 corresponds to the transport system, previously found in bovine renal epithelial cells, named B^o [15]. Mutations of the B^oAT1 gene (SLC6A19) cause the Hartnup disorder [16,17].

Abbreviations: pOHMB, *p*-hydroxymercuribenzoate; MTSET, [2-(trimethylammonio)ethyl] methanethiosulfonate; C_xE_y, alkyl(x)-poly(y)oxyethylene ether; MeAIB, α-(methylamino)isobutyric acid; PLP, pyridoxal-5-phosphate; BCH, 2-aminobicyclo[2,2,1]heptane-2-carboxylic acid; NEM, *N*-ethylmaleimide; NPM, *N*-phenylmaleimide

* Corresponding author. Dipartimento di Biologia Cellulare, Università della Calabria, Via P. Bucci cubo 4c, 87036 Arcavacata di Rende (CS), Italy. Tel.: +39 0984 492939; fax: +39 0984 492911.

E-mail address: indiveri@unical.it (C. Indiveri).

Most of the experimental data concerning the function of the amino acid transporters derive from studies performed in cell systems (over)expressing the transporters. A glutamine/amino acid transporter has been recently studied using liposomes reconstituted with solubilized renal brush borders. The transporter was identified as ASCT2 on the basis of its functional properties. In that case the liposome system has been helpful in clarifying and unraveling functional properties that could not be investigated in intact cells [18,19]. In the present study a procedure has been pointed out for efficient reconstitution in liposomes of a rat kidney transport system which is specific for glutamine and neutral amino acids; it shows all the basic functional properties of B⁰AT1; thus, it has been classified as B⁰-like. Functional aspects of the reconstituted transporter have been revealed. The procedure described represents a tool for further functional and kinetic studies of this or of heterologously expressed transporters related with the SLC6 cluster.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Amberlite XAD-4, egg yolk phospholipids (3-sn-phosphatidylcholine from egg yolk) C₈E₄ and C₁₂E₈ were purchased from Fluka; L-[³H]glutamine and L-[³H]leucine from GE Healthcare; Sephadex G-75, Triton X-100, and Triton X-114 from Sigma-Aldrich; MTSET from Toronto Research Chemicals (North York, Ontario, Canada). All other reagents were of analytical grade.

2.2. Solubilization of the B⁰-like transporter

Brush-border membranes were prepared from rat kidney and stored as previously described [18,20]. The transporter was solubilized by treating the membrane preparation (50 µl, about 0.2 mg protein) with 1.3% C₁₂E₈, 20 mM Hepes/Tris pH 7.0 in a final volume of 200 µl and centrifuged at 13,000 g for 4 min at 4 °C. The supernatant (extract) was used for the reconstitution.

2.3. Reconstitution of the B⁰-like transporter in liposomes

The B⁰-like transporter was reconstituted by the cyclic detergent removal procedure [21,22] with appropriate modifications. In brief, mixed micelles containing detergent, protein and phospholipids were repeatedly passed through the same Amberlite XAD-4 column. The composition of the initial mixture used for reconstitution was: 15 µl of the solubilized protein (about 10 µg protein in 1.3% C₁₂E₈), 80 µl of 10% C₁₂E₈, 100 µl of 10% egg yolk phospholipids in the form of sonicated liposomes prepared as described in Ref. [22], 50 mM K-gluconate and 20 mM Hepes/Tris pH 7.0 (except when differently specified in the legends to Figs.) in a final volume of 700 µl. After vortexing, this mixture was passed 20 times through the same Amberlite XAD-4 column (0.5 cm diameter × 2.5 cm height) preequilibrated with a buffer of the same composition of the initial mixture but without protein, phospholipid and detergent. All the operations were performed at 4 °C, except the passages through Amberlite XAD-4, which were carried out at room temperature.

2.4. Transport measurements

To remove the external buffer, 550 µl of proteoliposomes were passed through a Sephadex G-75 column (0.7 cm diameter × 15 cm height) preequilibrated with 20 mM Hepes/Tris pH 7.0 and sucrose at an appropriate concentration to balance the internal osmolarity. Transport was started by adding 0.1 mM [³H]glutamine or [³H]leucine and 50 mM Na-gluconate (except when differently specified in the legends to Figs.) to the proteoliposomes, and stopped by adding 20 µM mersalyl at the desired time interval. In control samples the inhibitor was added at time zero according to the inhibitor stop method [23]. The assay temperature was 25 °C. Finally, each sample of proteoliposomes (100 µl) was passed through a Sephadex G-75 column (0.6 cm diameter × 8 cm height) in order to separate the external from the internal radioactivity. Liposomes were eluted with 1 ml 50 mM NaCl and collected in 4 ml of scintillation mixture, vortexed and counted. For the determination of the [³H]glutamine or [³H]leucine uptake, the experimental values were corrected by subtracting the respective controls (samples inhibited at time zero). The radioactivity associated to the control samples, representing the (mersalyl-insensitive) unspecific diffusion was less than 5% of the [³H]glutamine or about 50% of the [³H]leucine taken up by the (mersalyl-sensitive) transporter mediated process. Transport rate was measured by stopping the reaction after 10 min, i.e., within the initial linear range of labeled substrate uptake into the proteoliposomes.

To generate K⁺ diffusion potential, 50 mM K-gluconate (except when differently specified in the legends to Figs.) was added to the reconstitution mixture. After removal of the external salts and buffers by Sephadex G-75 chromatography, as above described, valinomycin (0.75 µg/mg phospholipid) in 3 µl ethanol/water 1:1 was added to the proteoliposomes. The amount of ethanol added did not exert any effect on the transport activity.

2.5. Other methods

The protein concentration was determined by the modified Lowry procedure [24]. The internal volume of the proteoliposomes was measured as previously described [21,25].

3. Results

3.1. Optimal conditions for reconstitution

Brush-border membranes were solubilized with 1.3% Triton X-100, Triton X-114, C₁₂E₈ or C₈E₄. The extracts obtained (about 30 µg protein) were reconstituted into liposomes and the transport activity assayed as [³H]glutamine uptake in proteoliposomes in the presence of intraliposomal 50 mM K-gluconate and external 50 mM Na-gluconate. [³H]glutamine uptake of 8 nmol 20 min⁻¹ mg protein⁻¹ was measured in liposomes reconstituted with C₁₂E₈ solubilized brush border. The protein solubilized with Triton X-100 exhibited about 70% of the transport activity of that obtained with C₁₂E₈. Triton X-114 and C₈E₄ were almost ineffective in the solubilization of the transporter in active form.

The parameters that influence the efficiency of incorporation of the transport protein into the liposomes i.e., the protein concentration, the detergent/lipid ratio, the number of passages through the same Amberlite XAD-4 column [18,21,26] were optimised (experiments not shown). In these experiments, the [³H]glutamine uptake into proteoliposomes in 20 min was measured as function of each parameter. In all the experiments, the intraliposomal volume, that gives information on the liposome formation, was also determined. The transport increased with the protein concentration up to 12 µg/ml; above this value, a reduction of transport was observed. The intraliposomal volume of 4 µl/mg phospholipid slightly decreased by increasing the protein concentration, indicating that higher concentrations of protein cause the formation of less or smaller liposomes. The detergent/lipid ratio strongly influenced the transport activity, which reached optimal value at a detergent/lipid ratio of 0.83 (mg/mg) and then slightly decreased at higher detergent/lipid ratios. This parameter influenced also the internal volume of the proteoliposomes, although less strongly than the transport activity. Maximal internal volume was observed at detergent/lipid ratio of 0.83. The transport activity increased with the number of columns passages up to about 35 nmol 20 min⁻¹ mg protein⁻¹ at 18 passages and then remained nearly constant by further increasing the number of passages up to 24. The intraliposomal volume increased with the number of passages up to about 3.2 µl/mg phospholipid at 10 passages and remained nearly constant in the range from 10 to 22 passages. According to the results described, a protein concentration of about 10 µg/ml, a detergent/lipid ratio of 0.83 and 20 column passages were used in the experiments.

3.2. Functional characterization

The time course of 0.1 mM [³H]glutamine uptake in proteoliposomes has been studied in the presence of external Na-gluconate and different intraliposomal cations: Na⁺, K⁺ or Li⁺. The results are summarized in Fig. 1A. Significant uptake of [³H]glutamine was revealed only in the presence of internal K⁺, both as chloride or gluconate salt; under this condition the uptake increased as function of the time up to 50 and 39 nmol/mg protein in the presence of internal K-gluconate or KCl, respectively; the equilibrium was reached at about 60 min; then a slight decrease of intraliposomal radioactivity was observed. Similar results were obtained using external NaCl instead of Na-gluconate (not shown). Nearly no [³H]glutamine uptake was detected in the presence of internal LiCl or internal Na⁺, both as gluconate and (not shown) chloride salt, indicating that the [³H]glutamine uptake was dependent on internal K⁺ and did not tolerate the substitution of K⁺ for Na⁺ or Li⁺. In the

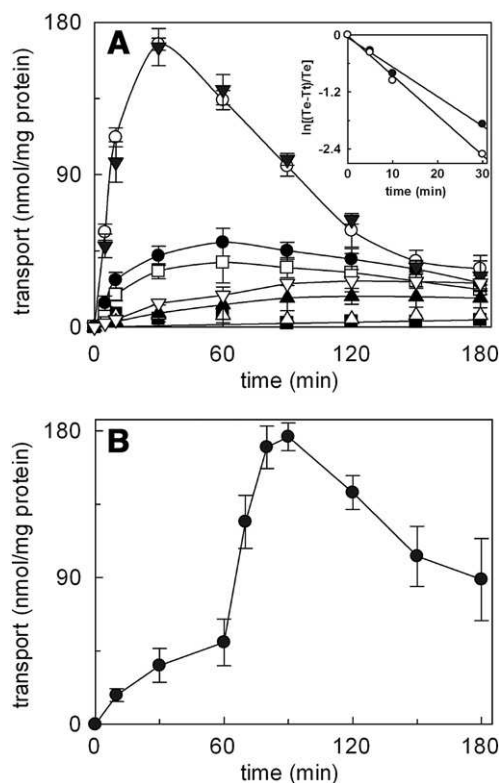


Fig. 1. Time course of glutamine uptake by reconstituted proteoliposomes. (A) 0.1 mM [^3H]glutamine together with 50 mM Na-gluconate was added at time zero to proteoliposomes containing 50 mM K-gluconate (●,○), KCl (□), LiCl (■), Na-gluconate (△), or K-gluconate plus 30 mM glutamine (▼); in (▲), external Na-gluconate was omitted or (▽) replaced by LiCl; in (○,▽,●) valinomycin was added to the proteoliposomes together with the labeled substrate (see Materials and methods); inset, semilogarithmic replot of (●) and (○) up to 30 min: T_t and T_e are the transport values at time t and at equilibrium, respectively; (B) 0.1 mM [^3H]glutamine together with 50 mM Na-gluconate was added at time zero to proteoliposomes containing 50 mM K-gluconate; after 60 min incubation valinomycin was added to the proteoliposomes (see Materials and methods). The transport reaction was stopped at the indicated times, as described in Materials and methods. Data represents means \pm S.D. from three experiments.

presence of internal K^+ , but in the absence of external Na^+ a very slow [^3H]glutamine uptake was found, which reached at 180 min about the same value of the residual radioactivity measured in the presence of external Na^+ . Similar results were obtained with external 50 mM LiCl, KCl or K-gluconate (not shown). The addition of valinomycin to the proteoliposomes led to a strong stimulation of the transport, which reached a maximum of 167 nmol/mg protein at 30 min. Then, a strong reduction of intraliposomal radioactivity ([^3H]glutamine efflux) was observed after 30 min, indicating that the cotransport of 50 mM Na^+ with 0.1 mM glutamine caused accumulation of glutamine in the proteoliposomes with a temporary outwardly directed glutamine gradient (overshoot). The presence of internal glutamine did not further influence the [^3H]glutamine uptake excluding both the occurrence of amino acid antiport or trans-inhibition. The substitution of external Na^+ with Li^+ , in the presence of valinomycin, led to a very slow uptake of [^3H]glutamine which was only slightly higher than in the absence of Na^+ , indicating a very low tolerance for the substitution of Na^+ for Li^+ . The experimental data up to 30 min of the experiments performed in the presence of internal K-gluconate and external Na-gluconate, both in the presence and absence of valinomycin were replotted in a logarithmic form (inset of Fig. 1A). In both the cases linear dependences were found indicating first order processes, i.e., the observed uptake was catalysed by a single transport system. The first order rate constants k , derived from the replots were 0.062 min^{-1} or

0.084 min^{-1} and the transport rate, calculated as the product of k and the transport at equilibrium, was 3.1 or $15.3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ in the absence or presence of valinomycin, respectively. The data suggested that electrogenic Na^+ -glutamine symport occurred in reconstituted liposomes which was dependent on intraliposomal K^+ . Analogous K^+ dependent [^3H]leucine uptake, which was stimulated by the presence of valinomycin was found under the same experimental conditions of Fig. 1A (not shown). To gain further insights on the question where the electrogenicity originates and whether K^+ is transported, further experiments were performed. The [^3H]glutamine uptake in the presence of Na^+ was measured in proteoliposomes containing K^+ as in the experiment of Fig. 1A. After the apparent equilibrium was reached at 60 min, valinomycin was added to the same proteoliposomes. The transport was strongly stimulated (Fig. 1B) as found in the previous experiment and the [^3H]glutamine uptake reached 176 nmol/mg protein i.e., nearly the same value of the experiment of Fig. 1A, in which valinomycin was added at time zero. These data indicated that in the first 60 min the Na^+ -glutamine cotransport generated a membrane potential positive inside which opposed the Na^+ -[^3H]glutamine coupled uptake; this membrane potential was compensated by the efflux of K^+ mediated by valinomycin with the consequent reactivation of the cotransport. These data also indicated that the reconstituted transporter did not mediate K^+ efflux. The dependence of the transport on the Na^+ concentration was studied (Fig. 2). As shown by the figure, the transport rate increased with increasing Na^+ concentrations according to a saturable process. The data interpolated in the Hill equation gave cooperativity indexes of 1.0 ± 0.29 and 0.97 ± 0.28 (from three experiments) in the presence or absence of valinomycin, respectively, indicating that 1 Na^+ is most probably transported together with glutamine. Half saturation constants (K_m) for Na^+ of 12 ± 0.90 and $5.2 \pm 0.91 \text{ mM}$ (from three experiments) in the presence or absence of valinomycin, respectively were derived from the experiment. The dependence on internal K^+ of the glutamine transport in the proteoliposomes was investigated. As shown by Fig. 3A the [^3H]glutamine transport rate increased from about 0.1 to $2.1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ with increasing K^+ concentrations up to 50 mM. At higher concentration of K^+ the transport rate decreased to a value lower than 50% of that found at 50 mM K^+ . A similar dependence was found in the presence of external K^+ at the same concentrations of the internal K^+ , i.e., in the absence of K^+ gradient. In this case, however, the transport rate was lower than in the absence of external K^+ , except that at 10 mM K^+ . A similar behaviour was observed in the presence of external Li^+

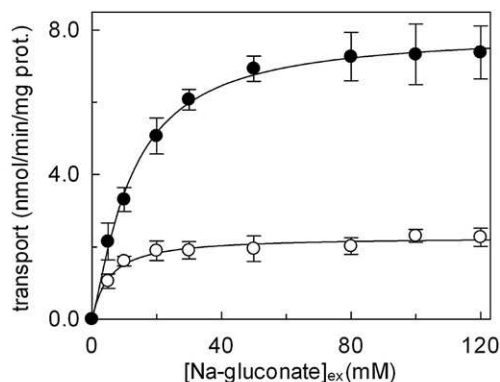


Fig. 2. Dependence of glutamine transport on the extraliposomal concentration of Na^+ . Transport rate was measured as 0.1 mM [^3H] glutamine uptake in 10 min into proteoliposomes containing 50 mM K-gluconate in the presence of the indicated concentrations of external Na-gluconate; in (●) valinomycin was added to the proteoliposomes together with the labeled substrate (see Materials and methods). Data represents means \pm S.D. from three experiments.

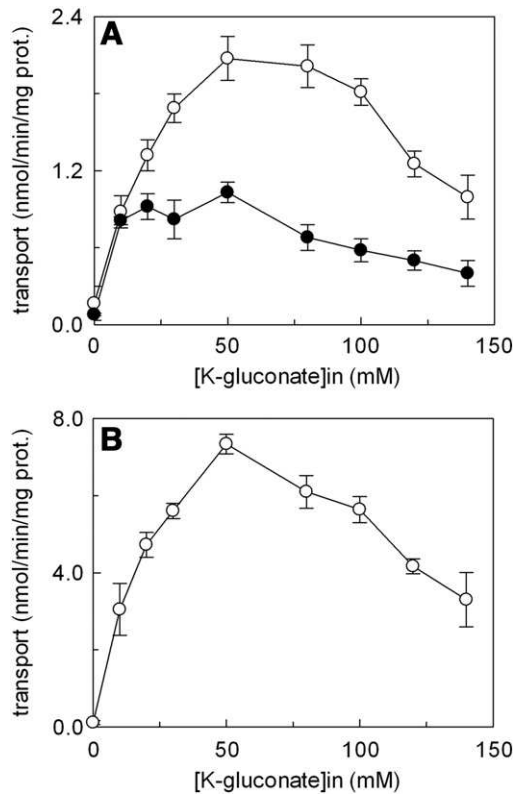


Fig. 3. Dependence of glutamine transport on the intraliposomal concentration of K^+ . Transport rate was measured as 0.1 mM [3H] glutamine uptake in 10 min into proteoliposomes containing K-gluconate at the indicated concentrations, in the presence of external 50 mM Na-gluconate and (○) 0.5 mM K-gluconate or (●) the same concentration of K-gluconate present inside the proteoliposomes; in (B) valinomycin was added (see Materials and methods). Data represents means \pm S.D. from three experiments.

instead of K^+ (not shown), suggesting that external K^+ or Li^+ inhibited the transport, probably competing with Na^+ . This observation suggests that K^+ is not transported from inside to outside, in agreement with the data of Fig. 1B. The dependence on internal K^+ was studied in the presence of valinomycin (Fig. 3B). A pattern similar to that found in the absence of valinomycin was observed, with a peak at 50 mM K^+ . In agreement with the data in Fig. 1A, in the presence of valinomycin the transport rate at 50 mM K^+ was about four fold that in the absence. In Fig. 4 the dependence of the ratio between the transport rate in the presence and absence of

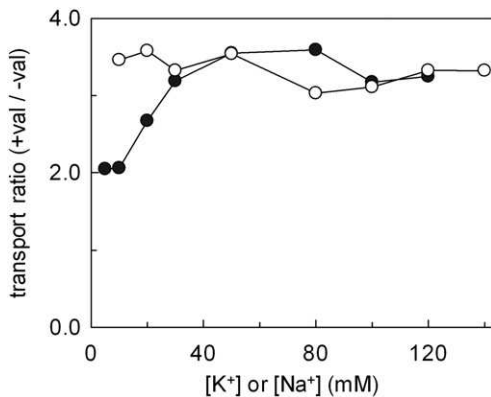


Fig. 4. Dependence on the Na^+ and K^+ concentration of the ratio between the transport rate in the presence and absence of valinomycin. The ratios were calculated from the data of Fig. 2 for the Na^+ (●) and Fig. 3A and B for the K^+ (○) concentrations, respectively.

valinomycin, on the concentration of Na^+ or K^+ (derived from Figs. 2 and 3) is reported. This parameter, which, represents the electrogenicity, was not affected by the concentration of K^+ , whereas it depended on the concentration of Na^+ . This confirmed that K^+ only stimulated, but was not involved in the transport; Na^+ generated the electrogenicity being involved in the transport process.

The dependence of the transport on the pH has been studied. [3H]glutamine transport rate was very low at pH 5.5. It strongly increased by increasing the pH with optimal transport in the range pH 6.5–7.0, then it decreased slightly at pH 7.5, more strongly at pH 8.0 (Fig. 5).

3.3. Specificity towards amino acids and inhibitors

The specificity of the reconstituted transporter towards the amino acids was investigated. To achieve this object, the effect of externally added amino acids on the [3H]glutamine or [3H]leucine uptake in the proteoliposomes was studied. Fig. 6 shows the residual transport activity (compared to the controls with no addition) in the presence of each amino acid. Lys, Asp, Arg and Glu did not exert any significant effect on the transport. The lowest extent of inhibition was observed in the presence of Gly. The inhibition increased in the presence of the other neutral amino acids, as indicated in the figure, with a similar pattern with [3H]glutamine or [3H]leucine as substrate, even though some amino acids exerted a slightly lower inhibition on [3H]leucine than on [3H]glutamine uptake. Higher S.D. values were associated with the average values of the [3H]leucine residual activity data (see also Materials and methods). Gln, Asn, Ala, Val, Ile, Cys, Phe, Leu and Met, at 5 mM, led to nearly complete inhibition, whereas Lys, Asp, Arg and Glu were still ineffective. Overlapping results were obtained in the presence of valinomycin (not shown).

In another experiment the sensitivity of the transporter to substrate analogues and to reagents which specifically react with amino acid residues of proteins was investigated (Fig. 7). The amino acid analogue BCH was an effective inhibitor whereas MeAIB and creatine did not inhibit at all the transporter. The thiol specific reagents mersalyl, pOHMB and $HgCl_2$ strongly inhibited the transporter. NPM and MTSET, at the concentrations normally used to modify proteins, had a lower inhibitory effect whereas NEM had no effect on the transport. The lysine reagent PLP poorly inhibited the transporter at the concentration of 10 mM whereas it was completely ineffective at 1 mM. The inhibition by the substrate analogue BCH and the thiol reagents mersalyl was further investigated as dependence on the reagent concentration. Fig. 8 shows the dose-response curves for the

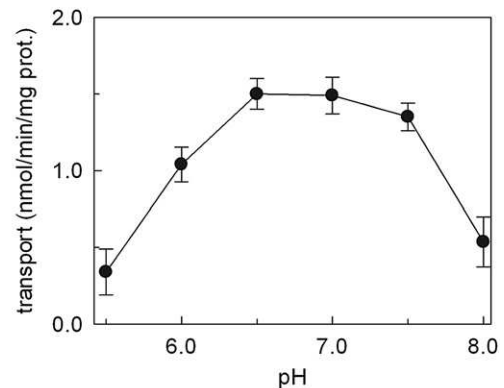


Fig. 5. Effect of pH on the reconstituted transporter. All the experimental procedures from the reconstitution to the transport measurement (see Materials and methods) were performed in 20 mM Hepes/Tris buffer at the indicated pH. Transport rate was measured as 0.1 mM [3H] glutamine uptake in 10 min into proteoliposomes containing 50 mM K-gluconate, in the presence of 50 mM external Na-gluconate. The results are means \pm S.D. of three experiments.

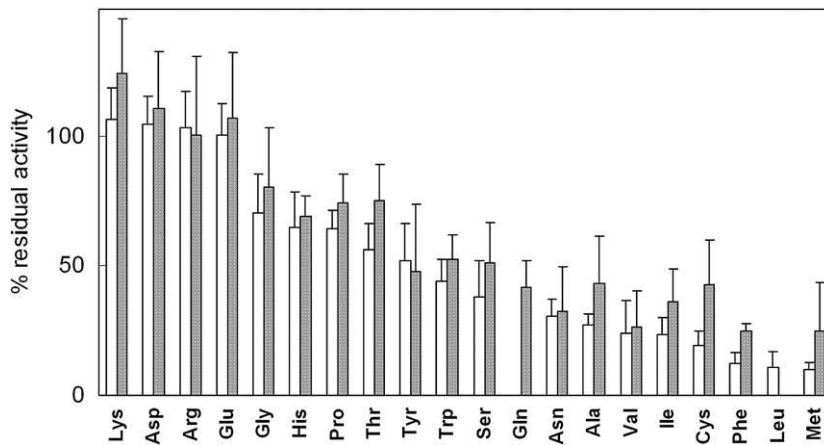


Fig. 6. Specificity of the reconstituted transporter towards amino acids. Transport was measured as 0.1 mM [³H]glutamine (white bars) or [³H]leucine (grey bars) uptake into proteoliposomes in the presence of 50 mM internal K-gluconate and 50 mM external Na-gluconate, in 10 min. 1 mM of the indicated amino acids was added together with the labeled substrates. Percent residual activity was calculated for each experiment with respect to the control samples (referred as 100%), i.e., no added amino acids. The results are means \pm S.D. of the percentages for three experiments. The average transport activity of the control samples was 18 ± 2.8 nmol 10 min^{-1} mg protein⁻¹ and 15 ± 6.5 nmol 10 min^{-1} mg protein⁻¹ for [³H]glutamine or [³H]leucine, respectively.

inhibitors. For each reagent complete inhibition was reached even though at very different concentrations. The IC_{50} of the transporter for the reagents was calculated. The values were 1.4 ± 0.52 mM or 2.0 ± 0.5 μ M for BCH or mersalyl, respectively.

The influence of the substrate on the inhibition of the transporter by mersalyl was investigated. As shown in Fig. 9, the [³H]glutamine uptake was inhibited 72% by the addition of 3 μ M mersalyl in agreement with the data of Figs. 7 and 8. The presence of 0.1 mM or 1 mM glutamine reduced the inhibition to 60% or 16% respectively indicating that the substrate prevented the binding of the inhibitor to the transporter.

Since it was previously found that the reconstituted ASCT2 glutamine/amino acid transporter was activated by intraliposomal (intracellular) nucleotides [18,19], the effect of ATP, ADP and AMP was investigated on the reconstituted proteoliposomes under the conditions pointed out in this work. The nucleotides were included in the

internal compartment of the proteoliposomes or externally added to the vesicles. The uptake of [³H]glutamine did not vary more than 5% in the presence of ATP, ADP or AMP at concentrations ranging from 0.1 to 6 mM both inside or outside the proteoliposomes. This indicated that none of the nucleotides exerted significant effect on the reconstituted transporter.

4. Discussion

A transport system which catalyses electrogenic symport of glutamine with Na⁺ has been solubilized from renal cell plasma membrane and reconstituted in liposomes. [³H]glutamine was preferentially used to follow the activity of the reconstituted transporter since it is more hydrophilic and, consequently, less permeable than other neutral amino acids like leucine or phenylalanine to the phospholipid vesicles. Due to this feature the radioactivity background, i.e., the non-protein mediated uptake (diffusion) was nearly negligible using [³H]glutamine, but comparable to the transport signal using [³H]leucine (see also Materials and methods section).

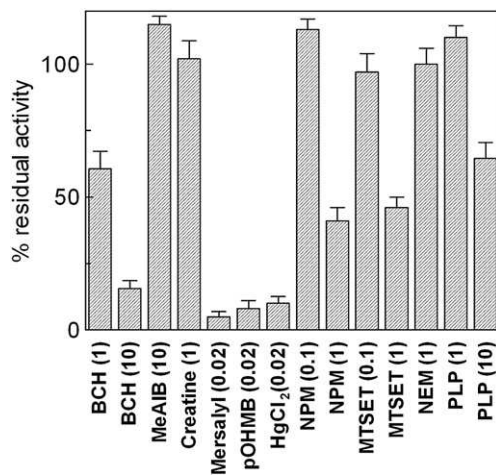


Fig. 7. Specificity of the reconstituted transporter towards inhibitors. Transport was measured as 0.1 mM [³H]glutamine uptake into proteoliposomes containing 50 mM internal K-gluconate, in the presence of 50 mM external Na-gluconate, in 10 min. The inhibitors at the mM concentrations indicated in brackets were added 1 min before the labeled glutamine. Percent residual activity was calculated for each experiment with respect to the control sample (referred as 100%), i.e., in the absence of inhibitor. The results are means \pm S.D. of the percentages for three experiments. The average transport activity of the control samples of the three experiments analysed was 17 ± 3.9 nmol 10 min^{-1} mg protein⁻¹.

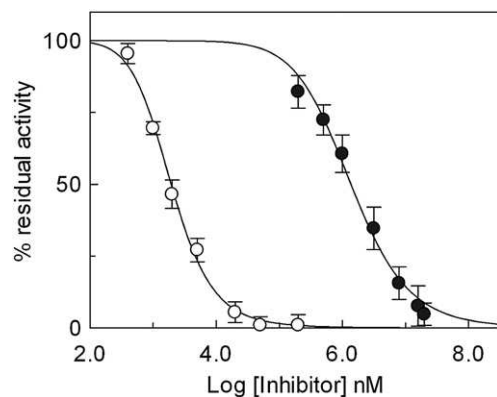


Fig. 8. Dose-response curves for the inhibition of the reconstituted transporter by mersalyl and BCH. Transport rate was measured as 0.1 mM [³H] glutamine uptake in 10 min in proteoliposomes containing 50 mM K-gluconate, in the presence of 50 mM external Na-gluconate. Mersalyl or BCH were added at the indicated concentrations to the proteoliposomes 1 min before the labeled glutamine. Percent residual activity with respect to the control are reported. The control activity (uninhibited [³H]glutamine transport) was 2.9 ± 0.70 nmol min^{-1} mg protein⁻¹; the values are means \pm S.D. from three experiments.

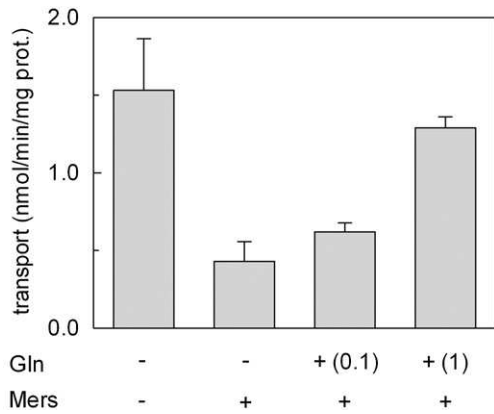


Fig. 9. Influence of substrate on the inhibition of the reconstituted transporter by mersalyl. Reconstituted proteoliposomes were treated as described in the figure before the transport assay: glutamine at the concentrations in brackets and/or mersalyl (3 μ M) were added to proteoliposome samples where indicated by (+). All samples were then passed through Sephadex G-75 columns to remove unreacted inhibitor and substrate; transport rate was then measured, in the presence of 50 mM external Na-gluconate, as 0.1 mM [3 H] glutamine uptake in 10 min in proteoliposomes containing 50 mM K-gluconate; the values are means \pm S.D. from three experiments.

The higher background caused an increase of the error in the measurements.

The reconstitution procedure was based on the detergent removal from mixed micelles of detergent, protein and phospholipid [21,22]. This procedure, that was pointed out for the reconstitution of mitochondrial transporters, has been recently modified and successfully used for the functional studies of the plasma membrane glutamine/amino acid (ASCT2) and carnitine (OCTN2) transporters [18,19,26]. The proteoliposome system presents some advantages with respect to the cell systems like the possibility to control the experimental conditions in the internal compartment, the reduction of interferences due to the virtual absence of external and internal enzymes. In addition, this type of reconstitution procedure leads to the formation of proteoliposomes larger than those obtained with other methods like the freeze-thaw-sonication; this feature allows to increase the accumulation of radioactivity in the vesicles [18,19,21,22,26]. The reconstituted transporter has been classified as B^o-like since its basic functional properties correspond to those of B^oAT1, expressed and characterized in cell systems [9,11,12]: the Na⁺-dependence, the low tolerance for Li⁺, the independence of Cl⁻, the electrogenic symport mode of transport, the specificity for neutral amino acids, the lack of inhibition by charged amino acids. Furthermore, the extent of inhibition exerted by the neutral amino acids both on the [3 H]glutamine and on the [3 H]leucine transport, was similar to that described for the B^oAT1 transporter in intact cells. Even though the reconstituted brush-border extract might contain other transport proteins, the activity of the B^o-like reconstituted transporter was discriminated using appropriate experimental conditions: labeled glutamine was used to test the transport, thus excluding several transporters that do not accept this amino acid; the reconstituted system was optimised with respect to parameters like the detergent, phospholipid and protein concentrations, that are critical for each single transporter [18,19,26]; furthermore, the use of the thiol reagent mersalyl, allowed to subtract the non transporter mediated unspecific diffusion. Specific functional differences allow to exclude that the reconstituted transporter may correspond to other known glutamine-specific transporters. In particular it can be excluded that the measured transport activity could be due, even in part, to the reconstituted ASCT2 transporter [18,19] for several reasons: i) the ASCT2 transport system catalyses substrate antiport with no detectable net uptake activity; ii) optimal conditions for reconstitution of the B^o-like are different from those of the ASCT2 transporter; iii)

glutamate and the NH₂ reagent PLP, that inhibit ASCT2, do not inhibit the B^o-like transporter; iv) differently from the B^o-like, the reconstituted ASCT2 transporter is activated by intraliposomal nucleotides not by K⁺. The presence of activity of the other known glutamine transporters can also be excluded. Differently from the reconstituted B^o-like transporter, systems L and b^{o/+} are Na⁺-independent; system A shows trans-inhibition and sensitivity to MeAIB; system y⁺L shows Li⁺ tolerance and specificity for cationic amino acids; system N shows Li⁺ tolerance, different specificities towards amino acids with respect to the B^o-like transporter and it is electroneutral; system B^{o/+} exhibits specificity towards cationic amino acids and Cl⁻ dependence [1–8]; the B^o isoform B^oAT2, differently from the reconstituted transporter, was previously shown to not be inhibited by Cys, Tyr, Trp, Gly, poorly inhibited by Gln and Ser but strongly inhibited by Pro [5,14,27]. The source of the reconstituted transporter corresponds to the cellular localization of B^oAT1. The high level of expression in kidney [9,12,13] well correlates with the higher transport activity of the reconstituted B^o-like transporter with respect to the other reconstituted rat kidney transporters ASCT2 and OCTN2 under similar experimental conditions [18,19,26]. Even though most of the experimental data here reported are in favor of the identification of the B^o-like transporter as B^oAT1, it cannot be excluded that the reconstituted transporter may be a still not identified B^o-like isoform or a member of the SLC6 cluster [9,11,13,28,29] which is expressed in kidney as the orphan XT2 (SLC6A18) or, less probably, the more phylogenetically distant from B^oAT1, XT3 (SLC6A20). However, it has been reported that: i) BBMV isolated from mice lacking XT2 lost Gly but not Met or Leu transport function [29], indicating that if XT2 is an amino acid transporter, it has a different specificity respect to the reconstituted B^o-like transporter; ii) the substrates of the B^o-like transporter Gln, Leu, Ala, Ile, Phe, Ser and Val are not substrates of XT2 and XT3 [28]; the opossum ortholog of the XT3, differently from the B^o-like transporter, is very poorly inhibited by Asn, Thr, Ser and is not inhibited by Gly and BCH [30].

The B^o-like transporter is oriented in the reconstituted vesicles as in the native membrane, as it was deduced by the dependence on extraliposomal, not intraliposomal, Na⁺. The experimental data suggested that 1 Na⁺ is cotransported with glutamine, in agreement with data reported for the B^oAT1 transporter in cell system [11]. An interesting feature of the reconstituted transporter is the dependence on intraliposomal K⁺ that, in vivo, corresponds to the intracellular K⁺. Some experimental evidences suggest that K⁺ is not transported but may act as a modulator: i) the transport rate decreased at K⁺ concentrations above 50 mM, indicating that internal K⁺ was not exchanged for external [3 H]glutamine; ii) the activation was found also in the absence of K⁺_{in}/K⁺_{out} gradient; iii) the uptake of Na⁺ coupled to [3 H]glutamine stopped after about 1 h even in the presence of intraliposomal K⁺, due to the generation of inside positive membrane potential and was regained only by the subsequent addition of valinomycin that mediated K⁺ efflux; iv) the electrogenicity of the transport did not depend on K⁺ concentration. Dependence on intracellular K⁺ was previously described for the glutamate transporters [4,5]. It was reported that K⁺ is transported in the case of the neuronal and renal glutamate transporter [4,31,32], whereas the cation is not transported by the glutamate/aspartate transporter of enterocytes [33].

The physiological role of the dependence on K⁺ of the B^o-like transporter may be related with the signaling of the metabolic condition of the cell. The intracellular concentration of K⁺ is influenced by a complex regulation of apical K⁺ channel in kidney, which are activated at sub-millimolar and inhibited at higher (millimolar) ATP concentration [34]. Consequently, the intracellular K⁺ concentration will decrease or increase, respectively, at lower or higher ATP level. Thus, K⁺ may modulate the activity of the B^o-like transporter in response to the level of ATP. Modulation by ATP was previously found for the reconstituted ASCT2, which is directly stimulated by higher intracellular ATP level [18,19]. Since B^oAT1 and ASCT2 mediate uniport

or antiport of neutral amino acids, respectively, the complex mechanism of modulation of their activity will regulate the balance between net uptake and exchange of amino acids in response to the metabolic state of the cell. This cross-talk between B⁰AT1 and ASCT2 together with the peculiar specificity of ASCT2 towards glutamate [19,35] support the occurrence and the modulation of the tertiary active transport recently proposed by Broer, involving the antiport of external glutamate with internal neutral amino acids mediated by ASCT2, followed by reuptake of the neutral amino acids by B⁰AT1 [5].

The optimal pH range found in the reconstituted system was different from that found for the B⁰AT1 overexpressed in cell system. This discrepancy may be due to the effect of massive amino acid uptake on the metabolism or to some interferences among channels or transporters in cells, which may change the intracellular pH or ion composition.

The amino acid analogue BCH inhibited the reconstituted transporter more efficiently than the B⁰AT1 in cell system [9]. The difference may be due to altered experimental conditions caused by uptake of BCH mediated by some of the several transport systems of the cell membrane.

Thiol specific reagents inhibited the reconstituted transporter, as previously found for ASCT2, indicating that some Cys must be involved in transport function. The transporter is very sensitive to mercurial reagents, but not to maleimides and MTSET. It can be hypothesized that the SH residue(s) involved in the inhibition may be located in a small pocket of the protein, accessible to the-Hg⁺ residue of the inhibitors, but not to the whole molecules of *N*-ethylmaleimide or MTSET that, consequently, cannot come in close contact with the SH residue for alkylating the protein. Since mersalyl is hydrophilic, it can be deduced that the Cys residues responsible for the inhibition are exposed towards the external face of the transporter. This is in agreement with the hydropathy profile of the mouse B⁰AT1 protein [9] (which is 96% identical to the rat orthologous; not shown), that predicts the presence of four large hydrophilic loops exposed towards the external side of the cell, which contains 6 of the 19 (18 in the rat orthologous) Cys residues of the protein. The protection of the mersalyl inhibition by the substrate indicated that the Cys residues responsible of the interaction of the inhibitor with the protein is located close to the substrate binding site; on this basis it can be excluded that the mercurial reagent could interact with an hypothetical accessory protein of the transport system.

The reconstitution of the B⁰-like transport system represents the starting point for further studies to characterize the kinetics, the transport mechanism and the regulation of the transporter. The reconstituted system provides a tool for the analysis of heterologously expressed B⁰-like transporters. This will help to gain insights in the functional properties of orphan transporters which have been shown to be expressed in kidney and other tissues and to be phylogenetically related with B⁰AT1 transport system [13,14]. In addition the reconstituted system would enable investigation on the role of accessory subunits in the function of B⁰-like amino acid transporters as for example collectrin for B⁰AT1 [36].

Acknowledgements

This work has been supported by the PRIN (Progetti di Ricerca Scientifica di Rilevante Interesse Nazionale) 2006 grant n. 2006054479 from MiUR (Ministero dell'Università e della Ricerca).

References

- [1] M. Palacin, R. Estevez, J. Bertran, A. Zorzano, Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters, *Physiol. Rev* 78 (1998) 969–1054.
- [2] S. Broer, Adaptation of plasma membrane amino acid transport mechanisms to physiological demands, *Pflügers Arch* 444 (2002) 457–466.
- [3] B. Mackenzie, J.D. Erickson, Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family, *Pflügers Arch* 447 (2004) 784–795.
- [4] Y. Kanai, M.A. Hediger, The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects, *Pflügers Arch* 447 (2004) 469–479.
- [5] S. Broer, Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia, *Physiol. Rev* 88 (2008) 249–286.
- [6] F. Verrey, Z. Ristic, E. Romeo, T. Ramadan, V. Makrides, M.H. Dave, C.A. Wagner, S. M. Camargo, Novel renal amino acid transporters, *Annu. Rev. Physiol* 67 (2005) 557–572.
- [7] B.P. Bode, Recent molecular advances in mammalian glutamine transport, *J. Nutr* 131 (2001) 2475S–2485S.
- [8] J.D. McGivan, C.I. Bungard, The transport of glutamine into mammalian cells, *Front. Biosci* 12 (2007) 874–882.
- [9] A. Broer, K. Klingel, S. Kowalczyk, J.E.J. Rasko, J. Cavanaugh, S. Broer, Molecular cloning of mouse amino acid transport system B⁰, a neutral amino acid transporter related to Hartnup disorder, *J. Biol. Chem* 279 (2004) 24467–24476.
- [10] C. Bohmer, A. Broer, M. Munzinger, S. Kowalczyk, J.E.J. Rasko, F. Lang, S. Broer, Characterization of mouse amino acid transporter B⁰AT1 (slc6a19), *Biochem. J* 389 (2005) 745–751.
- [11] S.M. Camargo, V. Makrides, L.V. Virkki, I.C. Forster, F. Verrey, Steady-state kinetic characterization of the mouse B(0)AT1 sodium-dependent neutral amino acid transporter, *Pflügers Arch* 451 (2005) 338–348.
- [12] M. O'Mara, A. Oakley, S. Broer, Mechanism and putative structure of B(0)-like neutral amino acid transporters, *J. Membr. Biol* 213 (2006) 111–118.
- [13] E. Romeo, M.H. Dave, D. Bacic, Z. Ristic, S.M. Camargo, J. Loffing, C.A. Wagner, F. Verrey, Luminal kidney and intestine SLC6 amino acid transporters of B0AT-cluster and their tissue distribution in *Mus musculus*, *Am. J. Physiol. Renal Physiol* 290 (2006) F376–F383.
- [14] S. Broer, The SLC6 orphans are forming a family of amino acid transporters, *Neurochem. Int* 48 (2006) 559–567.
- [15] F.A. Doyle, J.D. McGivan, The bovine renal epithelial cell line NBL-1 expresses a broad specificity Na(+)-dependent neutral amino acid transport system (System B0) similar to that in bovine renal brush border membrane vesicles, *Biochim. Biophys. Acta* 1104 (1992) 55–62.
- [16] R. Kleta, E. Romeo, Z. Ristic, T. Ohura, C. Stuart, M. Arcos-Burgos, M.H. Dave, C.A. Wagner, S.R. Camargo, S. Inoue, N. Matsuura, A. Helip-Woolley, D. Bockenbauer, R. Warth, I. Bernardini, G. Visser, T. Eggemann, P. Lee, A. Chairoungdua, P. Jutabha, E. Babu, S. Nilwarangkoon, N. Anzai, Y. Kanai, F. Verrey, W.A. Gahl, A. Koizumi, Mutations in SLC6A19, encoding B⁰AT1, cause Hartnup disorder, *Nat. Genet* 36 (2004) 999–1002.
- [17] H.F. Seow, S. Broer, A. Broer, C.G. Bailey, S.J. Potter, J.A. Cavanaugh, J.E. Rasko, Hartnup disorder is caused by mutations in the gene encoding the neutral amino acid transporter SLC6A19, *Nat. Genet* 36 (2004) 1003–1007.
- [18] F. Oppedisano, L. Pochini, M. Galluccio, M. Cavarelli, C. Indiveri, Reconstitution into liposomes of the glutamine/amino acid transporter from renal cell plasma membrane: functional characterization, kinetics and activation by nucleotides, *Biochim. Biophys. Acta* 1667 (2004) 122–131.
- [19] F. Oppedisano, L. Pochini, M. Galluccio, C. Indiveri, The glutamine/amino acid transporter (ASCT2) reconstituted in liposomes: transport mechanism, regulation by ATP and characterization of the glutamine/glutamate antiport, *Biochim. Biophys. Acta* 1768 (2007) 291–298.
- [20] J. Biber, B. Stieger, W. Haase, H. Murer, A high yield preparation for rat kidney brush border membranes. Different behaviour of lysosomal markers, *Biochim. Biophys. Acta* 647 (1981) 169–176.
- [21] R. Krämer, C. Heberger, Functional reconstitution of carrier proteins by removal of detergent with a hydrophobic ion exchange column, *Biochim. Biophys. Acta* 863 (1986) 289–296.
- [22] F. Palmieri, C. Indiveri, F. Bisaccia, V. Iacobazzi, Mitochondrial metabolite carrier proteins: purification, reconstitution, and transport studies, *Methods Enzymol* 260 (1995) 349–369.
- [23] F. Palmieri, M. Kligenberg, Direct methods for measuring metabolite transport and distribution in mitochondria, *Methods Enzymol* 56 (1979) 279–301.
- [24] J.R. Dullea, P.A. Grieve, A simple technique for eliminating interference by detergents in the Lowry method of protein determination, *Anal. Biochem* 64 (1975) 136–141.
- [25] P.S. Chen Jr, T.Y. Toribara, H. Warner, Microdetermination of phosphorus, *Anal. Chem* 28 (1956) 1756–1758.
- [26] L. Pochini, F. Oppedisano, C. Indiveri, Reconstitution into liposomes and functional characterization of the carnitine transporter from renal cell plasma membrane, *Biochim. Biophys. Acta* 1661 (2004) 78–86.
- [27] A. Broer, N. Tietze, S. Kowalczyk, S. Chubb, M. Munzinger, L.K. Bak, S. Broer, The orphan transporter v7-3 (slc6a15) is a Na⁺-dependent neutral amino acid transporter (B0AT2), *Biochem. J* 393 (2006) 421–430.
- [28] S.R. Nash, B. Giros, S.F. Kingsmore, K.M. Kim, S. el-Mestikawy, Q. Dong, F. Fumagalli, M.F. Seldin, M.G. Caron, Cloning, gene structure and genomic localization of an orphan transporter from mouse kidney with six alternatively-spliced isoforms, *Receptors Channels* 6 (1998) 113–128.
- [29] H. Quan, K. Athirakul, W.C. Wetzel, G.E. Torres, R. Stevens, Y.T. Chen, T.M. Coffman, M.G. Caron, Hypertension and impaired glycine handling in mice lacking the orphan transporter XT2, *Mol. Cell Biol* 24 (2004) 4166–4173.
- [30] Z. Ristic, S.M. Camargo, E. Romeo, S. Bodoy, J. Bertran, M. Palacin, V. Makrides, E.M. Furrer, F. Verrey, Neutral amino acid transport mediated by ortholog of imino acid transporter SIT1/SLC6A20 in opossum kidney cells, *Am. J. Physiol. Renal Physiol* 290 (2006) F880–F887.
- [31] E. Heinz, D.L. Sommerfeld, R.K. Kinne, Electrogenicity of sodium/L-glutamate cotransport in rabbit renal brush-border membranes: a reevaluation, *Biochim. Biophys. Acta* 937 (1988) 300–308.

- [32] N.C. Danbolt, Glutamate uptake, *Prog. Neurobiol* 65 (2001) 1–105.
- [33] V. Scalera, M.G. Mola, G. Prezioso, The kinetic mechanism of the glutamate-aspartate carrier in rat intestinal brush-border membrane vesicles: the role of potassium, *J. Bioenerg. Biomembr* 34 (2002) 95–103.
- [34] G. Giebisch, Renal potassium channels: function, regulation, and structure, *Kidney Int* 60 (2001) 436–445.
- [35] N. Utsunomiya-Tate, H. Endou, Y. Kanai, Cloning and functional characterization of a system ASC-like Na⁺-dependent neutral amino acid transporter, *J. Biol. Chem* 271 (1996) 14883–14890.
- [36] U. Danilczyk, R. Sarao, C. Remy, C. Benabbas, G. Stange, A. Richter, S. Arya, J.A. Pospisilik, D. Singer, S.M. Camargo, V. Makrides, T. Ramadan, F. Verrey, C.A. Wagner, J.M. Penninger, Essential role for collectrin in renal amino acid transport, *Nature* 444 (2006) 1088–1091.

Interaction of Mildronate with the Mitochondrial Carnitine/Acylcarnitine Transport Protein

Francesca Oppedisano,¹ Delia Fanello,¹ Menotti Calvani,² and Cesare Indiveri¹

¹Department of Cell Biology, University of Calabria, Via P.Bucci 4c, 87036 Arcavacata di Rende, Italy; E-mail: indiveri@unical.it

²Scientific Department, Sigma-Tau, Via Pontina km 30,400, Pomezia, Rome, Italy

Received 18 May 2007; revised 7 September 2007; accepted 11 September 2007

ABSTRACT: The interaction of mildronate [3-(2,2,2-trimethylhydrazine) propionate] with the purified mitochondrial carnitine/acylcarnitine transporter reconstituted in liposomes has been studied. Mildronate, externally added to the proteoliposomes, strongly inhibited the carnitine/carnitine antiport catalyzed by the reconstituted transporter with an IC_{50} of 560 μ M. A kinetic analysis revealed that the inhibition is completely competitive, that is, mildronate interacts with the substrate-binding site. The half-saturation constant of the transporter for external mildronate (K_i) is 530 μ M. Carnitine/mildronate antiport has been measured as [³H]carnitine uptake into proteoliposomes containing internal mildronate or as [³H]carnitine efflux from proteoliposomes in the presence of external mildronate, indicating that mildronate is transported by the carnitine/acylcarnitine transporter and that the inhibition observed was due to the transport of mildronate in the place of carnitine. The intraliposomal half-saturation constant for mildronate transport (K_m) has been determined. Its value, 18 mM, is much higher than the external half-saturation constant (K_i) in agreement with the asymmetric properties of the transporter. In vivo, the antiport reaction between cytosolic (administered) mildronate and matrix carnitine may cause intramitochondrial carnitine depletion. This effect, together with the inhibition of the physiological transport, will lead to impairment of fatty acid utilization. © 2008 Wiley Periodicals, Inc. *J Biochem Mol Toxicol* 22:8–14, 2008; Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10:1002/jbt.20208

KEYWORDS: Carnitine; Transport; Mildronate

INTRODUCTION

Because of the role of mitochondria in energy metabolism, pharmacological agents, which affect either intramitochondrial metabolic processes or trans-

port pathways connecting the cytosol with mitochondria, may have a considerable influence on the mitochondrial functions and on the total cell metabolism. Several pharmacological agents are known to influence mitochondrial functions [1]. Mildronate [2] is a pharmacological compound that, mostly by indirect actions, has a considerable effect on mitochondrial metabolism. It has been proposed that mildronate lowers the intracellular concentration of carnitine with a consequent suppression of the mitochondrial β -oxidation and activation of the glycolysis, thus exerting a cardioprotective effect [3–5]. However, after longer periods of mildronate treatment, cardiac dysfunction and liver steatosis have been observed in rats [6,7]. The intracellular carnitine depletion induced by mildronate is due to its interaction with several cellular targets. It was previously found that it is an inhibitor of the carnitine biosynthesis at different levels [3,8,9]. In addition, it has been shown that mildronate inhibits carnitine reabsorption by the kidney [3,10] and transport into muscle cells [10,11]. The carnitine transporter OCTN2 should be implicated in this mechanism since it was found that mildronate inhibits this transport system [12]. More recently, it has been shown that mildronate may also act on the nitric oxide production [13,14] and on the regulation of the expression of OCTN2 and other genes [12,15]. The effect of mildronate in lowering the intracellular carnitine concentration has been exploited to develop an animal model of carnitine deficiency in adult and neonatal rats [8,16]. It is very likely that besides the effects on the molecular targets described above, mildronate may exert a direct action on mitochondrial function by interacting with the mitochondrial carnitine/acylcarnitine transporter. This is a well-known transport system that mediates the transport of acylcarnitines into the mitochondrial matrix in exchange with free carnitine. This transport protein has been purified and reconstituted into liposomes [17]. Up to date, the transport system has been extensively characterized on the functional and structural level [18–21].

Correspondence to: Cesare Indiveri.

© 2008 Wiley Periodicals, Inc.

It catalyzes homologous antiport of carnitine with itself as well as heterologous antiport of carnitine with different countersubstrates like acylcarnitines of various lengths. The protein has a single substrate-binding site that accepts both carnitine and acylcarnitines. The antiport reaction occurs by a ping-pong mechanism, that is, the substrate-binding site is exposed alternatively to the external or to the internal face of the transporter. The same protein catalyzes also a unidirectional transport of carnitine, that is, about 10 times slower than the antiport; the unidirectional transport occurs only in the absence of countersubstrate and should play the function of equilibrating the carnitine concentration between the cytosol and the mitochondrial matrix. The transport protein is asymmetrical; its orientation in reconstituted liposomes corresponds to the orientation in mitochondria (right-side out). It shows different affinities for the substrate on the external (cytosol) and internal (matrix) sides. The internal K_m is one order of magnitude higher than the external [18–21].

The interaction of mildronate with the mitochondrial carnitine/acylcarnitine transporter can be investigated in detail on the purified protein reconstituted in liposomes. The proteoliposome experimental system allows analyzing the effect of the pharmacological agent in the absence of other molecular systems connected with the transport or interfering with that. The results, here described, identify the carnitine/acylcarnitine transporter as a mitochondrial molecular target of mildronate. The interaction of this compound with the transporter will have important implications on mitochondrial function and, hence, in the fatty acid catabolism.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Hydroxyapatite (Bio-Gel HTP) and Bio-Beads SM-2 were purchased from Bio-Rad (Segrate, Milano, Italy), Celite 535 from Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Germany), L-[^3H]carnitine from Amersham GE Healthcare (Milano, Italy), and all the other chemicals were from Sigma-Aldrich (Milano, Italy).

Isolation and Reconstitution of the Carnitine/Acylcarnitine Transporter

The carnitine/acylcarnitine transporter was purified from rat liver mitochondria by chromatography on hydroxyapatite and celite as previously described [17]. The purified protein was reconstituted into liposomes by removing the detergent with a hydrophobic column [22,23]. In this procedure, the mixed micelles

containing detergent, protein, and phospholipids were repeatedly passed through a column filled with Bio-Beads SM-2 resin. The composition of the initial mixture used for reconstitution was 380 μL of the purified carnitine/acylcarnitine transporter (about 2 μg protein in 3% Triton X-100), 20 μL of 10% Triton X-100, 100 μL of liposomes (7.5 mg phospholipids, L- α -phosphatidylcholine from fresh turkey egg yolk), 15 mM carnitine (except when differently specified), 30 mM sodium phosphate (pH 7) in a final volume of 680 μL . After vortexing, this mixture was passed 15 times through the same Bio-Beads SM-2 column (0.5 cm diameter \times 3.6 cm height) preequilibrated with a buffer of the same composition of the initial mixture but without protein, detergent, and phospholipids. All the operations were performed at 4°C, except the passages through Bio-Beads SM-2 column that were performed at room temperature.

Transport Measurements

The external substrate was removed by passing 550 μL of proteoliposomes through a Sephadex G-75 column (0.7 cm diameter \times 15 cm height) preequilibrated with 90 mM NaCl and 10 mM Pipes (pH 7). The first 600 μL of the turbid eluate from the Sephadex column was collected, transferred to reaction vessels (100 μL each), and used for transport measurement by the inhibitor stop method [24]. For uptake measurements, transport was initiated by adding 10 μL of [^3H]carnitine at the final concentration indicated in the figure legends. After the required time interval, the reaction was stopped by adding 5 μL of 30 mM *N*-ethylmaleimide, a known inhibitor of the carnitine/acylcarnitine transporter. In control samples, the inhibitor was added together with the labeled substrate at time zero. The assay temperature was 25°C. The external radioactivity was removed by passing the samples (100 μL) through a Sephadex G-50 column (0.6 cm diameter \times 8 cm height). The liposomes eluted with 1.3 mL of 60 mM NaCl were collected in 4 mL of scintillation mixture, vortexed, and counted. The experimental values were corrected by subtracting the respective control values. The transport rate was evaluated from the radioactivity taken up by the proteoliposomes in 2 min, that is, within the initial linear range of substrate uptake. The *N*-ethylmaleimide-insensitive radioactivity associated with the proteoliposomes was always less than 5% of the *N*-ethylmaleimide-sensitive radioactivity taken up during the transport assay.

For efflux measurements, the proteoliposomes containing 15 mM carnitine were pre-labeled by transporter-mediated exchange equilibration before starting the transport assay [19,23]. This was achieved by incubating the proteoliposomes (600 μL), passed through Sephadex G-75 to remove the external

substrate (see above), with 5 μM [^3H]carnitine at high-specific radioactivity (50 $\mu\text{Ci/nmol}$) for 20 min at 25°C. Then, the external radioactivity was removed by passing again the proteoliposomes through Sephadex G-75 as described above except that this chromatography was performed at 0°C to minimize the loss of internal substrate during the chromatography. Transport was started by adding unlabeled external carnitine or mildronate (antiport) at the concentration indicated in the legends to figures and stopped, at the appropriate time interval, as described above. Efflux activity cannot be calculated as specific activity for methodological reasons [23]. It was expressed in arbitrary units as percentage residual intraliposomal radioactivity with respect to the radioactivity present in the proteoliposomes at time 0. Efflux rate (min^{-1}) was calculated as the product of k , the first-order rate constant, and the percent radioactivity effluxed at equilibrium. Rate constants and kinetic constants values were determined by the Grafit (version 5.0.3) computer program based on nonlinear regression analysis.

Other Methods

The protein was determined by the Lowry method, modified for the presence of nonionic detergents [25].

RESULTS

Inhibition of Carnitine Antiport

The effect of mildronate on the carnitine/acylcarnitine transporter was tested in proteoliposomes. The transport activity was measured as 0.1 mM [^3H]carnitine uptake into proteoliposomes containing 15 mM carnitine (carnitine/carnitine homologous antiport) in the presence of increasing concentrations of externally added mildronate. The dose-response curve obtained is shown in Figure 1. Nearly complete inhibition of the transport was observed at 4 mM mildronate; the calculated IC_{50} was 0.56 mM (0.56 ± 0.03 mM from three experiments). To gain further insights into the mechanism of inhibition of the carnitine transport, a kinetic study was performed. The dependence of the carnitine/carnitine antiport rate on the extraliposomal carnitine concentration in the absence or presence of two different concentrations of mildronate was measured. The data, analyzed in double reciprocal (Lineweaver–Burk) plot (Figure 2A), were interpolated by three straight lines that showed a common intersection point close to the ordinate. This behavior is typical of competitive inhibition. The half-saturation constant of the transporter for

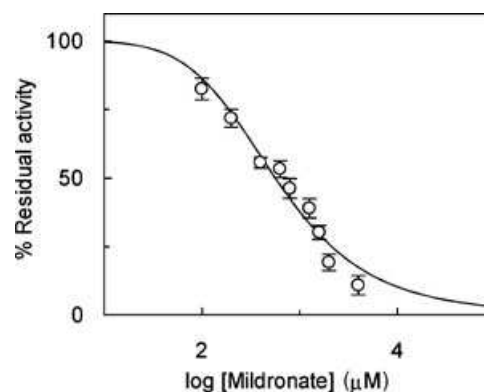


FIGURE 1. Dose-response curve for the inhibition of the reconstituted carnitine/acylcarnitine transporter by mildronate. The carnitine/carnitine antiport rate was measured as described in Materials and Methods, adding 0.1 mM [^3H]carnitine together with the indicated concentrations of mildronate to proteoliposomes containing 15 mM carnitine. Percent residual activity with respect to the control is reported. The control activity (uninhibited carnitine/carnitine antiport) was 0.51 ± 0.10 $\mu\text{mol/min/mg}$ protein; the values are means \pm SD from three experiments.

the inhibitor (K_i) was derived from the plot. The average value calculated from the curves obtained with the two different concentrations of mildronate was 0.70 ± 0.04 mM. The marked difference between the Lineweaver–Burk plots for competitive and noncompetitive type of inhibition makes them easy to distinguish. However, a problem may arise in the case of partially competitive inhibition, that is, the inhibitors bind to a site different from that of the substrate causing an enzyme conformational change that alters the binding of the substrates. This problem can be resolved by varying the concentration of inhibitor at fixed substrate concentrations and plotting the results according to the method of Dixon [26,27]; the data analyzed with this method give a nonlinear dependence in the case of partial inhibition, that is, the interference of the inhibitor with the substrate may be determined by conformational changes induced by the inhibitor binding far from the substrate-binding site. The Dixon plots obtained using the data of Figure 2A as reciprocal transport rates versus the inhibitor concentration (Figure 2B) showed linear dependences. This observation together with the interceptions among the straight lines falling above the abscissa indicated that the inhibition is competitive. The average K_i value derived from the interceptions among the straight lines was 0.53 ± 0.18 mM. These results show that the binding of mildronate occurs at the same site of carnitine.

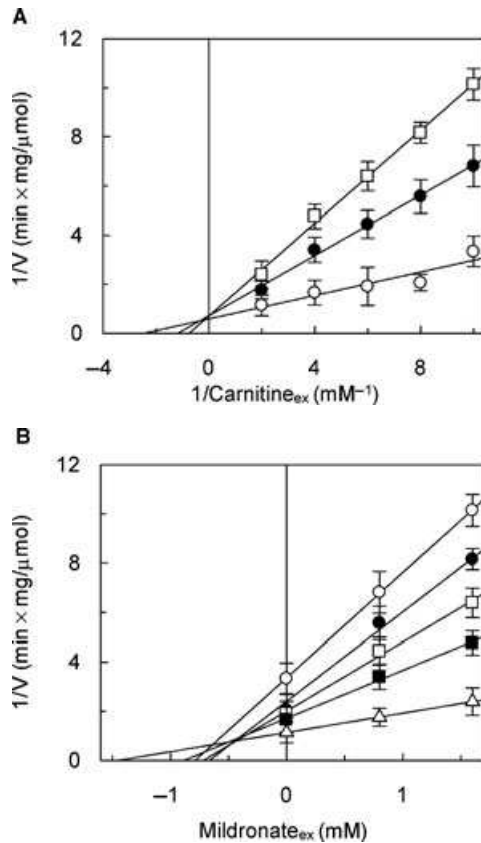


FIGURE 2. Kinetic analysis of the inhibition of the reconstituted carnitine/acylcarnitine transporter by mildronate. The carnitine/carnitine antiport rate was measured as described in Materials and Methods, adding [^3H]carnitine at concentrations ranging from 0.1 to 0.5 mM to proteoliposomes containing 15 mM carnitine, in the absence or in the presence of external mildronate. (A) Experimental data plotted according to Lineweaver-Burk as reciprocal rate versus reciprocal carnitine concentrations in the absence (O) or in the presence of 0.8 mM (●) or 1.6 mM (□) external mildronate. (B) Experimental data plotted according to Dixon as reciprocal rate versus mildronate concentration; the concentrations of external [^3H]carnitine are 0.5 mM (Δ), 0.25 mM (■), 0.17 mM (□), 0.12 mM (●), or 0.1 mM (O). The values are means \pm SD from three experiments.

Characterization of the Mildronate Transport Mediated by the Carnitine/Acylcarnitine Transporter

Because of the pure competitive nature of the inhibition of the carnitine transport by mildronate and to the high similarity of the molecular structure with carnitine [2] (Figure 3), mildronate may be accepted as

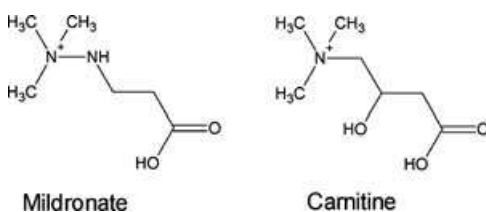


FIGURE 3. Chemical structures of mildronate and carnitine.

a substrate by the carnitine/acylcarnitine transporter and, hence, it could be transported. Since the carnitine/acylcarnitine transporter works mainly by an antiport mode, the transport of mildronate can be evaluated using it as a countersubstrate of carnitine. This strategy has been previously adopted to study the transport of carnitine acyl derivatives [17]. Mildronate has been included inside the proteoliposomes at two different concentrations, and the uptake of labeled carnitine has been measured in these proteoliposomes. As control, the uptake has also been detected in proteoliposomes containing carnitine or in proteoliposomes without internal substrate. As shown in Figure 4, the uptake of labeled carnitine into proteoliposomes containing 15 mM mildronate increased with the time up to 2.6 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein with an initial transport rate of 0.29 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein (calculated as the product of k , the first-order rate constant, and the transport at the equilibrium [23]). This value was about half compared to the uptake into proteoliposomes containing the same concentration of carnitine. In the presence of internal 25 mM mildronate, the uptake of labeled carnitine reached nearly the same amount (5.3 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein) as in the presence of 15 mM internal carnitine with calculated transport rates of 0.47 and 0.48 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein with internal mildronate or carnitine, respectively. As expected, the uptake of labeled carnitine into proteoliposomes without internal substrate was very low with a calculated transport rate of 0.032 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein. This experiment demonstrated that mildronate can be transported from inside the vesicles to outside in exchange for external carnitine, even though the transport of mildronate from inside to outside is less efficient than that of carnitine. To evaluate the possibility that mildronate could

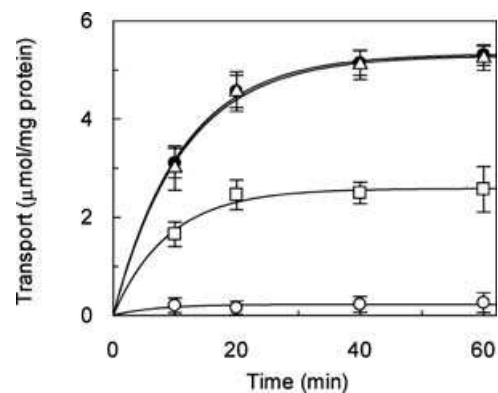


FIGURE 4. Time course of [^3H]carnitine uptake by proteoliposomes. 0.1 mM [^3H]carnitine was added at time 0 to proteoliposomes containing 15 mM carnitine (●), 15 mM mildronate (□), 25 mM mildronate (Δ), or no internal substrate (O). The transport reaction was stopped at the indicated times as described in Materials and Methods. The values are means \pm SD from three experiments.

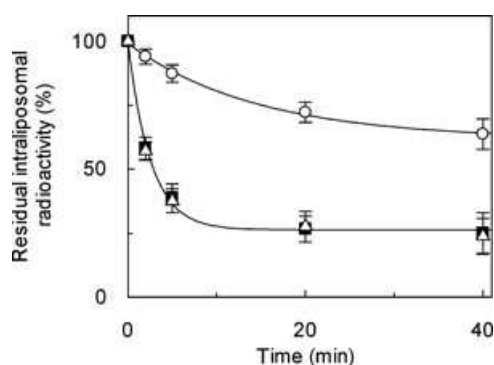


FIGURE 5. Time course of [^3H] carnitine efflux from proteoliposomes. Efflux of 15 mM [^3H]carnitine from prelabeled proteoliposomes (see Materials and Methods) was measured in the presence of 10 mM external carnitine (■), 25 mM external mildronate (Δ), or in the absence of external countersubstrate (○). The values are means \pm SD from three experiments.

be transported also in the opposite direction, that is, from outside to inside the proteoliposomes, the efflux of labeled carnitine has been measured in the presence of external mildronate as countersubstrate (Figure 5). To include the labeled carnitine inside the proteoliposomes, the prelabeling procedure described in Materials and Methods has been adopted. The basic efflux of the labeled substrate from the proteoliposomes in the absence of external countersubstrate (unidirectional transport) was more evident than in the uptake mode (compare Figure 5 with Figure 4) due to methodological reasons [23]. The labeled carnitine effluxed after 40 min, in the absence of external substrate, was about 36% of that initially present (time 0) into the vesicles. The calculated rate (see Materials and Methods) of the uniport was 2.6 min^{-1} . In the presence of 10 mM external carnitine, the radioactivity effluxed after 40 min was about 74% of that initially present inside the proteoliposomes. The rate of the antiport was 29 min^{-1} , about 10 times the rate of the uniport, in agreement with previous findings [19]. The addition of higher concentrations of mildronate (25 mM) instead of carnitine induced a labeled substrate efflux comparable to that induced by the addition of external carnitine. The results indicated that mildronate is transported by the carnitine/acylcarnitine transporter from outside to inside. The inhibition observed in the experiments of Figures 1 and 2 was due to the transport of mildronate in the place of carnitine.

To evaluate the half-saturation constant of the transporter for mildronate (K_m) on the internal side, the dependence of the transport rate on internal mildronate concentration was measured. The experimental data, reported in a double reciprocal plot (Figure 6), were interpolated by a straight line from which the K_m

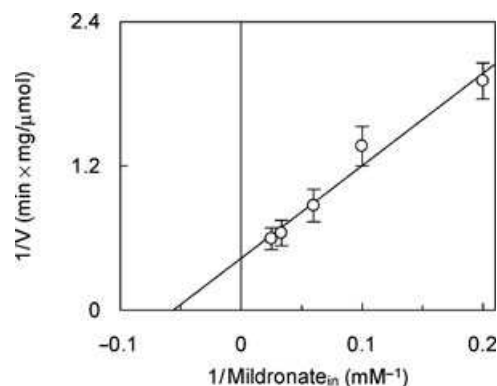


FIGURE 6. Dependence of the carnitine antiport rate on the intraliposomal concentration of mildronate. The carnitine/mildronate antiport rate was measured, as described in Materials and Methods, adding 1 mM [^3H]carnitine to proteoliposomes containing the indicated concentrations of mildronate included in the initial mixture during the reconstitution procedure. The experimental data were plotted according to Lineweaver–Burk as reciprocal rate versus reciprocal mildronate concentrations. The values are means \pm SD from three experiments.

of the transporter for internal mildronate was derived. Its value was $18 \pm 3.6 \text{ mM}$ (from three experiments).

DISCUSSION

In the present study, the role of the mitochondrial carnitine/acylcarnitine transporter as a potential molecular target for mildronate action has been investigated. The interaction of mildronate with the transport protein has been analyzed in the artificial membrane system of proteoliposomes reconstituted with the purified mitochondrial carnitine/acylcarnitine transporter. This strategy allowed us to perform an inhibition kinetic analysis of the effect of mildronate on the carnitine/carnitine antiport reaction catalyzed by the reconstituted transporter. A competitive type of inhibition by mildronate was found, indicating that the pharmacological compound interacts with the substrate-binding site of the transporter. The study of the heterologous antiport carnitine/mildronate revealed that the compound is also accepted as substrate by the transporter. This is in line with the high similarity of the molecular structures of mildronate and carnitine [2,8]. The external half-saturation constant (0.53 mM) of the transporter for external mildronate is very similar to the K_m for carnitine on the external side of the transporter (0.51 mM), measured under the same experimental condition used here [19]. The K_i is also very similar to the IC_{50} of mildronate inhibition. At the internal side, the constants are quite different, since the transporter shows half-saturation constant (18 mM) for mildronate

about three-fold the K_m for carnitine (5.8 mM) [19]. The lower affinity of mildronate with respect to carnitine on the internal side has the consequence that mildronate is preferentially transported from outside to inside in exchange with intraliposomal carnitine rather than, on the other way round, from inside to outside. On the basis of kinetic and inhibition studies, it was previously demonstrated that the carnitine/acylcarnitine transporter is inserted in the proteoliposomal membrane as in the mitochondrial inner membrane, that is, 100% right-side out [19,20]; thus, the experimental data here reported give important information on the possible mildronate action mechanism in vivo. Physiologically, the transporter catalyzes the entry of acylcarnitine into the mitochondrial matrix in exchange with free carnitine. The administered mildronate taken up by the cells will influence the mitochondrial metabolism with two different mechanisms: (i) the inhibition of the acylcarnitine transport into the mitochondrial matrix by the competitive mechanism; (ii) the transfer of the mildronate itself into the matrix by means of the carnitine/mildronate antiport. The latter mechanism will allow a direct action of mildronate on intramitochondrial enzymes. In addition, because of the antiport mode of transport of the carnitine/acylcarnitine transporter, the uptake of mildronate into mitochondria will be coupled to the efflux of carnitine. The occurrence of this transport mode in vivo would determine specific intramitochondrial carnitine depletion induced by mildronate. It is known that the concentration of carnitine inside the mitochondria limits the transport rate of the carnitine/acylcarnitine transporter [19,28]; thus, a lower intramitochondrial carnitine level will decrease the acylcarnitine transport into the matrix. The two action mechanisms, the inhibition of acylcarnitine transport by mildronate and the intramitochondrial carnitine depletion, will act synergistically leading to strong suppression of the β -oxidation and to a decrease of the pool of intramitochondrial acylCoA. The effect should be more significant after long times of mildronate treatment, determining an impairment of fatty acid utilization in tissues such as muscle or liver. This effect may be further modulated due to possible alterations of gene expression induced by mildronate or to variations of its metabolic elimination. The action mechanisms above described may contribute to explain at the molecular level the cardiomyopathy or steatosis observed after mildronate treatment in rats [6,7] and is in agreement with the observation that the level of acetylCoA, short-chain acylCoA, and long-chain acyl CoA is lowered in mitochondria isolated from rats treated with mildronate for 6 weeks, as compared with the controls [7]. A prerequisite of the interaction of mildronate with the mitochondrial target is its diffusion at a sufficient concentration into the cytosol. Very likely, the trans-

port of the pharmacological compound into the cell is mediated by the plasma membrane carnitine transporter (OCTN2). In agreement, it was reported that mildronate inhibits the uptake of carnitine by canine kidney cells [12]. Furthermore, it was found that the OCTN2 transporter, reconstituted into liposomes, catalyzes carnitine transport with an antiport mechanism as previously hypothesized in studies with intact cells [29,30]; this transport mode may determine mildronate accumulation in the cytosol and contribute to the observed cellular (cytosolic) carnitine depletion. The specific interaction of mildronate with the reconstituted OCTN2 transporter will be the object of further studies.

REFERENCES

1. Szewczyk A, Wojtczak L. Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol Rev* 2002;54:101–127.
2. Dambrova M, Liepinsh E, Kalvinsh I. Mildronate: Cardioprotective action through carnitine-lowering effect. *Trends Cardiovasc Med* 2002;12:275–279.
3. Simkhovich BZ, Shutenko ZV, Meirena DV, Khagi KB, Mezapuke RJ, Molodchina TN, Kalvins IJ, Lukevics E. 3-(2,2,2-Trimethylhydrazinium)propionate (THP)—a novel gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor with cardioprotective properties. *Biochem Pharmacol* 1988;37:195–202.
4. Liepinsh E, Vilskersts R, Loca D, Kirjanova O, Pugovichs O, Kalvinsh I, Dambrova M. Mildronate, an inhibitor of carnitine biosynthesis, induces an increase in gamma-butyrobetaine contents and cardioprotection in isolated rat heart infarction. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006;48:314–319.
5. Dhar PK, Grupp IL, Schwartz A, Grupp G, Matlib MA. Reduction of carnitine content by inhibition of its biosynthesis results in protection of isolated guinea pig hearts against hypoxic damage. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 1996;1:235–242.
6. Zaugg CE, Spaniol M, Kaufmann P, Bellahcene M, Barbosa V, Tolnay M, Buser PT, Krahenbuhl S. Myocardial function and energy metabolism in carnitine-deficient rats. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:767–775.
7. Spaniol M, Kaufmann P, Beier K, Wuthrich J, Torok M, Scharnagl H, Marz W, Krahenbuhl S. Mechanisms of liver steatosis in rats with systemic carnitine deficiency due to treatment with trimethylhydraziniumpropionate. *J Lipid Res* 2003;44:144–153.
8. Spaniol M, Brooks H, Auer L, Zimmermann A, Solioz M, Stieger B, Krahenbuhl S. Development and characterization of an animal model of carnitine deficiency. *Eur J Biochem* 2001;268:1876–1887.
9. Tsoko M, Beauseigneur F, Gresti J, Niot I, Demarquoy J, Boichot J, Bezard J, Rochette L, Clouet P. Enhancement of activities relative to fatty acid oxidation in the liver of rats depleted of L-carnitine by D-carnitine and a gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor. *Biochem Pharmacol* 1995;49:1403–1410.
10. Kuwajima M, Harashima H, Hayashi M, Ise S, Sei M, Lu K, Kiwada H, Sugiyama Y, Shima K. Pharmacokinetic analysis of the cardioprotective effect of

- 3-(2,2,2-trimethylhydrazinium) propionate in mice: Inhibition of carnitine transport in kidney. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;289:93–102.
11. Georges B, Le Borgne F, Galland S, Isoir M, Ecosse D, Grand-Jean F, Demarquoy J. Carnitine transport into muscular cells. Inhibition of transport and cell growth by mildronate. *Biochem Pharmacol* 2000;59:1357–1363.
 12. Grube M, Meyer zu Schwabedissen HE, Prager D, Haney J, Moritz KU, Meissner K, Roskopf D, Eckel L, Bohm M, Jedlitschky G, Kroemer HK. Uptake of cardiovascular drugs into the human heart: Expression, regulation, and function of the carnitine transporter OCTN2 (SLC22A5). *Circulation* 2006;113:1114–1122.
 13. Sjakste N, Kleschyov AL, Boucher JL, Baumane L, Dzintare M, Meirena D, Sjakste J, Sydow K, Munzel T, Kalvinsh I. Endothelium- and nitric oxide-dependent vasorelaxing activities of gamma-butyrobetaine esters: Possible link to the antiischemic activities of mildronate. *Eur J Pharmacol* 2004;495:67–73.
 14. Sjakste N, Baumane L, Boucher JL, Dzintare M, Meirena D, Sjakste J, Lauberte L, Kalvinsh I. Effects of gamma-butyrobetaine and mildronate on nitric oxide production in lipopolysaccharide-treated rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2004;94:46–50.
 15. Degrace P, Demizieux L, Gresti J, Tsoko M, Andre A, Demaison L, Clouet P. Fatty acid oxidation and related gene expression in heart depleted of carnitine by mildronate treatment in the rat. *Mol Cell Biochem* 2004;258:171–182.
 16. Pescechera A, Scalibastri M, Russo F, Giarrizzo MG, Carminati P, Giannesi F, Arduini A, Ricciolini R. Carnitine depletion in rat pups from mothers given mildronate: A model of carnitine deficiency in late fetal and neonatal life. *Life Sci* 2005;77:3078–3091.
 17. Indiveri C, Tonazzi A, Palmieri F. Identification and purification of the carnitine carrier from rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1990;1020:81–86.
 18. Palmieri F, Indiveri C, Bisaccia F, Kramer R. Functional properties of purified and reconstituted mitochondrial metabolite carriers. *J Bioenerg Biomembr* 1993;25:525–535.
 19. Indiveri C, Tonazzi A, Palmieri F. The reconstituted carnitine carrier from rat liver mitochondria: Evidence for a transport mechanism different from that of the other mitochondrial translocators. *Biochim Biophys Acta* 1994;1189:65–73.
 20. Indiveri C, Tonazzi A, Giangregorio N, Palmieri F. Probing the active site of the reconstituted carnitine carrier from rat liver mitochondria with sulfhydryl reagents. A cysteine residue is localized in or near the substrate binding site. *Eur J Biochem* 1995;228:271–278.
 21. Indiveri C, Iacobazzi V, Giangregorio N, Palmieri F. The mitochondrial carnitine carrier protein: cDNA cloning, primary structure and comparison with other mitochondrial transport proteins. *Biochem J* 1997;321:713–719.
 22. Kramer R, Heberger C. Functional reconstitution of carrier proteins by removal of detergent with hydrophobic ion exchange column. *Biochim Biophys Acta* 1986;863:289–296.
 23. Palmieri F, Indiveri C, Bisaccia F, Iacobazzi V. Mitochondrial metabolite carrier proteins: Purification, reconstitution, and transport studies. *Methods Enzymol* 1995;260:349–369.
 24. Palmieri F, Klingenberg M. Direct methods for measuring metabolite transport and distribution in mitochondria. *Methods Enzymol* 1979;56:279–301.
 25. Dullely JR, Grieve PA. A simple technique for eliminating interference by detergents in the Lowry method of protein determination. *Anal Biochem* 1975;64:136–141.
 26. Dixon M. The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem J* 1953;55:170–171.
 27. Tonazzi A, Giangregorio N, Palmieri F, Indiveri C. Relationships of cysteine and lysine residues with the substrate binding site of the mitochondrial ornithine/citrulline carrier: An inhibition kinetic approach combined with the analysis of the homology structural model. *Biochim Biophys Acta* 2005;1718:53–60.
 28. Eaton S. Control of mitochondrial beta-oxidation flux. *Prog Lipid Res* 2002;41:197–239.
 29. Pochini L, Oppedisano F, Indiveri C. Reconstitution into liposomes and functional characterization of the carnitine transporter from renal cell plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* 2004;1661:78–86.
 30. Ohashi R, Tamai I, Nezu JI, Nikaido H, Hashimoto N, Oku A, Sai Y, Shimane M, Tsuji A. Molecular and physiological evidence for multifunctionality of carnitine/organic cation transporter OCTN2. *Mol Pharmacol* 2001;59:358–366.

The glutamine/amino acid transporter (ASCT2) reconstituted in liposomes: Transport mechanism, regulation by ATP and characterization of the glutamine/glutamate antiport

Francesca Oppedisano, Lorena Pochini, Michele Galluccio, Cesare Indiveri*

Department of Cell Biology, University of Calabria, Via P. Bucci 4c 87036 Arcavacata di Rende, Italy

Received 8 June 2006; received in revised form 6 August 2006; accepted 6 September 2006

Available online 16 September 2006

Abstract

The glutamine/amino acid transporter solubilized from rat renal apical plasma membrane (brush-border membrane) with C₁₂E₈ and reconstituted into liposomes has been previously identified as the ASCT2 transporter. The reconstituted transporter catalyses an antiport reaction in which external glutamine and Na⁺ are cotransported in exchange with internal glutamine (or other amino acids). The glutamine–Na⁺ cotransport occurred with a 1:1 stoichiometry. The concentration of Na⁺ did not influence the K_m for glutamine and vice versa. Experimental data obtained by a bi-substrate analysis of the glutamine–Na⁺ cotransport, together with previous report on the glutamine_{ex}/glutamine_{in} pseudo bi-reactant analysis, indicated that the transporter catalyses a three-substrate transport reaction with a random simultaneous mechanism. The presence of ATP in the internal compartment of the proteoliposomes led to an increase of the V_{max} of the transport and to a decrease of the K_m of the transporter for external Na⁺. The reconstituted glutamine/amino acid transporter was inhibited by glutamate; the inhibition was more pronounced at acidic pH. A kinetic analysis revealed that the inhibition was competitive with respect to glutamine. Glutamate was also transported in exchange with glutamine. The external K_m of the transporter for glutamate (13.3 mM) was slightly higher than the internal one (8.3 mM). At acidic pH the external but not the internal K_m decreased. According with the K_m values, glutamate should be transported preferentially from inside to outside in exchange for external glutamine and Na⁺.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Plasma membrane; Transport; Liposome; Reconstitution; Glutamine; Glutamate; ASCT2

1. Introduction

The plasma membrane transporters for glutamine and neutral amino acids are object of interest for their involvement in the glutamine homeostasis in mammals (see refs. [1–5] for reviews). Even though several genes coding for the glutamine and neutral amino acid transporters have been identified and cloned, the functional and regulatory properties of the transporters are still matter of investigation. Among the experimental approaches for the functional characterization of the plasma membrane glutamine transporters, the most widely

used so far is the measurement of substrate uptake into cell systems (over)expressing a specific transporter [6–12]. Recently, the glutamine/amino acid transporter extracted from brush border membranes of rat kidney has been reconstituted into liposomes by the procedure of cyclic detergent removal [13]. The reconstituted transporter has been identified as ASCT2 (or its homologous ATB^o [14]), since the basic functional properties found in proteoliposomes were coincident with those described for the ASCT2 transporter in previous studies performed with cell systems [5–12,14] and the source of the reconstituted transporter corresponds with the cellular localization of ASCT2 in the kidney among other tissues [5,6,14]. In particular, the reconstituted glutamine/amino acid transporter, as the ASCT2, shows sodium dependence and low tolerance towards the substitution of Na⁺ by Li⁺, insensitivity to the amino acid analogue α -(methylamino)isobutyric acid (MeAIB), specificity for neutral amino acids and for glutamate

Abbreviations: C₁₂E₈, octaethylene glycol monododecyl ether; DEPC, Diethyl pyrocarbonate

* Corresponding author. Dipartimento di Biologia Cellulare, Università della Calabria, Via P. Bucci cubo 4c, 87036 Arcavacata di Rende (CS), Italy. Tel.: +39 0984 492939; fax: +39 0984 492911.

E-mail address: indiveri@unical.it (C. Indiveri).

that are transported by an antiport mode and shows maximal transport at pH 7 [13]. Differently, among the amino acid transporters that accept glutamine: systems L and b^{o+} are not dependent by sodium, systems y⁺L and N accept Li⁺ in the place of Na⁺, system A is inhibited by MeAIB, system B^{o+} mediate glutamine uniport, system B^oAT1 mediates net uptake of amino acids, does not accept glutamate and shows optimal activity at alkaline pH [1–5,14–16]. Novel functional properties of the glutamine/amino acid transporter have been revealed by means of the reconstituted system, like the functional asymmetry, the sensitivity to SH reagents and the activation by intraliposomal ATP. The transporter was inserted unidirectionally in the proteoliposomal membrane, right-side-out with respect to the cell membrane; thus, the properties of the internal side of the reconstituted transporter correspond to those of the intracellular side and vice versa.

In this paper, kinetic and functional aspects of the glutamine/amino acid transporter have been further investigated. The understanding of the kinetic mechanism of the glutamine_{ex}-Na⁺_{ex} cotransport reaction together with previous data on the analysis of the glutamine/glutamine antiport allowed to define the overall kinetic mechanism of the glutamine_{ex}-Na⁺_{ex}/glutamine_{in} reaction catalysed by the transporter. The kinetic parameters that are influenced by the binding of ATP to the internal side of the transporter have been revealed. The involvement of glutamate in the transport function of the glutamine/amino acid transporter has been investigated.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Amberlite XAD-4, egg yolk phospholipids (3-*sn*-phosphatidylcholine from egg yolk) and C₁₂E₈ were purchased from Fluka; L-[³H]glutamine from Amersham; Sephadex G-75, from Sigma. All other reagents were of analytical grade.

2.2. Solubilization of the glutamine/amino acid transporter

Brush-border membranes were prepared from rat kidney and stored as previously described [13,17]. The glutamine/amino acid transporter was solubilized by treating the membrane preparation (50 μl, about 0.15 mg protein) with 1.3% C₁₂E₈ in a final volume of 150 μl and centrifuged at 13,000×g for 4 min at 4 °C. The supernatant (extract) was used for the reconstitution.

2.3. Reconstitution of the glutamine/amino acid transporter into liposomes

The glutamine/amino acid transporter was reconstituted by removing the detergent with a hydrophobic chromatography column [18,19]. In this procedure, the mixed micelles containing detergent, protein and phospholipids were repeatedly passed through the same Amberlite XAD-4 column. The composition of the initial mixture used for reconstitution was: 25 μl of the solubilized protein (25–35 μg protein in 1.3% C₁₂E₈), 75 μl of 10% C₁₂E₈, 100 μl of 10% egg yolk phospholipids in the form of sonicated liposomes prepared as previously described [18], 30 mM L-glutamine, 20 mM HEPES/Tris pH 7.0 (except when differently specified) in a final volume of 700 μl. After vortexing, this mixture was passed 16 times through the same Amberlite column (0.5×2.5 cm) preequilibrated with a buffer of the same composition of the initial mixture with the exception of protein, detergent and phospholipid. All the operations were performed at

4 °C, except the passages through Amberlite, which were carried out at room temperature.

2.4. Transport measurements

To remove the external substrate, 550 μl of proteoliposomes were passed through a Sephadex G-75 column (0.7×15 cm) preequilibrated with 20 mM HEPES/Tris pH 7.0 (except when differently specified) and sucrose at an appropriate concentration to balance the internal osmolarity (“unlabeled” proteoliposomes). For efflux measurements, the “unlabeled” proteoliposomes (600 μl), containing 30 mM glutamine, were “prelabeled” by transporter-mediated exchange equilibration [19] by incubation with 10 μl of 0.6 mM [³H] glutamine at high specific radioactivity (2 μCi/nmol) for 60 min at 25 °C; then, the external radioactivity was removed by passing again the proteoliposomes through Sephadex G-75 as described above. Transport was started, in the case of uptake, by adding [³H]glutamine to the “unlabeled” proteoliposomes, or, in the case of efflux, by adding non-radioactive substrates to the “prelabeled” proteoliposomes. In both cases, transport was stopped by adding 20 μM mersalyl at the desired time interval. In control samples the inhibitor was added at time zero according to the inhibitor stop method [20]. The assay temperature was 25 °C. Finally, each sample of proteoliposomes (100 μl) was passed through a Sephadex G-75 column (0.6×8 cm) in order to separate the external from the internal radioactivity. Liposomes were eluted with 1 ml 50 mM NaCl and collected in 4 ml of scintillation mixture, vortexed and counted. For the determination of the [³H]glutamine uptake, the experimental values were corrected by subtracting the respective controls (samples inhibited at time zero). For the determination of the [³H]glutamine efflux, the experimental values were subtracted from the respective controls (samples inhibited at time zero). For kinetic determinations, the initial rate of transport was measured by stopping the reaction after 10 min, i.e., within the initial linear range of [³H]glutamine uptake into the proteoliposomes. [³H]glutamine efflux rate, expressed as cpm/min, was determined by fitting the experimental data in a first order rate equation from which the initial transport rate was calculated as the product of k (first order rate constant) and A (the effluxed radioactivity at equilibrium).

2.5. Other methods

The protein concentration was determined by the modified Lowry procedure [21].

3. Results

To further characterize the functional properties of the reconstituted glutamine/amino acid transporter (ASCT2), the ability to accept intraliposomal leucine and phenylalanine as countersubstrate for external glutamine was tested. The specificity towards the two amino acids is a feature to distinguish B^oAT1 from ASCT2 [15]. The uptake of labeled glutamine in proteoliposomes containing internal 30 mM leucine or phenylalanine has been compared to control samples, i.e., proteoliposomes containing 30 mM internal glutamine. The percent radioactivity taken up in the presence of leucine and phenylalanine was 15±2.6% and 20±1.6% of the radioactivity taken up in the presence of glutamine (three experiments). These data further indicated that the reconstituted transporter was different from the B^oAT1 transporter, in agreement with previous findings ([13] and see Introduction).

The stoichiometry of the sodium-glutamine co-transport in exchange for glutamine, as counter-substrate, has been determined in double labeling experiments. The time course of the uptake of [³H]glutamine and [²²Na⁺] (as Cl⁻ salt), at equal concentrations, in proteoliposomes containing 30 mM glutamine was measured. Very similar experimental data were

found for the glutamine and Na^+ uptake (Fig. 1) indicating a 1:1 stoichiometry of transport. This is in agreement with the lack of cooperative effects in the experiment of Fig. 3.

In the Na^+ -dependent glutamine antiport, the concentration of Na^+ may influence the K_m for glutamine and vice versa. To gain insights into this aspect, the glutamine– Na^+ cotransport has been investigated by a pseudo bi-reactant kinetic analysis [22–24], varying the concentrations of the two external substrates, glutamine and Na^+ , keeping the concentration of internal glutamine constant and close to saturation. Transport rates as function of the external glutamine (Fig. 2A) or Na^+ (Fig. 2B) concentration were reported in double reciprocal plots (Lineweaver–Burk plots). The intercepts of the straight lines with the abscissa were very close to each other, indicating that the concentration of Na^+ had nearly no influence on the K_m of the transporter for external glutamine and the glutamine concentrations had nearly no influence on the K_m for Na^+ . The patterns of intersecting straight lines indicated that the glutamine– Na^+ cotransport follows a simultaneous mechanism. In this mechanism the two substrates are translocated simultaneously to the opposite side of the membrane, differently from the ping-pong mechanism in which the translocation of the substrates occur in different consecutive steps. Concentration independent K_m for external glutamine and Na^+ , and K_{is} values, (dissociation constant of the pseudo-binary complex transporter-substrate), could be derived from secondary graphs obtained by plotting the values of the ordinate intercepts or the slopes of the straight lines of Fig. 2A and B, as function of the reciprocal substrate concentrations (not shown). The K_m values extrapolated from the replots were 0.43 mM for external glutamine and 10 mM for Na^+ . The K_{is} values obtained for glutamine and Na^+ were 0.30 and 7.1 mM, respectively. Thus, the affinity of the transporter for the substrates is similar, whether it is in the free or in the second substrate-bound form. Furthermore, the ratio between K_m and K_{is} for each substrate is constant and close to 1. These features together with the finding of common intersections close to the abscissa (Fig. 2A and B) are typical of the

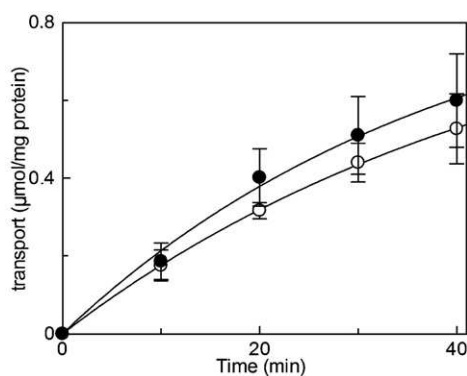


Fig. 1. Time course of $[^3\text{H}]$ glutamine and $[^{22}\text{Na}^+]$ uptake by reconstituted proteoliposomes. 5 mM $[^3\text{H}]$ glutamine (○) and 5 mM $[^{22}\text{Na}^+]$ (●) were added at time zero to proteoliposomes containing 30 mM internal glutamine; the transport reaction was stopped at the indicated times, as described in Materials and methods. Data are means \pm S.D. of three different experiments.

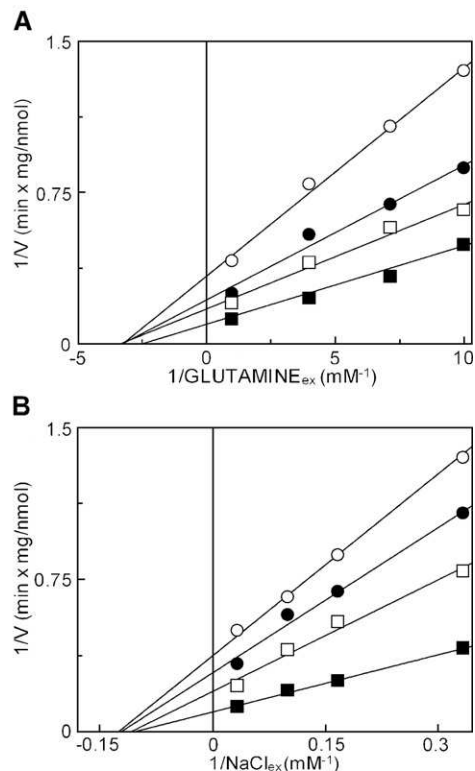


Fig. 2. Bi-substrate analysis of the glutamine– Na^+ cotransport mediated by the reconstituted glutamine/amino acid transporter. Lineweaver–Burk plots showing the dependence of glutamine $_{\text{ex}}$ – Na^+ $_{\text{ex}}$ /glutamine $_{\text{in}}$ antiport rate on external glutamine (A) or NaCl (B) concentrations. In (A) the concentrations of NaCl were 3 (○), 6 (●), 10 (□) and 30 (■) mM. In (B) the concentrations of glutamine were 0.1 (○), 0.14 (●), 0.25 (□) and 1 (■) mM. The concentration of internal glutamine was constant (50 mM). Similar results were obtained in three different experiments.

random simultaneous mechanism [22–24] in which, differently from the ordered mechanism, the substrates bind to the transporter without any preferential order.

It was previously shown that ATP present in the intraliposomal compartment activates the glutamine antiport catalysed by the reconstituted glutamine/amino acid transporter; the presence of the nucleotide did not affect significantly the external or the internal affinity of the transporter for the neutral amino acid substrates [13]. To ascertain whether ATP exerted any effect on the affinity of the transporter for Na^+ , the dependence of the transport rate on Na^+ concentration in the presence (or absence) of ATP was determined; the data were plotted according to Michaelis–Menten (Fig. 3). Besides the increase of transport rate in agreement with the previous finding [13], a clear reduction of the K_m for Na^+ was detected in the presence of internal ATP. The K_m decreased from 16.7 to 6.5 mM (14.4 ± 2.1 to 7.0 ± 0.6 mM from 3 experiments). Neither in the presence nor in the absence of ATP were cooperative effects observed.

It is known from previous studies in cell systems that the ASCT2 transporter shows higher affinity for the amino acid glutamate at acidic pH as compared to neutral or alkaline pH. This is a characteristic feature of this transport system [6,25].

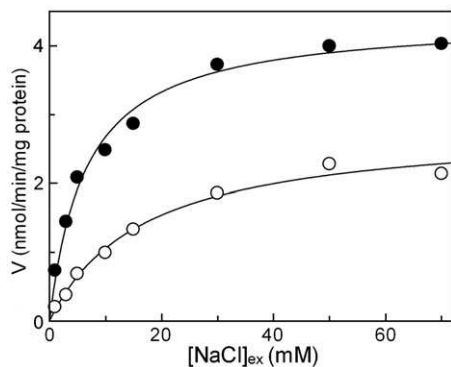


Fig. 3. Dependence of glutamine antiport rate on the concentration of external NaCl: effect of ATP. Antiport rate was measured as 0.1 mM [^3H]glutamine uptake into proteoliposomes containing 30 mM glutamine, as described in Materials and methods, in the presence (●) or absence (○) of 4 mM internal ATP. NaCl was added at the indicated concentrations outside the proteoliposomes. Similar results were obtained in three different experiments.

The interaction of glutamate with the transporter has been further investigated in this work. The inhibition by glutamate of the glutamine antiport catalysed by the reconstituted transporter, has been compared to the inhibition by serine and alanine in the range from pH 5.5 to pH 8.5. The results are reported in Fig. 4 as percent inhibition. The inhibition by glutamate strongly increased at acidic pH, whereas the inhibition by serine and alanine was nearly independent of the pH. Other neutral amino acids like threonine and asparagine behaved as alanine (not shown). An inhibition kinetic analysis was performed by studying the effect of glutamate at different glutamine concentration at pH 6.0 and pH 7.0. The data plotted according to Lineweaver–Burk revealed competitive inhibition patterns both at pH 6.0 (Fig. 5A) and at pH 7.0 (Fig. 5B). The inhibition was clearly more pronounced at pH 6.0. The average K_i of the transporter for glutamate were derived from the graphs: their values at pH 6.0 and pH 7.0 were 7.7 ± 2.3 mM and

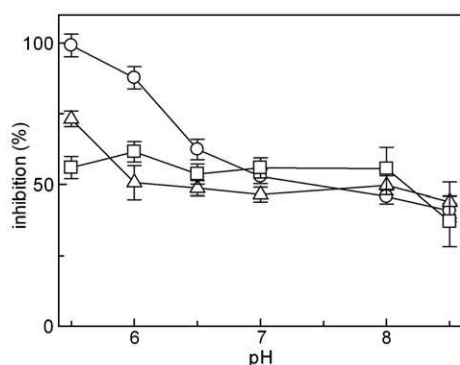


Fig. 4. pH dependence of the inhibition of the glutamine/amino acid transporter by glutamate. All the experimental procedures from the reconstitution to the transport measurement (see Materials and methods) were performed in 20 mM HEPES/Tris buffer at the indicated pH. Transport was measured as 0.1 mM [^3H]glutamine uptake in 10 min into proteoliposomes containing 30 mM glutamine, in the presence of 50 mM external NaCl and in presence of 16 mM external glutamate (○), 0.8 mM external serine (Δ), 0.8 mM external alanine (□). The results are expressed as percent inhibition with respect to the control without added inhibitor. Data are means \pm S.D. of three different experiments.

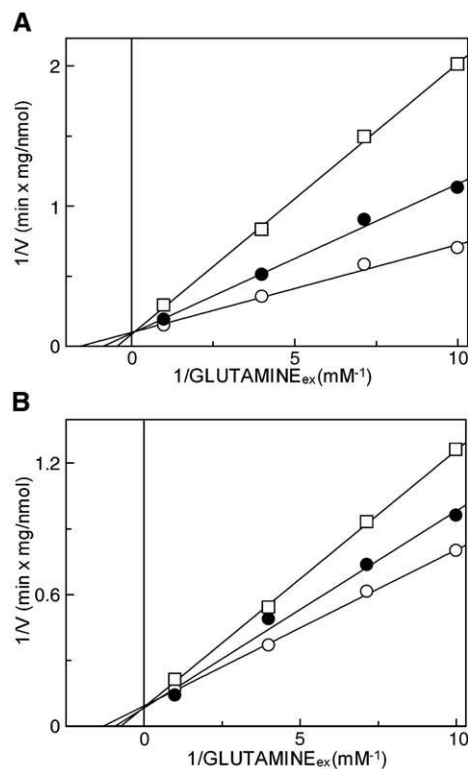


Fig. 5. Kinetic analysis of the inhibition of the reconstituted glutamine/amino acid transporter by glutamate. The uptake rate of [^3H]glutamine at the indicated concentrations was measured in proteoliposomes containing 30 mM glutamine in absence (○) or in the presence of 8 (●) mM or 16 (□) mM external glutamate. All the experimental procedures from the reconstitution to the transport measurement (see Materials and methods) were performed in 20 mM HEPES/Tris buffer at pH 6.0 (A), or at pH 7.0 (B). Similar results were obtained in three different experiments.

20.5 ± 0.7 mM, respectively. According to the competitive nature of the inhibition, glutamate should be transported as previously described for the expressed ASCT2 [6] and for the reconstituted transporter [13] even though with a lower efficiency in respect to the other neutral amino acids. To further investigate this important aspect, the dependence of the glutamate_{ex}/glutamine_{in} antiport on the pH was studied by measuring the efflux of labeled glutamine from proteoliposomes in the presence of external glutamate (see Materials and methods). As shown in Fig. 6A, a maximum of activity was observed at pH 6.0. The transport decreased at more alkaline pH and was very low at pH 5.5. This dependence was clearly different from the pH dependence of the homologous glutamine/glutamine antiport previously reported [13], in which maximal activity was observed at pH 7.0. In a further experiment the pH dependence of the glutamate_{ex}/glutamine_{in} antiport was studied by measuring the uptake of labeled glutamine into proteoliposomes containing internal glutamate (Fig. 6B). In this transport mode, a maximum was observed at pH 7.0 with a slight decrease of activity at more acidic pH and a stronger decrease at pH 5.5 and at alkaline pH; the dependence of this transport mode was more similar to that observed for the glutamine/glutamine antiport [13]. To measure the K_m of the transporter for external glutamate, the rate of the glutamate_{ex}/

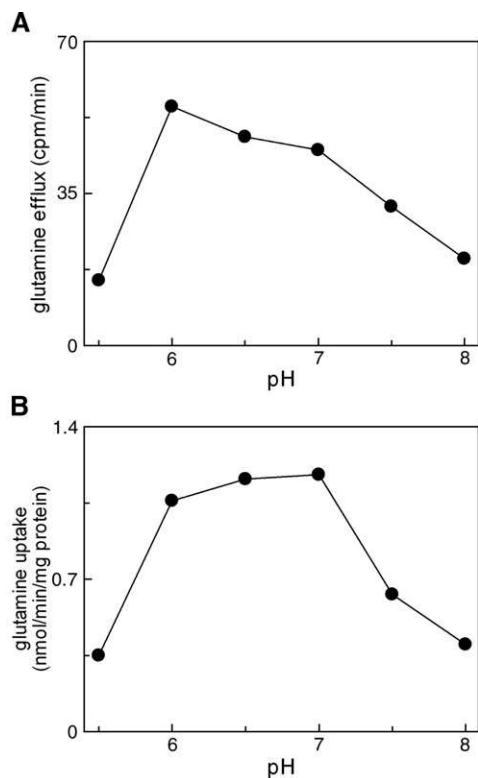


Fig. 6. Effect of pH on the glutamine/glutamate antiport. (A) The glutamate_{ex}/glutamine_{in} antiport rate has been measured as 30 mM [³H] glutamine efflux from proteoliposomes (as described in Materials and methods) in the presence of external 16 mM glutamate and 50 mM NaCl. (B) The glutamine_{ex}/glutamate_{in} antiport rate has been measured as 0.1 mM [³H]glutamine uptake into proteoliposomes containing 30 mM glutamate in 10 min. All the experimental procedures from the reconstitution to the transport measurement (see Materials and methods) were performed in 20 mM HEPES/Tris buffer at the indicated pH. Similar results were obtained in three different experiments.

glutamine_{in} antiport was measured at different external glutamate concentrations; to measure the internal Km for glutamate, the rate of the glutamine_{ex}/glutamate_{in} antiport was measured at different internal glutamate concentrations. The Km values for the zwitterion glutamic acid were derived from the concentration of the zwitterion at the different pH, calculated on the basis of the pKa 4.25, of the distal carboxyl group. At pH 7.0 the concentrations of the zwitterionic species were ten times lower than those at pH 6.0. The Km for glutamate was also measured in the presence of ATP. The internal and external Km for glutamate have been measured at pH 6.0 and compared to those previously determined at pH 7.0. The data are summarized in Table 1. The Km of the transporter for external glutamate was 13 mM at pH 7.0; the Km decreased to about half at pH 6.0. The Km values for the zwitterions were much lower than those for glutamate. These values clearly followed the concentration of the zwitterions. The presence of internal ATP did not cause appreciable variations of the Km. Neither ATP nor pH influenced the internal Km for glutamate. Differently from glutamate, both the external and the internal Km for glutamine at pH 6.0 did not change as compared to the values measured at pH 7.0. Aspartate has been tested as inhibitor of the glutamine/glutamate antiport both at pH 6.0 and

pH 7.0 in experiments performed (not shown) as those described for glutamate in Fig. 4. A very low inhibition was observed at pH 7.0 with a Ki of about 60 mM and nearly no inhibition was detected at pH 6.0. To investigate the possible involvement of His residues in the transport, DEPC, a specific His reagent, has been tested for its ability to inhibit the reconstituted glutamine/amino acid transporter. The reagent added to the reconstituted proteoliposomes inhibited the glutamine/glutamate antiport measured as 0.1 mM [³H] glutamine uptake into proteoliposomes containing 30 mM glutamate: 1, 2 and 3 mM DEPC lead to a transport inhibition of 25±10%, 55±12% and 82±21%, respectively.

4. Discussion

The renal glutamine/amino acid transporter reconstituted into liposomes and identified as ASCT2 catalyses a Na⁺ dependent antiport reaction in which glutamine (or other neutral amino acids) and Na⁺ are translocated from the external to the internal compartment of the proteoliposomes in exchange for internal glutamine or other neutral amino acids [13]. Even though the reconstituted brush-border extract should contain several membrane proteins, the activity of the glutamine/amino acid transporter was discriminated by using appropriate experimental procedures: labeled glutamine was used to test the transport, thus excluding several transporter that do not accept this amino acid; the antiport of glutamine with itself or other amino acids has been measured under condition of concentration gradient in favour of the unlabeled compounds. This strategy allows a several fold radioactivity accumulation with respect to the net uptake, thus limiting the possible

Table 1

Half-saturation constants of the reconstituted glutamine/amino acid transporter for glutamate and glutamine

| Substrate | pH | External Km (mM) | Internal Km (mM) |
|--------------------------------|-----|---------------------|--------------------|
| Glutamate | 6.0 | 7.5±2.2 | 9.1±2.0 |
| Glutamate | 7.0 | 13.3±2.9 | 8.3±2.1 |
| Glutamic acid (zwitterion) | 6.0 | 0.13±0.042 | 0.16±0.032 |
| Glutamic acid (zwitterion) | 7.0 | 0.022±0.0049 | 0.014±0.0035 |
| Glutamate (ATP _{in}) | 6.0 | 7.2±2.1 | 8.1±1.2 |
| Glutamate (ATP _{in}) | 7.0 | 13.1±3.1 | 9.2±1.0 |
| Glutamine | 6.0 | 0.50±0.03 | 9.9±2.1 |
| Glutamine | 7.0 | 0.47±0.07 from [13] | 11.0±1.9 from [13] |

Internal Km values for glutamate were calculated from double reciprocal plots of the experimental data obtained by measuring the antiport rate as [³H]glutamine uptake in the presence of external 50 mM NaCl into proteoliposomes containing different concentrations of glutamate ranging from 2 to 40 mM. For the determination of external Km the efflux of [³H]glutamine from prelabeled proteoliposomes was determined in the presence of external glutamate concentrations ranging from 1 to 30 mM (see Materials and methods). 4 mM ATP was included inside the proteoliposomes where indicated. Km values for glutamine were calculated from double reciprocal plots of the experimental data obtained by measuring the antiport rate as [³H]glutamine uptake in the presence of external 50 mM NaCl into proteoliposomes containing glutamine; the external or the internal glutamine concentration was varied from 0.1 to 2 mM or from 2 to 40 mM to measure the external or the internal Km, respectively. All the experimental procedures from the reconstitution to the transport measurement (see Materials and methods) were performed in 20 mM HEPES/Tris buffer at pH 6.0 or at pH 7.0. The values given are means±S.D. from 3 different experiments.

interference of net uptake systems; the discrimination was further improved by the use of the specific inhibitor, mersalyl, that allows to subtract the unspecific transport or transport mediated by mersalyl insensitive transporters. In addition, the reconstituted system was optimised with respect to parameters like the detergent, phospholipid and protein concentrations, that are critical for each single transporter [13,19]. Thus, the possible interference of other transporters, if present, is very low. In this paper it has been found that the glutamine–Na⁺ cotransport occurs with 1:1 stoichiometry. The concentration of Na⁺ has nearly no influence on the affinity of the transporter for glutamine and vice versa. The reaction catalysed by the glutamine/amino acid transporter (ASCT2) can be assimilated to a ter-reactant reaction in which external glutamine, external Na⁺ and internal glutamine are the three substrates. This special case of kinetic mechanism can be analysed by combinations of pseudo-bi-reactant analyses in which the concentrations of two of the substrates are varied keeping the concentration of the third substrate constant and close to saturation [22,23]. This type of kinetic analysis can be applied to transport systems as well [24]. In a previous report the bi-reactant kinetic analysis of the glutamine_{ex}/glutamine_{in} antiport, was carried out studying the dependence of the antiport rate on both external and internal glutamine concentration, keeping the Na⁺ concentration constant and close to saturation. The experimental data were in favour of a random simultaneous mechanism [13]. The pseudo-bi-reactant analysis described in the previous paper together with the pseudo-bi-reactant analysis of the glutamine–Na⁺ cotransport here described, allows a comprehensive interpretation of the kinetic mechanism of the transport catalysed by the glutamine/amino acid transporter: it is a random simultaneous mechanism. This is evidenced by the intersecting patterns of the straight lines with a common interception close to the abscissa, observed in both the pseudo-bi-substrate kinetic analyses and by the constant ratio between Km and Kis of the transporter for the substrates glutamine and Na⁺. This mechanism implies the formation of a complex involving one transporter molecule with two glutamine (or other amino acids, on the internal and on the external side of the protein) and one Na⁺ (on the external side). The formation of this complex does not require any preferential order for the binding of the substrates and the three molecules are translocated simultaneously [22–24]. Thus, the transporter protein should possess an internal site for the substrate and two external sites, one for the amino acid substrate, the other one for Na⁺. Differently, an ordered simultaneous transport mechanism was found for the B⁰AT1 transporter [26]. At this stage it is not possible to establish whether the transporter has a monomeric or an oligomeric structure and hence whether the transport pathway involves one or more molecules for each transported substrate molecule. The ASCT2 protein shows a significant identity (29%) of the amino acid sequence (not shown) with that of the *Pyrococcus horikoshii* glutamate transporter, the structure of which has recently been resolved [27]. Furthermore the hydrophobicity profiles of the two proteins are very similar (not shown and see ref. [6]). Thus, it is very likely that the ASCT2 has a tertiary structure similar to that of the glutamate transporter. On the light of this similarity, the ASCT2

transporter may have a oligomeric structure as the glutamate transporter. The glutamate transporter catalyses a net co-transport of glutamate and Na⁺. It, most probably, has one binding site for glutamate and one for Na⁺ on each monomer. The co-transport of the amino acid molecules and the Na⁺ ions from the external environment to the cytosol should occur by the opening of a transport pathway from the substrate binding site to the cytoplasm [27]. Differently, the ASCT2 is an antiporter. Thus, the simultaneous transport of glutamine and Na⁺ towards the cytoplasm and of another amino acid in the opposite direction should occur with a different molecular mechanism: (i) each transporter subunit should have an additional substrate binding site on the cytosolic side thus allowing the simultaneous translocation of the three molecular species through a single transport pathway or (ii) the oligomeric structure may act in the case of ASCT2 in a concerted molecular mechanism in which two active subunits have the substrate binding sites exposed on opposite sides; the external site binds the amino acid and Na⁺, the internal site binds the internal amino acid; the translocation, in this case, should occur through different transport pathways.

In a previous study on the reconstitution of the renal glutamine/amino acid transporter it was found that intraliposomal ATP stimulates the transport [13]. In the present study the mode of action of ATP in the regulation of the transport has been investigated. ATP increases the V_{max} of the transporter (see also ref. [13]) and decreases the K_m for external Na⁺. Thus, the interaction of ATP with the internal side, probably located at the N-terminus of the transporter [13] will determine conformational changes that on the one hand will determine an enhanced mobility of the protein induced for example by a looser conformation, leading to the V_{max} increase; on the other hand are transmitted to the external site of Na⁺ that, in the modified conformation, exhibits higher affinity (lower K_m) for Na⁺; this may be caused by little shifting of the amino acid residues that interact with Na⁺. The transmission of conformational changes from one side to the opposite side of a membrane protein would require a particular type of intermembrane structure with a low degree of rigidity. This feature has been observed in the glutamate transporter of the plasma membrane in which the binding of Na⁺ on the external side induces conformational changes on the opposite side [28]. The intermembrane structure of the *Pyrococcus horikoshii* member of the glutamate transporters, that should be similar to the ASCT2 transporter (see above), shows the properties of low degree of rigidity. It is characterized by the presence of short transmembrane segments that are connected within the membrane by loops that facilitate conformational changes [27]. From a physiological point of view, the effect of ATP on the affinity of the transporter for Na⁺, together with the effect on the V_{max}, may play an additional regulatory role in those kidney districts in which the tubular NaCl concentration is lower.

In studies performed with cells, it was proposed that the ASCT2 transporter accepts glutamate, preferentially at acidic pH [6] and that it is more sensitive to glutamate inhibition at pH 6.0 than at pH 7.0 [25]. In the present work the effect of

glutamate has been kinetically analysed both as inhibitor and as substrate. The inhibition by glutamate was clearly more pronounced at acidic pH in agreement with the previous data, differently from the neutral amino acids. The analysis of the inhibition revealed that the glutamate binds to the transporter at the same site of glutamine thus suggesting that both the substrates are transported by the same pathway. The glutamate_{ex}/glutamine_{in} antiport mode was more efficient at acidic pH. This is in line with the higher affinity of the transporter for external glutamate at acidic pH as it is evidenced by both the K_i and the K_m values (see Fig. 4 and Table 1). An explanation to this behavior may be given by the interaction of glutamate with the transporter as protonated zwitterionic species. However, both the external and internal K_m for the zwitterion glutamic acid at pH 7 were about one order of magnitude lower than those at pH 6 indicating that the transported species is not the zwitterion glutamic acid but glutamate. Thus, the different affinity of the transporter for glutamate may be determined by a different state of protonation of amino acid residues with a pK_a close to 6, in the external substrate binding site. A residue that fulfils this property is His. At acidic pH, this hypothetical His residue is protonated and has a positive charge that should facilitate the interaction of glutamate with the substrate binding site, but should have little or no influence on the binding of neutral amino acids. The presence of such a residue only in the external binding site may explain the different pH dependence of the opposite glutamine_{ex}/glutamate_{in} antiport mode that shows higher transport activity at pH 7.0; this is also in line with the internal K_m for glutamate that is not influenced by the pH. In agreement with the presence of a hypothetical His residue that is involved in the transport function, it has been observed that DEPC, an His specific reagent, inhibited the transport activity of the reconstituted glutamine/amino acid transporter. The amino acid sequence of the ASCT2 protein contains six His residues. At least three of these residues are exposed to the cytosolic side of the transporter, as it can be deduced from the hydrophobicity profile (not shown and see ref. [6]). Aspartate, differently from asparagine, does not inhibit the transporter, indicating that the size of the molecule is critical for the interaction with the substrate binding site only in the case of negatively charged substrates. Differently from glutamine, the K_m of which is much lower on the external than on the internal site, glutamate showed similar internal and external K_m . This feature of the transporter may have physiological implications. The external site of the transporter that exhibits an affinity for glutamine much higher than that for glutamate, will bind glutamine preferentially. The internal site, that has similar affinity for glutamine and glutamate, will bind glutamine and glutamate as well. Since the internal face of the reconstituted transporter corresponds to the intracellular side [13], the physiological mode of transport should be a flux of glutamine from the tubule lumen to the cytosol and a flux of glutamate from the cytosol to the lumen. A glutamate/glutamine transport in the opposite mode (glutamate from the lumen to the cytosol) may become more significant only when the pH of the lumen shifts towards strong acidic values. The glutamine/glutamate antiport mode may have significant role in tissues different from kidney in

which ASCT2 is also expressed. In rat lens, a glutamine/glutamate counterflow is required: this function may be performed by the single transporter ASCT2 [29]. ASCT2 may also play an important role in the glutamate/glutamine cycle and astrocyte/neuron communication in the central nervous system. ASCT2 may contribute in the release of glutamine synthesized in the astrocytes by the glutamine/glutamate antiport function [8,30]. This transport function of ASCT2 may explain the previous finding of glutamine efflux, induced by glutamate, observed in astroglia but not in synaptosomes [31]. This paper represents an evidence in favour of the expression of ASCT2 in kidney, that is still not very clear [32]. However, it cannot be excluded that the reconstituted transporter may be a still unknown protein (ASCT-like or even B^o-like protein with functional properties different from those described for B^oAT1 [15,26]) or an isoform of ASCT2 specifically expressed in kidney, with some functional differences with respect to isoforms expressed in other tissues.

Acknowledgement

This work has been supported by local funds “ex 60 %” from University of Calabria.

References

- [1] M. Palacin, R. Estevez, J. Bertran, A. Zorzano, Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters, *Physiol. Rev.* 78 (1998) 969–1054.
- [2] B.P. Bode, Recent molecular advances in mammalian glutamine transport, *J. Nutr.* 131 (2001) 2475S–2485S.
- [3] S. Broer, Adaptation of plasma membrane amino acid transport mechanisms to physiological demands, *Pflugers Arch.* 444 (2002) 457–466.
- [4] B. Mackenzie, J.D. Erickson, Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family, *Pflugers Arch.* 447 (2004) 784–795.
- [5] Y. Kanai, M.A. Hediger, The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects, *Pflugers Arch.* 447 (2004) 469–479.
- [6] N. Utsunomiya-Tate, H. Endou, Y. Kanai, Cloning and functional characterization of a system ASC-like Na⁺-dependent neutral amino acid transporter, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 14883–14890.
- [7] V. Torres-Zamorano, F.H. Leibach, V. Ganapathy, Sodium-dependent homo- and hetero-exchange of neutral amino acids mediated by the amino acid transporter ATB^o, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245 (1998) 824–829.
- [8] A. Broer, N. Brookes, V. Ganapathy, K.S. Dimmer, C.A. Wagner, F. Lang, S. Broer, The astroglial ASCT2 amino acid transporter as a mediator of glutamine efflux, *J. Neurochem.* 73 (1999) 2184–2194.
- [9] A. Broer, C. Wagner, F. Lang, S. Broer, Neutral amino acid transporter ASCT2 displays substrate-induced Na⁺ exchange and a substrate-gated anion conductance, *Biochem. J.* 346 (2000) 705–710.
- [10] M. Pollard, D. Meredith, J.D. McGivan, Identification of a plasma membrane glutamine transporter from the rat hepatoma cell line H4-IIIE-C3, *Biochem. J.* 368 (2002) 371–375.
- [11] M. Dolinska, A. Dybel, B. Zablocka, J. Albrecht, Glutamine transport in C6 glioma cells shows ASCT2 system characteristics, *Neurochem. Int.* 43 (2003) 501–507.
- [12] M. Dolinska, B. Zablocka, U. Sonnewald, J. Albrecht, Glutamine uptake and expression of mRNA's of glutamine transporting proteins in mouse cerebellar and cerebral cortical astrocytes and neurons, *Neurochem. Int.* 44 (2004) 75–81.
- [13] F. Oppedisano, L. Pochini, M. Galluccio, M. Cavarelli, C. Indiveri,

- Reconstitution into liposomes of the glutamine/amino acid transporter from renal cell plasma membrane: functional characterization, kinetics and activation by nucleotides, *Biochim. Biophys. Acta* 1667 (2004) 122–131.
- [14] N.E. Avissar, C.K. Ryan, V. Ganapathy, H.C. Sax, Na⁺-dependent neutral amino acid transporter ATB^o is a rabbit epithelial cell brush-border protein, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 281 (2001) C963–C971.
- [15] A. Broer, K. Klingel, S. Kowalczyk, J.E.J. Rasko, J. Cavanaugh, S. Broer, Molecular cloning of mouse amino acid transport system B0, a neutral amino acid transporter related to hartnup disorder, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 24467–24476.
- [16] C.B. Ohmer, A. Broer, M. Munzinger, S. Kowalczyk, J.E.J. Rasko, F. Lang, S. Broer, Characterization of mouse amino acid transporter B0AT1 (slc6a19), *Biochem. J.* 389 (2005) 745–751.
- [17] J. Biber, B. Stieger, W. Haase, H. Murer, A high yield preparation for rat kidney brush border membranes. Different behaviour of lysosomal markers, *Biochim. Biophys. Acta* 647 (1981) 169–176.
- [18] R. Krämer, C. Heberger, Functional reconstitution of carrier proteins by removal of detergent with a hydrophobic ion exchange column, *Biochim. Biophys. Acta* 863 (1986) 289–296.
- [19] F. Palmieri, C. Indiveri, F. Bisaccia, V. Iacobazzi, Mitochondrial metabolite carrier proteins: purification, reconstitution, and transport studies, *Methods Enzymol.* 260 (1995) 349–369.
- [20] F. Palmieri, M. Klingenberg, Direct methods for measuring metabolite transport and distribution in mitochondria, *Methods Enzymol.* 56 (1979) 279–301.
- [21] J.R. Dullea, P.A. Grieve, A simple technique for eliminating interference by detergents in the Lowry method of protein determination, *Anal. Biochem.* 64 (1975) 136–141.
- [22] I.H. Segel, *Enzyme Kinetics*, Wiley, New York, 1975, pp. 274–320.
- [23] W.W. Cleland, in: P.D. Boyer (Ed.), *The Enzymes*, vol. 2, Academic Press, New York, 1970, pp. 1.C–65.
- [24] C. Indiveri, A. Tonazzi, A. De Palma, F. Palmieri, Kinetic mechanism of antiports catalyzed by reconstituted ornithine/citrulline carrier from rat liver mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta* 1503 (2001) 303–313.
- [25] C.S. Esslinger, K.A. Cybulski, J.F. Rhoderick, N-gamma-aryl glutamine analogues as probes of the ASCT2 neutral amino acid transporter binding site, *Bioorg. Med. Chem.* 13 (2005) 1111–1118.
- [26] S.M.R. Camargo, V. Makrides, L.V. Virkki, I.C. Forster, F. Verrey, Steady-state kinetic characterization of the mouse B0AT1 sodium-dependent neutral amino acid transporter, *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 451 (2005) 338–348.
- [27] D. Yernool, O. Boudker, Y. Jin, E. Gouaux, Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*, *Nature* 431 (2004) 811–818.
- [28] H.P. Larsson, A.V. Tzingounis, H.P. Koch, M.P. Kavanaugh, Fluorometric measurements of conformational changes in glutamate transporters, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 3951–3956.
- [29] J. Lim, K.A. Lorentzen, J. Kistler, P.J. Donaldson, Molecular identification and characterisation of the glycine transporter (GLYT1) and the glutamine/glutamate transporter (ASCT2) in the rat lens, *Exp. Eye Res.* 83 (2006) 447–455.
- [30] A. Broer, J.W. Deitmer, S. Broer, Astroglial glutamine transport by system N is upregulated by glutamate, *Glia* 48 (2004) 298–310.
- [31] J. Albrecht, L-glutamate stimulates the efflux of newly taken up glutamine from astroglia but not from synaptosomes of the rat, *Neuropharmacology* 28 (1989) 885–887.
- [32] F. Verrey, Z. Ristic, E. Romeo, T. Ramadan, V. Makrides, M.H. Dave, S.M. R. C.A. Wagner, Novel renal amino acid transporters, *Annu. Rev. Physiol.* 67 (2005) 557–572.

The glutamine/amino acid transporter (ASCT2) reconstituted in liposomes: electrical nature of the glutamine/glutamate antiport

Francesca Oppedisano, Lorena Pochini, Michele Galluccio, Cesare Indiveri

Department of Cell Biology, University of Calabria, Arcavacata di Rende, Italy

Abstract. The glutamine/amino acid transporter solubilized from rat renal apical plasma membrane (brush-border membrane) with C12E8 and reconstituted into liposomes has been previously identified as the ASCT2 transporter. The reconstituted transporter catalyses an antiport reaction in which extraliposomal glutamine and Na^+ are cotransported in exchange with intraliposomal neutral amino acids. Differently from other neutral amino acid transporters, ASCT2 accepts also glutamate as substrate, as demonstrated by the glutamine/glutamate antiport measured in proteoliposomes. The electrical nature of the homologous glutamine/glutamine antiport and of the heterologous glutamine/glutamate antiport has been investigated by imposing a K^+ diffusion potential (positive outside) across the proteoliposomal membrane in the presence of valinomycin. The membrane potential did not affect the glutamine/glutamine antiport whereas it stimulated about two fold the glutamine/glutamate antiport rate.

Key words: Plasma membrane, Transport, Liposome, Reconstitution, Glutamine, ASCT2

INTRODUCTION

Several mammalian plasma membrane glutamine transporters have been identified and cloned [1-5]. Even though the role of these transporters in glutamine homeostasis has been established, their functional and regulatory properties are still controversial. Most of the knowledge on the glutamine transporters arises from studies in intact cells [6-12]. One of the amino acid transporters specific for glutamine, ASCT2, has been recently reconstituted in liposomes by the procedure of cyclic detergent removal [13]. The reconstituted, as the native, ASCT2 transporter catalyses a sodium dependent amino acid antiport; it shows low tolerance towards the substitution of Na^+ by Li^+ , insensitivity to the amino acid analogue α -(methylamino)isobutyric acid (MeAIB), specificity for glutamine and other neutral amino acids. Differently from all the other known neutral amino acid transporters, it interacts also with glutamate [5-14]. Novel functional properties of the ASCT2 glutamine/amino acid transporter have been revealed by means of the reconstituted system. The transporter was inserted unidirectionally in the proteoliposomal membrane, right-side-out with respect to the cell membrane. The kinetic mechanism of the glutamine- $\text{Na}^+_{\text{ex}}/\text{glutamine}_{\text{in}}$ antiport reaction has been defined: it is simultaneous random, i.e., the substrates and the Na^+ bind to the transport protein

with no preferential order and are translocated in one step. It has been found that the transporter is inhibited by SH reagents and is activated by intraliposomal (intracellular) ATP [13-14]. A still unclear aspect of the ASCT2 is the electrical nature of the antiport of glutamine with neutral amino acids or glutamate. This reaction should be electrogenic since Na^+ is cotransported with external glutamine [2, 9, 13-14]. In this paper the involvement of glutamate in the ASCT2 transport function and the electrical nature of the glutamine/amino acid antiport reaction have been investigated in proteoliposomes.

METHODS

Solubilization and reconstitution of the glutamine/amino acid transporter. The ASCT2 transporter was solubilized from rat kidney brush-border membranes and reconstituted in liposomes with a procedure based on cyclic detergent removal from mixed micelles of protein, detergent and phospholipid as previously described [13].

Transport measurements. 550 μl of proteoliposomes obtained by the reconstitution procedure, were passed through a Sephadex G-75 column (0.7 x 15 cm) preequilibrated with 20 mM HEPES/Tris pH 7.0 and 60 mM sucrose, and used for uptake experiments. For efflux experiments, 600 μl of proteolipo-

somes, containing 30 mM glutamine, treated as above described, were "prelabeled" by transporter-mediated exchange equilibration [14] by incubation with 10 μ l of 0.6 mM [3 H]glutamine at high specific radioactivity (2 μ Ci/nmol) for 60 min at 25°C; then, the external radioactivity was removed by passing again the proteoliposomes through Sephadex G-75. Transport was started, in the case of uptake, by adding external [3 H]glutamine to the proteoliposomes, or, in the case of efflux, by adding non radioactive substrates to the proteoliposomes containing internal [3 H]glutamine. In both cases, transport was stopped by adding 20 μ M mersalyl. In control samples the inhibitor was added at time zero. Finally, each sample of proteoliposomes (100 μ l) was passed through a Sephadex G-75 column (0.6 x 8 cm) to separate the external from the internal radioactivity and collected in scintillation mixture, vortexed and counted. For the determination of the [3 H]glutamine uptake, the experimental values were corrected by subtracting the respective controls (samples inhibited at time zero).

Results and Discussion

ASCT2 catalyses an obligatory antiport of extraliposomal (extracellular) glutamine and Na⁺ with internal neutral amino acids (glutamine-Na⁺_{ex}/amino acid_{in}). Differently from most of the neutral amino acid transporters it interacts also with the negatively charged glutamate. To investigate the transport of glutamate catalysed by ASCT2 the activity of the reconstituted transporter has been studied in uptake experiments in which 0.1 mM [3 H]glutamine was added to proteoliposomes containing internal glutamate or, as control, glutamine or no internal substrate. As shown in Fig. 1 A the uptake of [3 H]glutamine in proteoliposomes containing internal glutamate increased as function of the time. The uptake was only slightly lower than in the presence of internal glutamine, indicating that glutamate was efficiently transported from inside to outside in exchange with external labelled glutamine. In both cases the experimental data fitted a first order rate equation from which the rate constants *k* were calculated. Their values were 0.028 min⁻¹ and 0.016 min⁻¹ for the glutamine_{ex}/glutamine_{in} and glutamine_{ex}/glutamate_{in} antiport respectively. The uptake in the absence of internal substrate (Fig. 1 A) or (not shown) in the absence of external Na⁺ was nearly negligible confirming that ASCT2 catalysed a sodium dependent obligatory antiport. To investigate the time dependence of the heterologous antiport in the opposite direction i.e., glutamate_{ex}/glutamine_{in}, the efflux of [3 H]glutamine from proteoliposomes was measured in the presence of externally added gluta-

mate. Fig. 1 B shows that glutamine efflux was induced by the addition of external glutamate. Also in this case the glutamate_{ex}/glutamine_{in} antiport was slower than the homologous glutamine_{ex}/glutamine_{in} antiport with first order rate constants of 0.043 min⁻¹ and 0.071 min⁻¹, respectively. Very slow glutamine efflux was observed in the absence of external substrate or (not shown) in the presence of external glutamine (or glutamate) and absence of Na⁺. The experimental data demonstrated that glutamate could be transported from outside to inside as well and that in both the directions the heterologous glutamine/glutamate was a little slower than the homologous glutamine/glutamine antiport. As mentioned

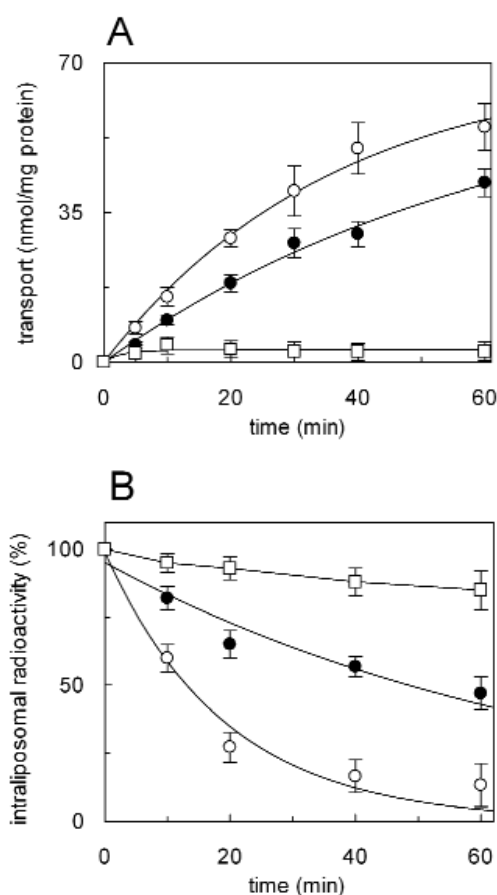


Figure 1

Time course of [3 H]glutamine transport in reconstituted proteoliposomes. A, uptake experiment: 0.1 mM [3 H] glutamine together with 50 mM NaGluconate was added at time zero to proteoliposomes containing 30 mM internal glutamine (O), 30 mM internal glutamate (●) or without internal substrate (□); B, efflux experiment: 5 mM glutamine (O), 5 mM glutamate (●) or buffer alone, together with 50 mM NaGluconate was added to prelabelled proteoliposomes containing 30 mM [3 H] glutamine; in both the uptake and efflux experiments the transport reaction was stopped at the indicated times, as described in Materials and Methods. Data are means \pm S.D. of three different experiments.

above, Na^+ is cotransported with the external substrate. According to the antiport reactions glutamine- $\text{Na}^+_{\text{ex}}/\text{glutamine}_{\text{in}}$ and glutamine- $\text{Na}^+_{\text{ex}}/\text{glutamate}_{\text{in}}$, the net movement of positive charge(s) should occur and hence the transport should be stimulated by positive outside membrane potential. However, the electrical nature of the ASCT2 catalysed antiport is still unclear since the experimental conditions in intact cells did not allow to discriminate between electroneutral and electrogenic transport [2, 9]. This question was addressed here by imposing a membrane potential of about 120 mV (calculated according to the Nernst equation) across the proteoliposomal membrane adding valinomycin in the presence of a K^+ gradient ($0.5_{\text{ex}}/50_{\text{in}}$ mM/mM). Fig. 2 A shows the time course of the glutamine($\text{Na}^+_{\text{ex}}/\text{glutamine}_{\text{in}}$

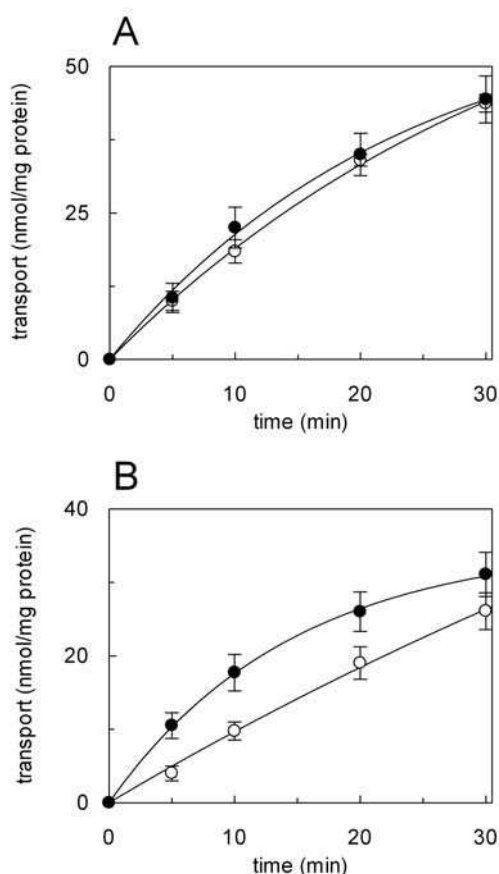


Figure 2

Influence of the membrane potential on the $[^3\text{H}]$ glutamine transport in reconstituted proteoliposomes. 0.1 mM $[^3\text{H}]$ glutamine together with 50 mM NaGluconate was added at time zero to proteoliposomes containing 30 mM internal glutamine (A) or 30 mM internal internal glutamate (B) in the presence of a Potassium gluconate gradient of $0.5_{\text{ex}}/50_{\text{in}}$ mM/mM. 0.75 $\mu\text{g}/\text{mg}$ phospholipid Valinomycin in 3 μl ethanol (●) or ethanol (○) was added to each sample at time zero. The transport reaction was stopped at the indicated times, as described in Materials and Methods. Data are means \pm S.D. of three different experiments.

antiport in the presence or in the absence of the membrane potential. Surprisingly, no significant effect was exerted by the membrane potential on the homologous antiport. On the contrary, when the heterologous glutamine($\text{Na}^+_{\text{ex}}/\text{glutamate}_{\text{in}}$) antiport was assayed a clear stimulation by the membrane potential was observed. The rate of the antiport, derived from the initial part of the time course, increased from 1.0 to 2.4 nmol/min/mg protein. These experimental data indicated that, in spite of the involvement of Na^+ in the homologous antiport reaction (glutamine- $\text{Na}^+_{\text{ex}}/\text{glutamine}_{\text{in}}$), no net charge movement occurs, whereas it does in the heterologous antiport (glutamine- $\text{Na}^+_{\text{ex}}/\text{glutamate}_{\text{in}}$). This apparent discrepancy may be explained by the movement of a still unknown positive charged species from inside to outside that compensates only the single positive charge in the homologous glutamine- $\text{Na}^+_{\text{ex}}/\text{glutamine}_{\text{in}}$ antiport but not the movement of net positive charges in the heterologous glutamine- $\text{Na}^+_{\text{ex}}/\text{glutamate}_{\text{in}}$ antiport. The nature of the ion species which should play this role is matter of future investigation.

Acknowledgements

This work has been supported by the PRIN (Progetti di Ricerca Scientifica di Rilevante Interesse Nazionale) 2006 grant n. 2006054479 from MiUR (Ministero dell'Università e della Ricerca).

References

- 1 Palacin M, Estevez R, Bertran J, Zorzano A. Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters, *Physiol Rev* 1998;78:969-1054.
- 2 Bode BP. Recent molecular advances in mammalian glutamine transport, *J Nutr* 2001;131:2475S-85S.
- 3 Broer S. Adaptation of plasma membrane amino acid transport mechanisms to physiological demands, *Pflugers Arch* 2002;444:457-66.
- 4 Mackenzie B, Erickson JD. Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family, *Pflugers Arch* 2004;447:784-95.
- 5 Kanai Y, Hediger MA. The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects, *Pflugers Arch* 2004;447:469-79.
- 6 Utsunomiya-Tate N, Endou H, and Kanai Y, Cloning and functional characterization of a system ASC-like Na^+ -dependent neutral amino acid transporter, *J. Biol. Chem* 1996;271:14883-90.
- 7 Torres-Zamorano V, Leibach FH, Ganapathy V. Sodium-dependent homo- and hetero-exchange of

- neutral amino acids mediated by the amino acid transporter ATB^o, *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1998;245:824-829.
- 8 Broer A, Brookes N, Ganapathy V, Dimmer KS, Wagner C.A, Lang F. and Broer S. The astroglial ASCT2 amino acid transporter as a mediator of glutamine efflux, *J. Neurochem* 1999;73:2184-94.
- 9 Broer A, Wagner C, Lang F, Broer S. Neutral amino acid transporter ASCT2 displays substrate-induced Na⁺ exchange and a substrate-gated anion conductance, *Biochem J* 2000;346:705-10.
- 10 Pollard M, Meredith D, McGivan J.D. Identification of a plasma membrane glutamine transporter from the rat hepatoma cell line H4-IIIE-C3, *Biochem J* 2002;368:371-5.
- 11 Dolinska M, Dybel A, Zablocka B, Albrecht J. Glutamine transport in C6 glioma cells shows ASCT2 system characteristics, *Neurochem Int* 2003;43:501-7.
- 12 Dolinska M, Zablocka B, Sonnewald U, Albrecht J. Glutamine uptake and expression of mRNA's of glutamine transporting proteins in mouse cerebellar and cerebral cortical astrocytes and neurons, *Neurochem Int* 2004;44:75-81.
- 13 Oppedisano F, Pochini L, Galluccio M, Cavarelli M, Indiveri C. Reconstitution into liposomes of the glutamine/amino acid transporter from renal cell plasma membrane: functional characterization, kinetics and activation by nucleotides. *Biochim. Biophys Acta* 2004;1667:122-31.
- 14 Oppedisano F, Pochini L, Galluccio M, Indiveri C. The glutamine/amino acid transporter (ASCT2) reconstituted in liposomes: transport mechanism, regulation by ATP and characterization of the glutamine/glutamate antiport. *Biochim. Biophys. Acta*, 2007;1768:291-8.

Corresponding author

Cesare Indiveri
Dipartimento di Biologia Cellulare
Università della Calabria
Via P.Bucci cubo 4c
87036 Arcavacata di Rende (CS), Italy
Tel.: +39-0984-492939 - Fax: +39-0984-492911
email: indiveri@unical.it