

## EL SISTEMA A: UN TRANSPORTADOR D'AMINOÀCIDS UBIC I ALTAMENT MODULABLE

MARÇAL PASTOR-ANGLADA, F. JAVIER CASADO I ANTONIO FELIPE

*Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.*

### CARACTERITZACIÓ I PROPIETATS CINÈTIQUES DE L'ACTIVITAT A

El transport de bona part d'aminoàcids neutres des de la sang, on són majoritaris, cap a l'interior de la pràctica totalitat de cèl·lules de mamífer, depèn essencialment d'un sistema de transport conegut com a sistema A. Com la majoria de sistemes de captació de soluts orgànics i inorgànics, l'A ha estat caracteritzat com una entitat cinètica, és a dir, es defineix segons la seva funcionalitat biològica, la qual implica tot un seguit de característiques pròpies pel que fa al tipus de substrat que pot captar, l'afinitat envers aquests substrats, l'existència o no d'inhibidors específics, la dependència de fluxos acoblats (dependència de  $\text{Na}^+$ , per exemple), la susceptibilitat a ser regulat bé sigui per mecanismes a curt o a llarg termini i moltes altres «qualitats» funcionals que permeten assumir que una determinada activitat biològica probablement es correspongui amb un producte gènic determinat. Actualment i tal com comentarem més endavant, es desconeix del tot la identitat mo-

lecular d'aquest sistema de transport, per la qual cosa, l'única manera de quantificar-ne la presència i les propietats està en la caracterització cinètica i funcional.

L'activitat del sistema A es caracteritza per les propietats que s'indiquen a la taula I. Essencialment el sistema constitueix un mecanisme de transport actiu secundari, acoblat al gradient electroquímic transmembrana de sodi i disposa d'un inhibidor específic, l'àcid metilaminoisobutíric (MeAIB), el qual és alhora substrat del sistema. Les característiques que fan del sistema A una entitat cinètica força especial són el fet que es tracta d'un sistema pràcticament ubic i altament modulad tant per factors nutricionals com hormonals. La resposta del sistema A a la manca d'aminoàcids incrementant la capacitat catalítica del sistema ( $V_{\text{màx}}$ ) constitueix un mecanisme de control gairebé exclusiu del sistema A. Només el sistema específic de cèl·lules parenquimàtiques del fetge conegut per N i

TAULA I. Propietats del sistema A. Resum de les principals característiques fisicoquímiques diferencials del sistema A de transport d'aminoàcids neutres.

|  |   |
|--|---|
| 1. Dependència de Catió                    | dependent de Sodi   |
| 2. Preferència de substrat                 | majoria d'aminoàcids neutres, més específicament: Ala, Gly, Pro, AIB. |
| 3. Substrat específic                      | N-metilats, MeAIB   |
| 4. Efectes <i>trans</i>                    | <i>trans</i> -inhibible   |
| 5. Efectes del pH                          | inhibible a pH àcid (per sota de 7.0)                                 |
| 6. Estereoespecificitat                    | moderada  |
| 7. Regulació per asequibilitat de substrat | sí (resposta adaptativa)  |
| 8. Regulació hormonal                      | sí  |
| 9. Distribució cel·lular                   | ubic, no present en eritròcits  |

responsable de la captació d'aminoàcids de tipus bàsic com la glutamina o l'arginina presenta una molt reduïda capacitat de resposta a la manca d'aminoàcids. Moltes d'aquestes propietats que fan del sistema A un transportador essencial per a la viabilitat cel·lular són discutides amb més detall en les seccions posteriors d'aquesta curta revisió i han estat àmpliament tractades en la literatura especialitzada (Kilberg i Häussinger, 1992; McGivan i Pastor-Anglada, 1994; Bertran *et al.*, 1994; Harvey i Nelson, 1994; Mailliard *et al.*, 1995).

## REGULACIÓ DE L'ACTIVITAT DEL SISTEMA A

L'activitat d'un transportador pot estar sotmesa al doble control propi d'altres paràmetres biològics com pot ser l'activitat enzimàtica. Així doncs, per al sistema A, sovint es parla també de regulació a curt termini, independent de síntesi proteica i de transcripció gènica, i de regulació a llarg termini, dependent de la síntesi de mRNA i de proteïnes, i suggereix en molts casos la necessitat que nous transportadors siguin sintetitzats i inserits funcionalment a la membrana per tal que es produeixi un canvi estable en l'activitat d'aquest sistema de transport d'aminoàcids.

## Regulació a curt termini

Per regulació a curt termini ens referim essencialment a la possibilitat que l'activitat d'un transportador pugui variar de forma ràpida, però sovint transitòria, en molts casos mentre dura l'estímul inductor o repressor. Pel que fa al sistema A, hi ha algunes possibilitats descrites tocant a la seva modulació a curt termini.

En primer lloc, cal pensar en el fet que el sistema A és un sistema de transport que està fortament sotmès a transinhibició. Això vol dir que la concentració intracel·lular d'aquells aminoàcids que són substrats del propi sistema pot condicionar l'activitat del transportador. És a dir, com més elevada sigui la concentració d'aminoàcids a l'interior de la cèl·lula, més gran és el grau d'inhibició del sistema A. Altres sistemes de transport són transestimulables i d'altres no presenten cap mena d'efecte *trans* (Kilberg i Häussinger, 1992). És molt probable que aquest fenomen tingui significació fisiològica ja que són moltes les situacions en què les concentracions intracel·lulars d'aminoàcids varien.

Una segona possibilitat de regulació a curt termini, no exclusiva del sistema A, fóra la seva activació posterior a una hiperpolarització de la membrana plasmàtica de la cèl·lula. Aquest fet ha estat ben descrit a

l'hepatòcit (McGivan, 1986) i un possible model mecanístic s'esquemmatitza a la figura 1. Essencialment la idea és que l'activitat de molts transportadors concentratius i dependents de  $\text{Na}^+$  i voltatge podria augmentar en situacions d'hiperpolarització de la membrana que impliquin canvis en el gradient electroquímic d'aquest catió. Alguns efectors hormonals com el glucagó (via AMPc) o l'EGF poden induir aquesta mena d'efectes (Moule i McGivan, 1987), els quals es fan extensius a altres transportadors encara que no siguin d'aminoàcids però que comparteixen característiques termodinàmiques similars pel que fa al funcionament (Gómez-

Angelats *et al.*, 1995b). El model suggereix que la inducció passa per una estimulació ràpida i transitòria de l'activitat de la bomba de sodi, la  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasa, la qual contribueix a la hiperpolarització i a magnificar el gradient de sodi. Com comentarem més endavant, el lligam funcional entre el sistema A i la  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasa no només té sentit fisiològic sinó que probablement també comporta modulació a llarg termini, probablement pel que fa als gens que codifiquen per ambdues proteïnes de membrana (McGivan i Pastor-Anglada, 1994).

Tal com es veu a la figura 1, el paper dels canvis de potencial de membrana sobre la

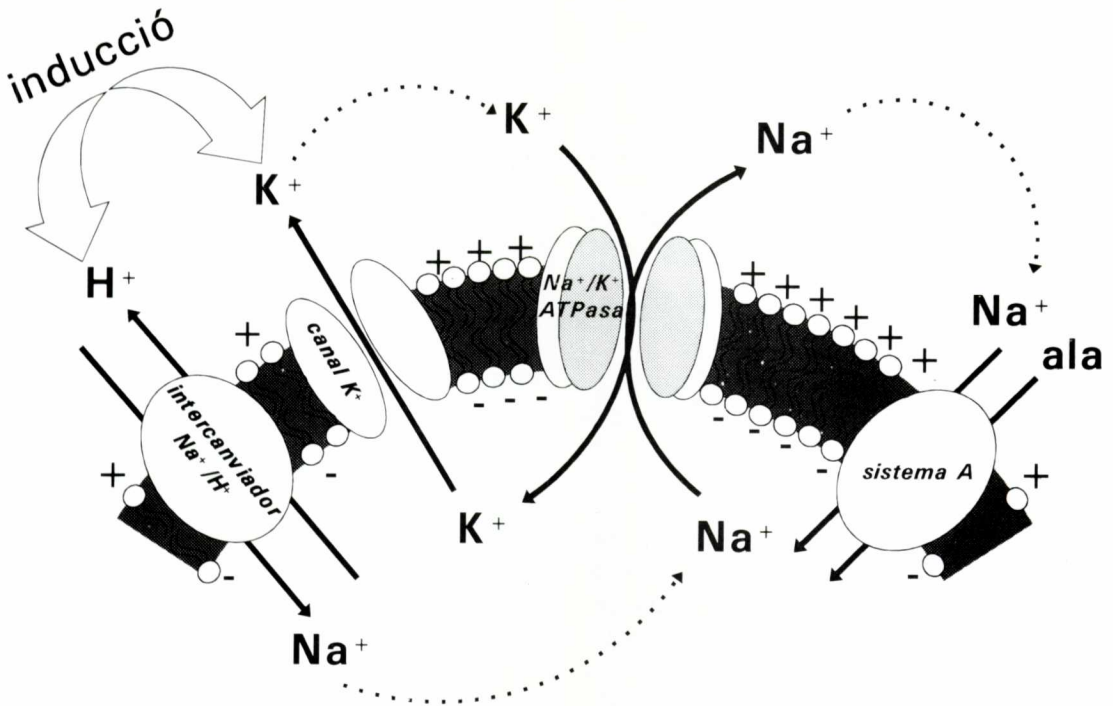


FIGURA 1. Esquema de la modulació del sistema A per canvis de potencial de la membrana plasmàtica. L'estimulació de l'intercanviador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  provoca una hiperpolarització de la membrana plasmàtica. En resposta, la  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasa incrementa la seva activitat, bombejant  $\text{Na}^+$  a l'exterior de la cèl·lula i fent créixer el gradient transmembrana d'aquest ió, la qual cosa, a la vegada, induïx un augment en l'activitat del sistema A, dependent d'aquest gradient transmembrana de sodi. Canvis de potencial de membrana provocats per canals de  $\text{K}^+$  també poden modificar l'activitat de la  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasa, estimulando o inhibint el sistema A.

$\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasa, que modifiquen l'activitat del sistema A, no és exclusiu de l'intercanviador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . D'aquesta manera, s'ha descrit que els canals de  $\text{K}^+$  poden controlar el potencial de membrana modulant tant la  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasa com el sistema A (Wang *et al.*, 1992; Felipe *et al.*, 1993b).

Una tercera possibilitat de modulació a curt termini de l'activitat A no exempta d'interrogants és la modulació per insulina descrita al múscul esquelètic. L'activitat del sistema s'indueix de manera relativament ràpida després de l'addició de l'hormona en el medi per un mecanisme independent de síntesi proteica però insensible a canvis en el gradient transmembrana de sodi i en la pròpia activitat  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasa (Gumà *et al.*, 1988). Resulta atractiu pensar que aquest mecanisme de modulació pugui implicar l'existència de transportadors en vesícules intracel·lulars, potencialment translocables fins a la membrana després de l'estímul hormonal. Aquesta resposta fóra anàloga a la ja descrita i ben caracteritzada per al transportador de glucosa, GLUT 4 (Zorzano *et al.*, 1995).

### Regulació a llarg termini

Són molts els models cel·lulars en els quals s'ha descrit modulació del sistema A a llarg termini, però una vegada més, on més s'ha estudiat aquest fenomen és en cèl·lules parenquimàtiques del fetge. No en va l'hepatòcit és l'únic tipus cel·lular que pot sintetitzar urea i exerceix un paper clau en la homeòstasi nitrogenada de l'organisme. El millor exemple d'això és l'adaptació del metabolisme hepàtic a dietes molt riques en proteïnes, la qual cosa implica un increment progressiu en la ureogènesi alhora que les activitats dels sistemes de transport s'adapten de manera generalitzada a la més gran aportació de substrats per via portal, mercès

a increments en llurs  $V_{\text{màx}}$  (Fafournoux *et al.*, 1990). És evident que els efectes sobre l'activitat del sistema A observats en situacions fisiològiques i fisiopatològiques diverses associades a un context hormonal alterat, probablement hauran de ser conseqüència d'una complexa munió d'estímuls, que tant poden involucrar canvis en les concentracions d'aminoàcids lliures com en els nivells d'hormones susceptibles de modular-ne l'activitat.

El sistema A de transport d'aminoàcids neutres és altament modulable en les cèl·lules parenquimàtiques del fetge per hormones pancreàtiques. La insulina i el glucagó, en concentracions fisiològiques, poden induir l'activitat del transportador (de dues a tres vegades els nivells basals), mitjançant un mecanisme que es dependent de síntesi proteica i que és compatible amb la síntesi de nous transportadors (Kilberg *et al.*, 1985). De fet, la majoria d'efectes hormonals descrits sobre l'activitat A en tipus cel·lulars diversos es caracteritzen perquè indueixen canvis de  $V_{\text{màx}}$  sense alteracions significatives en el valor de  $K_m$ . En hepatòcits, la resposta, però, és relativament ràpida i es fa palesa ja a les dues hores després d'afegir-hi l'hormona.

Quin sentit té que dues hormones en principi antagoniques puguin exercir el mateix efecte biològic sobre el sistema A? La raó és essencialment metabòlica i es troba lligada al doble paper dels aminoàcids en les cèl·lules parenquimàtiques del fetge, el paper de substrats gluconeogènics (la gluconeogènesi fóra estimulada per glucagó) i el paper de precursors en la síntesi de proteïnes (la insulina la potencia).

La modulació del sistema A hepàtic per hormones pancreàtiques madura durant el desenvolupament postnatal, ja que és absent durant la vida fetal i en el nadó. Tanmateix, la capacitat màxima de resposta no s'assoleix fins bastant més tard del deslleta-

ment (Handlogten i Kilberg, 1982; Gómez-Angelats *et al.*, 1995a; Pastor-Anglada *et al.*, 1995). Curiosament, aquesta capacitat de modulació per la insulina i el glucagó es troba fortament afectada en casos de malnutrició proteica, la qual cosa posa de manifest que aquest sistema de transport pot ser perfectament una diana de la malnutrició que contribueix als retards de creixement associats a aquestes deficiències nutricionals (Gómez-Angelats *et al.*, 1995a).

Altres hormones com les catecolamines o els glucocorticoides també poden estimular l'activitat A en cèl·lules parenquimàtiques del fetge a llarg termini mitjançant un mecanisme que comporta canvis en els paràmetres cinètics equivalents als descrits per a les hormones pancreàtiques (Kilberg *et al.*, 1985). La modulació per les catecolamines està ja establerta durant la vida fetal tot i que la via de transducció de senyals sembla que involucra receptors diferents segons l'estat de desenvolupament,  $\beta$  durant la vida intrauterina i en el nadó i  $\alpha$  en l'adult (Leoni *et al.*, 1990). La modulació pels glucocorticoides apareix de manera transitòria sobretot durant el deslletament, coincidint amb un increment en els nivells circulants d'aquestes hormones. Aquesta resposta als glucocorticoides també sembla que està afectada en situacions de malnutrició proteica (Gómez-Angelats *et al.*, 1995a).

La possibilitat que el context hormonal pugui modificar l'activitat d'aquest sistema *in vivo* s'ha posat de manifest en evidenciar que en moltes situacions associades a hipoinsulinèmia com la diabetis experimental induïda per l'estrepto-zotocina o el mateix dejuni, comporten increments significatius en l'activitat A (Rosenthal *et al.*, 1985; Felipe *et al.*, 1995). Igualment, algunes situacions caracteritzades per una hiperinsulinèmia però amb resistència a l'hormona, com la gestació o l'obesitat genètica, comporten induccions estables de l'activitat d'aquest trans-

portador (Pastor-Anglada *et al.*, 1987; Felipe *et al.*, 1989; Ruiz *et al.*, 1991). Tanmateix, la hiperinsulinèmia per si mateixa també pot fer augmentar l'activitat del sistema A hepàtic en el model experimental del *clamp* euglucèmic hiperinsulinèmic, caracteritzat per forts increments en els nivells circulants d'aquesta hormona pancreàtica tot i que manté la glucèmia per tal d'evitar respostes contrareguladores (Ferrer-Martínez *et al.*, 1994). La resposta a la hiperinsulinèmia es veu fortament disminuïda si l'experiment es fa en rates dejunades on l'activitat basal del transportador ha estat probablement ja induïda per l'efecte del glucagó. Les interaccions entre els diferents factors endocrins moduladors de l'activitat A *in vivo* són altament complexes i no estan del tot aclarides.

Com ja hem comentat anteriorment, la modulació hormonal del sistema A en models *in vitro* ha estat ben estudiada, almenys en alguns tipus cel·lulars concrets, i àmpliament revisada en la literatura (Kilberg *et al.*, 1985; Kilberg i Häussinger, 1992; McGivan i Pastor-Anglada, 1994). Alguns exemples d'acció hormonal sobre l'activitat A es resumeixen a la taula II i s'indica el tipus cel·lular d'estudi.

### Regulació per assequibilitat de substrats

La regulació a llarg termini de l'activitat A per assequibilitat de substrats constitueix una observació de gran interès independentment de la seva possible implicació fisiològica. Aquest tipus de modulació, coneguda tradicionalment pel nom de *control adaptatiu*, en realitat correspon a un mecanisme de control negatiu de l'expressió gènica modulada per l'assequibilitat d'aminoàcids (McGivan i Pastor-Anglada, 1994). Actualment són ja uns quants els exemples de transcripció gènica possiblement regula-

TAULA II. Regulació hormonal del sistema A. Control endocrí del sistema A de transport d'aminoàcids neutres per diferents hormones i teixits diana on s'han descrit els efectes.

| Hormona                                | Efecte  |
|--|---|
| Catecolamines                          | ↑ fetge, ronyó, cor, múscul, intestí<br>↓ adipós, múscul  |
| Glucocorticoids                        | ↑ fetge, fibroblasts humans<br>↓ múscul, fibroblasts de ratolí, timòcits, limfòcits, glàndula mamària, cèl·lules HeLa, JTC-4, L-929, diafragma, hepatomes, fetge                                |
| Insulina                               | ↑ múscul esquelètic, diafragma, cor, fetge, glàndula adrenal, medul·la òssia, limfòcits, úter, adipós, fibroblasts, glàndula mamària, tiroides, retina, adenocarcinoma mamari, pulmó<br>↓ ronyó |
| Glucagó                                | ↑ fetge<br>↓ adipós   |
| cAMP                                   | ↑ fetge, timòcits, cèl·lules 3T3, ronyó<br>↓ adipós, ronyó  |
| ACTH                                   | ↑ glàndula adrenal, múscul, intestí<br>↓ ronyó, adipós  |
| Andrògens                              | ↑ pròstata, vesícula seminal, múscul esquelètic, ronyó  |
| Estrògens                              | ↑ úter, cèl·lules Ehrlich   |
| Hormona estimulant del fol·licle (FSH) | ↑ ovaris, testicles   |
| Hormona del creixement                 | ↑ múscul esquelètic, cor, fetge, diafragma, adipós  |
| Hormona luteinizant (LH)               | ↑ ovaris  |
| Hormona paratiroidea (PTH)             | ↑ medul·la òssia, escorça renal   |
| Prolactina                             | ↑ intestí, teixit mamari  |
| Prostaglandines                        | ↑ timòcits, medul·la òssia<br>↓ fibroblasts   |
| Hormona estimulant del tiroides (TSH)  | ↑ múscul esquelètic, fetge, tiroides  |
| Hormones tiroïdals                     | ↑ medul·la òssia, cartíleg, timòcits, intestí, fetge<br>↓ pituitària  |

TAULA II. (continuació)

| Factors de creixement                                | Efecte   |
|--|--|
| Factor de creixement epidèrmic (EGF)                 | ↑ cèl·lules de cor d'embrió de pollastre, fibroblasts humans |
| Factor de creixement fibroblàstic (FGF)              | ↑ fibroblasts  |
| Factor de creixement nerviós (NGF)                   | ↑ cèl·lules de feocromocitoma                                |
| Factor de creixement derivat de les plaquetes (PDGF) | ↑ fibroblasts diploides humans                               |

da per metabòlits en cèl·lules de mamífers. Per exemple, recordem l'expressió del receptor de lipoproteïnes de baixa densitat (LDL) modulada pels nivells de colesterol o la possibilitat que el gen de la hidroximetilglutaril-CoA reductasa sigui controlat pels àcids grassos. També s'ha suggerit que en els adipòcits, la transcripció dels enzims clau de la lipogènesi hauria de ser modulada per algun intermediari glucolític. El fenomen de regulació de l'expressió d'un gen per la concentració d'un metabòlit concret és per si mateix suggestiu i ens recorda els sistemes àmpliament descrits en procariotes generalment associats en estructures de tipus operó.

Pel que fa a l'activitat del sistema A, aquesta s'indueix quan qualsevol tipus cel·lular és incubat en absència d'aminoàcids (Moffett i Englesberg, 1984; Kilberg *et al.*, 1986; Englesberg i Moffett, 1986; Kilberg *et al.*, 1994). Un exemple característic de resposta adaptativa el tenim a la figura 2. Aquesta resposta és relativament lenta i comporta transcripció gènica i síntesi de proteïnes, les quals han de ser N-glucosilades ja que se'n pot bloquejar l'efecte per tunicamicina. Moltes evidències indirectes comentades més endavant suggereixen que la proteïna o les proteïnes A contenen algun component glucosilat i això ha fet que tradicionalment s'associés el control adaptatiu a la síntesi de nous transportadors. Experiments indirectes en què s'han utilitzat inhibidors de la

transcripció han permès, però, evidenciar que l'inici de la resposta adaptativa és força ràpida i s'acumula l'mRNA necessari per a assolir resposta màxima durant les primeres quatre hores de dejuni d'aminoàcids. Aquesta resposta no ha de ser entesa com un mecanisme inespecífic d'adaptació a una situació d'estrès, ja que pot ser bloquejada selectivament per certs aminoàcids individuals, sovint substrats del sistema A (Moffett i Englesberg, 1986). Anàlegs no metabolitzables com l'MeAIB també bloquegen la resposta adaptativa, la qual cosa suggereix que no cal la metabolització de l'aminoàcid per a exercir la seva inhibició sobre la desrepressió del gen A (Moffett i Englesberg, 1986). Aquest conjunt d'evidències experimentals s'ha interpretat tenint en compte l'existència d'una segona proteïna moduladora de l'expressió del gen A, la qual fóra sensible a la concentració intracel·lular d'aminoàcids concrets. Això explicaria que no calgués la metabolització de l'aminoàcid per a exercir l'efecte i que l'especificitat d'unió no fos necessàriament idèntica a la del transportador envers els seus substrats. La prova més forta en favor de l'existència d'aquesta proteïna reguladora prové de la genètica somàtica (Moffett i Englesberg, 1984; Englesberg i Moffett, 1986). La selecció de mutants puntuals de cèl·lules CHO-K1 promercès a llur resistència a créixer en medis molt rics en alanina va permetre l'aïllament i la caracterització fenotípica d'un mutant,

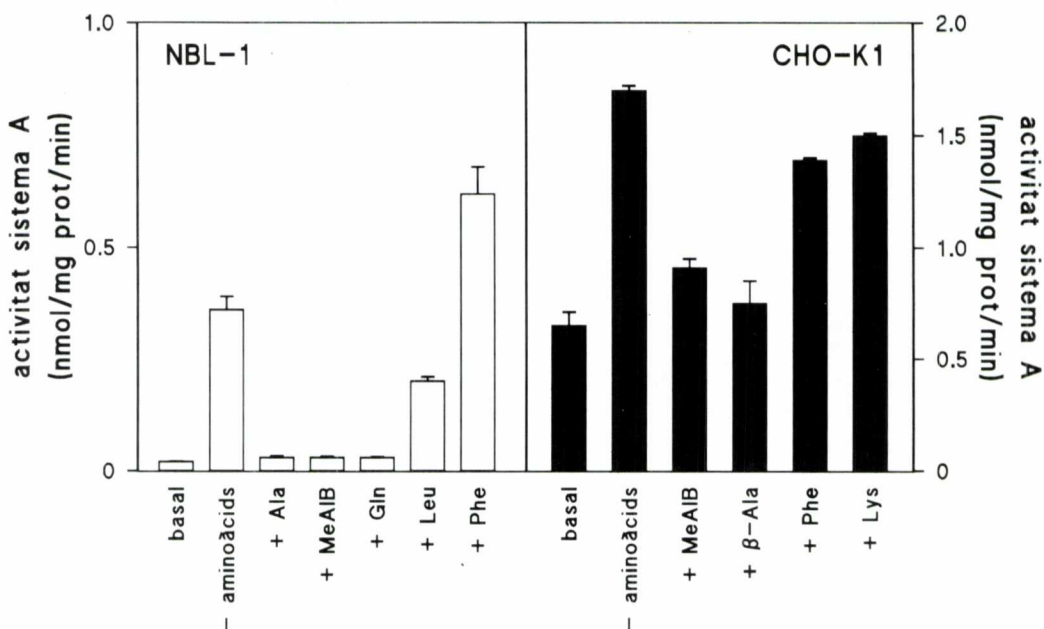


FIGURA 2. Resposta adaptativa del sistema A a l'absència d'aminoàcids en el medi. Incubació de dues línies cel·lulars de mamífer (NBL-1, d'epiteli renal boví, i CHO-K1, d'ovari de hámster) en presència (basal) o absència (-aminoàcids) d'aminoàcids en el medi. És evident el fenomen de resposta adaptativa, un fort increment de l'activitat del sistema A quan les cèl·lules són incubades sense aminoàcids. Aquesta resposta és bloquejada per l'addició d'alguns aminoàcids individuals específics (alanina, glutamina o MeAIB a les cèl·lules NBL-1, MeAIB o  $\beta$ -alanina a les CHO-K1) però no per l'addició d'altres (leucina o fenilalanina a les NBL-1, fenilalanina o lisina a les CHO-K1).

anomenat CHO-K1 ala<sup>r</sup> 4, que presenta una activitat basal del sistema A equivalent a la mateixa activitat de la soca salvatge després d'haver respost adaptativament a l'absència d'aminoàcids. El mutant CHO-K1 ala<sup>r</sup> 4 hauria perdut totalment la capacitat de respondre al control adaptatiu i el seu fenotip fóra el resultat d'una mutació amb pèrdua d'activitat biològica de la proteïna repressora, per la qual cosa l'activitat A en aquest mutant estaria sempre desreprimida. Una prova accessòria a favor del caràcter regulador d'aquesta hipotètica proteïna la tenim en comprovar que els híbrids somàtics CHO-K1 ala<sup>r</sup> 4 x CHO-K1 recuperen el fenotip propi de la soca salvatge. Aquest model de regulació s'esquematitza a la figura 3. Curiosament, els aminoàcids no només sembla

que exerceixen aquest paper de moduladors de l'expressió del sistema A pel que fa als gens, sinó que també hi ha evidències experimentals a favor de la inactivació selectiva de l'activitat després d'haver estat induïda per dejuni d'aminoàcids. L'efecte, tant a CHO-K1 com a la línia renal NBL-1, que ha estat àmpliament estudiada també al nostre laboratori, és totalment insensible als inhibidors de la síntesi proteica (Moffett i Englesberg, 1986; Ruiz-Montasell *et al.*, 1994a), per la qual cosa aquest fóra més aviat un mecanisme de regulació a curt termini però estaria totalment lligat a la reversió ràpida de la inducció adaptativa del sistema A quan l'assequibilitat d'aminoàcids retorna a la normalitat. La línia renal NBL-1 presenta una resposta adaptativa molt simi-



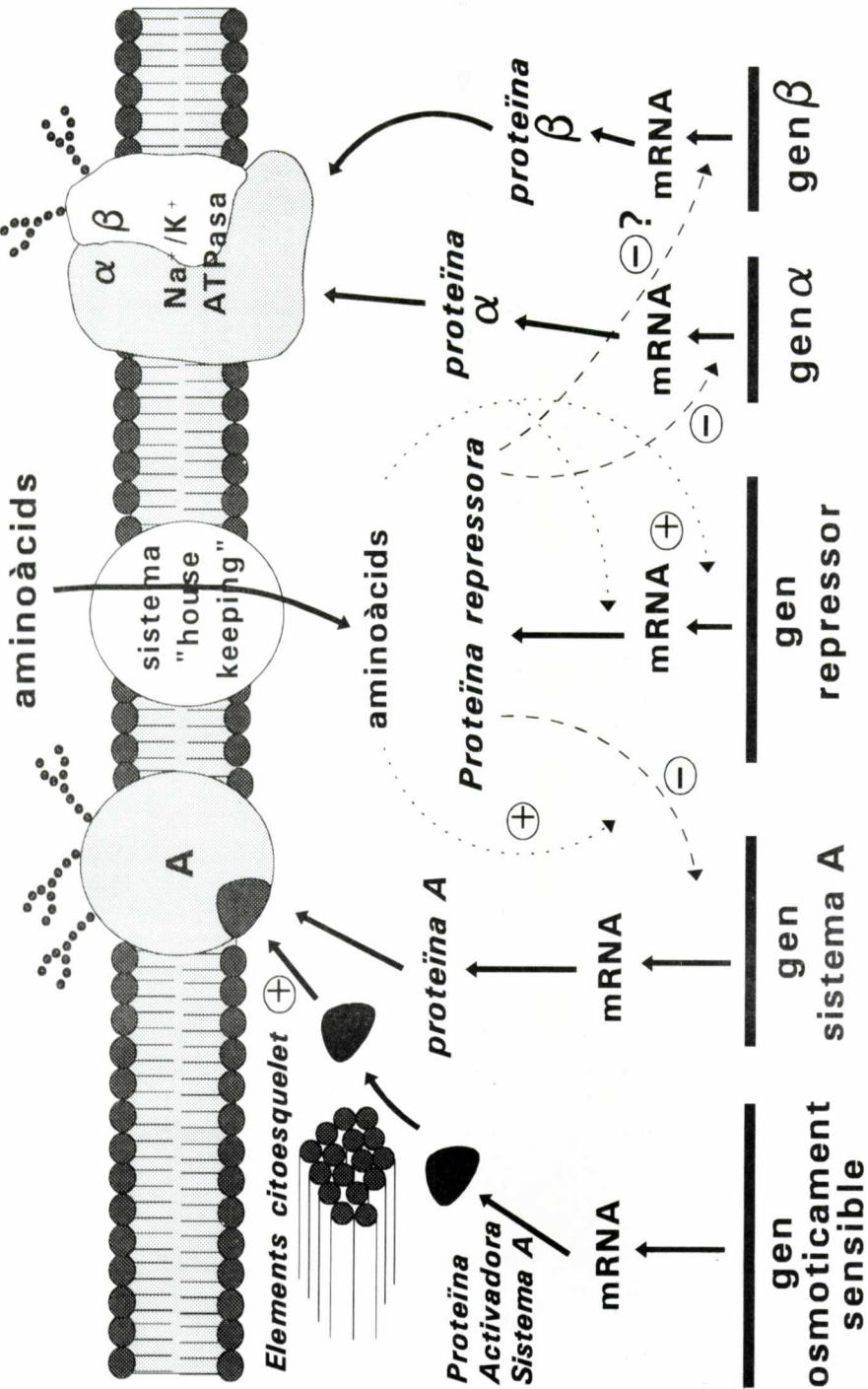


FIGURA 3. Model de regulació coordinada de l'expressió dels gens del sistema A i de la Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPasa pels aminoàcids intracel·lulars. Segons aquest model, la presència de certs aminoàcids a l'interior de la cèl·lula provoca la inducció de la transcripció d'un gen repressor així com l'activació del seu producte. Aquesta proteïna repressora mantindria inhibida, en situacions d'abundància d'aminoàcids, la transcripció dels gens del sistema A i de la Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPasa (com a mínim, de la seva subunitat α). En absència d'aminoàcids, es perdria aquest control negatiu de la proteïna repressora i s'induiria la transcripció dels gens tant del sistema A com de l'ATPasa. També incloem a l'esquema l'existència d'un gen osmòticament sensible, el producte del qual és una proteïna activadora del sistema A, d'alguna manera relacionada amb certs elements del citoesquelet.

lar a la ja descrita en cèl·lules CHO-K1, tant pel que fa a especificitat de repressors com a inactivació, però té la particularitat única que, en condicions basals de cultiu, l'activitat A és totalment negligible (no mesurable per tècniques convencionals) i s'indueix fortament pel control adaptatiu (Figura 2) (Felipe *et al.*, 1992; Soler *et al.*, 1993).

Fins a quin punt aquest mecanisme de control és important *in vivo*? La contesta no és evident tot i que hi ha força situacions fisiològiques associades a canvis profunds en la concentració circulant d'aminoàcids que van acompanyats d'induccions selectives de l'activitat A. Per exemple, durant l'adaptació al dejuni, l'increment progressiu en l'activitat de transport dependent de sodi de L-alanina (en gran mesura lligada a activitat A) és inversament proporcional a la concentració portal d'aquest substrat (Felipe *et al.*, 1995). Igualment durant la transició metabòlica associada al naixement, la forta caiguda en el contingut circulant d'aminoàcids del nadó (durant la vida fetal els nivells són molt més alts mercès a la capacitat concentrativa de la placenta) s'havia considerat un element inductor de l'elevada taxa d'activitat A dels hepatòcits del nadó (Pastor-Anglada *et al.*, 1995). Tanmateix, l'anàlisi cinètica de les activitats hepàtiques fetals demostren que el sistema A està ja plenament desenvolupat i presenta elevades  $V_{\max}$  abans del naixement (Martínez-Mas *et al.*, 1993). Pel que fa a l'exemple del dejuni, cal pensar que el canvi en el context hormonal portal pot contribuir per si mateix a la inducció del sistema A hepàtic. Recordeu que ja havíem dit que l'activitat induïda per dejuni difícilment era activable per insulina *in vivo* (Ferrer-Martínez *et al.*, 1994), fet que potser fóra esperable si el desencadenant de la inducció fos exclusivament l'assequibilitat de substrat. En aquest cas podríem pensar en una additivitat dels efectes, el de desrepressió i el de modulació per insulina. A

favor d'aquesta possibilitat cal recordar que la genètica somàtica ha permès d'obtenir mutants derivats de la soca CHO-K1 pro<sup>+</sup>, anomenats CHO-K1 ala<sup>6</sup>, que han perdut totalment la capacitat de resposta a la insulina però segueixen presentant la resposta adaptativa a l'absència d'aminoàcids (Moffett *et al.*, 1987). Es pot pensar que la via de modulació hormonal i la de control adaptatiu són completament diferents. El fet que la pèrdua de sensibilitat a la insulina afectés només l'activitat A i no altres paràmetres modulats per l'hormona també suggeriria una possible via de transducció de senyals específica per a aquest transportador. Això podria explicar, per exemple, per què durant el desenvolupament postnatal, quan tot el metabolisme intermediari és fortament resistent a la insulina (Issad *et al.*, 1988), l'activitat A ja té capacitat de resposta a l'hormona (Gómez-Angelats *et al.*, 1995a).

Com ja havíem comentat en l'apartat de modulació hormonal, cal pensar que l'activitat A està regulada *in vivo* per un seguit de senyals tan complexos que difícilment podem destriar-ne els elements individuals responsables dels canvis d'activitat associats a situacions fisiològiques i fisiopatològiques concretes (breument resumides a la taula III). Establir els efectes relatius de cada hormona o dels canvis de concentracions de substrats moduladors de l'activitat, bé com a repressors de la seva expressió o com a inactivadors, és probablement impossible.

### Regulació per canvis de volum cel·lular

La possibilitat que els aminoàcids puguin actuar com a osmòlits en les cèl·lules de mamífer és altament probable. Un osmòlit és aquell compost, relativament inert des d'un punt de vista metabòlic, susceptible de ser concentrat dins la cèl·lula en resposta a l'exposició a un medi hipertònic (Kinne,

TAULA III. Inducció del sistema A en situacions fisiològiques i fisiopatològiques. Increment d'activitat del sistema A en diferents situacions fisiològiques i fisiopatològiques associades a un increment de la massa hepàtica i, per tant, a estats de proliferació dels hepatòcits.

| Situació fisiològica | % increment activitat A | % increment massa hepàtica |
|----------------------|-------------------------|----------------------------|
| Gestació             |                         |                            |
| 9 dies               | 43                      | 30                         |
| 12 dies              | 68                      | 32                         |
| 21 dies              | 18                      | 57                         |
| Alletament           |                         |                            |
| 15 dies              | 60                      | 59                         |
| Obesitat genètica    |                         |                            |
| 55 dies              | 79                      | 36                         |
| Regeneració hepàtica |                         |                            |
| 6 hores              | 142                     | n.d.                       |
| Desenvolupament      |                         |                            |
| fetus 21 dies        | 251                     | n.d.                       |
| nadons 1 dia         | 144                     | n.d.                       |
| deslletats 21 dies   | 6                       | n.d.                       |

Valors d'increment sobre el 100% dels respectius controls; n.d. no determinat

1993). En sentit estrictament és evident que els aminoàcids foren probablement els osmòlits menys inerts, però la seva gran concentració intracel·lular clarament els atorga un paper modulador de la resposta osmoreguladora a curt i a llarg termini.

Essencialment els osmòlits seran concentrats mitjançant tres tipus de mecanismes: estimulació de llur síntesi (cas del sorbitol, per exemple), inhibició de llur degradació (cas de la glicerolfosfocolina) o bé increment en la captació des de l'exterior de la cèl·lula (cas del mioinositol, la betaïna i els aminoàcids) (García-Pérez i Burg, 1995). Si aquestes adaptacions són a llarg termini, aleshores implicaran la síntesi d'aquelles proteïnes que puguin resultar limitants en aquests processos, com per exemple l'aldosa reductasa per a la síntesi del sorbitol o els mateixos transportadors de membrana per al cas de la betaïna (BGT1) i el mioinositol (SMIT). BGT1 i SMIT van ser clonats per expressió en oòcits de *Xenopus* aprofitant també el gran increment en els nivells de llurs mRNA

en resposta a la hipertonicitat (Kwon *et al.*, 1992; Yamauchi *et al.*, 1992). L'expressió gènica de tots dos transportadors està sotmesa clarament a control transcripcional (Uchida *et al.*, 1993; Yamauchi *et al.*, 1993) i recentment ja s'ha donat a conèixer el que sembla un probable element de resposta a la hiperosmolaritat en el promotor de BGT1 (Takenaka *et al.*, 1994).

L'activitat del sistema A pot estar modulada per canvis de l'osmolaritat del medi (McGivan i Pastor-Anglada, 1994) (Figura 4). Aquest efecte, descrit inicialment en fibroblasts, havia estat pobrement caracteritzat i s'havia relacionat amb la resposta adaptativa, és a dir que el dejuni d'aminoàcids d'alguna manera condiciona també canvis d'osmolaritat, tot i que previsiblement seran oposats als que cal esperar en situacions d'hipertonicitat. Actualment disposem d'evidències per a pensar que l'activitat A que s'indueix en cèl·lules de mamífers en resposta a la hiperosmolaritat, probablement és la conseqüència cinètica de l'acció estimuladora

d'una o més proteïnes sobre transportadors A existents prèviament (Soler *et al.*, 1993; Ruiz-Montasell *et al.*, 1994a). És a dir, el gen A no fóra el sensible a canvis osmòtics sinó que algun altre gen osmòticament sensible hauria de codificar aquesta hipotètica proteïna activadora. Les evidències a favor d'aquest model de regulació, també representat a la figura 3, són diverses, com es pot veure a la figura 5. En les cèl·lules d'epiteli renal boví NBL-1, l'activitat A s'activa en condicions d'hiperosmolaritat per un mecanisme que és sensible a la cicloheximida i l'actinomicina D, però no a la tunicamicina (recordem que el transportador A, com moltes altres proteïnes de membrana, sembla que és una estructura glucosilada). Aquesta estimulació només s'esdevé si prèviament les cèl·lules han expressat, probablement *de novo*, l'activitat A en ser incu-

bades en un medi sense aminoàcids. La resposta del sistema A a la hiperosmolaritat comporta canvis en ambdós paràmetres cinètics,  $K_m$  i  $V_{m\acute{a}x}$ , i guanya capacitat catalítica i afinitat envers el substrat, la qual cosa explica que en concentracions fisiològiques del substrat l'efecte osmòtic sigui d'una magnitud (fins a sis vegades sobre els valors de transport basals) molt superior a la del propi control adaptatiu. Un canvi cinètic d'aquestes característiques difícilment és compatible amb la síntesi de nous transportadors. Més aviat es pot entendre segons l'acció d'una segona proteïna reguladora, susceptible de modificar la conformació del transportador i alterar les seves constants cinètiques, tal com s'ha descrit per al transportador intestinal de glucosa SGLT1, per al qual s'ha identificat una proteïna moduladora anomenada RS1, la interacció amb la qual

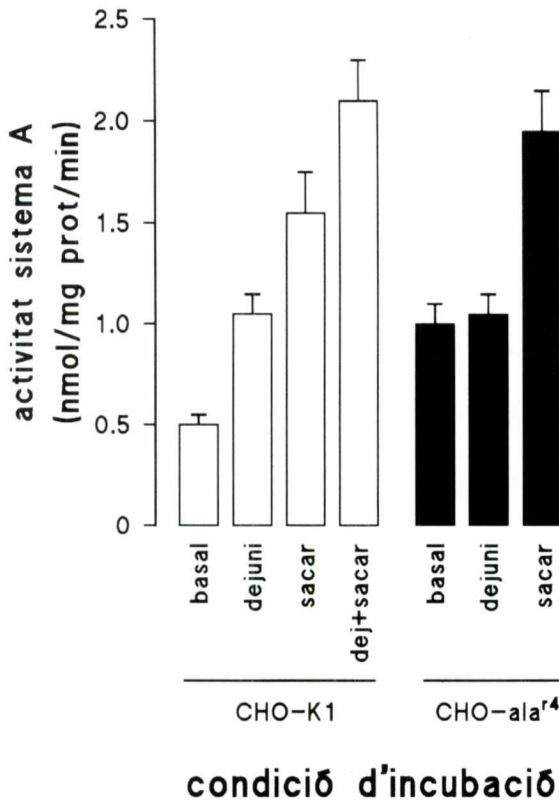


FIGURA 4. Efecte de la hiperosmolaritat sobre l'activitat del sistema A. En incubar cèl·lules CHO-K1 en un medi hiperosmòtic (sacarosa 200 mM), s'indueix la activitat del sistema A a un nivell fins i tot superior al de la resposta adaptativa (dejeny d'aminoàcids). A més, aquests dos efectes es produeixen per vies diferents, ja que la combinació de tots dos resulta en un increment additiu de l'activitat del sistema A. Com a confirmació d'aquest punt, una línia mutant de cèl·lules CHO (anomenada CHO-ala<sup>r4</sup>) que no respon al dejeny d'aminoàcids (possiblement per una mutació del gen de la proteïna repressora) encara manté la capacitat de resposta a la hiperosmolaritat, i assoleix taxes de transport equivalents a les de la soca salvatge sotmesa al dejeny d'aminoàcids i a la hiperosmolaritat.

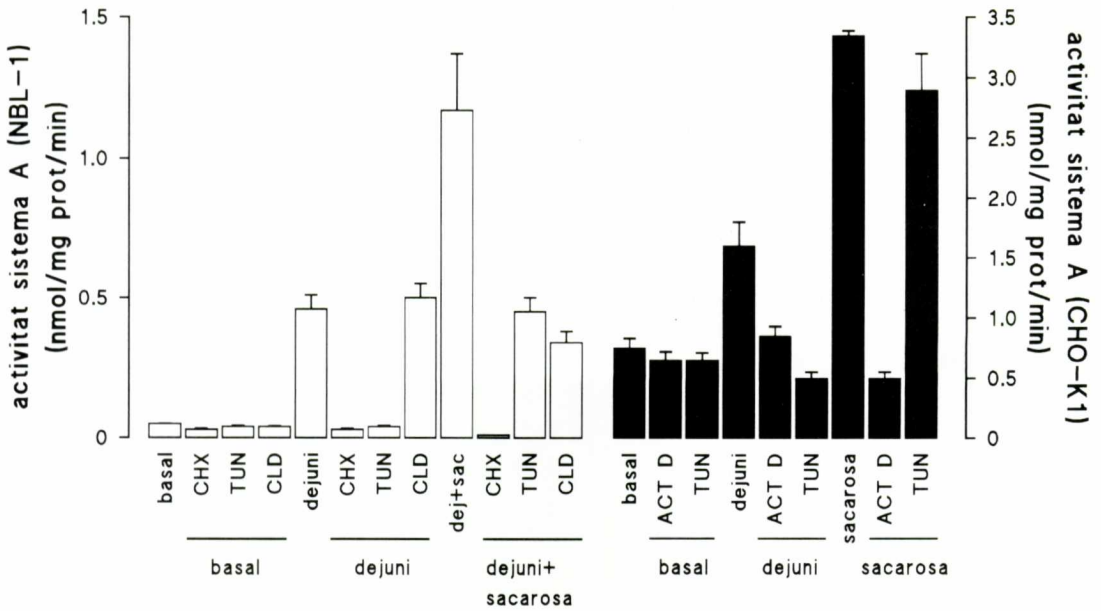


FIGURA 5. El dejuni d'aminoàcids i la hiperosmolaritat indueixen l'activitat del sistema A per mecanismes diferents. Tant en cèl·lules NBL-1 com en cèl·lules CHO-K1, la resposta del sistema A a la privació d'aminoàcids i a la hiperosmolaritat són degudes a mecanismes diferents. A NBL-1, la resposta al dejuni es totalment inhibida per la tunicamicina (un inhibidor de la N-glucosilació, mentre que la colcemida (un inhibidor de la funció microtubular) no té cap efecte; en canvi, la tunicamicina no pot bloquejar totalment l'efecte combinat del dejuni i la hiperosmolaritat, que sí que és parcialment sensible a la colcemida. Similarmet, a CHO-K1, la tunicamicina bloqueja completament la inducció deguda a la privació d'aminoàcids però no té cap efecte sobre l'activació produïda per la hiperosmolaritat.

sembla que comporta un canvi profund en el comportament cinètic del transportador (Vehyl *et al.*, 1993).

En qualsevol cas, és molt clar que la resposta a la hiperosmolaritat no té res a veure amb l'adaptativa (Ruiz-Montasell *et al.*, 1994a). Ambdues són additives, la primera és sensible a un inhibidor de la funció microtubular (colcemida) però no ho és la segona. A més, després de comprovar que els fibroblasts CHO-K1 pro<sup>+</sup>, malgrat que no són cèl·lules d'origen renal, també mantenen aquesta capacitat de resposta a la hiperosmolaritat, vàrem posar de manifest que el mutant CHO-K1 ala<sup>4</sup>, que ha perdut la capacitat de respondre a un dejuni

d'aminoàcids (manca de control adaptatiu), manté la capacitat d'incrementar l'activitat A fins a nivells equivalents als de la soca salvatge, quan se sotmet a un estrès hipertònic sense aminoàcids (estímuls additius). Igual que a NBL-1, a CHO-K1 pro<sup>+</sup> la resposta osmoreguladora no podia ser inhibida per tunicamicina. Tanmateix, estudis recents que combinen inhibidors i desestabilitzadors d'estructures de citoesquelet, microtúbuls i microfilaments, permeten de suggerir que ambdues línies sí que diferirien pel que fa al tipus d'estructures involucrades en la inducció de l'activitat del sistema A (Gómez-Angelats, Casado, Felipe i Pastor-Anglada; dades no publicades).

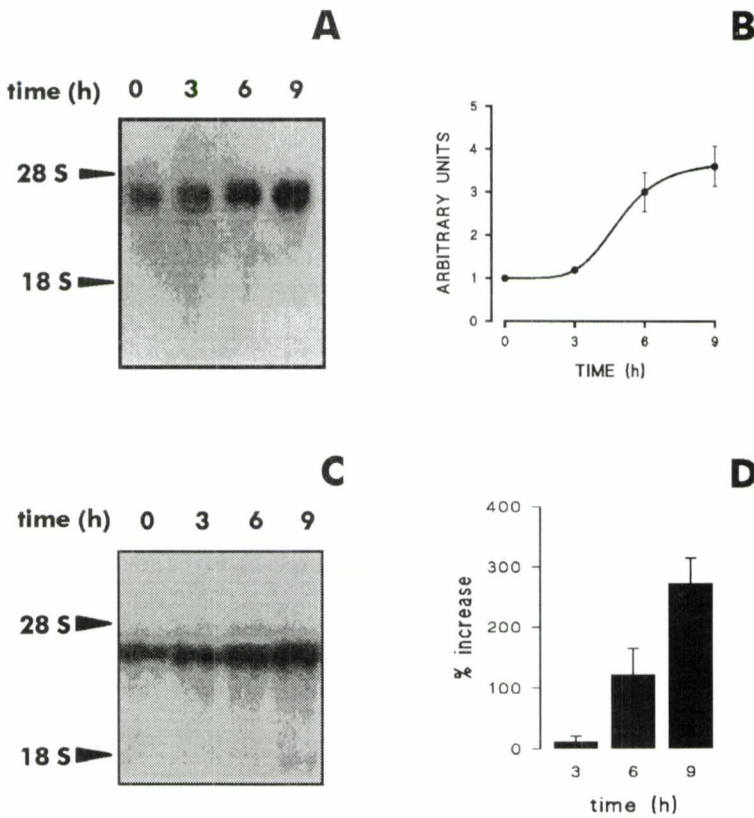


FIGURA 6. Inducció coordinada en resposta a la hiperosmolaritat de l'expressió de la Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPasa i del transportador de glutamat X<sub>AG</sub><sup>-</sup>. Anàlisi per Northern blot del missatger de la subunitat  $\alpha_1$  de la Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPasa (A, B) i del transportador de glutamat X<sub>AG</sub><sup>-</sup> (C, D, amb la sonda EAAC1). Es pot observar l'estret paral·lelisme que hi ha entre la quantitat dels mRNA de tots dos productes.

La resposta osmoreguladora de l'activitat A és força específica tot i que no és exclusiva d'aquest transportador. El sistema de transport de glutamat d'alta afinitat (sistema X<sub>AG</sub><sup>-</sup>) s'indueix fortament després de l'exposició de cèl·lules NBL-1 a un medi hipertònic (Ferrer-Martínez *et al.*, 1995). Aquest efecte comporta exclusivament un canvi de V<sub>màx</sub> i és inhibible per cicloheximida però també per tunicamicina. El cDNA que codifica per a X<sub>AG</sub><sup>-</sup> fou clonat (EAAC1) i de la seqüència deduïda d'aminoàcids, se'n desprèn que té llocs potencials de glucosilació. Utilitzant una sonda cDNA generada per

PCR a partir de la seqüència publicada, es pogué comprovar que en aquest cas les quantitats de mRNA per a EAAC1 incrementaven fins a 3-4 vegades sobre els valors basals després d'exposar les cèl·lules a hipertonicitat (Figura 6). Totes aquestes dades clarament apunten que, en aquest cas, la hiperosmolaritat sí que estimula directament la transcripció del gen EAAC1 i sintetitza més transportadors, els quals determinen un canvi cinètic en llur funcionalitat biològica que es manifesta en un increment de V<sub>màx</sub> (Ferrer-Martínez *et al.*, 1995). Tanmateix, altres sistemes de transport d'aminoàcids, també

concentratius i dependents de sodi, que s'expressen en cèl·lules NBL-1 (sistema B0 d'ampli espectre) i en cèl·lules CHO-K1 (sistema ASC) són totalment insensibles a un medi hipertònic o fins i tot disminueixen d'activitat. Transportadors concentratius d'altres soluts inorgànics, com el de fosfat, típicament renal, tampoc són modulables per canvis osmòtics en les cèl·lules NBL-1 (Ferrer-Martínez *et al.*, 1995). Tanmateix, l'activitat de transport de  $\text{Rb}^+$  inhibible per furosemida (equivalent al cotransportador  $\text{Na}/\text{K}/\text{Cl}$ ) es troba fortament induïda per hiperosmolaritat, mitjançant un mecanisme que implica canvis en la quantitat del seu missatger (Ferrer-Martínez, Felipe, Casado i Pastor-Anglada, dades no publicades). Curiosament l'activitat de la  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasa augmenta feblement en les mateixes condicions de cultiu, però això va acompanyat d'un fort increment en els nivells de mRNA de la subunitat 1 de la  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasa, que és compatible amb un sistema de control transcripcional (Ferrer-Martínez, Felipe, Casado i Pastor-Anglada; dades no publicades).

Les implicacions fisiològiques del perquè alguns transportadors d'aminoàcids no respondrien a canvis osmòtics i altres sí ho que farien, però potser per mecanismes diferents (síntesi del propi transportador o de possibles proteïnes activadores), ens són ara per ara totalment desconegudes.

## EL SISTEMA A EN LA PROLIFERACIÓ CEL·LULAR

L'activitat del sistema A oscil·la al llarg del cycle cel·lular i generalment augmenta en situacions d'hiperplàsia tisular i en línies transformades químicament i viralment que presenten elevades taxes de proliferació (Mc Givan i Pastor-Anglada, 1994). Una vegada més, les cèl·lules parenquimàtiques del fet-

ge constitueixen un model únic per a l'estudi de la modulació del sistema A vinculada a fenòmens de proliferació cel·lular, mercès a l'elevada capacitat de regeneració que té aquest òrgan fins i tot en l'animal adult i en les nombroses situacions fisiològiques i fisiopatològiques associades a un creixement hipertròfic i/o hiperplàsic del fetge. Per regla general, l'activitat A es troba induïda en situacions d'hiperplàsia com són el propi desenvolupament (Martínez-Mas *et al.*, 1993a; Gómez-Angelats *et al.*, 1995a; Amat *et al.*, 1995), la gestació (Pastor-Anglada *et al.*, 1987; Felipe *et al.*, 1989; Pastor-Anglada *et al.*, 1995), l'alletament (Felipe *et al.*, 1993a) o les fases primerenques de l'obesitat genètica (Ruiz *et al.*, 1991). Aquesta inducció probablement es troba en alguns casos coordinada amb la d'altres transportadors concentratius com l'ASC, el N i el sistema de transport, recentment caracteritzat, responsable de la captació concentrativa de nucleòsids. Tanmateix, el millor model per a establir la correlació entre l'entrada en el cycle mitòtic i la inducció de l'activitat A, és la regeneració induïda per una hepatectomia parcial. Durant la fase prereplicativa de la regeneració, l'activitat A es troba fortament induïda, mitjançant un mecanisme que és compatible amb la síntesi de nous transportadors (Martínez-Mas *et al.*, 1993b). La inducció és estable en preparacions de membrana plasmàtica fins i tot en presència d'ionòfors de sodi. És a dir, que es tracta d'una inducció del transportador i no pas d'un efecte sobre el gradient de  $\text{Na}^+$ . L'activitat induïda sembla que és idèntica a la basal. En aquest sentit convé recordar que l'activitat A descrita en línies d'hepatoma, malgrat que és molt elevada, presenta una forta insensibilitat a agents modificadors de grups -SH tipus N-ètilmaleïmida (Dudeck *et al.*, 1987), la qual cosa no es detecta per a l'activitat A, basal o induïda, de cèl·lules diferenciades (Martínez-Mas *et al.*, 1993b). Aquesta observació és

compatible amb l'existència d'isofomes, tal com ja s'ha suggerit utilitzant la tècnica d'òdits de *Xenopus*, en què s'ha pogut demostrar que mRNA de diferent mida poden codificar un mínim de dues activitats diferents (Lin *et al.*, 1994). S'ha suggerit que la inducció de l'activitat A durant la proliferació de les cèl·lules parenquimàtiques del fetge podia ser un mecanisme permissiu en l'entrada al cicle cel·lular (Leffert *et al.*, 1988), tot i que durant molt de temps es va creure que aquest increment d'activitat, lluny de ser estable, podria ser degut exclusivament a canvis en el potencial de membrana. Convé recordar que tradicionalment s'havia considerat que un increment en la concentració de sodi intracel·lular i la consegüent energetització de la bomba de sodi foren elements primerencs en la resposta proliferativa de l'hepatòcit (Koch i Leffert, 1979). Actualment s'ha demostrat que la Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPasa s'indueix fortament durant la mateixa fase prereplicativa mitjançant un mecanisme que implica increments en la quantitat de proteïna d'ambdues subunitats,  $\alpha 1$  i  $\beta 1$ , i també en la quantitat de llurs mRNA (Martínez-Mas *et al.*, 1995). Probablement l'increment estable tingui sentit fisiològic en tant que altres transportadors concentratius i dependents de Na<sup>+</sup>, com el de nucleòsids, també es troben induïts (Ruiz-Montasell *et al.*, 1993), i previsiblement l'activitat incrementada de la bomba de sodi haurà de ser necessària per a garantir un manteniment eficient del gradient transmembrana del catió. Tot i que s'allunya de l'abast d'aquesta revisió, pel que fa al transport hepàtic de nucleòsids durant la proliferació cel·lular, també existeixen evidències a favor d'una possible expressió diferencial de transportadors.

La possibilitat que certs transportadors d'aminoàcids o de nucleòsids es puguin expressar diferencialment segons l'estat de diferenciació de l'hepatòcit, ens obre una possible via per a la generació de marcadors

tumorals, alhora que, potencialment, fins i tot existeix la possibilitat teòrica que aquests sistemes puguin ser utilitzats com a dianes de fàrmacs antiproliferatius. Aquesta particularitat, l'expressió diferencial de transportadors, probablement no fóra exclusiva dels hepatòcits, ja que, per exemple, els fibroblasts transformats oncogènicament es caracteritzen perquè gairebé desapareix l'activitat de transport d'alta afinitat de glutamat, coneguda per sistema X<sub>AG</sub>- (Bussolati *et al.*, 1993). Les bases cel·lulars d'aquests efectes ens són en gran mesura desconegudes.

### INDUCCIÓ COORDINADA DEL SISTEMA A AMB ALTRES SISTEMES DE TRANSPORT DEPENDENTS DE SODI

Fóra atractiu pensar que l'activitat de transportadors concentratius i dependents de sodi, responsables de la captació de soluts que cobreixen necessitats metabòliques complementàries, es podrien induir de manera coordinada en situacions fisiològiques i fisiopatològiques que així ho requerissin (vegeu la figura 7). Tanmateix, les evidències són circumstancials i tan sols es disposa d'alguna prova més conclouent en l'àmbit de la genètica somàtica.

És freqüent que la inducció de l'activitat A s'esdevingui de manera simultània amb la d'altres transportadors actius, incloent-hi la mateixa Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPasa. En molts casos l'observació és merament fenomenològica, és a dir, A s'activa i també ho fan altres transportadors (Ruiz-Montasell *et al.*, 1994b). Aquest és el cas dels models associats a la hiperplàsia hepàtica o de la resposta a la hiperosmolaritat, tot i que en aquest darrer cas, com ja hem explicat, mecanísticament la inducció del sistema A sembla que és única entre les descrites. Probablement les dades més espectaculars són les que s'han obtingut



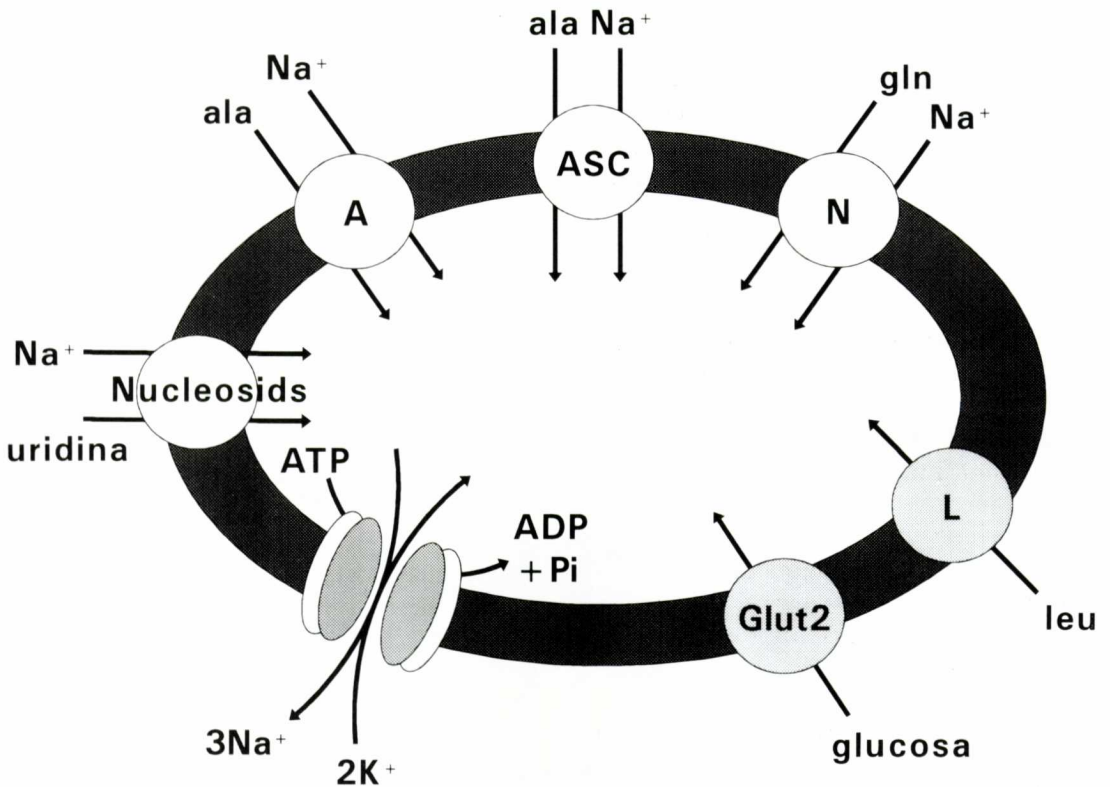


FIGURA 7. Relació entre els transportadors dependents de sodi i la  $\text{Na}^+, \text{K}^+-\text{ATPasa}$ . Els transportadors dependents de sodi han augmentat en diferents situacions fisiològiques o fisiopatològiques associades a un estat de proliferació cel·lular en les quals també s'ha descrit una activació de la  $\text{Na}^+, \text{K}^+-\text{ATPasa}$ . Els transportadors independents de sodi, com ara el sistema L de transport d'aminoàcids ramificats o el sistema GLUT2 de transport de glucosa, no presenten increments d'activitat en les mateixes situacions.

gut en línies cel·lulars i en alguns mutants somàtics. El cultiu prolongat de fibroblasts en un medi amb ouabaïna indueix una activitat incrementada de la bomba de sodi que va acompanyada d'induccions en l'activitat A (Leister *et al.*, 1988; Schenermann *et al.*, 1988). No hi ha evidències però que l'increment de la  $\text{Na}^+, \text{K}^+-\text{ATPasa}$  es correspongui amb un fenomen estable lligat a un increment en el nombre de bombes. Quan es fa un experiment que es podria entendre com a complementari de l'anterior, és a dir, seleccionar cèl·lules somàtiques segons activitats incrementades del sistema A, s'observa que el fenotip seleccionat presenta una

coinducció de la  $\text{Na}^+, \text{K}^+-\text{ATPasa}$  (Qian *et al.*, 1989). Això s'ha fet amb cèl·lules CHO-K1 pro<sup>-</sup>, que són auxòtrofes per a la prolina (substrat del sistema A). Després d'induir químicament la taxa basal de mutació espontània d'aquestes cèl·lules, la selecció amb concentracions elevades d'alanina (també substrat del sistema A i, per tant, tòxic per a les cèl·lules si es troba en concentracions elevades) va permetre d'obtenir mutants somàtics amb activitats A força incrementades. Un d'aquests mutants, el CHO-K1 ala<sup>r4</sup> ja ha estat introduït en l'apartat de modulació a llarg termini per control adaptatiu. Aquests mutants i d'altres que se'n deriva-

ren mantenien una correlació lineal i positiva entre ambdós paràmetres, activitat del sistema de transport d'aminoàcids i activitat  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasa. La correlació se seguia mantenint si utilitzàvem el valor de nombre de bombes de sodi (mesurat com a llocs d'unió específica d'ouabaina) o com a quantitat de mRNA per a la subunitat  $\alpha 1$  de la bomba. Tanmateix, les evidències més concloents a favor d'una possible coinducció d'ambdós transportadors pel que fa als gens s'obtingueren en demostrar que l'mRNA d'aquesta subunitat també s'acumulava com a resposta al control adaptatiu per manca d'aminoàcids i, a més, aquesta resposta era inhibible per aminoàcids individuals amb el mateix patró d'especificitat que el descrit per a la des-repressió del sistema A en absència d'aminoàcids (Qian *et al.*, 1991). Tal com es podia esperar d'aquest tipus de resposta, el mutant somàtic CHO-K1  $\text{pro}^-$  també presentava nivells més elevats del missatger, però l'híbrid somàtic CHO-K1  $\text{pro}^- \times$  CHO-K1 ala<sup>r</sup>4 tenia cúmuls de mRNA per a la subunitat  $\alpha 1$  propis de la soca salvatge. Aquestes característiques fenotípiques dels mutants i els híbrids, així com la resposta adaptativa de la soca salvatge són compatibles amb la idea que el gen de la subunitat  $\alpha 1$  podria estar sota el control de la mateixa proteïna repressora postulada per al sistema A de transport d'aminoàcids neutres. Aquesta possibilitat de coregulació s'esquemmatitza també a la figura 3.

La possibilitat que les coinduccions poguessin afectar més d'un transportador d'aminoàcids també es derivà de l'anàlisi fenotípica dels primers mutants somàtics generats a partir de cèl·lules CHO-K1  $\text{pro}^-$  (Englesberg i Moffett, 1986). Mutants puntuals presentaven efectes pleotròpics que implicaven més d'un transportador d'aminoàcids sempre que aquests fossin concentratius. Així doncs l'activitat del sistema L (de difusió facilitada) mai no es troba signi-

ficativament alterada. S'ha postulat l'existència d'algun element funcional comú per a tots ells i de fet no es extrany trobar situacions fisiològiques, com les ja descrites, on els efectes sobre més d'un transportador exclou sistemàticament els de difusió facilitada. L'existència o no de mecanismes de coregulació o de proteïnes activadores comunes per a més d'un transportador que permetin explicar el fenomen del pleotropisme, només es podrà demostrar mitjançant aproximacions moleculars.

## IDENTITAT MOLECULAR DEL SISTEMA A

Ningú no sap com és el sistema A. Si ens demanessin el parer, probablement diríem que aquesta activitat biològica correspon a més d'una proteïna, possiblement un heteropolímer, del qual existeixen moltes isoformes. Aquesta possibilitat és tan sols una aposta. Per què no s'ha pogut identificar encara ara el sistema A a escala molecular?

Per regla general tots els sistemes de transport d'aminoàcids han estat molt difícils de caracteritzar a escala molecular i podríem dir que molts dels que tenen més interès metabòlic, com el propi A, el N o el L, no han estat encara identificats. Les raons són essencialment dues: la manca de lligands específics i la poca abundància d'aquestes proteïnes en la cèl·lula. Això ha complicat en gran mesura l'aproximació clàssica, és a dir, la purificació de la proteïna, la seqüenciació i l'obtenció d'anticossos i la seva eventual clonació en biblioteques d'expressió o mitjançant oligonucleòtids degenerats. Cal tenir present que la manca de lligands obliga constantment a realitzar assajos biològics de transport al llarg de tot el procés de purificació, la qual cosa comporta la solubilització i la reconstitució de les fraccions proteïques en proteoliposomes. Això

sovint s'associa a pèrdua d'activitat, parcialment deguda al caràcter altament hidrofòbic dels dominis transmembrana i a la forta tendència a crear agregats proteics. Algunes purificacions parcials del sistema A han estat descrites i, fins i tot, a finals de la dècada dels vuitanta, aparegué un treball en què s'afirmava haver obtingut anticossos anti-A (McCormick i Johnstone, 1988), que finalment no van reconèixer aquest transportador. La possibilitat de convertir en «específics» uns lligands en principi «inespecífics» s'havia intentat uns quants anys abans mitjançant una estratègia força hàbil que mereix un record (Hayes i McGivan, 1983). Ja hem comentat que alguns modificadors de grups -SH com el NEM poden inhibir l'activitat A. En realitat el NEM s'unirà a qualsevol grup -SH sempre que la topografia de la proteïna ho permeti. En demostrar-se que en coincubar preparacions de vesícula de membrana plasmàtica de fetge amb NEM i substrats del sistema A es protegia el transportador de la inactivació, s'intentà saturar tots els llocs d'unió de NEM en presència de substrats protectors, per tal d'eliminar-los posteriorment i repetir la incubació amb NEM tritiat. Teòricament el NEM marcat s'hauria d'haver unit irreversiblement a proteïnes A. L'estratègia no va funcionar.

Quan la via proteica no ha tingut èxit, aleshores s'intenta l'aproximació per la via dels àcids nucleics. En aquest sentit, el treball pioner amb el transportador dependent de sodi de glucosa intestinal (SGLT1) (Hediger *et al.*, 1987), clonat per la tècnica d'expressió en oòcits de *Xenopus*, va obrir la via a l'aïllament dels cDNA que codifiquen per a alguns dels transportadors fins ara clonats. En tant que molts d'aquests comparteixen una elevada homologia estructural i sembla que constitueixen famílies gèniques, l'aïllament dels primers clons i l'observació de llur homologia de seqüència generà veritables curses per tal d'aïllar qualsevol

cDNA mínimament homòleg. Això és especialment cert per al cas dels transportadors de neurotransmissors (Harvey i Nelson, 1994). El gruix de publicacions de llur clonació s'extengué al llarg d'un període de pocs mesos.

Pel que fa a l'activitat A, malgrat que s'aconseguí un cert nivell d'expressió en oòcits injectats amb mRNA (Tarnuzzer *et al.*, 1990; Palacín *et al.*, 1990), aquesta aproximació no ha arribat a funcionar mai. La possibilitat que A fos parcialment homòleg amb algun altre transportador ja identificat a escala molecular també es va considerar i s'arribà a suggerir que la proteïna codificada per el cDNA SAAT1 era la responsable de l'activitat biològica coneguda com a A (Kong *et al.*, 1993). SAAT1 es clonà mercès a la seva homologia amb SGLT1. Així semblava confirmar-se la hipòtesi que dins una mateixa família de transportadors concentratius i dependents de sodi, les diferents entitats moleculars mantindrien certa homologia estructural pel que fa, per exemple, a llocs d'unió del catió, de manera que petits canvis de seqüència foren suficients per a anar modificant l'especificitat de substrat. SMIT, un dels transportadors modulables per osmolaritat ja comentats anteriorment, també formaria part d'aquesta família gènica. Assajos funcionals molt més acurats permeten comprovar que SAAT1 codificava en realitat un transportador de glucosa de baixa afinitat (Mackenzie *et al.*, 1994), amb la qual cosa el nom del clon fou canviat per pSGLT2 i el problema de la identitat molecular de A seguia sense resoldre's. Aparentment, l'expressió heteròloga de pSGLT2 es traduïa, segons el tipus cel·lular, en una petita inducció de l'activitat A endògena. La base cel·lular d'aquesta resposta és desconeguda però probablement es trobava en l'origen de la mala interpretació dels resultats obtinguts amb SAAT1.

Una altra aproximació utilitzada per un

parell de laboratoris fou la hibridació diferencial aprofitant línies cel·lulars o condicions de cultiu que permetessin la inducció selectiva de A. La hibridació diferencial mRNA/cDNA o qualsevol altra variant d'aquesta aproximació, té com a finalitat aïllar clons que provinquin de mRNA sobreexpressats específicament en la línia cel·lular o en la situació de cultiu i que comportin la inducció selectiva de l'activitat A. En darrer terme sempre calia recórrer a l'expressió del clon per tal d'esbrinar-ne la funció biològica. Aquesta aproximació s'ha realitzat en dos models: el control adaptatiu en cèl·lules d'hepatoma (Shay *et al.*, 1990; Kilberg *et al.*, 1994) i els mutants somàtics de cèl·lules CHO-K1 pro<sup>-</sup> que sobreexpressen l'activitat A (Pastor-Anglada, Qian, Englesberg; dades no publicades). L'estratègia del control adaptatiu era clara, es tractava de desreprimir les cèl·lules durant un temps curt (unes quatre hores) però suficient per a garantir que la totalitat de l'mRNA necessari per a la resposta adaptativa del sistema A ja s'havia sintetitzat. Si la resposta adaptativa era altament específica d'aquest transportador, calia suposar que la hibridació diferencial entre cèl·lules dejunades d'aminoàcids i cèl·lules mantingudes en medi control ens hauria de permetre aïllar un nombre reduït de clons, entre els quals hi ha l'A. L'experiència ha demostrat que probablement siguin moltes les proteïnes susceptibles d'induir-se en absència d'aminoàcids (entre elles les proteïnes d'estrès diverses), per la qual cosa es van aïllar cDNA de gens sensibles al dejuni d'aminoàcids però que no tenien res a veure amb la funció transportadora (per exemple proteïnes ribosomals) (Kilberg *et al.*, 1994). La hibridació diferencial aplicada a mutants induïts per amplificació gènica a partir de la línia cel·lular ja comentada, CHO-K1 ala<sup>r4</sup>, tampoc va donar resultats positius. La causa probablement sigui el fet que la soca utilit-

zada, ala<sup>r4</sup> H3.9, malgrat que té activitats de transport fins cinquanta vegades més altes que les pròpies de la soca salvatge, també havia estat coseleccionada per elevades concentracions d'alanina en el medi (>100 mM). Aquestes condicions són clarament hipertòniques i, en aquest cas, no sent mutants puntuals, es podia preveure una coselecció per resistència a l'aminoàcid però també per resistència al medi hipertònic. Així doncs l'activitat A del mutant podia ser la conseqüència de la sobreexpressió de A i de la hipotètica proteïna activadora codificada per un gen osmòticament sensible. Això ve refermat pel fet que ala<sup>r4</sup> H3.9 ha perdut totalment la capacitat de resposta al medi hipertònic (Gómez-Angelats, Casado, Felipe, Pastor-Anglada; dades no publicades).

Una alternativa que s'està assajant actualment al nostre laboratori és la d'utilitzar els models de cèl·lules NBL-1 i CHO-K1 pro<sup>-</sup> en l'estudi de l'expressió diferencial de mRNA (*differential display* (Liang and Pardee, 1995)), com a eina per a l'aïllament d'algun cDNA vinculat al sistema A. Ja hem comentat que NBL-1, quan s'incuba en un medi sense aminoàcids, passa de no presentar activitat A a induir-la fortament. També hem fet referència a l'elevada activitat d'aquest sistema de transport en els mutants somàtics derivats de CHO-K1 pro<sup>-</sup>. Essencialment el que estem fent és amplificar mitjançant PCR la totalitat de cDNA procedent de cada tipus cel·lular incubat en condicions que comportin canvis modulables d'activitat A. El conjunt de productes de PCR, previsiblement un elevat nombre de fragments de pesos moleculars lleugerament diferents, es poden resoldre en un gel de poliacrilamida i es pot determinar quins fragments s'han expressat diferencialment tot comparant mostra «control» amb mostra «induïda». El cas òptim fóra el de la inducció *de novo* (aparició d'una banda allà on no era) però, alternativament, la tècnica pot arribar

a ser semiquantitativa. És obvi que aquesta aproximació, malgrat que es basa en el mateix principi teòric, té avantatges sobre la hibridació diferencial. L'aproximació per la via dels àcids nucleics va acompanyada dels esforços d'un altre grup que ha concentrat l'interès en la generació d'anticossos monoclonals contra glucoproteïnes que s'indueixen selectivament en cèl·lules NBL-1 en ser dejunades d'aminoàcids.

Si aquestes estratègies conduiran o no a la clonació del sistema A és del tot difícil de predir. En el fons, malauradament, les estratègies sovint són limitades i en darrer terme sempre es depèn de la sort. La identificació d'aquest sistema de transport aportaria les eines per a establir les bases moleculars de la seva regulació per la llarga llista de factors hormonal i nutricionals que modulen la seva activitat, alhora que permetria evidenciar l'existència d'isoformes i estudiar les causes de llur expressió probablement específica del teixit i de l'estat de diferenciació.

## AGRAÏMENTS

Els autors agraeixen a Bonaventura Ruiz Montasell, Joan Vicenç Martínez Mas, Mireia Gómez Angelats, Andreu Ferrer Martínez, Belén del Santo, Gemma Tarafa, Mercè Amat i Joan Mercader, tots ells membres o antics membres del grup de recerca sobre Regulació dels Sistemes de Transport (Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona) llur col·laboració en tots els estudis realitzats al nostre laboratori i comentats en aquesta monografia. Els autors també agraeixen al Dr. John D. McGivan (Universitat de Bristol) i al Prof. Ellis Englesberg (Universitat de Califòrnia, Santa Barbara), la discussió de resultats i l'accés a materials diversos (sondes, anticossos, línies cel·lulars, etc.), que han estat de gran ajut en l'avenç de

les nostres línies de recerca. Igualment s'agraeix el finançament rebut al llarg dels darrers anys per part de la DGICYT (Ministeri d'Educació i Ciència), FIS (Ministeri de Sanitat i Consum), Fundació August Pi i Sunyer i The Nestlé Nutrition Research Grant Programme (Suïssa).

## BIBLIOGRAFIA

- AMAT, M.; A. FELIPE; F. J. CASADO; M. PASTOR-ANGLADA (1995). «Ontogeny of L-alanine uptake in plasma membrane vesicles from rat liver». *Pediatr. Res.* [En premsa].
- BERTRAN, J.; X. TESTAR; A. ZORZANO; M. PALACÍN (1994). «A new age for mammalian membrane amino acid transporters». *Cell. Physiol. Biochem.*, núm. 4, pàg. 217-241.
- BURG, M. (1995). «Molecular basis of osmotic regulation». *Am. J. Physiol.* [En premsa].
- BUSSOLATI, O.; B. M. UGGERI; R. ROTOLI; R. FRANCHI-GAZZOLA (1993). «The relationship between sodium-dependent transport of anionic amino acids and cell proliferation». *Biochim. Biophys. Acta*, núm. 1151, pàg. 153-160.
- DUDECK, K. L.; E. E. DUDENHAUSEN; T. C. CHILES; P. FAFOURNOUX; M. S. KILBERG (1987). «Evidence for inherent differences in the system A carrier from normal and transformed liver tissue». *J. Biol. Chem.*, núm. 262, pàg. 12565-12569.
- ENGLESBERG; J. MOFFETT (1986). «A genetic approach to the study of neutral amino acid transport in mammalian cells in culture». *J. Membrane Biol.*, núm. 91, pàg. 199-212.
- FAFOURNoux, P.; C. RÉMÉSY; C. DEMIGNÉ (1990). «Fluxes and membrane transport of amino acids in rat liver under different protein diets». *Am. J. Physiol.*, núm. 259, pàg. E614-E625.
- FELIPE, A.; X. REMESAR; M. PASTOR-ANGLADA (1989). «Na<sup>+</sup>-dependent alanine transport in plasma membrane vesicles from late-pregnant rat livers». *Pediatr. Res.*, núm. 26, pàg. 448-451.
- (1993a). «Alanine uptake by liver of mid-lactating rats». *Metabolism*, núm. 42, pàg. 1109-1115.
- (1995). «Starvation-induced increase of hepatic alanine uptake is related to changes in sensitivity to SH-group reagents». *Am. J. Physiol.*, núm. 268, pàg. R598-R604.
- FELIPE, A.; D. J. SNYDERS; K. K. DEAL; M. M. TAMKUN (1993b). «Influence of cloned voltage-gated K<sup>+</sup> channel expression on alanine transport, Rb<sup>+</sup> uptake, and cell volume». *Am. J. Physiol.*, núm.

- 265, pàg. C1230-C1238.
- FELIPE, A.; C. SOLER; J. D. MCGIVAN (1992). «Amino acid deprivation leads to the emergence of system A activity and the synthesis of a specific membrane glycoprotein in the bovine renal epithelial cell line NBL-1». *Biochem. J.*, núm. 284, pàg. 577-582.
- FERRER-MARTÍNEZ, A.; J. CASADO; A. LETURQUE; A. FELIPE; M. PASTOR-ANGLADA (1994). «Up-regulation of liver system A for neutral amino acid transport in euglycemic hyperinsulinemic rats». *Biochim. Biophys. Acta*, núm. 1222, pàg. 63-69.
- FERRER-MARTÍNEZ, A.; A. FELIPE; B. NICHOLSON; F. J. CASADO; M. PASTOR-ANGLADA; J. D. MCGIVAN (1995). «Induction of high-affinity Na<sup>+</sup>-dependent glutamate transport by hypertonic stress in the renal epithelial cell line NBL-1». *Biochem. J.* [En premsa].
- GARCÍA-PÉREZ, A.; M. B. BURG (1991). «Renal medullary organic osmolytes». *Physiol. Rev.*, núm. 71, pàg. 1081-1115.
- GÓMEZ-ANGELATS, M.; J. MERCADER; B. DEL SANTO; A. FERRER-MARTÍNEZ; A. FELIPE; J. CASADO; M. PASTOR-ANGLADA (1995b). «Hormonal regulation of the hepatic concentrative nucleoside transporter». *Biochem. J.* [En revisió].
- GÓMEZ-ANGELATS, M.; B. RUIZ-MONTESELL; A. FELIPE; J. J. G. MARÍN; F. J. CASADO; M. PASTOR-ANGLADA (1995a). Effect of protein malnutrition on neutral amino acid transport by rat hepatocytes during development. *Am. J. Physiol.*, núm. 268, pàg. E368-E374.
- GUMÀ, A.; X. TESTAR; M. PALACÍN; A. ZORZANO (1988). «Insulin-stimulated  $\alpha$ -(methyl)-aminoisobutyric acid uptake in skeletal muscle. Evidence of short-term activation of uptake independent of Na<sup>+</sup> electrochemical gradient and protein synthesis». *Biochem. J.*, núm. 253, pàg. 625-629.
- HANDLOTGEN, M. E.; M. S. KILBERG (1982). «Transport system A is not responsive to hormonal stimulation in primary culture of fetal rat hepatocytes». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, núm. 108, pàg. 1113-1118.
- HARVEY, M. E.; N. NELSON (1994). «Transporters». *J. Exp. Biol.*, núm. 196, pàg. 1-491.
- HAYES, M. R.; J. D. MCGIVAN (1983). «Comparison of the effects of certain thiol reagents on alanine transport in plasma membrane vesicles from rat liver and their use in identifying the alanine carrier». *Biochem. J.*, núm. 214, pàg. 489-495.
- HEDIGER, M.; M. J. COADY; T. S. IKEDA; E. M. WRIGHT (1987). «Expression cloning and cDNA sequencing of the Na<sup>+</sup>/glucose co-transporter». *Nature*, núm. 330, pàg. 379-381.
- ISSAD, T.; M. PASTOR-ANGLADA; M. A. BAUDON; J. GIRARD (1988). «Development of insulin sensitivity at weaning in the rat. Role of the nutritional transition». *Biochem. J.*, núm. 251, pàg. 685-690.
- KILBERG, M. S.; E. F. BARBER; M. E. HANDLOTGEN (1985). «Characteristics and hormonal regulation of amino acid transport system A in isolated rat hepatocytes». *Curr. Top. Cell. Regul.*, núm. 25, pàg. 133-163.
- KILBERG, M. S.; D. S. BRACY; M. E. HANDLOTGEN (1986). «Substrate regulation of hepatic system A transport after induction by substrate starvation or glucagon». *Fed. Proc.*, núm. 45, pàg. 2438-2454.
- KILBERG, M. S.; D. H. HÄUSSINGER (1992). «Mammalian amino acid transport». A: Kilberg, M. S.; Häussinger, D. H. *Mechanism and Control*. Nova York: Plenum Press, pàg. 1-318.
- KILBERG, M. S.; R. G. HUTSON; R. O. LAINE (1994). «Amino acid regulated gene expression in eukaryotic cells». *FASEB J.*, núm. 8, pàg. 13-19.
- KINNE, R. K. H. (1993). «The role of organic osmolytes in osmoregulation: from bacteria to mammals». *J. Exp. Zool.*, núm. 265, pàg. 346-355.
- KOCH, C.; H. L. LEFFER (1979). «Increased sodium ion influx is necessary to initiate rat hepatocyte proliferation». *Cell*, núm. 18, pàg. 153-163.
- KOCH, C.; S. YET; J. LEVER (1993). «Cloning and expression of a mammalian Na<sup>+</sup>/amino acid cotransporter with sequence similarity to Na<sup>+</sup>/glucose cotransporters». *J. Biol. Chem.*, núm. 268, pàg. 1509-1512.
- KWON, H. M.; A. YAMAUCHI; S. UCHIDA; A. PRESTON; A. GARCÍA-PÉREZ; M. BURG; J. S. HANDLER (1992). «Cloning of the cDNA for a Na<sup>+</sup>/myo-inositol cotransporter, a hypertonicity stress protein». *J. Biol. Chem.*, núm. 267, pàg. 6297-6301.
- LEFFERT, H. L.; K. S. KOCH; P. J. LAD; I. P. SHAPIRO; H. SKELLY; B. DE HEMPTINNE (1988). «Hepatocyte regeneration, replication, and differentiation». A: Arias, A. I. M.; Jakoby, W. B.; Popper, H.; Schachter, D.; Shafritz, D. A. *The Liver. Biology and Pathobiology*. Nova York: Raven Press, Ltd., pàg. 833-850.
- LEISTER, K. J.; M. A. SCHENERMANN; E. RACKER (1988). «Energetic mechanism of system A. Amino acid transport in normal and transformed mouse fibroblasts». *J. Cell. Physiol.*, núm. 135, pàg. 163-168.
- LEONI, S.; S. SPAGNUOLO; M. MASSIMI; L. CONTI DEVIRGILIS (1990). «Epinephrine regulation of amino acid transport in rat hepatocytes isolated during development». *Membr. Biochem.*, núm. 9, pàg. 117-128.
- LIANG, P.; A. B. PARDEE (1995). «Recent advances in differential display». *Current Opinion Immunol.*, núm. 7, pàg. 274-280.
- LIN, G.; J. I. MCCORMICK; R. M. JOHNSTONE (1994). «Differentiation of two classes of "A" system amino acid transporters». *Arch. Biochem. Biophys.*, núm. 312, pàg. 308-315.
- MACKENZIE, B.; M. PANAYOTOVA-HEIERMANN; D. D. F. LOO; J. E. LEVER; E. M. WRIGHT (1994). «SAAT1 is a

- low affinity Na<sup>+</sup>/Glucose cotransporter and not an amino acid transporter. A reinterpretation». *J. Biol. Chem.*, núm. 269, pàg. 22488-22491.
- MAILLIARD, M. E.; B. R. STEVENS; G. E. MANN (1995). «Amino acid transport by small intestinal, hepatic and pancreatic epithelia». *Gastroenterol.*, núm. 108, pàg. 888-910.
- MARTÍNEZ-MAS, J. V.; F. J. CASADO; J. J. G. MARAÑÓN; M. PASTOR-ANGLADA (1993a). «L-alanine uptake by rat liver parenchymal and haematopoietic cells during the perinatal period». *Biochem. J.*, núm. 293, pàg. 819-824.
- MARTÍNEZ-MAS, J. V.; J. PEINADO-ONSURBE; B. RUIZ-MONTESELLA; A. FELIPE; F. J. CASADO; M. PASTOR-ANGLADA (1995). «Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase expression during the early phase of liver growth after partial hepatectomy». *FEBS Lett.*, núm. 362, pàg. 85-88.
- MARTÍNEZ-MAS, J. V.; B. RUIZ-MONTESELLA; A. FELIPE; F. J. CASADO; M. PASTOR-ANGLADA (1993b). «Up-regulation of system A activity in the regenerating rat liver». *FEBS Lett.*, núm. 329, pàg. 189-193.
- MCCORMICK, J. J.; R. M. JOHNSTONE (1988). «Simple and effective purification of Na<sup>+</sup>-dependent amino acid transport system from Ehrlich ascites cell plasma membrane». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 85, pàg. 7877-7881.
- MCGIVAN, J. D. (1986). «Regulation of amino acid transport in rat hepatocytes». *Biochem. Soc. Trans.*, núm. 14, pàg. 995-999.
- MCGIVAN, J. D.; M. PASTOR-ANGLADA (1994). «Regulatory and molecular aspects of mammalian amino acid transport». *Biochem. J.*, núm. 299, pàg. 321-334.
- MOFFET, J.; E. ENGLSBERG (1984). «Recessive constitutive mutant chinese hamster ovary cells (CHO-K1) with an altered A system for amino acid transport and the mechanism of gene regulation of the A system». *Mol. Cell. Biol.*, núm. 4, pàg. 799-808.
- (1986). «Regulation of the A system of amino acid transport in Chinese hamster ovary cells CHO-K1. The characterization of the apo-repressor-inactivator (apo-ri) and the difference between the apo-ri and the carrier protein». *J. Cell. Physiol.*, núm. 126, pàg. 421-429.
- MOFFET, J.; F. PÉRIER; M. JONES; E. ENGLSBERG (1987). «Control of A-system amino acid transport by a second regulatory gene R2 in Chinese hamster ovary cells CHO-K1 and the possible connection of this gene with insulin activity». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 84, pàg. 8040-8043.
- MOULE, S. K.; J. D. MCGIVAN (1987). «Epidermal growth factor, like glucagon, exerts a short-term stimulation of alanine transport in rat hepatocytes». *Biochem. J.*, núm. 247, pàg. 233-235.
- PALACÍN, M.; WERNER, A.; DITTMER, J.; MURER, H.; BIBER, J. (1990). «Expression of rat liver Na<sup>+</sup>/L-alanine co-transport in *Xenopus laevis* oocytes». *Biochem. J.*, núm. 270, pàg. 189-195.
- PASTOR-ANGLADA, M.; F. J. CASADO; A. FELIPE; M. GÓMEZ-ANGELATS (1995). «Physiological and endocrinological basis of protein metabolism during development. Role of plasma membrane transporters». *Endocrinologia*. [En premsa].
- PASTOR-ANGLADA, M.; X. REMESAR; G. BOURDEL (1987). «Alanine uptake by liver at midpregnancy in rats». *Am. J. Physiol.*, núm. 252, pàg. E408-E413.
- QIAN, N. X.; M. JONES; A. McDONOUGH; E. ENGLSBERG (1989). «A1ar4, a constitutive mutant of the A system for amino acid transport, has increased abundance of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and mRNA for alpha-1 subunit of this enzyme». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 86, pàg. 7984-7988.
- QIAN, N. X.; M. PASTOR-ANGLADA; E. ENGLSBERG (1991). «Evidence for coordinate regulation of the system A for amino acid transport and the mRNA for the alpha-1 subunit of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase gene in Chinese hamster ovary cells». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 88, pàg. 3416-3420.
- ROSENTHAL, N. R.; R. JACOB; E. BARRET (1985). «Diabetes enhances activity of alanine transport in liver plasma membrane vesicles». *Am. J. Physiol.*, núm. 248, pàg. E581-E587.
- RUIZ, B.; A. FELIPE; J. CASADO; M. PASTOR-ANGLADA (1991). «Amino acid uptake by liver of genetically obese Zucker rats». *Biochem. J.*, núm. 280, pàg. 367-372.
- RUIZ-MONTASELL, B.; A. FERRER-MARTÍNEZ; F. J. CASADO; A. FELIPE; M. PASTOR-ANGLADA (1994b). «Coordinate induction of Na<sup>+</sup>-dependent transport systems and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in the liver of obese Zucker rats». *Biochim. Biophys. Acta*, núm. 1196, pàg. 45-50.
- RUIZ-MONTASELL, B.; M. GÓMEZ-ANGELATS; F. J. CASADO; A. FELIPE; J. D. MCGIVAN; M. PASTOR-ANGLADA (1994a). «Evidence for a regulatory protein involved in the increased activity of system A for neutral amino acid transport in osmotically stressed mammalian cells». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 91, pàg. 9569-9573.
- RUIZ-MONTASELL, B.; J. V. MARTÍNEZ-MAS; C. ENRICH; F. J. CASADO; A. FELIPE; M. PASTOR-ANGLADA (1993). «Early induction of Na<sup>+</sup>-dependent uridine uptake in the regenerating rat liver». *FEBS Lett.*, núm. 316, pàg. 85-88.
- SCHENERMANN, M. A.; K. J. LEISTER; D. K. TRACHTENBERG; E. RACKER (1988). «Induction of system A amino acid transport through long-term treatment with ouabain: correlation with increased (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase activity». *J. Cell. Physiol.*, núm. 135, pàg. 157-162.
- SHAY, N. F.; H. S. NICK; M. S. KILBERG (1990). «Molecular cloning of an amino acid-regulated mRNA (amino acid starvation-induced) in rat hepatoma cells». *J. Biol. Chem.*, núm. 265, pàg. 17844-18848.

- SOLER, C.; A. FELIPE; F. J. CASADO; J. D. MCGIVAN; M. PASTOR-ANGLADA (1993). «Hyperosmolarity leads to an increase in derepressed system A activity in the renal epithelial cell line NBL-1». *Biochem. J.*, núm. 289, pàg. 653-658.
- TAKENAKA, M.; A. S. PRESTON; H. M. KWON; J. S. HANDLER (1994). «The tonicity-sensitive element that mediates increased transcription of the betaine transporter gene in response to hypertonic stress». *J. Biol. Chem.*, núm. 269, pàg. 29379-29381.
- TARNUZZER, R. W.; M. J. CAMPA; N. X. QIAN; E. ENGLERBERG; M. S. KILBERG (1990). «Expression of the mammalian system A neutral amino acid transporter in *Xenopus oocytes*». *J. Biol. Chem.*, núm. 265, pàg. 13914-13917.
- UCHIDA, S.; A. YAMAUCHI; A. S. PRESTON; H. M. KWON; J. S. HANDLER (1993). «Medium tonicity regulates expression of the Na<sup>+</sup>-dependent and Cl<sup>-</sup>-dependent betaine transporter in Madin-Darby Canine Kidney cells». *J. Clin. Invest.*, núm. 91, pàg. 1604-1607.
- VEHYL, M.; J. SPANGENBERG; B. PÜSCHEL; R. POPPE; C. DEKEL; G. FRITZSCH; W. HAASE; H. KOEPESELL (1993). «Cloning of a membrane-associated protein which modifies activity and properties of the Na<sup>+</sup>-D-glucose cotransporter». *J. Biol. Chem.*, núm. 268, pàg. 25041-25053.
- WANG, W.; H. SACKIN; G. GIEBISCH (1992). «Renal potassium channels and their regulation». *Annu. Rev. Physiol.*, núm. 54, pàg. 81-96.
- YAMAUCHI, A.; S. UCHIDA; H. M. KWON; A. S. PRESTON; R. B. ROBAY; A. GARCIA-PÉREZ; M. B. BURG; J. S. HANDLER (1992). «Cloning of a Na- and Cl-dependent betaine transporter that is regulated by hypertonicity». *J. Biol. Chem.*, núm. 267, pàg. 649-652.
- YAMAUCHI, A.; S. UCHIDA; A. S. PRESTON; H. M. KWON; J. S. HANDLER (1993). «Hypertonicity stimulates transcription of gene for Na<sup>+</sup>-myo-inositol cotransport in MDCK cells». *Am. J. Physiol.*, núm. 264, pàg. F20-F23.
- ZORZANO, A.; M. CAMPS; A. CASTELÓ; A. GUMÀ; P. KALIMAN; S. MORA; P. MUÑOZ; M. PALACÍN; T. SANTALUCIA; X. TESTAR; F. VIÑALS (1995). «Biologia dels transportadors de glucosa de difusió facilitada. Redistribució cel·lular de transportadors de glucosa en resposta a hormones». *Treb. Soc. Cat. Biol.*, núm. 45, pàg. 7-30.