



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

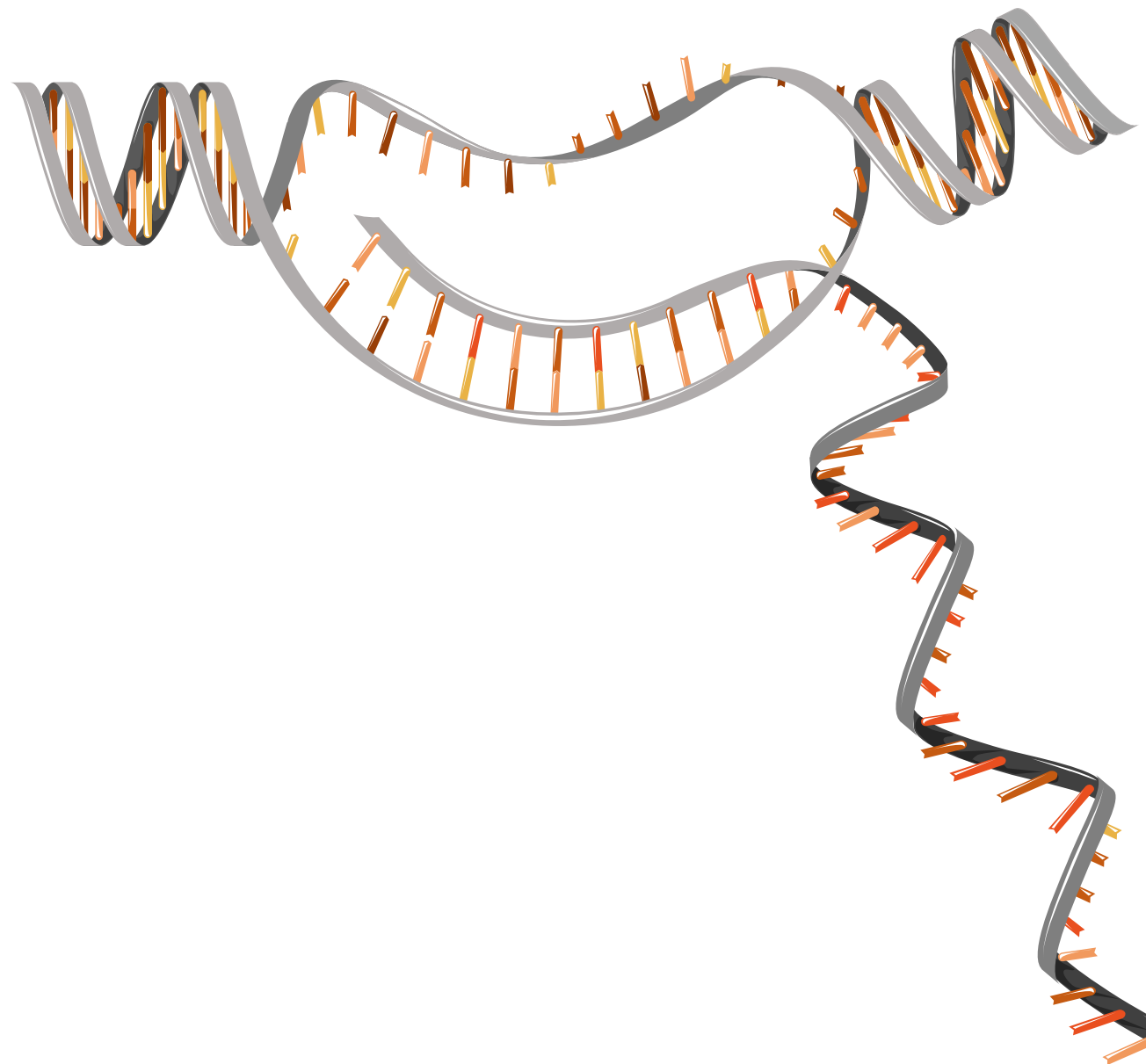
Implicacions fisiopatològiques de l'alteració del transportador concentratiu de nucleòsids hCNT1

Aida Mata i Ventosa

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Aida Mata i Ventosa

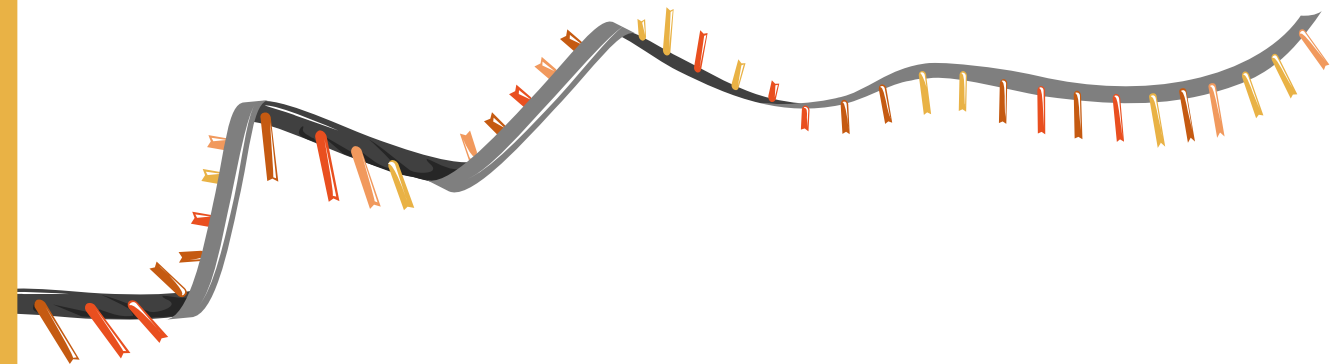
Implicacions fisiopatològiques de l'alteració del transportador concentratiu de nucleòsids hCNT1

T C U A G

2019

2019

Implicacions fisiopatològiques de l'alteració del transportador concentratiu de nucleòsids hCNT1



Aida Mata i Ventosa

Tesi doctoral



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOMEDICINA MOLECULAR
FACULTAT DE BIOLOGIA
UNIVERSITAT DE BARCELONA

**Implicacions fisiopatològiques de
l'alteració del transportador concentratiu
de nucleòsids hCNT1**

Aida Mata i Ventosa

2019

MEMÒRIA PER OPTAR AL GRAU DE DOCTORA PER LA UNIVERSITAT DE BARCELONA

PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOMEDICINA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOMEDICINA MOLECULAR
FACULTAT DE BIOLOGIA
UNIVERSITAT DE BARCELONA

Implicacions fisiopatològiques de l'alteració del transportador concentratiu de nucleòsids hCNT1

Memòria presentada per
Aida Mata i Ventosa

La interessada,

Vist-i-plau dels directors,

Dr. Marçal Pastor Anglada
Catedràtic de Bioquímica i Biologia
Molecular
Departament de Bioquímica i Biomedicina
Molecular
Universitat de Barcelona

Dra. Sandra Pérez Torras
Investigadora CIBERehd
Professora Associada
Departament de Bioquímica i Biomedicina
Molecular
Universitat de Barcelona

ABSTRACT

Nucleoside transporters are divided in two gene families: *SLC28*, encoding the Concentrative Nucleoside Transporters (hCNT), and *SLC29*, encoding the Equilibrative Nucleoside Transporters (hENT). These proteins are expressed in most cell types, with apparent functional redundancy. It has been described that hCNTs expression, especially hCNT1, is downregulated in cancer. hCNT1 restoration in pancreatic cancer models altered signaling pathways, reduced cell migration and cell cycle progression, and induced non-apoptotic cell death, in a substrate translocation-independent manner. Thus, hCNT1 is considered a transceptor. Here we aim to elucidate what mechanisms regulate hCNT1 activity and *SLC28A1* expression. A clinical case was presented with uridine-cytidineuria, fever, hepatosplenomegaly, persistent lactate acidosis, severely disturbed liver enzymes and ultimately multiorgan failure. Genetic analysis revealed two variants in *SLC28A1* (hCNT1), c.1528C>T (p.R510C) and c1682G>A (p.R561Q). Functional analysis showed that these variants affected the three-dimensional structure of hCNT1, altered glycosylation and decreased the half-life of the mutant proteins which resulted in impaired transport activity. Co-transfection of both variants, mimicking the allelic trans disposition in the patient, significantly impaired hCNT1 biological function. The patient was also suffering from Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis type 2. The identification of two co-existing monogenic defects might have resulted in a blended phenotype. Further analysis of hCNT1 protein revealed RNF41 as an interactor protein. We hypothesized that RNF41 being an E3 ligase was targeting hCNT1 for proteasomal degradation. However, we also proposed that the interaction could also be related to other functions, such as hCNT1 recycling. Studies with the epigenetic drug SAHA revealed that acetylated lysins are involved in hCNT1 expression for the first time. We also identified the *SLC28A1* promoter, which presents different activity depending on the cellular context. A 400bp fragment 1695bp downstream of the transcription start site (TSS) exhibits the highest activity, especially in liver-derived tumoral cell lines. Analysis of the transcription factor putative binding sites revealed STAT3, YY1, KLF6, p53 and E2F1 as candidates for *SLC28A1* expression regulation. p53 status of the cell lines conditions *SLC28A1* promoter activity. KLF6 was found to bind 470bp upstream to *SLC28A1* TSS. The CDK4-pRb-E2F1 axis modulates nucleoside transporters expression through E2F1, which binds to both *SLC28A1* and *SLC29A1* promoters, exerting repressive effects.

ÍNDEX

LLISTAT D'ACRÒNIMS	1
LLISTAT DE TAULES	3
LLISTAT DE FIGURES.....	4
INTRODUCCIÓ	9
1. Nucleòsids.....	11
2. Transportadors de nucleòsids	15
2.1 Transportadors concentratius de nucleòsids (hCNTs)	15
2.2 Transportadors equilibratius de nucleòsids (hENTs)	19
2.3 Característiques dels NT a nivell genètic.....	21
2.4 Regulació dels NT a nivell proteic.....	28
2.5 Distribució cel·lular i tissular dels NT	31
3. Associació dels transportadors de nucleòsids a la patologia	36
3.1 Paper farmacològic dels transportadors de nucleòsids: anàlegs de nucleòsids	36
3.2 Transportadors de nucleòsids directament associats a fenotips patològics	38
4. Funcions emergents dels transportadors de nucleòsids	40
OBJECTIUS.....	43
MATERIALS I MÈTODES	47
1. PCR i tècniques derivades	49
1.1 Introducció de dianes de restricció	50
1.2 PCR de mutagènesi dirigida.....	51
1.3 Seqüenciació	52
2. Biologia molecular	54
2.1 Clonació en un vector.....	54
2.2 Transformació de bacteris competents	57
2.3 Obtenció de DNA plasmídic de bacteris competents.....	59
2.4 Gels d'agarosa	59
3. Cultius cel·lulars	60
3.1 Línies cel·lulars	61
3.2 Manteniment	61
3.3 Tractaments amb fàrmacs.....	63

3.4	Assajos de viabilitat cel·lular	64
3.5	Expressió heteròloga de proteïnes.....	64
3.6	Silenciament de proteïnes.....	66
4.	Anàlisi de l'expressió de RNA	66
4.1	Extracció d'RNA	66
4.2	Síntesi de cDNA	67
4.3	Real Time PCR.....	67
4.4	<i>Real Time</i> PCR absoluta	68
5.	Anàlisi de l'expressió de proteïnes	69
5.1	Obtenció d'extractes proteics totals a partir de cultius cel·lulars	69
5.2	Valoració de la concentració proteica.....	70
5.3	Anàlisi de proteïnes mitjançant western blot	70
5.4	Immunoprecipitació i co-immunoprecipitació.....	73
6.	Transport de nucleòsids	74
6.1	Medis i reactius	74
6.2	Cèl·lules en monocapa	75
6.3	Inhibicions creuades.....	76
6.4	Valoració de proteïna pel mètode BCA.....	76
6.5	Càlculs d'activitat específica.....	76
7.	Estudi funcional del promotor	77
7.1	Assaig luciferasa	77
7.2	Immunoprecipitació de cromatina (ChIP)	78
8.	Localització subcel·lular de proteïnes fluorescents.....	80
9.	Perfil de cycle cel·lular	80
10.	Estadística	81

RESULTATS I DISCUSSIÓ.....83

BLOC 1: CARACTERITZACIÓ DE LA PROTEÏNA hCNT1..... 85

1.	Estudi del primer cas clínic associat a hCNT1	85
1.1	Cas clínic	85
1.2	Anàlisi genètica del pacient.....	86
1.3	Estudi funcional de les variants d'hCNT1	88
1.4	Detecció d'altres variants implicades en el cas clínic.....	102
2.	L'interactoma d'hCNT1 com a element regulador	105
2.1	Domini N-terminal d'hCNT1	105

2.2	Regulació d'hCNT1 per RNF41.....	106
BLOC 2: ESTUDI DE LA REGULACIÓ DE L'EXPRESSION DE LES FAMÍLIES SLC28 I SLC29		119
3.	Regulació epigenètica de les famílies SLC28 i SLC29	119
3.1	Introducció	119
3.2	Fàrmacs epigenètics.....	121
3.3	Modulació de l'expressió dels gens de les famílies SLC28 i SLC29 per SAHA.....	123
3.4	Modulació de l'activitat de les proteïnes hCNT per SAHA	129
4.	Regulació transcripcional d'SLC28A1 i SLC28A2	139
4.1	Determinació de la regió promotora dels gens SLC28A1 i SLC28A2	139
4.2	Modulació de l'expressió del gen SLC28A1 per factors de transcripció	148
5.	Paper d'E2F1 en la regulació dels transportadors de nucleòsids	170
5.1	Introducció	170
5.2	Antecedents: l'eix CDK4-pRb-E2F1 en el metabolisme.....	172
5.3	Modulació de l'expressió dels transportadors de nucleòsids per abemaciclib	176
5.4	E2F1 com a regulador dels transportadors de nucleòsids	183
DISCUSSIÓ GENERAL.....		193
CONCLUSIONS		203
BIBLIOGRAFIA		207
ANNEX		251

LLISTAT D'ACRÒNIMS

ABM	Abemaciclib
Ac-K	Lisines acetilades
AMPK	Proteïna quinasa activada per AMP
ATP	Adenosina Trifosfat
CDK	Quinasa dependent de ciclina
cDNA	<i>Complementary Deoxyribonucleic Acid</i>
CDS	<i>Coding sequence</i>
ChIP	<i>Chromatin Immunoprecipitation</i>
CHX	Cicloheximida
CNT	<i>Concentrative Nucleoside Transporter</i>
Dip	Dipiridamol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	Desoxinucleòtid Trifosfat
dpm	Desintegracions per minut
DR5	<i>Death Receptor 5</i>
ENT	<i>Equilibrative Nucleoside Transporter</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FW	<i>Forward</i>
GEM	Gemcitabina
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
H3K4me3	Trimetilació de la lisina 4 de la histona 3
HCQ	Hidroxicloroquina sulfat
HDAC	Histona Desacetilasa
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
Kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
KM	Constant Michaelis-Menten
LC3B	Cadena lleugera 3B
MCS	<i>MultiCloning Site</i>

mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
MYTH	<i>Membrane Yeast Two-Hybrid</i>
NT	<i>Nucleoside Transporter</i>
OCT	<i>Organic Cation Transporter</i>
p/v	pes/volum
Pb	Parells de bases
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pRb	Proteïna de retinoblastoma fosforilada
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNF41	<i>RING Finger Protein 41</i>
rpm	Revolucions per minut
RT-PCR	<i>Real-Time PCR</i>
RV	<i>Reverse</i>
SAHA	<i>Suberanilohydroxamic acid (Vorinostat)</i>
SD	Desviació estàndard
SDS	<i>Sodium Dodecil Sulfate</i>
SEM	Error estàndard de la mitjana
SLC	<i>Solute carrier</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SV	Variant d' <i>splicing</i>
TM	Transmembrana
TMD	Domini Transmembrana
TNM	Tunicamicina
TSS	<i>Transcription Start Site</i>
U	Unitats d'enzim
Ub	Ubiquitina
WGA	<i>Wheat Germ Agglutinin</i>
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i>
WT	<i>Wild Type</i>

LLISTAT DE TAULES

Taula 1. Transportadors concentratius de nucleòsids, els seus substrats i les seves constants d'afinitat aparents.....	15
Taula 2. Transportadors equilibratius de nucleòsids, els seus substrats i les seves constants d'afinitat aparents.....	20
Taula 3. Variants SNP descrites dels gens que codifiquen els transportadors de nucleòsids.....	23
Taula 4. Anàlegs de nucleòsids emprats per tractaments antitumorals.....	37
Taula 5. Anàlegs de nucleòsids emprats com a tractaments antivirals	38
Taula 6. Primers dissenyats per a la clonació dels fragments de promotor putatiu de <i>SLC28A1</i> , promotor putatiu de <i>SLC28A2</i> , de factors de transcripció i de RNF41..	50
Taula 7. Primers dissenyats per a la generació de constructes luciferasa amb fragments delecionats, les variants d'splicing de KLF6, les variants d'hCNT1 i mutacions d'hCNT1K19	51
Taula 8. Primers dissenyats per a la seqüenciació dels clons indicats.....	53
Taula 9. Descripció de les línies cel·lulars emprades en aquesta tesi.....	62
Taula 10. Condicions de transfecció amb fosfat calci.	65
Taula 11. Condicions de transfecció amb Lipofectamina 2000.....	66
Taula 12. Sondes Taqman emprades en aquesta tesi doctoral	69
Taula 13. Anticossos emprats.	73
Taula 14. Anticossos emprats per a immunoprecipitar a assaig CHIP	79
Taula 15. Primers dissenyats per a la detecció dels fragments de promotor d'interès.....	79
Taula 16. Valors d'uridina i citidina a orina i plasma del pacient.....	86
Taula 17. Variants del gen <i>SLC28A1</i> trobades al pacient.	88
Taula 18. Modificacions post-traduccionals predites per a la seqüència proteica d'hCNT1	96
Taula 19. Alguns exemples de fàrmacs epigenètics emprats en clínica o en vies d'aprovació.	122
Taula 20. Valors IC ₂₀ i IC ₅₀ del tractament amb SAHA de les línies cel·lulars indicades.	124
Taula 21. Estat del gen TP53 i la repercussió a nivell proteic en les línies cel·lulars indicades	164

LLISTAT DE FIGURES

Figura 1. Esquemes representatius del metabolisme de purines en cèl·lules de mamífer	12
Figura 2. Representació esquemàtica del metabolisme de pirimidines	13
Figura 3. Esquema representatiu dels transportadors concentratius de nucleòsids (CNT) en humans.....	16
Figura 4. Estructura predita dels transportadors concentratius de nucleòsids per homologia amb vcCNT.....	17
Figura 5. Esquema representatiu dels transportadors equilibratius de nucleòsids (ENT) 1 i 2 en humans.....	19
Figura 6. Estructura del transportador equilibratiu de nucleòsids hENT1.....	21
Figura 7. Representació esquemàtica de la localització subcel·lular d'hCNT1, hCNT2, hCNT3, hENT1 i hENT2.....	33
Figura 8. Expressió d'mRNA d' <i>SLC28A1</i> , <i>SLC28A2</i> , <i>SLC28A3</i> , <i>SLC29A1</i> i <i>SLC29A2</i> al llarg del tracte gastrointestinal	34
Figura 9. Esquema representatiu de la comparativa entre transportador i transceptor	42
Figura 10. Esquema representatiu del Multicloning site del vector pcDNA3.1	54
Figura 11. Esquema representatiu del vector de pGL3-basic	55
Figura 12. Esquema de la construcció del minigen del locus proper a l'exó 3 del gen <i>SLC28A1</i>	88
Figura 13. Modelatge per homologia d'hCNT1 per tal de determinar canvis en el patró d'interacció dels residus R510 i R561 d'hCNT1.....	89
Figura 14. Les variants R510C i R561Q modifiquen l'activitat i expressió d'hCNT1 comparat amb el WT	91
Figura 15. La localització d'hCNT1 a la membrana plasmàtica es veu reduïda per a les variants R510C i R561Q.....	92
Figura 16. El recanvi proteic de les variants d'hCNT1 presenta alteracions.....	94
Figura 17. La degradació d'hCNT1 podria estar relacionada amb el proteasoma.....	95
Figura 18. Eliminació dels residus glucídics units per un enllaç N a les proteïnes mitjançant PNGasaF	97
Figura 19. La forma madura de la proteïna hCNT1 és glicosilada.....	98
Figura 20. La glicosilació és determinant per a l'activitat d'hCNT1	99
Figura 21. Confirmació que les variants rs2242047 i rs149246522 es troben en trans.....	100
Figura 22. La disposició al·lèlica de les variants condiona l'activitat hCNT1	101
Figura 23. Modelatge per homologia del complex d'hCNT1 en forma de trímer.....	102
Figura 24. Co-immunoprecipitació d'hCNT1 amb myc-RNF41.....	106

Figura 25. La modulació de l'expressió d'RNF41 produeix canvis en l'activitat d'hCNT1	108
Figura 26. La inhibició del proteasoma interfereix en l'expressió d'hCNT1.....	109
Figura 27. RNF41 també modula l'activitat d'hCNT1 en un sistema HEK293 de transfecció transitòria.....	110
Figura 28. Mutants de K19	110
Figura 29. L'expressió d'hCNT1K19R no varia per modulació de l'expressió d'RNF41	111
Figura 30. La inhibició del proteasoma amb MG-132 també indueix canvis d'expressió d'hCNT1K19R.....	111
Figura 31. No es detecten diferències d'ubiquïtinització entre hCNT1 i K19R	112
Figura 32. La detecció d'ubiquïtines després d'immunoprecipitar hCNT1 és inespecífica.....	113
Figura 33. La sobreexpressió d'RNF41 sembla afectar la vida mitjana d'hCNT1	115
Figura 34. Esquema representatiu del mecanisme d'acció de SAHA.....	122
Figura 35. Corbes dosi-resposta del tractament amb SAHA a les línies HT-29, CaCo-2, EGI-1, TFK-1 i BCLC-12.....	123
Figura 36. El tractament amb SAHA incrementa la quantitat de lisines acetilades (Ac-K) a totes les línies cel·lulars testades	125
Figura 37. SAHA modula l'expressió dels transportadors concentratius de nucleòsids	126
Figura 38. Els tractaments amb SAHA a HT-29 durant temps més llargs no incrementa l'expressió dels transportadors concentratius de nucleòsids	127
Figura 39. La modulació de l'expressió dels transportadors concentratius de nucleòsids pel tractament de SAHA en línies derivades de colangiocarcinoma depèn principalment de la línia tractada	127
Figura 40. Els transportadors equilibratius de nucleòsids no són modulats pel tractament amb SAHA.....	129
Figura 41. La detecció d'hCNT1 endogen no permet identificar si hi ha canvis després del tractament amb SAHA.....	130
Figura 42. Modulació de l'activitat de transport concentratiu de nucleòsids a HT-29.....	132
Figura 43. SAHA incrementa la internalització de citidina mitjançant transportadors concentratius de nucleòsids a CP15T.....	133
Figura 44. La citotoxicitat de gemcitabina no es veu incrementada per acció d'un pre-tractament amb SAHA.....	134
Figura 45. SAHA no augmenta el potencial citotòxic de la gemcitabina.....	135
Figura 46. L'expressió de l'enzim dCK sembla disminuir en resposta al tractament amb SAHA	136

Figura 47. La internalització d'uridina a través dels transportadors equilibratius de nucleòsids és disminuïda per acció del tractament amb SAHA	138
Figura 48. Esquema representatiu del locus del gen <i>SLC28A1</i> i construccions del promotor putatiu clonades.....	141
Figura 49. Les construccions dissenyades pel promotor putatiu d' <i>SLC28A1</i> no presenten activitat luciferasa	141
Figura 50. L'activitat de les construccions del promotor d' <i>SLC28A1</i> depèn del background cel·lular.....	142
Figura 51. Esquema de les noves construccions clonades del promotor putatiu d' <i>SLC28A1</i> ...	143
Figura 52. Activitat promotora dels fragments 10 i 11 a les línies HT-29, CP15T, Huh7 i HepG2	144
Figura 53. Les construccions 12 i <i>down</i> són les que presenten major activitat promotora, tot i que difereixen entre línies cel·lulars	145
Figura 54. Esquema representatiu del locus del gen <i>SLC28A2</i> i construccions del promotor putatiu clonades.....	146
Figura 55. Les construccions del promotor putatiu d' <i>SLC28A2</i> presenten activitat alta a HT-29 i Huh7, i menor a HepG2.....	147
Figura 56. Esquema representatiu del promotor d' <i>SLC28A1</i> i els llocs d'unió putatius als factors de transcripció indicats	148
Figura 57. Els factors de transcripció ING4, Ikaros, HNF1 α i HNF1 β no modulen l'expressió d'hCNT1 a les línies cel·lulars testades	149
Figura 58. Esquema representatiu dels llocs d'unió putatius als factors de transcripció indicats al promotor d' <i>SLC28A1</i>	150
Figura 59. Expressió dels diferents factors de transcripció a les diferents línies cel·lulars emprades en aquest apartat.....	151
Figura 60. Corbes de supervivència al llarg del temps en càncer de fetge i d'endometri segons si l'expressió de YY1 és baixa (blau) o alta (rosa)	152
Figura 61. Les delecions dels llocs d'unió putatius per a YY1 van suggerir que té un paper activador i no repressor	153
Figura 62. Estructura gènica de KLF6 i les seves variants d' <i>splicing</i>	154
Figura 63. Correlació d'expressió gènica entre <i>SLC28A1</i> i KLF6 en mostres de carcinoma de cèl·lules renals.....	155
Figura 64. Caracterització de l'expressió de KLF6 a diferents línies cel·lulars d'origen tumoral	155

Figura 65. L'expressió heteròloga de KLF6 produeix una tendència a incrementar l'expressió d'hCNT1 a les línies cel·lulars testades	156
Figura 66. Les variants d'splicing KLF6-SV1 i KLF6-SV2 no modulen l'expressió d'hCNT1	157
Figura 67. La transfecció de KLF6 no modula hCNT1 a nivell proteic	158
Figura 68. KLF6 indueix una tendència a augmentar el transport concentratiu de citidina	158
Figura 69. KLF6 mostra tendència a augmentar l'activitat del fragment <i>down</i> del promotor d' <i>SLC28A1</i>	159
Figura 70. La immunoprecipitació de cromatina confirma la unió de KLF6 al promotor d' <i>SLC28A1</i> , a Huh7	160
Figura 71. L'estatus de p53 a les línies cel·lulars condiona l'activitat del promotor d' <i>SLC28A1</i>	163
Figura 72. L'expressió de p53 a Saos2 sembla revertir la repressió de la construcció 4 i augmentar l'activitat del fragment <i>down</i>	164
Figura 73. La modulació de p53 varia l'expressió d'hCNT1 segons la línia cel·lular	165
Figura 74. El silenciament de p53 indueix una disminució de l'expressió d'E2F1 a Huh7	167
Figura 75. L'assaig d'immunoprecipitació de la cromatina contra el residu H3K4me3 demostra que les NP-29 presenten aquesta senyal prop del TSS d' <i>SLC28A1</i>	168
Figura 76. Funcions principals d'E2F1 en teixits metabòlics	173
Figura 77. La sobreexpressió d'E2F1 no modula l'expressió del transportador concentratiu de nucleòsids hCNT2	175
Figura 78. La sobreexpressió d'E2F1 no modula l'expressió del transportador equilibratiu de nucleòsids hENT1	176
Figura 79. Abemaciclib	177
Figura 80. El tractament amb abemaciclib produeix canvis en les proteïnes de l'eix CDK4-pRb-E2F1.....	178
Figura 81. El tractament amb abemaciclib produeix acumulació de les cèl·lules en fase G ₁ ...	179
Figura 82. Abemaciclib modula l'expressió dels transportadors de nucleòsids hCNT1, hCNT2 i hENT1 en diferents línies cel·lulars	179
Figura 83. El tractament amb abemaciclib sembla modular l'expressió dels transportadors hCNT1 i hCNT2 a les 48 hores de tractament	180
Figura 84. No es detecten canvis a nivell de proteïna dels transportadors hCNT1 i hENT1 en condicions de tractament amb abemaciclib	181
Figura 85. El tractament amb abemaciclib mostra una tendència a disminuir el transport dels hCNTs i dels hENTs a Huh7.....	182
Figura 86. La sobreexpressió d'E2F1 disminueix l'expressió d'hCNT1 a la línia Huh7	184

Figura 87. El silenciament d'E2F1 modula l'expressió d'hCNT1, hCNT2 i hENT1.....	184
Figura 88. El silenciament d'E2F1 exerceix una modulació molt subtil de l'expressió dels transportadors hCNT1 i hENT1 a nivell proteic.....	186
Figura 89. Esquema representatiu dels promotors dels gens <i>SLC28A1</i> , <i>SLC28A2</i> i <i>SLC29A1</i> ...	187
Figura 90. La sobreexpressió d'E2F1 redueix l'activitat de les construccions dels promotors d' <i>SLC28A1</i> i <i>SLC28A2</i>	188
Figura 91. E2F1 s'uneix als promotors d' <i>SLC29A1</i> i <i>SLC28A1</i>	189
Figura 92. Model de regulació de l'expressió d'hCNT1.....	202

INTRODUCCIÓ

1. Nucleòsids

Els àcids nucleics comprenen una de les quatre grans famílies de biomolècules, juntament amb els lípids, els glúcids i les proteïnes. Els àcids nucleics estan compostos per una sèrie de monòmers, els nucleòtids, units entre si mitjançant enllaços fosfodièster. Al seu torn, els nucleòtids estan formats per una pentosa, una base nitrogenada i almenys un grup fosfat; si presenten més d'un grup fosfat, passen a anomenar-se nucleòtids di- o tri-fosfat. En referència als altres dos components del monòmer, en primer lloc tenim la pentosa: en funció del tipus d'àcid nucleic pot ser una ribosa (per RNA) o la seva forma reduïda, 2-desoxiribosa (per DNA). Per altra banda, les bases nitrogenades es divideixen en dos grans grups segons la naturalesa de l'anell aromàtic: les purines (adenina i guanina) i les pirimidines (timina, uracil i citosina). La unió d'una base nitrogenada i una ribosa, en absència de grup fosfat, s'anomena nucleòsid.

Els nucleòtids i nucleòsids intervenen en un gran nombre de processos cel·lulars. La seva funció probablement més evident és formar el DNA i l'RNA en totes les seves formes. Quan es troben en forma de nucleòtid trifosfat, sobretot ATP però també UTP, GTP i CTP, actuen com a font d'energia química gràcies a la hidròlisi dels enllaços fosfat, aprofitada per a reaccions diverses en l'àmbit cel·lular. Per altra banda, l'adenosina és part estructural de cofactors cel·lulars com el NAD⁺, el FAD o el Coenzim A; la seva presència no està relacionada amb l'activitat dels cofactors però és imprescindible per a què es pugui dur a terme. Algunes formes cícliques de nucleòtids, com cAMP i cGMP, actuen com a segons missatgers cel·lulars, generalment de senyals hormonals que rep la cèl·lula. Per últim, també poden formar part d'intermediaris biosintètics; per exemple, la UDP-glucosa és una forma activada de la glucosa reconeguda per les glucosiltransferases (Connolly and Duley 1999).

Els nucleòsids i nucleòtids es poden obtenir a través de dues rutes molt diferents. Per un cantó hi ha el que s'anomena síntesi *de novo* de nucleòsids i nucleòtids, molt conservada al llarg de l'evolució. Consisteix en un conjunt de reaccions que permeten la construcció de nucleòtids a partir de precursors de baix pes molecular, que són la ribosa 5-fosfat, HCO₃⁻ i NH₃ provinent d'aminoàcids. Les purines i les pirimidines segueixen vies metabòliques diferents. Tant és així, que en el cas de les purines l'anell aromàtic se sintetitza a partir de la ribosa activada provinent de la via de les pentoses fosfat, obtenint com a producte final la inosina monofosfat (IMP) (Figura 1). En canvi, referent a les pirimidines, primer se sintetitza la base pas a pas, i finalment s'uneix la pentosa fosforilada (Figura 2), sent la uridina monofosfat (UMP) el producte final (revisat a Buj and Aird 2018). Una diferència important entre les vies d'ambdós tipus de nucleòsids és que la síntesi *de novo* de pirimidines està físicament acoblada a mitocondri, ja que l'enzim

dihidroorotat deshidrogenasa (DHODH) està localitzat a la membrana mitocondrial interna. Tanmateix, a nivell funcional ambdues vies depenen d'aquest orgànel cel·lular, ja que els folats intermediaris per a la síntesi de purines són generats al mitocondri. A partir d'IMP i UMP s'obtenen els altres nucleòtids purínics o pirimidínics respectivament, així com els desoxinucleòtids mitjançant l'enzim ribonucleòtid reductasa (RNR) (Fairman et al. 2011).

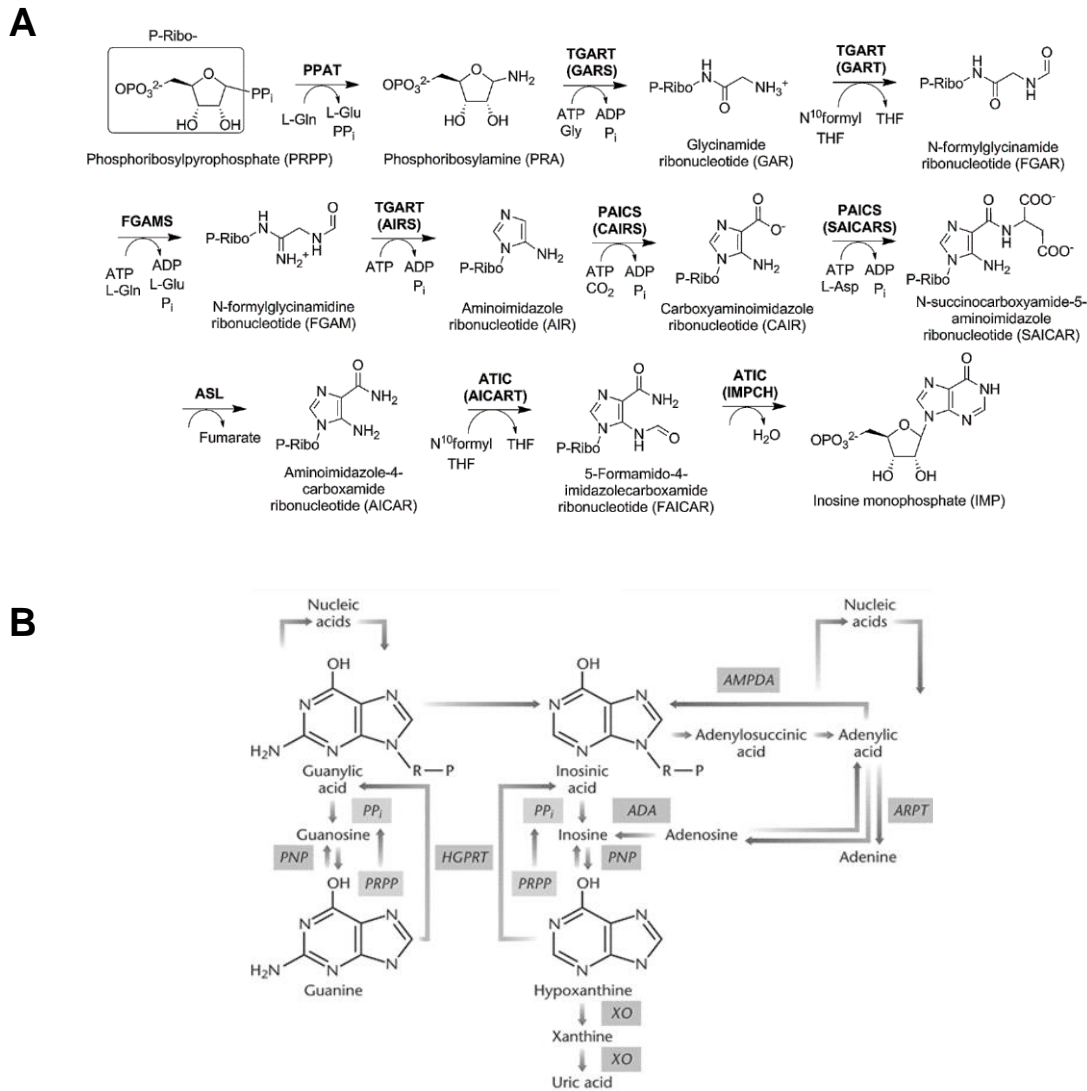


Figura 1. Esquemes representatius del metabolisme de purines en cèl·lules de mamífer. (A) Síntesi *de novo* de purines (French et al. 2013). (B) Reciclatge i degradació de purines (Nyhan 2014).

Tanmateix, no tots els teixits poden dur a terme la síntesi *de novo* de nucleòtids – com ara eritròcits, algunes cèl·lules cerebrals, múscul, leucòcits i moll de l'os (Young et al. 2013). A més, es tracta d'un procés molt costós a nivell energètic. Així doncs, com a segon mecanisme d'obtenció de nucleòtids i nucleòsids hi ha les vies de recuperació (*salvage pathways*). Aquestes rutes s'anomenen així perquè suposen una via de reciclatge: a partir de les bases nitrogenades lliures i de nucleòsids, ja provinquin de la dieta o de la degradació d'àcids nucleics, es formen

nucleòtids de nou (Lane and Fan 2015). Per tant, en aquest cas la ribosa activada s'unirà a la nucleobase reciclada per formar un nucleòtid monofosfat. Les vies de recuperació també difereixen entre purines i pirimidines. En cas de les purines, hi participen dos enzims: hipoxantina-guanosina fosforibosil transferasa (HGPRT) i adenina fosforibosil transferasa (APRT) (Figura 1). En canvi, en el reciclatge de pirimidines hi participa principalment un enzim, uracil fosforibosil pirofosfat (UPRT) (Figura 2) (Buj and Aird 2018).

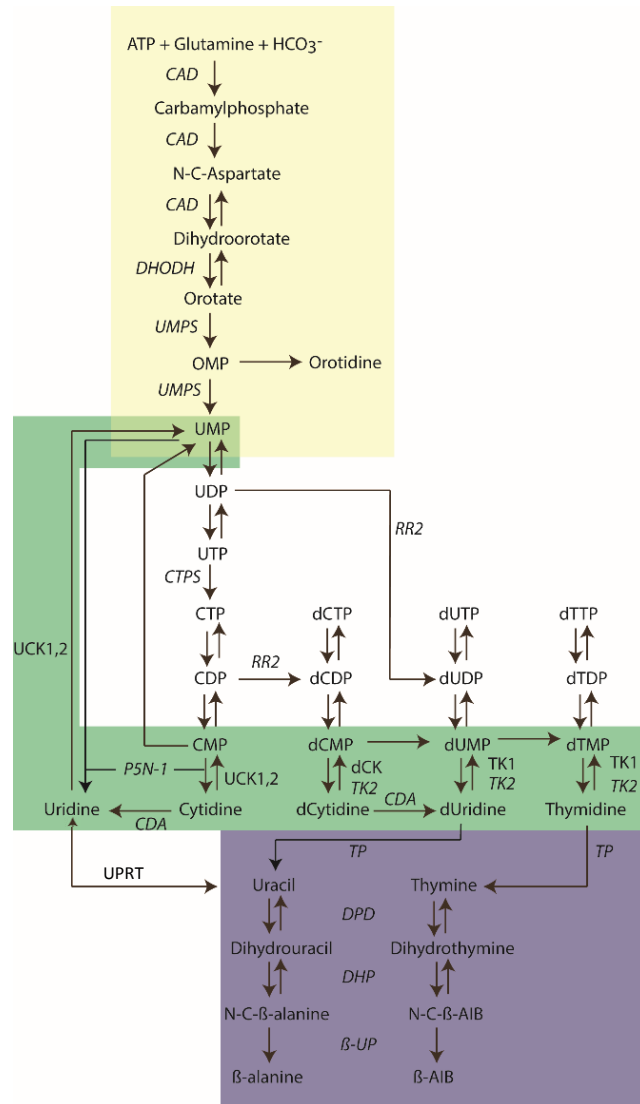


Figura 2. Representació esquemàtica del metabolisme de pirimidines. La síntesi de novo està indicada en groc, la via de reciclatge en verd i la degradació en lila. En cursiva s'indiquen els enzims relacionats amb errors congènits del metabolisme de pirimidines. CAD, Carbamoil-fosfat sintasa, Aspartat transcarbamilasa, Dihydroorotasa; CDA, citidina deaminasa; CTPS, CTP sintasa; dCK, desoxicitidina quinasa; DPD, dihidropirimidina deshidrogenasa; DHODH, dihydroorotat deshidrogenasa; DHP, dihidropirimidinas; N-C-β-alanina, N-carbamil-β-alanina; N-C-β-AIB, àcid N-carbamil-β-aminoisobutíric; P5N-1, Pirimidina 5'-nucleotidasa tipus-I; TK1, Timidina quinasa 1; TK2, Timidina quinasa 2; TP, Timidina fosforilasa; RR2, ribonucleòtid reductasa 2; UCK1,2, uridina-citidina quinasa 1,2; UMPS, UMP sintasa; β-UP, β-ureidopropionasa; β-AIB, β-aminoisobutirat. Pérez-Torras et al. 2019.

Sovint, quan es parla de recuperació de nucleòsids, no es té en compte un fet de vital rellevància, que és l'entrada dels nucleòsids i nucleobases a les cèl·lules. El caràcter hidrofílic d'aquestes molècules fa que la difusió passiva a través de la membrana plasmàtica, d'alt caràcter hidrofòbic, sigui molt reduïda. Els transportadors de nucleòsids (NT, de l'anglès *Nucleoside Transporters*) són proteïnes integrals de membrana que faciliten l'entrada de nucleòsids i nucleobases a la cèl·lula (Molina-Arcas et al. 2009). Es classifiquen en dues grans famílies gèniques. La família gènica *SLC28* consta de tres membres, i regula l'entrada unidireccional de nucleòsids a l'interior de la cèl·lula de manera dependent de sodi i amb alta afinitat. Per altra banda, la família gènica *SLC29* permet el transport bidireccional de nucleòsids i, algun membre, de nucleobases. Està formada per quatre membres, amb diferències funcionals entre si. En el cas de recuperació de purines, cal tenir en compte el transportador de nucleobases recentment descrit ENTB1 (*SLC43A3*) (Furukawa et al. 2015).

El manteniment de l'homeòstasi de nucleòtids és vital pel correcte funcionament de la cèl·lula. En aquest sentit també és important destacar el paper de les vies de degradació que, un cop més, difereixen entre purines i pirimidines. Les cèl·lules humanes no poden desfer l'anell de purina. Així, la degradació dels nucleòsids de purina implica tres reaccions seqüencials que desuneixen els fosfats i la pentosa, i finalment l'anell és oxidat a àcid úric i excretat per orina (Figura 1) (Maiuolo et al. 2016). En canvi, els anells d'uracil i timidina poden ser degradats a β -alanina i β -aminoisobutirat, respectivament (Figura 2), els quals poden entrar a cicle de Krebs (Wasternack 1980).

2. Transportadors de nucleòsids

2.1 Transportadors concentratius de nucleòsids (hCNTs)

En humans, els transportadors concentratius de nucleòsids (de l'anglès *Concentrative Nucleoside Transporter*, CNT) són codificats per la família gènica *SLC28*. Els CNT estan localitzats a la membrana plasmàtica i mitjancen un transport unidireccional dependent de sodi; per tant, impliquen despesa energètica indirecta. L'afinitat pels substrats és molt alta, tal i com indiquen les seves constants de Michaelis-Menten (Taula 1) (Pastor-Anglada et al. 2018).

hCNT	Substrat	K _M
hCNT1	Citidina	3,1 μM (1)
	Timidina	27 μM (2)
	Uridina	38 μM (1)
hCNT2	Adenosina	8 μM (2)
	Guanosina	ND
	Inosina	13,7 μM (1)
	Uridina	116 μM (1)
hCNT3	Citidina	3,5 μM (1)
	Timidina	10,6 μM (1)
	Uridina	5,3 μM (1)
	Adenosina	2,4 μM (1)
	Guanosina	8,5 μM (1)
	Inosina	4,3 μM (1)

Taula 1. Transportadors concentratius de nucleòsids, els seus substrats i les seves constants d'afinitat aparents. Les constants K_M estan determinades en (1) línies cel·lulars o (2) oòcits de *Xenopus laevis*. ND significa No Determinat. Adaptada de Pastor-Anglada et al. 2018.

La família està formada per tres gens, *SLC28A1*, *SLC28A2* i *SLC28A3*, que codifiquen respectivament hCNT1, hCNT2 i hCNT3 (Figura 3). Difereixen entre si en quant a selectivitat de substrat (Ritzel et al. 1997; Ritzel et al. 1998; Ritzel et al. 2001b). Per un cantó, hCNT1 transporta específicament pirimidines, tot i que presenta la peculiaritat de poder unir adenosina sense capacitat de transportar-la. hCNT2, per la seva banda, transporta específicament purines però també pot transportar uridina. Per últim, hCNT3 presenta capacitat de transportar tant purines com pirimidines. A més, hCNT3 té dos trets diferencials respecte el cotransport de sodi. El primer és que consta de dos llocs d'unió a sodi enlloc d'un com tenen hCNT1 i hCNT2, de manera que l'estequiometria del cotransport és 2:1 per sodi:nucleòsid. Així, hCNT3 presenta una major capacitat de transportar nucleòsids contra gradient de concentració, aconseguint nivells de nucleòsids intracel·lulars més elevats. En segon lloc, hCNT3 és capaç d'efectuar el transport acoblat a protons, però en aquest cas l'estequiometria és 1:1 i només succeeix amb uridina

(Smith et al. 2005). A més, es pot donar la situació en què en presència de sodis i protons al medi, els dos llocs d'unió a ions d'hCNT3 estiguin ocupats per ions diferents (Mulinta et al. 2017). Cal destacar que l'afinitat d'hCNT3 per uridina varia en funció de si es cotransporta sodi o un protó.

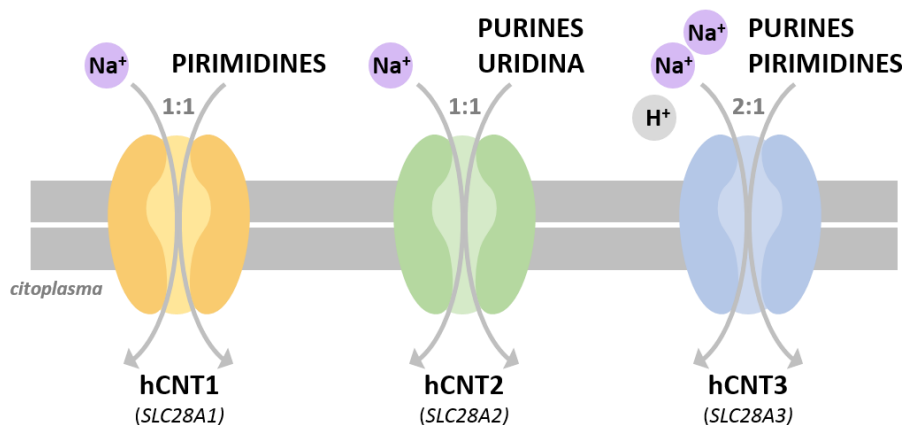


Figura 3. Esquema representatiu dels transportadors concentrats de nucleòsids (CNT) en humans. Adaptat de Pastor-Anglada and Pérez-Torras 2018.

2.1.1 Estructura dels hCNTs

Els transportadors concentrats de nucleòsids humans no han estat cristal·litzats fins el moment. Inicialment, mitjançant estudis de mutagènesi dirigida i de tractaments amb endoglicosidases, s'havia ideat l'estructura topològica dels hCNTs: una proteïna amb 13 dominis putatius transmembrana (inicialment se n'havien suggerit 14), extrem amino terminal llarg intracel·lular i extrem carboxi terminal extracel·lular (Pastor-Anglada et al. 2008). Ara bé, l'any 2012 es va publicar la cristal·lització de l'ortòleg de *Vibrio cholerae*, vcCNT. Aquest transportador consta de 8 hèlix transmembrana, dues forquilles hèlix-gir-hèlix i tres hèlix interfase paral·leles a la membrana (Johnson et al. 2012). En comparació amb els hCNTs humans, vcCNT presenta un 39% d'homologia amb hCNT3 i un percentatge lleugerament inferior amb hCNT1 i hCNT2. L'alineament entre les seqüències mostra que s'ha incorporat un domini amino terminal a les proteïnes hCNT comparat amb vcCNT; dit d'una altra manera, el domini TM1 de vcCNT seria el domini TM4 en hCNT3, tal i com s'ha pogut inferir per modelatge d'homologia (Mulinta et al. 2017). Així, l'extrem N-terminal present en els hCNT consta de tres dominis transmembrana i una cua llarga intracel·lular (Figura 4).

Del treball de Johnson et al., també cal destacar que vcCNT es va cristal·litzar com a homotrímer. Cadascun dels monòmers que formaven el trímer cristal·litzat presentava el lligand, uridina en

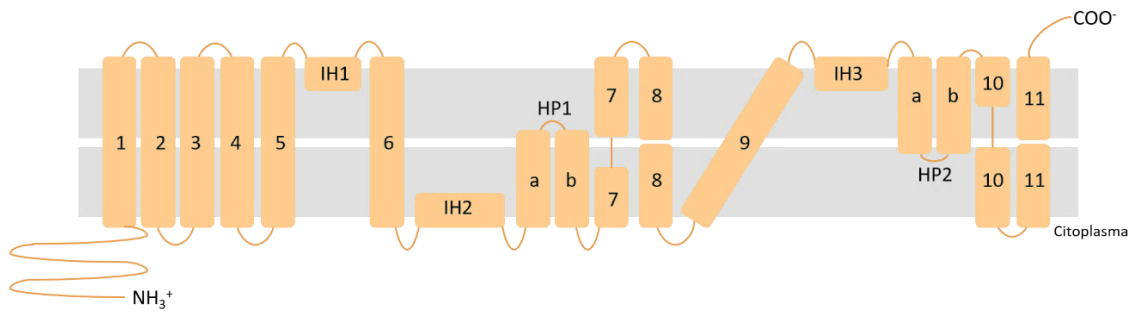


Figura 4. Estructura predita dels transportadors concentrats de nucleòsids per homologia amb vcCNT. Els números designen les regions transmembrana, IH les hèlix interfasa i HP les forquilles hèlix-gir-hèlix. Adaptada de Mulinta et al., 2017.

aquest cas, i el sodi units. Es van proposar els dominis de vcCNT importants en l'oligomerització, i s'ha vist que aquests dominis presenten un alt grau de conservació en comparació amb els hCNT; per tant, Johnson et al. ja van suggerir que els hCNTs podrien oligomeritzar. Cal destacar, a més, que segons *Protein Data Bank* (PDB) un 65% de les proteïnes de membrana formen oligòmers (Forrest 2015). Fins al moment només s'ha descrit la formació de trímers per hCNT3. Mitjançant dades d'homologia estructural amb vcCNT, es va inferir quins dominis d'hCNT3 serien susceptibles de ser importants en la interfase monòmer-monòmer. L'estratègia per demostrar la interacció va ser la introducció de cisteïnes als dominis putatius d'oligomerització, per forçar així ponts di-sulfur que només es formarien si els monòmers interaccionen (Stecula et al. 2017). Les dades es veuen reforçades per un altre treball publicat gairebé paral·lelament en què mitjançant el mètode de substitució de cisteïnes accessibles (de l'anglès, SCAM), van analitzar el domini de transport de hCNT3 i els canvis conformationals d'aquest (Mulinta et al. 2017). No està del tot clar quina implicació té la trimerització en el funcionament d'hCNT3. L'alineament de 883 seqüències homòlogues d'hCNT3 indica que el domini de trimerització està conservat al llarg de l'evolució com a dominis invertits repetits, i que aquests dominis participen de la catalització del transport. Per tant, se suggereix que el domini de trimerització és important pel transport (Stecula et al. 2017).

2.1.2 Dinàmica de transport

Com s'ha mencionat anteriorment, la família hCNT presenta diferent selectivitat de substrats: hCNT1 transporta pirimidines, hCNT2 purines i uridina i hCNT3 pot catalitzar l'entrada d'ambdós tipus de nucleòsids. Si s'analitzen les seqüències d'aminoàcids dels tres transportadors, s'observa que hCNT1 i hCNT2 presenten un 72% d'homologia entre si, mentre que la comparació d'hCNT3 amb els anteriors presenta un 48 i un 47%, respectivament. Filogenèticament, doncs, es proposa una separació del transportador hCNT3 i els seus ortòlegs en mamífer més

primerenca, i una posterior aparició d'hCNT1 i hCNT2 (Pastor-Anglada et al. 2008). La comparativa entre les seqüències explica també la diferent selectivitat de substrat. L'any 1999 ja es van identificar els residus d'hCNT1 responsables del transport de pirimidines que, en ser mutats pels residus que presenta hCNT2 en les posicions homòlogues, fan que hCNT1 transporti purines com si fos hCNT2 (Loewen et al. 1999). Un estudi posterior del nostre grup, gràcies al modelatge per homologia a l'estructura de vcCNT, ha identificat un total de quatre residus relacionats amb la selectivitat de substrat. Així, per hCNT1 són S318, Q319, S352 i L353; per hCNT2, G313, M314, T347 i V348; per hCNT3 són G340, Q341, S374 i V375 (Arimany-Nardi et al. 2017). Com es pot observar, hCNT3 presenta una combinatòria de residus d'hCNT1 i hCNT2 que aparentment és responsable de l'amplia selectivitat de substrats que el caracteritza.

S'ha proposat que els hCNT presenten un tipus de transport anomenat "model ascensor" (*elevator model of transport*, en anglès). Aquest tipus de transport consisteix en la presència d'un domini de transport mòbil, que conté els llocs d'unió als co-substrats, que es mou com a cos rígid al llarg d'un domini *scaffold* (Drew and Boudker 2016). És un model de transport descrit per a varis transportadors dependents de sodi, com el transportador sodi-aspartat Glt_{ph} de *Pyrococcus harikoshii* (Reyes et al. 2009), el transportador d'àcids biliars dependent de sodi SBT de *Yersinia frederiksenii* (Zhou et al. 2014), l'antiport NapA sodi/protons de *Thermus thermophilus* (Lee et al. 2014) i el transportador CitS de sodi/citrat de *Klebsiella pneumoniae* (Kim et al. 2017). La cristal·lització de vcCNT es va realitzar en una conformació en què el transportador, que presentava el sodi i la uridina units, estava orientat cap al cantó citoplasmàtic de la membrana: s'anomena conformació *inward*. L'estudi realitzat en un altre ortòleg de CNT, el de *Neisseria wadsworthii* ($_{\text{NW}}\text{CNT}$), que catalitza un transport de nucleòsids dependent de sodi i de forma molt semblant a vcCNT, ha permès obtenir les diferents conformacions del transportador que defineixen el model ascensor (Hirschi et al. 2017). La primera cristal·lització de $_{\text{NW}}\text{CNT}$ va mostrar una estructura molt semblant a vcCNT, amb conformació *inward*. Mitjançant una sèrie de mutagènesis dirigides en què alteraven els llocs d'unió del sodi i la uridina, es van obtenir quatre conformacions més de $_{\text{NW}}\text{CNT}$. La primera, sense unió de substrats, corresponia a la conformació *outward*. En aquesta, els dominis transmembrana s'havien desplaçat cap a la cara extracel·lular de la membrana, fent que els llocs d'unió de sodi i uridina estiguessin per sobre de TM6 i, per tant, accessibles des del cantó extracel·lular. Altres mutacions van permetre cristal·litzar tres posicions intermediàries del domini de transport, en què els llocs d'unió dels substrats estan ocults a l'interior del transportador.

Recentment s'ha suggerit que hCNT3 presenta un transport tipus ascensor, semblant a l'ortòleg $_{\text{NW}}\text{CNT}$. Ambdues proteïnes presenten un 38% d'homologia, i s'han generat models estructurals

d'hCNT3 basant-se en les cinc conformacions de $_{NW}CNT$ (Yao and Young 2018). A diferència del que succeeix amb $_{NW}CNT$, però, hCNT3 té capacitat de transportar uridina de forma dependent de protons (Smith et al. 2005). Per tant, es va suggerir que hCNT3 ha de tenir almenys dues conformacions *outwards* en funció del catió que s'hi uneixi (Yao and Young 2018). Faltaria, a més, modelar com es comportaria el segon lloc d'unió a sodi, donat que els ortòlegs cristal·litzats no el presenten.

2.2 Transportadors equilibratius de nucleòsids (hENTs)

En humans, la família gènica *SLC29* codifica els anomenats Transportadors Equilibratius de Nucleòsids (*Equilibrative Nucleoside Transporter, ENT*). Tot i que podrien semblar similars als hCNT, no presenten homologia estructural ni passat evolutiu comú; és més, els hENTs no presenten ortòlegs a procariota mentre que els CNT sí (Young et al. 2013).

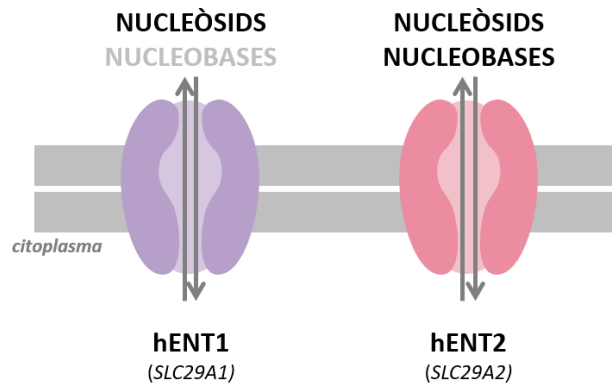


Figura 5. Esquema representatiu dels transportadors equilibratius de nucleòsids (ENT) 1 i 2 en humans. Adaptat de Pastor-Anglada and Pérez-Torras 2018.

La família dels hENTs està formada per quatre membres (*SLC29A1-4*) (Molina-Arcas et al. 2009), dels quals hENT1 i hENT2 són els més estudiats i millor caracteritzats (Figura 5). Ambdós són proteïnes integrals de la membrana plasmàtica que mitjancen un transport bidireccional i a favor de gradient de nucleòsids i nucleobases, tant purínics com pirimidínics, però amb menys afinitat que els hCNT (Taula 2) (Baldwin et al. 2004; Yao et al. 2011; Young et al. 2013). A diferència dels hCNT, el transport no depèn de sodi. El fet distintiu més important entre hENT1 i hENT2 és la inhibició mitjançant nitrobenzil tiinosina (NBTI): hENT1 és molt més sensible que hENT2, amb K_s de 10 nM i 10 μ M respectivament. Tots dos transportadors són inhibits pel vasodilatador dipiridamol (Visser et al. 2002). A més, entre si presenten una identitat del 50% (Hyde et al. 2001). Pel que fa hENT3, també pot transportar purines i pirimidines, a més de la nucleobase adenina. Presenta un domini N-terminal molt llarg i hidrofílic que conté un motiu di-leucina

característic de proteïnes lisosomals (Baldwin et al. 2005; Hsu et al. 2012). Recentment, però, s'ha descrit que també pot localitzar-se a mitocondri (Kang et al. 2010). Probablement la seva funció tingui rellevància en l'alliberament de nucleòsids i nucleobases provinents de la hidròlisi d'àcids nucleics a l'interior lisosomal. Per últim, hENT4, també conegut com transportador de mono-amines de membrana plasmàtica (PMAT), no es pot considerar un transportador de nucleòsids canònic. De fet, és evolutivament divergent d'hENT1-3 i en primera instància va ser caracteritzat com un transportador poliespecífic de cations orgànics (Engel 2005). Tanmateix, s'ha descrit que a pH àcid presenta transport d'adenosina amb baixa afinitat. Aquesta activació del transport d'adenosina a pH baix podria suggerir que, igual que hENT3, el transport podria estar acoblat a protons (Barnes et al. 2006).

hENT	Substrat	K_M
hENT1	Citidina	580 μ M (1)
	Timidina	300 μ M (1)
	Uridina	240 μ M (2)
	Adenosina	40 μ M (1)
	Guanosina	140 μ M (1)
	Inosina	170 μ M (1)
	Timina	6300 μ M (2)
	Adenina	3200 μ M (2)
	Hipoxantina	6000 μ M (2)
hENT2	Citidina	5610 μ M (1)
	Timidina	710 μ M (1)
	Uridina	200 μ M (2)
	Adenosina	140 μ M (1)
	Guanosina	2700 μ M (1)
	Inosina	50 μ M (1)
	Citosina	ND
	Timina	1700 μ M (2)
	Uracil	2600 μ M (2)
	Adenina	1100 μ M (2)
	Guanina	ND
hENT3	Hipoxantina	700 μ M (2)
	Uridina	2000 μ M (2)
hENT4	Adenosina	1900 μ M (1)
	Adenosina	780 μ M (1)

Taula 2. Transportadors equilibratius de nucleòsids, els seus substrats i les seves constants d'afinitat aparents. Les constants K_M estan determinades en (1) línies cel·lulars o (2) oòcits de *Xenopus laevis*. ND significa No Determinat. Adaptada de Pastor-Anglada et al. 2018.

2.2.1 Estructura dels hENTs

Recentment s'ha publicat la resolució de l'estructura d'hENT1 cristal·litzada (Wright and Lee 2019), ja que fins el moment tot el que es coneixia d'estructura provenia de prediccions *in silico*

amb suport de construccions quimèriques i assajos de mutagènesi dirigida. Les estructures resoltes són dues: la primera és un complex entre hENT1 i l'inhibidor NBMPR (anàleg de nucleòsid) (Figura 6A), mentre que la segona és un complex entre hENT1 i el vasodilatador dilazep, el qual no presenta cap analogia amb els nucleòsids. En tots dos casos hENT1 ha estat cristal·litzat com un monòmer. Coincidint amb les prediccions, presenta 11 hèlix transmembrana amb cua N-terminal citosòlica i cua C-terminal extracel·lular (Figura 6B). Abans de conèixer-se l'estructura, s'havia especulat que els hENTs presentaven similituds estructurals amb la *major facilitator superfamily* (MFS, superfamília de transportadors de membrana present a totes les espècies). Tanmateix, aquest treball demostra que hi ha diferències substancials; per exemple, MFS presenten 12 dominis TM amb simetria entre els dominis TM1-6 i TM7-12. hENT1 presenta pseudo-simetria entre TM1-6 i TM7-11, i el domini TM9 ocupa una localització diferent respecte el TM9 dels MFS canònics. Els dominis TM estan connectats mitjançant regions hidrofíliques curtes, excepte les unions entre TM1-2 i TM6-7, que presenten una seqüència d'unió més extensa que, en el cas d'hENT1, contenen 41 i 66 aminoàcids respectivament (Sundaram et al. 2001; Dos Santos-Rodrigues et al. 2014).

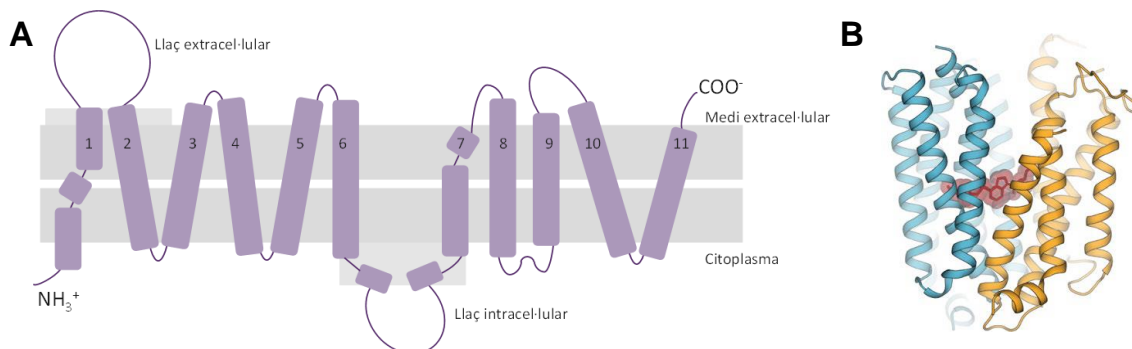


Figura 6. Estructura del transportador equilibratiu de nucleòsids hENT1. (A) Diagrama de la topologia d'hENT1 a la membrana plasmàtica. Els números designen les regions transmembrana. (B) Estructura cristal·litzada d'hENT1 unit a NBMPR, amb el lligand destacat i representat amb bastons. Obtingut de Wright and Lee 2019.

2.3 Característiques dels NT a nivell genètic

Els transportadors de nucleòsids, tot i que aparentment duen a terme funcions semblants, no comparteixen llinatge filogenètic. Com s'ha mencionat anteriorment, la família *SLC28* presenta ortòlegs a diversos procarïotes, com *Vibrio cholerae* i *Neisseria wadsworthii*. D'altra banda, la família *SLC29* es considera exclusivament eucariota, ja que fins el moment no s'ha descrit cap ortòleg procarïota. Un altre tret diferencial és que només la família *SLC29* presenta ortòlegs a plantes. Es considera, doncs, que la família *SLC29* presenta una distribució més àmplia, potser

pel fet d'estar relacionats a la *Major Facilitator Superfamily* de transportadors (Young et al. 2013).

2.3.1 Variants dels NT

Sempre s'ha considerat que els transportadors de nucleòsids presenten molt poca variabilitat genètica (Errasti-Murugarren and Pastor-Anglada 2010). La importància d'aquests transportadors en el bon funcionament de la cèl·lula i de l'organisme podria anar lligada a aquesta baixa variabilitat, ja que la pressió selectiva hauria desfavorit la perpetuïtat de les variants. En un primer estudi comparatiu del 2003, Leabman et al. van identificar la variabilitat de 24 gens que codifiquen transportadors de membrana amb rols potencials en la resposta a fàrmacs. Aquest estudi incloïa membres de la superfamília del *SoLute Carriers* (SLC) i dels transportadors ABC (Leabman et al. 2003). Van analitzar els gens en 247 mostres de DNA d'una població diversa; concretament els exons i les regions intròniques flanquejants com a zones en què l'impacte de la variabilitat genètica és més alt. Per tal d'entendre les dades proporcionades, van emprar el paràmetre indicador de la mitjana de diversitat de nucleòtids present en el gen analitzat. La mitjana de variació genètica en la població oscil·la entre $5,05 \cdot 10^{-4}$ i $7,51 \cdot 10^{-4}$ segons els estudis, i la variació genètica mitjana dels transportadors analitzats era de $5,09 \cdot 10^{-4}$, mostrant com de conservades estan les seqüències corresponents. Tanmateix, aquest nombre no és representatiu per a *SLC28A1*, gen que codifica hCNT1: la variabilitat de les seqüències estudiades puja fins $11,8 \cdot 10^{-4}$.

Les dades d'aquest estudi van ser emprades a posteriori per analitzar més profundament la variabilitat dels gens *SLC28A1* (Gray 2004), *SLC28A2* (Owen et al. 2005) i *SLC28A3* (Badagnani et al. 2005). *SLC28A2* va en línia al comentat anteriorment: la variabilitat és molt baixa. De les variants trobades a la població analitzada, alguna presenta canvis en el transport, sobretot la variant E385K trobada en alta proporció en la població malaia (Taula 3). Aquest residu de glutamat es troba altament conservat en els ortòlegs d'hCNT2, i també en els paràlegs hCNT1 i hCNT3 (Li et al. 2007). El cas d'*SLC28A3* fa encara més evident la pressió selectiva a la qual està sotmès, ja que només s'han detectat 10 residus que alterin la seqüència aminoacídica d'hCNT3. Dels tres canvis més destacats, G367R presenta un 85% de reducció del transport de timidina i inosina i, de manera semblant al cas d'E385K d'*SLC28A2*, el residu de glicina 367 està molt conservat tant en ortòlegs com en hCNT1 i hCNT2. La variant C602R, present en un 1% de la població, altera la unió del sodi i provoca una mala inserció d'hCNT3 als *rafts* lipídics (Taula 3)

CANVI NUCLEÒTID	CANVI AMINOÀCID	CONSEQÜÈNCIES FUNCIONALS	REFERÈNCIA
SLC28A1 (hCNT1)			
c.38C>G	S13C	↑ transport timidina	Gray et al., 2004
c.128G>A	S43N	↓ transport timidina	
c.418-420+TTG	+V140	Sense canvis	
c.565G>A	V189I	↑ transport timidina	
c.568G>T	A190S	↑ transport timidina	
c.689C>T	A230V	↑ transport timidina	
c.709C>A	Q237K	↑ transport timidina	
c.1153G>Del	V385Del	No funcional	
c.1234G>C	E412Q	Sense canvis	
c.1528C>T	R510C	Sense canvis	
c.1561G>A	D521N	↑ transport timidina	
c.1636T>C	S546P	No funcional	
c.1880A>G	N627S	↑ transport timidina	
c.1903C>G	L635V	↓ transport timidina	
SLC28A2 (hCNT2)			
c.65C>T	P22L	Sense canvis	Owen et al., 2005
c.225C>A	S75R	↑ transport guanosina	
c.488T>G	L163W	↑ transport guanosina	Li et al., 2007
c.515G>T	E172D	Sense canvis	
c.734G>C	S245T	Sense canvis	Owen et al., 2005
c.1064T>C	F355S	↓ transport guanosina	
c.1153G>A	E385K	↓↓ transport inosina i uridina	Li et al., 2007
c.1835T>C	M612T	↓ transport inosina i uridina	
SLC28A3 (hCNT3)			
c.338T>C	Y113C	↑ transport timidina	Badagnani et al., 2005
c.1099G>A	G367R	↓↓ transport timidina i inosina	
c.1804T>C	C602R	↓ transport timidina, citidina, uridina, guanosina i adenosina	Errasti-Murugarren et al., 2008
SLC29A1 (hENT1)			
c.647T>C	I216T	Sense canvis	Osato et al., 2003
c.1171G>A	E391K	Sense canvis	
SLC29A2 (hENT2)			
c.13G>T	D5Y	↓ transport guanosina, uridina, inosina, hipoxantina	Owen et al., 2006
c.93C>A	N68K	↑ transport guanosina	
c.551-556Del	S184M + DelG185 + DelV186	↓ transport guanosina, uridina, inosina	
c.845-846Del	Canvi pauta (+282)	No funcional	

Taula 3. Variants SNP descrites dels gens que codifiquen els transportadors de nucleòsids. S'indiquen les que presenten rellevància funcional o clínica. Adaptada d'Errasti-Murugarren and Pastor-Anglada, 2010.

(Errasti-Murugarren et al. 2010). En canvi, *SLC28A1* no sembla seguir una pressió selectiva tan estricta com els altres membres de la família *SLC28*. L'anàlisi de la població va identificar 1,5 SNPs (de l'anglès *Single Nucleotide Polymorphism*) per cada 100 parells de bases analitzades; una freqüència molt elevada comparada amb altres transportadors de membrana (Leabman et al. 2003). Tenint en compte la diversitat de nucleòtids (π) que dona lloc a canvis sinònims i no sinònims (π_S i π_{NS} , respectivament), es pot calcular l'índex π_{NS}/π_S . Aquest índex és indicatiu del grau de pressió selectiva d'un gen, en què valors més propers a zero indiquen major pressió. La mitjana per als transportadors de membrana estudiats per Leabman et al. és 0,182, i concretament el d'*SLC28A3* és de 0,01. En canvi, *SLC28A1* presenta un índex 0,381. Així, per alguna raó sembla que *SLC28A1* presenta menys pressió selectiva que altres transportadors de membrana. Les evidències d'aquest estan recollides a la Taula 3. De les variants en destaca en primer lloc V385Del, que dona lloc a una forma truncada d'hCNT1 no funcional present en un 3% de la població americana d'origen afro-americà (Gray 2004). La variant hCNT1S546P tampoc és funcional, però estudis posteriors demostren que el transportador s'inserta de manera correcta a membrana plasmàtica però és incapaç de translocar substrats (Cano-Soldado et al. 2011).

La família *SLC29* segueix una línia semblant a la família *SLC28* pel que fa la pressió selectiva exercida sobre els gens corresponents. Hi ha dos estudis semblants als mencionats anteriorment per *SLC28A1*, *SLC28A2* i *SLC28A3*, en els quals es van analitzar *SLC29A1* i *SLC29A2* en 247 mostres de DNA. Es va observar que *SLC29A1* presenta una taxa de variants molt inferior a la mitjana dels transportadors analitzats per Leabman et al., concretament de $0,89 \cdot 10^{-4}$ (Leabman et al. 2003). De les variants identificades, només dues presentaven canvis en la seqüència d'aminoàcids. L'estudi funcional de les variants hENT1I216T i hENT1E391K conclou que no hi ha diferències funcionals entre ambdues variants ni respecte hENT1 de referència (Taula 3) (Osato et al. 2003). Tanmateix, recentment s'ha descrit que la variant hENT1E391K està relacionada amb el grup sanguini *Augustine*. Concretament, el glutamat en la posició 391 correspon a At(a+) (nomenclatura del grup sanguini), mentre que la lisina correspon a At(a-). En el mateix estudi van detectar una inserció a la posició c.589+1, que resulta en una proteïna truncada d'hENT1, i per tant no funcional. Els tres individus homozigots identificats amb aquesta inserció presenten grup sanguini At(a0), i característiques mineralització ectòpica observada en els ratolins *knock-out* per *Slc29a1* (Daniels et al. 2015). L'anàlisi d'*SLC29A2* també va revelar una baixa taxa de variació. Tanmateix, *SLC29A2* és l'únic gen dels transportadors estudiats per Leabman et al. que presenta dues delecions en la seva zona codificant (Owen et al. 2006). El total de variants trobades per aquest gen és de cinc; les tres restants corresponen a canvis d'aminoàcid en què

una presenta reducció de l'activitat (D5Y) i una altra augment (N68K) (Taula 3). La primera deleció suposa la supressió de 6 parells de bases, que comporta un aminoàcid mutat i dos delecionats. Aquesta variant presenta transport reduït de tots els substrats testats. La segona deleció és de dos aminoàcids, que es tradueix en un canvi de pauta de lectura i una conseqüent variant d'hENT2 truncada que no és funcional (Taula 3).

Pel que fa als altres dos membres de la família *SLC29*, *SLC29A3* presenta alguna variant que ha estat associada a patologia (esmentat a l'apartat 3.2). No s'han descrit variants d'*SLC29A4*.

Dins el concepte de variants, però, no es poden contemplar únicament els canvis d'un sol parell de bases, o INDELS de pocs parells de bases. L'*splicing* alternatiu és un procés molt comú en eucariotes. De fet, s'ha estimat que un 95% dels pre-mRNAs que contenen múltiples exons pateixen *splicing* alternatiu en algun punt, ja sigui entre teixits diferents, estadis del desenvolupament o teixit sa versus patològic (Pan et al. 2008; Wang et al. 2008). L'*splicing* alternatiu succeeix per fenòmens diferents, però el més comú en eucariotes de complexitat superior (per exemple, humans) és saltar-se un exó (*exon skipping*; Alekseyenko et al. 2007).

S'han trobat varis casos d'*splicing* a la superfamília SLC, tant de variants naturals com de variants associades a fenotip patològic (Park et al. 2017). Està descrit que en hepatocarcinoma i colangiocarcinoma apareixen variants diferents d'*splicing* del gen *SLC22A1*, que codifica el transportador de cations orgànics 1 (hOCT1). Aquestes variants, a més, estan associades a la disminució de l'activitat d'hOCT1 en els tumors mencionats (Herraez et al. 2013). Un altre membre de la superfamília, el transportador de pèptids 1 (PEPT1, codificat pel gen *SLC15A1*), presenta una variant d'*splicing* natural. El mRNA de PEPT1 presenta 23 exons, mentre que la variant d'*splicing* en té només 6. Aquesta variant més curta s'ha proposat com a factor regulador sensible a pH (Urtti et al. 2001).

En relació als transportadors de nucleòsids, la bibliografia indica que només *SLC28A3*, *SLC29A1* i *SLC29A2* presenten variants d'*splicing*. Ara bé, les bases de dades amplien el nombre de gens de NT afectats per *splicing* i el nombre de variants de cadascun d'ells. Tant és així que *SLC28A1* i *SLC29A1* podrien presentar 6 variants d'*splicing*, *SLC29A3* en tindria 5, *SLC29A2* 4, *SLC28A3* i *SLC29A4* en tindrien 3 i *SLC28A2* només una (dades de GenBank, NCBI, NIH). Fins al moment, però, només se n'han caracteritzat pels transportadors hCNT3, hENT1 i hENT2. La variant d'*splicing* d'*SLC28A3* identificada s'anomena hCNT3ins, i és expressada de forma relativament ubiqua. La variant presenta un fragment de 176 parells de bases insertat entre els exons 2 i 3, probablement pel fenomen de retenció d'intró. Aquest insert canvia la pauta de lectura, de manera que a hCNT3ins li manquen els 69 primers aminoàcids de la cua N-terminal. Es va

observar que hCNT3ins és capaç de transportar nucleòsids i localitza al reticle endoplasmàtic (Errasti-Murugarren et al. 2008). Respecte les variants d'*splicing* d'*SLC29A1*, en humà s'han trobat casos de canvis dels nivells de variants d'*splicing* alternatives en càncer colorectal (Vladimirovna Snezhkina et al. 2016). Per altra banda, en el gen ortòleg de ratolí *Slc29a1* sí que s'ha identificat una variant d'*splicing* que es tradueix a proteïna, mENT1 Δ 11, la qual li falten els tres últims dominis transmembrana comparat amb mENT1. Aparentment no hi ha diferències respecte l'activitat transportadora però sí que hi ha variacions en quant a la distribució tissular (Robillard et al. 2008). Per últim, *SLC29A2* és el transportador de nucleòsids les variants d'*splicing* del qual han estat més profundament caracteritzades fins al moment. S'han identificat almenys 10 variants d'*splicing*, a més de la isoforma canònica (WT). Algunes d'aquestes variants codifiquen la mateixa proteïna, i altres formarien unes proteïnes truncades tan curtes que es considera que no tindrien activitat transportadora (Grañé-Boladeras et al. 2016). Les variants d'*splicing* que arriben a traduir-se formen les proteïnes HNP36 i HNP32, de localització a la membrana nuclear. Aquestes isoformes actuen com a dominants negatius d'hENT2 a la membrana plasmàtica, afavorint la retenció d'hENT2 a nucli, un fenomen que succeeix en condicions de proliferació. A la membrana nuclear interna, hENT2 i les isoformes HNP36 i HNP32 formarien oligòmers capaços d'internalitzar nucleòsids i nucleobases al nucli.

2.3.2 Regulació transcripcional dels NT

L'expressió dels transportadors de nucleòsids ha estat àmpliament estudiada. Tanmateix, existeix un important coll d'ampolla en aquest estudi i és causat per la manca de models adequats, sobretot en el cas dels hCNT. De manera general, l'expressió dels transportadors concentratius està més associada a epitelis diferenciats, mentre que l'expressió dels transportadors equilibratius està més associada a proliferació (Del Santo et al. 2001; Pastor-Anglada et al. 2001; Aymerich et al. 2004). Tant és així que s'ha descrit àmpliament la pèrdua d'expressió dels CNT en algun tipus de càncer, com en tumors ginecològics, de pit o colangiocarcinoma (Farré et al. 2004; Gloeckner-Hofmann et al. 2006; Urtasun et al. 2017). Conseqüentment, l'estudi de l'expressió dels gens que codifiquen els transportadors concentratius de nucleòsids és difícil en models de línies cel·lulars tumorals.

Hi ha estudis realitzats sobre l'expressió del transportador CNT1 en rata (rCNT1) i en humans (hCNT1). A nivell més genèric, en línies cel·lulars s'ha detectat que hCNT1 està regulat per cicle cel·lular, de manera que la seva expressió augmenta en fase S, el qual es relacionaria amb la necessitat de la cèl·lula de captar nucleòsids per a la replicació del DNA (Valdés et al. 2002). A nivell específic de teixit, els estudis en rata demostren la sensibilitat de rCNT1 a la dieta. El dejuni

provoca un increment de rCNT1 a jejú, probablement a causa de la deprivació de nucleòsids, mentre que una dieta rica en nucleòsids en disminueix l'expressió (Valdés et al. 2000). La distribució tissular de l'expressió d'hCNT1 està descrita a l'apartat 2.5. S'anticipa, però, que el fetge és un dels òrgans en què l'expressió és més elevada. Estudis en diferents models de fetge, com hepatòcits en cultius o la línia cel·lular HepG2, demostren que els factors TNF α i interleucina-6 (IL-6) regulen l'expressió del gen *SLC28A1* (Fernández-Veledo et al. 2004). A més, un estudi ha acotat la regió promotora del gen *SLC28A1* i ha determinat que el factor de transcripció HNF4 α i els àcids biliars en regulen l'expressió (Fernández-Veledo et al. 2007; Klein et al. 2009). Aquest estudi es reforça pel fet que HNF4 α té una expressió elevada a fetge, ronyó, pàncrees i intestí, que són teixits associats a l'expressió d'hCNT1 també (Nammo et al. 2008). Per últim, s'ha vist que hCNT1 està regulat per insulina a fibroblasts cardíacs (Podgorska et al. 2007). Els estudis de l'expressió de CNT2 també s'han realitzat en models humans i de rata. Estudis en una línia cel·lular derivada d'hepatoma de rata van determinar que TGF β és un factor implicat en l'augment d'expressió d'*SLC28A2* (Valdés et al. 2006). Per altra banda, s'ha vist que els àcids biliars, C/EBP α i HNF3 γ poden augmentar l'activitat d'hCNT2 (Fernández-Veledo et al. 2006; Fernández-Veledo et al. 2007). IFN α també participa de l'increment d'activitat d'hCNT2, ja sigui per augment de presència d'hCNT2 a la membrana com per activació de la transcripció del gen *SLC28A2* (Pinilla-Macua et al. 2014). També s'ha vist que la hipòxia juga un paper determinant en l'expressió de CNT2 *in vitro* i *in vivo* (Medina-Pulido et al. 2013). Els estudis de la regulació d'hCNT3 se centren més en modificacions post-traduccionals, explicades a l'apartat 2.4.1.

En relació als transportadors equilibratius, l'expressió d'hENT1 sembla estar relacionada amb el cicle cel·lular també, donat que s'ha detectat en cèl·lules en cultiu cel·lular que els nivells d'hENT1 en fase G₂-M són el doble que en fase G₁ (Baldwin et al. 2004). S'han trobat varis factors implicats en la regulació del gen *SLC29A1*. Per un cantó, en models de rata, s'han descrit elements activadors com EGF i TNF α (Aymerich et al. 2004). En models humans s'han relacionat MAZ, Sp1, PPAR α i PPAR γ a l'augment de transport d'hENT1 (Abdulla and Coe 2007; Montero et al. 2012). Per altra banda, la repressió de l'expressió d'hENT1 està dirigida per factors com el complex hCHOP-C/EBP α , per *Matricellular protein cys-rich angiogenic inducer 61*, i en cardiomiòcits mitjançant HIF1 α en situacions d'hipòxia (Eltzschig et al. 2005; Farías et al. 2010; Hesler et al. 2016). A més a placenta, la senyalització iniciada per la glucosa a través de la via MAPK redueix l'activitat promotora d'*SLC29A1* (Puebla et al. 2008). Respecte hENT2, el cicle cel·lular també està implicat en la seva expressió, concretament en l'expressió de les variants d'*splicing*, que augmenten en situacions de proliferació cel·lular (Grañé-Boladeras et al. 2016).

En quant a factors de transcripció, s'ha descrit també que HIF1 α redueix l'expressió del gen *SLC29A2* a cor i intestí (Eltzschig et al. 2005; Morote-Garcia et al. 2009).

Per últim, s'han relacionat hCNT1, hENT1 i hENT2 amb el cicle cel·lular (Valdés et al. 2002; Baldwin et al. 2004; Grañé-Boladeras et al. 2016). En els darrers anys ha crescut la consciència que els mateixos elements que regulen la progressió del cicle cel·lular també són determinants per a processos metabòlics de la cèl·lula. Així, E2F1 ha estat implicat en la síntesi *de novo* de nucleòtids mitjançant la regulació dels gens que codifiquen la timidina quinasa (TK) i la dihidrofolat reductasa (DHFR). A més, en el context d'oncogènesi, aquest mateix factor de transcripció ha estat relacionat amb adaptacions metabòliques requerides per al creixement i la supervivència cel·lular (Denechaud et al. 2017).

2.4 Regulació dels NT a nivell proteic

En ser proteïnes integrals de membrana, la traducció dels transportadors de nucleòsids està associada a reticle endoplasmàtic, de manera que quan apareix un segment de cadena polipeptídica hidrofòbica ràpidament és inserida a la membrana del reticle (revisat a Harris et al. 2018). A partir d'aquest punt, el transportador naixent ha de ser dirigit al seu lloc funcional.

2.4.1 Modificacions post-traduccionals dels NT

Està àmpliament descrit que els transportadors de membrana poden patir modificacions post-traduccionals que comportin alteracions en la seva funció. Les glicosilacions són fonamentals per la funció de molts transportadors de membrana (revisat a Czuba et al. 2018). En adipòcits, la insulina indueix la presència del transportador de glucosa GLUT4 a membrana plasmàtica (Leto and Saltiel 2012). En enteròcits, per altra banda, la presència de glucosa provoca la incorporació de SGLT1 a membranes (Korn et al. 2001). Cal tenir en compte, a més, que les regulacions poden anar en sentit contrari també: el transportador d'anions orgànics OAT1 és endocitat de manera dependent de PKC (Zhang et al. 2008; Zhang et al. 2013).

Pels transportadors de nucleòsids també s'han descrit algunes modificacions post-traduccionals implicades en la seva funció. Per un cantó, hi ha les modificacions en el si de la cadena peptídica dels transportadors. Fins el moment no s'ha descrit cap modificació post-traduccional de glicosilació, fosforilació, acetilació, unió de residus lipídics, ubiquitinització o SUMOilació d'hCNT1, hCNT2 ni hCNT3. Dades no publicades del grup suggereixen que hCNT2 podria ser glicosilat. Respecte els transportadors equilibratius hENT1 i hENT2, s'ha detectat que ambdós són fosforilats i glicosilats. hENT1 és glicosilat al residu asparagina 48, situat en el llaç

extracel·lular entre el domini TM1 i TM2. Aquesta glicosilació és necessària per a l'activitat i la correcta inserció d'hENT1 a la membrana plasmàtica (Bicket and Coe 2016). Per altra banda, el llaç intracel·lular entre els dominis TM6 i TM7 presenta diversos residus susceptibles de ser fosforilats, tant per PKA (serines 267 i 271, treonina 274; possiblement altres residus també) com per PKC (serines 279, 281 i 286) (Reyes et al. 2011; Grañe-Boladeras et al. 2019). La fosforilació d'hENT1, en part, està lligada a la regulació d'aquest transportador per part dels receptors d'adenosina. S'ha descrit que l'estimulació del receptor A1 indueix l'activació de PKC, la qual fosforila la serina 281 d'hENT1 i conseqüentment augmenta el flux de nucleòsids cap a l'interior de la cèl·lula (Hughes et al. 2015). De la mateixa manera que hENT1, hENT2 també pot ser glicosilat. En aquest cas hi ha dos residus implicats, les asparagines 48 i 57. A diferència d'hENT1, però, la manca de glicosilació d'hENT2 no impedeix que el transportador s'inserti a la membrana plasmàtica (Baldwin et al. 2005). Sí que s'observa una reducció del transport dependent d'hENT2 a la membrana plasmàtica (Ward et al. 2003). La fosforilació d'hENT2, pel seu cantó, ha estat objecte de discussió. S'havia descrit que PKC podria estar implicada en la fosforilació d'aquest transportador, però estudis més recents són partidaris d'un efecte indirecte de PKC sobre hENT2. S'ha descrit que la quinasa CKII és responsable de la fosforilació d'hENT2 en el llaç intracel·lular entre TM6 i TM7, concretament als residus serina 270 i 282 i treonina 285. Ara bé, el mateix estudi fa palès que la funció de PKC en aquest cas està associada a la desfosforilació, mitjançant l'activació de la fosforilasa PP1. L'estudi proposa que hENT2, fosforilat per CKII, és present a un domini submembrana de la membrana plasmàtica. Senyals mediat per PKC activen la fosforilasa PP1, la qual desfosforila hENT2 i aquest passa a estar present en el si de la membrana plasmàtica (Grañe-Boladeras et al. 2019).

Per altra banda, s'han descrit mecanismes de regulació de l'activitat i de l'expressió dels transportadors que estan més associats al tràfic a membrana d'aquests. La proteïna hRS1 ha estat identificada com a reguladora dels membres de la família *SLC28*. Aquesta proteïna, inicialment relacionada amb la regulació del transportador de glucosa acoblat a sodi SGLT1 (Korn et al. 2001), s'ha vist que regula la presència dels CNT a membrana. hRS1 disminueix la localització a la membrana plasmàtica i l'activitat d'rCNT1, rCNT2 i rCNT3, concretament bloquejant la sortida dels CNT del trans-Golgi (Errasti-Murugarren et al. 2012). La regulació és independent de glucosa (Veyhl-Wichmann et al. 2016). Per hCNT1 no s'ha descrit cap altra regulació. Per CNT2, proves realitzades a l'ortòleg de rata demostren que la correcta estructura i estat d'oxidació de la cua C-terminal és determinant per tal que el transportador s'inserti a la membrana. En l'ortòleg humà, per altra banda, IFN α està implicat en un augment d'hCNT2 a membrana plasmàtica. La unió d'IFN α al receptor de citoquines promou una cascada de

senyalització relacionada amb la translocació d'hCNT2 a membrana plasmàtica (Pinilla-Macua et al. 2014). Pel seu cantó, hCNT3 és l'únic transportador de nucleòsids del qual es coneix que la seva localització a la membrana plasmàtica està associada a bases lipídiques (*lipid rafts* en anglès), sent major la seva activitat translocadora en aquest domini (Errasti-Murugarren et al. 2010). A més, s'ha vist en un model de leucèmia limfàtica crònica, que la presència a membrana plasmàtica d'hCNT3 està regulada per l'àcid trans-retinoic (ATRA), mitjançant senyalització paracrina i autocrina de TGF β (Fernández-Calotti and Pastor-Anglada 2010).

La regulació de la inserció a membrana dels membres de la família *SLC29* no està tan estudiada – excepte el cas de PKC, PP1 i hENT2 esmentat anteriorment. La única regulació mencionada a la bibliografia relaciona un complex d'ubiquitina lligasa SCF, que conté una subunitat de reconeixement de substrat anomenada FBW7. La modulació d'aquesta subunitat està relacionada amb l'expressió d'hENT1 a nivell proteic però no d'RNA, sobretot la seva presència a la membrana plasmàtica, però se'n desconeix el mecanisme (Hu et al. 2017).

2.4.2 Regulació dels NT per interaccions

Les interaccions proteïna-proteïna comprenen un altre mecanisme de regulació de l'activitat proteica. Els transportadors de nucleòsids han estat objectes d'estudi en aquest sentit.

Fins el moment, no s'ha descrit cap proteïna d'interacció per hCNT1. L'estudi de l'interactoma d'hCNT2 ha identificat dues proteïnes relacionades amb el metabolisme de glucosa: aldolasa B i GRP58 (*Glucose-Regulated Protein 58*). Cadascuna de les dues interaccions d'hCNT2 s'ha validat en un sistema diferent. En el seu conjunt, convertirien a hCNT2 en un transportador sensible als nivells de glucosa. Per un cantó, la interacció amb aldolasa B és afavorida en presència de substrats glicolítics com la glucosa i la fructosa, i també augmenta l'afinitat d'hCNT2 pels seus substrats. Per altra banda, GRP58 actuaria com a sensor negatiu: l'expressió de GRP58 augmenta quan hi ha baixos nivells de glucosa, mentre que l'expressió i activitat d'hCNT2 augmenten quan els nivells de glucosa són elevats (Huber-Ruano et al. 2010). Respecte l'interactoma d'hCNT3, fins el moment només s'ha descrit galectina-4 com a proteïna d'interacció d'aquest transportador. La regulació de l'expressió de galectina-4 en cèl·lules que expressen hCNT3 suggereix que aquesta lectina és necessària per tal que hCNT3 s'inserti de manera correcta a la membrana apical de les cèl·lules (Fernández-Calotti et al. 2016).

Pel que fa les proteïnes d'interacció dels hENTs, per hENT2 només s'ha descrit PP1, mencionada anteriorment. hENT1 s'ha vist que està subjecte a la regulació mitjançant calmodulina, sota una senyalització de calci dependent de receptor. S'ha demostrat la interacció entre hENT1 i

calmodulina en presència de calci, i emprar quelants de calci o antagonistes de calmodulina produeix una disminució de l'entrada de nucleòsids (Bicket et al. 2016).

Cal destacar que recentment s'ha detectat un altre mecanisme de regulació dels hENTs, que és per oligomerització. L'estudi proposa que en situació basal, hENT1 es troba en membrana plasmàtica en forma d'homòmers. hENT2, en canvi, es troba en una regió submembrana, on és fosforilat per CKII (mencionat anteriorment). Quan PKC és activada, aquesta activa la fosfatasa PP1, la qual desfosforila hENT2. A continuació hi ha un canvi de localització d'hENT2, que passa a insertar-se a la membrana plasmàtica. La presència d'hENT2 a la membrana plasmàtica promou la formació d'heteròmers hENT1-hENT2. Aquests heteròmers redueixen la capacitat transportadora d'hENT1 mentre que afavoreixen el transport mitjançant per hENT2 (Grañe-Boladeras et al. 2019).

2.5 Distribució cel·lular i tissular dels NT

La localització dels transportadors de nucleòsids dins la cèl·lula s'entén de forma més clara si es posa en context de teixit, sobretot per aquells tipus cel·lulars en què hi ha co-expressió de transportadors concentratius i transportadors equilibratius de nucleòsids.

Generalment sempre s'ha considerat que l'expressió dels CNTs estava més associada a epitelis (re)absortius. Durant els últims anys aquesta afirmació s'ha posat en dubte, i es considera que l'expressió és més àmplia. Més concretament, hCNT1 s'expressa a alguna regió del cervell, a ronyó, a intestí prim i sobretot a fetge. hCNT2 s'expressa de forma força abundant a sistema nerviós central, al sistema immunitari de manera general però amb alta variabilitat, al cor, al múscul esquelètic, a fetge, a ronyó, a intestí, a pàncrees i a placenta. hCNT3, per altra banda, està més àmpliament expressat. Ha estat detectat en alguna regió del cervell, s'expressa a macròfags i monòcits, a pàncrees, al moll de l'os, a la tràquea, a l'intestí i de forma força abundant a glàndula mamària. Si s'agrupen els tres membres de la família *SLC28*, s'observa que l'activitat transportadora sodi-dependent es detecta en teixits epitelials especialitzats en l'absorció/reabsorció: fetge, ronyó i intestí prim (Molina-Arcas et al. 2009; Young et al. 2013).

En canvi, els ENTs són considerats ubics, amb variabilitat de nivells d'expressió considerable entre teixits. L'expressió d'hENT1 destaca a endoteli vascular, placenta, sistema nerviós central, cor, fetge, còlon i eritròcits – en aquest últim tipus cel·lular està relacionat amb un tipus de grup sanguini, Augustine (Daniels et al. 2015). hENT2 força abundant a endoteli vascular, cor, sistema nerviós central, placenta, tim, pàncrees, pròstata, ronyó i especialment a múscul esquelètic. hENT3, àmpliament descrit com a transportador intracel·lular, també és considerat ubic, però

l'expressió a placenta és més elevada. De fet, els sincitiotrofoblasts són l'únic tipus cel·lular en què s'ha detectat presència d'hENT3 a dominis de membrana plasmàtica apicals i basolaterals (Govindarajan et al. 2009). hENT4 és ubic també, però l'expressió és especialment abundant a múscul esquelètic, sistema nerviós central i principalment a cor (Molina-Arcas et al. 2009; Young et al. 2013).

La distribució cel·lular diferencial dels transportadors de nucleòsids ha estat estudiada en teixits epitelials, principalment fetge, ronyó, intestí, placenta i barrera hematoencefàlica. Estudis amb marcatge de fluorescència han demostrat que l'expressió dels CNT en epitelis polaritzats està pràcticament restringida a la membrana apical (Mangravite et al. 2001; Mangravite et al. 2003; Errasti-murugarren et al. 2007). Se suggereix que els residus 50-62 d'hCNT3 contenen la senyal d'exportació i modulen la inserció d'aquest transportador al domini apical de la membrana plasmàtica (Errasti-Murugarren and Pastor-Anglada 2010). Cal recordar també la variant hCNT3ins mencionada anteriorment, localitzada a reticle endoplasmàtic. La distribució dels hENTs, en canvi, és més diversa. hENT4 és exclusivament de membrana apical, mentre que hENT3 es troba en endosomes tardans, lisosomes i mitocondri. Pel que fa hENT1 i hENT2, ambdós s'han detectat tant a membrana plasmàtica com a membranes intracel·lulars. hENT1 es troba principalment a membrana basolateral, tot i que en algun teixit com ronyó es pot detectar a membrana apical (Mangravite et al. 2003). S'ha detectat en menor mesura a mitocondri, lisosomes, embolcall nuclear i reticle endoplasmàtic (Pisoni and Thoene 1991; Mani et al. 1998; Lai et al. 2004). hENT2 se situa principalment al domini basolateral de la membrana plasmàtica (Mangravite et al. 2003), tot i que també s'ha descrit la presència tant d'hENT2 WT com de les isoformes d'*splicing* a l'embolcall nuclear (Grañé-Boladeras et al. 2016). La presència d'hENT1, hENT2 i també hCNT3ins en compartiments intracel·lulars demostren que les famílies *SLC28* i *SLC29* estan implicades en la mobilització de nucleòsids entre compartiments intracel·lulars. Per tant, la distribució asimètrica dels transportadors en el mateix tipus cel·lular genera un flux vectorial de nucleòsids en el si de les cèl·lules i, en segons quin cas, del teixit (Molina-Arcas et al. 2009; Pastor-Anglada et al. 2018). La direccionalitat ve marcada pel fet que a la cara apical de manera general hi ha els CNTs, d'alta afinitat i unidireccionals, que promouen l'entrada de nucleòsids a dins la cèl·lula. En canvi els hENTs estan localitzats a la membra basolateral. Sent bidireccionals i de menor afinitat, l'entrada o sortida de nucleòsids serà determinada per la concentració relativa d'aquests en l'interior o exterior de la cèl·lula.

A ronyó s'ha detectat l'expressió dels tres transportadors concentratius així com d'hENT1 i hENT2. Els tres hCNT s'expressen al túbul contornejat proximal i al túbul distal, que són

segments implicats en la reabsorció (Pastor-Anglada et al. 2007). hENT1, a més, ha estat detectat a la cara apical de les cèl·lules epitelials del segment proximal (Damaraju et al. 2007) (Figura 7).

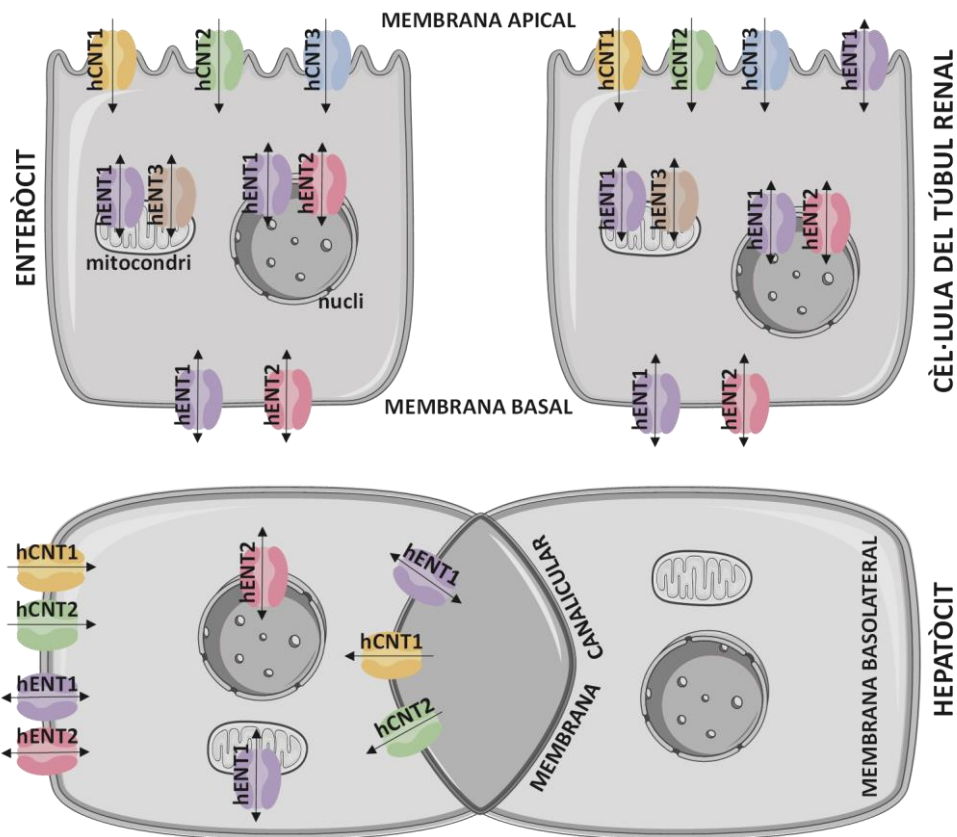


Figura 7. Representació esquemàtica de la localització subcel·lular d'hCNT1, hCNT2, hCNT3, hENT1 i hENT2. S'indiquen les distribucions a enteròcit, cèl·lula del túbul renal i hepatòcit. Adaptat d'Errasti-Murugarren et al. 2010.

A intestí, la distribució cel·lular dels transportadors emfatitza la importància dels nucleòsids de la dieta en l'homeòstasi de nucleòtids. Es considera que els hCNTs es troben a la membrana apical i els hENTs a la membrana basolateral (Figura 7), tot i que la presència d'hENT2 a aquesta membrana és dubtosa (Young et al. 2013); d'aquesta manera el flux vectorial afavoreix l'absorció dels nucleòsids. A l'intestí, a més, es creu que el flux vectorial és intratissular. hCNT1 i hCNT2 són abundants als enteròcits, fent la funció d'absorció. Sembla que hENT1 i hENT2 són més abundants a les cèl·lules de la cripta. En aquest context s'associa els hCNTs a enteròcits totalment diferenciats. Els hENTs presentarien una doble funció: per un cantó, als enteròcits, regularien l'exportació de nucleòsids i nucleobases a la membrana basolateral; per altra banda, l'expressió més elevada a cèl·lules de la cripta probablement estaria relacionada amb fenòmens de proliferació (Pastor-Anglada et al. 2018). Altres estudis dels transportadors de nucleòsids al llarg del tracte intestinal demostren que els tres hCNT estan distribuïts al llarg de l'intestí seguint

un gradient proximal-distal (Molina-Arcas and Pastor-Anglada 2009). Tant és així que estudis funcionals demostren la presència d'hCNT1 i hCNT2 al jejú, però no hCNT3. L'accessibilitat a les dades *online* ha permès entendre aquest gradient d'expressió a nivell d'mRNA gràcies a EMBL-EBI Expression Atlas, revisat a Pastor-Anglada et al. 2018. Dels tres transportadors concentratius, hCNT3 presenta una expressió més constant al llarg del tracte, mentre que hCNT1 i hCNT2 presenten expressió més elevada a duodè i intestí prim (Figura 8). En canvi, els hENTs (especialment hENT1) són més abundants a esòfag i estómac (Figura 8), suggerint un possible rol compensatori entre hENTs i hCNT1 i hCNT2 (Pastor-Anglada et al. 2018).

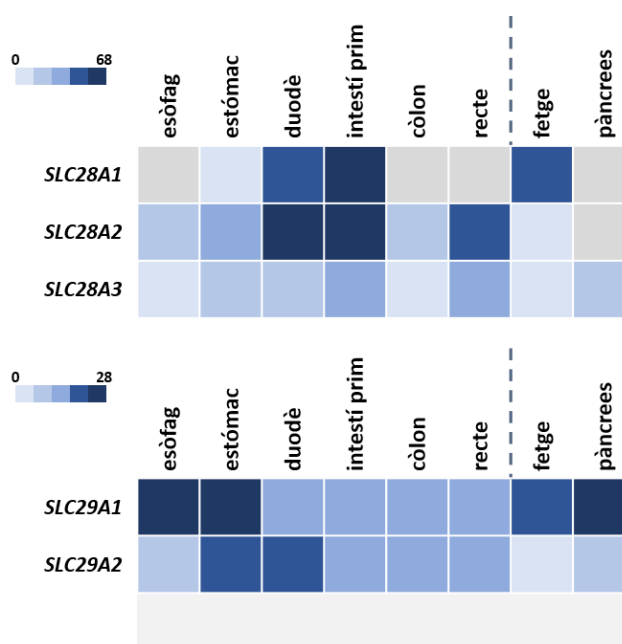


Figura 8. Expressió d'mRNA d'SLC28A1, SLC28A2, SLC28A3, SLC29A1 i SLC29A2 al llarg del tracte gastrointestinal. Adaptada de Pastor-Anglada et al., 2018.

La distribució a fetge és diferent a les descrites anteriorment. Cal considerar que el fetge és l'òrgan que contribueix de manera majoritària a la síntesi *de novo* de purines i pirimidines, de manera que suposa una font de nucleòsids independent de dieta per aquells teixits que no poden fer síntesi *de novo*. De l'expressió dels transportadors de nucleòsid al fetge en destaca que l'mRNA d'SLC28A3 és molt minoritari en comparació amb SLC28A1 i SLC28A2 (Govindarajan et al. 2009). De fet, l'expressió d'hCNT3 que hi pugui haver a fetge s'associa a macròfags infiltrats i no a hepatòcits. Pel que fa als altres transportadors, es distingeixen dos dominis. Per un cantó, a la membrana sinusoïdal hi ha els transportadors de nucleòsids que afavoreixen la sortida dels nucleòsids formats per síntesi *de novo*. Alhora, també permeten la captació dels nucleòsids i

nucleobases fisiològics. Així, hCNT1 i hCNT2 participen de l'absorció de nucleòsids, mentre que hENT1 i hENT2 faciliten l'entrada o sortida en funció de les concentracions internes de nucleòsids (Figura 7). Per altra banda, hCNT1 i hCNT2 presents a la membrana canalicular s'encarreguen de la recaptació de nucleòsids cap a l'hepatòcit. hENT1, de forma similar que a la membrana sinusoidal, permet l'entrada o sortida de nucleòsids en funció de la concentració relativa de nucleòsids a la membrana oposada (Figura 7) (Govindarajan et al. 2009; Young et al. 2013).

3. Associació dels transportadors de nucleòsids a la patologia

3.1 Paper farmacològic dels transportadors de nucleòsids: anàlegs de nucleòsids

Els anàlegs de nucleòsids i nucleòtids són compostos sintètics amb modificacions químiques que han estat desenvolupats per a mimetitzar els nucleòsids naturals. Aquests anàlegs han estat emprats com a fàrmacs per a tractar tumors sòlids, malalties limfoproliferatives, infeccions virals i algunes malalties inflamatòries com Crohn o artritis reumatoide (Minuesa et al. 2011; Jordheim et al. 2013). Els transportadors de nucleòsids són d'importància vital en l'ús dels anàlegs de nucleòsids com a fàrmac, ja que de manera similar als nucleòsids, permeten l'entrada dels anàlegs a la cèl·lula. Tanmateix, les modificacions químiques dels anàlegs poden alterar la seva capacitat d'interacció amb aquests transportadors (revisat a Cano-Soldado and Pastor-Anglada 2012). Per exemple, els fàrmacs antivirals als quals els manca el 3'OH de la ribosa perden la capacitat per interaccionar amb hCNT1, de manera que aquest residu sembla ser essencial per a la translocació (Cano-Soldado et al. 2004). Els fàrmacs anàlegs de nucleòsids tenen poca bioassequibilitat oral, de manera que la majoria són administrats per via intravenosa – excepte els aprovats per la FDA per a l'administració oral: 6-mercaptapurina, capecitabina i fludarabina.

El mecanisme d'acció dels anàlegs de nucleòsid per tractar tumors és força comú per a tots ells. El fàrmac, a l'entrar a la cèl·lula, interacciona amb els enzims del metabolisme de purines o pirimidines (segons el cas), i és convertit en anàleg de nucleòtid. Aquests poden ser incorporats als àcids nucleics i, en molts casos, inhibeixen els enzims implicats en la síntesi del DNA, amb el consegüent dany a la doble hèlix i inducció de l'apoptosi (Parker 2009). Les diferències entre els diferents anàlegs rauen normalment en la diferent capacitat de cadascú d'interaccionar amb els enzims del metabolisme de purines i pirimidines. Els anàlegs emprats per tractament tumoral estan recollits a la Taula 4. Generalment, els anàlegs de purina són més habituals per a tractar càncers hematològics, mentre que els anàlegs de pirimidina són més eficaços contra tumors sòlids (Pastor-Anglada and Pérez-Torras 2015).

Els anàlegs de nucleòsids emprats com a fàrmacs antivirals són estructuralment més diversos que els antitumorals, ja que poden ser nucleòsids, nucleòtids o nucleòsids acíclics (De Clercq and Holý 2005). La forma d'actuar és diferent també: inhibeixen les DNA polimerases i les transcriptases reverses virals. La Taula 5 recull els fàrmacs emprats per al tractament antiviral (Pastor-Anglada and Pérez-Torras 2015). Cal destacar, en aquest cas, que alguns dels fàrmacs no són transportats exclusivament per les famílies *SLC28* i *SLC29*. La família *SLC22* codifica transportadors de cations orgànics, i està composta per 22 membres que s'organitzen segons homologia de seqüència en hOCTs, hOATs i hOCTNs. Aquests transportadors són molt rellevants

per la seva capacitat de transportar un ampli rang de fàrmacs. Els anàlegs de nucleòsids antivirals poden ser transportats per algun membre de la família *SLC22*, però a més alguns fàrmacs com abacabir o zidovudina són inhibidors d'hOCT1, hOCT2 i hOCT3 (Minuesa et al. 2009).

Les tiopurines, com la 6-mercaptapurina i la 6-tioguanina, són un altre tipus d'anàleg de nucleòsids que s'utilitza per al tractament de malalties inflamatòries intestinals i patologies reumatoides. Sembla que part de la seva funció immunosupressora procedeix de la inducció de l'apoptosi en limfòcits (Bär et al. 2013; Friedman et al. 2014). Les tiopurines esmentades són anàlegs de nucleobase, com el 5-fluorouracil emprat per a tractament antitumoral. Tot i que no hi ha evidències respecte a la capacitat dels hCNTs de transportar nucleobases naturals, alguns estudis relacionen la resistència a aquests anàlegs a l'expressió reduïda d'hCNT1, hCNT2 i hCNT3 (Gloeckner-Hofmann et al. 2006; Peng et al. 2008).

FÀRMAC	TRANSPORTADOR	REFERÈNCIA
Patologies limfoproliferatives		
Mercaptopurina	hCNT3, hENT1, hENT2	(Fotoohi et al. 2006; Yao et al. 2011)
Citarabina	hCNT1, hENT1, hENT2	(Smith et al. 2004; Clarke et al. 2006)
Fludarabina	hCNT2, hCNT3, hENT1, hENT2	(King et al. 2006)
Pentostatina	hENT1, hENT2	(Wiley et al. 1991)
Cladribina	hCNT2, hCNT3, hENT1, hENT2	(King et al. 2006)
Azacitidina	hCNT1, hCNT2, hCNT3, hENT1, hENT2, hENT3, hENT4	(Rius et al. 2009; Damaraju et al. 2012)
Clofarabina	hCNT2, hCNT3, hENT1, hENT2	(King et al. 2006)
Nelarabina (AraG) ¹		
Decitabina	hENT1, hENT2	(Damaraju et al. 2012; Arimany-Nardi et al. 2014)
Tumors sòlids		
Floxuridina	hCNT1, hCNT2, hCNT3	(Lang et al. 2001; Smith et al. 2004; Hu et al. 2006)
Gemcitabina	hCNT1, hCNT3, hENT1, hENT2, hENT3	(Mackey et al. 1999; Hu et al. 2006; Govindarajan et al. 2009)
Capecitabina (5-DFUR) ²		
5-Fluorouracil	hENT1, hENT2, hOAT2	(Kobayashi et al. 2005; Yao et al. 2011)

Taula 4. Anàlegs de nucleòsids emprats per tractaments antitumorals. 1: Nelarabina és un pro-fàrmac d'AraG, el qual és translocat per hENT1 i hENT2 (Prus et al. 1990). 2: Capecitabina és un pro-fàrmac de 5-DFUR, el qual és translocat per hCNT1, hCNT2, hCNT3, hENT1 i hENT2 (Lang et al. 2001; Mata et al. 2001; Molina-Arcas et al. 2006; Errasti-murugarren et al. 2007). Adaptada de Pastor-Anglada and Pérez-Torras 2015.

FÀRMAC	VIRUS	TRANSPORTADOR	REFERÈNCIA
Ribavirine	VHC	hCNT2, hCNT3, hENT1, hENT2	(Jarvis et al. 1998; Patil et al. 1998; Hu et al. 2006; Govindarajan et al. 2009; Fukuchi et al. 2010)
Sofosbuvir	VHC	hOATP1B1	(Furihata et al. 2014a)
Adefovir	VHB	hOAT1, hOAT3	(Cihlar et al. 1999; Cihlar et al. 2001; Uwai et al. 2007)
Entecavir	VHB	hOAT1, hOAT3, hPEPT1	(Xu et al. 2013; Xu et al. 2014)
Telbivudine	VHB		
Lamivudine	VIH, VHB	hENT3, hOCT1, hOCT2, hOCT3	(Jung et al. 2008; Govindarajan et al. 2009; Minuesa et al. 2009)
Tenofovir	VIH, VHB	hOAT1, hOAT3	(Cihlar et al. 2001; Uwai et al. 2007)
Emtricitabine	VIH, VHB	hOCT1, hOCT2, hOCT3	(Minuesa et al. 2009)
Zidovudine	VIH	hCNT1, hCNT3, hENT2, hENT3, hOAT1, hOAT2, hOAT3, hOAT4	(Yao et al. 2001; Takeda et al. 2002; Cano-Soldado et al. 2004; Smith et al. 2004; Baldwin et al. 2005; Hu et al. 2006; Minuesa et al. 2009)
Didanosine	VIH	hCNT2, hCNT3, hENT1, hENT2, hENT3	(Rltee et al. 1998; Ritzel et al. 2001a; Yao et al. 2001; Baldwin et al. 2005; Hu et al. 2006)
Zalcitabine	VIH	hCNT3, hENT1, hENT2, hOCT1, hOCT2	(Ritzel et al. 2001a; Yao et al. 2001; Baldwin et al. 2005; Jung et al. 2008)
Stavudine	VIH	hCNT1, hCNT3, hENT3	(Cano-Soldado et al. 2004; Hu et al. 2006; Govindarajan et al. 2009)
Abacavir	VIH	hOCT1, hOCT2, hOCT3	(Minuesa et al. 2009)
Aciclovir	Herpes	hOCT1, hOAT1, hOAT2	(Takeda et al. 2002; Cheng et al. 2012)
Penciclovir	Herpes	hOAT1, hOAT2, hOAT3	(Cheng et al. 2012)
Famciclovir ¹	Herpes		
Ganciclovir	Herpes, CMV	hOCT1, hOAT1, hOAT2	(Takeda et al. 2002; Cheng et al. 2012)
Valaciclovir	Herpes, CMV, EBV	hPEPT1, hPEPT2, ATB(0,+)	(Ganapathy et al. 1998; Hatanaka et al. 2004)
Cidofovir	CMV	hOAT1, hOAT3	(Cihlar et al. 1999; Uwai et al. 2007)
Valganciclovir	CMV	hPEPT1, hPEPT2, ATB(0,+)	(Sugawara et al. 2000; Umapathy et al. 2004)

Taula 5. Anàlegs de nucleòsids emprats com a tractaments antivirals. 1: Famciclovir és un pro-fàrmac de Penciclovir. VHC: Virus de l'Hepatitis C; VHB: Virus de l'Hepatitis B; VIH: Virus de la Immunodeficiència Humana; CMV: Citomegalovirus; EBV: Virus Epstein-Barr. Adaptada de Pastor-Anglada and Pérez-Torras 2015.

3.2 Transportadors de nucleòsids directament associats a fenotips patològics

El metabolisme de purines i pirimidines comprèn les vies de recuperació, les vies de síntesi *de novo* i les vies de degradació, així com els transportadors de nucleòsids. S'han descrit varies patologies hereditàries associades a defectes en aquestes vies metabòliques. Aquestes malalties

són categoritzades com a malalties rares, i s'han associat a més de 30 deficiències enzimàtiques (Jurecka 2009). La simptomatologia d'aquestes patologies sol ser variada en funció de l'origen de la disfunció, però de forma general els casos presenten anèmia, immunodeficiència, càlculs renals, convulsions, discapacitat intel·lectual, autisme i retard de creixement (Balasubramaniam et al. 2014).

Fins el moment no s'ha presentat cap cas de patologia associada als transportadors concentratius de nucleòsids. En canvi, la família *SLC29* sí que ha estat relacionada directament a fenotips patològics. S'han detectat tres pacients que no expressen hENT1, els quals presenten mineralització ectòpica. Tanmateix, no està clar que les variants d'*SLC29A1* estiguin associades directament a aquest fenotip (Daniels et al. 2015). L'únic transportador de nucleòsids directament associat a malalties hereditàries és hENT3. Mutacions a la regió codificant del gen *SLC29A3* han estat associades a síndrome H, una dermatosi de caràcter hereditari autosòmic recessiu que presenta manifestacions sistèmiques (Molho-Pessach et al. 2008; Bolze et al. 2012; Huber-Ruano et al. 2012). Altres variants han estat associades a hipertricosi pigmentosa amb síndrome de diabetis mellitus no autoimmune dependent d'insulina (PHID) (Cliffe et al. 2009), síndrome de Faisalabad histiocitosi (FHC) i malaltia de Rosai-Dorfman (Morgan et al. 2010).

Els tumors comprenen un fenotip patològic completament diferent. Els transportadors de nucleòsids tenen un rol important en càncer degut a la seva capacitat de transportar fàrmacs antitumorals anàlegs de nucleòsids, tal i com s'ha indicat en l'apartat 3.1. A més, les cèl·lules tumorals presenten una alta taxa de proliferació, de manera que es pensaria que els transportadors de nucleòsids tenen un paper fonamental a l'hora de mantenir la demanda de nucleòsids per a les duplicacions genòmiques i altres funcions. Els transportadors equilibratius de nucleòsids estan associats a fenotips més proliferatius, i en les cèl·lules tumorals es mantenen. En canvi, l'expressió dels hCNT està més vinculada a teixits diferenciats (Pastor-Anglada and Pérez-Torras 2015). El procés d'oncogènesi ha estat associat a la pèrdua d'expressió dels transportadors concentratius de nucleòsids, sobretot hCNT1: en tumors ginecològics (Farré et al. 2004), hepatocarcinoma (Zollner et al. 2005; Martinez-Becerra et al. 2012), tumors en bufeta urinària (Mey et al. 2006), càncer de mama (Gloeckner-Hofmann et al. 2006; Lane et al. 2010), adenocarcinoma pancreàtic (Bhutia et al. 2011; Mohelnikova-Duchonova et al. 2013) i colangiocarcinoma (Urtasun et al. 2017). Tanmateix, cal aprofundir en la relació de la pèrdua d'hCNT1 i l'oncogènesi, donat que la majoria d'aquests estudis estan realitzats a nivell d'RNA.

4. Funcions emergents dels transportadors de nucleòsids

La majoria d'estudis realitzats sobre els transportadors de nucleòsids se centren en la seva capacitat translocadora i en mecanismes o fenotips que la regulen. Tanmateix, en els últims anys s'ha proposat que els transportadors de nucleòsids podrien tenir rols accessoris.

La majoria de cèl·lules expressa més d'un transportador de nucleòsids. Si s'analitza el perfil d'entrada de nucleòsids en aquestes cèl·lules s'observa una certa redundància funcional, donat que sovint els transportadors que s'expressen presenten la mateixa selectivitat de substrats (Pastor-Anglada and Pérez-Torras 2015). També cal destacar el possible rol del domini N-terminal dels transportadors concentratius de nucleòsids. Segons alineament de seqüències amb ortòlegs procariotes, el domini N-terminal dels hCNT és adquirit al llarg de l'evolució. Donat que els ortòlegs procariotes presenten capacitat de transport, se suggereix que aquest domini N-terminal no és essencial per a la capacitat transportadora de les proteïnes, sinó que podria dotar-les de funcions accessòries.

El concepte transceptor prové de la contracció de transportador i receptor. El concepte va ser encunyat al grup de Johan Thevelein l'any 1999 després del seu estudi de la permeasa general d'aminoàcids de *Saccharomyces cerevisiae*, Gap1. Van observar que el transportador Gap1 era necessari per a la senyalització mitjançada per PKA en cèl·lules que primer havien estat desproveïdes d'aminoàcids i posteriorment suplementades amb aminoàcids. Per tant, Gap1 integrava dues funcions: la de transportador d'aminoàcids i la de receptor per a la senyalització de PKA (Donaton et al. 2003). En els següents anys s'han trobat evidències d'altres transceptors en llevat relacionats amb la senyalització de PKA, com els transportadors de ferro Ftr1 i de zinc Zrt1 (Rubio-Teixeira et al. 2010; Schothorst et al. 2017).

En primera instància es va creure que l'existència de proteïnes amb capacitat transceptora estava restringida a eucariotes inferiors, com llevats. No es va trigar en identificar transceptors a altres regnes d'éssers vius. És el cas del sensor d'alta afinitat d'aminoàcids (PATH) de *Drosophila melanogaster* (Goberdhan et al. 2005), o el transportador d'amoní AMT1-3 en plantes (Rogato et al. 2010). En mamífers s'han descrit fins el moment 6 membres de la superfamília SLC com a transceptors. El gen *SLC5A4* codifica el transportador de glucosa SGLT3, un membre de la família *SLC5* de cotransportadors de sodi/glucosa que no havia estat prèviament caracteritzat. SGLT3 presenta un 70% d'identitat d'aminoàcids amb SGLT1, però estudis funcionals van revelar que no té capacitat de translocar glucosa tot i estar a la membrana plasmàtica. En canvi, es va veure que produïa un canvi de potencial de membrana. Es va suggerir, doncs, que SGLT3 és un sensor de glucosa (Díez-Sampedro et al. 2003). El gen *SLC38A2* codifica

el transportador d'aminoàcids SNAT2. S'ha demostrat que SNAT2, en presència d'aminoàcids, produeix una senyal receptora de la transcripció del mateix SNAT2, de forma anàloga a Gap1 de *S. cerevisiae* i PATH de *D. melanogaster* (Hyde et al. 2007).

Els altres casos de membres de la superfamília SLC detectats com a transceptor han estat més relacionats amb fenotips patològics. El primer en detectar-se va ser el gen *SLC5A5*, que codifica el transportador de sodi i iodur NIS (*sodium iodide symporter*). Es va detectar que durant alguns processos de carcinogènesi augmenta l'expressió d'aquest transportador i canvia la seva localització de membrana plasmàtica a dominis intracel·lulars. La nova localització és causada per la interacció del seu domini C-terminal amb la proteïna LARG (*Leukemia-associated RhoA guanine exchange factor*), que segresta NIS impedit que s'inserti a la membrana plasmàtica. Una variant de NIS que manca de capacitat transportadora produeix els mateixos efectes (Lacoste et al. 2012). El transportador de monocarboxilats acoblat a sodi 1 (SMCT1), codificat pel gen *SLC5A8*, presenta disminució d'expressió en tumors. L'expressió ectòpica d'SMCT1 en cèl·lules tumorals transloca la proteïna antiapoptòtica survivina a la membrana plasmàtica a través d'interacció proteïna-proteïna. Aquest canvi de localització de la survivina indueix aturada de cicle cel·lular i apoptosi. Els efectes d'SMCT1 són independents de transport (Coothankandaswamy et al. 2013). El gen *SLC6A4* codifica el transportador de serotonina. S'havia hipotetitzat que la serotonina estava implicada en el procés patogènic de malalties autoimmunitàries i inflamacions cròniques. Un estudi va revelar que els efectes no són causats per la serotonina *per se* sinó que és el transportador *SLC6A4* el que provoca les desregulacions que duen a aquests processos patogènics (Tanaka et al. 2014).

S'ha descrit que hCNT1 també és un transceptor. Tal i com s'ha exposat anteriorment, l'expressió d'hCNT1 està associada a diferenciació, mentre que en tumors és reduïda. Les línies cel·lulars tumorals no presenten activitat d'hCNT1, a nivell proteic és indetectable i els nivells de mRNA estan disminuïts dramàticament. La restitució d'hCNT1 a línies cel·lulars tumorals produeix una alteració de l'estat de fosforilació de quinases intracel·lulars, com Akt, redueix la migració cel·lular, redueix la progressió del cicle cel·lular i promou la hiperactivació de PARP. Finalment, s'indueix una mort cel·lular per una via que no és apoptosi. A més, la restitució d'hCNT1 és capaç de reduir el creixement tumoral en models de ratolí d'adenocarcinoma pancreàtic. Tots aquests efectes no es poden explicar simplement per l'increment de l'entrada de pirimidines a les cèl·lules, ja que també han estat observats en restituir-se l'expressió d'hCNT1S546P, la variant d'hCNT1 que s'inserta a membrana plasmàtica però no presenta capacitat translocadora. Per tant, se suggereix que els efectes provenen de la capacitat d'hCNT1 com a sensor (Pérez-Torras et al. 2013).

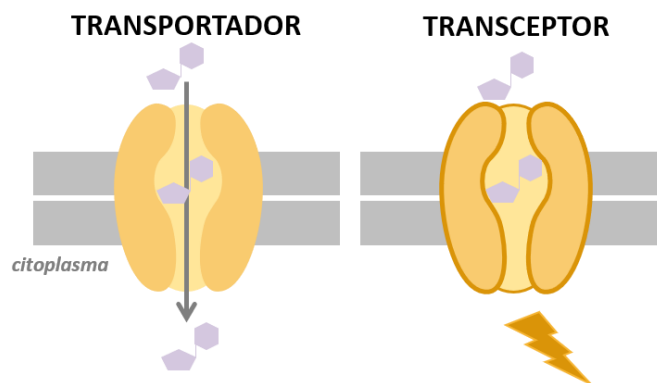


Figura 9. Esquema representatiu de la comparativa entre transportador i transceptor. Adaptada de Pastor-Anglada and Pérez-Torras 2018.

Fins el moment, es desconeix si hCNT2 i hCNT3 són transceptors, però no es descarta que ho puguin ser (Pastor-Anglada and Pérez-Torras 2018). Tal i com s'ha mencionat anteriorment, hCNT2 interacciona amb Aldolasa B i GRP58; aquest fet podria relacionar hCNT2 amb el metabolisme energètic (Huber-Ruano et al., 2010). Per altra banda, hCNT2 i hCNT3 presenten capacitat de translocar adenosina, de manera que podrien ser sensors d'adenosina. S'ha vist en models de cervell de rata que en situacions d'increment d'adenosina, rCNT2 està disminuït (Guillén-Gómez et al. 2004; Medina-Pulido et al. 2013). A més, l'adenosina transportada per CNT2 pot activar AMPK en varis models cel·lulars (Aymerich et al. 2006). Addicionalment, rCNT3 en colangiòcits està regulat pel receptor d'adenosina A2AR (Godoy et al. 2014).

Pel que fa els transportadors equilibratius de nucleòsids, no es descarta la seva inclusió a la categoria de transceptors. Per hENT1, els efectes que es podrien relacionar amb funcions més enllà del transport estan relacionats amb la internalització d'adenosina. Així, la inhibició d'ENT1 o la baixa expressió d'aquest transportador contribueixen a la cardioprotecció per augment dels nivells d'adenosina circulants (Rose et al. 2010; Ramadan et al. 2014). L'alteració de l'expressió d'ENT1 a sistema nerviós central produeix canvis de comportament associats a desordres d'addicció en models de ratolí, com excés d'ingesta d'alcohol (Nam et al. 2011; Nam et al. 2013). Altres canvis en el SNC estan relacionats amb l'alteració de la funció astrocítica (Hinton et al. 2014). Finalment, s'ha postulat el gen *SLC29A1* com a possible biomarcador de la malaltia de Huntington, ja que s'ha detectat augment de l'expressió a nivell de mRNA (Guitart et al. 2016). Per hENT2, a l'apartat 2.3.1 s'ha descrit l'existència de dues variants d'*splicing* del gen *SLC29A2*. Aquestes dues variants, juntament amb hENT1, han estat identificades com a elements clau del control de *pools* de nucleòsids i nucleòtids per a la síntesi de DNA i la progressió del cicle cel·lular (Grañé-Boladeras et al. 2016).

OBJECTIUS

Els transportadors de nucleòsids tenen un paper clau en la recuperació de nucleòsids extracel·lulars. En molts teixits s'expressen alhora els transportadors concentratius de nucleòsids (hCNT, família gènica *SLC28*) i els transportadors equilibratius de nucleòsids (hENT, família gènica *SLC29*), el que suggeriria una aparent redundància funcional. L'expressió dels transportadors de nucleòsids s'ha vist alterada en diversos tipus de tumors. Concretament, s'ha descrit que en diferents tipus de càncer l'expressió dels transportadors concentratius de nucleòsids disminueix, sobretot hCNT1. Tenint en compte que es tracta d'un context en què s'esperaria una alta demanda de nucleòsids per satisfer les taxes de proliferació, aquesta pèrdua d'expressió dels hCNTs podria anar lligada a altres funcions més enllà de la translocació de nucleòsids. En aquest sentit, s'ha descrit que hCNT1 és un transceptor, ja que la seva restitució en models tumorals activa vies de senyalització i produeix una sèrie de canvis de caràcter supressor de tumors que són independents de la seva capacitat de transport.

Amb aquests antecedents s'hipotetitzava que la pèrdua d'expressió d'hCNT1 es produiria en un pas primerenc de la carcinogènesi. Les cèl·lules esdevenen tumorals com a conseqüència d'alteracions genètiques i epigenètiques, les quals comporten canvis d'expressió d'elements que regulen la proliferació i la mort cel·lular, entre altres. La regulació d'hCNT1, doncs, podria estar inclosa en aquest procés complex.

Així doncs, l'objectiu principal d'aquesta tesi és elucidar els mecanismes de regulació de d'hCNT1, des de nivell proteic fins a l'estudi de la regulació transcripcional del gen *SLC28A1*.

Els objectius concrets del projecte són els següents:

1. Caracteritzar la proteïna hCNT1
 - 1.1. Estudiar el primer cas clínic en què hCNT1 s'associa a patologia
 - 1.2. Analitzar l'interactoma d'hCNT1 com a element regulador
2. Elucidar la regulació de l'expressió dels membres de les famílies *SLC28* i *SLC29*
 - 2.1. Determinar la implicació de l'epigenètica en la regulació de l'expressió dels gens que codifiquen els transportadors de nucleòsids
 - 2.2. Identificar els factors de transcripció implicats en la regulació dels transportadors de nucleòsids

MATERIALS I MÈTODES

1. PCR i tècniques derivades

La *Polymerase chain reaction* (PCR) és la tècnica emprada per a l'amplificació de DNA *in vitro* (Mullis et al. 1992). La metodologia es basa en un seguit de cicles repetitius d'oscil·lació tèrmica, els quals presenten tres fases que permeten la desnaturalització del DNA, la unió dels *primers* (o encebadors) i la replicació enzimàtica del DNA. El material necessari per a dur-la a terme consta de DNA motlle, un enzim termoestable amb activitat DNA polimerasa, dNTPs, un parell de *primers* dirigits a la seqüència diana i el tampó de reacció.

Excepte per la seqüenciació (apartat 1.4) i per la prova de micoplasma (apartat 3.1.3.), la polimerasa emprada en aquesta tesi és la Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific).

Degut a l'alta sensibilitat de la PCR, és vital evitar la contaminació mitjançant l'ús de material autoclavat i solucions estèrils. La preparació de la reacció ha de ser en gel. L'ordre d'addició dels reactius també és important, ja que la Phusion té també activitat 3'-5' exonucleasa i podria degradar els *primers* en absència de dNTPs. Components:

- H₂O: fins a 20 o 50µL, segons el volum final de reacció.
- Tampó de reacció 5X. Per defecte, HF.
- 200µM de cadascun dels dNTPs.
- 0,5µM de *primer forward* i 0,5µM de *primer reverse*.
- DNA motlle. La quantitat depèn de la complexitat d'aquest. Els plasmidis o els BAC són considerats DNA de baixa complexitat i se'n necessiten entre 1pg i 10ng (reacció de 50µL). Pels de major complexitat, calen 50-250ng. Si el motlle és el cDNA, el volum no pot excedir el 10% del volum final de PCR; en el nostre cas, hi posem 2µL, que són 100ng de cDNA (50ng/µL).
- 0,02U/µL de Phusion.

La reacció consisteix en 25-35 cicles, a més d'una desnaturalització inicial (30" a 98°C) i una extensió final (5-10min a 72°C). Els cicles comprenen per desnaturalització (10" a 98°C), anellament (30") i extensió (72°C). La temperatura d'anellament depèn de la parella de *primers*; per calcular-la s'empra l'eina *Tm calculator* de Thermo Fisher. El temps d'extensió depèn de la llargada i la complexitat del fragment a amplificar; generalment, 30 segons/kb.

En el cas d'aquesta tesi, la PCR estàndard s'ha emprat per detectar el DNA de promotor immunoprecipitat en la tècnica CHIP (veure apartat 7.2).

1.1 Introducció de dianes de restricció

Per tal que els inserts d'interès puguin ser clonats en un vector d'expressió, cal que estiguin flanquejats per dianes de restricció. Les dianes es col·loquen a l'extrem 5' en cada *primer* (sentit 5'-3'). A més, cal afegir nucleòsids necessaris a l'extrem per tal que l'endonucleasa funcioni correctament (el nombre depèn de l'enzim – es pot consultar a New England Biolabs <https://international.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/cleavage-close-to-the-end-of-dna-fragments>). S'escullen les endonucleases en funció de la no presència de dianes al nostre insert, que estiguin al *MultiCloning Site* (MCS) del vector, i idealment que siguin diferents per cada *primer* i en ordre 5'-3' dins el MCS per assegurar l'orientació adequada de l'insert. Així doncs, el *primer* constarà d'una regió no homòloga (diana de restricció i nucleòtids necessaris per a la digestió) i d'una regió homòloga de mínim 20 kb per afavorir l'anellament correcte dels *primers* i la seqüència a amplificar. La Taula 6 conté els *primers* emprats en aquesta tesi.

Primer	Seqüència (5'-3')	Diana de restricció
Promotor de SLC28A1		
hCNT1 -2461 fw	TAGCTCGAGACCTATAATAGACAGGGACAT	XhoI
hCNT1 -1069 fw	TAGCTCGAGCCAGGTTTAGGAGAGAAGAAT	XhoI
hCNT1 TSS rv	CAGAAGCTTTGGGCCCTAATCTCTACAACA	HindIII
hCNT1 +746 rv	CGGAAGCTTTATTCATTTTCCAATAGGGGA	HindIII
hCNT1 ATG rv	CGGAAGCTTGTCCAGACCTTCCAGCTGAA	HindIII
hCNT1 +746 fw	TAGCTCGAGTCCCCTATTGGAAAATGAATA	XhoI
hCNT1 +1695 rv	CAGAAGCTTGCCAGGCTGTTAGCTTTTTGC	HindIII
hCNT1 down Fw	ATTCTCGAGTGGGGAAAGGAGGCCATGGGAA	XhoI
hCNT1 down Rv	CGGAAGCTTAGAGGGAAGCACACGTCTCTGT	HindIII
Promotor de SLC28A2		
hCNT2 fw -3695	GCTACGCGTTCTCAAGTCCTGCTGCTACTGGT	MluI
hCNT2 fw -742	GCTACGCGTTGTCTCACACGGAAAACGGT	MluI
hCNT2 ATG rv	CTACCCGGGCTCCTGTTCTCCTCAACTGAAA	SmaI
hCNT2 TSS rv	CAACCCGGGGAAAAGCTCAGCTGCGAGGGAG	SmaI
Factors de transcripció		
KLF6 fw	TCAAAGCTTATGGACGTGCTCCCATGTG	HindIII
KLF6 rv	ATTCTCGAGTCAGAGGTGCCTTTCATGTGCAG	XhoI
Ikaros fw	ACGAAGCTTATGGATGCTGATGAGGGTCA	HindIII
Ikaros rv	CTGCTCGAGTTAGCTCATGTGGAAGCGGT	XhoI
HNF1A fw	TACGAAGCTTATGGTTTCTAAACTGAGCCAGCTGC	HindIII
HNF1A rv	GTGAATTCTTACTGGGAGGAAGAGGCCATCTG	EcoRI
HNF1B fw	TACGAAGCTTATGGTGTCCAAGCTCACGTCGCT	HindIII
HNF1B rv	ATGAATTCTCACCAGGCTGTAGAGGACACT	EcoRI
RNF41		
RNF41 fw	GGGGTACCATGGGGTATGATGTAACCCGTTTC	KpnI
RNF41 rv	CGGAATTCTTATATCTTCCACGCCATG	EcoRI

Taula 6. Primers dissenyats per a la clonació dels fragments de promotor putatiu de SLC28A1, promotor putatiu de SLC28A2, de factors de transcripció i de RNF41. Els nucleòtids subratllats corresponen a la diana de restricció, indicada a l'última columna. Els nucleòtids homòlegs al clon es troben a 3' de la diana.

1.2 PCR de mutagènesi dirigida

S'ha emprat la DNA polimerasa Phusion per realitzar la mutagènesi dirigida en quatre casos. Primer, per introduir les substitucions corresponents a les variants d'hCNT1 estudiades. En segon lloc, per mutar la lisina 19 (K19) d'hCNT1. En tots dos casos els canvis de nucleòtids han estat introduïts en un dels dos *primers*, el *forward*. El tercer cas de mutagènesi dirigida ha estat per deletar possibles zones repressores del promotor putatiu de *SLC28A1*. Per últim, s'han generat les variants d'*splicing* de KLF6, KLF6-sv1 i KLF6-sv2. Ambdues variants difereixen de KLF6-FL per la manca d'un segment de CDS continu, de manera que s'ha deletat en cada cas el fragment corresponent. L'estratègia en aquest cas consisteix en dissenyar els *primers* homòlegs a les seqüències flanquejants al fragment que es vol deletar, de manera que no s'amplifica.

Primer	Seqüència (5'-3')
Variants d'hCNT1	
R510C fw	CAAGCAATGCGCCTGGCAGGGGCCGAG
R510C rv	CTGCCAG GCGGCATTGCTTGTACTTGGAGA
R561C fw	GGTCCCCAACAGAAGAGCGACTTCTCC
R561C rv	CGCTCTTGTGGGGGACCATGGAGGT
hCNT1K19	
K19 rv	ATGGACTCTTCTCGTCTCGAGGGGTCGT
K19R fw	CTCTCTCACACCTGTGGCCAGAGGTCTG
K19T fw	CTCTCTCACACCTGTGGCCAGGGTCTG
Del K19 fw	CTCTCTCACACCTGTGGCCGGTCTGGAG
Delecions de fragments de promotor	
DEL YY1 BS1 fw	GAAACCCCATCTCTACTAAAAATAC
DEL YY1 BS1 rv	GTCAGGCTGGTCTCGAACTTCAA
DEL YY1 BS2 fw1	GGGAGATAGAGAAAGATGCAAATG
DEL YY1 BS2 fw2	GGAGGCCATGGGAAGGAAGGAGGGG
DEL YY1 BS2 rv	AACAGCAACCAATTTTCTGTGCTGGA
Variants d'<i>splicing</i> de KLF6	
KLF6 SV2 rv	GCTTCCCCGAAGTCCCGCTGCGCA
KLF6 SV2 fw	CAGGAGAAAAGCCTTACAGATGCTC
KLF6 SV1 rv	TCCCTGGCGAGGGCAGCTCC
KLF6 SV1 fw	AGGAGAAAAGCCTTACAGATGCTC

Taula 7. Primers dissenyats per a la generació de constructes luciferasa amb fragments deletats, les variants d'*splicing* de KLF6, les variants d'hCNT1 i mutacions d'hCNT1K19. S'indiquen en gris les substitucions realitzades.

En tots els casos, per tal de poder lligar el producte de PCR, cal que els *primers forward* i *reverse* estiguin fosforilats a l'extrem 5'. La fosforilació dels primers s'ha dut a terme mitjançant l'enzim T4 *Polynucleotide Kinase* (PNK, New England Biolabs). La PNK permet fosforilar com a màxim

50pmol de 5'termini. Es calcula la quantitat de mols de *primer* corresponents a 50pmol de 5'termini mitjançant les fórmules següents:

$$1 \mu\text{g } 20\text{mer} = 150 \text{ pmol } 5'\text{termini}$$
$$\text{pmol ssDNA} = \frac{\mu\text{g ssDNA}}{\text{Nb}} \cdot \frac{10^3 \text{ ng}}{1 \mu\text{g}} \cdot 3030$$

Per tant, la llargada del *primer* serà el que determinarà la quantitat de *primer* a fosforilar.

Cada *primer* és fosforilat per separat. La reacció consisteix en una incubació de 20 minuts a 37°C i 10 minuts a 75°C per inactivar l'enzim. Es prepara amb un volum final de 20µL, al qual s'hi afegeixen tampó A 10X, ATP a concentració final 1mM, el corresponent volum de *primer*, 10 U de PNK i la resta, aigua. Els *primers* són utilitzats directament per la PCR subseqüent. Aquesta PCR és lleugerament diferent a les convencionals. Primer, perquè s'utilitzen només 10pmol de cada *primer*, ja que d'altra manera s'arrossega massa proporció de la reacció de fosforilació i això pot interferir en el rendiment de la PCR. Segon, la mescla de dNTPs només conté dTTP, dCTP i dGTP, ja que el dATP estarà inclòs en el volum dels *primers* i un excés podria impedir la PCR.

1.3 Seqüenciació

Les seqüenciacions realitzades en aquesta tesi segueixen el mètode de Sanger. S'empren dideoxinucleòtids mancats del grup 3'hidroxil i marcats amb fluorescència, que en ser incorporats a una cadena creixent de DNA la formació d'aquesta s'atura. Per tant, en funció de quan s'hagin incorporat els dideoxinucleòtids, les cadenes tindran mides variables. La mescla de cadenes és separada mitjançant electroforesi capil·lar, i l'excitació dels dideoxinucleòtids amb un làser produeix l'emissió de fluorescència. Com que cada dideoxinucleòtid està marcat amb un color diferent (G, T, C i A), es genera un electrofluorogram del qual se n'obté la seqüència de DNA.

S'utilitza el kit de seqüenciació *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.1* (Applied Biosystems). La reacció es fa a un volum final de 20µL i conté *Big dye sequencing buffer* 5X, 1,25µM de *primer* (Taula 8), 100ng/kb DNA motlle i 1µL de *Ready reaction mix*.

La reacció consta de 25 cicles, a més de les fases de desnaturalització inicial (5 minuts a 96°C) i extensió final (15 minuts a 60°C). Els cicles presenten desnaturalització (10" a 96°C), anellament (5" a 50°C) i extensió (4 minuts a 60°C). El producte de PCR és enviat a la unitat de Genòmica del Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona. Els resultats obtinguts són comparats amb la seqüència original mitjançant l'eina bioinformàtica *Emboss Needle Pairwise sequence alignment* (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html).

Primer	Seqüència (5'-3')
Externs de vectors	
CMV fw (pcDNA3.1)	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
BGH rv (pcDNA3.1)	TAGAAGGCACAGTCGAGG
RLprimer3 fw (pGL3basic)	CTAGCAAAATAGGCTGTCCC
GLprimer2 rv (pGL3basic)	CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCCA
pEGFPN3 rv	CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG
hCNT1	
hCNT1 intern fw1	TACGCAGTGTCTGGA
hCNT1 intern fw2	GACATGGTGGACATCCA
hCNT1 intern fw3	ACAGAACCAGGATTCATTGC
hCNT1 intern fw4	ACAGAACCAGGATTCATTGC
hCNT1 intern rv1	TTCCTGTTGCCGACCCA
hCNT1 intern rv2	GCAATCAGGTTGGCAGCGAT
hCNT1 intern rv3	GCAATCAGGTTGGCAGCGAT
Promotor de <i>SLC28A1</i>	
Seq CNT1 fw1	GACCTGTAAACCGCAAATACG
Seq CNT1 rv1	CAGTTAGGCTGACATACTCAG
Seq CNT1 fw2	AGGTTGCAGTGAACCGAGCT
Seq CNT1 rv2	ACCACTATTGAGTTTGTGTGGC
Seq CNT1 fw3	CAAGGGTGAGAGAAAAGGACA
Seq CNT1 rv3	CTACCTGCTTTTCCACTTTGC
Seq CNT1 fw4	CTCTTCTGACAGTTCTTGTGC
Seq CNT1 rv4	CCACCTCCTGTTTTAGGGAAT
Seq CNT1 fw5	TAAAATTCGCCCTGCCTGGT
Seq CNT1 rv5	ACAAAATGGAAGGCCGAGTC
Seq CNT1 fw6	CATCTGACGGGATTCACAACA
Seq CNT1 rv6	AAGTGCTGGGATTACAGGCA
Seq CNT1 fw7	AGGTAGAGTCTTGCTCTGTGGCTA
Seq CNT1 rv7	AGAGTTCCGCACACTGTTGAGAG
Seq CNT1 fw8	GCTGGATGGTGAAGGAAATTA
Seq CNT1 rv8	ATGCCTGCACTCCCAGCACTTTG
Seq CNT1 fw9	TAGCTGGGACTACAGGCACCT
Promotor de <i>SLC28A2</i>	
Seq CNT2 fw1	GCTAACTTGCTTACCTTACAGGA
Seq CNT2 rv1	CTAAGCTATTTCTGGGCTGC
Seq CNT2 fw2	GGGTTTCACCATGTTGGCTA
Seq CNT2 rv2	CTCATGCCTGTACTCCAGA

Taula 8. Primers dissenyats per a la seqüenciació dels clons indicats. Els primers "Externs de vectors" són comercials.

2. Biologia molecular

En aquest apartat s'indiquen les tècniques emprades per a l'amplificació i purificació del DNA plasmídic. Cal recalcar que quan es treballa amb bacteris competents, es fa sempre en condicions d'esterilitat mitjançant la flama d'un encenedor Bunsen. A més, tot el material és prèviament autoclavat i només es pot obrir al costat de la flama.

2.1 Clonació en un vector

2.1.1 Vectors emprats

En aquesta tesi s'han emprat diferents tipus de vector en funció de l'ús. En tots els casos es tracta de vectors que repliquen en bacteris.

Vectors plasmídics

S'escull el vector en funció de l'ús posterior. Es poden classificar els vectors emprats en dos tipus:

- Vector d'expressió.
 - pcDNA3.1(+) (Clontech). Vector d'expressió a mamífers resistent a ampicil·lina, de 5,4 kb. Presenta el promotor de citomegalovirus (CMV) abans del MCS, que garanteix una alta expressió de l'insert. Després del MCS, hi ha una senyal de poliadenilació de l'hormona de creixement bovina (BGH) i seqüència de finalització de la transcripció, amb l'objectiu d'aconseguir un mRNA altament estable. En aquesta tesi s'ha emprat per a clonar hCNT1 i els seus mutants (KpnI + XbaI), KLF6 i les seves variants d'*splicing* (HindIII + XhoI), RNF41 (KpnI + EcoRI), HNF1A (HindIII + EcoRI), HNF1B (HindIII + EcoRI) i Ikaros (HindIII + XhoI).

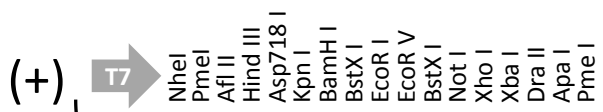


Figura 10. Esquema representatiu del *Multicloning site* del vector pcDNA3.1.

- Vector amb un gen reporter. El gen reporter es troba immediatament després o abans del MCS, de manera que el producte final és una quimera entre l'insert i el gen reporter. En aquesta tesi se n'empren dos:
 - pGL3-basic (Promega) (Figura 11). Vector que conté la regió codificant de l'enzim luciferasa de *Photinus pyralis*. La luciferasa catalitza l'oxidació de la luciferina, i com a conseqüència es produeix bioluminescència. El vector pGL3-basic no presenta cap mena de seqüència promotora o *enhancer upstream* del gen de la luciferasa; només

hi té el MCS. D'aquesta manera, l'expressió de la luciferasa està sotmesa a les regions reguladores clonades en el MCS. En aquesta tesi, el vector pGL3-basic ha estat emprat per clonar diferents regions dels promotors putatius de *SLC28A1* i *SLC28A2*, amb les combinacions d'enzims HindIII + XhoI i MluI + SmaI, respectivament.

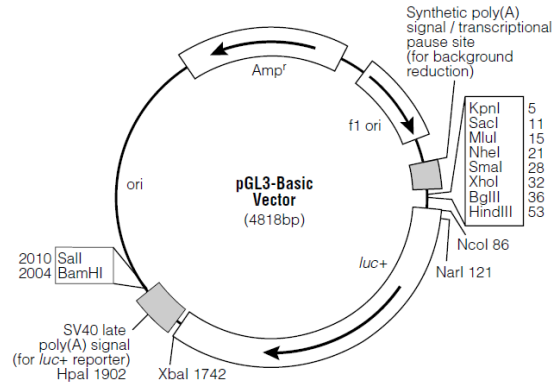


Figura 11. Esquema representatiu del vector de pGL3-basic.

- pEGFP-C1 (Clontech). Vector d'expressió a mamífers resistent a kanamicina, de 4,7kb. Conté una variant del gen *Green Fluorescent Protein* (GFP), EGFP. El MCS es troba entre la seqüència de EGFP i la poliA de SV40. En aquesta tesi, pEGFP-C1 ha estat emprat per subclonar hCNT1 i els seus mutants (KpnI + XbaI), i poder així generar proteïnes quimera hCNT1-GFP per a ser localitzades a nivell subcel·lular.

Alguns vectors d'expressió emprats han estat adquirits d'un repositori. És el cas dels vectors que expressen HNF4A2 (ID: #31100, cedit per Gerhart Ryffel), HNF4A8 (ID: #31114, cedit per Gerhart Ryffel), ING4 (ID: #13289, cedit per Curtis Harris), flag-hKLF6 (ID: #49488, cedit per Scott Friedman), p53 (ID: #11770, cedit per Geoff Wahl), pSG5L-HA (ID: #1435, cedit per William Sellers) i pSG5L-HA-E2F1 (ID: #10736, cedit per William Sellers).

BAC

Bacterial artificial chromosome (BAC) és un vector petit (7,4Kb) però d'alta capacitat que pot contenir inserts de fins 300kb (Shizuya and Kouros-Mehr 2001), motiu pel qual és considerat un cromosoma artificial. Els clonatges a BAC es fan servir principalment per a construir genoteques. En el cas d'aquesta tesi, s'han emprat dos BACs que contenen part del genoma humà: el BAC Clone 2253L13 per al clonatge del promotor de *SLC28A1* i el BAC Clone CTC-771C19 per al clonatge del promotor de *SLC28A2*.

2.1.2 Digestió

La digestió de l'insert i el vector amb els mateixos enzims permet que els extrems d'ambdues molècules de DNA siguin compatibles, facilitant així la lligació entre si. Encara que els enzims

siguin diferents, la digestió pot fer-se alhora utilitzant 5-10U de cada enzim, tenint en compte que la quantitat final d'enzim no pot superar el 10% de la reacció. A més, cal emprar un tampó 10X òptim per a què ambdós enzims presentin activitat – la compatibilitat entre enzims es pot consultar a <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Roche/Bulletin/1/11082035001bul.pdf>. Generalment, en aquesta tesi s'ha digerit 1,5µg de DNA durant 2-3 hores a 37°C. En el cas de SmaI + MluI (inserts del promotor de *SLC28A2*), es van haver de fer dues digestions seqüencials, donat que la temperatura òptima per SmaI és 25°C. Quan es digereix un plasmidi s'afegeix un pas posterior mitjançant el qual s'elimina el fosfat 5' del vector linealitzat, amb la fosfatasa alcalina (Roche – 1U enzim/1µg vector).

2.1.3 Purificació del DNA

S'han utilitzat tres estratègies per a purificar el DNA. La primera és mitjançant un gel d'agarosa 0,8% (veure apartat 2.4). La segona ha estat mitjançant un kit de purificació de DNA, *DNA Clean&Concentrator* de Zymo Research, seguint les indicacions del kit. La limitació d'aquesta segona opció és que es poden purificar un màxim de 5µg de DNA.

La tercera estratègia és la purificació del DNA mitjançant fenol-cloroform-isoamílic, emprada per a purificar els BAC. Aquest protocol s'usa quan el fragment de DNA és tan gran que no pot ser purificat per columna. Per començar, cal tenir el DNA en un volum final de 100µL. Se li afegeixen 100µL d'una solució fenol : cloroform : alcohol isoamílic (preparada a proporcions 25:24:1) i s'agita amb un vòrtex 10 segons; d'aquesta manera, s'eliminen les proteïnes. Se centrifuga el producte 30 segons a velocitat màxima, i es passa la fase aquosa superior a un eppendorf nou. S'afegeix 1/10 de volum d'acetat sòdic 3M pH 5,2, per tal d'incrementar l'osmolaritat. A continuació, s'afegeix 2-2,5 volums d'etanol absolut fred i es deixa en gel durant 5 minuts. Se centrifuga 5 minuts a velocitat màxima, es descarta el sobrenedant i es veu com en el tub queda un *pellet* blanc que és el DNA purificat. Es renta el *pellet* amb 1mL d'etanol 70% per tal d'eliminar l'excés de sals, i se centrifuga 5 minuts a velocitat màxima per treure les restes d'etanol. Es deixa assecar el *pellet* a temperatura ambient i es dilueix amb aigua estèril (la quantitat depèn de la mida del *pellet* i de l'ús posterior del DNA).

2.1.4 Lligació

La lligació té lloc entre un vector digerit i tractat amb fosfatasa alcalina i un insert digerit amb els mateixos enzims que el vector. Cal tenir en compte la següent fórmula per poder calcular la quantitat d'insert necessària segons la quantitat de vector:

$$\text{ng insert} = \text{ng vector} \frac{\text{Kb insert}}{\text{Kb vector}} \rightarrow \text{relació 1:1}$$

En aquesta tesi s'ha lligat generalment amb 50ng de vector, excepte casos puntuals en què l'insert fos molt petit respecte el vector, que s'han utilitzat 100ng de vector. A més, és recomanable afegir la *ratio* vector:insert 1:3 (seria multiplicar per 3 la quantitat d'insert) per millorar l'eficiència de la lligació. En cas d'extrems cohesius, s'afegeix un control d'autolligació 1:0. La reacció es fa en un volum final de 10µL en la qual s'hi ha d'afegir tampó lligasa 10X, 50ng de vector, els ng corresponents d'insert, 0,1-1U T4 lligasa (Promega) i aigua. La incubació té lloc durant 3 hores a temperatura ambient. El producte de lligació serà introduït a bacteris competents mitjançant transformació, per tal d'amplificar-lo.

2.2 Transformació de bacteris competents

2.2.1 Obtenció de bacteris competents

En aquesta tesi s'utilitzen *Escherichia coli* XL1-blue competents, generades mitjançant un tractament químic amb CaCl₂ al laboratori i emmagatzemades a -80°C.

Medis:

- LB (Luria-Broth) autoclavat: 1% (p/v) triptona, 0,5% (p/v) extracte de llevat, 1% (p/v) NaCl.
- SOB: 2% (p/v) triptona, 0,5% (p/v) extracte de llevat, 10mM NaCl i 2,5mM KCl. Aquest producte s'autoclava i se suplementa amb 2.5mL de MgCl₂·6H₂O 2M i 2.5mL de MgSO₄·7H₂O 2M (prèviament filtrats)
- RF1 (esterilitzat per filtració): 100mM RbCl, 50mM MnCl₂·4H₂O, 30mM KAc pH 7,5, 10mM CaCl₂·2H₂O, 15% (v/v) glicerol (87%).
- RF2 (esterilitzat per filtració): 10mM MOPS pH 6,8, 10mM RbCl, 75mM CaCl₂·2H₂O, 15% (v/v) glicerol (87%).

S'inocula una petita quantitat d'*E.coli* emmagatzemades a -80°C en 3mL de LB, i es fan créixer en agitació (200rpm) a 37°C tota la nit. L'endemà, 1mL d'aquest creixement s'afegeix a 75mL de medi SOB i es torna a incubar a 37°C en agitació. En condicions d'esterilitat, es prenen alíquotes del creixement cada 15-20 minuts i se'n determina l'absorbància a 550nm. Quan la densitat òptica (DO) sigui de 0,375-0,4 significa que s'ha arribat a la fase de creixement exponencial, i es retira el creixement de l'incubador per deixar-lo en gel 15 minuts. A continuació, se centrifuga a 4500G durant 15 minuts a 4°C (Sorvall SA600). Es descarta el sobrenedant per decantació i es resuspèn el *pellet* bacterià suaument en 25mL de RF1. Els tubs s'incuben en gel durant 20 minuts i es tornen a centrifugar a 4500G 15 minuts a 4°C. Es descarta el sobrenedant i es resuspèn el *pellet* en 6mL de RF2. S'incuben els bacteris en gel durant 15 minuts. Aquests bacteris competents resultants es poden utilitzar directament o bé emmagatzemar. Per conservar-los

se'n fan alíquotes de 50µL que són congelades per contacte directe amb nitrogen líquid i guardades a -80°C.

2.2.2 Transformació

L'objectiu de la transformació és introduir DNA plasmídic circular a bacteris competents, amb la finalitat d'aprofitar la replicació dels bacteris per amplificar el plasmidi i posteriorment purificar-lo. El mètode emprat és la transformació per xoc tèrmic, i varia segons la soca de bacteris competents. Aquí es descriu el mètode per a *E.coli XL1-blue*.

Plaques d'agar

El punt final de la transformació és el creixement de colònies de bacteris que hagin incorporat el DNA en plaques d'agar. Les plaques d'agar-LB es preparen mitjançant l'addició d'agar bacterià americà a LB. La mescla s'autoclava i quan s'hagi refredat per sota dels 60°C i abans que solidifiqui, s'afegeix l'antibiòtic corresponent: ampicil·lina (30µg/mL), kanamicina (100µg/mL) o cloramfenicol (10µg/mL). El medi es reparteix en plaques de 100mmØ (20mL aproximadament a cadascuna) i es deixa refredar; posteriorment es conserven les plaques a 4°C. L'ús de cada placa depèn de la resistència codificada en els vectors utilitzats, ja que només creixeran els bacteris que hagin estat transformats, donat que seran els únics resistents a l'antibiòtic. Dels emprats en aquesta tesi, pcDNA3.1 i pGL3-basic són resistents a ampicil·lina, pEGFP-C1 és resistent a kanamicina i els BAC són resistents a cloramfenicol.

Procés

Els bacteris competents es descongelen en gel. Sota la flama, es mesclen els bacteris i el DNA. El volum de bacteris i de DNA depèn del tipus de DNA. En cas d'una lligació, es mesclen 100µL d'*E.coli* competents en suspensió amb els 10µL de volum final de lligació. Si es transforma un plasmidi ja circular, s'afegeixen 50-200ng de DNA a 50µL de bacteris competents. La mescla s'incuba 15 minuts en gel. Posteriorment, es fa el xoc tèrmic: incubació de 1 minut 30 segons a 42°C, seguit d'aproximadament 1 minut en gel. S'afegeix 1mL de LB a cada transformació. S'incuba durant aproximadament 1 hora a 37°C i agitació horitzontal. A continuació, se centrifuga el producte durant 5 minuts a 3400rpm. Es descarten uns 800µL de sobrenedant i es resuspèn el *pellet* amb el volum restant, que es plaqueja a la placa d'agar amb l'antibiòtic corresponent. Aquesta placa s'incuba tota la nit (aproximadament 16 hores) a 37°C i de manera que l'agar quedi a la part superior.

2.3 Obtenció de DNA plasmídic de bacteris competents

En aquesta tesi s'han emprat dos protocols d'aïllament de DNA plasmídic en funció de la quantitat de plasmidi desitjada.

2.3.1 Mini-prep

Procés per obtenir ràpidament una petita quantitat de DNA plasmídic. S'ha utilitzat majoritàriament per comprovar que els processos de lligació i transformació hagin estat satisfactoris. Per aïllar el DNA, primer de tot cal fer créixer una colònia de bacteris transformats en 3mL de LB amb 100µg/mL de l'antibiòtic corresponent, durant la nit a 37°C i agitació (200-250rpm). La purificació es fa mitjançant el kit comercial *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), segons les indicacions del protocol.

2.3.2 Midi-prep

El procediment d'aïllament de DNA plasmídic mitjançant midi-prep és més complex. S'utilitza per obtenir molta més quantitat de DNA que en les mini-prep, i aquest DNA està generalment destinat a ser transfectat a cèl·lules. En aquest cas, s'introdueixen 150µL de creixement de mini-prep en 50mL de LB amb 100µg/mL del corresponent antibiòtic. S'incuba durant la nit a 37°C i agitació (200-250rpm). La purificació s'ha realitzat segons el kit *NucleoBond Xtra Midi/Maxi* (Macherey-Nagel) segons especificacions del protocol.

2.3.3 Quantificació del DNA

Es mesura la concentració de DNA mitjançant espectrofotometria, amb l'aparell Nanodrop ND-1000. Es mesura la quantitat de DNA a longitud d'ona 260nm (màxima absorbància per àcids nucleics), i per tal de mesurar les proteïnes romanents que hi pugui haver també es mesura a 280nm. En una purificació correcta de DNA, la relació entre les dues densitats òptiques ha de ser entre 1.80 i 2. Si la relació surt d'aquest rang, podria indicar contaminació per proteïnes.

2.3.4 Preservació de bacteris

Els bacteris competents poden ser preservats a -80°C. Es congela una mescla amb 77% de creixement bacterià (com el de mini-prep) i 23 % de glicerol. El tub amb la suspensió es congela directament amb nitrogen líquid i es guarda a -80°C.

2.4 Gels d'agarosa

L'electroforesi en gel d'agarosa permet separar els fragments de DNA per mida. S'empra per comprovar si un producte de PCR presenta el pes adequat, si els plasmidis lligats han incorporat l'insert (i per tant pesen més que els plasmidis buits) i també per purificar DNA.

El tampó TBE 0,5X (dilució 1/10 de TBE 5X: Tris-base 0,5M, àcid bòric 0,45M, EDTA 5mM) s'utilitza tant per la preparació del gel d'agarosa com de medi aquós per tal que el gel corri adequadament. Per fer un gel d'1% d'agarosa calen 0,6g d'agarosa i 60mL TBE 0,5X. Per diluir l'agarosa s'escalfa la mescla fins just el punt previ a l'ebullició. Es deixa atemperar i s'afegeix el SYBR Safe (Invitrogen), el qual s'utilitza perquè quan s'uneix al DNA pot absorbir llum ultraviolada i retornar llum verda, de manera que es podrà visualitzar el DNA. S'aboca la mescla al suport de plàstic, es col·loca la pinta i es deixa polimeritzar. Un cop sòlid, es retira la pinta i es posa el gel a la cubeta, cobert amb TBE 0,5X.

Cal afegir *loading dye* 6X a les mostres a carregar. A més, s'ha de córrer en paral·lel un marcador de pesos moleculars adequat a la mida del DNA a analitzar (1kb o 100bp *DNA ladder*, Promega). L'electroforesi es fa a un voltatge de 60-120V. Per tal d'obtenir imatges del DNA, cal excitar el gel amb llum UV i registrar les emissions consegüents amb una càmera.

Purificació de DNA

Els gels d'agarosa també poden ser una eina per a purificar DNA. El procediment és el mateix, però reduint el percentatge d'agarosa al 0,8% per tal d'optimitzar la purificació. Un cop feta l'electroforesi, es fa servir llum UV per localitzar la banda d'interès i es retalla amb un bisturí. La banda retallada és processada mitjançant el kit comercial *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen), que permet purificar fragments entre 70bp i 10kb.

3. Cultius cel·lulars

Les tècniques de cultius cel·lulars tenen com objectiu el manteniment de cèl·lules fora de l'organisme d'origen i en condicions controlades, de manera que es puguin preservar les característiques fisiològiques, genètiques i bioquímiques. En aquesta tesi, tots els cultius cel·lulars són de línies cel·lulars tumorals.

En treballar amb cultius cel·lulars, l'esterilitat és de vital importància. Cal treballar amb cabines de flux laminar vertical amb filtre HEPA i amb material estèril; les solucions líquides han de ser autoclavades o filtrades amb filtres de 0,22µm de diàmetre de porus. Les cèl·lules i el material estèril només es poden manipular dins la campana, sempre amb bata i guants. Un cop s'acaba de treballar amb les cèl·lules, es guarden les plaques a un incubador amb atmosfera controlada (37°C, ambient humit i 5% CO₂).

3.1 Línies cel·lulars

Totes les línies cel·lulars emprades en aquesta tesi creixen en monocapa, i tenen com origen cèl·lules tumorals – excepte les HEK293, d'origen embrionari. Les línies provenen de diferents fonts (Taula 9). Les CP15T van ser produïdes al laboratori i tenen com origen un adenocarcinoma ductal pancreàtic humà (Pérez-Torras et al. 2011). Les NP-9 i les NP-29 van ser establertes al Servei de Digestiu de l'Hospital de Santa Creu i Sant Pau de Barcelona i amablement cedides al laboratori. Deriven d'adenocarcinoma pancreàtic humà implantats en ratolins atímics i que s'han perpetuat com a xenografts (Villanueva et al. 1998). Les BCLC-3, BCLC-5 i BCLC-12 van ser cedides pel Dr. Jordi Bruix d'IDIBAPS Hospital Clínic de Barcelona; van ser generades a partir de reseccions quirúrgiques d'hepatocarcinomes humans, les dues primeres, i de colangiocarcinoma la darrera. La resta de línies són comercials i es detallen a la Taula 9.

Els medis usats per cada línia estan suplementats en tots els casos per un 10% de sèrum fetal boví (FBS), 2mM de glutamina i una mescla d'antibiòtics de penicil·lina i estreptomina, 20 U/mL i 20µg/mL respectivament. Les suplementacions addicionals requerides per cada línia cel·lular estan indicades a la Taula 9.

3.2 Manteniment

Totes les línies emprades es mantenen en plaques de 100mm de diàmetre, ja que creixen en monocapa adherida a un suport sòlid. Per tal d'evitar un arrest de cicle cel·lular o diferenciació, cal replaquejar les cèl·lules quan arriben a 80-90% de confluència. El replaqueig o passatge es fa per tripsinització, que consisteix en un procés mecànic i enzimàtic mitjançant el qual les cèl·lules són desadherides del suport i disgregades, recuperades i posteriorment replaquejades. La dilució de les cèl·lules pel passatge depèn de la línia cel·lular (Taula 9), i ha de ser adequada per tal que es puguin tornar a replaquejar als 3-5 dies. Entremig dels diferents passatges es canvia el medi, aspirant el vell i afegint el volum corresponent (10mL en plaques de 100mm) de medi nou.

3.2.1 Criopreservació i descongelació

Les línies tumorals, com més divisions acumulin, més probabilitat tenen d'arrossegar errors produïts com a conseqüència d'aquestes. Per aquest motiu cal disposar de vials criopreservats en nitrogen líquid amb cèl·lules a passatge baix.

El procés de criopreservació s'inicia de la mateixa manera que un passatge: tripsinitzant les cèl·lules. Aquestes són centrifugades durant 4 minuts a 1200 rpm, i es retira el sobrenedant. Les cèl·lules són resuspeses en medi de congelació, que està format un 90% per FBS i 10% per

dimetilsulfòxid (DMSO), que és un crioprotector. La suspensió es fa amb 1 mL de medi de congelació per placa tripsinitzada, i s'introdueix en criotubs. Aquests són immediatament col·locats a un dipòsit de congelació gradual d'isopropanol a -80°C. L'isopropanol fa que la temperatura de les cèl·lules es redueixi 1°C per cada minut, evitant així la formació de cristalls intracel·lulars i per tant assegurant-ne la viabilitat. Al dia següent, els vials amb cèl·lules poden traslladar-se al tanc de nitrogen líquid, on seran conservades.

Contràriament, el procés de descongelació de vials criopreservats ha de ser molt ràpid. El motiu és que el DMSO és molt tòxic per les cèl·lules a temperatura ambient i a concentració superior a l'1%. Per tant, el vial congelat en nitrogen és dut a un bany a 37°C i descongelat. La suspensió de cèl·lules és traspasada a un tub de 15 mL i centrifugada 4 minuts a 1200 rpm. S'aspira el sobrenedant i les cèl·lules són plaquejades en medi fresc suplementat amb 20% FBS.

Línia cel·lular	Medi	Origen	Dilució passatge
Derivades d'adenocarcinoma colorectal			
CaCo-2	MEM	ATCC	1:5-1:6
HT-29	DMEM	ATCC	1:8-1:10
Derivades d'adenocarcinoma ductal pancreàtic			
CP15T	DMEM F-12	Pérez-Torras et al., 2011	1:5-1:6
NP-9		Villanueva et al., 1998	1:4-1:5
NP-29			1:5-1:6
Derivades d'hepatocarcinoma			
BCLC-3	DMEM F-12 +1% NEAA +1% sodi piruvat	Laboratori Dr. Bruix	1:5-1:6
BCLC-5			1:4-1:5
Huh7	DMEM	JCRB	1:6-1:8
Derivades d'hepatoblastoma			
HepG2	EMEM	ATCC	1:4-1:5
Derivades de colangiocarcinoma			
EGI-1	DMEM	DMSZ	1:5-1:6
BCLC-12	DMEM F-12 +1% NEAA +1% sodi piruvat	Laboratori Dr. Bruix	1:5-1:6
TFK-1			
Derivades de ronyó embrionari humà			
HEK293	DMEM	ATCC	1:10-1:12
HEK293-hCNT1	DMEM	Establertes al laboratori	1:10-1:12
Derivades d'osteosarcoma			
Saos-2	DMEM	ATCC	1:3-1:4

Taula 9. Descripció de les línies cel·lulars emprades en aquesta tesi. NEAA = aminoàcids no essencials. ATCC = American Type Culture Collection. JCRB = Japanese Collection of Research Bioresources. DMSZ = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. Tots els medis estan adquirits a Thermo Fisher Scientific.

3.2.2 Test de micoplasma

Les cèl·lules han de ser lliures de tota contaminació. Generalment, si es contaminen amb bacteris o fongs es pot detectar a simple vista, donat que canvia la turbulència i el color del medi. L'excepció és la contaminació per *Mycoplasma*, ja que són bacteris que no presenten paret cel·lular i per tant eludeixen l'acció de molts antibiòtics, com la penicil·lina. A més, la seva mida (menys d'1 µm) dificulta la seva visualització als microscopis convencionals. És important evitar-ne la contaminació degut a què produeix alteracions a les cèl·lules, el qual pot fer alterar els resultats obtinguts.

El control de micoplasma es fa cada 15 dies. Es pren una mostra de medi de cultiu que hagi estat 48-72 hores en contacte amb les cèl·lules i s'escalfa a 95°C per desfer possibles estructures bacterianes. S'empra una mostra d'aquest medi com a motlle per la PCR, la PCR amplifica un fragment de 500bp aproximadament del genoma del micoplasma.

Si les cèl·lules són positives per micoplasma, poden ser tractades durant 15 dies amb Plasmocin (Invivogen) a 25 µg/mL. Durant aquest temps, no s'utilitzen per a cap procediment experimental i es conserven a un incubador separat de la resta de línies.

3.3 Tractaments amb fàrmacs

En funció de l'estudi a realitzar, les cèl·lules se sembren en diversos tipus de placa: *Multi-well* 96 per assajos de citotoxicitat, MW24 per assajos de transport o luciferasa, i MW6 o placa de 60mm de diàmetre per extracció d'RNA o proteïna. La densitat de cèl·lules a sembrar varia segons la durada del tractament i de la línia cel·lular. El moment d'inici de tractament depèn de si les cèl·lules són transfectades, com en el cas de les HEK293 en aquesta tesi, o si no ho són. Si no ho són, els tractaments es fan 24 hores post sembra. En cas de ser transfectades, els tractaments s'inicien entre 8 i 24 hores post transfecció.

Els fàrmacs escollits es dilueixen en el medi de cultiu corresponent a la concentració desitjada en cada cas, i romanen en contacte amb les cèl·lules durant un temps determinat (excepte si s'indica el contrari). Passat aquest temps, es pot aspirar el medi amb fàrmac i substituir-lo per medi fresc, o bé es fa l'assaig corresponent. En cas d'extracció de proteïna o RNA, les plaques poden ser congelades amb nitrogen líquid i guardades a -80°C fins el moment de l'extracció.

Els fàrmacs emprats en aquesta tesi són els següents:

- Àcid hidroxàmic suberoilànida (SAHA, Vorinostat; Sigma-Aldrich).
- Gemcitabina (2',2'-difluoro 2' desoxicitidina, dFdC; MedChem Express).

- Cicloheximida (CHX, Sigma).
- MG-132 (Sigma).
- Hidroxicloroquina sulfat (HCQ, Sigma).
- Tunicamicina (TNM, Sigma).
- Abemaciclib (ABM, Sigma)

3.4 Assajos de viabilitat cel·lular

En aquesta tesi, la viabilitat cel·lular s'ha mesurat mitjançant el mètode de bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT). La metodologia es basa en la detecció espectrofotomètrica dels cristalls de formazan, produïts arrel de la disrupció de la sal de tetrazoli en presència de la succinat deshidrogenasa; per tant, la reacció només la poden dur a terme cèl·lules vives. Els assajos MTT s'han realitzat tots a les 96 hores després de sembrar les cèl·lules en una placa MW96. Els tractaments i temps emprats depenen de l'objectiu de l'assaig i estan indicats en cada figura (resultats). L'assaig en si comença amb la retirada de medi de cultiu i l'addició de medi fresc que conté MTT (7,5 mg/mL) dissolt en PBS i medi de cultiu (relació 1:9), i incubació durant 30-60 minuts a 37°C en funció de la línia. Passat el temps, es retira el medi i es dissolen els cristalls amb DMSO. La lectura es realitza a 550nm.

3.5 Expressió heteròloga de proteïnes

La manipulació de l'expressió d'una proteïna d'interès serveix per analitzar l'efecte biològic d'aquesta. L'expressió heteròloga consisteix en la introducció a les cèl·lules d'un vector d'expressió que conté el gen que codifica la proteïna d'interès, de manera que aquesta s'expressa transitòriament.

3.5.1 Transfecció amb fosfat calci

Mètode emprat per a transfectar les HEK293. Es basa en la capacitat del CaCl_2 de precipitar el DNA mitjançant unions electrostàtiques en una solució salina de fosfat. Aquests precipitats són internalitzats per la cèl·lula a través de les vies endocítiques.

Medis:

- Calci: 500 mM CaCl_2 , 100 mM àcid N,N-Bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfonic (BES) i pH 6,95. Preparat amb aigua miliQ i filtrat amb filtres 0,22 μm .
- Fosfat: 280 mM NaCl, 0,75 mM Na_2HPO_4 , 0,75 mM NaH_2PO_4 . L'eficiència de transfecció depèn del pH d'aquest tampó, i cal trobar quin és el pH òptim per a cada línia cel·lular. En cas de les HEK293, és pH 6,4. Preparat amb aigua miliQ i filtrat amb filtres 0,22 μm .

Procés:

És important que les cèl·lules estiguin a una confluència del 70% aproximadament en el moment de ser transfectades. En aquesta tesi, les HEK293 s'han sembrat a densitat de 40.000 cèl·lules/cm². El volum de transfecció s'afegeix sobre el medi, sempre mantenint la mateixa proporció: 85µL per a pou de MW24 i 340µL per a MW6. Passades 8 hores de la transfecció, es canvia el medi per medi fresc. La Taula 10 indica les proporcions de cada reactiu. Es prepara la mescla seguint estrictament l'ordre: primer aigua, després DNA, seguidament calci i per últim fosfat; en afegir aquest, es mescla per bombolleig. S'incuba 15 minuts a temperatura ambient i s'afegeix la solució al pou corresponent gota a gota.

	MW24	MW6
DNA (µg)	0,2 en total 0,1+0,1 en cotransfeccions	0,8 en total 0,4+0,4 en cotransfeccions
Aigua (µL)	21,25 - µL DNA	85 - µL DNA
Calci (µL)	21,25	85
Fosfat (µL)	42,5	170
Total (µL)	85	340

Taula 10. Condicions de transfecció amb fosfat calci.

3.5.2 Transfecció amb Lipofectamina 2000

La Lipofectamina 2000 (Invitrogen) s'ha usat per transfectar les línies cel·lulars emprades en aquesta tesi que no són HEK293. El mètode es basa en la formació de liposomes catiònics que uneixen el DNA (carregat negativament) i permeten la seva internalització a la cèl·lula.

Les cèl·lules se sembren de manera que a les 24h, en transfectar-les, presentin una confluència de 50-70%. Del volum final del pou, 1/10 serà de solució de transfecció i 9/10 de medi fresc (s'ha de canviar abans de la transfecció). Per preparar la solució de transfecció, primer es preparen dos tubs per separat (Taula 11). El primer contindrà Opti-MEM (medi sense FBS) i lipofectamina, mentre que el segon contindrà una mescla d'Opti-MEM i DNA. Tot seguit, es barregen els continguts i s'incuba durant 5 minuts. S'afegeix la solució gota a gota sobre les cèl·lules. Entre 4 i 6 hores post transfecció, es canvia el medi.

3.5.3 Transfecció amb Lipofectamina 3000

La Lipofectamina 3000 (Invitrogen) comparteix mètode de funcionament amb la Lipofectamina 2000, però presenta major eficiència de transfecció. Per aquest motiu, en la darrera etapa de la tesi es va canviar de reactiu de transfecció en favor de la Lipofectamina 3000. La preparació és equivalent, amb alguna excepció. La quantitat de Lipofectamina per pou difereix, sent 1,75µL per pou de MW24 i 7,5µL per pou de MW6. Pel que fa el DNA, a la mescla s'hi afegeix el reactiu

P3000. La quantitat de DNA a MW6 és de 2,5µg per pou. Per últim, no cal canviar el medi després de la transfecció.

		MW24	MW6	Placa 60mm
Tub 1	Opti-MEM	25 µL	100 µL	150 µL
	Lipofectamina	2 - 3µL	8 – 12 µL	12 - 18µL
Tub 2	Opti-MEM	25 µL	100 µL	150 µL
	DNA	500 ng	2 µg	3 µg
Total (µL)		50	200	300

Taula 11. Condicions de transfecció amb Lipofectamina 2000.

3.6 Silenciament de proteïnes

El silenciament de proteïnes d'interès s'ha realitzat transfectant siRNA a les cèl·lules diana mitjançant el reactiu TranIT-siQUEST (Mirus Bio). Per silenciar en placa MW6, s'empra una reacció que consta de 250µL d'OptiMEM, 7,5µL de TransIT-siQUEST i el siRNA necessari per obtenir una concentració final de 80nM al pou. S'incuba la reacció durant 20 minuts i s'afegeix a les cèl·lules, damunt de medi fresc i gota a gota.

Els siRNA emprats són Silencer® Select Pre-designed (Thermo Fisher Scientific): hCNT1 (*SLC28A1* ID: 4392421), RNF41 (ID: 138106), E2F1 (ID:114508) i p53 (ID: 106140).

4. Anàlisi de l'expressió de RNA

4.1 Extracció d'RNA

En aquesta tesi, l'extracció d'RNA es fa en tots els casos a partir de cèl·lules en monocapa. S'han utilitzat dos kits d'extracció comercials en funció de l'experiment. Generalment, s'ha emprat el kit d'extracció d'RNA total *SV Total RNA Isolation System* (Promega). En els casos en què s'ha volgut mesurar també l'expressió de microRNAs, el kit usat ha estat *Mirneasy Mini kit* (Qiagen). En ambdós protocols s'han seguit les instruccions del fabricant.

4.1.1 Quantificació RNA

Es mesura de manera anàloga a la concentració de DNA (apartat 2.3.3). En aquest cas, però, la relació de densitats òptiques ha de ser entre 2 i 2.15.

4.2 Síntesi de cDNA

El procés de retrotranscripció consisteix en la síntesi d'una doble cadena de DNA a partir d'una cadena de mRNA. En primer lloc, se sintetitza la cadena complementària, cDNA, creant així un híbrid RNA:DNA. L'RNA d'aquest híbrid és degradat, i a continuació es forma la doble cadena. Aquests processos enzimàtics són mediatos per la M-MLV RT (Thermo Fisher). A la reacció, a més, se li afegeix RNasin (Promega), un inhibidor de ribonucleases però que no interfereix en l'activitat de la M-MLV RT.

Per tal d'evitar contaminacions, les reaccions de retrotranscripció i de *Real Time PCR* es preparen dins una cabina de flux vertical. Les puntes emprades tenen filtre i són estèrils.

La reacció es fa en dos passos. El primer consisteix en la dilució de 1µg d'RNA amb H₂O estèril, fins a un volum final de 10µL. La mescla s'incuba 5 minuts a 65°C al termociclador per tal de desnaturalitzar l'RNA. A continuació, es deixen les mostres momentàniament en gel. Posteriorment, s'afegeixen 10µL de mescla de cDNA mix (4µL de tampó 5X *first strand*, 2µL DTT 0.1M, 1µL dNTPs 10mM, 240ng *random primers* i H₂O estèril fins 10µL). Un cop afegit, s'incuba 50 minuts a 37°C per tal que tingui lloc la retrotranscripció, i després 10 minuts a 70°C per inactivar els enzims.

4.3 Real Time PCR

L'anàlisi dels nivells de mRNA s'ha fet mitjançant PCR a temps real (*Real Time PCR*, *RT-PCR*), utilitzant el sistema *TaqMan Gene Expression Assays* (Applied Biosystems). Consisteix en una PCR mitjançant la qual s'amplifica el cDNA d'interès: consta d'un cicle de 2 minuts a 50°C, un cicle de 10 minuts a 95°C i finalment 40 cicles de 15 segons a 95°C i 60 segons a 60°C. S'empren plaques òptiques de 96 pous (Applied Biosystems), en què en cada pou té lloc una reacció. Es prepara amb Taqman Universal PCR MasterMix 2X (Applied Biosystems), 1µL de combinació de sonda i *primers* i 50ng de cDNA. Es fa una reacció per cada gen que es vol analitzar, per duplicat. L'expressió gènica s'analitza amb l'ús de sondes fluorogèniques TaqMan (Applied Biosystems), les quals presenten un fluorocrom a 5' (*reporter*) i un inhibidor de l'emissió (*quencher*) a 3', i *primers* específics per cada gen (Taula 12). Mentre la sonda roman intacta, la presència del *quencher* redueix l'emissió del fluorocrom, de manera que no es detecta. Quan hi ha presència de la seqüència reconeguda per la sonda, els *primers* l'amplifiquen, i la sonda s'uneix a les cadenes naixents. L'activitat 5'nucleasa de la polimerasa Taq produeix una disrupció de la sonda, de forma que el fluorocrom és alliberat i deixa d'estar inhibat pel *quencher*, i per tant pot ser detectat. Conforme van avançant els cicles, la senyal s'anirà amplificant. Durant els primers

cicles de PCR es determina una línia basal sota la qual no s'observen canvis. Si es detecta fluorescència per sobre d'aquesta línia basal, significa que es detecta producte de PCR acumulat. Es fixa una línia límit (*threshold*) de fluorescència per sobre de la línia basal, que serveix per determinar el Cicle límit (C_T) de cada reacció; el C_T indica en quin cicle la fluorescència producte de la PCR ha superat el límit. Com més representació del gen analitzat hi hagi a la mostra, més inferior serà el valor de la C_T .

Les RT-PCR d'aquesta tesi s'han analitzat mitjançant el mètode $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Es realitza una quantificació relativa del gen d'interès comparant-lo amb un gen endogen (*housekeeping*) que no es vegi alterat per les condicions experimentals. En aquesta tesi, l'endogen emprat ha estat hGAPDH per defecte, excepte en algun cas que s'ha utilitzat hGUSB. A partir de la C_T mitjana dels duplicats del gen d'interès i del *housekeeping*, es calcula la ΔC_T (gen – *housekeeping*), a més de l'error estàndard de ΔC_T . A continuació s'estableix el $\Delta\Delta C_T$, que consisteix en la diferència entre ΔC_T de cada condició respecte el control. Per trobar el valor de $2^{-\Delta\Delta C_T}$ s'aplica una potència en base 2 de $-\Delta\Delta C_T$; aquest valor, expressat en unitats arbitràries, indica el nombre de vegades que canvia cada condició respecte el control.

4.4 Real Time PCR absoluta

En aquesta tesi, la RT-PCR absoluta s'ha fet seguint els mateixos principis i reactius que en l'apartat 4.3. La diferència rau en la incorporació d'una recta patró del gen d'interès amb concentració coneguda de DNA. Els gens per la recta patró s'han obtingut mitjançant la linealització del vector d'expressió que contingui el gen en qüestió. A partir de la concentració de DNA linealitzat purificat (ng/ μ L) es dedueix el nombre de còpies per μ L emprant les equivalències següents:

$$1 \text{ mol DNA} = 6,02 \cdot 10^{23} \text{ còpies de DNA}$$

$$1 \text{ pmol dsDNA} = 660 \text{ pg dsDNA}$$

Es prepara una recta patró de manera que en pipetejar 9 μ L per pou (el mateix volum que es posa de mostra de cDNA) hi hagi el següent nombre de còpies de DNA: $10^7 - 10^6 - 10^5 - 10^4 - 10^3 - 10^2$.

El processament de resultats, en aquest cas, és diferent: no es relativitza l'expressió a cap gen endogen sinó que s'obtenen valors de ng de DNA per mostra.

Com que es coneix la concentració del gen d'interès a la recta patró, s'infereix la concentració del mateix en les mostres de cDNA mitjançant la comparativa de C_T .

Gen	Primers / ID	Sonda	Quencher
Dissenyades al laboratori			
<i>SLC28A1</i> – 101T	FW: TGATTTCTTGAAAGCCTGGA RV: CTGCTCCTGATCTCTGCGG	FAM: AAGGCCAGCTCCCTAGGA GTGACTTGAG	TAMRA
<i>SLC28A2</i> – 109T	FW: AAGTAGAGCCTGAGGGAAGCAA RV: GCCCAGTCCATCCCCC	FAM: AGGACTGACGCACAAGGA CACAGCC	TAMRA
<i>SLC28A3</i> – 109T	FW: GAGCTGTGCAAAGCAGGGA RV: TGGAGAATCCTGCTCAACTGTG	FAM: CACACAAACACCAAACAGG ATGAAGAACAGG	TAMRA
<i>SLC29A1</i> – 77T	FW: GCAAAGGAGAGGAGCCAAGA RV: TTCATTGGTGGGCTGAGAGTT	FAM: CAGGCAAAGAGGAATCTG GAGTTTCAGTCTC	TAMRA
<i>SLC29A2</i> – 131T	FW: CCCTGGATCTTGACCTGGAG RV: GGTTTTCTGGCTTCTGGG	FAM: AGGAGCCGGAATCAGAGC CAGATGA	TAMRA
<i>KLF6-FL</i>	FW: CTTTAACGGCTGCAGGAAAG RV: GGAAGTGCCTGGTAACTCATC	FAM: ACAGATGCTCATGGGAAG GGTGTG	NFQ
<i>KLF6-SV2</i>	FW: GGAACCTTCTCAACTGTGGG RV: CACTCACACCCTCCCATG	FAM: AGGCTTTTCTCCTGGCTTCC CC	NFQ
Comercials			
<i>hGAPDH</i>	4310884E	VIC	TAMRA
<i>hGUSB</i>	431088E	VIC	TAMRA

Taula 12. Sondes Taqman emprades en aquesta tesi doctoral.

5. Anàlisi de l'expressió de proteïnes

5.1 Obtenció d'extractes proteics totals a partir de cultius cel·lulars

L'extracció proteica de cultius cel·lulars s'ha realitzat, en aquesta tesi, a partir de cèl·lules sembrades en plaques de 60mm de diàmetre o en MW6, a les quals s'ha retirat el medi, rentat 2 vegades amb PBS 1X i congelat amb nitrogen líquid. Generalment s'ha emprat el tampó NP40 (50mM Tris pH 7.4, 250mM NaCl, 1% NP-40, 5mM pirofosfat sòdic i 50mM NaF), suplementat amb 1mM d'ortovanadat sòdic i còctel d'inhibidors de proteasa 1X. En els casos en què es volen detectar residus d'ubiquitina, s'ha utilitzat el tampó NEM, de mateixa composició que NP-40 però també conté 50mM d'N-etilmaleimida per inhibir els enzims desubiquitinadors. En casos en què es vulguin detectar proteïnes fosforilades, s'utilitza un tampó especial que preserva els residus de fosforilació (20mM Tris pH 8, 150mM NaCl, 1% NP-40, 10mM EDTA, 10mM pirofosfat sòdic, 2mM ortovanadat, 100mM NaF i 1mM β -glicerofosfat), suplementat amb inhibidors de proteasa 1X i inhibidors de fosfatasa 1X.

L'extracció es fa en gel per evitar possibles degradacions. Es dipositen uns 60-100 μL de tampó de lisi sobre el pou (segons la línia cel·lular) i es recullen les cèl·lules amb l'ajuda d'un *scraper*. Es passa la mostra per una xeringa de 25G i se centrifuga 15 minuts a 4°C i 13200 rpm. El sobrenedant, que conté les proteïnes, es traspassa a un tub nou. Es pot emmagatzemar a -20°C.

5.2 Valoració de la concentració proteica

Es fa mitjançant el mètode Bradford, utilitzant la solució comercial *Protein Assay Kit* (Bio-Rad) a proporció 1:5 amb aigua destil·lada. En medi àcid, quan el blau brillant de Coomassie s'uneix a proteïnes, provoca un canvi del màxim d'absorbància de 465 a 595nm. Aquest canvi és proporcional a la quantitat de proteïna present en la mostra. En la mateixa mesura cal afegir mostres de concentració coneguda. Generalment consisteixen en dilucions del rang 0-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fetes a partir d'albúmina sèrica bovina 2 mg/mL. A partir de les absorbàncies de concentració coneguda, i gràcies a la llei Lambert Beer, es pot determinar la concentració proteica de les mostres.

Per tal que les mostres quedin en el rang de concentracions de la recta patró, es dilueixen 1:20 i 1:40 (HEK293) o 1:15 i 1:30 (la resta de línies). Es carreguen duplicats de 10 μL en una placa MW96, juntament amb triplicats de cada punt de la recta patró. S'afegeixen 200 μL de reactiu Bradford per pou i es mesura l'absorbància a 595nm.

5.3 Anàlisi de proteïnes mitjançant western blot

5.3.1 Electroforesi en SDS-PAGE

Per analitzar l'expressió de proteïnes, aquestes han de ser separades segons el seu pes molecular per sotmetiment a un camp elèctric. Amb aquest objectiu s'utilitzen gels de poliacrilamida (PAGE) en presència de dodecil sulfat sòdic (SDS), un agent desnaturalitzant que reverteix les unions no covalents entre proteïnes.

Els gels de poliacrilamida estan formats per dos subtipus de gel:

- Gel concentrador: serveix per tal que les diferents mostres entrin simultàniament al gel resolutiu. Té pH més àcid i percentatge baix d'acrilamida per afavorir el moviment de les proteïnes. Per preparar 4mL, calen: 2,7mL d'aigua miliQ, 0,67mL de 30% acrilamida/Bis 37,5:1 (Bio-Rad), 0,5mL de Tris 1M pH 6,8, 40 μL d' SDS 10%, 40 μL d'amoni persulfat (APS, Sigma) 10% i 4 μL de N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED, Sigma).
- Gel resolutiu: serveix per a la separació de les proteïnes. En funció del pes molecular que interressi separar, el percentatge d'acrilamida variarà entre 6 i 15%. En aquesta tesi s'han

emprat generalment gels del 10% d'acrilamida, excepte gels del 15% per detectar histones i LC3B, i gels del 8% per a la detecció d'Rb i pRb. Per a 10mL, 2,7mL, 3,3mL o 5mL d'acrilamida segons si el gel és del 8, del 10 o del 15% respectivament; 2.5mL Tris 1,5M pH 8,8, 100µL SDS 10%, 100µL APS 10%, 4µL TEMED i la resta d'aigua.

Primer es prepara el gel resolutiu i, un cop polimeritzat, s'afegeix el gel concentrador damunt amb una pinta de 10 o 15 pous segons interès. Quan estiguin preparats, els gels es munten al sistema Mini Protean 3 (Bio-Rad); en cas de només tenir un gel, a l'altre cantó s'hi posa un suport de plàstic. El muntatge es posa a una cubeta d'electroforesi, i s'omplen amb tampó d'electroforesi (Tris-Base 25mM, Glicina 191mM, SDS 0,1%) tant el muntatge com la cubeta, fins el volum indicat. Es retira la pinta del gel i es netegen els pous formats amb tampó.

Es preparen mostres dels extractes proteics que es volen analitzar. En aquesta tesi s'han analitzat 10-40µg de proteïna, preparats a un volum final de 20µL. La mostra conté proteïna, aigua miliQ i tampó de càrrega 5X (2% % SDS, 20% glicerol, 0,01% blau de bromofenol i 2,5 mM Tris-HCL pH 6,8). El tampó de càrrega confereix densitat i color a la mostra. A més, se suplementa amb un 5% de β-mercaptoetanol per tal de desnaturalitzar les proteïnes. Un cop preparades, les mostres s'incuben 30 minuts a 37°C si es volen detectar transportadors de nucleòsids, o bé 7 minuts a 95°C en cas de voler detectar proteïnes solubles.

Es carrega el total de volum als pous corresponents, juntament amb l'estàndard de pesos molecular *Precision Plus Protein Standard Dual Color* (Bio-Rad), que conté marcadors entre 10 i 250 kDa amb coloració diferencial. L'electroforesi es produeix a amperatge constant de 40mA en cas de tenir un gel, 80mA per dos. El temps depèn del pes molecular que es vulgui analitzar.

5.3.2 Transferència de proteïnes

Per poder detectar les proteïnes separades mitjançant anticossos cal transferir-les primer a una membrana de fluorur de polivinilidè (PVDF Inmobilon-P, Millipore). La membrana, tallada a dimensions 6x9cm, ha de ser prèviament activada amb un cicle de 15 segons en metanol, 2 minuts en aigua miliQ i temps indefinit en tampó de transferència. El tampó de transferència es prepara amb un 20% de metanol, 10% de tampó de transferència 10X (Tris base 250mM, glicina 1,92M) i aigua destil·lada.

Un cop acabada l'electroforesi, s'incuba breument el gel en tampó de transferència per tal d'equilibrar els ions. A continuació, es procedeix al muntatge en un sistema Mini Protean (Bio-Rad). Es fa un sandvitx amb el següent ordre: (cànode) esponja, 3 membranes Whatman de 3mm, gel (només el resolutiu), membrana activada, 3 membranes Whatman i esponja (ànode). S'afegeix a la cubeta de transferència un suport congelat per tal que el sistema es mantingui

fred, i s'omple amb tampó de transferència. S'executa a amperatge constant de 180mA, i el temps depèn de si es volen detectar proteïnes de baix pes molecular (60min), pes molecular mitjà (70min) o pes molecular elevat (120min a 4°C).

Per comprovar que la transferència hagi estat adequada, es pot tenyir reversiblement la membrana amb solució de Ponceau, la qual s'uneix a les proteïnes.

5.3.3 Bloqueig

Com a pas previ a la immunodetecció, cal bloquejar la membrana per cobrir els espais on no hi hagi proteïna transferida, ja que són susceptibles d'unions inespecífiques. La solució de bloqueig es prepara amb TBS (Tris base 20mM, NaCl 150mM a pH 7,6) Tween 20 al 0,1%, a la qual s'afegeix 5% de llet en pols desnatada (p/v). La incubació de la membrana té lloc durant mínim 1 hora a temperatura ambient, en agitació.

5.3.4 Immunodetecció

El primer pas per la immunodetecció és la incubació amb l'anticòs primari corresponent. Els anticossos primaris es preparen amb solució de bloqueig principalment, a la qual se li pot afegir azida sòdica 0,1% si l'anticòs no es pot congelar (ho indica el fabricant). Els anticossos que detecten modificacions post-traduccionals, com acetilacions o metilacions, es preparen amb BSA 5%, ja que la caseïna de la llet podria intervenir en el bon funcionament. La Taula 13 indica les condicions de preparació dels anticossos primaris. La incubació sol durar tota la nit, a 4°C i en rotació – a excepció de l'actina, que pot incubar-se 1 hora a temperatura ambient.

Després de la incubació, l'anticòs primari es recupera i es guarda per futurs usos. La membrana es renta 3 vegades durant 7 minuts amb TBS-Tween 20, en agitació. A continuació, s'afegeix l'anticòs secundari que correspongui, que detecta les cadenes pesants de l'anticòs primari; és a dir, l'espècie. L'anticòs secundari es dilueix amb tampó de bloqueig i s'incuba durant 2 hores a temperatura ambient i en rotació.

5.3.5 Revelat

En acabar la incubació de l'anticòs secundari, es repeteixen els tres rentats per treure l'excés d'anticòs, i a continuació es procedeix amb el revelat. L'anticòs secundari duu fusionada una peroxidasa de rave. En afegir el reactiu de revelat ECL (*Enhanced Chemoluminescent Method*, Biological Industries), el qual conté peròxid d'hidrogen i luminol, la peroxidasa catalitza la reacció. Un dels productes de reacció és llum, que pot ser detectada mitjançant una càmera fotogràfica d'elevada sensibilitat (Fujifilm), i enregistrada mitjançant el software Las-3000 en forma de foto.

Anticòs	Casa comercial	Reactivitat	Dilució	Espècie	Pes molecular (kDa)
Anticòs primari					
Ac-K	Abcam	Humà	1:1000	Ratolí	Múltiple
Actina	Sigma	Humà	1:2000	Conill	42
DR5	Cell Signaling	Humà	1:1000	Conill	40, 48
E2F1	Abcam	Humà, ratolí i rata	1:1000	Ratolí	60
H3K4me3	Abcam	Humà	1:1000	Conill	15
hCNT1 G7	Santa Cruz Biotechnology	Humà	1:1000	Ratolí	60
hCNT1 N17	Santa Cruz Biotechnology	Humà	1:500	Cabra	60
hENT1 F-12	Santa Cruz Biotechnology	Humà, ratolí, rata	1:1000	Ratolí	45
KLF6 E-10 X	Santa Cruz Biotechnology	Humà, ratolí, rata	1:1000	Ratolí	43
LC3B	Cell Signaling	Humà, ratolí, rata	1:1000	Conill	14, 16
p21	Cell Signaling	Humà, mono	1:1000	Conill	21
p53	Invitrogen	Humà, ratolí, rata	1:1000	Ratolí	53
pRb (S780)	Cell Signaling	Humà, ratolí, rata	1:1000	Conill	110
Rb	Santa Cruz Biotechnology	Humà, ratolí, rata	1:500	Ratolí	110
RNF41	Santa Cruz Biotechnology	Humà	1:1000	Ratolí	36
STAT3	Cell Signaling	Humà, ratolí, rata	1:1000	Ratolí	80
Ubiquitina	Santa Cruz Biotechnology	Humà	1:1000	Ratolí	9 (+residus en proteïnes)
Anticòs secundari					
Anti-rabbit	BioRad	Conill	1:2000	Cabra	-
Anti-mouse	BioRad	Ratolí	1:2000	Conill	-
Anti-goat	Dako	Cabra	1:5000	Conill	-

Taula 13. Anticossos emprats. Indicades les dilucions, l'espècie de secundari i el pes molecular detectat.

5.4 Immunoprecipitació i co-immunoprecipitació

En aquesta tesi s'ha emprat la immunoprecipitació de hCNT1 per tal de poder-lo aïllar i així identificar possibles modificacions o interaccions amb altres proteïnes (co-immunoprecipitació).

Per a la immunoprecipitació, s'incuben 500µg d'extracte proteic juntament amb 2µg de l'anticòs anti-CNT1 G7, en un volum final de 500µL (el volum fins a 500 es completa amb NP40 suplementat). L'endemà es preparen 450µg de Protein G Dynabeads (Invitrogen) per IP, rentant-

les 3 vegades amb tampó de lisi NP40 i descartant el sobrenedant; com que són boletes magnètiques, s'empra un imant per separar les Dynabeads del sobrenedant. S'afegeix la incubació de la IP a l'ependorf amb les Dynabeads i es realitza la unió de l'anticòs a les Dynabeads incubant durant 10 minuts a temperatura ambient. En acabar, se separen les Dynabeads i el sobrenedant. Les Dynabeads contindran l'anticòs unit i la proteïna unida a l'epítip de l'anticòs, a més de possibles altres proteïnes que es puguin arrossegar. Per tant, al sobrenedant hi haurà la resta de proteïnes. Es guarda aquest sobrenedant, del qual 20 μ L (que contindran 20 μ g de proteïna) s'empraran pel posterior western blot. Després, es renten les Dynabeads 3 vegades amb NP40 suplementat. A continuació, s'elueix la proteïna immunoprecipitada mitjançant tampó de càrrega 2X, incubant 10 minuts a 50°C. Es recull l'eluit, que se suplementa amb 0,25 μ L de β -mercaptoetanol.

Les immunoprecipitacions es resolen mitjançant western blot, al qual s'hi carreguen una mostra de l'extracte proteic, el sobrenedant i la IP. En el cas de les co-immunoprecipitacions, s'immunodetecta primer la proteïna co-immunoprecipitada.

6. Transport de nucleòsids

El transport de nucleòsids és el mecanisme per dur a terme la valoració de l'activitat específica dels transportadors de nucleòsids als sistemes de cultius cel·lulars estudiats. Un mix de substrat no radioactiu (fred) de concentració coneguda i una proporció de substrat marcat radioactivament és emprat per incubar les cèl·lules durant un temps determinat. La incorporació de radioactivitat a les cèl·lules indicarà la quantitat de substrat captat durant el temps d'incubació previ a l'aturada brusca del transport. La lisi i solubilització en líquid de centelleig posteriors permetran obtenir valors de la mesura d'activitat.

Els transports realitzats a aquesta tesi s'han fet a 1 minut, un temps que es troba proper al rang de velocitat inicial pels transportadors estudiats, en què la quantitat de substrat transportat és directament proporcional al temps d'incubació. La concentració de substrat ha estat 1 μ Ci i 1 μ M en cada cas.

6.1 Medis i reactius

En funció de si es vol analitzar el transport dels transportadors concentratius o equilibratius, els medis utilitzats seran diferents. Els hCNT són sodi dependents, de manera que per determinar-ne l'activitat es compara l'entrada de nucleòsid radioactiu en cèl·lules incubades amb medi ric

en sodi (medi sodi) o bé amb medi sense sodi (medi colina). En canvi, els hENT no presenten sodi dependència, de manera que la comparativa es fa amb cèl·lules incubades sempre amb medi colina, amb o sense inhibidor (dipiridamol).

Medis:

- Medi sodi: NaCl 137mM, 5.4mM KCl, 1.8mM CaCl₂, 1.2mM MgSO₄ i 10mM HEPES, a pH 7.4 ajustat amb Tris base 1M.
- Medi colina: 137mM clorur de colina, 5.4mM KCl, 1.8mM CaCl₂, 1.2mM MgSO₄ i 10mM HEPES, a pH 7.4 ajustat amb Tris base 1M.
- Medi *stop*: NaCl 137mM i 10mM HEPES, a pH 7.4 ajustat amb Tris base 1M.

Se suplementen els medis amb el nucleòsid corresponent, fred i radioactiu. Amb el nucleòsid fred (Sigma; estoc 1mM) s'aconsegueix la concentració final de 1μM, mentre que el nucleòsid radioactiu permetrà que els nivells de radioactivitat siguin 1μCi. Els nucleòsids radioactius emprats en aquesta tesi estan marcats en cada cas amb triti (Moravek Inc):

- Citidina: *Cytidine* [5-³H(N)]- amb concentració 1mCi/mL i en solució 1:1 etanol:aigua.
- Uridina: *Uridine* [5,6-³H]- amb concentració 1mCi/mL i en solució aquosa.

6.2 Cèl·lules en monocapa

Les mesures de transport es realitzen en plaques de 24 pous. El nombre de cèl·lules sembrades depèn del tipus d'experiment. Cada condició consta de quadriplicats.

Per poder començar l'assaig de transport, cal rentar les cèl·lules amb 1mL de medi sodi o colina temperats als pous corresponents; així, s'eliminen les restes de medi de cultiu. El transport en si s'inicia quan se substitueixen els medis de rentat per medi amb substrat radioactiu, 250μL per pou, i es deixa incubant durant un minut. Passada la incubació, es renten dues vegades les cèl·lules ràpidament amb medi *stop*, fred. Així, s'atura el transport per disminució de temperatura i dilució. S'aspiren el romanents de medi i bé es congela la placa a -20°C o bé s'afegeixen 100μL de tampó de lisi per pou (tritó X-100 0.5%, 100mM NaOH) per processar l'experiment. La placa amb tampó s'agita vigorosament durant 1 hora a temperatura ambient, en un agitador horitzontal. La mescla s'homogenitza amb l'ajuda d'una pipeta multicanal. D'aquesta, 10μL són emprats per a determinar la concentració proteica, mentre que els 90μL restants se solubilitzen en 3mL de líquid de cintil·lació (EcoscintTMH, National Diagnostics) pel comptatge radioactiu. A més, per poder valorar els valors de radioactivitat, cal diluir per triplicat 5μL del medi de transport utilitzat en líquid de cintil·lació, ja que proporcionarà les mesures

d'activitat específica de la radioactivitat. La mesura de radioactivitat es realitza mitjançant un comptador beta que proporciona les desintegracions per minut (dpm) de l'isòtop radioactiu.

6.3 Inhibicions creuades

Les inhibicions creuades comprenen el mecanisme mitjançant el qual es pot deduir l'activitat específica d'un sol transportador en un sistema on n'hi ha més d'un. En aquests experiments s'afegeixen punts en què el medi, a més de contenir el nucleòsid radioactiu i la corresponent proporció de nucleòsid fred, conté excés d'un altre nucleòsid fred, a concentració 100µM. Així doncs, en un sistema en què coexisteixin hCNT1, hCNT2 i hCNT3, el transport amb citidina donaria valors de transport concentratiu per a hCNT1 i hCNT3 que són els que tenen capacitat de transportar-la, sense especificar quin dels dos seria el responsable principal de l'activitat. Si s'afegeix guanosina freda en excés, aquesta estaria sent transportada per hCNT3 i no hCNT1, de manera que l'activitat mesurada gràcies a l'entrada de nucleòsid radioactiu en aquest punt correspondria a l'activitat de hCNT1.

6.4 Valoració de proteïna pel mètode BCA

La valoració de proteïna és important per corregir els valors de transport de nucleòsid per la concentració proteica de cada punt, podent obtenir així l'activitat del transportador per µg de proteïna. Aquesta valoració es realitza mitjançant el mètode de l'àcid bicinonínic (BCA, Pierce). Els 10µL de proteïna han estat prèviament afegits a una placa de 96 pous, juntament amb un patró de dilucions d'albumina sèrica bovina de concentració de proteïna coneguda (0-2mg/mL) que servirà per extrapolar les concentracions proteiques dels punts de l'assaig. El Pierce conté dos reactius, A i B, que es mesclen en proporció 50:1, i se n'afegeix 200µL per pou a analitzar. La placa s'incuba 30 minuts a 37°C i 10 minuts a temperatura ambient, i es llegeix en un lector d'ELISA a 550nm.

6.5 Càlculs d'activitat específica

$$AE \left(\frac{\text{dpm}}{\text{pmol}} \right) = \frac{\text{dpm estàndard}}{\text{volum estàndard} \times [\text{substrat}]}$$

$$\text{Activitat} \left(\frac{\text{pmol}}{\text{mg prot}} \cdot \text{min} \right) = \frac{\text{dpm mostra} \times 10^3}{AE \times \text{volum mostra} \times [\text{proteïna}] \left(\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}} \right)} \cdot \text{min}$$

7. Estudi funcional del promotor

L'estudi funcional del promotor s'ha dut a terme des de dues aproximacions. La primera ha estat clonar fragments del promotor putatiu en un vector d'expressió de luciferasa (veure apartat 1.1) per valorar-ne l'activitat reguladora. El promotor putatiu s'ha determinat a partir de l'eina bioinformàtica MatInspector, a la qual s'hi ha introduït la seqüència *upstream* d'*SLC28A1* o *SLC28A2* (fins ATG). S'obté un llistat de factors de transcripció i la seva localització. Els segments de promotor han estat dissenyats en funció de la densitat de llocs d'unió putatius de factors de transcripció que podrien estar relacionats amb hCNT1 o hCNT2.

7.1 Assaig luciferasa

Els assajos luciferasa s'han realitzat mitjançant el *Dual Luciferase Reporter Assay System* (Promega). Aquest assaig es basa en la mesura de la luminiscència de la proteïna luciferasa, la qual només pot ser sintetitzada si el promotor clonat que estem analitzant presenta activitat.

L'assaig es realitza en plaques MW24, sembrant triplicats per a cada condició. Cada fragment de promotor clonat és una condició diferent, i es cotransfecta a les cèl·lules juntament amb el vector pRL-TK. pRL-TK expressa la proteïna renilla sota el control de la regió promotora del gen timidina quinasa del virus *Herpes simplex*, i s'empra com a control de transfecció (la quantitat de DNA de pRL-TK és un 10% del DNA total). A més, cada assaig ha d'incloure el control negatiu (pGL3 *basic* buit) i els primers assajos poden incloure també el control positiu, pel qual s'utilitza el vector pGL3 *promoter*, donat que presenta un promotor fort per expressar la luciferasa.

Per realitzar l'assaig en si es renten les cèl·lules un cop amb PBS 1X i es lisen amb el tampó PLB 1X, proveït pel kit, durant 20 minuts en agitació. Les mostres de cada pou es recullen per separat, són vortejades durant 15 segons i se centrifuguen a rpm màximes durant 2 minuts a 4°C. Es recupera el sobrenedant, el qual pot ser guardat a -80°C o usat per a la lectura imminent. Es dipositen 20µL de sobrenedant en pous de MW96 blanc opac (Biogen). La lectura es realitza amb el suport d'un luminòmetre i el software Glomax. Cal afegir els dos reactius corresponents als injectors, LARII per detectar la luciferasa i Stop&Glo per detectar la renilla. Un cop realitzada la lectura, el software dona els valors de luminiscència en un full excel. El processament de dades es realitza, en primer lloc, calculant la *ratio* entre la luminiscència de la luciferasa i la de la renilla. En segon lloc, es calcula l'activitat dels fragments de promotor respecte el control negatiu – s'estableix com a 1 el valor del pGL3 *basic* buit.

En aquesta tesi, a més, s'ha provat la combinació de transfectar els fragments de promotor juntament amb factors de transcripció candidats. En aquests casos, la cotransfecció s'ha realitzat

dividint la quantitat de DNA total a la meitat. Dels 500ng de DNA per pou de MW24, 250ng han estat de factor de transcripció (o pcDNA3.1 buit, el seu control negatiu) i l'altra meitat de clon de promotor i renilla (mantenint el 10% de renilla respecte el promotor).

7.2 Immunoprecipitació de cromatina (ChIP)

S'utilitzen plaques de 10cm de diàmetre a confluència 70-80%. Sense retirar el medi, es procedeix al *cross-linking* del DNA i les proteïnes d'unió mitjançant l'addició de formaldehid del 36,5% a una concentració final de l'1%, i s'incuba 10 minuts a temperatura ambient en agitació suau. Seguidament, s'atura el *cross-linking* afegint glicina a una concentració final de 125mM. Es retira el medi i es renta dos cops amb PBS 1X. S'afegeix 1mL tampó *Cell Lysis Buffer* (CLB: Pipes pH 8 5mM, KCl 85 mM, NP40 0,5% i inhibidor de proteases fresc del dia) i es recullen les cèl·lules amb l'ajuda d'un *cell lifter*. S'incuba en rotació durant 30 minuts a 4°C. A continuació, se centrifuga 5 minuts a 5000rpm i 4°C i es descarta el sobrenedant. Es resuspèn el *pellet* amb 250µL de tampó *Nuclear lysis buffer* (NLB: Tris HCl pH 8,1 50mM, EDTA 10mM, SDS 1% i inhibidor de proteases fresc del dia). S'incuba 10 minuts en gel i se sonica en un sonicador *Vibra-Cell*TM (Sonics & Materials), amb els paràmetres TUNE25, 50% de potència i 20 cicles ON/OFF de 30" cadascun (les condicions poden variar segons la línia cel·lular). La sonicació serveix per a fragmentar la cromatina, i els paràmetres han estat posats a punt prèviament per tal que els fragments resultants tinguin una mida de 500pb aproximadament, tal i com recomana el protocol. Després, se centrifuga la mostra durant 15 minuts a 4°C i velocitat màxima. Es guarda el sobrenedant, i 40µL d'aquest es congelen en un tub a part – serà l'*input*. En paral·lel, es preparen 450µg per condició *Protein G Dynabeads* (Invitrogen), fent un bloqueig previ amb BSA 1mg/mL i esperma de salmó 1mg/mL, durant 1 hora a 4°C i en rotació. A continuació, s'hi uneixen 3,6µg d'anticòs (Taula 14) diluït en PBS amb Tween-20, durant 30 minuts en rotació a temperatura ambient. Finalment, es renten les *beads* amb tampó de dilució d'IP (IPdil: SDS 0,01%, tritó 1,1%, EDTA 1,2mM, Tris HCl pH 8,1 16,7mM, NaCl 167mM i inhibidor de proteases fresc del dia). En aquest punt, s'afegeixen 30µg de DNA provinents de la mostra sonicada diluïts 1/10 amb tampó IPdil, i s'incuba tota la nit a 4°C en rotació. L'endemà, es retira el sobrenedant i es renten les *beads* amb una sèrie de tampons: TSE1 (Tris HCl pH 8,1 20mM, EDTA 2mM, NaCl 150mM, tritó 1%, SDS 0,1%), TSE2 (Tris HCl pH 8,1 20mM, EDTA 2mM, NaCl 500mM, tritó 1%, SDS 0,1%), TP3 (Tris HCl pH 8,1 10mM, EDTA 1mM, àcid deoxicòlic 1%, NP40 1%) i TE (Tris HCl pH 8,1 10mM, EDTA 1mM). A continuació, s'elueix dues vegades amb 60µL de tampó d'elució fresc (NaHCO₃ 100mM, SDS 1%) incubant 10 minuts a 37°C, i es guarda el sobrenedant en un sol tub nou que procedirà al *de-crosslinking*. Aquest es fa a 65°C durant 4h. Per tal de recuperar el

DNA tant de l'*input* com de la mostra de CHIP, s'afegeixen 3µL de NaCl 5M, 10µL de Tris 1M, 1µg de RNase i 1µL de solució de proteïnasa K en tampó TNEK 5X (Tris HCl pH 7,5 50mM, EDTA 5mM, NaCl 500mM, proteïnasa K 0,5mg/mL). S'incuba 1 hora a 55°C i es purifica el DNA mitjançant el kit comercial *DNA Clean&Concentrator* de Zymo Research.

Anticòs	Casa comercial
E2F1	Abcam
H3K4me3	Abcam
KLF6 E-10 X	Santa Cruz Biotechnology

Taula 14. Anticossos emprats per a immunoprecipitar a assaig CHIP.

Per tal de detectar si el fragment de DNA d'interès està a la nostra mostra, es fa una PCR convencional amb *primers* dissenyats per a l'amplificació de fragments menors a 500bp (Taula 15), donat que la sonicació fa que la cromatina doni fragments de màxim aquesta mida.

Primer	Seqüència (5'-3')
H3K4me3	
BS1 H3K4 hCNT1 fw	GTGACAGCAATGACACCTGC
BS1 H3K4 hCNT1 rv	ACAACAAGGATTTAATGGGC
BS2 H3K4 hCNT1 fw	TAGCTGGGACTACAGGCACCT
BS2 H3K4 hCNT1 rv	AAGTGCTGGGATTACAGGCA
BS3 H3K4me3 hCNT1 fw	TGCCTGTAATCCCAGCACTT
BS3 H3K4me3 hCNT1 rv	CATCTGACGGGATTCACAACA
KLF6	
BS1 KLF6 fw	TAAGACCCTTGGTTTGCAG
BS1 KLF6 rv	CAGATGTGCACCATACGCCA
BS2i3 KLF6 fw	TAAAATTTCGCCCTGCCTGGT
BS2i3 KLF6 rv	ACTCTTTGCTTGTGACTCTTC
BS4 KLF6 P2 fw	CTCTTCTGACAGTTCTTGTGC
BS4 KLF6 P2 rv	TGAGTGAGACCTAGAGCTGA
BS5 KLF6 P3 fw	TCAGCTCTAGGTCTCACTCA
BS5 KLF6 P3 rv	TCAAGGAGGCATGGCCAGCA
BS6 KLF6 fw	TAGCTGGGACTACAGGCACCT
BS6 KLF6 rv	AAGTGCTGGGATTACAGGCA
BS7D KLF6 fw	CTTGACAGACCTGAAACT
BS7D KLF6 rv	TGCTGCTTCTCCATCAGAGAT
BS8 KLF6 fw	AGGACTGCTTGAGCCCAGGA
BS8 KLF6 rv	GCTGAAAGACAAATCAGGGA
E2F1	
hENT1 E2F1 FW	AGAGGGAAGCTGCAGCGAGA
hENT1 E2F1 RV	TGACCGCAGCCTGTTTTAGG
BS E2F1 hCNT1 fw	ACTGCATGGTTGCTGCTGGA
BS E2F1 hCNT1 rv	ACTCCAGCCTCGGCAACAGA

Taula 15. Primers dissenyats per a la detecció dels fragments de promotor d'interès.

8. Localització subcel·lular de proteïnes fluorescentes

L'estratègia escollida per sublocalitzar proteïnes dins la cèl·lula ha estat la creació de proteïnes quimèriques mitjançant la fusió de GFP (subapartat *Vectors plasmídics*, 2.1.1). Les cèl·lules emprades han estat les HEK293. Per tal de poder seguir el procés posterior de fixació, cal sembrar les cèl·lules en MW24 sobre cobreobjectes de 12mm de diàmetre prèviament esterilitzats (llum UV, 15 minuts). Les cèl·lules seran transfectades segons els procediments habituals, i a les 48h es procedirà a la preparació de la mostra.

Tenint en compte que les proteïnes analitzades en aquesta tesi són quimeres de diferents variants de hCNT1, cal emprar un tint de membrana plasmàtica per a comprovar la seva localització. L'WGA (*Wheat Germ Agglutinin*) s'uneix als residus d'àcid siàlic i N-acetilglucosaminil de la membrana. A més, també es tenyeix el nucli cel·lular amb bis-Benzimida H 33342 (Sigma-Aldrich).

Per processar les mostres, es renten els cobreobjectes amb PBS 1X. S'afegeixen 300µL per pou de solució de tinció de nucli i de membrana, que es prepara amb medi sense sèrum, Hepes 10mM, WGA 1µg/mL i bis-Benzimida 1µg/mL. S'incuba durant 10 minuts a temperatura ambient. Posteriorment, es retira la solució i es renten les cèl·lules dues vegades amb PBS 1X. Els cobreobjectes són fixats amb paraformaldehid 4% durant 15 minuts en agitació suau i temperatura ambient. Es tornen a rentar els cobreobjectes amb PBS 1X, tres vegades. Seguidament, es fa el muntatge en els portaobjectes gràcies a la solució de muntatge (*ProLong Gold antifade reagent*, Invitrogen). Es diposita una gota de 5µL sobre el portaobjectes i es col·loca el cobreobjectes a sobre, girat de manera que el cantó amb cèl·lules quedi en contacte amb el medi de muntatge. Es deixa assecar a temperatura ambient i fosc durant 24h.

L'anàlisi de les mostres es fa amb l'ajut d'un microscopi confocal o de fluorescència. Les imatges d'aquesta tesi han estat obtingudes en el microscopi confocal Leica SP2 del Servei de Microscopia de la Facultat de biologia, a augment x63. La longitud d'ona per cada component és 405nm per detectar bis-Benzimida, 496nm per GFP i 561nm per WGA. Les imatges han estat processades amb el programa ImageJ.

9. Perfil de cicle cel·lular

L'anàlisi del perfil de cicle cel·lular es realitza mitjançant citometria de flux, la qual permet detectar el DNA tenyit de les cèl·lules. En una població de cèl·lules en creixement, el DNA es distribueix seguint dos pics: el primer correspon a G_1/G_0 i el segon a G_2/M ; a més, entre els pics

apareix una vall que correspon a la fase S. Els pics simulen la quantitat de DNA, ja que en la fase G₂/M les cèl·lules presenten el doble de DNA que en la fase G₁/G₀. Degut a la duplicació del DNA, la quantitat en fase S serà més variable.

En aquesta tesi s'ha emprat el mètode del iodur de propidi per tal de determinar el percentatge de cèl·lules en les diferents fases del cicle. El iodur de propidi és un fluorocrom que s'intercala entre les bases del DNA i l'RNA i que emet fluorescència a 617 nm quan s'excita amb un làser de 538 nm.

Procés:

Les cèl·lules a analitzar es tripsinitzen i se centrifuguen durant 5 minuts a 1500rpm. A continuació es fa un rentat amb PBS 1X, es tornen a centrifugar les cèl·lules i es resuspèn el *pellet* amb 300µL de PBS 1X (volum per cada $5 \cdot 10^5$ - $1 \cdot 10^6$ cèl·lules). Després es fixen les cèl·lules amb etanol absolut, el qual també actua com a permeabilitzador; s'afegeixen 700µL d'etanol fred (guardat a -20°C) gota a gota, en agitació suau i constant. Les mostres es deixen en fixació a -20°C durant mínim 24 hores i màxim 15 dies. En el moment d'analitzar-les, se centrifuguen i es renten un cop amb PBS 1X per tal d'eliminar l'etanol. Es resuspenen les cèl·lules amb 300µL de iodur de propidi (Sigma) 50µg/mL i RNasa (Roche) 10µg/mL – amb la RNasa s'evita la unió de l'intercalant a l'RNA. Després d'incubar 1 hora en fosc, es dipositen 200µL de cada mostra en una pou de placa de 96 perquè siguin processades pel citòmetre. Les dades s'analitzen mitjançant el software Summit® V3.1 Build844.

10. Estadística

Tot l'anàlisi estadístic de les dades generades en aquesta tesi ha estat efectuat amb el programa GraphPad Prism 6.0 (La Jolla). A cada representació gràfica, generalment realitzada amb el mateix programa, hi ha indicat el nombre d'experiments independents. La representació de les mostres indica el valor de la mitjana de les rèpliques independents i l'error estàndard.

S'han seguit dues estratègies per analitzar la significança estadística de les dades, en funció del disseny experimental. En el cas de comparar un tractament amb un control, s'ha emprat el test t-Student per calcular el valor de la probabilitat p d'error que existeix quan s'afirma que dos grups experimentals són diferents: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.005$ (***). En canvi, si el disseny experimental implica la comparació entre més d'un grup diferent, s'ha realitzat el test de multivariants ANOVA, i la significança ha estat adreçada mitjançant el test *post-hoc* Tukey; els valors p : $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.005$ (***), $p < 0.001$ (****).

RESULTATS I DISCUSSIÓ

BLOC 1: CARACTERITZACIÓ DE LA PROTEÏNA hCNT1

1. Estudi del primer cas clínic associat a hCNT1

1.1 Cas clínic

Durant el congrés de la *Purine and Pyrimidine Society* del 2015 a Nova York, el Dr. André van Kuilenburg (*Academic Medical Centre – Amsterdam*) va consultar-nos en relació a un pacient de les Antilles Holandeses que presentava característiques clíniques de les quals no havien aconseguit detectar la causa genètica. El pacient era el segon fill de pares que no presentaven consanguinitat. L'embaràs va ser complicat degut a contraccions primerenques, probablement relacionades amb un mioma uterí, juntament amb inici gradual d'oligohidramnis. Aquestes complicacions van dur a programar el naixement per cesària, a la setmana 38+1. El nadó, un nen, va néixer amb un pes de 2750 grams, amb puntuacions Apgar de 9 i 10 després d'un i 5 minuts respectivament. L'exploració física va ser normal, incloent l'exploració del fetge i la melsa, els quals tenien mides dins els rangs de normalitat. Tanmateix, el dia 1 va presentar hipoglicèmia (glucosa 2,1 mmol/L a 1 hora; 1,9 mmol/L a les 6 hores), de manera que se li van administrar infusions de glucosa. Es va recuperar completament al dia següent. Durant les properes setmanes, la mare va notar irritabilitat i episodis de 2-3 minuts de moviments simètrics erràtics de les extremitats. A les 3 setmanes va ser readmès a l'hospital per tal de determinar l'origen d'aquestes convulsions. La primera exploració va determinar que el nadó estava en estat hipertònic, i el fetge i la melsa continuaven presentant mides normals. Se li van realitzar una sonografia cerebral, la qual no va destacar cap paràmetre anormal. A més, els nivells de glucosa, electròlits i oxigen a la sang estaven dins de les normals. Es va repetir l'encefalograma, el qual va mostrar activitat teta multifocal en un fons immadur, sense activitat epilèptica. En aquest punt, el neuròleg pediàtric responsable del cas va concloure que els moviments que patia el nadó eren deguts a mioclònia, i que no es tractava d'un cas d'epilèpsia. El pacient va ser enviat a casa de nou. Durant aquest temps, els moviments espontanis van continuar. Se li va fer una avaluació metabòlica, la qual va indicar que presentava nivells elevats d'uridina a orina (Taula 16); així, va ser readmès per tal de realitzar-li més proves als dos mesos de vida. El nadó pesava 4,8 kg (percentil 98), mesurava 53 cm (percentil 80) i la seva circumferència occipito-frontal era de 38,5 cm (percentil 90). A més, va ser admès tenint febre. Se li va fer una radiografia, la qual va mostrar signes de pneumònia amb efusions pleurals. En aquest punt, se li van administrar antibiòtics. Se li van repetir les anàlisis metabòliques, i es va observar que continuava presentant nivells elevats d'excreció d'uridina per orina (Taula 16). Durant aquest període d'anàlisis, la febre

li va desaparèixer degut a l'ús d'antibiòtics; de manera sorprenent, però, el pacient va empitjorar. Anàlisis dels paràmetres hematològics suggerien que podia tenir una infecció viral, però els resultats de la serologia eren negatius. Va desenvolupar acidosi làctica (pH 7.22 [ref: 7.35–7.45]; excés de base –6.9 mmol/L [ref: –3 a +3]; lactat 16.6 mmol/L [ref: 1.1–3.5]), alteració dels enzims hepàtics (aspartat aminotransferasa 2242 U/L [ref: 9–90]; alanina aminotransferasa 678 U/L [ref: 13–45]; gamma glutamil transferasa 127 U/L [ref: 8–90]; lactat deshidrogenasa 4695 U/L [ref: 180–430]), ascites gradual i insuficiència respiratòria. El pacient va ser intubat per suport respiratori. L'acidosi làctica va empitjorar (pH 6.88, excés de base –24 mmol/L; lactat 17.4 mmol/L), així com la hipoglicèmia (glucosa 1.9 mmol/L; ref: 2.8–5.5). Se li va realitzar una sonografia abdominal, la qual va revelar que el fetge estava lleugerament engrandit (diàmetre màxim 8 cm; ref: 4,7-7,5 cm), la melsa presentava augments importants (diàmetre 8 cm; ref: 3-6 cm) i també es va detectar necrosi aguda del còrtex renal. Els nivells elevats d'uridina en orina van persistir, i es va observar que presentava citidinúria (Taula 16). Els tests cardíacs i neuronals van concloure que l'activitat en aquests òrgans era normal. En aquest punt, el pacient va desenvolupar fallida multiorgànica i va morir a les 9 setmanes de vida. No es va concedir permís per a l'autòpsia.

Edat	PACIENT			CONTROLS (rang)
	4 setmanes	8 setmanes	9 setmanes	
Orina (mmol/mol creatinina)				
Uridina	102	56	48	0,06 – 2,5 (n=50)
Citidina	n.d.	12,6	5,0	0,08 – 2,2 (n=50)
Plasma (µM)				
Uridina	n.d.	4,6	6,5	1,3 – 9,4 (n=39)
Citidina	n.d.	0,6	n.d.	< 0,1 – 0,2 (n=39)

Taula 16. Valors d'uridina i citidina a orina i plasma del pacient. El rang de referència correspon a l'edat entre 0 i 2 anys. n.d., no disponible.

1.2 Anàlisi genètica del pacient

Es va procedir a analitzar mitjançant mostres del pacient quina podria ser la base genètica de la simptomatologia severa que presentava. Degut a la pirimidinúria detectada, es va decidir analitzar els nivells de purines i pirimidines del plasma (Taula 16). Es va observar que la uridina presentava nivells normals, mentre que hi havia un petit augment de citidina en plasma. Així doncs, en primer lloc es van analitzar enzims del metabolisme de pirimidines. S'han descrit molts desordres genètics relacionats principalment amb la síntesi *de novo* i la degradació de pirimidines, els quals presenten fenotips clínics molt diversos; entre altres, anèmia, immunodeficiència, pedres renals, convulsions, discapacitat intel·lectual, autisme i retard en el

creixement (Balasubramaniam et al. 2014). Es van analitzar les seqüències dels enzims més relacionats amb la citidina i la uridina: uridina citidina quinasa 1 i 2 (UCK1, UCK2), responsables de la fosforilació de citidina i uridina per formar CMP i UMP, respectivament; i uridina fosforilasa 1 i 2 (UPP1, UPP2), que catalitzen el pas d'uridina a uracil. La manca d'aquests dos enzims podria explicar l'acumulació de citidina i uridina en les mostres del pacient. Tanmateix, els resultats de seqüenciació van revelar que aquests enzims no presentaven cap variant patològica, així que es va descartar la seva participació.

Fins aquest punt, doncs, no estava clar d'on venia la pirimidinúria. La col·laboració amb el nostre grup va començar quan vam suggerir que potser els nivells alts de citidina i uridina s'explicaven per un dèficit en la recaptació enlloc d'un problema en la síntesi dels metabòlits. hCNT1 és l'únic transportador de nucleòsids que transloca específicament pirimidines, de manera que el vam suggerir com a gen candidat. A més, l'expressió d'hCNT1 al ronyó es troba sobretot al túbul contornejat proximal, que és la localització implicada en la reabsorció de biomolècules com glucosa i nucleòsids (Pastor-Anglada et al. 2007). Per tant, es va procedir a seqüenciar el gen *SLC28A1*, concretament les seqüències genòmiques dels exons seus exons i les regions flanquejants dels introns. Els resultats de seqüenciació es van comparar amb la seqüència de referència NM_001287762.1. Es van detectar un total de 13 variants en heterozigosi per aquest gen (Taula 17): una inserció de tres nucleòtids, 4 variants silencioses, 4 variants intròniques i 4 variants amb canvi de sentit. De totes aquestes variants, algunes són variants amb freqüència elevada a la població – el que s'anomenava anteriorment polimorfismes. És el cas, per exemple, de la inserció de 3 nucleòtids, que té com a conseqüència la inserció d'una valina després de la lisina 141. Altres canvis freqüents són el canvi d'una G per una C a la posició 63 de l'intró 9, la variant silenciosa p.K383K i les variants amb canvi de sentit p.V189I i p.Q237K. L'alta freqüència d'aquestes variants va fer que fossin descartades per als estudis posteriors de la proteïna hCNT1, donat que si fossin responsables per la pirimidinúria del pacient aquest símptoma seria més habitualment detectat. A més, es van deixar de banda les altres variants sinònimes i la majoria de variants intròniques. Per tant, es va procedir l'estudi per a 3 variants d'*SLC28A1*: el canvi intrònic c.97-10 C>T i les variants amb canvi de sentit p.R510C i p.R561Q. Tal i com mostra la Taula 17, la baixa freqüència d'aquestes variants fa que siguin considerades rares.

La variant c.97-10 C>T està localitzada immediatament abans de la posició d'acceptació d'*splicing* de l'exó 3. La mateixa seqüenciació del gen va revelar que el pacient era heterozigot per aquesta variant. Tot i només tenir-ne una còpia, la proximitat al lloc d'acceptació d'*splicing* podria estar alterant la maduració del pre-mRNA sorgit d'aquest al·lel. Així, en primera instància es va voler determinar si la variant podia afectar l'*splicing* del pre-mRNA del gen *SLC28A1*.

Aquesta part es va realitzar al laboratori del Dr. André van Kuilenburg. Es va amplificar per PCR un fragment genòmic del pacient de 3272 pb de la regió exó 2 – exó 4 del gen *SLC28A1*, incloent els introns, tant per l'al·lel *wild type* com per l'al·lel mutant que presentava la variant (Figura 12). Els fragments es van clonar en el vector pcDNA3.1Zeo; aquesta construcció s'anomena minigen. Es van transfectar a cèl·lules HEK FI-In els dos minigens, tant el WT com el que presentava la variant, per tal d'avaluar l'expressió d'RNA d'*SLC28A1*. La seqüenciació del cDNA de les HEK FI-In transfectades amb els diferents minigens va revelar que l'*splicing* era igual per a les dues construccions. Per tant, la variant c.97-10 C>T no afectava l'*splicing* del gen *SLC28A1*.

Exó / Intró	Variant	dbSNP ID	Efecte	ESP MAF		ExAC MAF
				AE	AA	
Exó 2	c.[9C>T]; [9C=]	rs8187737	p.N3N	0.01%	8.6%	0.77%
Intró 2	c.[97-10C>T]; [97-10C=]	rs8187742		0.06%	1.53%	0.19%
Exó 5	c.[419_420insTGT]; [419_420=]	rs151038463	p.Leu140_Lys141insVal	30.4%	29.7%	27.3%
Exó 6	c.[565G>A]; [565G=]	rs2290272	p.V189I	35%	21.8%	40.4%
Exó 7	c.[630A>T]; [630A=]	rs8187755	p.G210G	0.03%	9.2%	0.72%
Exó 7	c.[709C>A]; [709C=]	rs8187758	p.Q237K	22.4%	17.1%	28.1%
Intró 8	c.[795+69C>T]; [795+69C=]	rs2305365		n.r.	n.r.	30.4%
Intró 9	c.[876+63G>C]; [876+63G=]	rs1562885		n.r.	n.r.	35.6%
Intró 9	c.[958-9T>C]; [958-9T=]	rs3825875		37.4%	41.7%	39%
Exó 12	c.[1149G>A]; [1149G=]	rs2305367	p.K383K	37.1%	40.5%	47.1%
Exó 13	c.[1368A>G]; [1368A>G]	rs2305367	p.Q456Q	12.6%	5.2%	88.4%
Exó 14	c.[1528C>T]; [1528C=]	rs2242047	p.R510C	1.7%	8.5%	5.7%
Exó 16	c.[1682G>A]; [1682G=]	rs149246522	p.R561Q	n.r.	n.r.	0.0041%

Taula 17. Variants del gen *SLC28A1* trobades al pacient. Abreviacions: ESP, *Exome Sequencing Project*; MAF, *Minor Allele Frequency*; ExAC, *Exome Aggregation Consortium*; AE, americans europeus; AA, americans africans; n.r., no registrat. La seqüència de referència per analitzar *SLC28A1* és NM_001287762.

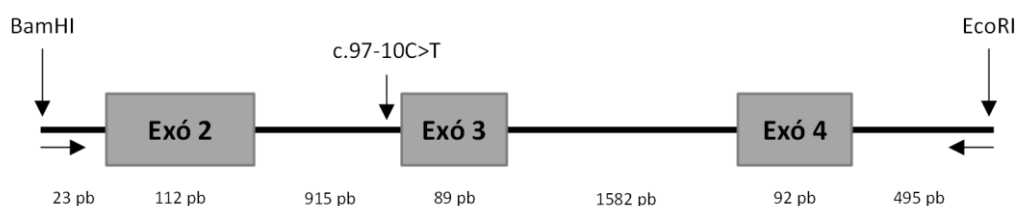


Figura 12. Esquema de la construcció del minigen del locus proper a l'exó 3 del gen *SLC28A1*.

1.3 Estudi funcional de les variants d'hCNT1

A continuació, es va prosseguir amb l'estudi de les dues variants de canvi de sentit que presentaven baixa freqüència en la població: p.R510C i p.R561Q. La primera es tracta d'una variant que és molt poc freqüent a la població europea (1,7%). Ara bé, en altres poblacions, com

l'asiàtica, presenta major incidència (36%). La baixa freqüència a la població del pacient va fer incloure p.510C a l'estudi. Per altra banda, la variant p.R561Q pràcticament no havia estat descrita, i les dades indiquen una freqüència de 0,0041%. Per tant, es pot qualificar de variant rara.

1.3.1 Efecte de les variants a l'estructura terciària d'hCNT1

Es va analitzar l'estructura d'hCNT1 per tal de determinar si les variants c.1528C > T (p.R510C) i c.1682G > A (p.R561Q) estaven associades a un mal funcionament del transportador hCNT1, i per tant es pogués explicar la pirimidúria del pacient. La proteïna hCNT1 no ha estat cristal·litzada fins el moment. Per estudiar canvis en l'estructura es va aprofitar un model d'estructura d'hCNT1 creat al nostre laboratori en col·laboració amb els Drs. Xavier Barril i Axel Bidon-Chanal. El model es va crear mitjançant modelatge per homologia, emprant com a base l'estructura cristal·litzada de l'ortòleg procariota vcCNT (ID de PDB: 3TIJ) (Johnson et al. 2012). Es va realitzar un alineament de seqüències entre l'estructura cristal·litzada i hCNT1, mitjançant MOE (*Molecular Operating Environment*, Canadà, 2016), per generar els models d'homologia tal i com es descriu per hCNT1 a Arimany-Nardi et al. 2017.

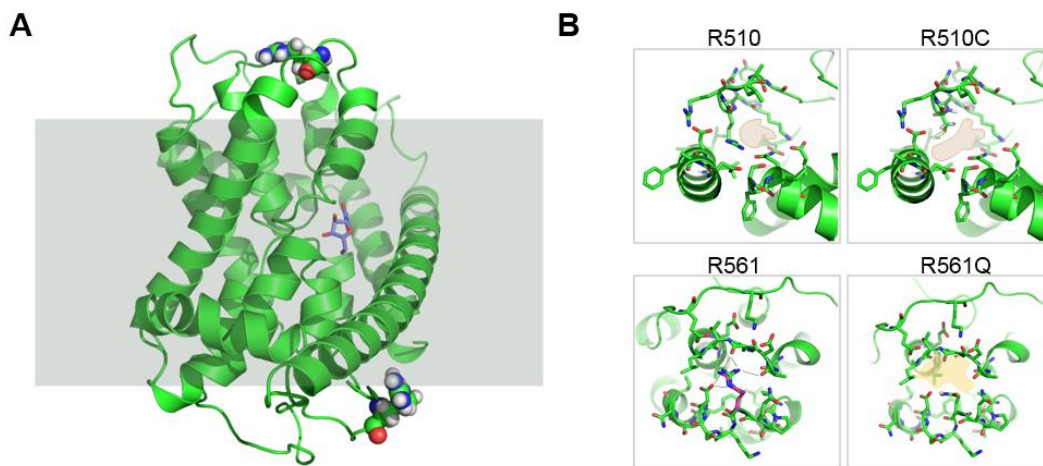


Figura 13. Modelatge per homologia d'hCNT1 per tal de determinar canvis en el patró d'interacció dels residus R510 i R561 d'hCNT1. (A) Indicació de la localització intramolecular dels residus R510 i R561 en el model d'hCNT1 insertat a la membrana plasmàtica. (B) R510 (a dalt a l'esquerra) i R561 (a baix a l'esquerra) són representats amb bastons, igual que els residus del voltant, mostrant les interaccions. Els panells de la dreta mostren el mateix però de les variants R510C (dalt) i R561Q (baix). Totes dues variants generen canvis en el patró d'interacció entre residus i el volum ocupat pels residus.

Segons el model d'hCNT1, el residu R510 és extracel·lular, mentre que el residu R561 es troba a la part citosòlica de la proteïna de membrana (Figura 13A). Com que tots dos residus es troben lluny del lloc d'unió del substrat, es va descartar que les variants afectessin la unió del nucleòsid

al transportador. A continuació, es van analitzar individualment els canvis trobats en el pacient. La càrrega positiva de la cadena lateral d'R510 interacciona amb la càrrega negativa de D503 mitjançant interaccions càrrega-càrrega. A més, també interacciona mitjançant ponts d'hidrogen amb Q461 i N443 (Figura 13B). Per altra banda, R561 presenta interaccions semblants amb D564, L330, A331 i M333 (Figura 13B). Les mutacions a cisteïna en el cas d'R510 i a glutamina en el cas d'R561 causen canvis dràstics en el patró d'interaccions electrostàtiques d'ambdós residus. La cisteïna a la posició 510 presenta una naturalesa més hidrofòbica i una cadena lateral més curta. Per altra banda, la glutamina en la posició 561 no canvia tant la naturalesa del residu però la cadena lateral també és sensiblement més curta. Segons el model d'estructura, el volum ocupat pels residus també canvia substancialment. Tot plegat indica que les variants afecten l'estructura de la proteïna i fins i tot la seva capacitat de realitzar canvis conformacionals.

1.3.2 Impacte de les variants en l'activitat i expressió d'hCNT1

Amb l'objectiu d'estudiar els efectes funcionals de les variants, es va clonar hCNT1 a partir de cDNA de teixit hepàtic al vector d'expressió pcDNA3.1. Les variants c.1528C > T (p.R510C) i c.1682G > A (p.R561Q) es van generar en vectors independents mitjançant mutagènesi dirigida. A més, també es va generar un vector d'expressió d'hCNT1 amb les dues variants, R510C;R561Q, per tal d'estudiar els possibles efectes en cas que les variants estiguessin al mateix al·lel.

Es van realitzar assajos funcionals amb les quatre construccions generades (WT, R510C, R561Q i R510C;R561Q). Es van expressar heteròlogament a cèl·lules HEK293, donat que s'ha descrit que aquesta línia cel·lular no presenta expressió d'hCNT1 ni activitat associada (Arimany-Nardi et al. 2017). L'activitat del transportador va ser analitzada mitjançant l'entrada de citidina marcada amb triti a les cèl·lules transfectades. Es va observar que a les 24 hores post-transfecció l'activitat de les variants R510C i R561Q era significativament menor comparat amb hCNT1 WT (Figura 14A). A les 48 hores post-transfecció les variants continuaven presentant activitat reduïda, però amb menys diferències entre si (Figura 14B). Aquestes diferències podrien ser degudes a una maduració més lenta per part de la variant R510C en comparació amb R561Q, o a un major recanvi de la variant R561Q. Més endavant es detallaran els anàlisis pertinents. Cal destacar que el doble mutant R510C;R51Q presentava una reducció dramàtica de l'entrada de citidina a tots dos temps (Figura 14). En paral·lel es va analitzar el patró d'expressió de totes les variants. Destaca el fet que hCNT1 presentava múltiples bandes de pesos moleculars diferents. En comparar la proteïna resultant de la traducció de cada variant, es va observar que el patró de bandes diferia considerablement, sobretot pel que fa les bandes de major pes molecular. hCNT1 WT presentava alta expressió de les bandes més pesades tant a 24 com a 48 hores post-

transfecció. La variant R510C presentava més intensitat de les bandes del voltant de 60 kDa, sobretot a 48 hores. El fet que més va cridar l'atenció fou la reducció de les bandes de pes més elevat a 24 hores, que es recuperava en certa manera a 48 hores. Aquest canvi quantitatiu podria anar lligat al fet que l'activitat a les 48 hores era més semblant a la variant R561Q que no pas a les 24 hores. Per altra banda, la variant R561Q presentava un patró més semblant a hCNT1 WT però amb menor intensitat de les bandes de pes molecular alt. Tant R510C com R561Q, a més, contenien una banda d'uns 53 kDa amb major intensitat que hCNT1 WT. Per últim, el doble mutant R510C;R561Q era el que presentava diferències més substancials: les bandes de pes molecular més elevat desapareixien i només romanien les de 60 kDa aproximadament (Figura 14). La desaparició de les bandes de pes molecular més alt, lligada a la manca d'activitat transportadora d'R510C;R561Q, va suggerir que les bandes de més pes podrien estar associades a l'activitat d'hCNT1.

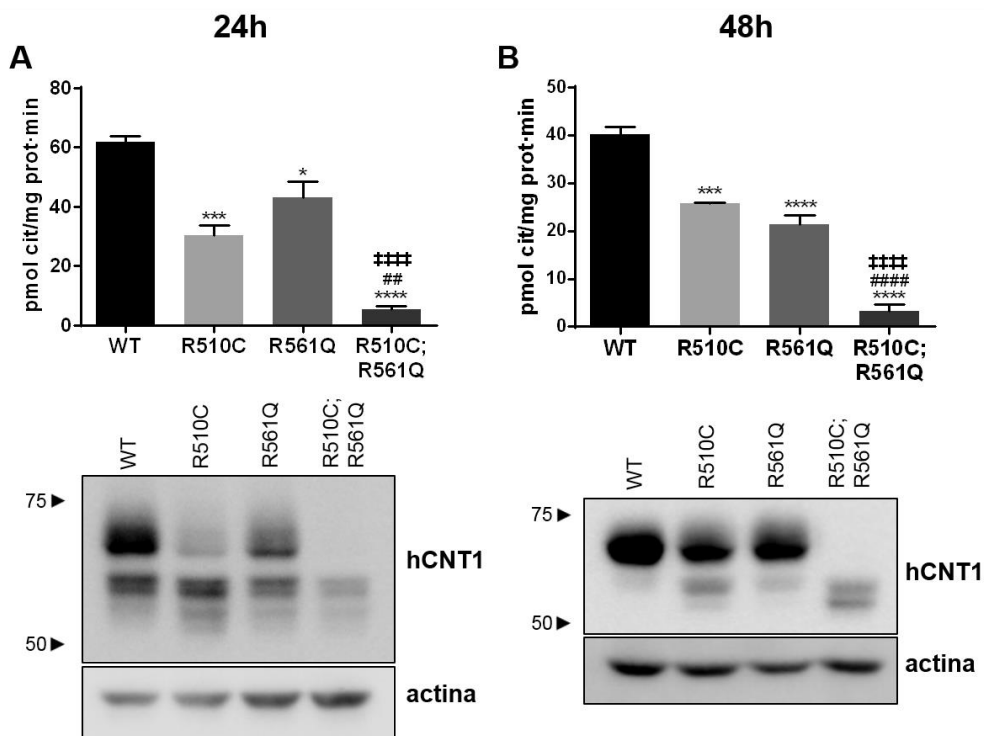


Figura 14. Les variants R510C i R561Q modifiquen l'activitat i expressió d'hCNT1 comparat amb el WT. Les cèl·lules HEK293 van ser transfectades durant 24 (A) o 48 (B) hores amb els diferents vectors d'expressió d'hCNT1 indicats. L'activitat d'hCNT1 es va mesurar mitjançant l'entrada de citidina tritiada a les cèl·lules, calculada a partir de la diferència de valors entre un medi ric en sodi i un medi ric amb colina. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm SEM (n=4 per 24h, n=3 per 48h). La significació estadística es va determinar mitjançant 1 way ANOVA; * indica la comparativa amb el WT (* p<0.05, *** p<0.005, **** p<0.001); # indica la comparativa amb R510C (# p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.005, #### p<0.001); † indica la comparativa amb R561Q (†††† p<0.001). L'expressió d'hCNT1 a nivell proteic es va analitzar sota les mateixes condicions experimentals en cada cas. S'inclou un western blot significatiu de 4 (24h) i 3 (48h) experiments independents.

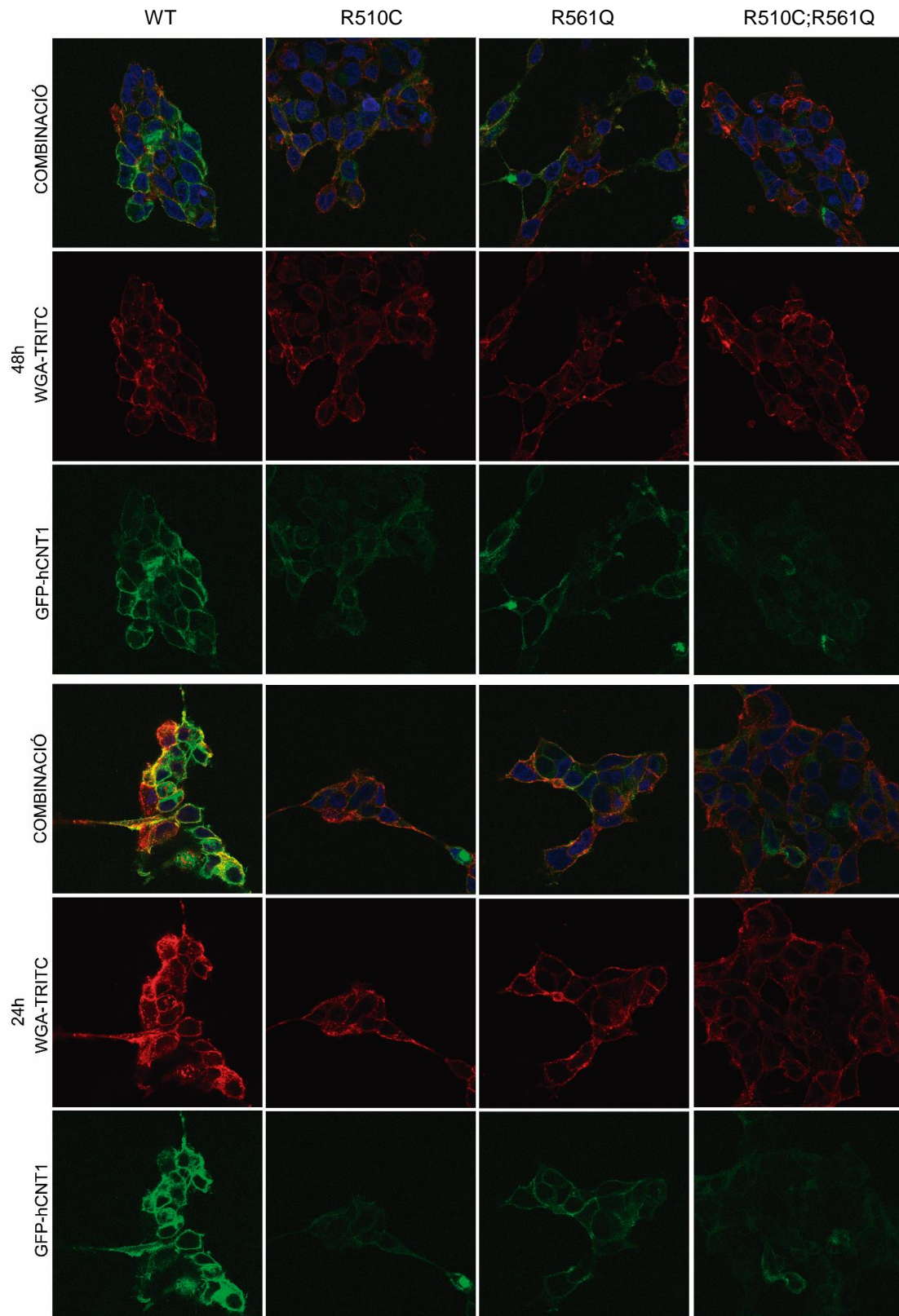


Figura 15. La localització d'hCNT1 a la membrana plasmàtica es veu reduïda per a les variants R510C i R561Q. La localització subcel·lular d'hCNT1 es va realitzar mitjançant microscòpia confocal. Es van transfectar cèl·lules HEK293 amb els vectors quimera de GFP-hCNT1, durant 24 o 48 hores. La membrana plasmàtica i el nucli van ser tenyits amb WGA-TRITC i Hoechst, respectivament. Magnificació x63.

Es van subclonar hCNT1 WT, les dues variants i el doble mutant al vector pEGFP-C1, per tal d'aconseguir proteïnes quimera producte de la fusió entre GFP i hCNT1 a través de l'extrem N-terminal del darrer. La fusió amb GFP és una eina molt útil per tal de sublocalitzar la proteïna d'interès a la cèl·lula. Es va comprovar si les proteïnes quimera resultants tenien activitat semblant a les proteïnes expressades amb el vector pcDNA3.1. Es va detectar una lleugera disminució de la translocació de citidina triada que podria ser deguda a interferència del GFP, a eficiència de transfecció dels diferents vectors o a diferències entre els promotors presents als vectors. Com que l'activitat de WT-GFP, R510C-GFP i R561Q-GFP era suficient per considerar que la proteïna quimera podia efectuar la funció de transportador (dades no mostrades), es va prosseguir a localitzar les variants d'hCNT1 a la cèl·lula. Així doncs, es van expressar heteròlogament les quatre construccions hCNT1-GFP a HEK293. Es va tenyir la membrana plasmàtica amb el marcador WGA-TRITC i es van fixar les cèl·lules. Mitjançant microscòpia confocal, es va analitzar si les diferents variants d'hCNT1 colocalitzaven amb el marcador de membrana. Es va confirmar la presència d'hCNT1 WT a la membrana plasmàtica principalment (Figura 15). Les variants R510C i R561Q també es trobaven a la membrana plasmàtica, més a les 48 hores post-transfecció que a les 24. Tanmateix, es va observar certa quantitat de transportador a l'interior de la cèl·lula, sobretot en el cas de la variant R510C. Així doncs, les imatges confirmen que les variants R510C i R561Q arribaven a membrana plasmàtica però de manera reduïda en comparació amb hCNT1 WT. El doble mutant R510C;R561Q es detectava majoritàriament intracel·lular, de manera que es podria relacionar la seva manca d'activitat amb la no presència del transportador a la membrana plasmàtica. Difereix d'aquesta manera de la variant d'hCNT1 descrita que no presenta activitat, hCNT1S546P, ja que aquesta variant s'inserta correctament a la membrana plasmàtica; en aquest cas, es va descriure que la variant és incapaç de translocar el substrat (Cano-Soldado et al. 2011).

1.3.3 Alteració de la vida mitjana d'hCNT1

Les dades de localització subcel·lular d'hCNT1 no explicava les diferències d'activitat i d'expressió entre variants. En aquest punt es va plantejar la possibilitat que els impediments estructurals de les variants predits per modelatge d'homologia alteressin la vida mitjana de la proteïna.

La vida mitjana d'hCNT1 i les variants es va analitzar sota diferents condicions. En primer lloc es va estudiar el recanvi mitjançant la inhibició de la síntesi proteica. A les 24 hores post-transfecció de les variants es van tractar les cèl·lules amb cicloheximida durant 2, 4 i 6 hores (Figura 16). La cicloheximida és un inhibidor de la síntesi proteica en eucariotes que actua interferint en

l'activitat peptidil transferasa de la subunitat ribosòmica 60S, de manera que bloqueja el pas d'elongació traduccional. Es va observar com hCNT1 WT era molt estable, només s'intuïa disminució de les bandes de menor pes molecular a temps 6 hores. En canvi, les variants R510C i R561Q presentaven una disminució de l'expressió considerable a partir de les 4 hores de tractament amb cicloheximida. Així com a hCNT1 WT les bandes de pes molecular alt mantenien l'expressió en el temps, l'expressió de les variants es veia reduïda en totes les formes proteiques. De fet, per a R561Q la banda de pes inferior pràcticament desapareixia. En aquest punt es va plantejar la possibilitat que el patró de bandes d'hCNT1 observat en el western blot fos degut a modificacions post-traduccionals, essent les formes no processades (i per tant, de menor pes molecular) menys estables que les processades. El doble mutant R510C;R561Q també presentava disminució de l'expressió per efecte de la cicloheximida, sobretot a les 6 hores, en què la presència d'aquesta variant doble és escassa. Així doncs, la inhibició de la síntesi proteica va permetre observar que les variants d'hCNT1 presentaven vida mitjana més curta que hCNT1 WT.

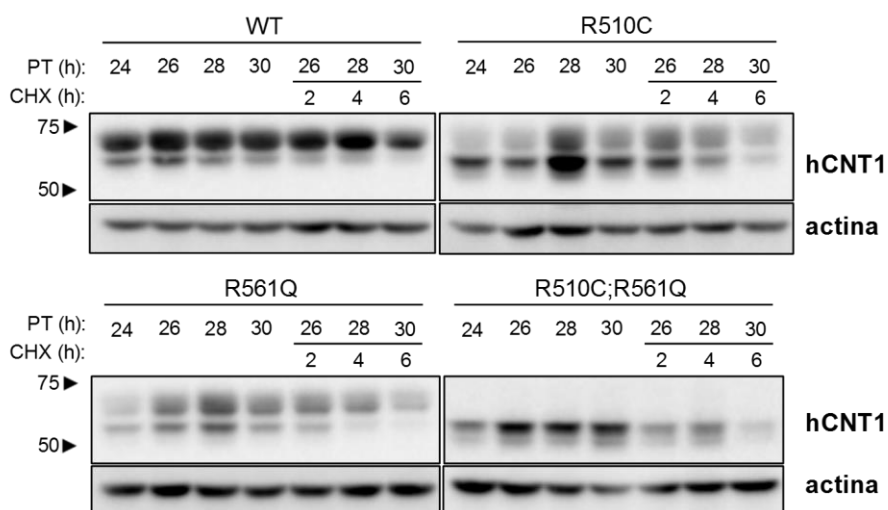


Figura 16. El recanvi proteic de les variants d'hCNT1 presenta alteracions. Anàlisi mitjançant western blot d'extractes proteics totals de HEK293 transfectades amb les diferents construccions. Les cèl·lules van ser tractades o no amb cicloheximida (CHX, 40µg/mL) durant els temps indicats, a les 24 hores post-transfecció.

Per altra banda, fins el moment no estava descrit quina via de degradació segueix hCNT1. Per aquest motiu, i per determinar si la diferència d'activitat entre variants era deguda a una major o menor taxa de degradació, es van inhibir les dues vies de degradació principals de la cèl·lula: el proteasoma i la via lisosomal. Es va inhibir la formació d'autofagolisosomes amb hidroxiclороquina sulfat, un fàrmac aprovat per al tractament de malària, lupus i altres malalties inflammatòries que bloqueja la via lisosomal mitjançant l'increment del pH en aquests

compartiments; així, els enzims es troben fora del seu pH òptim per actuar. El tractament va funcionar correctament, tal i com demostra l'increment d'expressió d'LC3B II, però no es van observar canvis d'expressió d'hCNT1 respecte el control ni entre variants (Figura 17B). Per altra banda, es va inhibir el proteasoma amb MG132, que és un pèptid sintètic que bloqueja el complex 26S del proteasoma sense afectar-ne les activitats ATPasa ni isopeptidasa; per tant, és una inhibició reversible. El tractament amb MG132, en aquest cas, produïa una acumulació de l'expressió de totes les variants, sobretot pel que fa les bandes de menor pes molecular (Figura 17A). Així doncs, aquest resultat va suggerir que el proteasoma juga un paper important en la regulació de l'expressió d'hCNT1, però caldria aprofundir per determinar si és directe per degradació d'hCNT1, o indirecte per degradació d'algun factor regulador.

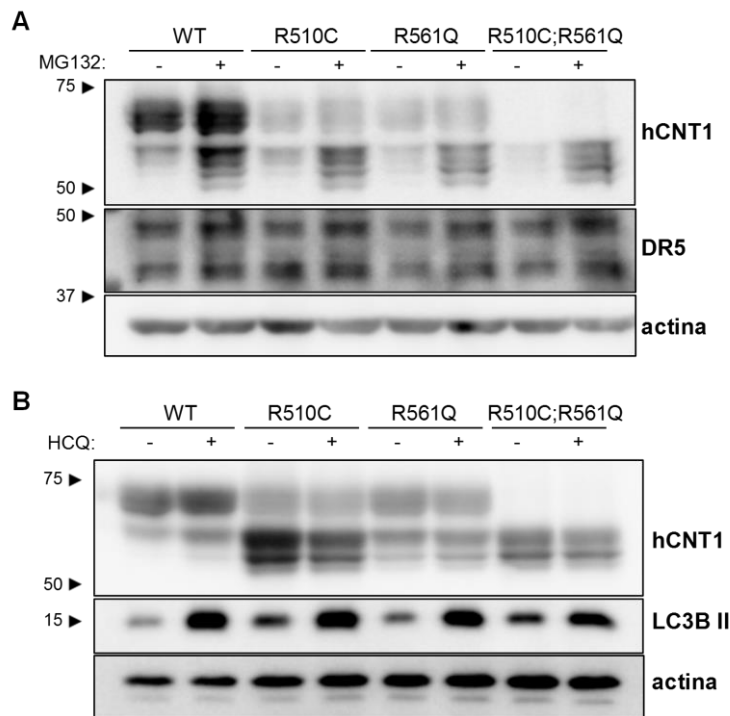


Figura 17. La degradació d'hCNT1 podria estar relacionada amb el proteasoma. Anàlisi mitjançant western blot d'extractes proteics totals de HEK293 transfectades amb les diferents construccions. (A) Les cèl·lules van ser tractades durant 16 hores a les 8 hores post-transfecció amb MG-132 (5μM) o (B) hidroxicloroquina sulfat (HCQ, 20μM). DR5 i LC3B-II són els controls positius en cada cas.

1.3.4 Glicosilació d'hCNT1

El patró de bandes de proteïna hCNT1 va suscitar l'anàlisi *in silico* de possibles modificacions post-traduccionals d'hCNT1. Degut a la localització a membrana plasmàtica d'hCNT1, es va mirar l'acilació de la proteïna, concretament la miristil·lació, i es van identificar 12 clústers susceptibles. Tanmateix, es va descartar que les variants poguessin diferir entre si per canvis en la miristil·lació, ja que els canvis d'aminoàcid R510C i R561Q no es troben en cap dels clústers.

Així, es van identificar residus glicosilables per N-glicosilació, O-glicosilació i C-glicosilació, així com 3 lisines susceptibles de ser ubiquitinades i 54 serines/treonines/tirosines susceptibles de ser fosforilades (Taula 18).

Modificacions post-traduccionals predites per hCNT1		
N-glicosilació		
N543	N605	N643
C-glicosilació		
D41		
O-glicosilació		
S13		
Ubiquitinació		
K19	K393	K401
Miristil·lació		
88-93	115-160	302-307
344-349	351-356	355-360
361-366	399-404	417-422
548-553	552-557	576-581
Fosforilació		
S6	S11	T15
S31	S40	S43
S50	S52	S60
S73	T87	S95
S169	T172	S173
S203	S208	S243
S249	S250	T304
T308	S318	T334
T343	Y346	S352
S359	S366	S371
Y386	S392	T403
Y404	T416	S421
S447	S465	Y501
S505	S527	T535
S546	S563	S566
T575	S602	T606
S609	S610	S611
S612	Y616	S631

Taula 18. Modificacions post-traduccionals predites per a la seqüència proteica d'hCNT1. Es va analitzar la seqüència en els softwares *NetNGlyc 1.0 server (DTU Health Tech)*, *NetCGlyc 1.0 server (DTU Health Tech)*, *NetOGlyc 4.0 server (DTU Health Tech)*, *UbPred (Indiana University Bloomington)*, *NMT Myristoylation Predictor (DTU Health Tech)*, i *NetPhos 3.1 server (DTU Health Tech)*.

En primera instància es va voler determinar si la N-glicosilació i la fosforilació participaven de les modificacions post-traduccionals d'hCNT1. Fins el moment no s'havia descrit que els transportadors concentratius de nucleòsids presentessin modificacions post-traduccionals; en

canvi, s'ha demostrat que tant hCNT1 com hCNT2 són fosforilats i glicosilats (Baldwin et al. 2004; Reyes et al. 2011; Bicket and Coe 2016; Grañe-Boladeras et al. 2019). La primera aproximació va ser *in vitro*, mitjançant l'endonucleotidasa PNGasaF, la qual elimina els sucres units a les proteïnes per enllaç N-glicosídic. En paral·lel també es va emprar la fosfatasa alcalina d'intestí de vedella, CIP, per tal d'eliminar les fosforilacions dels residus d'hCNT1. En ambdós casos es van tractar extractes proteics amb els enzims. La desfosforilació de l'extracte no va mostrar diferències en el patró de bandes d'hCNT1 (dades no mostrades), mentre que la desglicosilació mitjançant PNGasaF sí (Figura 18). Tal i com s'observa a la figura, en tots els casos les bandes de major pes molecular desapareixen amb el tractament de desglicosilació, i només romanien una banda de pes molecular més baixa. Aquesta banda coincidia amb les bandes de pes molecular inferior de R510C, R561Q i R510C;R561Q, però la banda no era present en hCNT1 WT. Aquest resultat suggeria que hCNT1 WT és glicosilat, però que les variants presenten menys grau de glicosilació en comparació amb el WT. A més, la comparativa de les bandes de western blot del doble mutant R510C;R561Q, amb i sense tractament amb PNGasaF, mostrava com l'extracte tractat amb l'endonucleasa presentava menys expressió. Això semblava indicar que el doble mutant sense les modificacions post-traduccionals de glicosilació era menys estable, i per tant l'expressió era menor.

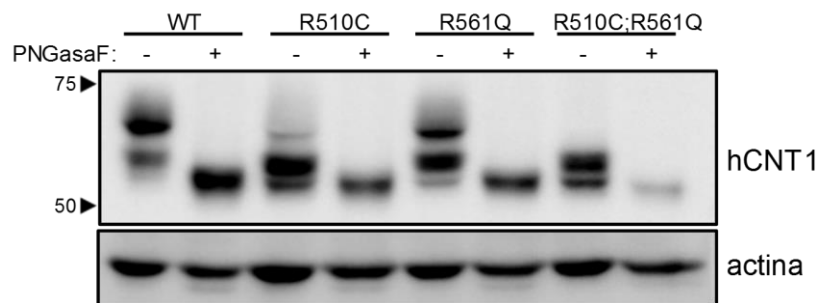


Figura 18. Eliminació dels residus glucídics units per un enllaç N a les proteïnes mitjançant PNGasaF. Els extractes proteics de HEK293 transfectades amb els corresponents vectors d'expressió d'hCNT1 van ser tractats amb PNGasaF durant 4 hores, i posteriorment es va detectar hCNT1 mitjançant western blot.

A continuació es va optar per demostrar l'efecte de la glicosilació d'hCNT1 en cultiu cel·lular, és a dir, en cèl·lules HEK293 transfectades amb els vectors corresponents de cada variant d'hCNT1. Es va emprar l'antibiòtic tunicamicina, que bloqueja la N-glicosilació en eucariotes mitjançant la inhibició de la GlcNAc fosfotransferasa (GPT), la qual catalitza la transferència d'N-acetilglucosamina-1-fosfat de la UDP-N-acetilglucosamina al dolicol fosfat, de manera que s'inhibeix el primer pas de la síntesi de glicoproteïnes. Així doncs, es van tractar les cèl·lules que expressaven heteròlogament les variants d'hCNT1 i es va mesurar l'expressió proteica, la localització i l'activitat. El patró de bandes de proteïna observat en el western blot s'assemblava

força al patró resultant del tractament amb PNGasaF (Figura 19A). Per tant, la inhibició de la N-glicosilació en un sistema cel·lular confirmava que hCNT1 és glicosilat. A més, es va detectar que hCNT1 WT, sota condicions de tractament amb tunicamicina, era pràcticament intracel·lular (Figura 19B), amb un patró molt semblant al doble mutant R510C;R561Q en condicions basals observat a la Figura 15. La localització, doncs, semblava indicar que la glicosilació és un fenomen determinant per a la correcta inserció del transportador hCNT1 a la membrana plasmàtica. Per últim, també es va determinar l'activitat d'hCNT1 i les variants mitjançant la valoració de la captació de citidina tritiada. Tant hCNT1 WT com les variants presentaven una disminució de l'activitat en condicions de tractament amb tunicamicina, essent molt similars entre si (Figura 20). El doble mutant R510C;R561Q, que ja no presentava activitat, no es veia modulad per acció de la tunicamicina. Tot i que les activitats de WT, R510C i R561Q eren reduïdes, els resultats indicaven que encara perdurava certa activitat residual dels transportadors en cada cas. Això indicaria que la glicosilació d'hCNT1 és determinant per a la seva correcta activitat, però no és l'únic paràmetre que la modula. És possible que hCNT1 pateixi alguna altra modificació post-traducciona que no hagi estat detectada i que participi també del correcte funcionament del transportador de nucleòsids.

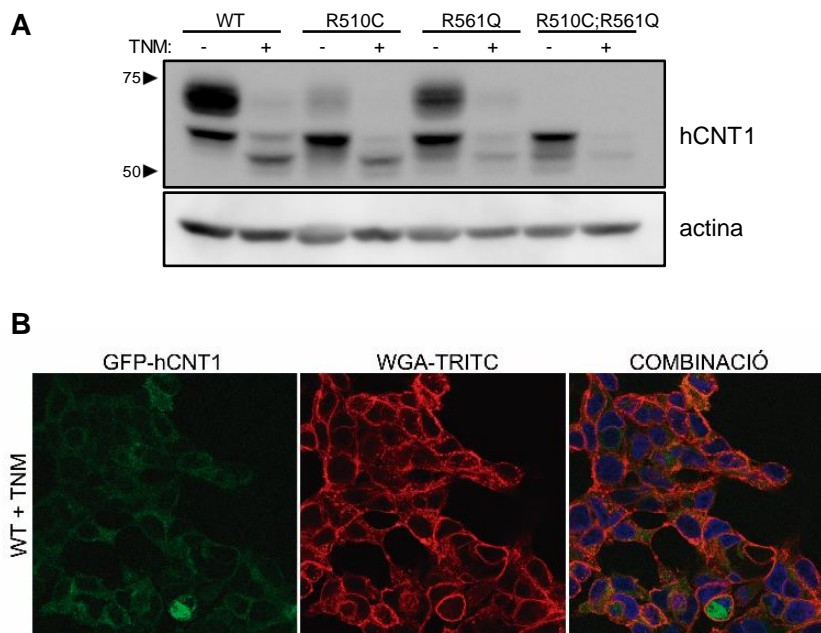


Figura 19. La forma madura de la proteïna hCNT1 és glicosilada. (A) Anàlisi de l'expressió proteica de les diferents variants d'hCNT1 transfectades a HEK293, sota condicions de tractament amb tunicamicina (TNM, 100nM) durant 16 hores. Es mostra un western blot representatiu de 3 experiments independents. (B) Anàlisi de la localització subcel·lular d'hCNT1-WT transfectada a HEK293 després del tractament amb tunicamicina (TNM, 100nM) durant 16 hores. Es mostra una imatge representativa de 3 experiments independents.

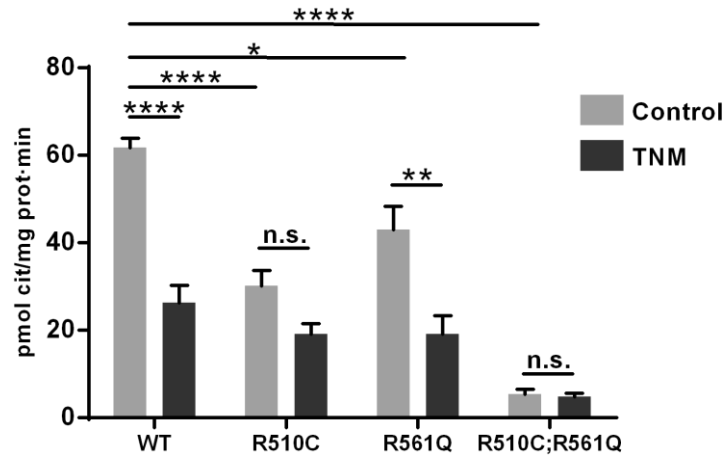


Figura 20. La glicosilació és determinant per a l'activitat d'hCNT1. Es mesura l'activitat de transport d'hCNT1 en HEK293 transfectades amb les corresponents variants i tractades o no amb tunicamicina (TNM, 100nM) durant 16 hores. L'activitat d'hCNT1 es va mesurar mitjançant l'entrada de citidina tritiada a les cèl·lules, calculada a partir de la diferència de valors entre un medi ric en sodi i un medi ric amb colina. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm SEM (n=4). La significació estadística es va mesurar amb el test 2-way ANOVA; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

1.3.5 Estudi de l'heterozigositat del pacient

En paral·lel a l'estudi de les variants a nivell proteic es va voler determinar el genotip del pacient. No es va poder obtenir gDNA dels pares per tal de discernir el model d'herència de les variants estudiades. Afortunadament, les dades del *Whole Genome Sequencing* efectuat van ser suficients, i van revelar que les variants detectades en el pacient eren heterozigòtiques; per tant, el pacient presentava una còpia WT per a cada variant. Es van realitzar anàlisis PCR específiques d'al·lels per tal d'esbrinar si la disposició de les variants c.1528C>T (p.R510C) i c.1682G>A (p.R561Q) era en *cis* (en el mateix al·lel) o en *trans* (diferent). Les variants rs2242047 (ID que identifica la variant c.1528C>T) i rs149246522 (ID que identifica la variant c.1682G>A) es troben separades per 9119 parells de bases, de manera que no es podia realitzar l'estudi mitjanant PCR convencional. Es va aprofitar l'existència d'una variant heterozigota entremig dels dos loci, rs28430562 A/G. L'estratègia seguida va ser determinar si rs28430562 estava en *cis* o en *trans* respecte les variants d'interès. El resultat de seqüenciació demostra com la variant rs28430562A es troba en el mateix cromosoma que rs2242047C, l'al·lel WT per a c.1528C>T; en canvi, rs28430562G es troba en el mateix cromosoma que rs149246522G, el WT corresponent per a c.1682G>A (Figura 21). Per tant, es demostrà que la disposició de c.1528C>T i c.1682G>A era en *trans*.

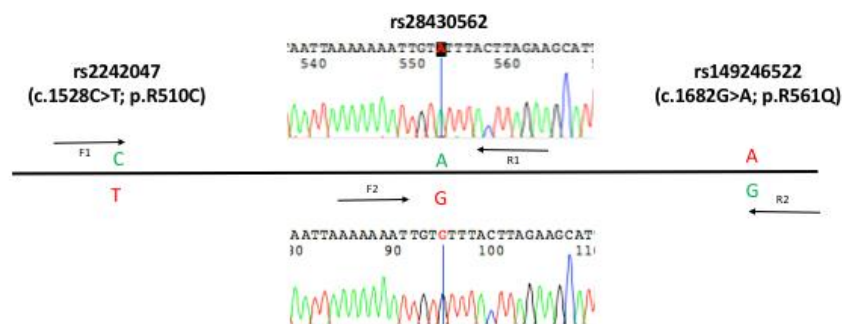


Figura 21. Confirmació que les variants rs2242047 i rs149246522 es troben en *trans*.

Aquests resultats van descartar la participació del doble mutant R510C;R561Q en el fenotip del pacient. Per un cantó, el primer WGS ja va demostrar que les variants eren presents en heterozigosi, però no se sabia fins aquest punt si el pacient tenia un al·lel WT i l'altre doble mutant, o bé era una combinació de les dues variants.

Tot plegat suggeria que l'activitat resultant de la combinació d'R510C i R561Q es veia minvada respecte hCNT1 WT, donat que el pacient presentava pirimidinúria. La funció dels transportadors hCNT sembla estar condicionada per l'oligomerització (Johnson et al. 2012); fins el moment s'ha demostrat només per hCNT3 (Stecula et al. 2017). Així doncs, es va decidir demostrar *in vitro* l'efecte de l'heterozigosi del pacient mitjançant la co-transfecció de les construccions corresponents. Per tant, es va comparar l'activitat del WT amb l'activitat de la combinació del WT amb les variants per separat (WT + R510C i WT + R561Q) i amb l'activitat de la combinació de les variants R510C + R561Q (Figura 22A). Es va observar que una còpia d'hCNT1 WT era suficient per tal que les cèl·lules presentessin el transport de citidina normal associat a hCNT1. En canvi, la combinació d'R510C i R561Q mostrava només aproximadament el 50% d'activitat. A més, l'expressió proteica associada era inferior a la resta de combinacions (Figura 22B). Amb aquests resultats es va demostrar que la disposició al·lèlica en *trans* va contribuir a empitjorar el fenotip del pacient, i que la co-expressió de dues variants que presentaven menor activitat però no nul·la era suficient per disminuir la recaptació de citidina per part de la cèl·lula.

L'estudi de l'heterozigosi del pacient va donar peu a l'indici, per primera vegada, que hCNT1 és capaç d'oligomeritzar. Si hCNT1 funcionés en forma de monòmer, s'esperaria que una sistema cel·lular que co-expressés alhora el WT i una de les dues variants (és a dir, WT + R510C o WT + R561Q) presentés transport reduït de citidina en comparació a un que només expressés el WT. En canvi, es va observar que la presència de les variants passava desapercebuda quan hi havia una còpia d'hCNT1 WT. L'anàlisi de les variants per separat va demostrar que eren capaces d'inserir-se a la membrana plasmàtica – excepte la R510C;R561Q, però es va descartar en saber

que el pacient presentava les variants en *trans*. Els oligòmers es formen en el trànsit cap a membrana plasmàtica (Reddy and Corley 1998), de manera que s'esperaria que un hipotètic oligòmer entre hCNT1 WT i hCNT1 R510C, per exemple, pogués arribar a la membrana i exercir la seva funció.

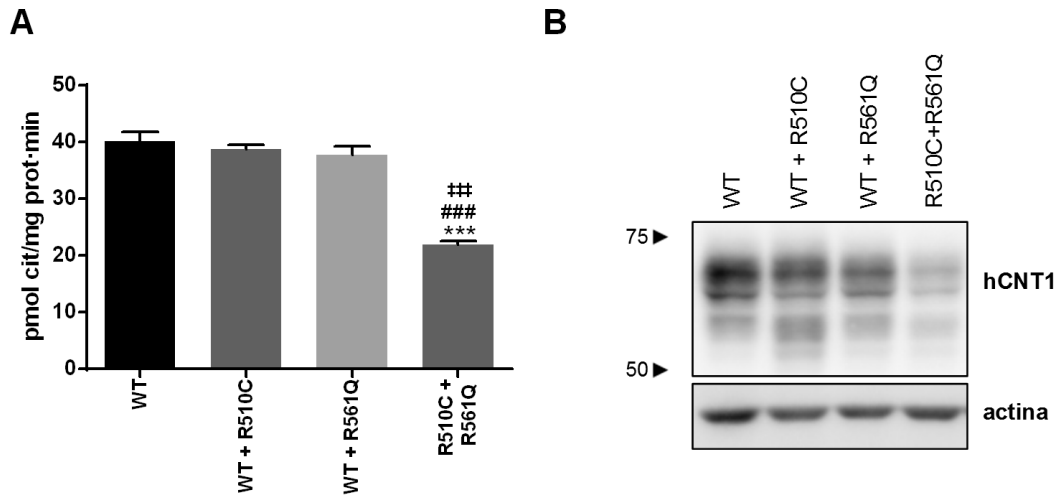


Figura 22. La disposició al·lèlica de les variants condiciona l'activitat hCNT1. Les cèl·lules HEK293 van ser cotransfectades amb les següents condicions: WT, WT + R510C, WT + R561Q or R510C + R561Q. (A) L'activitat d'hCNT1 es va mesurar mitjançant l'entrada de citidina tritiada a les cèl·lules, calculada a partir de la diferència de valors entre un medi ric en sodi i un medi ric amb colina. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm SEM (n=3). La significació estadística es va determinar mitjançant *1 way ANOVA*; * indica la comparativa amb el WT (***) $p < 0.005$); # indica la comparativa amb WT + R510C (### $p < 0.005$); ‡ indica la comparativa amb WT + R561Q (‡‡‡ $p < 0.005$). (B) Expressió proteica de les variants d'hCNT1. Es mostra un western blot representatiu de 3 experiments independents.

En resum, els resultats presentats en els apartats anteriors induïen a pensar que la glicosilació era parcialment responsable de què l'expressió i activitat de les variants R510C i R561Q fossin disminuïdes respecte hCNT1 WT. En aquesta part de l'estudi, però, es va intuir el possible rol de l'oligomerització d'hCNT1 per tal que aquest transportador sigui funcional. L'ortòleg de *V. cholerae* es va cristal·litzar en forma de trímer (Johnson et al. 2012), i hCNT3 és un homotrímer (Stecula et al. 2017). Així, si s'hagués de plantejar una forma d'oligomerització d'hCNT1 seria en forma trimèrica. Per aquest motiu es va voler identificar la posició relativa dels residus R510 i R561 en el model d'homologia d'hCNT1 en forma trimèrica. Es va observar que R561 presentava una situació més interna en els monòmers, mentre que R510 estaria posionat prop de la zona hipotètica d'interacció entre els diferents monòmers (Figura 23). Aquest model indicaria, doncs, que en cas d'existir en forma d'homotrímer, la variant R510C podria presentar alteracions en la cinètica de formació del complex, degut al canvi de naturalesa del residu, que podria estar vinculat amb l'homotrimerització. Tanmateix, primer caldria confirmar l'oligomerització

d'hCNT1 per tal de poder hipotetitzar la seva possible implicació en la disminució d'activitat d'hCNT1R510C i hCNT1R561Q.

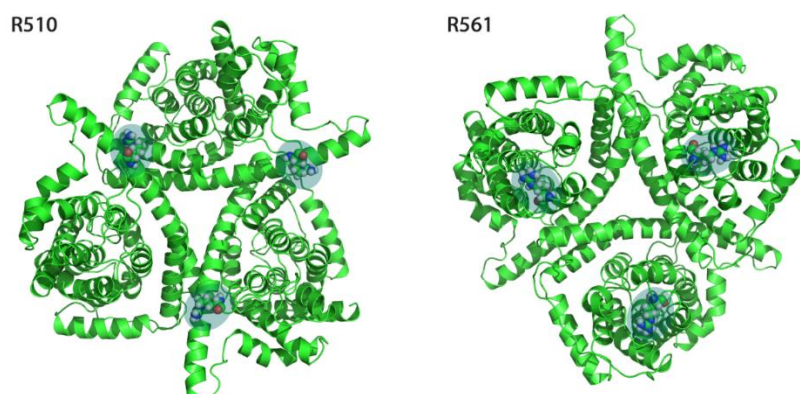


Figura 23. Modelatge per homologia del complex d'hCNT1 en forma de trímer. Els cercles blaus destaquen la posició de cada residu en el model de trímer (R510 a l'esquerra i R561 a la dreta).

1.4 Detecció d'altres variants implicades en el cas clínic

En paral·lel, es va tornar a seqüenciar el genoma del pacient amb *Whole Genome Sequencing*, realitzat al laboratori del Dr. André van Kuilenburg. El motiu d'aquest segon anàlisi va ser que l'alteració de la funció transportadora d'hCNT1 no explicava el fenotip clínic observat de disregulació immunitària, febre, hepatomegàlia, esplenomegàlia i disfunció hepàtica. Es van identificar 109 gens candidats que presentaven variants considerades rares, és a dir, poc freqüents en la població. Gens destacats:

- 9 candidats amb variants homozigotes: *STAMBPL1*, *ABI3BP*, *CELSR2*, *OR5P3*, *MEFV*, *TAF4*, *POU4F1*, *NCOA3* i *ZSWIM6*.
- 11 candidats amb variants hemizigotes: *MED12*, *RBMX2*, *GJB1*, *TMLHE*, *WNK3*, *BCOR*, *APLN*, *FAM120C*, *BCOR*, *CXorf30* i *MAGEA4*.
- 89 candidats amb variants heterozigòtiques: *ABCA13*, *ABCC11*, *ABI3BP*, *ADAMTS18*, *ADARB2*, *AGRN*, *AKAP13*, *AMDHD2*, *ANKDD1B*, *ANKZF1*, *ARID4A*, *C15ORF37*, *CCDC92*, *CELSR1*, *CLIC6*, *CORO7*, *CRYBG3*, *D2HGDH*, *DCHS2*, *DLC1*, *DNAH10*, *DNAH11*, *DNAH7*, *DNAH9*, *DPYD*, *EI24*, *ELFN1*, *ELP2*, *ENTHD2*, *ENTPD6*, *FAM47E*, *FAT1*, *FAT3*, *FSTL5*, *GDPD4*, *GIGYF2*, *GPX1*, *GRIK4*, *HERC1*, *HMCN1*, *HOXA4*, *KMT2C*, *KRT24*, *LAMA5*, *LAMB1*, *LGR6*, *LOXL4*, *LRPPRC*, *MMP26*, *MOGAT3*, *MTHFSD*, *MUC12*, *MUC17*, *MUC6*, *MYPN*, *NCOR2*, *NLRP1*, *NRD1*, *OR56B1*, *PCK1*, *PKHD1L1*, *POLQ*, *PRF1*, *PROM1*, *PTX3*, *QRICH2*, *R3HCC1L*, *RLTPR*, *RNF213*, *RNF223*, *RPUSD4*, *SEC24D*, *SELP*, *SLC28A1*, *STRA6*, *SYNE2*, *SYNPO*, *SYVN1*, *TCHHL1*, *TMC3*, *TMPRSS15*, *TMPRSS9*, *TRIM17*, *TTC40*, *TTN*, *USP53*, *WDR38*, *YBX3* i *ZNF556*.

Es va analitzar si els gens destacats havien estat prèviament implicats en malalties rares. A més de les variants d'hCNT1 ja descrites prèviament, només hi havia un gen candidat d'aquests 109 que podia encaixar amb el fenotip patològic del pacient: *PRF1* (MIM 170280), que codifica la proteïna perforina-1. La perforina-1 és una de les proteïnes citolítiques principals, ja que forma part d'una de les vies de citòlisi del sistema immunitari. Els limfòcits T efectors o les cèl·lules NK la contenen en els seus grànuls citolítics, i la secreten sobre les membranes de les cèl·lules diana, on formarà porus que induiran la lisi d'aquestes cèl·lules. Aquesta funció converteix la perforina-1 en una peça clau en l'eliminació de cèl·lules infectades per virus. L'any 1999 es va identificar per primera vegada que pacients amb limfocitosi hemofagocítica familiar (FHL2) presentaven mutacions al gen *PRF1* en homozigosi i en heterozigosi composta (Stepp et al. 1999). Aquesta patologia es caracteritza per la proliferació descontrolada de limfòcits T activats i de macròfags, que segreguen grans quantitats de limfocines que indueixen hemofagocitosi. Principalment estan afectats la medul·la òssia, el fetge, la melsa i el sistema nerviós central. Al llarg dels anys s'han anat identificant altres variants en diferents poblacions (Ericson et al. 2001; Molleran Lee et al. 2004; Risma et al. 2006; Trizzino et al. 2008). El pacient d'aquest cas era un heterozigot compost i presentava dues variants prèviament identificades. La primera (rs147035858) era una variant patogènica causada per un canvi de pauta de lectura, g.72360608CA>C (c.50delT; p.L17Rfs*34) (Stepp et al. 1999). La segona (rs745902829) era una deleció en pauta, g.70598866_70598868Del (c.853_855delAAG; p.K285Del) (Ericson et al. 2001; Zur Stadt et al. 2006). Es va determinar mitjançant seqüenciació de Sanger el model d'herència de les dues variants de *PRF1* i la conclusió va ser que estaven disposades en *trans*. Per tant, el pacient presentava dues còpies infuncionals del gen que codifica la perforina.

En resum, en aquest bloc s'ha descrit el cas del primer pacient amb uridina-citidinúria que podria estar relacionada amb una deficiència funcional del transportador de pirimidines hCNT1. Les dues variants identificades, c.1528C>T (p.R510C) i c.1682G>A (p.R561Q) presents al gen *SLC28A1* del pacient alteren la glicosilació i disminueixen la vida mitjana de les proteïnes mutants, i conseqüentment presenten una activitat reduïda respecte hCNT1 WT. El pacient va resultar ser heterozigot per ambdues variants, amb disposició *trans*, de manera que es va emular el genotip mitjançant la co-expressió de les dues variants i es va comparar amb la combinació de cadascuna individualment amb hCNT1 WT. Els resultats van indicar que una còpia WT de l'al·lel era suficient per a mantenir l'activitat hCNT1, mentre que la combinació de dues còpies deficientes reduïa l'activitat del transportador de pirimidines fins la meitat. Les diferències podrien explicar-se per efecte de l'oligomerització hipotètica d'hCNT1.

La majoria de símptomes presentats pel pacient s'explicarien amb la troballa del dèficit de Perforina-1. Tanmateix, en els últims temps s'ha realçat la importància de la combinació de dos defectes gènics com a causa de patologia (Tarailo-Graovac et al. 2016). Tot en conjunt, doncs, sembla indicar que el cas clínic descrit en aquest bloc presentava un fenotip agreujat per la co-existència de dos defectes monogènics.

2. L'interactoma d'hCNT1 com a element regulador

2.1 Domini N-terminal d'hCNT1

En comparar la seqüència proteica dels tres membres de la família *SLC28* amb el seu ortòleg de *Vibrio cholerae* vcCNT s'observa que s'ha adquirit evolutivament tot un domini N-terminal. Aquest consta de la cua N-terminal intracel·lular i els següents 3 dominis transmembrana (Johnson et al. 2012). Un treball previ ja havia demostrat mitjançant deleccions que el domini N-terminal d'hCNT1 i rCNT1 no era necessari per al transport d'uridina en oòcits de *Xenopus* (Hamilton et al. 2001). Així, s'hipotetitzava que aquest domini N-terminal podria conferir noves funcions als transportadors concentratius de nucleòsids (Pérez-Torras et al. 2013).

Les possibles noves funcions dels hCNTs podrien estar regulades mitjançant proteïnes d'interacció. Per aquest motiu al grup s'han realitzat diferents aproximacions per a definir l'interactoma dels transportadors de nucleòsids. Les dues primeres estratègies seguides varen ser el *GST-Pull Down* i el *Bacterial Two-Hybrid*, dues tècniques que tenen com a limitació que només es pot emprar la part soluble de la proteïna, que en el cas dels hCNTs és la cua N-terminal. Mitjançant aquestes tècniques s'han identificat diverses proteïnes d'interacció: Rack1 per hCNT1, GRP58 i Aldolasa B per hCNT2, i ADK i Galectina-4 per hCNT3.

La nova aproximació emprada recentment s'anomena *Membrane Yeast Two-Hybrid* (MYTH). A diferència de les dues anteriors, aquesta tècnica permet l'ús de la proteïna de membrana sencera (Snider et al. 2010). El sistema emprat és *Saccharomyces cerevisiae*, que en ser una cèl·lula eucariota les proteïnes poden presentar modificacions post-traduccionals semblants a les que tenen lloc en la cèl·lula humana (Leach and Brown 2012). La tècnica MYTH té com a base la divisió de la ubiquitina en dos dominis estables, Nub (N-terminal) i Cub (C-terminal). La pseudoubiquitina resultant de la unió dels dos dominis pot ser detectada per enzims que la proteolitzen. Ara bé, si es muta la isoleucina 13 del domini Nub per una glicina (NubG), la unió entre NubG i Cub es veu debilitada, i només pot tenir lloc si els dos dominis es troben molt propers a l'espai. En el MYTH s'aprofita aquest principi per a detectar interaccions entre proteïnes, les quals poden donar-se en qualsevol localització cel·lular.

Així, en el marc de la tesi doctoral del Dr. Albert Viel-Oliva es va realitzar la tècnica MYTH per a hCNT1, hCNT2 i hCNT3. Es van fusionar els transportadors a Cub, i es va realitzar l'assaig contra una llibreria de cDNA de ronyó i una altra de cDNA de sistema nerviós central; contenien cDNAs de fusió amb NubG per a poder realitzar la tècnica. El transportador hCNT2 no va reportar cap proteïna d'interacció per aquests paràmetres. Per altra banda, hCNT1 va donar tres positius: *Gamma-Butyrobetaine Dioxygenase* (BBOX1), *Nuclear Factor 1 C-type isoform 5* (NFIC) i *E3*

Ubiquitin Protein Ligase Nrdp1 (RNF41). Per últim, hCNT3 també va proporcionar tres positius: *General Transcription Factor III Complex 5* (GTF3C5), *Gamma-aminobutyric Acid Receptor-Associated Protein-like 2* (GABARAPL2) i *Dihydropteridine reductase* (QDPR).

2.2 Regulació d'hCNT1 per RNF41

El Dr. Albert Viel-Oliva va validar els resultats de MYTH durant la seva tesi doctoral demostrant la interacció entre hCNT1 i RNF41. Tant els assajos de co-immunoprecipitació com els de co-immunolocalització cel·lular es van realitzar emprant els vectors hCNT1-HA i myc-RNF41, aprofitant l'avantatge que proporciona l'ús de *tags*. Posteriorment la Dra. Sandra Moro va demostrar la co-immunoprecipitació entre hCNT1 i RNF41 utilitzant anticossos específics per a cadascuna de les proteïnes. El sistema en aquest cas va ser transfectar un vector d'expressió d'hCNT1 generat al laboratori (referència de la seqüència: NM_004213.5) a les HEK293, les quals no presenten expressió ni activitat hCNT1 (Arimany-Nardi et al. 2017). Es va demostrar la interacció tant amb RNF41 endogen (carril de l'esquerra) com amb myc-RNF41 (carril de la dreta) (Figura 24).

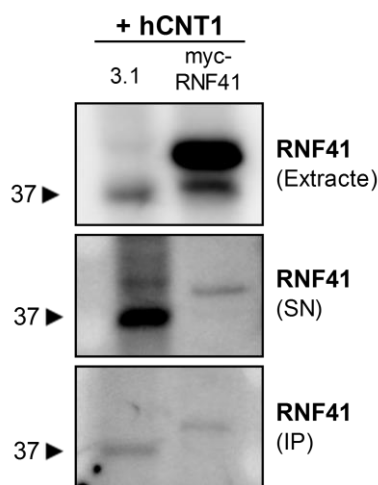


Figura 24. Co-immunoprecipitació d'hCNT1 amb myc-RNF41. Es van sembrar cèl·lules HEK293 i 24 hores després es van co-transfectar amb dos vectors d'expressió: pcDNA3.1 buit i pcDNA3.1-hCNT1, o bé pcDNA3.1-myc-RNF41 i pcDNA3.1-hCNT1. 48 hores després es van processar les mostres i es va realitzar la immunoprecipitació d'hCNT1 amb l'anticòs N17 (SCB) i posteriorment es va analitzar RNF41 mitjançant western blot. SN: sobrenedant. IP: immunoprecipitat. Resultats de la tesi de la Dra. Sandra Moro.

En paral·lel també es va voler demostrar el sentit biològic de la interacció. RNF41 (*Ring Finger Protein 41*), també anomenada *Nrdp1* (*Neuregulin receptor protein 1*), és una ubiquitina lligasa E3 de tipus RING. Conté un domini RING (*Really Interesting New Gene*), el qual li proporciona capacitat per reconèixer els seus substrats via interaccions proteïna-proteïna (Qiu and Goldberg 2002). Les E3 lligases, en general, ubiquïtinen les proteïnes diana. En funció del tipus

d'ubiquïtinització, les conseqüències per a la proteïna diana són unes o altres. Així, si una proteïna és poliubiquïtinada, el seu destí serà la degradació via proteasoma. Tanmateix, les modificacions mitjançant ubiquïtines poden tenir altres funcions més enllà de la proteolítica, com per exemple internalització de receptors, tràfic intracel·lular, regulació de l'activitat transcripcional mitjançant la modificació d'histones, assemblatge de complexos multiproteics i regulació d'activitats enzimàtiques (Reyes-Turcu et al. 2009; Grabbe et al. 2011).

La família d'E3 lligases de tipus RING és molt diversa i comprèn un gran nombre de funcions a la cèl·lula. Tant és així que s'han descrit desregulacions de membres d'aquesta família que contribueixen a la patogènesi de diverses malalties humanes, incloent carcinogènesi (Wang et al. 2014; Wen et al. 2014). Per exemple, l'expressió de p53 està regulada per un membre d'aquesta família, l'E3 lligasa Hdm2, però també s'ha observat que RNF31 pot promoure'n la degradació (Zhu et al. 2016). La família RING E3 lligases ubiquïtinitza tant proteïnes oncogèniques com supressores de tumors; així, elles mateixes poden actuar com a oncogens o supressors de tumors en funció de la naturalesa de les seves dianes.

RNF41 també ha estat relacionada amb processos oncogènics, concretament amb tumors mamaris, mitjançant la seva interacció amb el receptor tirosina quinasa ErbB3. RNF41 regula l'expressió d'ErbB3 a través de l'ubiquïtinització, que té com a conseqüències la internalització del receptor i posterior degradació via proteasoma (Diamonti et al. 2002; Qiu and Goldberg 2002; Cao et al. 2007). De fet, s'ha relacionat la pèrdua d'RNF41 amb el creixement tumoral dependent d'ErbB3/ErbB2 en càncer de mama (Yen et al. 2006).

En tractar-se d'una E3 ubiquïtina lligasa, s'intueix que la funció de la interacció hCNT1-RNF41 sigui la regulació d'expressió del transportador mitjançant la seva degradació dependent d'ubiquïtina. Fins el moment no s'havia descrit el mecanisme de degradació de cap transportador de nucleòsids. En la present tesi doctoral s'ha vist que la inhibició de la funció del proteasoma amb MG-132 produeix una acumulació d'hCNT1 (apartat 1.3 – Pérez-Torras et al. 2019). S'havia descrit que un transportador de nucleòsids específic d'eritròcits (eENT1) és subjecte a la senyalització d'adenosina, la qual indueix la ubiquïtinització d'eENT1 i posterior degradació via proteasoma (Song et al. 2017). Per tant, es va decidir validar la degradació via proteasoma d'hCNT1 dependent d'RNF41.

En primer lloc, es va modular l'expressió d'RNF41 i es va valorar l'impacte sobre l'activitat d'hCNT1. Es van utilitzar les cèl·lules HEK293-hCNT1, un clon de HEK293 produït al laboratori en què s'ha induït l'expressió estable de la proteïna hCNT1. Es tracta d'un model molt útil per a caracteritzar canvis en l'activitat d'aquesta proteïna, així com estudiar possibles interaccions

amb fàrmacs. El Dr. Albert Viel-Oliva va demostrar que la sobreexpressió d'RNF41 produïa una reducció de l'activitat d'hCNT1 del 13% (Figura 25A), mentre que el silenciament d'RNF41 induïa l'activitat d'hCNT1 un 37% (Figura 25B). Ambdós resultats lligarien amb la hipòtesi que RNF41 indueix la degradació d'hCNT1 via proteosomal. Aquest sistema indicaria que en condicions de sobreexpressió d'RNF41 hi hauria major taxa de degradació d'hCNT1, i per tant l'activitat seria reduïda. En canvi, en condicions de *knock down* d'RNF41, la ubiquïtinització d'hCNT1 seria menor, igual que la degradació conseqüent per via proteasoma, i per aquest motiu es detectaria major activitat de transport.

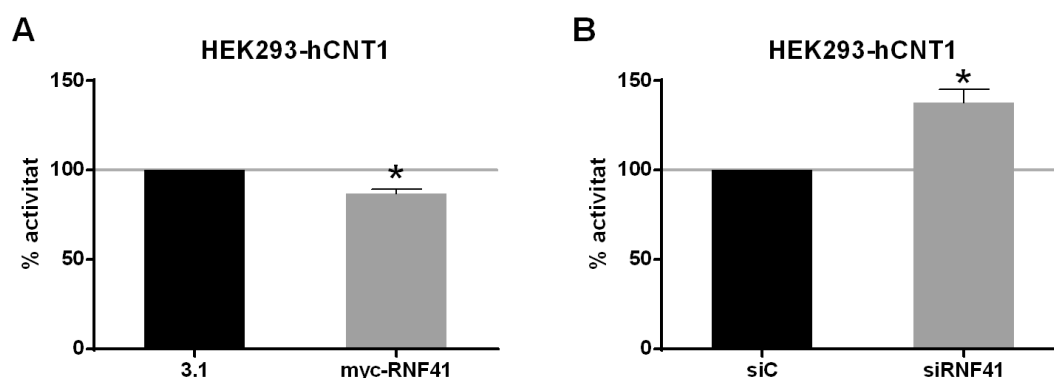


Figura 25. La modulació de l'expressió d'RNF41 produeix canvis en l'activitat d'hCNT1. Les cèl·lules HEK293-hCNT1 es van sembrar, i a les 24 hores es van transfectar amb pcDNA3.1 o pcDNA3.1-myc-RNF41 (A), o bé es van silenciar amb siRNA C o siRNA RNF41 (B). L'assaig de transport en ambdós casos es va realitzar a les 48 hores post transfecció o silenciament. L'activitat d'hCNT1 es va mesurar mitjançant l'entrada de citidina tritiada a les cèl·lules, calculada a partir de la diferència de valors entre un medi ric en sodi i un medi ric amb colina. Els resultats estan referits a l'activitat basal de HEK293-hCNT1, a la qual se li atorga un valor del 100%. Les barres representen la mitjana dels percentatges de cada experiment \pm SEM (n=3). La significació estadística es va mesurar amb test t-Student aparellat; * p<0.05. Resultats de la tesi del Dr. Albert Viel-Oliva.

Així doncs es va voler comprovar si RNF41 ubiquïtinava hCNT1 i conseqüentment aquest era degradat via proteasoma. El mecanisme va ser inhibir la funció del proteasoma amb el fàrmac MG-132 en condicions de sobreexpressió d'RNF41. Els resultats no van ser clars pel fet que en comparar les dues condicions control es va observar com l'expressió d'hCNT1 semblava augmentar quan es va sobreexpressar RNF41 (Figura 26). Per altra banda, en comparar l'expressió d'hCNT1 quan el proteasoma estava inhibit es va detectar acumulació de les bandes de menor pes molecular en ambdós casos, tal i com s'havia observat en l'estudi del cas clínic en l'apartat anterior. L'acumulació sembla major en cas de sobreexpressió d'RNF41. Aquest resultat es podria explicar pel fet que en una situació en què hi hauria major presència d'RNF41, hCNT1 seria més ubiquïtinat i per tant, en inhibir-se el proteasoma, l'acumulació seria major.

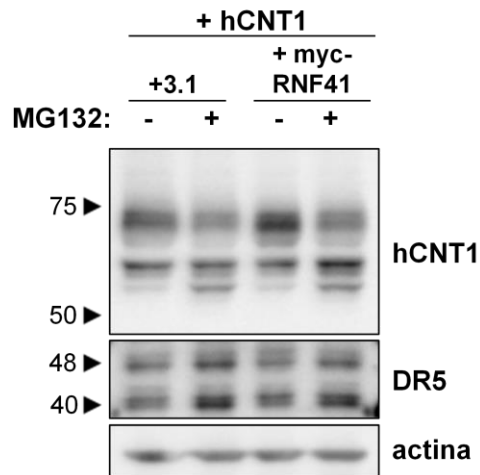


Figura 26. La inhibició del proteasoma interfereix en l'expressió d'hCNT1. Anàlisi mitjançant western blot d'extractes proteics totals de HEK293 transfectades amb les combinacions indicades. Les cèl·lules van ser tractades durant 16 hores a les 8 hores post-transfecció amb MG-132 (5µM). DR5 és el control positiu. Es mostren els resultats d'un sol experiment.

La ubiquïtinització de proteïnes té lloc típicament en residus lisina (revisat a Hochstrasser 2009), però també s'han descrit ubiquïtinitzacions a residus cisteïna o treonina (Wang et al. 2007). D'entrada, però, es va analitzar la seqüència proteica d'hCNT1 amb el software UbPred (Indiana University Bloomington), el qual indica quines lisines són susceptibles de ser ubiquïtinades. Es van detectar 3 lisines: K19, K393 i K401 (Taula 18 de l'apartat 1.3 de Resultats). Segons el model d'homologia estructural descrit en l'apartat anterior d'aquest mateix bloc, K393 i K401 es troben en el cantó extracel·lular. K19, en formar part del domini N-terminal no present en l'ortòleg procarionta, no va poder ser modelat, però segons la predicció d'estructures es trobaria a la cua N-terminal. Considerant que la ubiquïtinació és un procés que té lloc a l'interior de la cèl·lula, es va hipotetitzar que K19 era la lisina d'hCNT1 susceptible de ser ubiquïtinada.

Conseqüentment, es va procedir a mutar la K19 per elucidar el seu paper en la ubiquïtinització d'aquest transportador de pirimidines. Tanmateix, el sistema d'estudi havia de canviar, ja que les mutacions de la K19 es van realitzar sobre el vector d'expressió pcDNA3.1-hCNT1 i no sobre la línia estable HEK293-hCNT1. Com que tot l'estudi previ s'havia realitzat a la línia estable, es va comprovar si hi havia modulació de l'activitat d'hCNT1 per part d'RNF41 en un sistema de HEK293 transfectades transitòriament. Es va poder observar que l'activitat també disminuïa, un 16% en aquest cas (Figura 27) – en les HEK293-hCNT1 era un 13%.

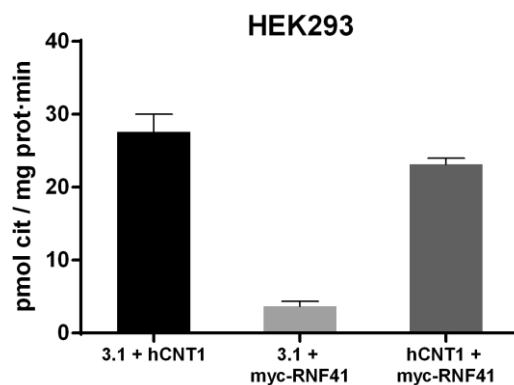


Figura 27. RNF41 també modula l'activitat d'hCNT1 en un sistema HEK293 de transfecció transitòria. Les cèl·lules van ser sembrades i transfectades l'endemà amb els vectors indicats (3.1 indica pcDNA3.1 buit). A les 48 hores es va realitzar l'assaig de transport. L'activitat d'hCNT1 es va mesurar mitjançant l'entrada de citidina tritiada a les cèl·lules, calculada a partir de la diferència de valors entre un medi ric en sodi i un medi ric amb colina. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm SEM (n=3). La significació estadística es va calcular per un test t-Student de mostres aparellades.

Un cop confirmat que es podia emprar el sistema de transfecció transitòria es va procedir a la mutagènesi dirigida de la K19. Es van realitzar les substitucions K19R, K19T i DelK19 (Figura 28A). Posteriorment es va comprovar si l'activitat de les proteïnes resultants variava respecte hCNT1 WT, així com l'expressió. La substitució K19R va mostrar tenir la mateixa activitat que el WT, mentre que K19T i DelK19 presentaven menys transport de citidina (Figura 28B). L'expressió a nivell proteic lleugerament inferior al WT en tots els casos (Figura 28C).

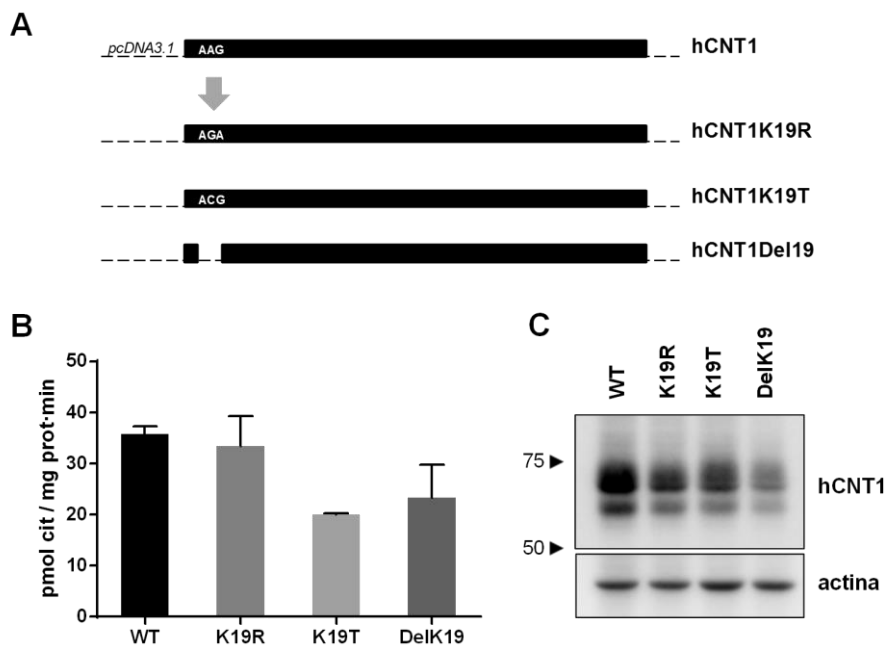


Figura 28. Mutants de K19. (A) Esquema representatiu de les substitucions en cada cas. (B) Activitat d'hCNT1 mesurada per l'entrada de citidina a les cèl·lules i calculada com la diferència de transport entre un medi ric en sodi i un medi ric en colina. Les barres representen la mitjana \pm SEM de dos experiments independents. (C) Extractes proteics totals de HEK293 transfectades amb els vectors indicats.

Es van descartar les mutacions K19T i DelK19, ja que els canvis en l'activitat d'hCNT1 es podrien explicar per canvis dràstics en l'estructura del transportador per presència d'una cadena lateral polar sense càrrega o la manca d'un residu, respectivament. En aquest punt, doncs, es va procedir a comprovar si hi havia canvis en l'expressió d'hCNT1 en modular l'expressió d'RNF41. La sobreexpressió d'RNF41 (sense el *tag myc*) no semblava afectar l'expressió d'hCNT1 (Figura 29A). Per altra banda, hCNT1 WT s'acumulava en certa manera en condicions de *knock down* d'RNF41, mentre que l'expressió d'hCNT1K19R es mostrava invariable (Figura 29B).

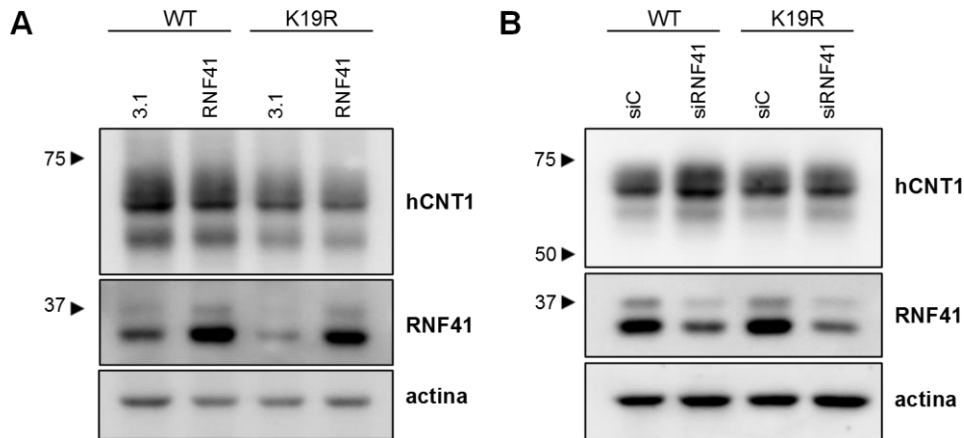


Figura 29. L'expressió d'hCNT1K19R no varia per modulació de l'expressió d'RNF41. Extractes totals de HEK293 transfectades (A) o silenciades (B) amb els vectors indicats mesurats per western blot. Es mostra la resolució de 10µg de proteïna en cada cas.

A continuació es va comprovar l'efecte d'inhibir el proteasoma amb MG-132 sobre l'expressió d'hCNT1K19R, i en comparació amb l'efecte sobre hCNT1 WT (Figura 30).

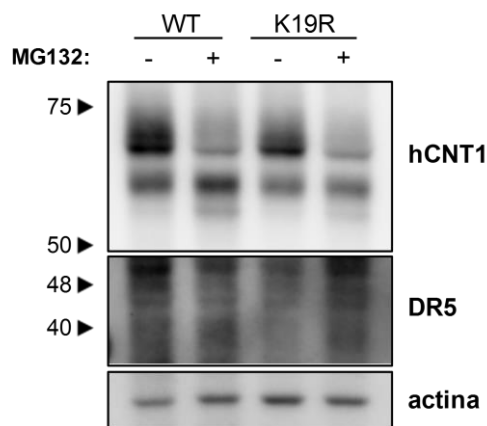


Figura 30. La inhibició del proteasoma amb MG-132 també indueix canvis d'expressió d'hCNT1K19R. Anàlisi mitjançant western blot d'extractes proteics totals de HEK293 transfectades amb els vectors indicats. Les cèl·lules van ser tractades durant 16 hores a les 8 hores post-transfecció amb MG-132 (5µM). DR5 és el control positiu. Es mostra un resultat representatiu de 3 experiments independents.

Tal i com s'havia observat anteriorment, la inhibició del proteasoma produïa dos efectes sobre hCNT1: una disminució de les bandes de més pes molecular i una acumulació de les bandes de menor pes molecular. Aquesta acumulació és menys pronunciada a hCNT1K19R, suggerint que la lisina 19 podria estar implicada en la degradació d'hCNT1 via proteasoma.

El següent pas va ser comprovar si realment hCNT1 era ubiquïtinat i si aquest fet canviava en substituir la lisina 19 per una arginina. Es va procedir a immunoprecipitar hCNT1 i detectar ubiquïtina en les mostres immunoprecipitades. Els primers resultats semblaven suggerir que no hi havia diferències entre hCNT1 WT i hCNT1K19R en quant a nivells d'ubiquïtinització (Figura 31). Per tant, els resultats indicaven que hCNT1 era ubiquïtinat en residus diferents a la K19.

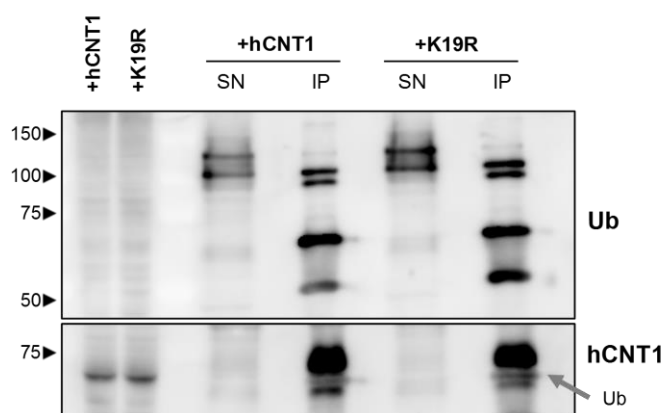


Figura 31. No es detecten diferències d'ubiquïtinització entre hCNT1 i K19R. Es van sembrar cèl·lules HEK293 i 24 hores després es van transfectar amb els vectors d'expressió indicats. 48 hores després es van processar les mostres i es va realitzar la immunoprecipitació d'hCNT1 amb l'anticòs G7 (SCB) i posteriorment es va analitzar ubiquïtina (Ub) mitjançant western blot. Els extractes proteics totals resolts contenen 20µg de proteïna. SN: sobrenedant, 20µg; IP: immunoprecipitat. La fletxa indica la banda romanent del revelat d'Ub en el revelat d'hCNT1.

Es va decidir procedir de forma diferent. Es va comprovar en condicions de sobreexpressió d'hCNT1 WT si el silenciament d'RNF41 alterava la ubiquïtinització de la proteïna. Es va afegir en paral·lel un control de HEK293 buides sense transfectar hCNT1. Els resultats van revelar que l'anticòs d'ubiquïtina presentava un alta inespecificitat per a detectar-se després d'una immunoprecipitació, ja que el control de HEK293 buides mostrava les mateixes bandes que els immunoprecipitats en què hi havia hCNT1 present (Figura 32). L'única banda que només apareixia en HEK293 transfectades amb hCNT1 i siRNA control pesava 120 kDa aproximadament, un pes molt més elevat del d'hCNT1 (60-75 kDa). De fet, si hCNT1 oligomeritzés en forma de dímer, 120kDa seria el pes predit per aquesta estructura. Tanmateix, en revelar hCNT1 no es va detectar cap banda a aquest pes molecular.

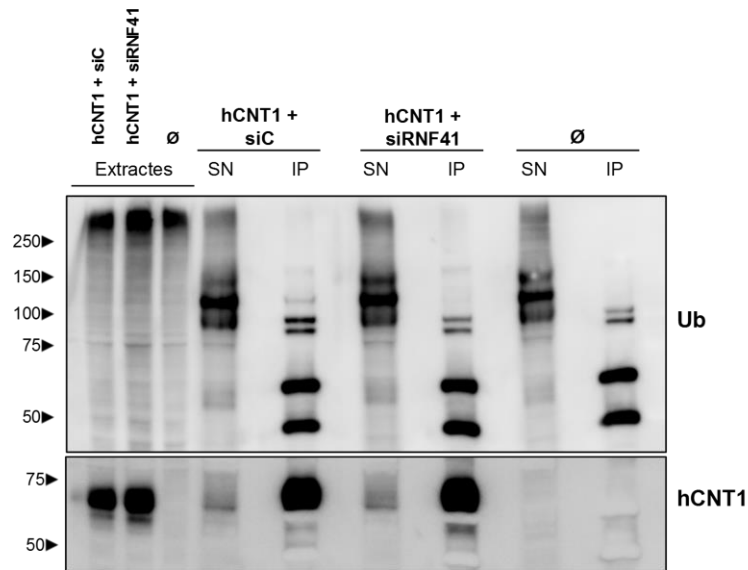


Figura 32. La detecció d'ubiquïtines després d'immunoprecipitar hCNT1 és inespecífica. Les HEK293 van ser transfectades l'endemà que sembrades, i posteriorment silenciades amb siRNA control o siRNF41. A les 48 hores després del silenciament es van processar les mostres i es va immunoprecipitar hCNT1 amb l'anticòs G7. Primer es va detectar ubiquïtina per western blot i posteriorment hCNT1. Els extractes proteics totals resoltos contenen 20µg de proteïna. SN: sobrenedant, 20µg; IP: immunoprecipitat.

Fins aquest punt s'havia demostrat que l'expressió d'hCNT1 era modulada pel proteasoma d'alguna manera, però no s'havia pogut demostrar ni descartar que la ubiquïtinació de la lisina 19 hi participés. Tot plegat es podria deure a un fenomen de competència entre anticossos. La lisina 19 es troba en la cua N-terminal d'hCNT1, que és la mateixa regió que detecta l'anticòs anti-hCNT1 (G7) que s'ha emprat, el qual és un anticòs monoclonal comercial (SCB). Si realment la lisina 19 fos ubiquïtinada, podria impedir que l'anticòs G7 reconegués la cua N-terminal d'hCNT1-Ub. En el context de les immunoprecipitacions això significaria arrossegar només els transportadors no ubiquïtinats, de manera que no es detectarien diferències entre hCNT1 WT i hCNT1K19R. Un anticòs òptim per a la detecció d'ubiquïtina podria detectar aquesta porció romanent d'hCNT1 no ubiquïtinat en el sobrenedant de les immunoprecipitacions. Per evitar possibles fenòmens d'interferència caldria realitzar la immunoprecipitació d'hCNT1 amb un anticòs que detectés el domini C-terminal de la proteïna. Al laboratori es va produir un anticòs monoclonal contra el C-terminal, però no s'ha aconseguit immunoprecipitar hCNT1.

La ubiquïtinització és una senyal de tràfic intracel·lular i regula el *sorting*. S'ha descrit que RNF41 és responsable d'ubiquïtinitzacions de caire diferent. La poliubiquïtinització al residu K48 de les proteïnes està relacionat amb la degradació via proteasoma, i RNF41 l'efectua sobre MyD88, Parkin i BRUCE (Qiu et al. 2004; Yu and Zhou 2008; Wang et al. 2009). En canvi, la poliubiquïtinització o monoubiquïtinització en el residu K63 típicament envia les proteïnes a

degradació per la via lisosomal (revisat a Piper and Lehner 2011); RNF41 regula la poliubiquïtinització en K63 de TBK1 (Wang et al. 2009). Per últim, se sap que RNF41 poliubiquïtinitza altres proteïnes però se'n desconeix el residu, com ara ErbB3, RAR α i IL-3R (Qiu and Goldberg 2002; Jing et al. 2008). Per altra banda, s'ha relacionat RNF41 amb la regulació del tràfic de receptors de citoquina de membrana plasmàtica. Dos treballs molt seguits publicats pel mateix grup han descrit de quina manera RNF41 participa del control de la ruta dels receptors de citoquines dependents de JAK2. En el primer treball s'havia descrit com RNF41 bloquejava la formació d'una part escindida de la regió C-terminal del receptor de leptina (LR), anomenada CTS. La proteasa catepsina L és responsable de la formació de CTS i posterior degradació per via lisosomal, però RNF41 bloqueja la formació de CTS i per tant redueix la degradació d'aquests receptors per via lisosomal. En canvi, afavoreix el fenomen anomenat *ectodomain shedding*, és a dir, formació de receptor soluble, en la qual hi participen les proteases ADAM. En cap cas es va confirmar la ubiquïtinització del receptor (Wauman et al. 2011). En el segon treball revelen que els efectes d'RNF41 sobre LR es donen a través d'un altre element, la desubiquïtinasa USP8. USP8 i RNF41, que s'ha demostrat que interaccionen, presenten una regulació recíproca entre si, ja que RNF41 indueix la ubiquïtinització d'USP8 i en disminueix l'expressió, mentre que USP8 promou l'estabilització d'RNF41 mitjançant el bloqueig de la seva autoubiquïtinització. Alhora, aquesta regulació recíproca també controla el tràfic de receptors de citoquines com LR. La formació del CTS té lloc en uns microdominis anomenats cossos multivesiculars (MVB), els quals acaben fusionant-se amb els lisosomes i per tant el contingut és degradat. USP8 és imprescindible per a què els receptors de citoquina puguin arribar als MVB. Com que RNF41 indueix la degradació d'USP8, la reducció d'aquesta proteïna fa que LR no pugui accedir als MVB i per tant és reciclat a la membrana plasmàtica. La major presència d'LR a membrana plasmàtica afavoreix *ectodomain shedding* (De Ceuninck et al. 2013).

Això va portar a hipotetitzar si RNF41 podia exercir un efecte semblant a l'efectuat sobre el receptor de leptines. Ja s'ha demostrat que hCNT1 i RNF41 interaccionen, de manera que la funció d'RNF41 podria ser apropar hCNT1 a la maquinària de reciclatge. Caldria comprovar si els actors són els mateixos i si hCNT1 pot patir *ectodomain shedding*. En tot cas, si RNF41 afavorís la solubilització d'hCNT1, el transport es veuria disminuït, que és el que s'ha observat en sobreexpressar RNF41; i s'esperaria el contrari del silenciament, és a dir, major presència d'hCNT1 a la membrana plasmàtica i per tant més activitat.

Com a primera prova es va decidir comprovar si RNF41 intervenia en la vida mitjana d'hCNT1, és a dir, si la seva sobreexpressió induïa d'alguna manera menor expressió d'hCNT1 o increment de bandes de menor pes molecular (que correspondrien a una possible solubilització). Es va

inhibir la síntesi proteica amb cicloheximida durant 2, 4 i 6 hores, en condicions d'expressió endògena d'RNF41 (hCNT1 + 3.1) o en condicions de sobreexpressió (hCNT1 + RNF41) (Figura 33).

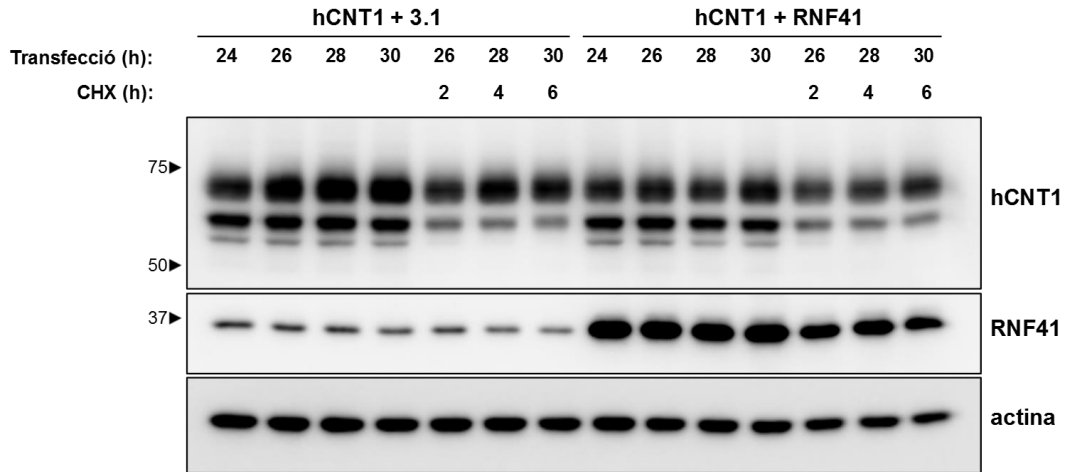


Figura 33. La sobreexpressió d'RNF41 sembla afectar la vida mitjana d'hCNT1. Anàlisi mitjançant western blot d'extractes proteics totals de HEK293 transfectades segons està indicat. Les cèl·lules van ser tractades o no amb cicloheximida (CHX, 40µg/mL) durant els temps indicats, a les 24 hores post-transfecció. Es mostra un western blot representatiu de dos experiments.

Es va observar com la inhibició de la síntesi proteica afectava tant hCNT1 com RNF41, tot i que a les 6 hores encara es mantenia una expressió considerable d'ambdues proteïnes. En condicions control, la sobreexpressió d'RNF41 semblava disminuir l'expressió de les bandes de major pes molecular d'hCNT1. Hem determinat recentment que el patró d'expressió d'hCNT1 presenta bandes de diferents pesos moleculars, en què les bandes superiors corresponen a hCNT1 funcional, amb les modificacions post-traduccionals pertinents (Pérez-Torras et al. 2019). Aquest resultat, doncs, lligaria amb el fet que la sobreexpressió d'RNF41 produïa una disminució de l'activitat d'hCNT1. En comparar els tractaments amb cicloheximida amb els controls corresponents, es va intuir una disminució de la vida mitjana d'hCNT1 quan RNF41 estava sobreexpressat, tot i que molt subtil. Aquests resultats indicarien que RNF41 estaria participant en la degradació d'hCNT1. Una manera de comprovar-ho seria silenciant RNF41 i inhibint la síntesi proteica amb cicloheximida, ja que s'esperaria menys disminució de l'expressió d'hCNT1 en absència d'RNF41.

Per tant, s'ha demostrat que RNF41 modula l'activitat d'hCNT1 i que ambdues proteïnes interaccionen. En ser RNF41 una E3 lligasa, s'havia hipotetitzat que la funció d'aquesta interacció estava relacionada amb la degradació d'hCNT1 via proteasoma. La seqüència d'hCNT1 presenta tres lisines susceptibles de ser ubiquitinades: K19, K393 i K401. S'ha descrit que típicament el

residu relacionat amb la degradació de proteïnes via proteasoma és la K48 (Grice and Nathan 2016), però hCNT1 no presenta aquesta lisina. En primera instància s'havia hipotetitzat que la K19 podria exercir aquesta funció, donat que s'havia detectat acumulació d'expressió d'hCNT1 en inhibir farmacològicament el proteasoma. Tanmateix, no s'ha pogut demostrar que hCNT1 s'ubiquïtina, almenys a través d'aquesta lisina. Tal i com s'ha comentat, no es pot descartar que K19 sigui ubiquïtinada, ja que els resultats presentats podrien estar condicionats per una possible competència pel lloc d'unió dels anticossos a l'N-terminal. Per altra banda, no es pot descartar que les lisines K393 i K401 puguin ser ubiquïtinades. En els últims anys ha incrementat la consciència de què la ubiquïtina, a més de marcar les proteïnes per a degradació proteasomal, també és un element regulador de molts processos. S'ha vist que en funció del context i del residu marcat, una proteïna ubiquïtinada pot ser degradada per via lisosomal o pot ser estabilitzada (revisat a Kwon and Ciechanover 2017). A més, el domini cel·lular en què tinguis lloc la ubiquïtinització també és rellevant. S'havia descartat K393 i K401 perquè segons el model d'homologia són extracel·lulars, i per tant RNF41 no podria accedir-hi per exercir d'E3 lligasa. Ara bé, si el transportador hCNT1 fos reciclat i accedís a un compartiment cel·lular en què hi hagués RNF41, aleshores hi hauria la possibilitat que aquesta E3 lligasa accedís a aquests dos residus de lisina i ubiquïtinar-los. Per tant, s'haurien de mutar aquests dos residus, en la mateixa molècula i per separat, i posteriorment comprovar si els hCNT1 mutants són ubiquïtinats, degradats per proteasoma o d'alguna manera canvia la localització cel·lular.

Per altra banda, no es pot descartar la possibilitat que la funció d'RNF41 sigui afavorir el reciclatge d'hCNT1. Aquest transportador no sembla degradat per la via lisosomal, tal i com indica la inhibició mitjançant hidroxiclороquina sulfat (Pérez-Torras et al. 2019). Tanmateix, RNF41 podria conduir-lo a un altre microdomini cel·lular. Es podria analitzar mitjançant immunolocalització si la interacció es pot donar en algun indret de la cèl·lula diferent a la membrana plasmàtica, per exemple emprant un marcador d'endosomes tardans. De la mateixa manera, es podria comprovar si canvia localització d'hCNT1 en situacions de modulació de l'expressió d'RNF41. Si en sobreexpressar RNF41 es detecta major proporció d'hCNT1 intracel·lular, això indicaria que RNF41 estaria afavorint la internalització del transportador. Per altra banda, no es pot descartar que alhora es produeixi algun fenomen *ectodomain shedding* o fins i tot la solubilització del transportador, tal i com succeeix amb el receptor de leptina LR (Wauman et al. 2011). Si l'escissió d'un domini es produís per l'extrem C-terminal, les eines actuals no permetrien detectar aquests fragments d'hCNT1 amb menor pes molecular, ja que l'anticòs detecta la part N-terminal. De la mateixa manera, la formació de proteïnes amb menor pes molecular (la part restant) podria no detectar-se. El sistema d'estudi emprat és el cultiu

cel·lular en el qual s'expressa heteròlogament hCNT1 mitjançant el vector d'expressió pcDNA3.1, que presenta un promotor fort. L'expressió constant del vector, així com les bandes de diferent pes molecular producte de les modificacions post-traduccionals, podrien emmascarar la possible aparició de proteïnes hCNT1 amb menor pes molecular.

En resum, els resultats de l'estudi funcional de la interacció entre hCNT1 i RNF41 encara es troben en estadis molt primerencs, però s'ha vist que RNF41 regula la funció d'hCNT1.

BLOC 2: ESTUDI DE LA REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE LES FAMÍLIES *SLC28* I *SLC29*

3. Regulació epigenètica de les famílies *SLC28* i *SLC29*

3.1 Introducció

El DNA eucariota s'organitza dins el nucli cel·lular de forma condensada. La cromatina consisteix en un octàmer d'histones (duplicats de les histones H2A, H2B, H3 i H4) al voltant del qual s'enrotllen 147 parells de bases de DNA. El terme 'epigenètica' s'empra per a descriure tots aquells esdeveniments basats en l'estructura de la cromatina que regulen els processos d'expressió del DNA. Els enzims implicats en l'estructura i funció de l'epigenoma són de tres tipus. Els *writers* són els encarregats d'afegir les marques covalents descrites a continuació, mentre que els *erasers* són els responsables d'eliminar-les. Tal i com es mencionarà més endavant, aquestes categories inclouen quinases com a *writers* i fosfatases com a *erasers*, per exemple. Per últim hi ha els *readers*, que reconeixen les marques i recluten altres enzims modificadors, complexos d'activació de la transcripció, entre altres (revisat a Dawson and Kouzarides 2012).

Dins aquests esdeveniments hi ha modificacions del propi DNA també, però aquestes no alteren la seqüència de nucleòtids. La modificació principal consisteix en la metilació de la citidina convertint-la en 5-metilcitidina (5mC), que alhora pot ser oxidada en el mateix residu metil successivament per donar lloc a la resta de modificacions (5-hidroximetilcitidina, 5-formilcitidina i 5-carboxilcitidina). Recentment s'han identificat residus de N⁶-metiladenina en genomes de mamífer, però se'n desconeix la funció (Xiao et al. 2018). La metilació del DNA està associada a zones transcripcionalment inactives, com centròmers, telòmers, la part inactiva del cromosoma X i seqüències repetitives (Baylin and Jones 2011).

El segon grup de modificacions epigenètiques engloba els canvis en residus de les histones. S'han descrit una àmplia varietat de canvis: metilació, acetilació, fosforilació, ubiquitinació, SUMOilació, ADP ribosilació, deaminació, isomerització de prolines, crotonilació, propionilació, butirilació, formilació, hidroxilació i O-GlcNAcilació (revisat a Dawson and Kouzarides 2012). Tanmateix, els més estudiats són la metilació, l'acetilació i la fosforilació. L'acetilació d'histones és l'esdeveniment principal implicat en canvis de transcripció, estructura de cromatina i reparació del DNA. L'acetilació neutralitza les càrregues positives de les lisines de les histones, debilitant les interaccions electrostàtiques entre histones i DNA, de manera que l'estructura del nucleosoma es relaxa i es passa a l'estat que s'anomena conformació oberta de la cromatina. És

una modificació molt dinàmica, regulada per dues famílies de proteïnes principals: les Histona Acetiltransferasa (HAT) i les Histona Desacetilasa (HDAC). Anàlisis de CHIP-seq han relacionat l'acetilació d'histones a promotors i *enhancers* de gens transcripcionalment actius. De forma anàloga, la fosforilació és semblant a l'acetilació en el sentit que també altera la càrrega de les histones, afectant l'estructura de la cromatina. Es poden distingir dues categories de fosforilació de les histones, la primera més relacionada amb la regulació de la transcripció i la segona implicada en la condensació de la cromatina. A diferència de l'acetilació, la fosforilació està més implicada a processos cel·lulars com mitosi o reparació del dany. Per altra banda, la metilació de les histones no suposa cap canvi en la càrrega neta del nucleosoma. Pot tenir lloc a les cadenes laterals de lisines (K), arginines (R) o histidines (H), però les més abundants són les metilacions de lisines, les quals poden ser mono, di o trimetilades. Els enzims són bastant específics de residu, tant les metiltransferases com les desmetilases. A més, hi ha marques específiques associades a gens actius (H3K4me1/2/3, H3K36me3 o H3K79me3) i marques associades a heterocromatina (H3K9me3, H3K27me3 o H4K20me3). Addicionalment, la localització dels residus respecte els gens també és important. S'ha descrit que H3K4me3 és una modificació associada a inici de transcripció, mentre que H3K4me1 és més típica d'*enhancers* (Sharifi-Zarchi et al. 2017).

L'últim grup està format pels RNA no codificants (ncRNA). Aquest tipus d'RNA inclou tots aquells RNAs que no tenen potencial de ser traduïts a proteïna. Estudis de *Whole Genome Sequencing* (WGS) i de *Whole Transcriptome Sequencing* (WTS) van revelar que només un 2% del genoma humà codifica proteïnes, mentre que el 75% del genoma és transcrit a ncRNAs (Djebali et al. 2012). Hi ha moltes subcategories de ncRNA i cadascuna té funcions diferents. Una d'elles està compresa pels microRNAs o miRNAs, els quals són RNAs petits de 20-24 parells de bases que causen la degradació o inhibició dels seus gens diana. Els miRNAs s'uneixen al 3'UTR de l'mRNA diana per complementarietat, i així en modulen l'expressió. Si la complementarietat és parcial té lloc una inhibició de la traducció, mentre que si la complementarietat és total, l'mRNA és degradat (Bartel 2009).

Tots els processos epigenètics estan molt regulats però són alhora molt dinàmics, al contrari del que es creia inicialment. Així, en funció de si una cèl·lula s'està dividint o és quiescent, les marques seran unes o altres. En aquesta mateixa línia, durant el procés de carcinogènesi l'epigenètica juga un paper determinant. Els canvis en el patró de modificacions epigenètiques han estat inclosos en els anomenats *hallmarks* del càncer (Hanahan and Weinberg 2011). S'ha observat que les cèl·lules tumorals presenten hipermetilació global, típicament a les illes CpG dels promotors. Aquesta hipermetilació està associada a un silenciament gènic que té especial

repercussió en gens supressors de tumors, i que probablement està vinculat a un guany de marques d'histones repressores (Flavahan et al. 2017).

Donat que l'expressió dels transportadors concentratius de nucleòsids es perd en el procés carcinogènic, una de les hipòtesis d'aquesta tesi és que les modificacions epigenètiques participen del silenciament dels gens que codifiquen els hCNTs.

3.2 Fàrmacs epigenètics

Els fàrmacs epigenètics tenen com a objectiu la remodelació de la cromatina per tal que torni a l'estat pretumoral, o que els canvis estructurals afavoreixin d'alguna manera el tractament del tumor. Es distingeixen dos tipus de fàrmacs tumorals: els reprogramadors d'ampli espectre i els fàrmacs específics de residus. Dins els reprogramadors d'ampli espectre hi ha els inhibidors de DNA metiltransferasa (DNMTi), els inhibidors d'histona desacetilasa (HDACi) i els inhibidors de bromodominis i proteïnes amb motiu extra-terminal (iBET) – els bromodominis són dominis presents en els *readers* que detecten l'acetilació d'histones. Aquests fàrmacs causen canvis d'expressió gènica a gran escala, i sovint reverteixen les alteracions d'expressió associades a càncer. Més concretament, els DNMTi eliminen la hipermetilació associada als gens supressors de tumors, especialment en els respectius promotors. En canvi, els HDACi redueixen la transcripció i senyalització d'oncogens, i també promouen arrest de cicle cel·lular i apoptosi. Els iBET funcionen de forma semblant, però la reducció de la senyalització oncogènica es produeix mitjançant la inhibició de la unió dels *readers* als *superenhancers* dels oncogens. Molts d'aquests fàrmacs es troben en fase clínica encara, però alguns ja han estat provats per la FDA. Per altra banda, els fàrmacs específics inhibeixen *writers* responsables de la modificació d'algun residu concret. La Taula 19 recull alguns exemples de fàrmacs i el seu estatus en quant a aprovació (Revisat a Jones et al. 2016).

El Vorinostat (Zolinza®), o àcid suberoïlanilida hidroxàmic (SAHA), és un inhibidor d'histones desacetilases que està aprovat per la FDA des de l'any 2006 pel tractament de manifestacions cutànies en pacients amb limfoma de cèl·lules T cutani. SAHA inhibeix l'activitat enzimàtica de les histones desacetilases de classe I (HDAC1, HDAC2 i HDAC3) i classe II (HDAC6). Aquesta inhibició permet l'acumulació de grups acetil als residus lisina de les histones, i conseqüentment la cromatina adopta una estructura més oberta i esdevé transcripcionalment més activa. En cèl·lules tumorals l'acció de SAHA s'associa a reducció de la proliferació i de la migració, a inhibició de la progressió del cicle cel·lular i a augment de la mort cel·lular (Ververis et al. 2013) (Figura 34).

Inhibidor	Mecanisme	Motiu	Fàrmac	Diana	Càncer	Estatus
DNMTi	Inhibició metilació DNA	Elimina hipermetilació dels gens supressors de tumors	Azacitidina (Vidaza)	Pan-DNMT	MDS	Aprovat per EMA i FDA
			Decitabina (Dacogen)		AML i MDS	Aprovat EMA (AML) i FDA (MDS)
HDACi	Inhibició de la desacetilació d'histones	Redueix la transcripció d'oncogens	Panobinostat (Farydak)	HDAC classe I, II i IV	Mieloma múltiple	Aprovat per la FDA
			Vorinostat / SAHA (Zolinza)		Limfoma de cèl·lules T cutànies	
iBET	Inhibició de la unió de BET a Ac-histones	Redueix la senyalització d'oncogens	BMS-986158	Pan-BET	Tumors sòlids	Fase I i Fase II
Inhibidor EZH2	Bloquegen la metilació de la H3K27	Inhibeixen mutacions activadores, indueixen apoptosi	Tazemetostat	EZH2	Limfomes i sarcomes	Fase I i Fase II
Inhibidor LSD1	Inhibició de la desmetilació d'H3K4 i H3K9	Promou expressió de gens supressors de tumors	GSK2879552	LSD1	AML i càncer de pulmó de cèl·lules petites	Fase I i Fase II

Taula 19. Alguns exemples de fàrmacs epigenètics emprats en clínica o en vies d'aprovació. Taula adaptada de Jones et al. 2016.

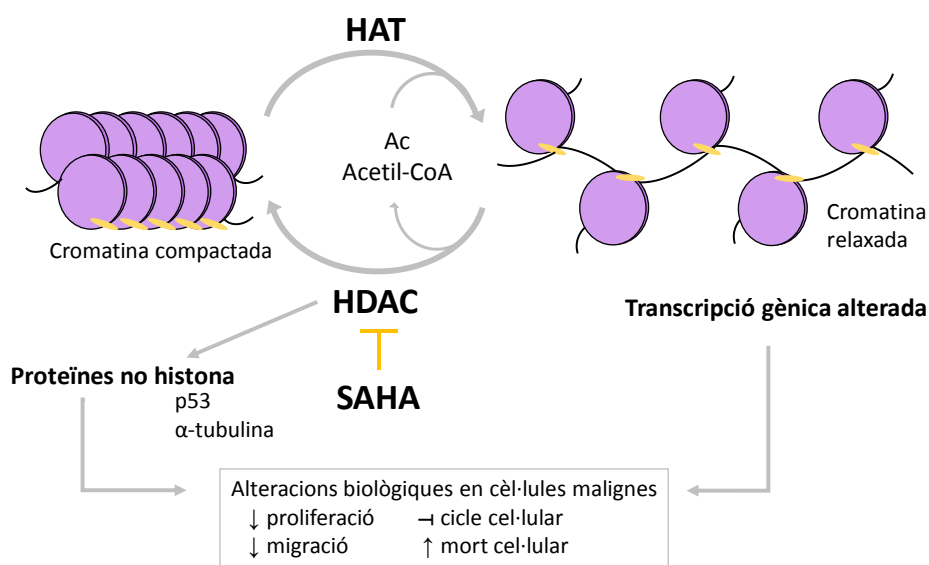


Figura 34. Esquema representatiu del mecanisme d'acció de SAHA. Adaptat de Ververis et al. 2013.

3.3 Modulació de l'expressió dels gens de les famílies *SLC28* i *SLC29* per SAHA

La pèrdua d'expressió dels transportadors concentratius de nucleòsids en cèl·lules tumorals podria estar relacionada amb el procés carcinogènic. En el cas particular d'hCNT1, aquesta hipòtesi està recolzada per les funcions descrites per aquest transportador relacionades amb el fenotip tumoral (Pérez-Torras et al. 2013). Com que l'epigenètica juga un paper important en el desenvolupament tumoral, l'objectiu d'aquest apartat és determinar si els gens que codifiquen els hCNTs estan regulats mitjançant mecanismes epigenètics.

L'aproximació escollida per tal d'avaluar la influència de l'epigenètica sobre els transportadors de nucleòsids ha estat el fàrmac epigenètic SAHA. Com que els transportadors de nucleòsids s'expressen al llarg del tracte gastrointestinal, com a model d'estudi es va escollir un panell de línies cel·lulars derivades de tumors gastrointestinals d'orígens diversos.

En primer lloc es va analitzar la citotoxicitat de SAHA. Es van realitzar assajos de citotoxicitat després de 72 hores de tractament a les línies tumorals derivades de càncer colorectal HT-29 i CaCo-2, així com a les línies derivades de colangiocarcinoma EGI-1, TFK-1 i BCLC-12 (Figura 35). Totes les línies testades van mostrar ser sensibles a SAHA dins el rang micromolar. A partir de les dades de citotoxicitat es va determinar la IC₂₀ i IC₅₀ per a cada línia cel·lular (Taula 20). Prèviament en el grup s'havien realitzat els mateixos assajos de citotoxicitat per a les línies derivades d'adenocarcinoma ductal pancreàtic CP15T i NP-9 i per a les línies derivades d'hepatocarcinoma BCLC-3 i BCLC-5. Els valors obtinguts d'IC₂₀ i IC₅₀ van ser 3,24 i 8,71 per NP-9, 2,51 i 3,98 per CP15T, 3,02 i 4,37 per BCLC-3 i 4,17 i 6,76 per a BCLC-5.

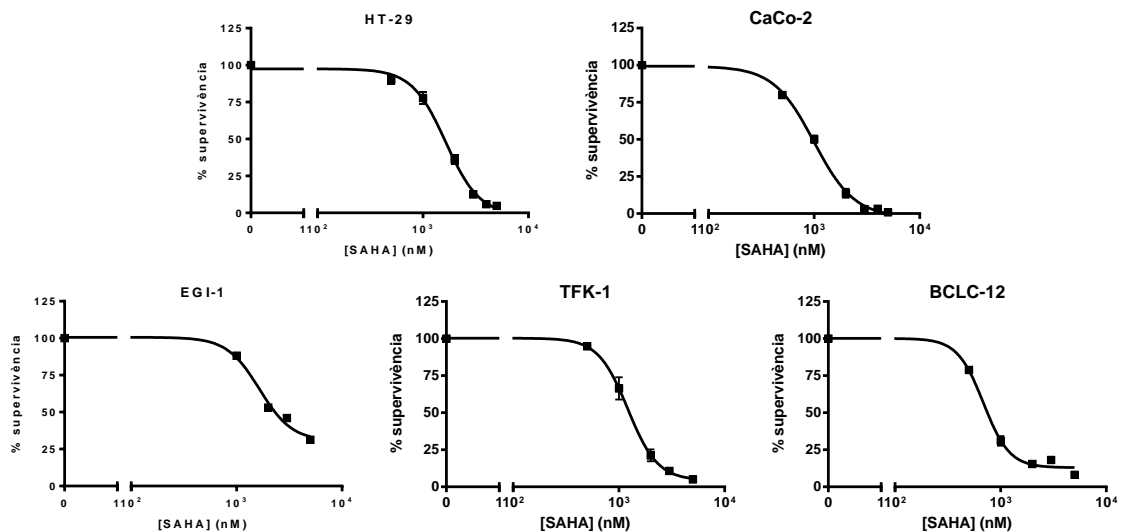


Figura 35. Corbes dosi-resposta del tractament amb SAHA a les línies HT-29, CaCo-2, EGI-1, TFK-1 i BCLC-12. Corbes dosi-resposta de model sigmoïdal (GraphPad Prism). Les cèl·lules indicades van ser tractades amb dosis creixents de SAHA durant 72 hores, en què es va realitzar l'assaig de viabilitat cel·lular MTT. Es mostra la mitjana de 3-6 experiments.

Línia cel·lular	IC ₂₀ ± SEM	IC ₅₀ ± SEM
HT-29	3,02 ± 0,08	3,27 ± 0,06
CaCo-2	2,78 ± 0,08	3,04 ± 0,06
EGI-1	3,01 ± 0,07	3,40 ± 0,07
TFK-1	2,95 ± 0,09	3,16 ± 0,08
BCLC-12	2,56 ± 0,11	2,91 ± 0,04

Taula 20. Valors IC₂₀ i IC₅₀ del tractament amb SAHA de les línies cel·lulars indicades. Els valors van ser determinats amb el programa GraphPad Prism, mitjançant ajustament a la corba utilitzant un model sigmoidal de dosi-resposta. Els resultats indiquen la mitjana ± SEM de 5 experiments independents per HT-29 i CaCo-2 i 3 per a la resta de línies.

Prèviament en el grup s'havia intentat determinar l'efecte de SAHA sobre l'expressió dels transportadors concentratius de nucleòsids. S'havia mesurat l'expressió a nivell d'RNA d'hCNT1, hCNT2 i hCNT3 en tractaments de 24 hores per a les línies tumorals HT-29 i CaCo-2, i de 48 i 72 hores per a NP-9 i CP15T. Els resultats no mostraven canvis significatius de l'expressió dels transportadors, o fins i tot certa tendència a disminuir en el temps. Com que els fàrmacs epigenètics d'ampli espectre com SAHA indueixen canvis d'expressió de molts gens, tractaments de llarga durada com 24-72 hores poden modular molts factors de transcripció o altres elements repressors que podrien estar regulant negativament l'expressió dels hCNTs. Així doncs, es va optar per tractaments de curta durada. L'objectiu era comprovar si el tractament a temps curts era suficient per a incrementar l'expressió dels transportadors concentratius de nucleòsids. En cas afirmatiu, a continuació es comprovaria si la funció del transportador també era restituïda.

Per tant, el primer pas va ser comprovar que SAHA produís un efecte sobre el panell de línies cel·lulars analitzat a temps curts de 4 i 6 hores. Les línies derivades de càncer colorectal HT-29 i CaCo-2 van ser analitzades també per al temps de 12 hores, i HT-29 per a 24 hores. Les dosis de SAHA escollides van ser 1 i 2µM per a les línies derivades de càncer colorectal i colangiocarcinoma, mentre que les línies d'adenocarcinoma ductal pancreàtic i hepatocarcinoma es van tractar a 4 i 8µM. Es va analitzar l'efecte de SAHA per western blot, mitjançant la detecció de l'augment de lisines acetilades (Figura 36). En aquest cas no es va mesurar concretament les lisines de les histones, sinó que es van detectar les lisines acetilades en general. Es va observar que el tractament amb SAHA funcionava a totes les línies cel·lulars analitzades. Ara bé, l'efecte no era el mateix. A HT-29, CaCo-2 i EGI-1 es va poder observar un efecte dependent del temps i de la dosi. En canvi, a CP15T i NP-9 es veia més increment de l'acetilació en funció del temps que no pas en funció de la dosi. Per altra banda, a TFK-1, BCLC-12, BCLC-3 i BCLC-5 semblava que l'efectivitat del tractament depenia més del tractament *per se*, donat que es va detectar increment de les lisines acetilades en cadascun dels punts analitzats, i amb la mateixa intensitat.

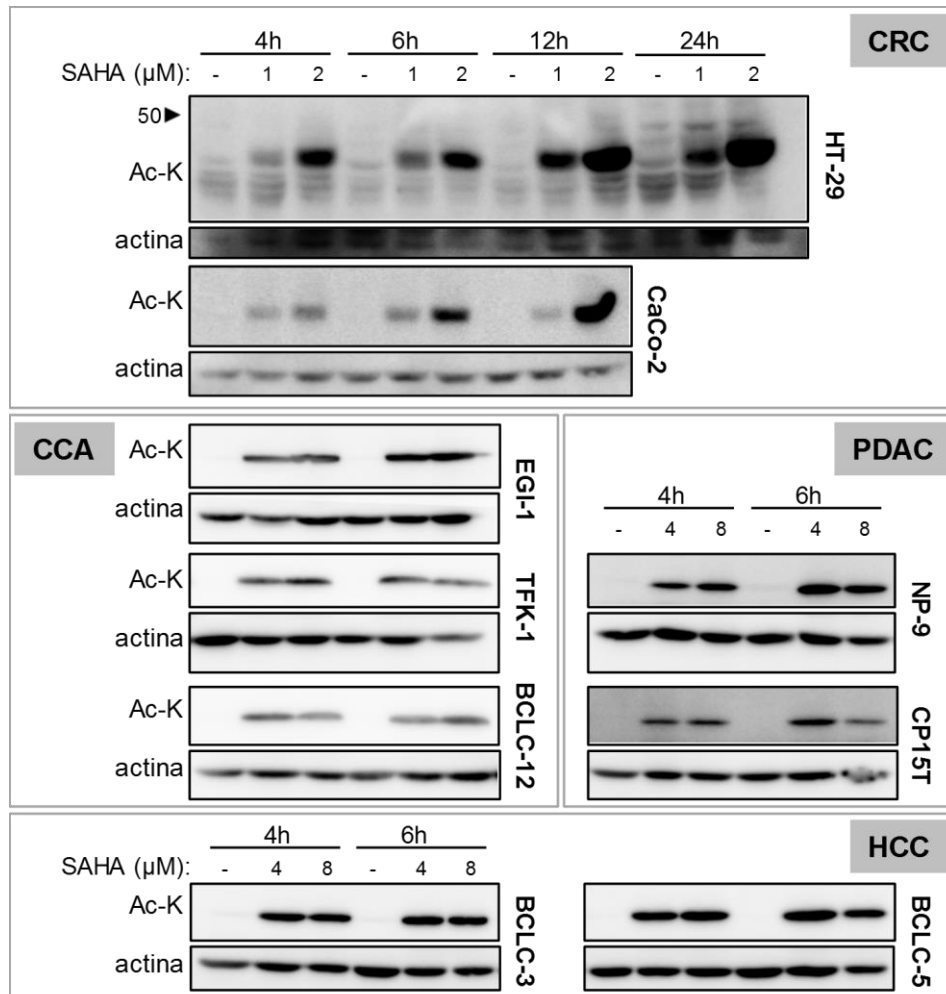


Figura 36. El tractament amb SAHA incrementa la quantitat de lisines acetilades (Ac-K) a totes les línies cel·lulars testades. Anàlisi mitjançant western blot del nivell de lisines acetilades a les línies cel·lulars indicades. Es mostra un resultat representatiu per cada cas. CRC, càncer colorectal; CCA, colangiocarcinoma; PDAC, adenocarcinoma ductal pancreàtic; HCC, hepatocarcinoma.

L'anàlisi dels nivells d'mRNA dels transportadors concentratius de nucleòsids es va realitzar inicialment en línies cel·lulars derivades de càncer colorectal i d'adenocarcinoma ductal pancreàtic. Els resultats van demostrar que la resposta de cadascun dels hCNTs al tractament amb SAHA és diferent (Figura 37). L'mRNA d'hCNT1 i hCNT2 mostrava una tendència a incrementar l'expressió en tots els casos. L'increment d'hCNT1 era considerablement elevat a CP15T, NP-9 i CaCo2 a les 6 hores. El tractament de SAHA 2μM a HT-29 durant 4 hores sí que mostrava un augment significatiu de l'expressió del gen *SLC28A1* (hCNT1). Per altra banda l'augment d'hCNT2 es mostrava encara més accentuat. hCNT2 presentava una tendència a augmentar l'expressió més elevada que hCNT1, significativa per 6 hores de tractament a HT-29. Per altra banda, l'expressió d'hCNT3 pràcticament no variava en les línies testades, excepte a 6 hores de tractament a HT-29, que mostrava una disminució de l'expressió.

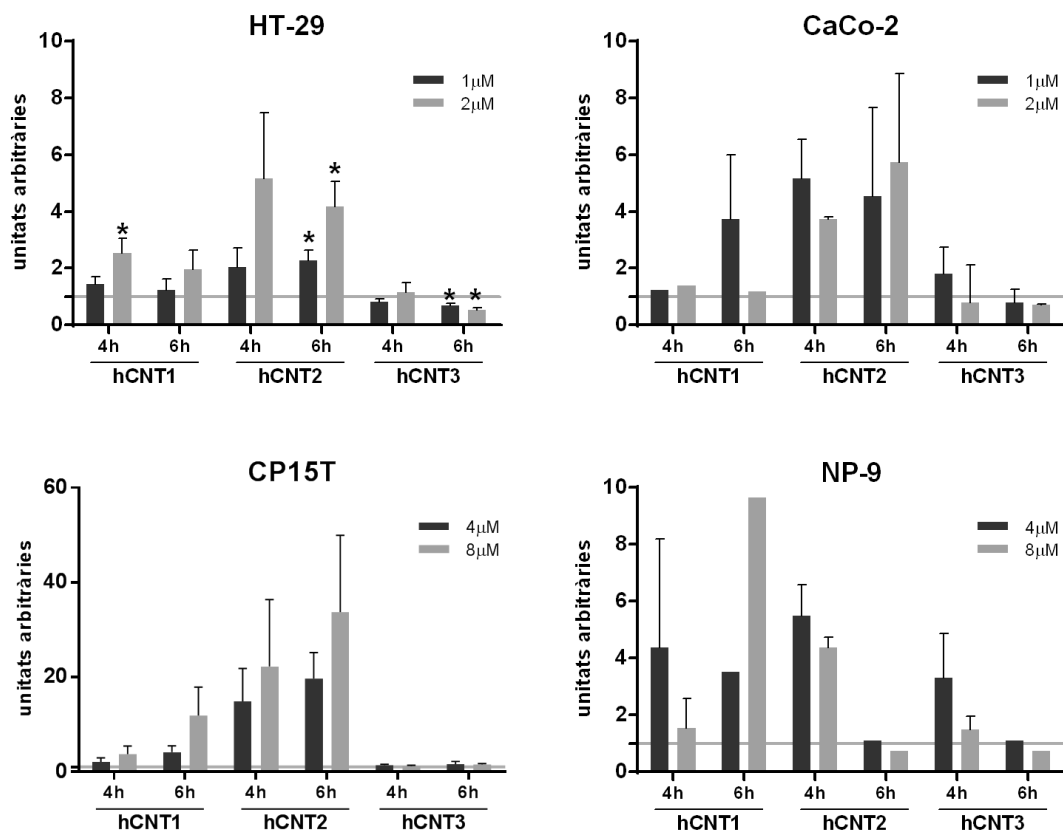


Figura 37. SAHA modula l'expressió dels transportadors concentratius de nucleòsids. Expressió relativa dels transportadors concentratius de nucleòsids hCNT1, hCNT2 i hCNT3 en un panell de línies cel·lulars derivades de càncer colorectal (HT-29 i CaCo-2) i adenocarcinoma ductal pancreàtic (CP15T i NP-9). L'expressió va ser determinada mitjançant PCR a temps real. Tots els valors van ser referits a una condició control sense tractament, indicada amb la línia horitzontal. Les barres representen la mitjana ± SEM d'experiments independents. La significació estadística es va determinar mitjançant test t-Student aparellat; * indica la comparativa amb el control (* p<0.05)

Excepte a HT-29, l'efecte de SAHA sobre l'expressió dels transportadors era superior a les 6 hores que a les 4. Així, es van provar tractaments de més llarga durada a HT-29, amb l'objectiu d'intentar entendre si l'efecte se sostenia en el temps o no, ja que els resultats observats a la Figura 37 indicaven que l'efecte de SAHA a les 4 hores podria començar a minvar a les 6 hores – tot i que la diferència d'expressió era molt subtil. Per tant, es va analitzar l'expressió d'hCNT1, hCNT2 i hCNT3 a temps més llargs: 12, 18 i 24 hores (Figura 38). Pel que fa hCNT1, l'augment degut a l'efecte de SAHA oscil·lava entre 2-3 al llarg del temps, així que es podria considerar que era força constant al llarg del temps. hCNT2, per altra banda, sí que semblava presentar un pic a les 18 hores de tractament, i a les 24 hores començava a mostrar una tendència menys clara, tot i que continuava augmentat respecte el control. Per últim, hCNT3 es mantenia reprimat, més a dosi 2 μM que a 1 μM, seguint la tendència dels tractaments a curt termini.

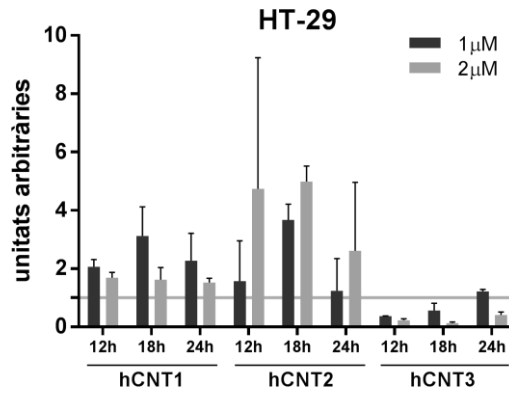


Figura 38. Els tractaments amb SAHA a HT-29 durant temps més llargs no incrementa l'expressió dels transportadors concentratius de nucleòsids. Expressió relativa dels hCNTs durant 12, 18 i 24 hores de tractament amb SAHA. L'expressió dels transportadors es va determinar mitjançant RT-PCR. Tots els valors estan referits a una condició control sense tractament, indicada amb la barra horitzontal. Les barres representen la mitjana ± SEM de dos experiments independents.

Es va realitzar el mateix anàlisi de l'expressió dels hCNTs després del tractament de SAHA durant 4 o 6 hores a les línies derivades de colangiocarcinoma BCLC-12, EGI-1 i TFK-1. En aquest cas, la regulació de l'expressió dels transportadors va resultar ser molt diferent entre línies cel·lulars (Figura 39).

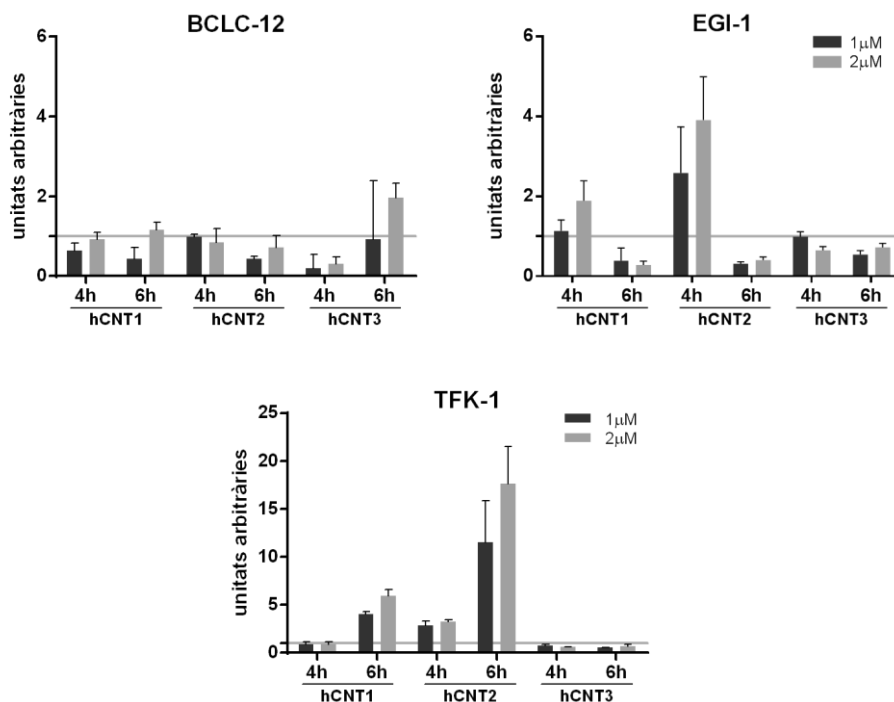


Figura 39. La modulació de l'expressió dels transportadors concentratius de nucleòsids pel tractament de SAHA en línies derivades de colangiocarcinoma depèn principalment de la línia tractada. Expressió relativa dels hCNTs a BCLC-12, EGI-1 i TFK-1. L'expressió dels transportadors es va determinar mitjançant RT-PCR. Tots els valors estan referits a una condició control sense tractament, indicada amb la barra horitzontal. Es representa un sol experiment. Les barres representen la mitjana dels duplicats intraexperimentals ± SEM.

Els nivells dels transportadors a BCLC-12 es mostraven invariables – excepte per hCNT3, que semblava presentar un augment lleuger. EGI-1, en canvi, mostrava un perfil més semblant a HT-29: hCNT1 semblava incrementar a les 4 hores de tractament i no tant a les 6, i hCNT2 exhibia un augment més ampli. La diferència més destacable era que l'augment d'hCNT2 no semblava sostenir-se en el temps, ja que a les 6 hores presentava fins i tot una tendència a disminuir. hCNT1 es comportava a la inversa, a TFK1, ja que a les 4 hores no presentava diferència mentre que a les 6 hores la tendència a augmentar era més accentuada. El canvi més destacable, però, és d'hCNT2 a TFK-1, ja que la tendència escalava fins a gairebé 20 vegades més l'expressió del gen *SLC28A2* a les 6 hores de tractament amb SAHA 2 μ M. Tant a EGI-1 com a TFK-1, hCNT3 es mostrava invariable.

Els resultats mostrats indicaven que l'expressió d'hCNT1 i hCNT2 era incrementada mitjançant la inhibició dels enzims histona desacetilasa, però no la d'hCNT3, a les línies cel·lulars testades. Per tant, SAHA es postulava com un bon candidat per restituir la funció dels transportadors hCNT1 i hCNT2 en tumors. Tanmateix, en el marc de la tesi doctoral de la Clara Boces-Pascual es va analitzar l'expressió dels transportadors concentratius de nucleòsids hCNT1 i hCNT2 en mostres aparellades de tumor i teixit adjacent, de càncer colorectal, adenocarcinoma ductal pancreàtic i hepatocarcinoma. Es va confirmar la disminució d'expressió d'hCNT1 en tumor, mentre que la disminució d'hCNT2 era més dubtosa. Així doncs, l'estudi de la modulació mitjançant el fàrmac epigenètic SAHA es va centrar en hCNT1 fins tenir més clar el paper d'hCNT2 en el fenotip tumoral. A més, hCNT1 és el transportador de nucleòsids pel qual s'han descrit altres funcions més enllà del transport relacionades amb el procés carcinogènic.

Abans de prosseguir es va voler analitzar l'efecte de SAHA sobre els transportadors equilibratius de nucleòsids. S'ha observat que les cèl·lules tumorals preserven l'expressió i funció dels transportadors equilibratius en general – tot i que no sempre és així. De fet s'ha demostrat que la resposta a gemcitabina depèn de l'expressió intratumoral d'hENT1 (Deng et al. 2014; Tavano et al. 2014; Vincenzi et al. 2017; Kim et al. 2018). Per tant calia comprovar que SAHA no produís un efecte negatiu sobre els transportadors equilibratius. De les tres línies cel·lulars analitzades, hENT1 es mostrava relativament invariable a les dues derivades de càncer colorectal, HT-29 i CaCo-2; a HT-29 semblava fins i tot va mostrar certa tendència a augmentar (Figura 40). Per altra banda, NP-9 mostrava una reducció considerable d'hENT1 sobretot a les 6 hores de tractament. hENT2 es mostra invariable a CaCo-2, igual que hENT1, mentre que a HT-29 presenta disminució de l'expressió en tots els punts de tractament. A NP-9 es mostra més variable. Per tant, aquests resultats semblaven indicar que SAHA mantenia l'expressió d'hENT1 a línies d'origen colorectal, mentre que el comportament d'hENT2 depenia de la línia, presentant generalment tendència a

disminuir. La diferència entre els dos transportadors equilibratius podia suggerir que en cas de trobar sinèrgia entre el tractament amb el fàrmac epigenètic SAHA i un anàleg de nucleòsid citotòxic, caldria tenir en compte la possible disminució del transportador equilibratiu hENT2.

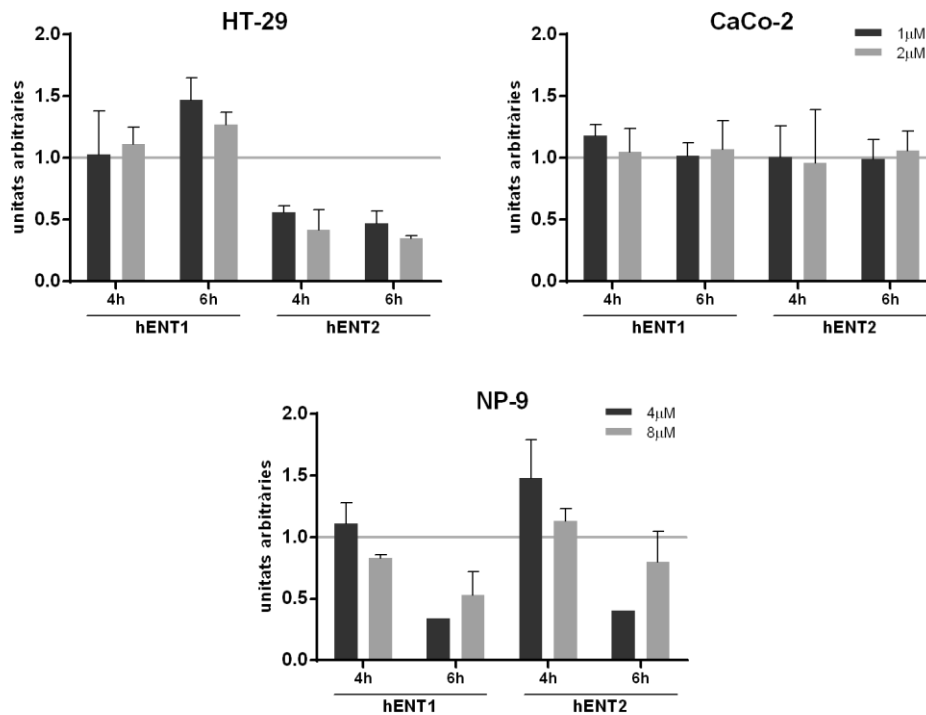


Figura 40. Els transportadors equilibratius de nucleòsids no són modulats pel tractament amb SAHA. Expressió relativa d'hENT1 i hENT2 a HT-29, CaCo-2 i NP-9. L'expressió dels transportadors es va determinar mitjançant RT-PCR. Tots els valors estan referits a una condició control sense tractament, indicada amb la barra horitzontal. Les barres representen la mitjana ± SEM de dos experiments independents, excepte pel punt de 6 hores 1 μM, en què només es representa un experiment.

3.4 Modulació de l'activitat de les proteïnes hCNT per SAHA

Es van escollir HT-29 i CP15T com a models per a seguir l'estudi, representant així dos orígens tumorals diferents com són el càncer colorectal i l'adenocarcinoma ductal pancreàtic, respectivament.

Es va provar de detectar hCNT1 i hCNT2 endògens provinents d'extractes proteics d'HT-29 tractades amb SAHA, de forma paral·lela a la detecció de canvis en l'expressió d'mRNA. En un primer moment es va provar de resoldre 20 μg de proteïna total mitjançant western blot, però no es va detectar hCNT1 amb cap dels anticossos provats, que eren l'anticòs policlonal comercial anti-CNT1 N17 (SCB) i un anticòs monoclonal produït al laboratori contra la cua C-terminal del transportador. De forma paral·lela al desenvolupament d'aquesta tesi la casa comercial Santa Cruz va treure un nou anticòs per a detectar CNT1, aquest cop un anticòs monoclonal que detectava la cua N-terminal. Es van realitzar proves en el laboratori per tal d'intentar

immunodetectar hCNT1 endogen en vàries línies cel·lulars, mitjançant silenciament. Es van resoldre 100µg de proteïna i es detectaven vàries bandes, de les quals només tres baixaven d'expressió en silenciar hCNT1: una banda a uns 120 kDa, una banda a uns 60 kDa i una altra entre 37 i 50 kDa. Amb aquestes dades, i observant el pes molecular d'hCNT1 transfectat en l'apartat anterior (60-75 kDa), es va realitzar un western blot amb 100µg d'extractes proteics d'HT-29 tractats o no amb SAHA. En aquest cas es van detectar vàries bandes també, però només presentaven canvis un conjunt de bandes detectades al voltant de 40-45 kDa (Figura 41). No es pot assegurar que correspongui a hCNT1, ja que s'havia trobat en l'apartat 1.3 que el pes mínim del transportador sense modificacions post-traduccionals és de 55 kDa (resultats d'extractes proteics tractats amb PNGasaF, Figura 18). Ara bé, aquests 55 kDa són de proteïna expressada heteròlogament, mentre que en aquest cas s'està detectant proteïna endògena. No es pot descartar que les HT-29 posseeixin algun tipus de mecanisme mitjançant el qual el transportador pateixi una escissió, i per tant s'estigui detectant una versió més curta d'hCNT1. Caldria comprovar, doncs, si les bandes pertanyen a hCNT1 mitjançant silenciament. Respecte les altres bandes detectades, no s'observen canvis, ni tan sols forçant l'exposició del western blot. Per tant, no es pot concloure que hCNT1 variï a nivell de proteïna en resposta al tractament amb SAHA.

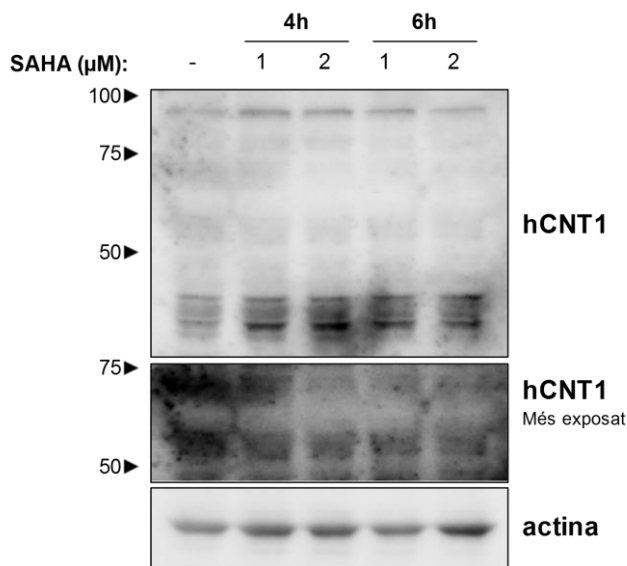


Figura 41. La detecció d'hCNT1 endogen no permet identificar si hi ha canvis després del tractament amb SAHA. Ressolució mitjançant western blot de 100µg de proteïna total, n = 1.

Pel que fa hCNT2, fins el moment no s'ha trobat un anticòs adequat per a la seva detecció. De fet, l'anticòs disponible al moment presentava alta inespecificitat i es detectaven múltiples

bandes. Es van realitzar proves per tal de determinar quina de les bandes corresponia a hCNT2, però van resultar inefectives. Així, es va descartar la detecció d'hCNT2 mitjançant western blot.

La incertesa respecte a la modulació dels transportadors concentratius de nucleòsids a nivell de proteïna va propiciar l'anàlisi de l'activitat dels hCNTs. La tècnica d'ús quotidià al grup per tal de mesurar l'activitat dels transportadors té alta sensibilitat, de manera que es va procedir a comprovar l'impacte del tractament amb SAHA sobre l'activitat dels transportadors concentratius de nucleòsids. En primer lloc es va mesurar la internalització d'uridina en cèl·lules HT-29 tractades amb SAHA (Figura 42A). La uridina és l'únic nucleòsid transportat pels tres hCNTs, de manera que analitzant-ne l'entrada es podria determinar si hi havia un augment del transport concentratiu. Tal i com s'observa en la figura, el transport concentratiu de les HT-29 és pràcticament nul, ja que es va detectar només 1pmol d'uridina radioactiva per mg de proteïna i per minut. Ara bé, el transport d'uridina tendia a augmentar després del tractament amb SAHA, tant a les 4 com a les 6 hores, i amb les dues dosis testades. L'augment era superior i significatiu per a 6 hores de tractament. Cal recordar que l'efecte de SAHA és inhibir els enzims HDAC, els quals al seu torn produeixen canvis en l'acetilació d'histones. Com a conseqüència es produeix una remodelació de la cromatina, s'afavoreix la transcripció i els mRNA dels transportadors concentratius de nucleòsids han de ser processats, traduïts i la proteïna s'ha d'inserir a la membrana plasmàtica. Podria ser que 4 hores de tractament no fossin suficients per a que tingués lloc tot aquest procés, i per tant s'observessin més canvis a les 6 hores. Es va realitzar una assaig de transport per tal de comprovar si a temps més llargs hi havia més internalització d'uridina, en HT-29 tractades amb SAHA durant 12 i 18 hores. En aquest cas, el transport detectat va ser nul (gràfic no inclòs), de manera que es va decidir mantenir els temps de 4 i 6 hores. A continuació es va voler determinar quin era el transportador concentratiu responsable de l'increment d'entrada d'uridina a les 6 hores. Amb aquest objectiu es va realitzar un nou assaig de transport amb uridina tritiada, però en aquest cas es van incloure els paràmetres citidina i guanosina fredes a 100µM. El nucleòsid fred competeix amb el radioactiu per entrar a les cèl·lules a través dels transportadors, i com que la concentració és 100 vegades superior bloqueja l'entrada de la uridina radioactiva. Així doncs, l'addició de citidina freda bloqueja hCNT1 i hCNT3, els dos transportadors que la internalitzen; per tant, el valor d'activitat en presència de citidina freda correspon a hCNT2. En canvi, la guanosina bloqueja hCNT2 i hCNT3, i per tant l'activitat d'aquesta condició correspon a hCNT1. Els resultats de la cis-inhibició mitjançant nucleòsids freds van ser inconclusius (Figura 42B).

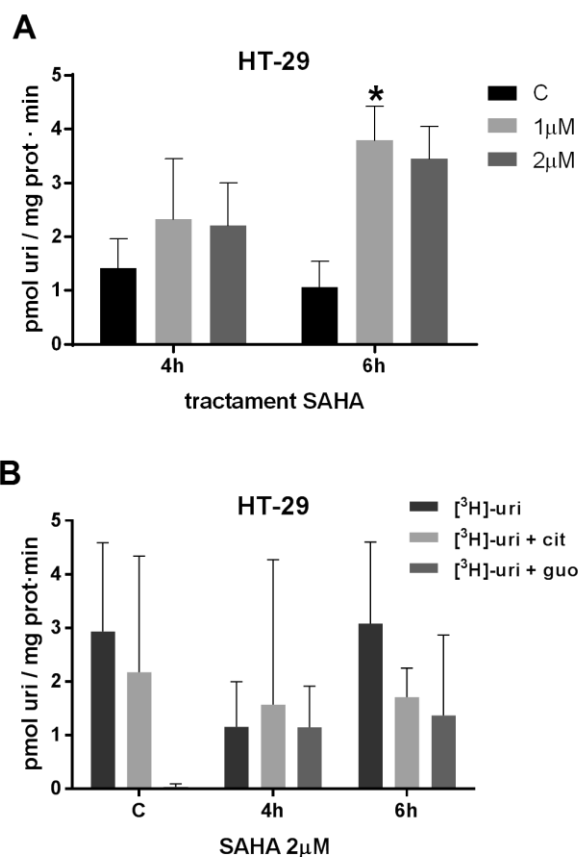


Figura 42. Modulació de l'activitat de transport concentratiu de nucleòsids a HT-29. (A) L'activitat dels hCNTs es va mesurar mitjançant l'entrada d'uridina tritiada a les cèl·lules, calculada a partir de la diferència de valors entre un medi ric en sodi i un medi ric amb colina. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm SEM (n=3). La significació estadística es va determinar mitjançant test t-Student aparellat; * indica la comparativa amb el control (* p<0.05). (B) Activitat dels hCNTs mesurada de la mateixa manera que en el panell A, però s'afegeixen els nucleòsids freds a concentració 100μM indicats per a realitzar la cis-inhibició dels transportadors. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm SEM (n=3).

A continuació es va procedir a intentar mesurar l'activitat a CP15T. És una línia cel·lular d'origen tumoral, com HT-29, però el *background* i el teixit originals són diferents. A més, s'havien observat tendències d'increment d'expressió d'hCNT1 i hCNT2 superiors respecte HT-29 (Figura 37), tot i no ser significatives. En aquest punt ja s'havia descartat hCNT3, i el paper d'hCNT2 en oncogènesi era dubtós. Per tant, es va procedir a intentar mesurar la internalització de citidina tritiada a CP15T tractades amb SAHA durant 4 i 6 hores. Es va confirmar que el transport basal de citidina en aquesta línia cel·lular era zero, i el tractament de SAHA va mostrar un increment de l'entrada de nucleòsid radioactiu a les cèl·lules, significatiu a les 6 hores (Figura 43). Per tant, aquest model semblava indicar que SAHA incrementava l'activitat d'hCNT1. Es va descartar que hCNT3 pogués jugar algun paper, donat que l'mRNA romaní invariable amb el tractament de SAHA (Figura 37). Caldria, però, afegir una cis-inhibició amb guanosina per tal de confirmar el paper d'hCNT1 i no hCNT3 en l'increment de translocació de la citidina a CP15T.

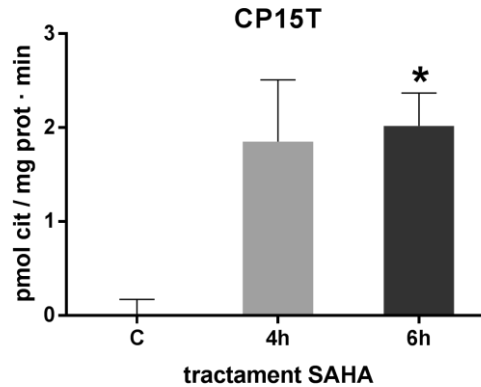


Figura 43. SAHA incrementa la internalització de citidina mitjançant transportadors concentratius de nucleòsids a CP15T. Les cèl·lules van ser sembrades i l'endemà tractades amb SAHA 8 μ M durant 6 hores. L'activitat dels hCNTs es va mesurar mitjançant l'entrada de citidina tritiada a les cèl·lules, calculada a partir de la diferència de valors entre un medi ric en sodi i un medi ric amb colina. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm SEM (n=3). La significació estadística es va determinar mitjançant T-test aparellat; * indica la comparativa amb el control (* p<0.05).

Els transportadors de nucleòsids tenen capacitat d'internalitzar a les cèl·lules anàlegs de nucleòsids, alguns dels quals són emprats en clínica com a fàrmacs antitumorals o antivirals (Minuesa et al. 2011; Jordheim et al. 2013). Es va decidir aprofitar aquesta capacitat per avaluar si l'efecte de SAHA sobre l'expressió dels transportadors es traduïa en un augment d'entrada d'anàleg de nucleòsid. Així doncs, es va procedir a efectuar assajos de citotoxicitat d'un tractament amb dosis creixents del fàrmac antitumoral combinat amb un pre-tractament amb SAHA i comparat amb cèl·lules control que no havien estat pre-tractades. Es va escollir gemcitabina, ja que és un dels anàlegs de nucleòsids més emprats en clínica i a més hCNT1 és un dels transportador que participen de la seva internalització. Tanmateix, la gemcitabina també és transportada per hENT1 i en certa mesura per hENT2. Per tant, es va afegir dipiridamol, un inhibidor dels hENTs, amb l'objectiu d'analitzar el paper d'hCNT1. La primera aproximació de tractament es va realitzar a HT-29 seguint dues estratègies. La primera va consistir en pre-tractar les cèl·lules amb SAHA 2 μ M i a les 6 hores tractar-les amb dosis creixents de gemcitabina, del rang nanomolar, durant 72 hores (Figura 44A). L'únic punt en què es podria intuir menys supervivència amb el pre-tractament amb SAHA comparat amb el seu control seria a 10nM de gemcitabina, però a la resta no es van observar diferències. Per aquest motiu es va optar per fer un tractament amb dosis més altes de gemcitabina durant 24 hores (Figura 44B). En cap punt es va detectar menys supervivència degut a l'efecte de SAHA; de fet, es podia intuir un cert augment – contrari al que s'esperaria.

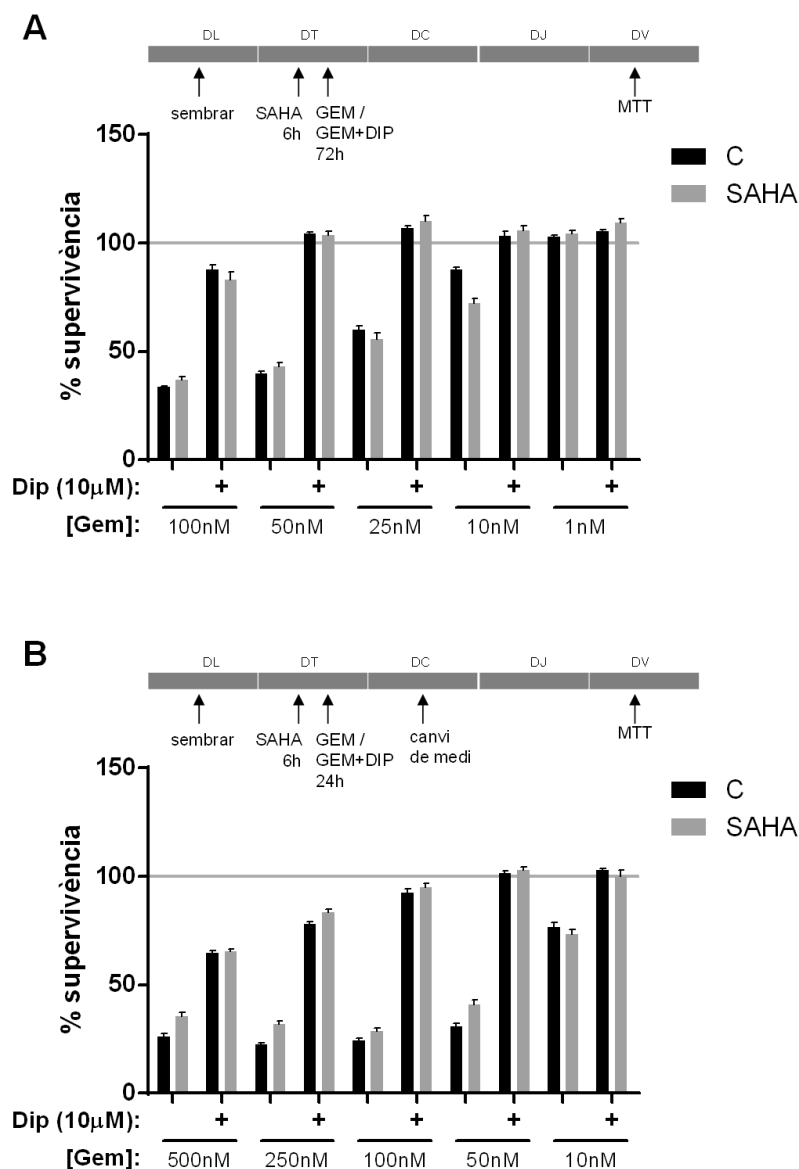


Figura 44. La citotoxicitat de gemcitabina no es veu incrementada per acció d'un pre-tractament amb SAHA. Assaig de citotoxicitat a cèl·lules HT-29 després de la combinació de SAHA (2µM) i gemcitabina (indicat), en presència i absència de dipiridamol. Els resultats corresponen a un sol experiment en cada cas. Les barres indiquen la mitjana de 5 duplicats intraexperimental i el corresponent error. Els valors estan referits a un control sense tractament, indicat amb la línia horitzontal al 100%. (A) El tractament de gemcitabina o gemcitabina i dipiridamol es va deixar en contacte amb les cèl·lules durant 72 hores, moment en què es va realitzar l'assaig MTT. (B) El tractament de gemcitabina o gemcitabina i dipiridamol va ser de 24 hores, després de les quals es va canviar el medi. 48 hores després es va realitzar l'assaig MTT.

La següent estratègia va ser incrementar les dosis de gemcitabina durant un període molt curt de temps com és 90 minuts. El motiu pel qual es va decidir seguir aquesta estratègia era el perfil d'expressió dels transportadors després del tractament de SAHA: l'augment d'expressió d'hCNT1 a les 4 i 6 hores era significativa, mentre que a les 12-24 hores era més variable, fins i

tot semblaria mostrar una tendència a disminuir (Figura 37 i 38). Per tant, si després del pic d'expressió a les 6 hores no es mantenia la quantitat d'hCNT1, es va optar per afegir més gemcitabina coincidint amb aquesta fase de pic, i comprovar si SAHA n'augmentava l'efecte citotòxic. Aquest assaig es va realitzar tant per HT-29 com per CP15T. En cap dels casos s'observa sinèrgia entre el pre-tractament amb SAHA i el tractament amb gemcitabina (Figura 45).

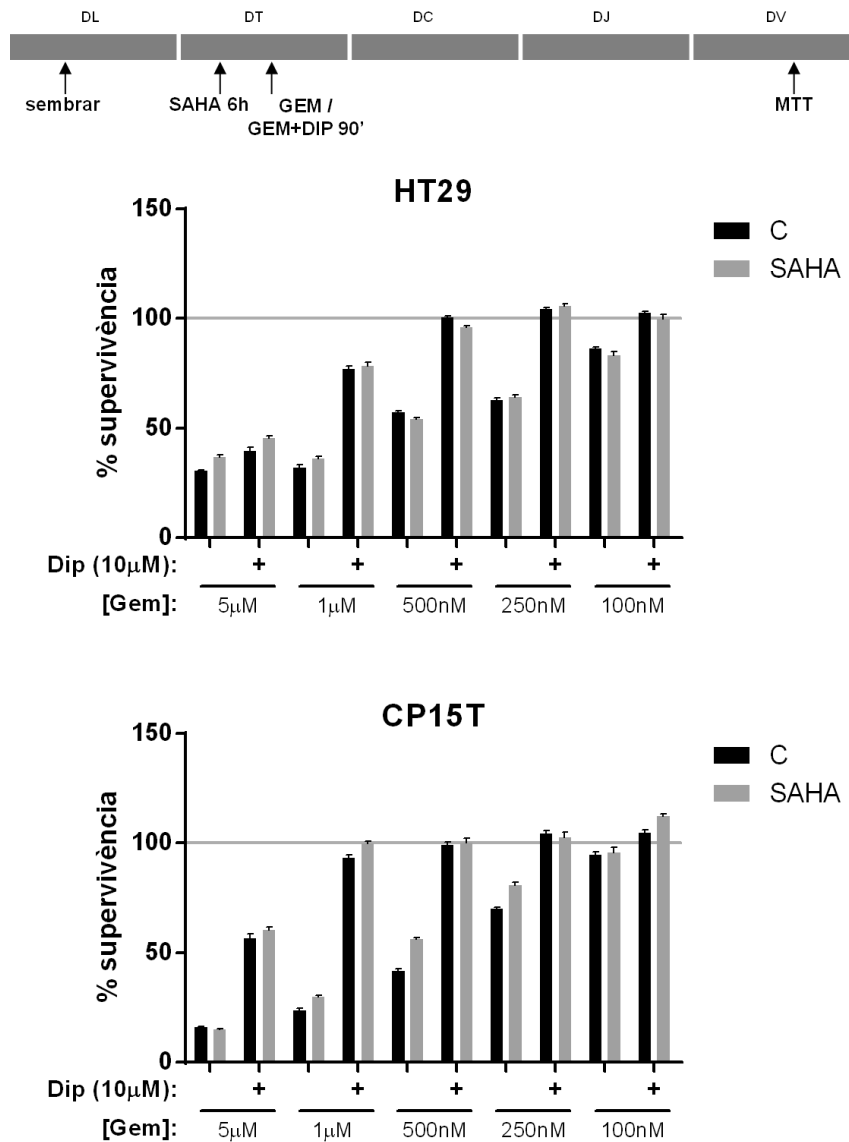


Figura 45. SAHA no augmenta el potencial citotòxic de la gemcitabina. Assaig de citotoxicitat a cèl·lules HT-29 i CP15T després de la combinació de SAHA (2µM a HT-29 i 8µM a CP15T) i gemcitabina, en presència i absència de dipiridamol. El pre-tractament de SAHA va ser de 6 hores. El tractament de gemcitabina o gemcitabina i dipiridamol va durar 90 minuts. 72 hores després es va realitzar l'assaig MTT. Resultats corresponents a un sol experiment. Les barres indiquen la mitjana de 5 rèpliques intraexperimentals ± SEM. Els valors estan referits a un control sense tractament, indicat amb la línia horitzontal al 100%.

En resum, els resultats d'mRNA semblaven indicar que SAHA incrementava l'expressió dels transportadors concentratius de nucleòsids, i aquest augment es traduïa en increment d'activitat de transport concentratiu, tant a HT-29 com a CP15T. Tanmateix, aquest augment d'activitat era petit i potser no era suficient per reflectir-se en un efecte sinèrgic sobre la citotoxicitat de gemcitabina. A més, cal tenir en compte que que l'efecte de la gemcitabina no depèn únicament de la seva entrada a la cèl·lula, sinó que ha de ser activada i també pot ser detoxificada. Les alteracions de l'epigenoma conseqüents al tractament amb SAHA poden propiciar canvis en l'expressió dels gens relacionats amb l'efecte de la gemcitabina. Dins aquests gens hi ha candidats com la bomba d'extrusió *Multidrug Resistance-associated Protein 5* (MRP5), la qual ha estat relacionada amb resistència a la gemcitabina, les 5-nucleotidases encarregades d'inactivar la gemcitabina, o els enzims que la fosforilen per tal d'activar-la, com són la Timidina Quinasa 2 (TK2) o la deoxiCitidina Quinasa (dCK) (Schnekenburger et al. 2014). S'havia descrit que SAHA no induïa l'expressió d'MDR ni MRP1 en altres models cel·lulars (Fedier et al. 2007). Per tant, es va comprovar l'efecte del tractament amb SAHA sobre l'expressió de dCK en unes mostres d'HT-29 prèviament analitzades. Es va detectar una disminució d'aquest gen en resposta al tractament amb SAHA, en totes les condicions testades (Figura 46). Per tant, si dCK disminueix, la citotoxicitat de la gemcitabina també es veuria compromesa, i això podria ser un motiu pel qual no s'ha detectat increment de la citotoxicitat de la gemcitabina després de pre-tractar les cèl·lules amb SAHA.

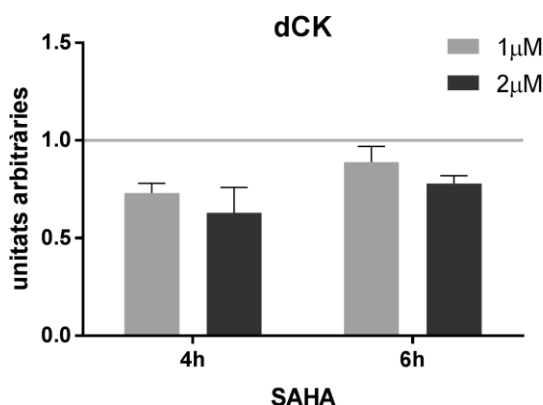


Figura 46. L'expressió de l'enzim dCK sembla disminuir en resposta al tractament amb SAHA. Anàlisi de l'expressió d'mRNA després de 4 i 6 hores de tractament amb SAHA, en comparació amb la condició control indicada amb la línia horitzontal. Es representa la mitjana \pm SEM de les rèpliques d'un sol experiment.

Així doncs, s'ha demostrat que SAHA incrementa l'expressió dels transportadors de nucleòsids a temps curts tot i que tan sols s'ha detectat un petit increment d'activitat en totes les

estratègies seguides. Els models emprats són línies tumorals a les quals no s'expressen els transportadors concentratius de nucleòsids, probablement degut a una combinació d'elements reguladors que en el context tumoral en reprimeixen l'expressió. SAHA podria estar revertint el possible silenciament gènic degut a la presència de marques d'histones repressores associades als gens *SLC28A1* i *SLC28A2*, però cal tenir en compte altres elements que podrien participar de la regulació d'expressió dels transportadors. Fins el moment s'ha descrit que HNF4 α regula l'expressió d'hCNT1 en diferents models (Fernández-Veledo et al. 2007; Klein et al. 2009), però és probable que altres factors de transcripció hi participin. Caldria comprovar si aquests elements reguladors mantenen l'expressió típica de teixit en les línies tumorals, o si bé també disminueixen durant el procés carcinogènic. S'ha observat que la inhibició de la funció d'HNF4 α és un dels processos destacats en el desenvolupament d'hepatocarcinoma (Seshachalam et al. 2018). Si aquest factor de transcripció és indispensable per a l'expressió d'hCNT1 en altres teixits, com pàncrees i còlon, es podria suggerir que la inhibició de les histones desacetilases no seria suficient per a restituir la funció d'aquest transportador de pirimidines.

Per altra banda, tampoc es va detectar efecte sinèrgic en la citotoxicitat de gemcitabina en condicions de pre-tractament amb SAHA. La gemcitabina és internalitzada per hCNT1, hCNT3, hENT1 i hENT2 (Mackey et al. 1999; Hu et al. 2006; Govindarajan et al. 2009). De tots aquests, només l'expressió d'hCNT1 a nivell d'mRNA augmentava en condicions de tractament amb SAHA. hENT1 i hCNT3 semblaven mantenir-se invariables, mentre que hENT2 tendia a disminuir. SAHA incrementava el transport dependent dels hCNTs, tot i que de forma subtil. Per tal de descartar un possible emmascarament de l'efecte per hENTs, es va decidir afegir dipiridamol a les condicions d'assajos de citotoxicitat. En presència d'aquest inhibidor la supervivència de les cèl·lules era superior que en absència (Figures 44 i 45), deixant intuir que els hENTs eren mediadors de molta part de l'efecte citotòxic de la gemcitabina. Tot i no haver vist canvis d'expressió, es va optar per a comprovar si SAHA produïa algun canvi en l'activitat dels transportadors equilibratius de nucleòsids, i per tant es va mesurar l'activitat específica dels hENTs en absència i presència de dipiridamol. Va resultar que a les 4 hores el transport era invariable, però a les 6 hores s'observava una disminució lleugera però significativa de l'activitat dels hENTs (Figura 47). 6 hores és el temps de pre-tractament emprat per a les citotoxicitats combinades, així que podria ser que aquesta reducció del transport es reflectís amb major supervivència de les cèl·lules pre-tractades amb SAHA. De fet, si es reanalitzen les Figures 44 i 45 es pot veure com en alguns punts les cèl·lules que van estar amb contacte amb SAHA no morien tant com els respectius controls.

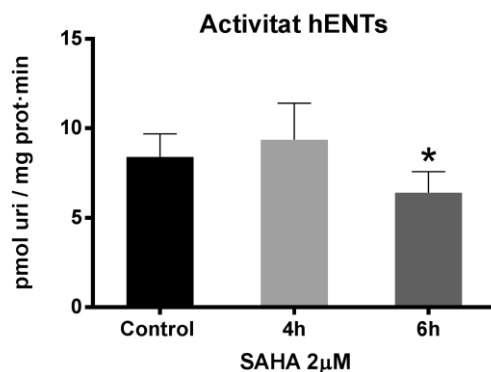


Figura 47. La internalització d'uridina a través dels transportadors equilibratius de nucleòsids és disminuïda per acció del tractament amb SAHA. L'activitat dels hENTs es va mesurar mitjançant l'entrada d'uridina tritiada a les cèl·lules, calculada a partir de la diferència de valors entre dos medis colina, un dels quals conté l'inhibidor dipiridamol a 10µM. Els resultats s'expressen com a mitjana ± SEM (n=3 per a 4h, n=6 per a 6h). La significació estadística es va determinar mitjançant T-Test aparellat; * indica la comparativa amb el control (* p<0.05).

Així doncs, el fàrmac epigenètic SAHA ha estat una eina que ha permès relacionar per primera vegada els transportadors de nucleòsids amb l'estatus epigenètic de les cèl·lules. Caldria elucidar el mecanisme a través del qual SAHA incrementa l'expressió dels transportadors, donat que hi podria haver múltiples factors implicats, com ara factors de transcripció o microRNAs que intervenen en l'expressió dels transportadors concentratius de nucleòsids. L'expressió dels transportadors de nucleòsids en cèl·lules polaritzades està associada a diferents regions, ja que els hCNTs s'expressen a la cara apical i els hENTs a la membrana basolateral. Per aquest motiu, caldria revisar les condicions experimentals i emprar altres tècniques que simulin millor el teixit tumoral. Seria el cas del cultiu 3D amb esferoides, un mètode basat en emprar plaques de baixa adhesió en les quals les cèl·lules no s'adhereixen en el suport sinó que formen un esferoide al centre. Aquest model presentaria estructura tridimensional, la qual és important per a l'estudi dels transportadors, ja que s'ha descrit que els transportadors concentratius de nucleòsids s'insereixen al domini apical de les cèl·lules polaritzades (Mangravite et al. 2001; Mangravite et al. 2003; Errasti-murugarren et al. 2007). La inserció correcta del transportador al domini pertinent potser afavoriria l'activitat dels hCNTs en aquest sistema, i per tant es podria determinar si SAHA indueix un increment de la internalització de nucleòsids mediada per aquests transportadors.

4. Regulació transcripcional d'*SLC28A1* i *SLC28A2*

Els transportadors concentratius de nucleòsids presenten el mateix origen evolutiu, tal i com demostra l'existència de transportadors concentratius en organismes procariotes o eucariotes inferiors. Tanmateix, en mamífers van aparèixer els tres gens que codifiquen cadascun dels hCNTs, probablement degut a un fenomen de divergència gènica. El transportador més semblant als ortòlegs procariotes és CNT3, mentre que CNT1 i CNT2 presenten major homologia entre si (Young et al. 2013). Aquest fenomen de divergència va lligat a la complexitat de l'organisme. Per tant, és lògic pensar que la regulació de l'expressió de cadascun dels gens també serà més complexa, i diferent entre si. Fins el moment s'han descrit alguns dels mecanismes implicats en la regulació dels tres transportadors concentratius de nucleòsids – detallats en l'apartat 2.3.2 de la Introducció. Breument, s'han descrit alguns elements que participen de la regulació de l'expressió dels CNTs en diferents models. Per a CNT1 hi ha TNF α , IL-6, HNF4 α i àcids biliars (Fernández-Veledo et al. 2004; Fernández-Veledo et al. 2007; Klein et al. 2009). Per a CNT2 hi ha TGF β , àcids biliars, C/EBP α , HNF3 γ i la hipòxia (Fernández-Veledo et al. 2006; Valdés et al. 2006; Fernández-Veledo et al. 2007; Medina-Pulido et al. 2013); a part, s'ha descrit que alguns polimorfismes presents en el seu promotor alteren la capacitat d'unió dels factors de transcripció HNF1 α i HNF1 β (Li et al. 2009; Yee et al. 2009). En aquesta mateixa tesi s'ha demostrat que l'epigenètica també juga un paper en la regulació dels gens *SLC28A1* i *SLC28A2*, tot i que falta determinar el mecanisme.

La disminució d'expressió dels transportadors concentratius de nucleòsids en càncer, especialment hCNT1, deixa intuir que els factors que en regulen l'expressió varien d'alguna manera durant la carcinogènesi. Entendre quins factors regulen els gens de la família *SLC28* seria el primer pas per elucidar els mecanismes de pèrdua d'expressió durant la carcinogènesi, i per tant provar de revertir-los per restituir la funció dels transportadors concentratius de nucleòsids.

Així doncs, l'objectiu d'aquest apartat és estudiar els gens *SLC28A1* i *SLC28A2* per tal d'identificar-ne les regions promotores i els factors de transcripció que participen de la seva regulació.

4.1 Determinació de la regió promotora dels gens *SLC28A1* i *SLC28A2*

A la bibliografia hi ha referències sobre els promotors putatius dels gens *SLC28A1* i *SLC28A2*. En el treball de Klein et al. es defineix el promotor d'*SLC28A1* com la regió compresa entre -2450 parells de base fins +110, respecte l'inici de transcripció. Ells mateixos van identificar l'inici de

transcripció mitjançant 5'-RACE (Klein et al. 2009). Tanmateix, dades actualitzades del GenBank sobre el gen *SLC28A1* (referència NM_004213.5) situen el lloc d'inici de transcripció 7 parells de bases després de l'indicat per Klein et al. Per altra banda, els dos treballs que identifiquen el promotor d'*SLC28A2* discrepen en la regió que consideren promotora. Li et al. consideren que el promotor s'estén des de -1072pb fins a +16 respecte l'inici de transcripció (Li et al. 2009). En canvi, Yee et al. acoten la regió *upstream* i allarguen la *downstream*, de manera que consideren promotor des de -265bp fins +100 (Yee et al. 2009).

L'estratègia seguida en aquesta tesi va ser una mica diferent. Es va voler analitzar una zona molt àmplia al voltant de l'inici de transcripció, que comprenia fins a 10kb *upstream* de l'inici de transcripció i fins l'ATG en el cas d'*SLC28A1* (Cromosoma 15, 84.875.424 – 84.887.803) i des de 5kb *upstream* fins a l'ATG per *SLC28A2* (Cromosoma 15, 45.247.260 – 45.253.216). Les seqüències de referència es van obtenir del GenBank. Es van realitzar anàlisis amb el software MatInspector (Genomatix, Intrexon Bioinformatics Germany GmbH – descripció a Cartharius et al. 2005). Els resultats van ser proporcionats en forma de taules en què s'indicaven paràmetres com la matriu (família gènica), informació sobre la matriu, el teixit en què s'ha identificat i la seqüència d'unió. El primer criteri per a distingir quins factors de transcripció podrien ser rellevants va ser que s'expressessin en teixits del tracte gastrointestinal, fetge o pàncrees, ja que són els òrgans i teixits en què hCNT1 i hCNT2 s'expressen més. Per hCNT1 es va mirar també ronyó. Per últim, es van tenir en compte tots aquells factors de transcripció d'expressió ubíqua.

4.1.1 Promotor d'*SLC28A1*

El primer anàlisi dels resultats del MatInspector va destacar tres zones denses en factors de transcripció variats que s'expressen a fetge, pàncrees i teixits gastrointestinals. Aquestes zones se situaven al voltant de -6kb respecte l'inici de transcripció (TSS), -2,6kb i -1,2kb. Es va decidir dissenyar diferents construccions que compreguessin aquestes zones de manera diferencial, per tal de distingir quina presentava major activitat. A més, es va incloure la seqüència entre TSS i ATG, ja que també presentava zones reguladores. Com que la distància TSS-ATG és superior a 3kb, es va decidir incloure un punt a +746pb per acotar les regulacions més properes al TSS. Per tant, les construccions 4-9 presentaven 2 punts d'inici diferents i 3 punts de final diferent: -2,4kb i -1kb aproximadament per l'inici, i TSS, +746pb i ATG pel final (Figura 48). Totes elles es van clonar en el sistema de vectors de luciferasa pGL3 bàsic.

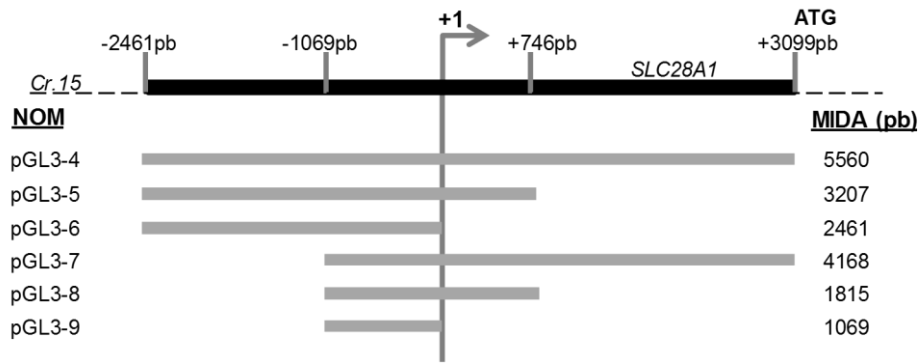


Figura 48. Esquema representatiu del locus del gen *SLC28A1* i construccions del promotor putatiu clonades. S'indica amb +1 el lloc d'inici de transcripció (TSS), al qual es refereixen les valors de distància en parells de base. S'inclouen els esquemes corresponents a les construccions 4-9 juntament amb la mida mesurada amb parells de bases.

La primera prova d'assaig luciferasa es va realitzar a la línia cel·lular derivada de càncer colorectal HT-29 (Figura 49). Cadascuna de les construccions va mostrar menys activitat que el control, que és el vector pGL3 bàsic buit. Això podria ser degut a què en teixit colorectal hCNT1 no s'expressa amb la mateixa abundància que en altres teixits, com fetge. Tanmateix, part del treball de Klein et al. va realitzar a CaCo-2, que tenen origen similar a HT-29, i ells sí que van detectar activitat (tot i que la mostren en unitats relatives al que consideren promotor total).

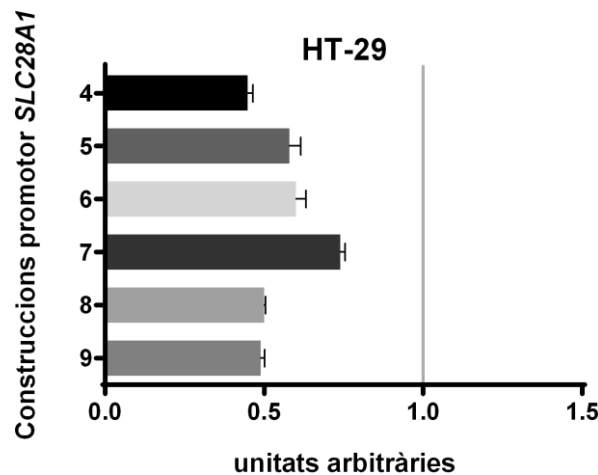


Figura 49. Les construccions dissenyades pel promotor putatiu d'*SLC28A1* no presenten activitat luciferasa. Activitat relativa de les construccions 4-9 respecte el vector pGL3 bàsic buit, representat amb una línia vertical. L'endemà de la sembra de les HT-29, les construccions van ser co-transfectades juntament amb el vector pRL-TK, el qual serveix de control endogen de la transfecció. A les 48 hores es va procedir a lissar les cèl·lules i mesurar l'activitat luciferasa (vector pGL3) i renilla (vector pRL-TK). El quocient entre ambdues activitats correspon a l'activitat del fragment del promotor. Les dades corresponen a un sol experiment, i les barres representen la mitjana \pm SEM de les rèpliques intraexperimentals.

Per tant, el següent pas va ser incloure un panell de línies cel·lulars d'origen divers per a testar les construccions. Es va mantenir HT-29 com a línia derivada de càncer colorectal i es van afegir CP15T, derivada d'adenocarcinoma ductal pancreàtic, Huh7, derivada d'hepatocarcinoma, i HepG2, derivada d'hepatoblastoma. També es van limitar les construccions testades a només la 7, la 8 i la 9 (Figura 50A). El lloc d'unió d'HNF4 α es troba entre -38 i -56pb respecte el TSS. Totes les construccions testades contenien aquesta regió, així que s'esperaria certa activitat deguda a HNF4 α . Els resultats van indicar que les construccions 7, 8 i 9 no presentaven activitat per a les línies HT-29 i CP15T (Figura 50B). De fet, que el valor fos inferior a pGL3 bàsic indicaria la participació de factors repressors. En canvi, Huh7 i HepG2 sí que presentaven certa activitat de les construccions 7 i 9, però no de la 8 (Figura 50B).

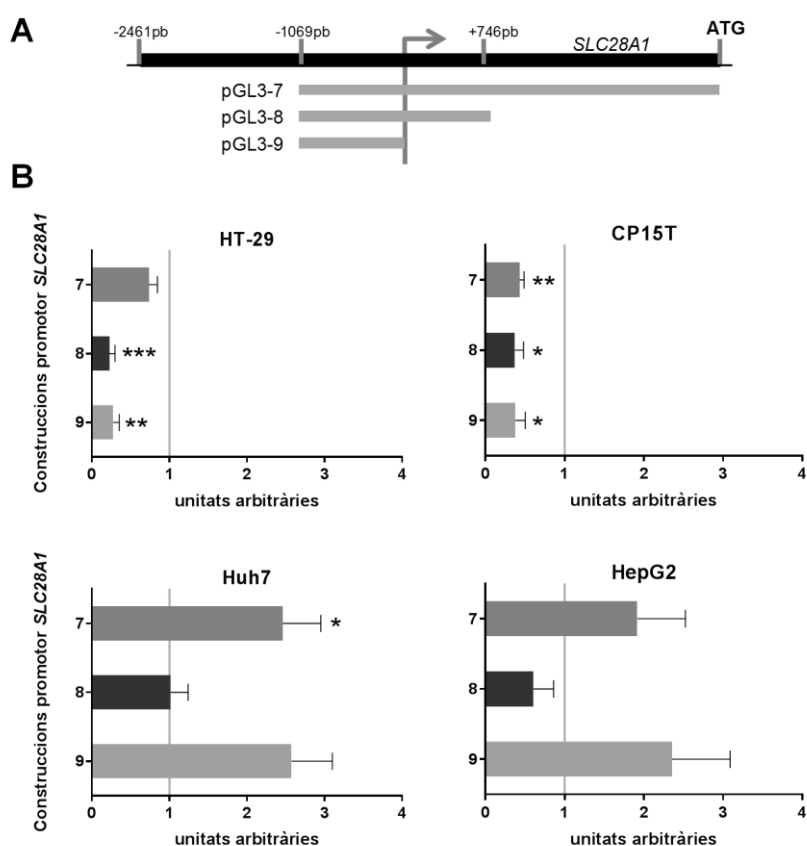


Figura 50. L'activitat de les construccions del promotor d'*SLC28A1* depèn del *background* cel·lular. (A) Esquema representatiu de les construccions testades. (B) Activitat de les construccions 7, 8 i 9 a les línies HT-29, CP15T, Huh7 i HepG2. Les cèl·lules van ser sembrades i l'endemà co-transfectades amb el vector de cadascuna de les construccions i pRL-TK. A les 48 hores es van lisar les cèl·lules i es van mesurar les activitats luciferasa i renilla, a partir de les quals es van calcular les *ratios* d'activitat de les construccions. Cada activitat està relativitzada al control, pGL3 bàsic buit, indicat amb una línia vertical. Les barres representen la mitjana \pm SEM d'experiments independents (n=3-6). L'estadística es va mesurar mitjançant un test t-Student per a mostres aparellades entre construcció i control, amb significació *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005.

La diferència entre les línies podria ser deguda a l'origen tissular de les diferents línies cel·lulars. Huh7 i HepG2, tot i ser derivades de tipus de tumors diferents, són originàries de fetge. S'ha descrit que aquest òrgan, juntament amb duodè i intestí prim, presenta l'expressió d'hCNT1 més alta (Figura 8). Es podria suggerir que tot i ser línies tumorals, Huh7 i HepG2 probablement expressin més factors implicats en l'expressió d'hCNT1, com ara HNF4 α . Ara bé, els resultats van mostrar que la construcció 8 no presentava activitat a Huh7 i estava reprimida a HepG2. La diferència entre la 8 i la 9 són els 746 parells de base de després del TSS presents en la construcció 8. Això indicaria que aquest *locus* presenta alguna zona repressora capaç de revertir l'activitat de la construcció 9. Per altra banda, la construcció 7 també conté aquesta zona repressora, però sí que es va detectar activitat a nivells semblants que la construcció 9. Això donaria peu a pensar que entre +746 i l'ATG hi ha zones activadores que revertirien la repressió del fragment TSS-746.

Els resultats obtinguts van propiciar un segon anàlisi del promotor putatiu d'*SLC28A1*. Aquest cop també es va incloure dades del projecte Ensembl, el qual indica el promotor per defecte d'un gen mitjançant l'anàlisi de paràmetres habituals dels promotors de mamífers. Les dades proporcionades per Ensembl van revelar que el promotor d'*SLC28A1* seria un fragment de 400 parells de bases situat 1695 parells de base *downstream* respecte el TSS. Per aquest motiu es van redissenar els fragments del promotor per tal d'incloure fragments escalats de la zona *downstream*. També es va decidir descartar les construccions 4-6, ja que l'estudi es va centrar en el *locus* que comprèn el TSS fins l'ATG, així com la regió immediatament abans del TSS. Així, es va mesurar l'activitat d'un total de 8 fragments, 5 nous respecte els anteriors (Figura 51).

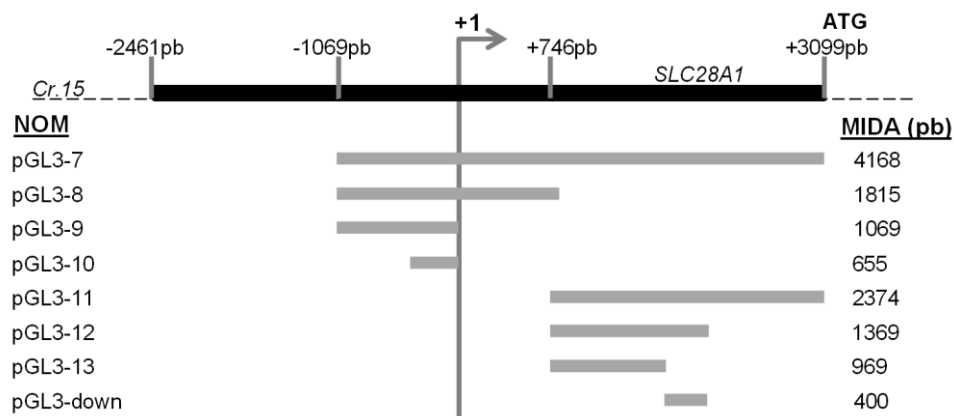


Figura 51. Esquema de les noves construccions clonades del promotor putatiu d'*SLC28A1*. S'indica amb +1 el lloc d'inici de transcripció (TSS), al qual es refereixen les valors de distància en parells de base. S'inclouen els esquemes corresponents a les construccions 7-13 i down juntament amb la mida de cadascun.

En primer lloc es va afegir el fragment 10, comprès entre -660pb i TSS, amb l'objectiu de comprovar si l'activitat augmentava en comparació de la construcció 9, ja que preserva el lloc d'unió d'HNF4 α . Després es van dissenyar 4 construccions per estudiar la zona que va de +746 fins a l'ATG. No es van dissenyar construccions des del TSS per tal d'evitar que les zones repressores emmascassin l'activitat dels nous fragments. Així doncs, es va clonar el fragment *down*, que correspon al promotor per defecte suggerit per Ensembl, i també els altres tres fragments, que presentaven el mateix inici a +746 però diferien en la mida.

Es va procedir a mesurar l'activitat de cadascun dels fragments a les diferents línies cel·lulars testades ja amb anterioritat: HT-29, CP15T, Huh7 i HepG2. Primer es van realitzar les proves amb les construccions 10 i 11 (Figura 52).

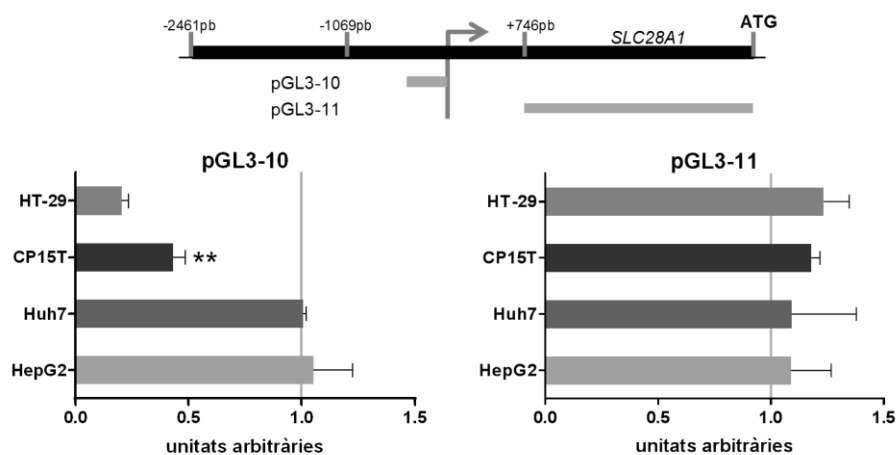


Figura 52. Activitat promotora dels fragments 10 i 11 a les línies HT-29, CP15T, Huh7 i HepG2. Les cèl·lules van ser sembrades i l'endemà co-transfectades amb el vector de cadascuna de les construccions i pRL-TK. Les cèl·lules es van lissar a les 48 hores i es van mesurar les activitats luciferasa i renilla per determinar l'activitat de cada fragment relativitzada al control pGL3 bàsic buit (línia vertical). Les barres representen la mitjana \pm SEM d'experiments independents (n=2-4). L'estadística es va mesurar mitjançant un test t-Student per a mostres aparellades entre construcció i control, amb significació $**p<0,01$.

El fragment 10 va demostrar no tenir activitat en les línies derivades de fetge, el qual contradeia la hipòtesi de l'activitat de la construcció 9 deguda a HNF4 α , ja que el lloc d'unió a aquest factor de transcripció també és present en el fragment 10. A les línies HT-29 i CP15T, en canvi, presentava menys activitat que el vector buit, el qual indicaria que presenta zones de repressió – és estadísticament significatiu a CP15T perquè es mostra el resultat de 3 experiments independents, mentre que el resultat d'HT-29 correspon només a 2 experiments. L'activitat d'aquest fragment 10 s'assembla a l'activitat de la construcció 9 a les mateixes línies cel·lulars (Figura 50), de manera que es podria deduir que el fragment diferent (entre -1069 i -660pb) no semblaria presentar cap lloc d'unió putatiu destacat per a factors de transcripció que s'expressin

a HT-29 i CP15T i que tinguin rellevància per a l'expressió d'hCNT1. Per altra banda, la construcció 11 no presenta activitat en cap de les línies testades. Si es compara amb les activitats dels fragments 7 i 9 a Huh7 i HepG2 es podria extreure la conclusió que la zona que confereix certa activitat promotora a aquests fragments es trobaria abans del TSS i no entre +746 i l'ATG.

A continuació es van analitzar la resta de construccions: 12, 13 i *down*, a les mateixes 4 línies cel·lulars (Figura 53). S'inclouen les dades ja mostrades de les construccions 7 i 9 per a poder comparar millor els diferents fragments de promotor.

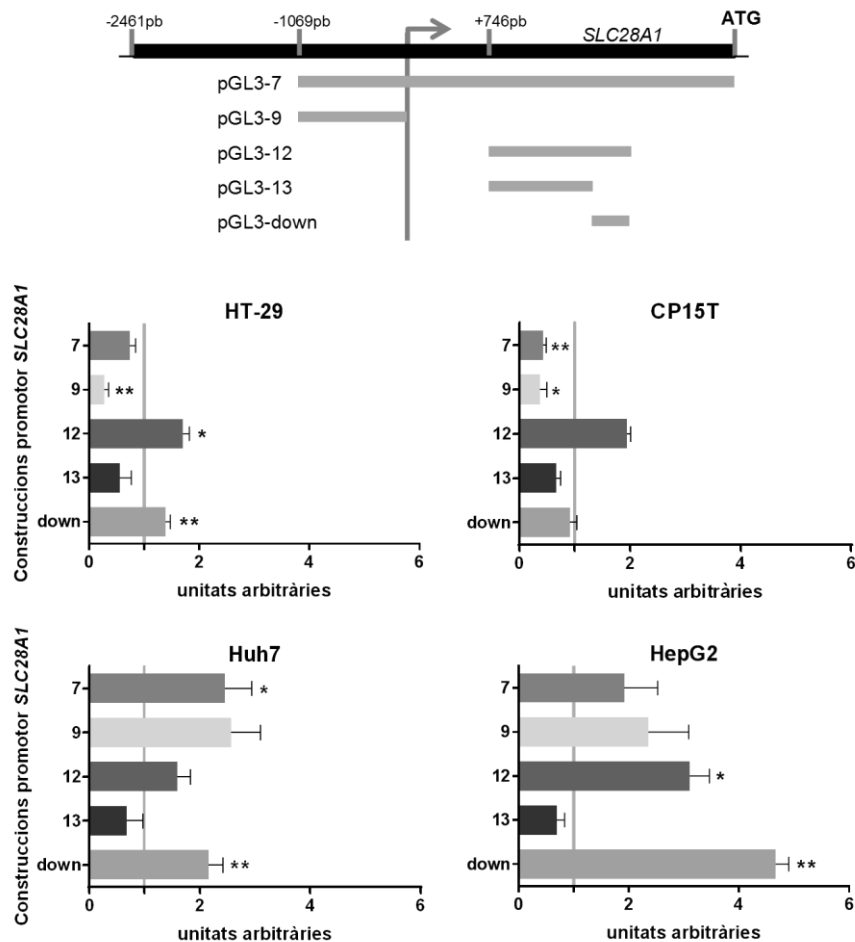


Figura 53. Les construccions 12 i *down* són les que presenten major activitat promotora, tot i que difereixen entre línies cel·lulars. Les cèl·lules es van lissar 72 hores després de ser sembrades i 48 hores després de ser transfectades amb els vectors pGL3 corresponents i pRL-TK. Es van mesurar les activitats de les construccions calculant la *ratio* entre luciferasa i renilla, i relativitzant-les al vector buit pGL3 bàsic (línia vertical). Les barres representen la mitjana \pm SEM d'experiments independents (n=2-6). L'estadística es va mesurar amb un test t-Student per a mostres aparellades entre construcció i control, amb significació *p<0,05, **p<0,01.

La construcció 12 presentava activitat a totes les línies cel·lulars en diferent mesura, mentre que el fragment 13 no en presentava en cap. El promotor per defecte *down* mostrava activitat variable segons la línia cel·lular, essent molt major a HepG2 que a CP15T. La diferència entre 12

i 13 és precisament el fragment *down*, i els resultats indicaven com en cadascuna de les línies l'omissió del *down* (13) reduïa totalment l'activitat del fragment 12, o fins i tot podia intuir-se una dominància de factors repressors. Així doncs, tal i com havia predit Ensembl, les proves van corroborar que el fragment *down* era rellevant per a l'expressió d'hCNT1. En comparar les activitats entre línies, es va observar que l'activitat del fragment 12 era força semblant en HT-29, CP15T i Huh7, mentre que a HepG2 era superior. Això podria suggerir que aquesta zona seria determinant per a l'expressió d'hCNT1 independentment del teixit – almenys en el context de línia cel·lular. Es podria especular, doncs, que s'hi uniria algun complex activador de la transcripció. Tanmateix, el valor més elevat d'activitat es va trobar en la construcció *down* a HepG2, sent els valors molt superiors a la resta de línies. L'origen de HepG2 és un hepatoblastoma, un tipus de tumor maligne hepàtic infantil força agressiu però amb pronòstic bastant favorable (Sharma et al. 2009). Els teixits infantils presentem un perfil d'expressió molt diferent als teixits adults, ja que encara no s'ha assolit la maduració dels òrgans. Per tant, la diferència d'activitat a HepG2 es podria explicar per l'origen peculiar d'aquesta línia cel·lular.

4.1.2 Promotor d'*SLC28A2*

En paral·lel a l'estudi del promotor d'*SLC28A1* es va realitzar l'estudi del promotor d'*SLC28A2*, seguint les mateixes estratègies. Els resultats del MatInspector van revelar una zona densa en llocs d'unió putatius a factors de transcripció al voltant d'1kb abans del TSS, coincidint amb l'inici del promotor segons Li et al. Per aquest motiu es van dissenyar 4 construccions diferents (1-4) per a estudiar una zona més àmplia a les publicades, ja que comprèn des de -3695pb fins a l'ATG (coincidint amb la construcció més llarga, 1) (Figura 54).

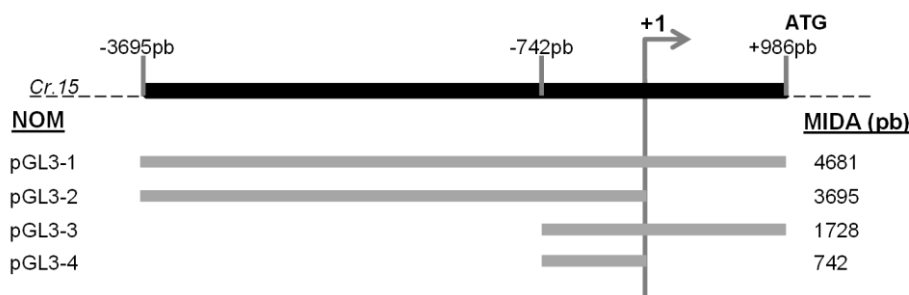


Figura 54. Esquema representatiu del locus del gen *SLC28A2* i construccions del promotor putatiu clonades. El +1 indica el lloc d'inici de transcripció (TSS), al qual es refereixen els valors de distància en parells de base. S'inclouen els esquemes corresponents a les construccions 1-4 juntament amb la mida de cadascuna d'elles mesurada amb parells de bases.

Es va analitzar l'activitat de les 4 construccions a les línies cel·lulars HT-29, Huh7 i HepG2 (Figura 55).

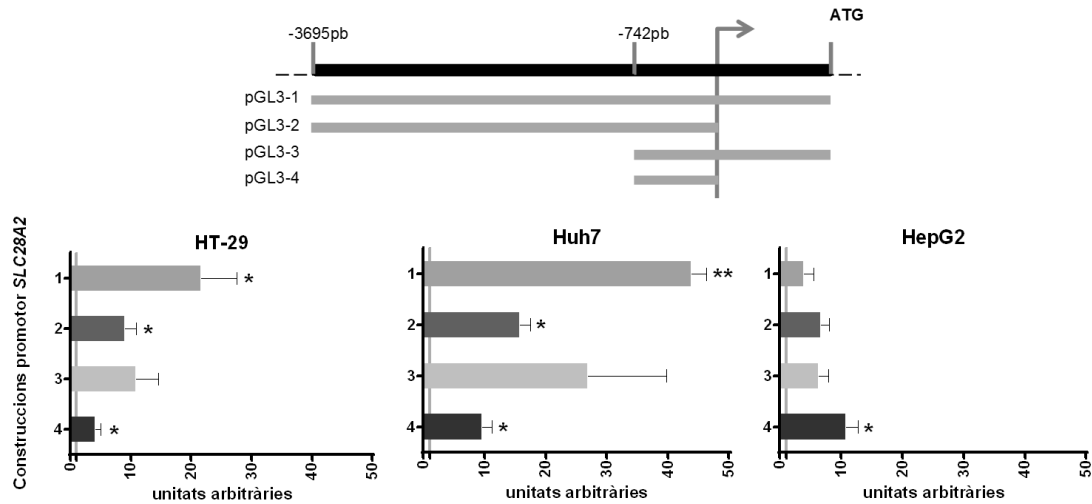


Figura 55. Les construccions del promotor putatiu d'SLC28A2 presenten activitat alta a HT-29 i Huh7, i menor a HepG2. Activitat relativa de les construccions 1-4 respecte el vector pGL3 bàsic buit, representat amb una línia vertical. L'endemà de la sembra les construccions van ser co-transfectades juntament amb el vector pRL-TK. 48 hores després es van lisar les cèl·lules i es va determinar l'activitat de cadascun dels fragments mitjançant la *ratio* entre luciferasa i renilla i posterior relativització al valor de pGL3 bàsic buit. Les barres representen la mitjana ± SEM d'experiments independents (n=4 per HT-29, n=3 per la resta). L'estadística es va mesurar amb un T-test per a mostres aparellades entre construcció i control, amb significació *p<0,05, **p<0,01.

El primer fet destacable va ser que l'activitat dels fragments presentava un ordre de magnitud superior a les activitats trobades pels fragments del promotor d'SLC28A1 vistes en l'anterior subapartat. Per tant, el promotor putatiu d'SLC28A2 sí que sembla que uneixi factors de transcripció activadors en aquestes línies tumorals. Comparant els perfils d'activitat entre línies, es va observar que HT-29 i Huh7 tenien un perfil molt semblant, en què les construccions posseïen més activitat en ordre 1-3-2-4. En canvi, el perfil de HepG2 era 4-3-2-1. A més, en comparar Huh7 i HepG2, ambdues d'origen hepàtic, l'única coincidència trobada era l'activitat del fragment 4, de valor 10 en tots dos casos. Es poden extreure varies conclusions d'aquests resultats. La primera està relacionada amb l'origen de HepG2. En aquest cas, però, semblaria que li manquen factors de transcripció activadors que tindrien llocs d'unió entre -3695pb i l'ATG, donat que les construccions 1 i 3 quasi no presenten activitat. Per tant, es podria hipotetitzar que aquests factors activadors estarien associats a teixit adult. En segon lloc, es pot concloure que entre el TSS i l'ATG hi ha elements activadors també, tal i com van demostrar les diferències d'activitat entre les parelles 1-2 i 3-4.

A partir d'aquest punt l'estudi es va centrar en SLC28A1 per la seva relació amb càncer.

4.2 Modulació de l'expressió del gen *SLC28A1* per factors de transcripció

4.2.1 Primer *screening*

Les dades d'activitat basal en diferents contextos del promotor putatiu d'*SLC28A1* van propiciar a l'anàlisi de quins factors de transcripció podrien estar jugant un paper en l'expressió d'hCNT1. El criteri, de nou, va ser comprovar l'efecte d'aquells factors de transcripció que s'expressen a teixit gastrointestinal, fetge i pàncrees. En primera instància se'n van destacar quatre: ING4, Ikaros, HNF1 α i HNF1 β . A més, es va afegir HNF4 α com a control positiu (Figura 56).

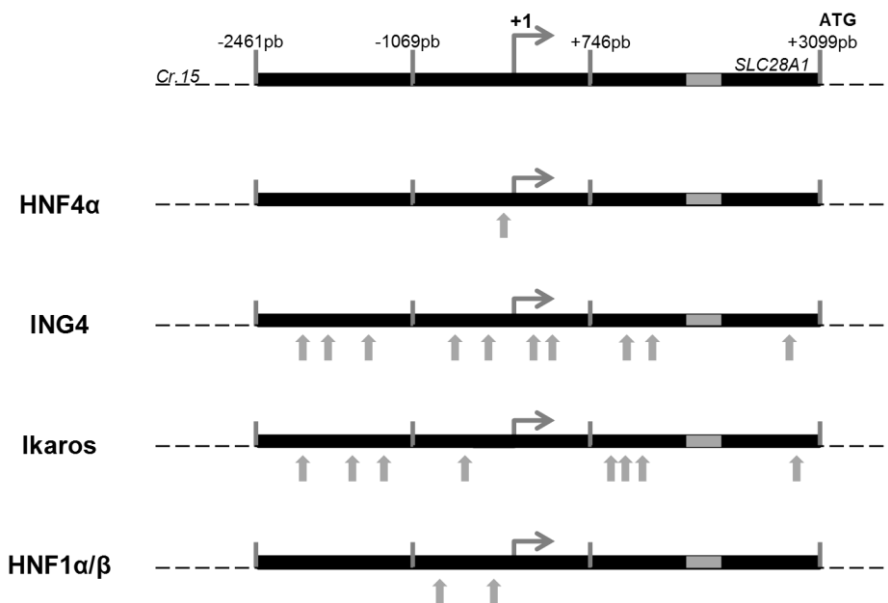


Figura 56. Esquema representatiu del promotor d'*SLC28A1* i els llocs d'unió putatius als factors de transcripció indicats. A la part superior es representa el locus en el cromosoma 15 del gen *SLC28A1*; el rectangle gris indica la seqüència corresponent al fragment *down* del promotor. Els llocs d'unió putatius dels factors de transcripció estan indicats mitjançant fletxes.

Breument:

- ING4. És un membre del complex HBO1, el qual té activitat acetil transferasa específica per a la histona H4 (dades UniProt). S'ha reportat la seva pèrdua en varis tumors, fins i tot relacionant-se amb pitjor prognosi (revisat a Guérillon et al. 2014). Se li han atorgat papers d'inhibició de la migració, cicle cel·lular i inducció de l'apoptosi, en algun cas a través de la seva interacció amb p53.
- Ikaros (IKZF1). La família gènica IKAROS està composta per cinc membres (IKZF1-5), els quals difereixen entre si en la funció d'unió al DNA – per exemple, IKZF4 és un dominant negatiu. IKZF1 és un factor de transcripció relacionat amb hematopoesi i diferenciació de limfòcits. Presenta una funció important com a remodelador de la cromatina mitjançant la seva interacció amb complexos que presenten HDAC (UniProt). IKZF1 és considerat un supressor

de tumors, ja que la seva pèrdua contribueix a la carcinogènesi en Leucèmia Limfocítica Aguda (ALL). A més, s'ha trobat deletat o mutat en un gran nombre de casos d'ALL pediàtrica i d'adult, i s'ha correlacionat la seva pèrdua a pitjor prognosi (Marke et al. 2018).

- HNF1 α i HNF1 β . Factors de transcripció de fetge que regulen un gran nombre de gens, però que també han estat identificats en altres teixits com pàncrees i ronyó (UniProt). La pèrdua d'expressió d'HNF1 α ha estat identificada com a factor de risc per càncer de pàncrees, ja que té un rol de supressor de tumors. HNF1 β interacciona amb HNF1 α i comparteixen via de senyalització. Ambdós han estat relacionats amb resistència a fàrmacs en varis càncers (Lu et al. 2019). A més, mutacions en el gen que codifica HNF1 β han estat relacionades també amb malformacions renals (Bockenbauer and Jaureguiberry 2016).

Amb l'objectiu d'elucidar el paper de tots aquests factors de transcripció es van adquirir els vectors d'expressió per a HNF4 α (HNF4A2 i HNF4A8, ja que Klein et al. no indicaven quina isoforma van identificar) i ING4 del repositori d'Addgene. En paral·lel es van clonar els CDS dels factors de transcripció Ikaros, HNF1 α i HNF1 β al vector d'expressió pcDNA3.1, a partir de cDNA de la línia tumoral HT-29. Es van expressar transitòriament a les línies cel·lulars CaCo-2, HT-29, Huh7 i CP15T, i es va mesurar l'expressió del gen *SLC28A1* mitjançant RT-PCR (Figura 57).

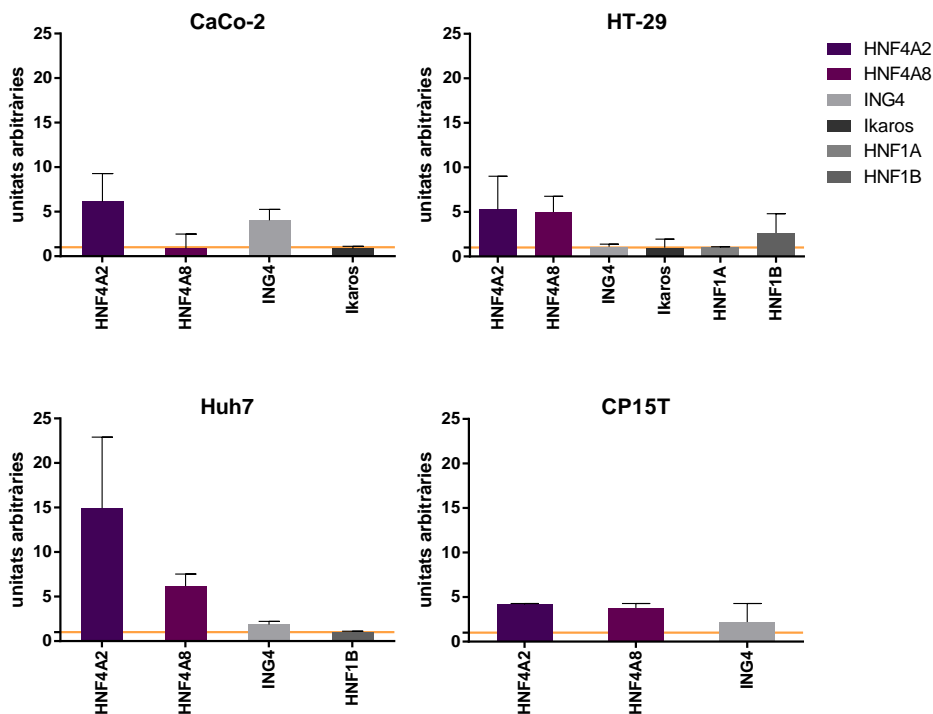


Figura 57. Els factors de transcripció ING4, Ikaros, HNF1 α i HNF1 β no modulen l'expressió d'hCNT1 a les línies cel·lulars testades. Les cèl·lules van ser sembrades, l'endemà transfectades i a les 48 hores processades. L'expressió d'mRNA d'hCNT1 es va determinar mitjançant RT-PCR. Els resultats indiquen les mitjanes \pm SEM dels duplicats intraexperimental (n=1), relativitzats a un control de pcDNA3.1 buit indicat amb la línia taronja horitzontal.

HNF4A2 i HNF4A8 eren els controls positius de regulació de l'expressió d'hCNT1, i en tots els casos n'augmenten l'expressió a nivell d'RNA – tot i que amb magnituds variables entre línies. En canvi, la resta de factors de transcripció testats no semblaven modular l'expressió d'hCNT1, a excepció d'ING4 a CaCo-2 i HNF1B a HT-29.

Per tant, es va procedir a reanalitzar les dades de MatInspector per tal de trobar altres factors de transcripció que poguessin modular l'expressió d'hCNT1. En aquest cas es van incloure també els factors de transcripció d'expressió ubiqua, i es va mantenir HNF4 α com a control positiu. Els criteris seguits van ser més amplis. En primer lloc, es va intentar trobar algun factor de transcripció repressor que expliqués la baixa activitat de les diferents construccions del promotor d'*SLC28A1*. En segon lloc, es va analitzar més en detall la regió *down* per tal d'identificar quins factors de transcripció hi presentaven lloc d'unió putatiu que expliquessin l'alta activitat a HepG2 i l'absència d'activitat a CP15T. Amb tots aquests criteris es van identificar els factors de transcripció STAT3, E2F1, p53, KLF6 i YY1 (Figura 58). Abans de començar a treballar individualment amb cadascun d'ells es va realitzar un *screening* d'expressió dels factors de transcripció a les diferents línies cel·lulars amb què s'ha treballat (Figura 59).

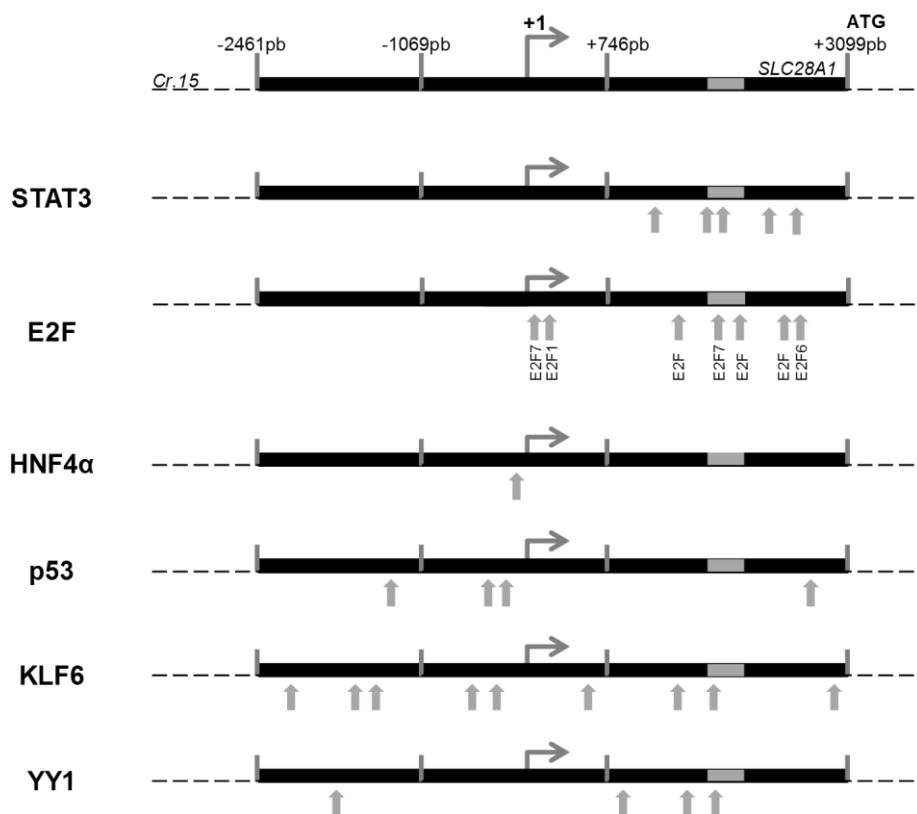


Figura 58. Esquema representatiu dels llocs d'unió putatius als factors de transcripció indicats al promotor d'*SLC28A1*. A la part superior es representa el locus en el cromosoma 15 del gen *SLC28A1*; el rectangle gris indica la seqüència corresponent al fragment *down* del promotor. S'indiquen amb fletxes els llocs d'unió putatius dels factors de transcripció.

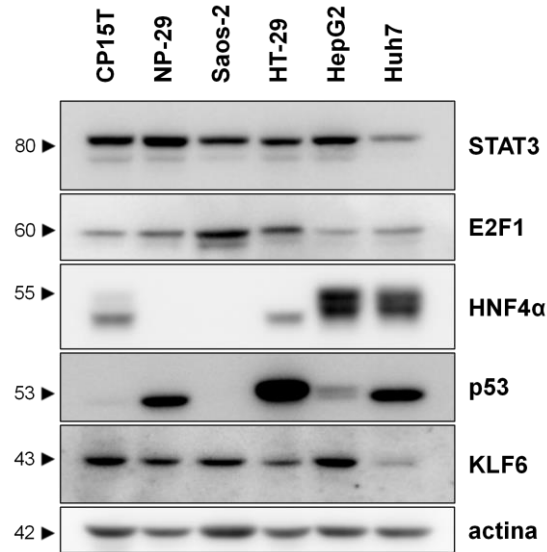


Figura 59. Expressió dels diferents factors de transcripció a les diferents línies cel·lulars emprades en aquest apartat. Es van emprar extractes proteics control de cadascuna de les línies cel·lulars indicades.

4.2.2 YY1

En un intent d'entendre quin agent podia estar al darrere de la repressió d'expressió d'hCNT1, es van analitzar els resultats de MatInspector amb l'objectiu de trobar algun element repressor. Va ser així com es van trobar 4 llocs putatius d'unió de YY1 al promotor d'*SLC28A1*.

YingYang1 (YY1) és un factor de transcripció d'expressió ubiqua que pertany a la família de factors de transcripció GLI-Krüppel. Tal i com indica el seu nom, exerceix funció dual sobre els promotors dels gens, ja que pot ser activador o repressor (Bonavida and Kaufhold 2015). La seqüència reconeguda per YY1 comença per CG susceptibles de ser metilades, el qual redueix la capacitat d'unió del factor de transcripció al DNA. L'efecte sobre la regulació de la transcripció depèn del context, és a dir, principalment els cofactors que es recluten. Per exemple, s'ha proposat que YY1 recluta el complex PRC2/EED-EZH2 als gens diana que han de ser reprimits (Gabriele et al. 2017). També s'ha relacionat YY1 amb la progressió tumoral. S'ha vist que té un paper important en la transició epiteli-mesènquima (EMT) i en metàstasi, ja que s'ha detectat que correlaciona negativament amb l'expressió d'E-cadherina (Baritaki et al. 2009; Bonavida and Baritaki 2011). Es considera un oncogen en varis contextos, com en càncer de mama, càncer de pròstata i hepatocarcinoma (Dong et al. 2017; Wang et al. 2018). En hepatocarcinoma s'ha relacionat la seva activitat amb la malignitat del tumor mitjançant la regulació de l'expressió d'un factor d'*splicing*, QKI, que activa l'EMT (Han et al. 2019). De fet, dades del projecte Human Protein Atlas indiquen que és un marcador de pronòstic negatiu en càncer de fetge i d'endometri (Figura 60).

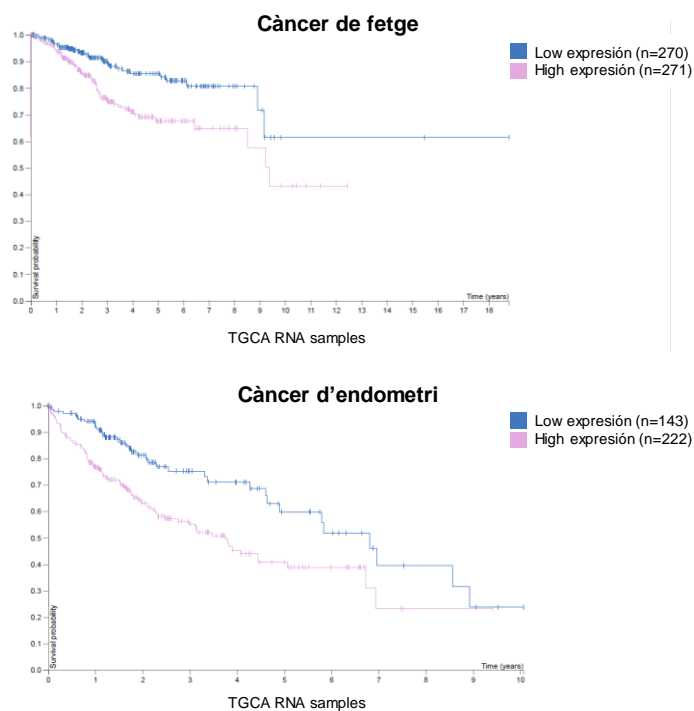


Figura 60. Corbes de supervivència al llarg del temps en càncer de fetge i d'endometri segons si l'expressió de YY1 és baixa (blau) o alta (rosa). Gràfics obtinguts de The Human Protein Atlas.

En ser un factor dual, es va voler comprovar si tenia paper de repressor mitjançant la deleció dels llocs d'unió putatius en les construccions del promotor d'*SLC28A1*. Dels 4 llocs d'unió, 3 es trobaven en el si del fragment 12, el qual era el que presentava major activitat a les línies cel·lulars testades. Així doncs, es van dissenyar 5 construccions per a estudiar l'efecte de deleccionar els llocs d'unió de YY1 (Figura 61A). Dos dels llocs d'unió estaven situats a 60pb de distància, de manera que es van dissenyar dues versions, una en què només se'n va deleccionar un dels dos (DEL 2A) i una en què es van eliminar ambdós incloent la seqüència entremig (DEL 2B). Les deleccions es van realitzar mitjançant mutagènesi dirigida. La generació de DEL 1 sola va ser infructuosa, però es va poder combinar amb les DEL 2A i 2B. A continuació es van testar les activitats dels fragments amb les deleccions a HT-29 i HepG2, ja que eren les línies en què la construcció 12 havia demostrat activitat més elevada. Els resultats de la construcció DEL 1+2B van presentar molt error, ja que en un experiment augmentava l'activitat respecte el fragment 12 i en l'altre disminuïa. La resta de construccions amb les deleccions presentaven menys activitat que el fragment 12 en ambdues línies cel·lulars (Figura 61B). Aquests resultats indicarien que YY1 té un rol activador del promotor d'*SLC28A1* en el context cel·lular analitzat i no repressor com era la hipòtesi inicial.

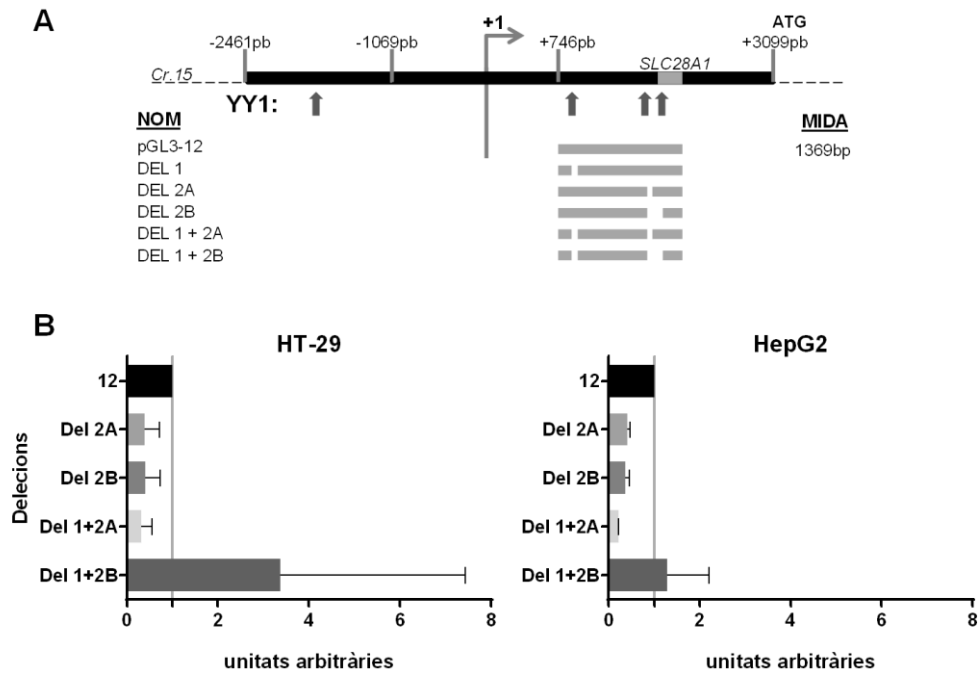


Figura 61. Les deleccions dels llocs d'unió putatius per a YY1 van suggerir que té un paper activador i no repressor. (A) Esquema representatiu del *locus* del gen *SLC28A1*. S'indica la regió promotora *down* amb el rectangle gris. Els llocs d'unió putatius de YY1 estan representats per fletxes. Es mostra quins llocs d'unió té deleccionats cadascuna de les construccions. (B). Activitat de les construccions deleccionades a HT-29 i HepG2. Es van sembrar les cèl·lules i l'endemà es van transfectar amb els vectors pGL3 corresponents i pRL-TK. Es van mesurar les activitats de les construccions calculant la *ratio* entre luciferasa i renilla, i relativitzant-les al vector pGL3-12 (línia vertical). Les barres representen la mitjana \pm SEM d'experiments independents (n=2).

4.2.3 KLF6

L'estudi en aquest punt es va focalitzar en trobar factors de transcripció amb rol activador de l'expressió d'*SLC28A1*. Un dels candidats més fermes era KLF6, o CPBP, ja que presentava un elevat nombre de llocs putatius d'unió al *locus* del gen *SLC28A1*. A més, 5 d'aquests locus estaven en zones del promotor en què s'havia trobat activitat; un d'ells, per exemple, es trobava a l'inici de la zona *down* (Figura 58).

KLF6 és un membre de la família de factors de transcripció Krüppel-like d'expressió ubiqua i amb participació important en diversos processos cel·lulars, incloent desenvolupament, diferenciació, proliferació i apoptosi (Narla et al. 2007). Tant és així que la seva expressió és molt elevada en el desenvolupament de la placenta i és essencial pel fetus (Yang et al. 2018). De fet, es va intentar produir un model de ratolí KO per *Klf6* però va resultar inviable (Matsumoto et al. 2006). S'ha descrit KLF6 com un factor de transcripció bifuncional, ja que pot trans-activar i trans-reprimir alguns gens en funció del context cel·lular (Bieker 2001). Per exemple, KLF6 és repressor quan s'associa en un complex del qual hi forma part HDAC3; s'ha trobat que aquest complex reprimeix *Dlk1*, un protooncogen que inhibeix la diferenciació d'adipòcits (Li et al.

2005). S'ha demostrat que KLF6 està desregulat en molts tipus de càncer, com càncer de pròstata, carcinoma colorectal, càncer gàstric, tumors nasofaringis, carcinoma ovàric, hepatocarcinoma o gliomes (Narla et al. 2001; Chen et al. 2002; Jeng and Hsu 2003; Kremer-Tal et al. 2004; Reeves et al. 2004; Cho et al. 2005; DiFeo et al. 2006). Els mecanismes de desregulació són diversos, des de pèrdua d'heterozigosi a mutacions somàtiques, hipermetilació del promotor o increment de l'*splicing* alternatiu (Diab et al. 2014).

Les variants d'*splicing* de KLF6 són claus per entendre el rol d'aquest factor de transcripció en càncer. El gen *KLF6* té 4 exons, els quals formen part de KLF6-FL (*full length*), la proteïna canònica. L'*splicing* alternatiu dona lloc a les altres 3 variants, SV1, SV2 i SV3 (Figura 62).

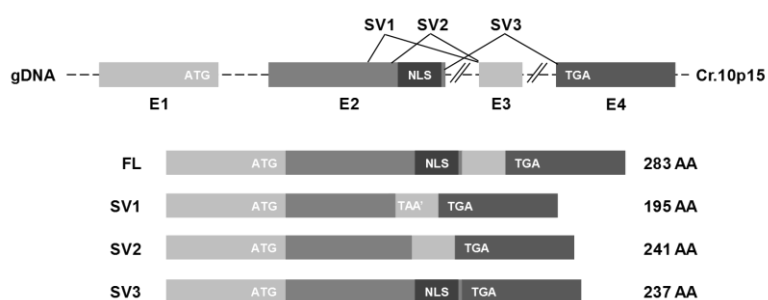


Figura 62. Estructura gènica de KLF6 i les seves variants d'*splicing*. E1-4 representa exons 1-4. FL significa *full length*, SV *splice variant* i AA aminoàcids. S'indiquen el lloc de l'ATG i els codons STOP, així com la senyal de localització nuclear NLS. Adaptada de Hanoun et al., 2010.

D'aquestes només SV3 conserva el senyal de localització nuclear, de manera que les altres són citoplasmàtiques. No es coneix gaire bé quina funció té SV3 al nucli. SV1 i SV2 han estat millor caracteritzades. KLF6-FL i KLF6-SV2 són proteïnes considerades supressores de tumors. De fet, s'ha descrit que l'expressió de la variant SV2 es troba disminuïda a hepatocarcinoma i a carcinoma colorectal. En ambdós tipus de càncer s'ha vist que la restitució d'SV2 resulta en increment de l'apoptosi i arrest de cicle cel·lular en G₁; efectes regulats per p21^{CIP1/WAF1}. KLF6 produeix un augment de l'expressió de p21, que al seu torn exerceix els efectes supressors de tumors de forma independent de p53 (Hanoun et al. 2010; Zhang et al. 2018). En canvi, KLF6-SV1 s'ha relacionat amb la progressió tumoral en diferents tipus de càncer com pròstata, ovari o adenocarcinoma pulmonar (Narla et al. 2001; DiFeo et al. 2006; DiFeo et al. 2009).

Amb aquests antecedents es va hipotetitzar que KLF6-FL era un factor de transcripció que regulava positivament l'expressió d'hCNT1. El seu paper com a supressor de tumor lligaria amb el fet que s'han descrit funcions més enllà del transport per hCNT1, les quals també són de caràcter supressor de tumors. A més, l'eina UALCAN (Universitat d'Alabama) permet analitzar dades dels OMICs de càncer, tant de *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) com de MET500 (cohort

de 500 pacients adults amb tumors sòlids metastàtics d'òrgens diversos, Robinson et al. 2017). S'ha trobat correlació positiva entre l'expressió d'*SLC28A1* i *KLF6* en carcinoma de cèl·lules renals, de valor 0,3 (Figura 63).

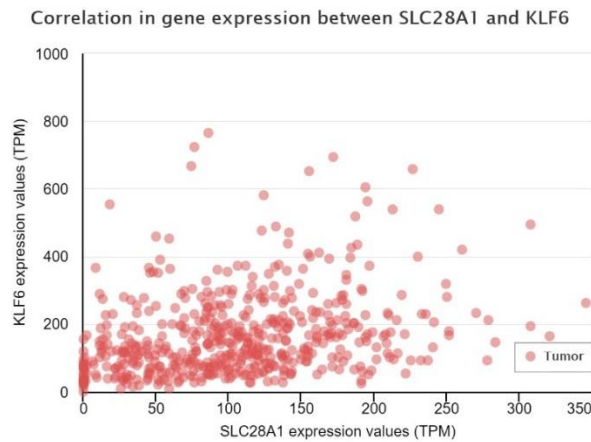


Figura 63. Correlació d'expressió gènica entre *SLC28A1* i *KLF6* en mostres de carcinoma de cèl·lules renals. Gràfic obtingut de la base de dades UALCAN (Chandrashekar et al. 2017).

En primer lloc es va optar per a caracteritzar l'expressió de *KLF6* a un panell de línies cel·lulars d'origen tumoral del laboratori, tant a nivell de RNA (Figura 64A) com a nivell de proteïna (Figura 64B), ja que s'havia descrit que la disminució d'expressió de *KLF6* a nivell d'mRNA és un procés primerenc en l'hepatocarcinogènesi (Kremer-Tal et al. 2007). Totes les línies testades van demostrar tenir una expressió semblant a nivell d'mRNA i de proteïna, a excepció d'Huh7, que presentava nivells de proteïna més baixos.

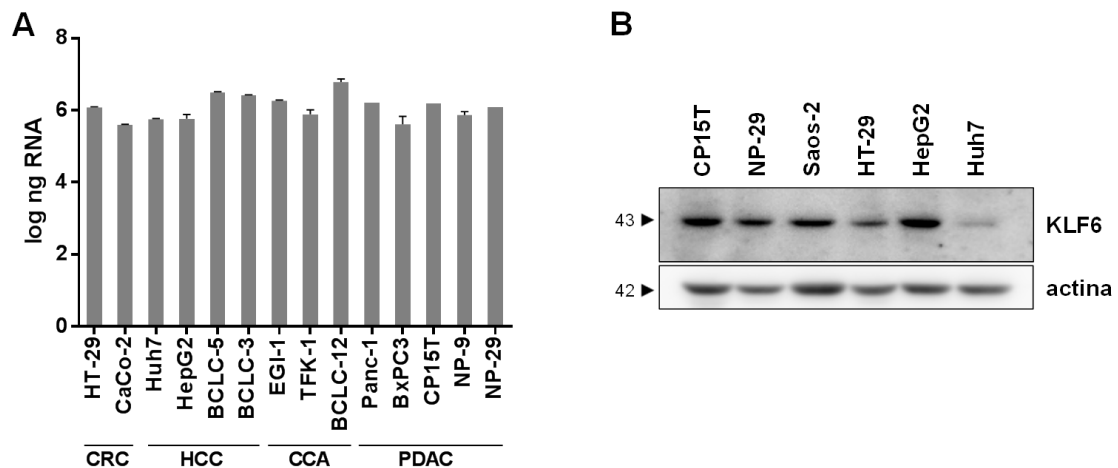


Figura 64. Caracterització de l'expressió de *KLF6* a diferents línies cel·lulars d'origen tumoral. (A) Detecció dels nivells absoluts d'mRNA de *KLF6*-FL a les línies cel·lulars indicades. CRC, carcinoma colorectal; HCC, hepatocarcinoma; CCA, colangiocarcinoma; PDAC, adenocarcinoma ductal pancreàtic. Les barres representen la mitjana \pm SEM de dos duplicats experimentals (excepte Panc-1, CP15T i NP-29, en què representen un sol valor). (B) Expressió proteica de *KLF6* a les línies cel·lulars indicades detectada per western blot en extractes control de cadascuna.

A continuació es va procedir a analitzar l'efecte de la sobreexpressió de KLF6 en les línies cel·lulars HT-29, CP15T, Huh7 i HepG2 (Figura 65A).

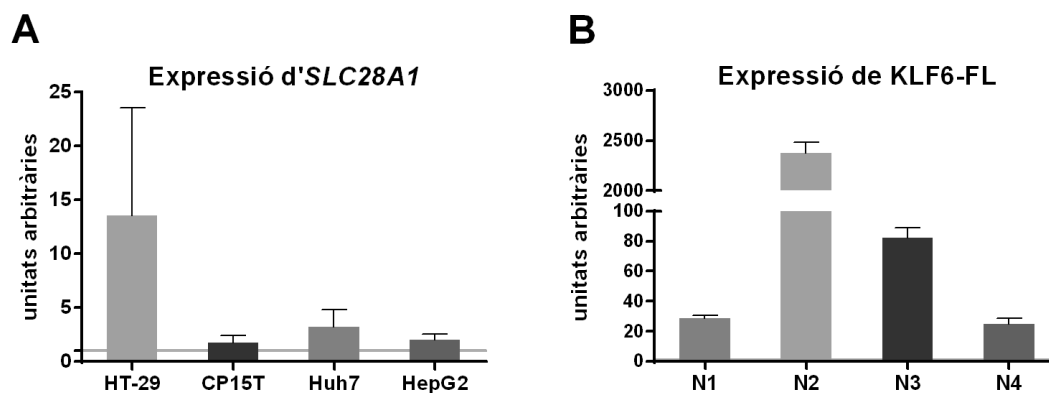


Figura 65. L'expressió heteròloga de KLF6 produeix una tendència a incrementar l'expressió d'hCNT1 a les línies cel·lulars testades. (A) L'expressió d'hCNT1 està relativitzada a un control en què es va transfectar el vector pcDNA3.1 buit, indicat amb la línia horitzontal. Les barres representen la mitjana d'experiments independents \pm SEM (n=4 HT-29, n=3 la resta). La significació estadística es va mesurar amb un T-Test de dades aparellades. (B) Comprovació de l'eficiència de transfecció de KLF6 a HT-29 mitjançant RT-PCR. L'expressió està relativitzada a la condició control en què s'ha transfectat pcDNA3.1 buit. S'indiquen els valors per separat de cada experiment independent.

El resultat va mostrar una variabilitat molt alta, sobretot a HT-29, en què el rang d'expressió d'hCNT1 se situava entre 43,51 i 0,97. Per descartar un possible error de manipulació es va comprovar mitjançant RT-PCR si la transfecció de KLF6 havia funcionat utilitzant una sonda específica per KLF6-FL. Es va veure que en cadascun dels experiments analitzats l'expressió de KLF6 augmentava amb un mínim de 24 vegades (Figura 65B). El mateix experiment en què l'expressió de KLF6 augmentava més de 2000 vegades no coincidia amb l'augment de 43 vegades d'hCNT1. Per tant, la variabilitat no era donada per l'eficiència de la transfecció, sinó que probablement es degué a un efecte indirecte del mateix KLF6. Les línies cel·lulars CP15T, Huh7 i HepG2 també mostraven una tendència a incrementar l'expressió d'hCNT1 però en menys mesura que HT-29.

En paral·lel es van generar els vectors d'expressió de les variants d'*splicing* SV1 i SV2 mitjançant mutagènesi dirigida, ja que a cadascuna li manca un fragment continu del CDS. Es va comprovar l'efecte de l'expressió heteròloga de KLF6-SV1 i KLF6-SV2 sobre hCNT1, però com era d'esperar degut a la manca de senyal nuclear d'aquestes variants cap de les dues modulava l'expressió d'SLC28A1 (Figura 66).

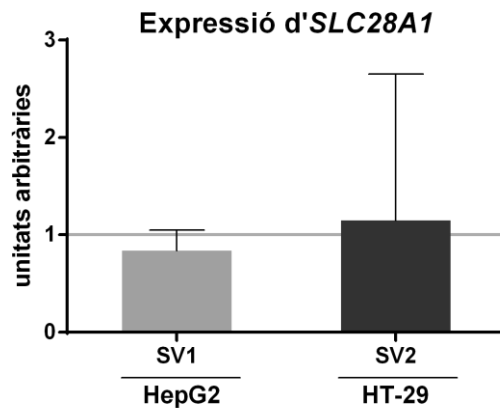


Figura 66. Les variants d'*splicing* KLF6-SV1 i KLF6-SV2 no modulen l'expressió d'hCNT1. Anàlisi dels nivells d'mRNA d'hCNT1 després de sobreexpressar KLF6-SV1 a HepG2 i KLF6-SV2 a HT-29, relativitzat a una condició control de transfecció del vector buit indicada amb la línia horitzontal. Es mostra un sol experiment; les barres representen la mitjana dels duplicats intraexperimentals \pm SEM.

Durant l'època en què s'estava realitzant la part experimental d'aquest bloc, Santa Cruz Biotechnology va treure un nou anticòs monoclonal per a la detecció d'hCNT1. Es van realitzar proves comparant-lo amb l'antic policlonal anti-CNT1 N17 i es va comprovar que funcionava millor, tant per a western blot com per immunoprecipitacions. Per aquest motiu es va procedir a provar de detectar hCNT1 endogen a les línies cel·lulars testades. Es va optar per HepG2 perquè és la línia cel·lular de les emprades en aquesta tesi que presenta major expressió d'hCNT1 endògena – mesurat pel mètode $\Delta\Delta$ CT, a nivell d'mRNA. Tot i que HT-29 fos la línia en què major augment d'hCNT1 es detectava en transfectar KLF6, les dificultats experimentades en intentar detectar la proteïna en el bloc de regulació epigenètica van propiciar el canvi de model d'estudi. Així doncs, es va mirar de detectar hCNT1 endogen a HepG2 després de transfectar KLF6 i HNF4 α com a control positiu. Els resultats van mostrar una banda d'uns 60kDa, el pes d'hCNT1, que semblava augmentar quan se sobreexpressava HNF4 α però no KLF6 (Figura 67). No es pot assegurar si les bandes de major pes molecular corresponen també a altres formes d'hCNT1, amb modificacions post-traduccionals o de possibles oligòmers. Per a demostrar-ho caldria silenciar hCNT1 endogen amb un siRNA i comprovar si les bandes de major pes molecular desapareixen o no.

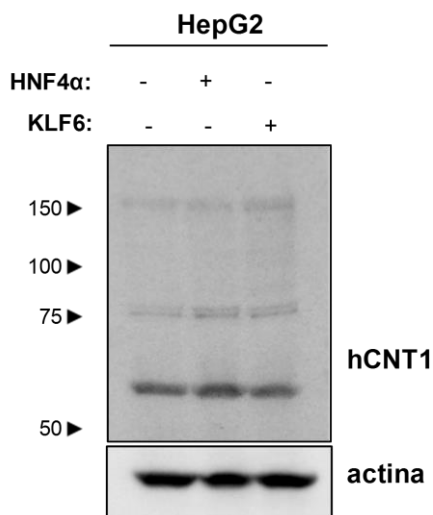


Figura 67. La transfecció de KLF6 no modula hCNT1 a nivell proteic. Extractes de proteïna total de cèl·lules transfectades amb pcDNA3.1 buit, HNF4α (control positiu) i KLF6. Es van resoldre 100µg de proteïna i es va provar de detectar hCNT1 amb l'anticòs nou anti-CNT1 G7 (Santa Cruz Biotechnology).

En paral·lel es va voler comprovar si hi havia algun impacte de la sobreexpressió de KLF6 sobre l'activitat d'hCNT1. Així, es va realitzar un assaig d'internalització de citidina tritiada a HepG2 en condicions de transfecció de pcDNA3.1 buit o pcDNA3.1-KLF6 (Figura 68).

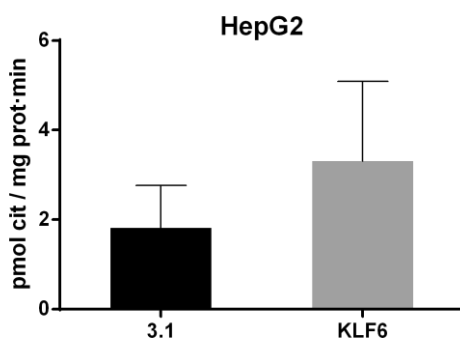


Figura 68. KLF6 indueix una tendència a augmentar el transport concentratiu de citidina. L'activitat dels hCNTs es va mesurar mitjançant l'entrada de citidina tritiada a les cèl·lules, calculada a partir de la diferència de valors entre un medi ric en sodi i un medi ric amb colina. Els resultats s'expressen com a mitjana ± SEM (n=3). La significació estadística es va determinar mitjançant T-Test aparellat.

Es va detectar certa tendència a augmentar l'entrada de citidina a les HepG2 que sobreexpressaven KLF6. Tanmateix, les condicions en què es van realitzar aquests experiments no permeten assegurar que aquest augment sigui degut a major expressió d'hCNT1. La citidina és internalitzada per hCNT1 i hCNT3, de manera que caldria comprovar l'efecte de l'expressió heteròloga de KLF6 sobre hCNT3 per a descartar que no hi hagi efecte d'aquest transportador. Una altra opció seria afegir guanosina freda en excés a les condicions experimentals, que en ser

transportada per hCNT3, bloquejaria l'activitat d'aquest transportador i per tant només es detectaria l'activitat d'hCNT1. De totes formes, amb un augment tan petit és molt difícil detectar canvis significatius en inhibicions creuades.

A continuació es va determinar l'efecte de la sobreexpressió de KLF6 sobre l'activitat promotora d'*SLC28A1*. Es van realitzar assajos luciferasa per avaluar l'activitat de les construccions 12 i *down* en condicions d'expressió heteròloga de KLF6, ja que presentaven dos i un lloc d'unió putatius respectivament. L'activitat del fragment 12 no semblava modular-se per acció de KLF6, mentre que la del fragment *down* sí que mostrava tendència a augmentar, ja que passava de gairebé 5 a unes 8 unitats arbitràries (Figura 69).

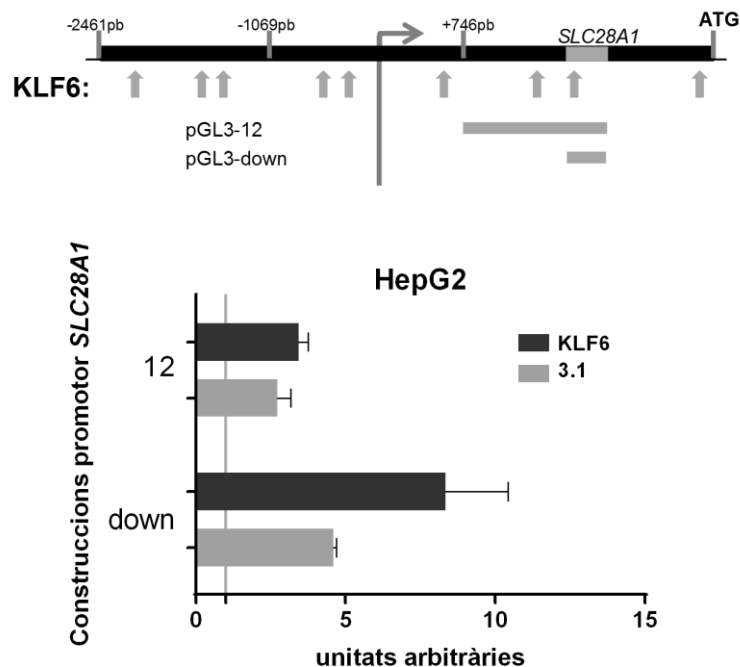


Figura 69. KLF6 mostra tendència a augmentar l'activitat del fragment *down* del promotor d'*SLC28A1*. Les cèl·lules van ser sembrades i l'endemà co-transfectades amb els vectors pGL3-12 o pGL3-down, pRL-TK i pcDNA3.1 buit o pcDNA3.1-KLF6. A les 48 hores es van lisar les cèl·lules i es van mesurar les activitats luciferasa i renilla, a partir de les quals es van calcular les *ratios* d'activitat de les construccions. Cada activitat està relativitzada al control corresponent, pGL3 bàsic buit + pcDNA3.1 o pGL3 bàsic buit + KLF6, indicats amb una línia vertical. Les barres representen la mitjana \pm SEM d'experiments independents (n=5). L'estadística es va mesurar mitjançant un test T d'Student per a mostres aparellades.

Per últim, es va procedir a realitzar un assaig de immunoprecipitació de cromatina (ChIP) amb KLF6 per a comprovar si s'unia a algun dels llocs d'unió putatius del promotor d'*SLC28A1*. Es va provar amb HepG2 i Huh7, tant amb KLF6 endogen com amb KLF6 sobreexpressat. Es va aconseguir només en Huh7, immunoprecipitant KLF6 endogen, ja que va ser l'única condició en què el control negatiu de la immunoprecipitació va sortir net (Figura 70).

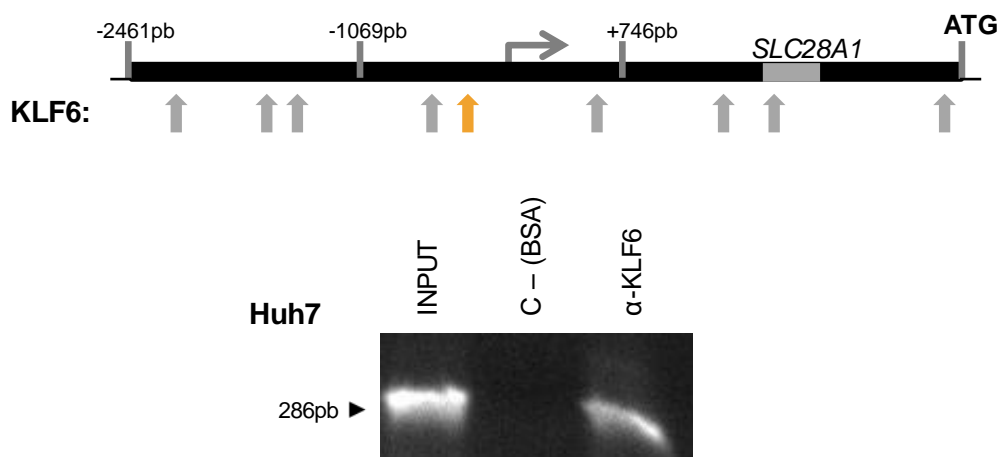


Figura 70. La immunoprecipitació de cromatina confirma la unió de KLF6 al promotor d'*SLC28A1*, a Huh7. Les cèl·lules es van sembrar i a les 48 hores es va procedir a realitzar l'assaig ChIP. Únicament es va amplificar el fragment que correspon al lloc d'unió indicat amb la fletxa taronja, amb els primers BS5 fw 5'TCAGCTCTAGGTCTCACTCA3' i BS5 rv 5'TCAAGGAGGCATGGCCAGCA3'. Es mostra un sol experiment.

Aquest resultat va confirmar la unió de KLF6 al promotor d'*SLC28A1*. El resultat només s'ha obtingut amb Huh7. En expressar heteròlogament KLF6 en aquesta línia cel·lular es va observar un augment de l'expressió d'hCNT1 de 3 vegades aproximadament. Per altra banda, es va optar en estudiar HepG2 perquè l'expressió endògena d'hCNT1 era més elevada que en la resta de línies, de manera que si hi havia alguna modulació per part de KLF6 seria més fàcil detectar-la. Però els resultats no van ser tan esperançadors com s'esperava, ja que no es va poder demostrar que sobreexpressar KLF6 incrementés l'expressió d'hCNT1 a nivell de mRNA o de proteïna, ni que augmentés l'activitat del transportador. Es va intuir cert increment de l'activitat promotora de la construcció *down*, i per aquest motiu els assajos ChIP s'havien dirigit a detectar la unió de KLF6 al lloc putatiu d'unió inclòs en aquesta regió; els resultats van ser negatius. Només s'ha demostrat la unió de KLF6 al promotor d'*SLC28A1* en Huh7, en un *locus* molt proper al TSS. Això fa canviar totalment la visió que es tenia fins el moment. Caldria revisar l'efecte sobre hCNT1 de la sobreexpressió de KLF6 a Huh7, tant a nivell proteic i d'activitat del transportador. A més, sabent que el lloc d'unió es troba a -470pb, els fragments de promotor susceptibles d'incrementar l'activitat en condicions de sobreexpressió de KLF6 són el 7 i el 9. Per tant, KLF6 no sembla ser el responsable de l'activitat del fragment *down*.

S'ha descrit que la vida mitjana de la proteïna KLF6 és molt curta: 18 minuts a HeLa, 50-70 minuts a HEK293. La seva expressió pot ser estabilitzada mitjançant fosforilació, de la qual GSK3β n'és responsable, i d'aquesta manera GSK3β contribueix a l'activitat supressora de tumors de KLF6 (Lang et al. 2013). El western blot en què es va detectar KLF6 a les diferents línies cel·lulars no mostra un doblet en relació als dos diferents estats de fosforilació (hipo- o

híper-), ja sigui perquè l'anticòs no ho detecta o bé perquè en aquestes línies KLF6 no és fosforilat. Aquest fet podria explicar la variabilitat interexperimental observada quan es transfecta KLF6 a les diferents línies cel·lulars. Per altra banda, l'acetilació també interfereix en la funció de KLF6. L'acetilació de la lisina 209 és indispensable per a què KLF6 pugui activar el promotor de $p21^{WAF1/CIP1}$ (Li et al. 2005). De fet, la mateixa acetilació és necessària per tal que KLF6 formi part d'un complex activador en què també hi ha els coactivadors PCAF, CBP i p300, els quals presenten funció histona acetiltransferasa (HAT). Tanmateix, s'han descartat com a responsables de l'acetilació de KLF6 (Camolotto et al. 2013). Ara bé, el fet que KLF6 formi part d'un complex amb activitat HAT suggeriria que l'estatus epigenètic de les cèl·lules podria regular d'alguna manera la funció de KLF6.

En resum, caldria aprofundir en l'estudi de KLF6 com a factor de transcripció candidat per a la regulació de l'expressió d'hCNT1, ja que els indicis indiquen que hi participa però encara no s'ha elucidat el mecanisme d'acció.

4.2.4 p53

p53 és el supressor de tumors per excel·lència. Exerceix la seva funció mitjançant la regulació de la transcripció de molts gens diana involucrats en arrest del cicle cel·lular, apoptosi, reparació del DNA, senescència i metabolisme (revisat a Lane and Levine 2010). A més, p53 pot exercir funcions independents de la seva funció de factor de transcripció, com la inducció de l'apoptosi a mitocondri després de ser reclutat en aquest orgànu (revisat a Vaseva and Moll 2009). Però totes aquestes funcions només les exerceix en ser activat. En condicions fisiològiques, l'expressió de p53 és molt baixa, ja que està constantment sent degradat via proteasoma després de ser ubiquïtinat per les E3 lligases HDM2, Pirh2 i COP1 (revisat a Pant and Lozano 2014). En condicions d'estrès genotòxic, p53 és estabilitzat mitjançant fosforilació i acetilació, i exerceix les seves funcions de supressor de tumors en què les conseqüències principals són l'aturada del cicle cel·lular i/o mort cel·lular.

S'ha observat que aproximadament el 85% de càncers presenten mutacions o inactivacions de p53 (Muller and Vousden 2013). La pèrdua de funció d'aquest supressor de tumor provoca el descontrol en el creixement i mort cel·lular de les cèl·lules normals, el qual condueix a una immortalització i finalment càncer. Les mutacions del gen *TP53* impedeixen principalment la unió de p53 al DNA, de manera que no es pot induir l'expressió dels gens necessaris per a reparar el dany cel·lular o arrestar les cèl·lules en cas de necessitat. Es poden classificar en dues categories: classe I, en què hi ha incloses les mutacions que produeixen canvis d'aminoàcid que

directament s'uneixen a l'element de resposta de p53 al DNA, o les mutacions de classe II o conformacionals, en què s'altera l'estructura de p53 i s'aboleix la capacitat d'unió al DNA. Com que p53 actua en forma de tetràmer, p53 mutant no només deixa d'unir-se al DNA, sinó que a més actua de dominant negatiu oligomeritzant amb p53 WT. Addicionalment, p53-mutant presenta funcions oncogèniques com progressió tumoral, potencial metastàtic i resistència a fàrmacs (revisat a Parrales and Iwakuma 2015).

La revisió de l'anàlisi dels factors de transcripció que podrien tenir un paper en regular l'expressió d'hCNT1 va revelar 4 llocs d'unió putatius de p53 pel promotor d'*SLC28A1*, dos dels quals es troben molt propers al TSS (Figura 71A). Així doncs es va decidir avaluar el rol de p53 en l'expressió d'hCNT1. El primer pas va ser escollir el model cel·lular. Les línies cel·lulars emprades en aquesta tesi són totes d'origen tumoral – excepte HEK293. Tenint en compte que p53 presenta alteracions de funció en la majoria de tumors, les línies cel·lulars seguiran el mateix perfil. Per aquest motiu es va decidir escollir dues línies cel·lulars amb estat diferent de p53. En primer lloc, la línia cel·lular NP-29, originàries d'un adenocarcinoma ductal pancreàtic, les quals han estat testades prèviament en el laboratori i són p53-WT. Per altra banda, es va escollir Saos-2, una línia derivada d'osteosarcoma que han estat descrites com a p53-*null*, és a dir, no expressen p53 degut a una deleció del gen (Diller et al. 1990). A continuació es va realitzar un assaig luciferasa en NP-29 i Saos-2 amb les construccions del promotor putatiu d'*SLC28A1* prèviament testades. Es van escollir les construccions 4, 7, 9, 12, 13 i *down*. La principal diferència respecte les proves efectuades en HT-29, CP15T, Huh7 i HepG2 va ser la incorporació del fragment 4. En un principi s'havia descartat perquè no havia mostrat activitat en la primera prova en HT-29 (Figura 49). Tanmateix, és l'únic fragment clonat que inclou els quatre llocs d'unió putatius de p53. L'anàlisi d'activitat luciferasa a NP-29 i Saos-2 va revelar que la construcció 4 era la que presentava més activitat a NP-29 (semblant al valor de *down* a HepG2, que era el màxim que s'havia observat), mentre que a Saos-2 estava reprimida (Figura 71B). La resta d'activitats s'assemblen a les obtingudes anteriorment: NP-29 va mostrar un perfil molt semblant a CP15T, en què *down* no semblava actiu, mentre que Saos-2 presentava un perfil semblant a HT-29, però amb major activitat de *down*. Dels resultats també en va destacar l'activitat de la construcció 9, que conté els mateixos llocs putatius d'unió per a p53 que la 4 a excepció del situat a -1212pb. El fragment 9 està reprimat a Saos-2, però tampoc presenta activitat a NP-29. La diferència entre 4 i 9 suggeriria que el lloc d'unió per a p53 és el situat a -1212pb, i no la resta. Així doncs, aquests resultats demostraven que en presència de p53 WT el fragment més llarg del promotor d'*SLC28A1* tenia més activitat.

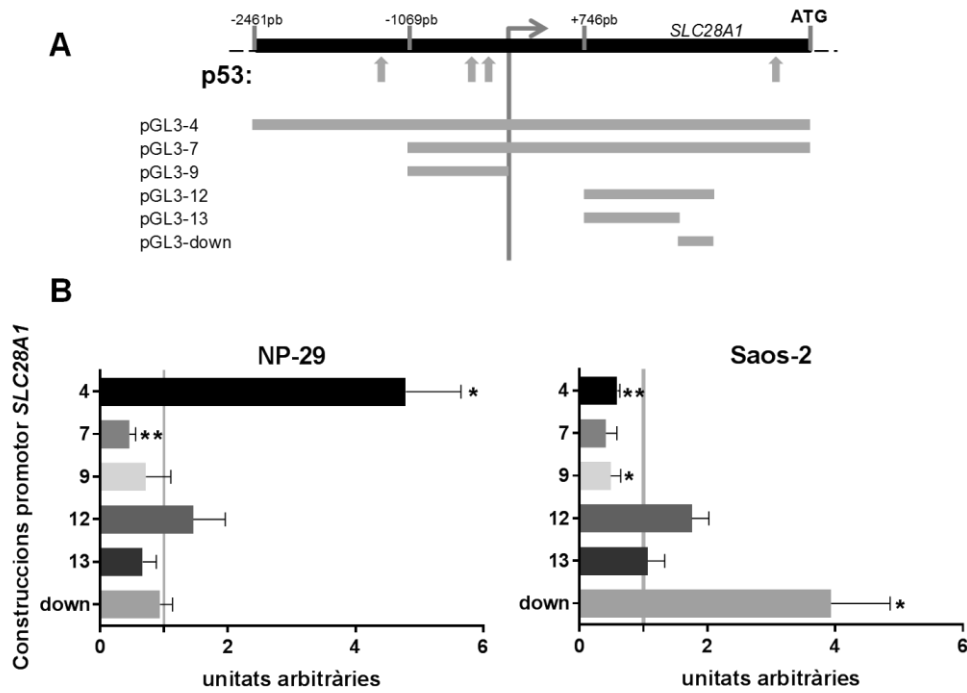


Figura 71. L'estatus de p53 a les línies cel·lulars condiona l'activitat del promotor d'*SLC28A1*. (A) Esquema representatiu del promotor d'*SLC28A1* en què s'indiquen els llocs d'unió putatius amb fletxes i les construccions analitzades. (B) Activitat relativa de les construccions indicades respecte el vector pGL3 bàsic buit, representat amb una línia vertical. L'endemà de la sembra, les construccions van ser co-transfectades juntament amb el vector pRL-TK. 48 hores després es van lisar les cèl·lules i es va determinar l'activitat de cadascun dels fragments mitjançant la *ratio* entre luciferasa i renilla. Les barres representen la mitjana \pm SEM d'experiments independents (n=3-5). L'estadística es va mesurar amb un test t-Student per a mostres aparellades entre construcció i control, amb significació *p<0,05, **p<0,01.

Per confirmar la troballa, es va co-transfectar el vector d'expressió de p53 (p53-GFP) juntament amb els vectors luciferasa, a Saos-2. L'anàlisi il·lustra només els canvis del vector luciferasa que conté els fragments de promotor i no pas la *ratio* entre luciferasa i renilla, ja que el vector pRL-TK va mostrar molts canvis d'activitat per acció de p53 que emascaraven els resultats. Es va observar com l'activitat de la construcció 4, la que conté tots els llocs d'unió putatius per a p53, presentava cert augment de l'activitat (Figura 72). Per altra banda, l'activitat del fragment 9 semblava disminuir. També es van detectar canvis en l'activitat de *down*, sense que aquest tingués cap lloc d'unió putatiu. Tant la disminució del 9 com l'increment de *down* podrien ser efectes indirectes de l'expressió de p53, ja que té molts gens diana (revisat a Fischer 2017). Un dels candidats seria STAT3, sobretot pel canvi observat en *down*. No és el factor de transcripció amb major increment d'expressió per acció de p53, ja que per exemple la regulació del factor de transcripció dependent de cAMP 3 (ATF3) és major. Tanmateix, STAT3 presenta dos llocs putatius d'unió a la regió *down* del promotor d'*SLC28A1*, a més de 3 llocs putatius addicionals tots *downstream* respecte el TSS.

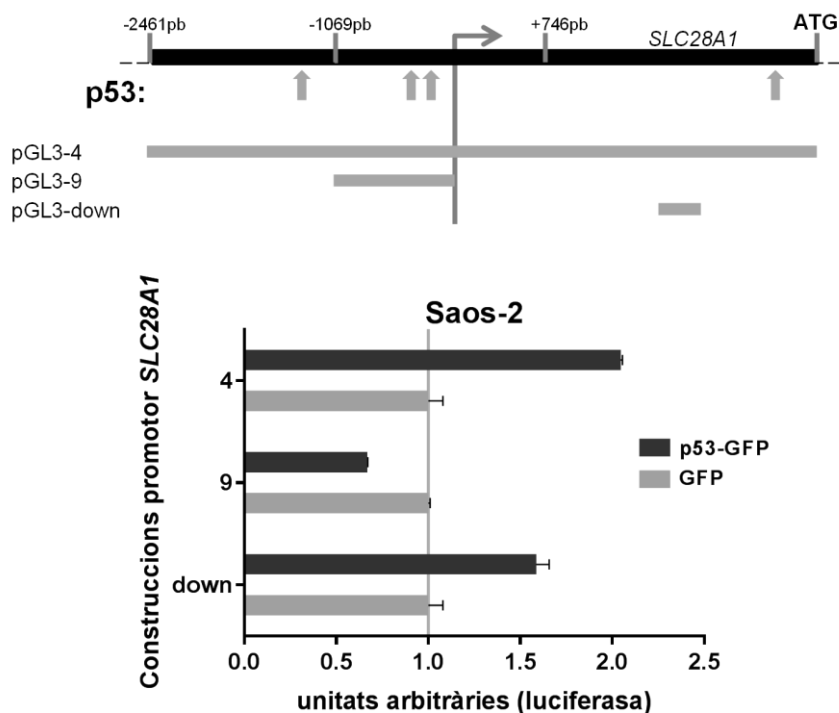


Figura 72. L'expressió de p53 a Saos2 sembla revertir la repressió de la construcció 4 i augmentar l'activitat del fragment down. Les cèl·lules van ser sembrades, a les 24 hores co-transfectades amb els vectors indicats i 48 hores més tard lisades. Es representen valors luciferasa i no renilla, relativitzats al valor de cada construct + GFP, indicat amb la línia vertical. Les barres representen la mitjana ± SD de tres triplicats (n=1).

De la mateixa manera que amb KLF6, es va proposar analitzar l'expressió d'hCNT1 en condicions de modulació de l'expressió de p53. Abans, però, calia tenir en compte l'estatus de p53 de cadascuna de les línies cel·lulars. La IARC TP53 Database recull dades del perfil de p53 en moltes de les línies cel·lulars emprades en recerca. La Taula 21 compila les dades de les línies cel·lulars emprades en aquest bloc obtingudes d'aquest consorci.

Línia cel·lular	Estatu <i>s</i> TP53	Exó	cDNA	Proteïna
HepG2	WT	-	WT	WT
Huh7	Mutat	Exó 6	c.659A>G	p.Y220C
HT-29	Mutat	Exó 8	c.818G>A	p.R273H
NP-29	WT	-	WT	WT
Saos-2	Null	Exó 2 - Deleció	-	-

Taula 21. Estat del gen TP53 i la repercussió a nivell proteic en les línies cel·lulars indicades. Dades de IARC TP53 Database, International Agency for Research on Cancer – excepte NP-29, obtingudes a partir de resultats previs del grup.

A continuació es va procedir a modular l'expressió de p53 a les línies cel·lulars Huh7, HepG2, HT-29, NP-29 i Saos-2. Es van presentar dificultats experimentals relacionades amb les línies NP-29 i Saos-2. Per un cantó, el silenciament no semblava funcionar a la línia NP-29 (Figura 73A). No era el primer cas del laboratori de dificultats de silenciament o transfecció en una línia derivada d'adenocarcinoma ductal pancreàtic. Per tant, es va descartar provar de silenciar p53 en aquesta línia. Per altra banda, les Saos-2 presentaven dificultats per obtenir suficient RNA per poder ser analitzat posteriorment. Així doncs, es va analitzar l'efecte de la modulació de p53 sobre l'expressió d'hCNT1 a les línies restants (Figura 73B). La modulació més evident es donava a la línia Huh7, en què el silenciament de p53 induïa una tendència a augmentar l'expressió d'hCNT1 d'un quatre vegades, mentre que la sobreexpressió de p53-GFP produïa una disminució de l'expressió d'hCNT1. Els canvis van ser menors a la resta de línies. Tant a HepG2 com a HT-29, el silenciament de p53 indicava una tendència a la disminució de l'expressió d'hCNT1, mentre que la sobreexpressió incrementava lleugerament hCNT1.

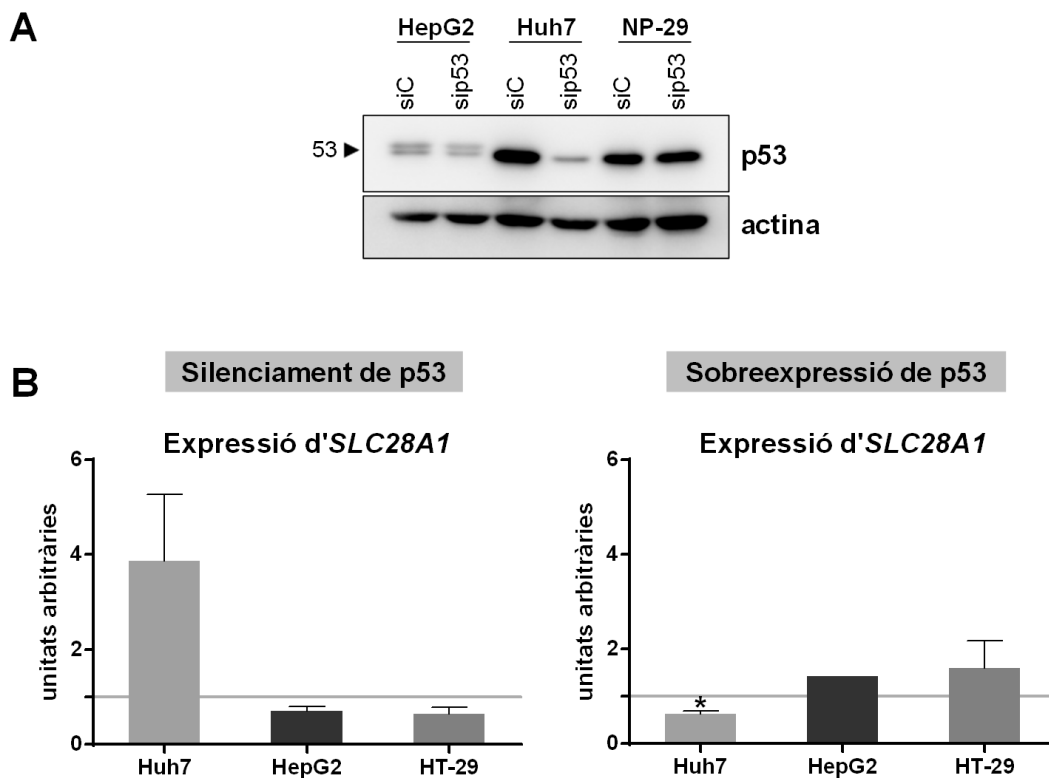


Figura 73. La modulació de p53 varia l'expressió d'hCNT1 segons la línia cel·lular. (A) Comprovació del silenciament de p53 mitjançant western blot. (B) Anàlisi de l'expressió d'hCNT1 a nivell d'mRNA en condicions de silenciament de p53 (esquerra) o sobreexpressió de GFP-p53 (dreta). Les cèl·lules es van sembrar i l'endemà es van silenciar o transfectar. Les barres representen la mitjana \pm SEM d'experiments independents ($n=3$, excepte HT-29 sip53 que és $n=2$ i HepG2 sobreexpressant p53 que és $n=1$), referides al valor siRNA control o transfecció del vector buit, respectivament, indicats amb la línia horitzontal en cada cas. L'estadística es va mesurar amb un test t-Student per a mostres aparellades en comparació amb el control, amb significació $*p<0,05$.

Tant Huh7 com HT-29 són mutants per a p53, però Huh7 té la mutació p.Y220C, mentre que HT-29 té la mutació p.R273H. Les mutacions del gen *TP53* es classifiquen en dues categories, de manera general. La primera implica canvis en el domini d'unió amb el DNA (DBD), de manera que aquestes mutacions impediran la interacció entre p53 i el DNA. Aquesta categoria inclou les mutacions en els residus 175, 242, 248, 249, 273 i 282, de les quals les mutacions a les posicions 175, 248 i 273 són les més comunes en pacients amb càncer – es consideren *hotspots* (Olivier et al. 2010). Com que p53 exerceix la seva funció en forma de tetràmer, la mutació p53R273H exerceix de dominant negatiu: en formar part del tetràmer n'impedeix la unió al DNA. En aquests casos p53 està incapacitat de funcionar com a supressor de tumors, de manera que pot adquirir funcions oncogèniques a través d'un mecanisme de guany de funció (Muller and Vousden 2013). De fet, s'ha descrit que el *knockdown* de p53R273H reverteix totalment la migració i capacitat invasiva de les cèl·lules en comparació al control (Lv et al. 2017a). La segona categoria comprèn aquelles mutacions que causen canvis dràstics en l'estructura de p53 per desestabilització, ja que la majoria alteren el centre hidrofòbic. S'han trobat 9 mutacions d'aquest tipus, entre les quals destaca Y220C. Aquest residu reté la capacitat d'unió al DNA; de fet, a 20°C té un 68% de capacitat d'unir-s'hi, però a 37°C p53Y220C és desnaturalitzat (Sundar et al. 2019). Les proteïnes desnaturalitzades tendeixen a produir agregats, que tenen efectes tòxics. En aquest cas, les mutacions per desestabilització de l'estructura estan sent estudiades com a diana per a la síntesi de compostos que puguin revertir la desestabilització i per tant recuperar la funció p53 WT (Joerger and Fersht 2007; Baud et al. 2018).

Analitzant la tendència d'expressió d'hCNT1 a HepG2, la qual és p53-WT, es van observar els canvis que s'esperarien si p53 fos activador de l'expressió d'hCNT1: una certa disminució quan se silenciava p53 i un cert augment en transfectar-lo. El fet que la disminució d'expressió d'hCNT1 després del silenciament fos tan petita podria explicar-se pel fet que el silenciament de p53 era molt subtil, tal i com mostra el western blot (Figura 73A).

La línia cel·lular HT-29 presenta un p53-mutant que exerceix de dominant negatiu. En transfectar p53-WT, l'efecte que s'observaria seria mínim, ja que p53-mutant endogen estaria segrestant-ne la funció. Per altra banda, s'esperaria que el silenciament sí que interferís en les funcions oncogèniques de p53-mutant. Respecte l'expressió d'hCNT1, es va observar una lleugera tendència a la disminució. Amb aquestes dades no es pot saber si es tracta d'un efecte directe de silenciar p53-mutant o és un efecte indirecte. A més, s'hauria de combinar el silenciament amb la introducció de p53 WT a les cèl·lules.

En quant a la línia cel·lular Huh7, es va veure com el silenciament de p53 era molt bo, i la conseqüència era un augment de l'expressió d'hCNT1 (Figura 73). Això semblaria indicar que el mutant Y220C present a p53 tindria un efecte repressor sobre el gen *SLC28A1*. Per altra banda, la transfecció de p53-WT disminuïa l'expressió d'hCNT1. De la mateixa manera que en HT-29, el mutant p53-Y22C exerciria de dominant negatiu. Per tant, si p53-WT tingués funció activadora sobre l'expressió d'hCNT1, el mutant no permetria analitzar-ho en aquesta línia cel·lular. A diferència d'HT-29, però, en aquest cas l'expressió d'hCNT1 disminuïa. p53-mutat d'Huh7 conté també la variant P72R, la qual afecta l'estructura de la proteïna quan és WT. S'ha vist que la coexistència d'aquesta variant amb p53-mutant produeix pitjor prognosi en càncers de pit (Basu et al. 2018), ja que, entre altres, inactiva l'apoptosi a través de p73 (Marin et al. 2000). Si l'efecte de p53 sobre el promotor d'*SLC28A1* fos indirecte, aquest doble mutant d'Huh7 podria afectar altres elements reguladors de l'expressió d'hCNT1, els quals podrien explicar les diferències entre Huh7 i HT-29.

Una segona hipòtesi implica el factor de transcripció E2F1. El rol d'aquest factor de transcripció en l'expressió d'hCNT1 està estudiat en l'apartat 5 d'aquesta tesi. S'ha descrit que p53 i E2F1 interaccionen, i presenten regulació recíproca (Inoue et al. 2016). De fet, E2F1 promou la transcripció de p14^{ARF}, el qual s'uneix directament a HDM2 i estableix i activa p53 (revisat a Poppy Roworth et al. 2015). En condicions de silenciament de p53 a les Huh7 es va observar una lleugera disminució d'expressió del factor de transcripció E2F1 (Figura 74). Les dades detallades en l'apartat 5 demostren que E2F1 és un factor de transcripció repressor del gen *SLC28A1*. Per tant, es podria explicar l'efecte de silenciar p53 a Huh7 a través de la disminució d'E2F1, de manera que el promotor d'*SLC28A1* estaria menys reprimat i per tant augmentaria l'expressió d'hCNT1. Cal plantejar nous experiments per a validar aquesta hipòtesi.

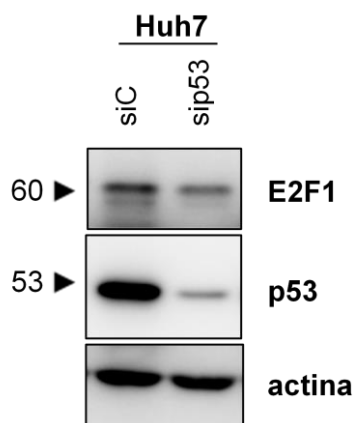


Figura 74. El silenciament de p53 induïx una disminució de l'expressió d'E2F1 a Huh7. Extractes proteics totals d'Huh7 després de 48 hores de silenciament de p53.

Per altra banda, recentment s'ha relacionat la funció de p53 com a activador gènic amb la marca d'histones H3K4me3. De les marques d'histones relacionades amb processos de transcripció, potser la més estudiada és H3K4me3, la qual està associada a gens transcripcionalment actius (Santos-Rosa et al. 2002). Tanmateix, estudis recents qüestionen que aquest residu sigui causa de transcripció i proposen que n'és conseqüència; en altres paraules, hi ha altres factors que determinen quins gens són transcrits en un context cel·lular determinat, i arrel de la transcripció apareix la marca H3K4me3 (revisat a Howe et al. 2017). Una de les evidències que va propiciar aquest canvi de perspectiva va ser la relació entre p53 i H3K4me3. En un estudi es van identificar els gens que presentaven un augment de la transcripció com a conseqüència de l'expressió de p53-WT. Es va detectar, a més, que les marques H3K4me3 d'aquests gens augmentaven al doble. Així, es va proposar que la transactivació efectuada per p53 constava de dos passos: primer, la unió de p53 al seu motiu en el DNA, i segon l'increment d'H3K4me3 en els gens (Menendez et al. 2013).

Dades del GenBank indiquen que el gen *SLC28A1* presenta tres *loci* associats al residu H3K4me3, dos dels quals es troben molt propers a l'inici de transcripció, i el tercer a 1kb *downstream* (Figura 75A). Aquestes marques han estat detectades a fetge i ronyó, dos dels teixits que més expressen hCNT1. Per tant, es podria intuir una relació entre la presència d'aquesta modificació epigenètica i l'expressió d'hCNT1. Així doncs, es va provar d'immunoprecipitar aquest residu a la línia cel·lular Huh7, derivada d'hepatocarcinoma, però no es va aconseguir. En saber d'aquesta nova perspectiva del residu H3K4me3 i la seva relació amb p53, es va repetir l'assaig amb la línia cel·lular NP-29, que és p53-WT. Els resultats van demostrar que 534pb *downstream* del TSS hi ha una seqüència associada a la marca d'histones H3K4me3 (Figura 75B).

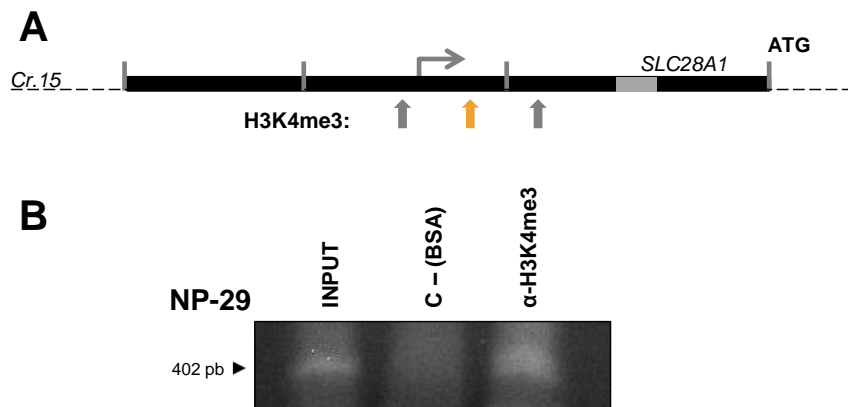


Figura 75. L'assaig d'immunoprecipitació de la cromatina contra el residu H3K4me3 demostra que les NP-29 presenten aquesta senyal prop del TSS d'*SLC28A1*. Les cèl·lules es van sembrar i a les 48 hores es va procedir a realitzar l'assaig ChIP. Dels tres *loci* putatius associats a la marca H3K4me3, només va donar positiu l'indicat amb la fletxa taronja, amplificat amb els primers H3K4me3 FW2 5'TAGCTGGGACTACAGGCACCT3' i H3K4me3 RV2 5'AAGTGCTGGGATTACAGGCA 3'.

Ara bé, en la línia cel·lular NP-29 l'expressió d'hCNT1 continua sent molt reduïda. Amb les dades presentades s'intueix la participació de p53 en l'expressió d'hCNT1, i fins i tot una relació amb la marca H3K4me3. Tanmateix, falta trobar factors repressors de l'expressió d'hCNT1 que expliquin el baix nivell d'expressió d'aquest transportador en tumors.

5. Paper d'E2F1 en la regulació dels transportadors de nucleòsids

5.1 Introducció

L'eix CDK4-pRB-E2F1 és primordial per a la regulació del cicle cel·lular. En arribar un estímul mitogen, CDK4 s'activa; aleshores, el complex ciclina D1-CDK4/6 promou la progressió de la fase G₁ del cicle cel·lular mitjançant la inactivació de la proteïna Rb a través d'hiperfosforilació. Rb forma un complex amb E2F1 de caràcter repressor, del qual també hi formen part sovint altres proteïnes com histones desacetilases o altres enzims relacionats amb l'estatus de la cromatina (Fabrizio et al. 2002; Fajas et al. 2010). En ser hiperfosforilat, pRb allibera E2F1, el qual s'activa i recluta coactivadors com DP als promotors, donant lloc així a la transcripció de gens clau per a la progressió del cicle (Sharpless and Sherr 2015; Gennaro et al. 2018). Com que E2F1 és diana de si mateix, la seva activació conseqüent a la dissociació d'Rb fa que de seguida hi hagi més E2F1 actiu a la cèl·lula, de manera que s'assegura la progressió de G₁. Entre les dianes d'E2F1 hi ha gens implicats en la replicació del DNA, en la mitosi, en la reparació del DNA i en l'apoptosi (Poppy Roworth et al. 2015). Per assegurar la progressió a fase S, E2F1 és reprimat per la ciclina E, la qual té un pic d'expressió a G₁/S, i per ciclina A, el pic d'expressió de la qual és a la fase G₂ (Schulze et al. 1995; Zhang et al. 2000)). En paral·lel, s'activa la proteïna fosfatasa 1 (PP1), la qual promou la desfosforilació de pRb i per tant, aquest passarà a unir-se a E2F1 formant de nou un complex que reprimeix sobretot els gens de progressió cel·lular (revisat a Kolupaeva and Janssens 2013).

L'alteració de l'eix CDK4-pRb-E2F1 està associada a molts tipus de càncer degut a l'estreta relació amb el cicle cel·lular. Els complexos CDK-ciclina estan desregulats en tumorigènesi (Deshpande et al. 2005). En concret, CDK4-ciclina D1 presenta activitat més elevada, ja sigui per sobreexpressió de ciclina D1 (Sheppard and McArthur 2013) o de CDK4. De fet, la sobreexpressió de CDK4 és considerada un *driver* oncogènic en la majoria de càncers humans, i sol aparèixer per ampliació gènica, per mutacions puntuals o inactivació de la maquinària de degradació (Qie and Diehl 2016). El paper de p16 també és important, ja que es tracta d'una proteïna que s'uneix a CDK4 per inhibir la seva activitat quinasa i per tant inhibir la fosforilació d'Rb. Un dels mecanismes de sobreexpressió de CDK4 és una mutació puntual en el lloc d'unió de p16, que fa que la quinasa sigui insensible a la inhibició (Wölfel et al. 1995). El gen *CDKN2A* (locus INK4B/ARF/INK4A) codifica dos proteïnes considerades supressores de tumor, p14^{ARF} i p16^{INK4a}. S'ha descrit que un 90-98% de les cèl·lules derivades d'adenocarcinoma ductal pancreàtic presenten una pèrdua de funció d'aquest gen, ja sigui per mutacions o hipermetilació del promotor (Tang et al. 2015). Per altra banda, *RB1* (gen que codifica Rb) va ser el primer gen supressor de tumors identificat per la seva relació amb la predisposició al retinoblastoma

(revisat a Dimaras and Corson 2019), principalment pel seu rol inhibint E2F1 i per tant evitant la transcripció dels gens de progressió del cicle cel·lular (revisat a Vélez-Cruz and Johnson 2017). Degut al seu domini *pocket*, Rb és una proteïna multifuncional de la qual s'han descrit interaccions vàries a través de les quals no només regula el cicle cel·lular sinó que també regula altres activitats cel·lulars com la replicació del DNA, la senescència, la diferenciació i l'apoptosi (Knudsen and Knudsen 2006). Així, la desregulació d'Rb està considerada un dels *hallmarks* del càncer. La pèrdua de funció d'Rb pot ser conseqüència de l'augment de l'activitat de CDK4 com s'ha mencionat, però també de delecions gèniques o mutacions en el gen *RB1*, que en ser un gen de mida considerable (unes 200kb) és relativament fàcil que hi hagi fenòmens d'aparicions de senyal STOP prematures o delecions internes (Di Fiore et al. 2013). Pel que fa E2F1, dades del *Catalogue of Somatic Mutation in Cancer* (COSMIC) revelen que només s'han descrit 43 mutacions somàtiques del gen *E2F1*, molt poques comparat amb les 1143 d'*RB1* o 7716 de *TP53* (Poppy Roworth et al. 2015). Hi ha dades contradictòries sobre si la família E2F és de caràcter oncogènic o supressor de tumors (Kent and Leone 2019). E2F1 majoritàriament ha estat descrit com oncogènic, i de fet s'ha relacionat la seva sobreexpressió amb pitjor prognosi, com recentment en hepatocarcinoma i adenocarcinoma ductal pancreàtic (Kent et al. 2016; Kent et al. 2017; Lan et al. 2018). Estudis de models animals amb sobreexpressió d'E2F1 indiquen que la predisposició a càncer està vinculada a l'absència de p53 funcional, ja que E2F1 és un regulador positiu de l'activitat de p53 (Pierce et al. 1998; Pierce et al. 1999).

Els transportadors de nucleòsids han estat relacionats amb el cicle cel·lular i amb l'estat proliferatiu de les cèl·lules. Es poden considerar els NT com el primer pas de la via de recuperació, ja que constitueixen la porta d'entrada dels nucleòsids a les cèl·lules. Per aquest motiu és lògic pensar que en situacions d'alta demanda de dNTPs, com en la fase S del cicle cel·lular en què s'ha de replicar el DNA, l'entrada de nucleòsids hauria de ser major. S'ha detectat en línies cel·lulars que l'expressió d'hCNT1 augmenta en fase S, i s'interpreta com a la resposta a la necessitat d'incrementar els *pools* de dNTPs (Valdés et al. 2002). En canvi, s'ha observat que en fase G₂-M hi ha el doble d'expressió d'hENT1 que en fase G₁ (Baldwin et al. 2004), moment en què ja ha tingut lloc la replicació. Per altra banda, hENT2 i les seves variants d'*splicing* més curtes han estat identificades com a elements clau per regular el *pool* de nucleòsids nucliocitoplasma, de manera que proveeixen el nucli de nucleòsids per a la síntesi de DNA i assegurar així la progressió del cicle cel·lular (Grañé-Boladeras et al. 2016).

Les cèl·lules del tracte gastrointestinal fa evident la relació entre l'expressió dels transportadors de nucleòsids i l'estat proliferatiu de les cèl·lules. hENT1 i hENT2 són més abundants en les cèl·lules de la cripta, que són les cèl·lules més proliferatives, mentre que hCNT1 i hCNT2 es

troben més expressats als enteròcits fent la funció d'absorció, que són les cèl·lules totalment diferenciades (Pastor-Anglada et al. 2018). A més, cèl·lules altament proliferatives com ho són les cèl·lules tumorals presenten pèrdua d'expressió dels hCNTs, sobretot hCNT1. S'ha descrit com la restitució d'hCNT1 a línies cel·lulars tumorals derivades d'adenocarcinoma pancreàtic redueix la progressió de cicle cel·lular en què les cèl·lules s'acumulen a fase S (Pérez-Torras et al. 2013).

En posar en comú tots aquests antecedents es proposa que l'eix CDK4-pRb-E2F1 contribueix a la regulació dels transportadors de nucleòsids.

5.2 Antecedents: l'eix CDK4-pRb-E2F1 en el metabolisme

En els últims anys han anat sorgint evidències que els mateixos agents que regulen el cicle cel·lular poden regular processos metabòlics. Tant és així que s'han descrit funcions per a CDK4 i E2F1 destacades en el metabolisme homeostàtic i tumoral.

La quinasa CDK4 s'ha postulat com a reguladora de l'homeòstasi energètica (Aguilar and Fajas 2010). Aquesta regulació l'exerceix a través de diferents efectius. El primer de tots és a través de l'eix pRb-E2F1, que a més de participar en el cicle cel·lular contribueix a la regulació del metabolisme oxidatiu (Blanchet et al. 2011) També s'ha descrit que CDK4 és capaç de promoure la glicòlisi anaeròbica i reprimir la oxidació d'àcids grassos mitjançant la fosforilació d'AMPK en models de ratolí (Lopez-Mejia et al. 2017). CDK4 participa en la resposta a insulina; en adipòcits de ratolí, la insulina activa el complex CDK4-ciclina D3, el qual fosforila el receptor d'insulina substrat 2 (IRS2), a través del qual es crea un *loop* de feedback positiu que manté la senyalització de la insulina (Lagarrigue et al. 2016). Recentment s'ha descrit que CDK4 regula també la via d'mTOR, ja que s'ha vist que aquesta quinasa és necessària per tal que mTORC1 pugui localitzar en els lisosomes (la via mTOR s'activa en aquest orgànu). A més, els efectes de CDK4 sobre l'activitat d'mTORC són independents d'E2F1 (Martínez-Carreres et al. 2019).

Per la seva banda, E2F1 participa en la diferenciació de diversos teixits. Recentment també s'han descrit funcions de regulació metabòlica específiques en òrgans ja diferenciats com pàncrees, teixit adipós, múscul o fetge (revisat a Denechaud et al. 2017). Segons si el teixit és sa o tumoral, la participació d'E2F1 en la regulació del metabolisme difereix. La Figura 76 esquematitza quines són les principals vies regulades per E2F1 en els teixits indicats. E2F1 participa en la secreció d'insulina, tant pel desenvolupament de les cèl·lules β com per la secreció d'insulina mitjançant la regulació de Kir6.2 (Fajas et al. 2004; Annicotte et al. 2009). A fetge, E2F1 afavoreix la síntesi d'àcids biliars, la glicòlisi i la lipogènesi, mentre que inhibeix el transport de colesterol.

Recentment també s'ha descrit que E2F1 promou la gliconeogènesi de manera dependent de PKA (Giralt et al. 2018). En teixit adipós blanc està més relacionat amb promoure adipogènesi a través de PPAR γ i RIP140, però inhibeix la lipòlisi i la β -oxidació mitocondrial (Fajas et al. 2002; Abella et al. 2005; Docquier et al. 2012; Liew et al. 2013). Es va trobar en models de ratolí que E2F1 reprimeix la diferenciació muscular inhibint MyoD i miogenina (Wang et al. 1996). A partir de dades de CHIP s'ha trobat que el complex repressor pRb-E2F1 reprimeix el metabolisme oxidatiu en aquest mateix teixit, així com a múscul cardíac i teixit adipós marró; en aquest últim inclou la termogènesi (Blanchet et al. 2011).

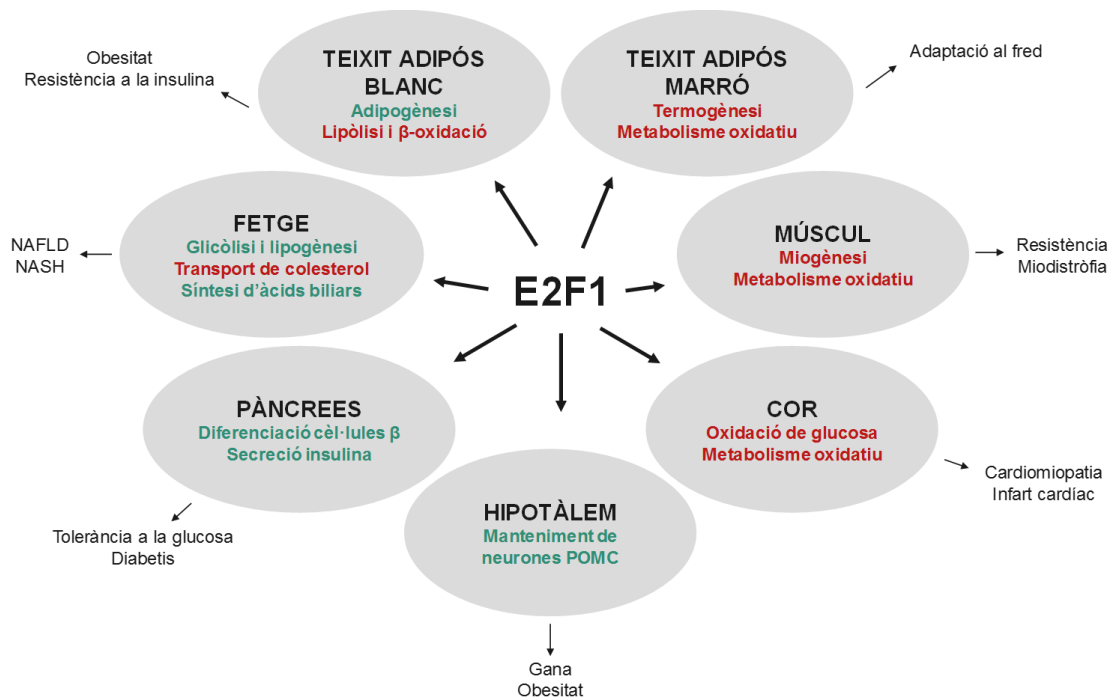


Figura 76. Funcions principals d'E2F1 en teixits metabòlics. E2F1 participa en la diferenciació de diversos teixits, però també en la regulació de funcions metabòliques específiques en òrgans ja diferenciats. S'especifiquen quins contextos fisiopatològics han estat relacionats amb E2F1 segons el teixit. Adaptat de Denechaud et al. 2017.

E2F1 també és important en el context de processos patològics en els diferents teixits esmentats anteriorment. És el cas de l'obesitat, en què s'ha trobat que els nivells d'E2F1 estan incrementats en teixit adipós blanc visceral dels pacients amb obesitat, amb correlació positiva amb la resistència d'insulina i els nivells d'àcids grassos lliures circulants (Haim et al. 2015). S'ha relacionat E2F1 amb la resposta gènica a l'estrès en teixit adipós blanc durant la progressió d'obesitat (Haim et al. 2017), amb la resposta inflamatòria regulada per NF- κ B (Warg et al. 2012) i amb hipertròfia cardíac que pot conduir a infart de miocardi (Vara et al. 2003; Wang et al. 2015). S'ha demostrat també la participació d'E2F1 en la malaltia del fetge greixós no alcohòlic (NAFLD), ja que s'han trobat nivells d'E2F1 hepàtic elevats en pacients amb fetge esteatòtic i

una correlació significativa entre la fosforilació de pRb a fetge i l'aparició de NAFLD en diferents models de ratolí d'obesitat i diabetis (Denechaud et al. 2016). En definitiva l'activitat E2F1 és incrementada en context d'obesitat, i contribueix a algunes de les co-morbiditats associades a aquesta condició.

La reprogramació metabòlica en cèl·lules tumorals és un dels *hallmarks* del càncer, ja que les cèl·lules tumorals adapten el seu metabolisme per tal de promoure el creixement, la proliferació, la supervivència i la metastasi. L'anomenat efecte Warburg consisteix en un increment de la glicòlisi aeròbica i reducció de l'oxidació de la glucosa, afavorint així la ràpida producció d'energia. Les conseqüències de l'efecte Warburg són una enorme consum de glucosa i una gran producció de lactat per part de les cèl·lules tumorals (Schwartz et al. 2017). S'ha demostrat que E2F1 pot promoure el canvi metabòlic, és a dir, afavorir l'efecte Warburg, donat que pot afavorir la glicòlisi i reprimir l'oxidació de la glucosa a nivell de mitocondri, tal i com s'ha demostrat en hepatocarcinoma (Tarangelo et al. 2015) i cèl·lules tumorals de pàncrees (Wang et al. 2016).

El transportador concentratiu de nucleòsids hCNT2, mitjançant la seva interacció amb aldolasa B i GRP58, ha estat relacionat amb el metabolisme energètic (Huber-Ruano et al. 2010). Per altra banda, es va detectar en models de rata que l'estat energètic cel·lular regula l'activitat de CNT2 a través de l'activació purinèrgica del receptor d'adenosina A1 (Dufлот et al. 2004). Aquests antecedents posicionen hCNT2 com a possible regulador del metabolisme. La disminució d'expressió d'hCNT2 en fenotips tumorals va donar peu a la hipòtesi que la participació d'hCNT2 en el metabolisme energètic de la cèl·lula anava en sentit contrari a l'efecte Warburg, i que per tant la restitució de la funció hCNT2 podria atenuar el canvi metabòlic de la cèl·lula tumoral.

El fetge és un dels teixits en què s'expressa hCNT2, i E2F1 ha estat relacionat amb afavorir l'efecte Warburg en hepatocarcinoma. Així, es va hipotetitzar que E2F1 podria estar modulant els nivells d'hCNT2. Per aquest motiu, la primera prova realitzada va ser mesurar els canvis d'expressió del gen *SLC28A2* en condicions de sobreexpressió d'E2F1 en tres línies derivades d'hepatocarcinoma (BCLC-3, BCLC-5 i Huh7), a una línia derivada d'hepatoblastoma (HepG2) i una línia derivada d'adenocarcinoma colorectal (HT-29). Els resultats mostren com E2F1 no modula l'expressió del transportador de purines hCNT2 en cap dels casos; només la línia BCLC-5 mostra certa tendència a disminuir l'expressió a conseqüència de la sobreexpressió d'E2F1 (Figura 77).

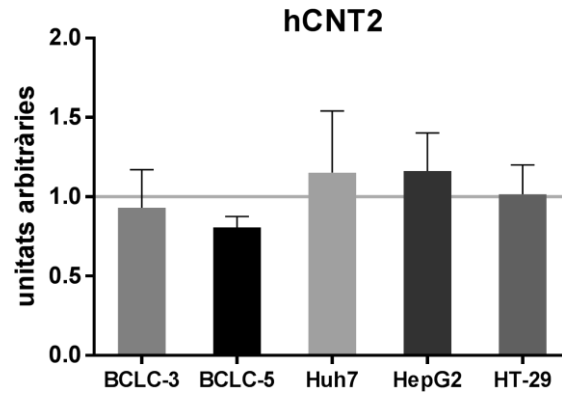


Figura 77. La sobreexpressió d'E2F1 no modula l'expressió del transportador concentratiu de nucleòsids hCNT2. Les cèl·lules van ser sembrades i transfectades l'endemà amb el vector pSGL5HA (control) o pSGL5HA-E2F1, durant 48 hores. Els resultats estan referits a la condició control, representada amb la línia horitzontal. Les barres representen la mitjana \pm SEM de tres experiments independents. L'estadística es va mesurar amb un test T d'Student per a mostres aparellades entre control i sobreexpressió d'E2F1.

E2F1 també ha estat relacionat amb el metabolisme anabòlic. Anteriorment s'ha mencionat la relació entre CDK4 i mTORC1, però E2F1 també participa de l'activitat d'aquest complex. E2F1 promou l'expressió de la v-ATPasa lisosomal, que és clau per al funcionament de la via. Conseqüentment, es bloqueja l'autofàgia (Meo-Evoli et al. 2015). D'aquesta manera mTORC1 pot efectuar el seu rol central en l'homeòstasi metabòlica, en què regula la síntesi de lípids, proteïnes, la glicòlisi, les biogènesis mitocondrial i lisosomal i la síntesi de nucleòtids (revisat a Murugan 2019). Per altra banda, E2F1 *per se* també ha estat relacionat amb la síntesi de lípids i de nucleòtids, processos que es relacionen amb afavoriment de la metàstasi i la divisió cel·lular. E2F1 promou un increment de l'expressió de la sintasa d'àcids grassos (FASN) en cèl·lules progenitores i medul·loblastoma (Bhatia et al. 2011). A més, afavoreix la síntesi de nucleòtids mitjançant la regulació de la timidina quinasa (Li et al. 1994) i la dihidrofolat reductasa (Slansky et al. 1993).

Així doncs es va voler determinar el paper d'E2F1 en el metabolisme de nucleòsids. Arrel d'aquest fet es va iniciar una col·laboració amb el laboratori del Dr. Lluís Fajas, del centre de Genòmica Integrativa de la Universitat de Lausanne, Suïssa. El grup del Dr. Fajas va realitzar un anàlisi ChIP-seq per E2F1, en el qual van analitzar una sèrie d'enzims del metabolisme de nucleòtids d'interès per al nostre grup. Es van efectuar dos anàlisis, un més restrictiu que l'altre. El menys restrictiu va indicar que E2F1 ocupa els promotors dels gens *SLC29A2* (hENT2), *PPAT* (fosforibosil pirofosfat amidotransferasa), *PRPS1* (fosforibosil pirofosfat sintasa 1), *HPRT1* (hipoxantina fosforibosiltransferasa 1) i *UMPS* (uridina monofosfat sintasa). L'anàlisi més restrictiu va indicar la presència d'E2F1 en els promotors dels gens *SLC29A1* (hENT1) i *CAD*

(carbamoïl-fosfat sintetasa 2, aspartat transcarbamilasa i dihidroorotasa). Per tant, els resultats suggerien la participació d'E2F1 en la regulació de la síntesi de nucleòtids per la via *de novo* (regulant CAD) i també per la via de recuperació (regulant hENTs i HPRT1).

Així doncs, de la mateixa manera que s'havia fet amb hCNT2 es va voler valorar la modulació de l'expressió d'hENT1, ja que en resultar positiu en el ChIP-seq més restrictiu és un resultat amb major confiança. La sobreexpressió d'E2F1 no va mostrar cap canvi respecte l'expressió d'hENT1 en cap de les línies emprades (Figura 78).

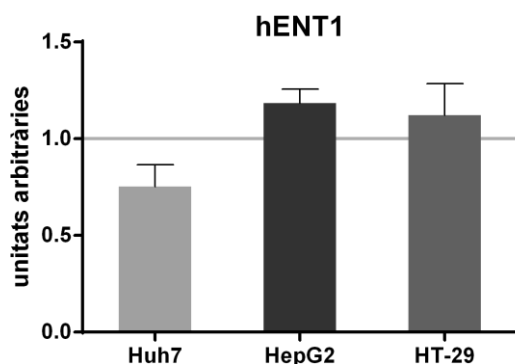


Figura 78. La sobreexpressió d'E2F1 no modula l'expressió del transportador equilibratiu de nucleòsids hENT1. Les cèl·lules van ser transfectades amb el vector pSGL5HA (control) o pSGL5HA-E2F1, durant 48 hores. Les barres representen la mitjana \pm SEM de tres experiments independents referida al control, representat amb la línia horitzontal. L'estadística es va mesurar amb un test t-Student per a mostres aparellades entre control i sobreexpressió d'E2F1.

Per tant, els antecedents suggerien que E2F1 podria jugar un paper en la modulació dels transportadors de nucleòsids, sobretot hENT1 per la seva vinculació en l'estat proliferatiu de les cèl·lules i els resultats previs provinents de ChIP-seq. Tanmateix, els resultats obtinguts sobreexpressant E2F1 no mostraven aquesta relació entre factor de transcripció i transportador.

5.3 Modulació de l'expressió dels transportadors de nucleòsids per abemaciclib

Abemaciclib (LY2835219, Verzenio) (Figura 79A) forma part dels fàrmacs anomenats inhibidors de CDK de tercera generació, juntament amb Palbociclib (PD0332991, Ibrance) i Ribociclib (LEE011, Kisqali). Els inhibidors de CDK han resultat molt efectius com a tractament contra el càncer. Tanmateix, els anomenats inhibidors de primera (Flavopiridol, Roscovitine) o de segona (Dinaciclib) generació presentaven una citotoxicitat molt elevada, la qual ha estat disminuïda amb l'aparició dels fàrmacs de tercera generació (revisat a Poratti and Marzaro 2019).

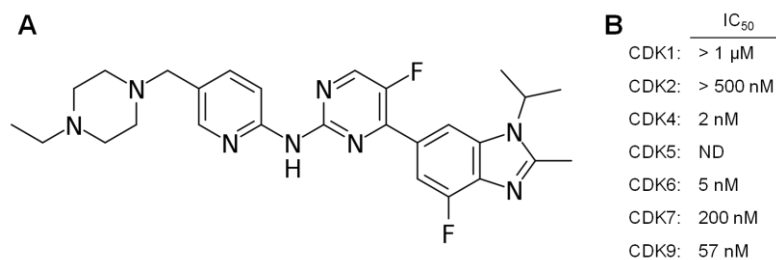


Figura 79. Abemaciclib. (A) Estructura química. (B) IC₅₀ trobades per a les diferents quinases de cicle cel·lular. Adaptat de Poratti & Marzaro, 2019.

Abemaciclib és un inhibidor dels enzims CDK4/6, tal i com indiquen els valors d'IC₅₀ (Figura 79B). Conseqüentment, suprimeix la fosforilació de Rb i indueix un arrest de cicle cel·lular en fase G₁. Presenta una elevada bioassequibilitat oral, i el punt de màxima efectivitat és 4-24 hores després de ser administrat (revisat a Poratti and Marzaro 2019). Aquest fàrmac va ser aprovat per la FDA per al tractament de càncer de pit ER-positiu (Patnaik et al. 2016; Torres-Guzmán et al. 2017), i actualment es troba Fase II d'assajos clínics per al tractament d'adenocarcinoma ductal pancreàtic, tant sol com amb combinació de l'inhibidor de PI3K (NCT02981342 ClinicalTrials.gov) (Dhir et al. 2019). A més, l'eficàcia d'abemaciclib ha estat testada en càncer de pulmó (Patnaik et al. 2016), càncer d'esòfag (Kosovec et al. 2017) i càncers de teixits tous (Dowless et al. 2018).

Degut a la projecció dels tractaments amb inhibidors de CDK4/6 i la possible relació entre l'eix CDK4-pRb-E2F1 i els transportadors de nucleòsids, es va decidir comprovar si l'expressió dels transportadors podia ser modulada pel tractament amb aquests inhibidors.

En primer lloc es van analitzar dades d'experiments *in vivo* realitzats al laboratori del Dr. Lluís Fajas en els quals es van tractar els ratolins amb palbociclib. Les mostres dels *in vivo* eren obtingudes per altres finalitats, però van ser cedides per analitzar els possibles canvis d'expressió dels transportadors de nucleòsids. Es van analitzar 3 experiments independents que presentaven pautes de tractament diferents en quant a dosi, temps de tractament i dejuni, així com diferent temps entre el tractament i l'obtenció de la mostra. Es van detectar canvis de l'expressió dels transportadors de nucleòsids en tots els experiments. Atès que les condicions experimentals no eren les mateixes, els canvis trobats també eren diferents en cada cas, i no es va poder extreure cap conclusió. Així doncs, es va decidir buscar un model més senzill per a estudiar els canvis en l'expressió dels transportadors de nucleòsids deguts a l'acció dels inhibidors de CDK4/6, com són les línies cel·lulars tumorals.

Els primers experiments es van realitzar amb palbociclib, però no es va detectar eficàcia del fàrmac en els models cel·lulars emprats. Per tant, es va decidir comprovar l'efecte d'abemaciclib.

Abans, però, calia establir el temps de tractament amb ABM a través de l'anàlisi de l'efecte del fàrmac sobre components de l'eix CDK4-pRb-E2F1. En inhibir CDK4, l'efecte d'ABM s'havia de reflectir mitjançant la hipofosforilació de pRb i per tant, menys E2F1 alliberat. En ser diana de si mateix, l'expressió d'E2F1 també hauria de disminuir. La sobreexpressió d'E2F1 s'havia relacionat amb pitjor prognosi en hepatocarcinoma i adenocarcinoma ductal pancreàtic, així que per aquest motiu es van escollir 4 línies cel·lulars: Huh7 (HCC), HepG2 (Hepatoblastoma), CP15T (PDAC) i NP-9 (PDAC). Com que el pic d'efectivitat d'ABM es trobava a les 4-24 hores, es van escollir els temps 6 hores i 24 hores per comprovar si realment eren suficients per a modular l'eix CDK4-pRb-E2F1. Addicionalment es van afegir els temps 48 i 72 hores per analitzar l'efecte d'ABM a temps més llargs. A totes les línies testades es va poder identificar una reducció considerable de la fosforilació de pRb, major a 24 hores que a 6 hores (Figura 80A). Es va comprovar l'efecte sobre E2F1 en les línies Huh7 i HepG2, i també es va poder observar com disminuïa l'expressió (Figura 80B). Tanmateix, a HepG2 l'efecte semblava ser menor als temps més llargs, en què la disminució és molt més subtil. Degut a què els temps més curts ja es mostraven efectius i a la incertesa de què passa amb E2F1 a HepG2 a temps més llargs, es va escollir els temps 6 i 24 hores per a procedir amb l'estudi.

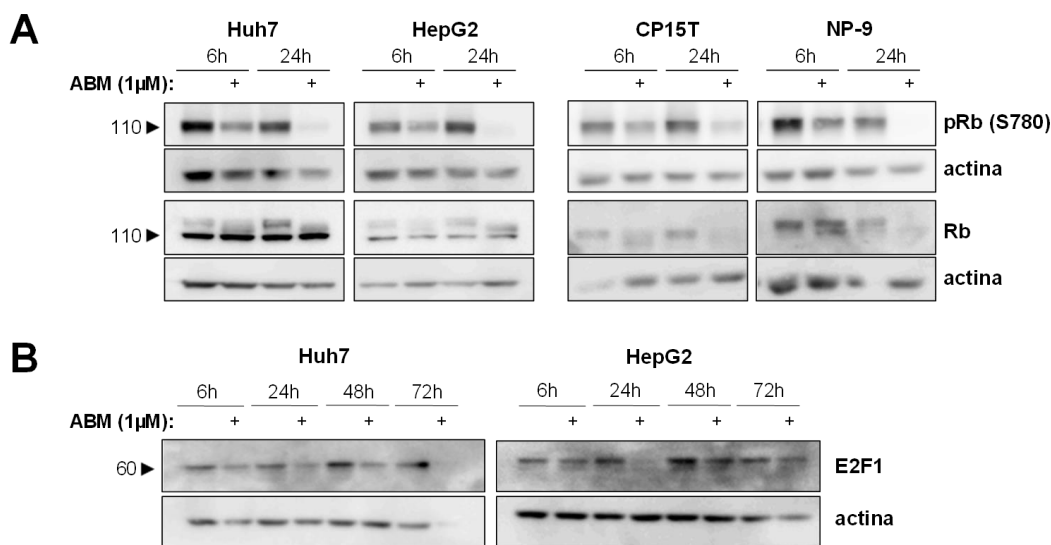


Figura 80. El tractament amb abemaciclib produeix canvis en les proteïnes de l'eix CDK4-pRb-E2F1. Extractes proteics totals de cèl·lules tractades amb ABM 1µM durant els temps indicats. Es mostra un blot representatiu de 3 experiments independents. (A) Anàlisi del nivell de fosforilació de pRb i Rb total. (B) Anàlisi de l'expressió d'E2F1.

Per altra banda, el tractament amb ABM també produïa canvis en el cicle cel·lular, tal i com s'ha identificat en altres casos (Dhir et al. 2019). A les 6 hores l'acumulació a fase G₁ és molt subtil, però a les 24 hores de tractament s'observa com la majoria de cèl·lules es troben en fase G₁ i n'hi ha molt poques que estiguin ciclant (Figura 81).

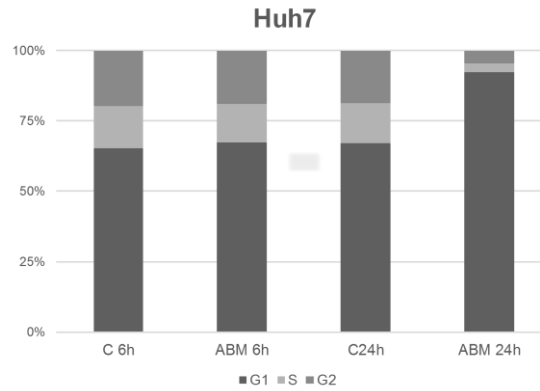


Figura 81. El tractament amb abemaciclib produeix acumulació de les cèl·lules en fase G₁. Les cèl·lules van ser tractades amb ABM 1μM durant el temps indicat i posteriorment fixades amb etanol absolut durant 24 hores. Es van tenyir amb iodur de propidi i posteriorment van ser analitzades per citometria de flux. Es representa la mitjana de 3 experiments independents.

A continuació es va procedir a analitzar si ABM modulava l'expressió dels transportadors de nucleòsids a nivell d'mRNA (Figura 82).

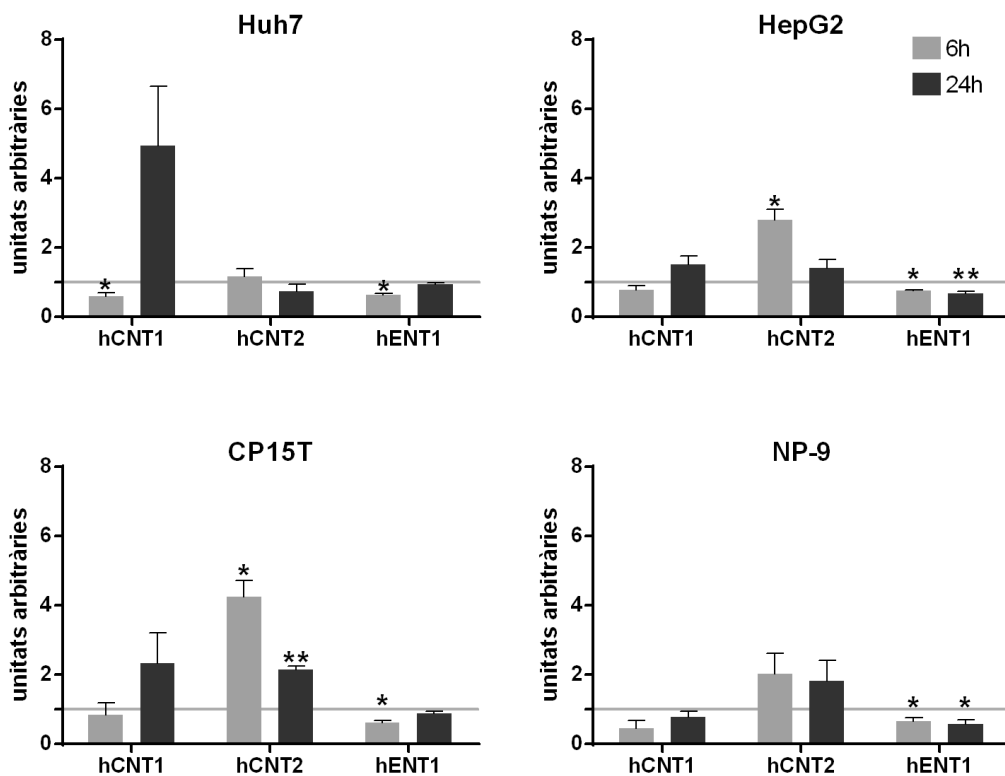


Figura 82. Abemaciclib modula l'expressió dels transportadors de nucleòsids hCNT1, hCNT2 i hENT1 en diferents línies cel·lulars. Les cèl·lules van ser tractades amb ABM 1μM durant els temps indicats. Es va relativitzar l'anàlisi d'mRNA a una condició control sense tractament, indicada amb la línia horitzontal. Les barres representen la mitjana ± SEM d'experiments independents (n=3-4). La significació estadística es va determinar mitjançant test t-Student aparellat; * p<0.05, **p<0.01.

Els transportadors concentratius es comportaven de manera diferent segons la línia cel·lular i el temps de tractament. En el temps de 6 hores hCNT1 no canviava o fins i tot disminuïa a Huh7, mentre que a les 24 hores l'increment d'expressió era més elevat, excepte a NP-9 que no variava. En canvi, hCNT2 es comportava de forma contrària: a les 6 hores l'augment era més gran que a les 24 hores a HepG2 i CP15T; a Huh7 pràcticament no variava, mentre que a NP-9 tendia a augmentar de manera semblant en els dos punts temporals. Per altra banda, els canvis en l'expressió d'hENT1 eren més homogenis entre les línies cel·lulars testades. Es va observar una disminució de l'expressió al temps 6 hores, mantinguda fins les 24 hores a HepG2 i NP-9. En canvi, a Huh7 i CP15T semblava que l'expressió d'hENT1 tornava als nivells del control a les 24 hores.

En la comprovació de l'efecte del fàrmac s'havia vist com el tractament romania efectiu a les 48 hores, de manera que es va decidir analitzar la modulació de l'expressió dels transportadors de nucleòsids hCNT1, hCNT2 i hENT1 a aquest temps més llarg de tractament. Es va observar com la tendència observada a les 6 i a les 24 hores es mantenia a les 48, sobretot a Huh7 (Figura 83).

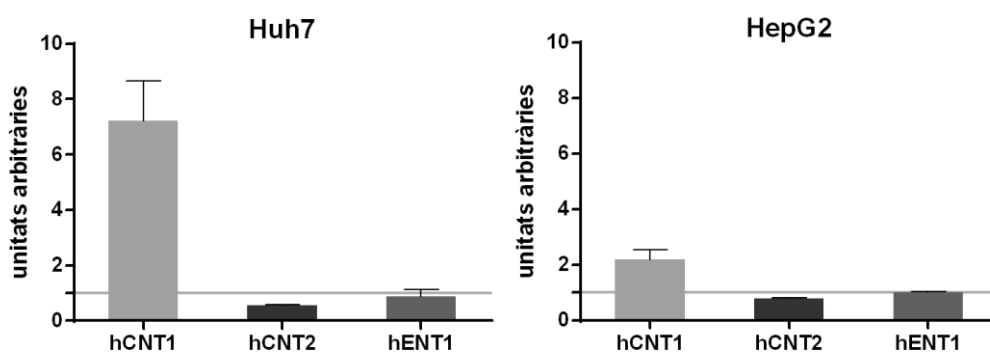


Figura 83. El tractament amb abemaciclib sembla modular l'expressió dels transportadors hCNT1 i hCNT2 a les 48 hores de tractament. Les cèl·lules van ser sembrades i l'endemà tractades amb ABM 1 μ M durant 48 hores. Es va relativitzar l'anàlisi d'mRNA a una condició control sense tractament, indicada amb la línia horitzontal. Les barres representen la mitjana \pm SEM d'experiments independents (n=2).

L'expressió del transportador de pirimidines hCNT1 augmentava unes 7 vegades a les 48 hores de tractament a Huh7, mentre que l'augment era menor a HepG2. La diferència entre ambdues línies es podria explicar per l'aparent menor efectivitat del tractament a HepG2, tal i com mostrava que la reducció d'expressió d'E2F1 no era tant significativa com en els temps 6 i 24 hores (Figura 82). Així doncs, la tendència que seguia l'expressió d'hCNT1 era d'augment, superior a mesura que es prolongava el temps de tractament. Pel que fa hCNT2, a les 48 hores semblava que hi havia disminució de la seva expressió comparat amb el control, a ambdues línies

cel·lulars. En aquest cas, la tendència semblaria indicar que hi hauria un pic primerenc d'increment d'expressió que es perdria en el temps i fins i tot acabaria disminuint l'expressió del transportador concentratiu específic de purines. En canvi, l'expressió d'hENT1 semblava mostrar-se invariable a les 48 hores de tractament. Cal recalcar que s'havia vist com a les 24 hores de tractament les cèl·lules ja estaven arrestades a fase G₁ del cicle, de manera que a 48 hores probablement ho estiguin molt més. Per aquest motiu, i per les diferències observades entre transportadors concentratius i transportadors equilibratius, es va decidir continuar l'anàlisi dels temps 6 i 24 hores.

Es va procedir a comprovar si els canvis detectats a nivell d'mRNA també eren detectats a nivell de proteïna, a la línia cel·lular Huh7. Tal i com s'ha comentat en l'apartat 3.4, la manca d'un anticòs adequat per a la detecció d'hCNT2 no permet mesurar aquest transportador a nivell proteic, de manera que es van analitzar hCNT1 i hENT1. Degut a la dificultat de detectar hCNT1 endogen, es va forçar el western blot resolent 100µg de proteïna, tal i com s'havia realitzat en l'apartat 3. Es van detectar múltiples bandes entre els pesos moleculars de 50 i 75 kDa, però no es van detectar diferències entre control i tractament en cap dels dos temps (Figura 84A). Per altra banda, l'expressió d'hENT1 a les línies cel·lulars permet detectar-lo per western blot. Tanmateix, el tractament amb abemaciclib no va mostrar canvis d'expressió d'aquest transportador a nivell proteic (Figura 84B). La reducció de l'expressió a nivell d'mRNA era molt petita; si la vida mitjana del transportador tendeix a ser més aviat llarga, aleshores els temps de 6 o 24 hores potser no serien suficients per a detectar la disminució a nivell de proteïna.

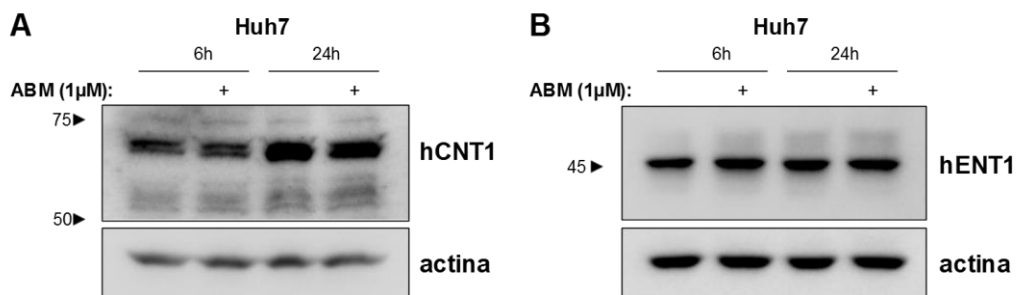


Figura 84. No es detecten canvis a nivell de proteïna dels transportadors hCNT1 i hENT1 en condicions de tractament amb abemaciclib. Anàlisi dels transportadors mitjançant western blot a Huh7. (A) Es van resoldre 100µg de proteïna total. Es va immunodetectar hCNT1 endogen i actina com a control de càrrega. (B) Resolució de 20µg de proteïna total. Es va comprovar l'expressió d'hENT1 i d'actina com a control endogen.

En paral·lel es va determinar si ABM induïa canvis en l'activitat dels transportadors de nucleòsids a Huh7. Les línies cel·lulars no presenten activitat dels transportadors concentratius de nucleòsids degut a la seva baixa expressió. Sí que s'ha detectat expressió i activitat dels

transportadors equilibratius. Com que els canvis d'expressió d'hCNT1 i hCNT2 seguien tendències diferents, es va optar per analitzar la translocació de citidina, la qual no és transportada per hCNT2. El primer anàlisi es va realitzar als temps de tractament 6 i 24 hores, però per a 6 hores no es va detectar transport concentratiu en cap de les condicions. Tot i l'augment a nivell d'mRNA detectat, no es van observar canvis a nivell de proteïna, el qual podria explicar la manca de transport d'hCNTs a les 6 hores de tractament. Així doncs, es va prosseguir l'anàlisi mantenint 24 hores i afegint el punt de 48 hores, ja que en aquest últim temps s'havia detectat un augment considerable de l'expressió d'hCNT1. Tant l'activitat dels hCNTs com la dels hENTs semblava disminuir a ambdós temps, de forma més acusada en el cas dels equilibratius (Figura 85).

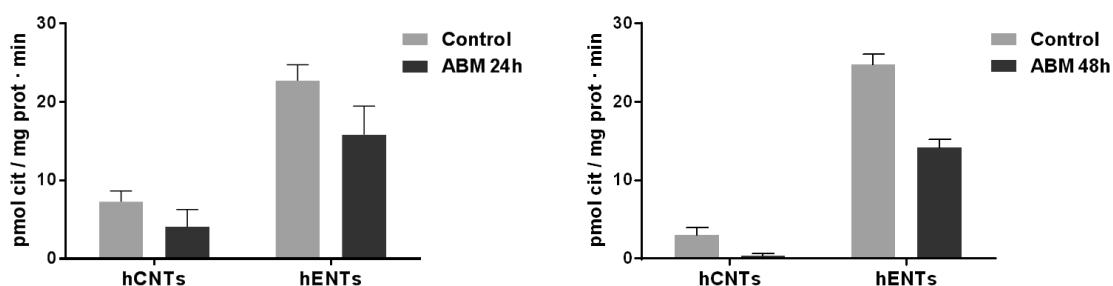


Figura 85. El tractament amb abemaciclib mostra una tendència a disminuir el transport dels hCNTs i dels hENTs a Huh7. Es va analitzar el transport després dels temps de tractament indicats amb ABM 1 μ M. L'activitat dels hCNTs es mesura mitjançant l'entrada de citidina tritiada a les cèl·lules, calculada a partir de la diferència de valors entre un medi ric en sodi i un medi ric amb colina. L'activitat dels hENTs es mesura calculant la diferència d'entrada de citidina tritiada en un medi colina sense i amb dipiridamol. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm SEM (n=3). La significació estadística es va determinar mitjançant test t-Student aparellat.

Els resultats d'activitat dels transportadors concentratius no seguien la mateixa línia que els resultats d'expressió. En primer lloc no es van detectar canvis a nivell de proteïna, de manera que no s'esperarien canvis a nivell d'activitat. Tanmateix, es va observar una tendència a disminuir la translocació de substrat tritiat. La citidina és internalitzada per hCNT3 a més d'hCNT1, i fins el moment no s'havia tingut en compte el paper d'aquest transportador. La reducció del transport concentratiu podria ser deguda a una disminució de l'expressió d'hCNT3, emascarant així l'augment d'hCNT1. Per tant, es va analitzar hCNT3 a les mostres tractades amb abemaciclib a les 6 i a les 24 hores. No es va detectar expressió d'hCNT3 en cap de les condicions a Huh7. De fet, aquest transportador de nucleòsids no s'expressa en hepatòcits.

Per altra banda, els transportadors equilibratius sí que presentaven activitat reduïda en condicions de tractament amb ABM durant 6 hores així com a les 24 hores (amb citidina). Cal tenir en compte que aquests valors inclouen el transport dependent d'hENT2. Es van mesurar

els canvis d'aquest transportador i no es van detectar canvis en capt dels dos punts temporals de tractament.

En aquest apartat s'ha detectat una modulació de l'expressió dels transportadors de nucleòsids conseqüent al tractament amb ABM, un inhibidor de CDK4/6. Tanmateix, les dades no indiquen si E2F1 és l'agent efector d'aquests canvis o si hi hauria algun altre actor participant. Palbociclib és un altre inhibidor de CDK4/6 (Poratti and Marzaro 2019). Actualment està aprovat per la FDA per al tractament de càncer de pit avançat i es troba en Fase II d'assajos clínics pel tractament d'hepatocarcinoma en pacients intolerants a sorafenib (NCT01356628). Es creia que els efectes de Palbociclib (PLB) es donaven a través de l'eix CDK4-pRb-E2F1. Un estudi comparatiu entre les línies cel·lulars Huh7 i Hep3B va mostrar que en ambdós casos el tractament de PLB induïa apoptosi, però la línia Hep3B era Rb-null i per tant els efectes no podien estar regulats per l'eix pRb-E2F1. Es va determinar que l'eix PP5/AMPK (és a dir, l'activació d'AMPK) és clau per a la sensibilitat de les cèl·lules a PLB (Hsieh et al. 2017). Per tant, abemaciclib podria estar actuant de la mateixa manera que palbociclib influint en vies que no són les esperades per a un inhibidor de CDK4. Conseqüentment, es podrien estar modulant altres factors influents en l'activitat dels transportadors, com proteïnes implicades en la correcta maduració o proteïnes d'interacció, i per tant els canvis a nivell d'mRNA no es veurien reflectits en l'activitat dels transportadors.

5.4 E2F1 com a regulador dels transportadors de nucleòsids

S'ha demostrat com la inhibició farmacològica de CDK4/6 regula l'expressió dels transportadors de nucleòsids hCNT1, hCNT2 i hENT1. Tanmateix, no s'ha demostrat si aquesta regulació està intercedida per l'eix CDK4-pRb-E2F1 o per alguna altra via de senyalització.

En els antecedents s'havia determinat que la sobreexpressió d'E2F1 no produïa canvis en l'expressió d'hCNT2 ni d'hENT1 (Figures 77 i 78), únicament es podia intuir certa tendència de disminuir hENT1 a Huh7. Així doncs, es va procedir a analitzar l'efecte de la sobreexpressió d'E2F1 durant 48 hores en l'expressió d'hCNT1. Es van emprar les línies Huh7 i HepG2, prèviament emprades per l'anàlisi amb ABM, i es va afegir HT-29, derivada d'adenocarcinoma colorectal, ja que s'havia emprat per analitzar la majoria de factors de transcripció en l'apartat anterior. Es va poder observar com l'expressió d'hCNT1 era fortament reprimida a Huh7 i HT-29, mentre que a HepG2 els resultats varen ser més variables (Figura 86). Aquests resultats anticipaven un paper repressor d'E2F1, almenys en Huh7 i HT-29.

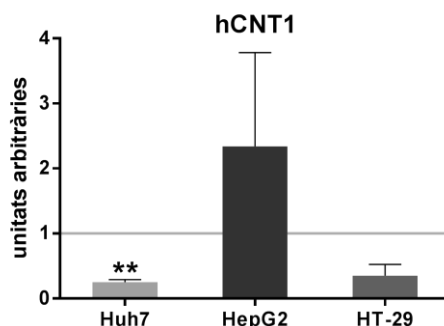


Figura 86. La sobreexpressió d'E2F1 disminueix l'expressió d'hCNT1 a la línia Huh7. Les cèl·lules van ser sembrades i transfectades l'endemà amb el vector pSGL5HA (control) o pSGL5HA-E2F1, durant 48 hores. Els resultats estan referits a la condició control, representada amb la línia horitzontal. Les barres representen la mitjana \pm SEM de tres experiments independents. L'estadística es va mesurar amb un test T d'Student per a mostres aparellades entre control i sobreexpressió d'E2F1; ** $p < 0.01$.

El següent pas va ser comprovar si realment E2F1 exercia un paper repressor mitjançant el silenciament d'aquest factor de transcripció. S'esperava que el silenciament d'E2F1 produís un efecte semblant a l'ús d'ABM, ja que inhibir CDK4 redueix la fosforilació de pRb i per tant hi ha menys E2F1 lliure que pugui exercir la seva funció. Per tant es va procedir a silenciar E2F1 durant 48 hores. Degut a dificultats de la tècnica no es va poder silenciar durant els temps de 6 i 24 hores, ja que el siRNA no és efectiu amb tant poc temps d'actuació. El silenciament a les 48 hores va resultar ser òptim (Figura 87A). L'expressió dels transportadors també variava després del silenciament (Figura 87B).

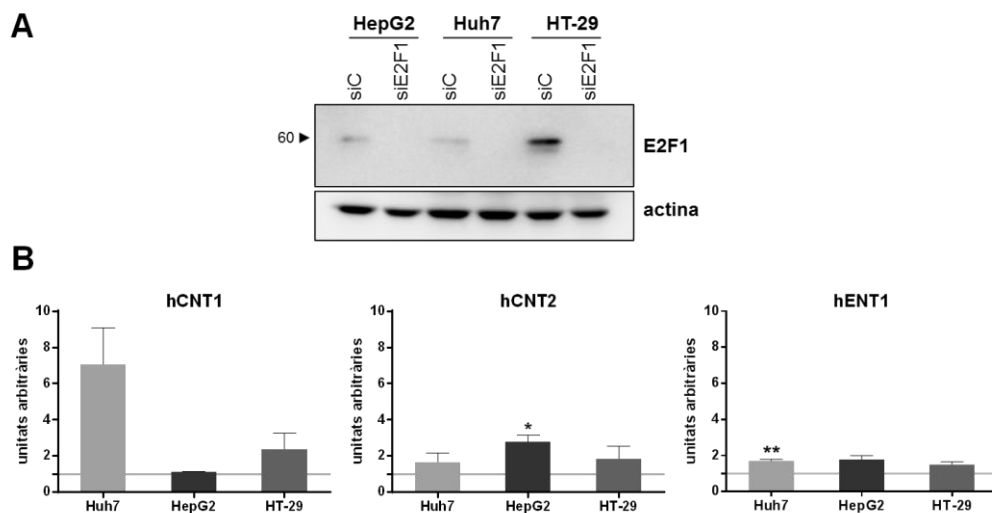


Figura 87. El silenciament d'E2F1 modula l'expressió d'hCNT1, hCNT2 i hENT1. (A) Comprovació per western blot de l'eficàcia del silenciament d'E2F1. (B) Anàlisi per RT-PCR de l'expressió dels transportadors hCNT1, hCNT2 i hENT1 a nivell d'mRNA. Les cèl·lules van ser sembrades i l'endemà silenciades amb siRNA control o siRNA per E2F1, i a les 48 hores es van processar les mostres. L'expressió en cada cas està referida al valor de siRNA control, representat per la línia horitzontal. Les barres mostren la mitjana \pm SEM d'experiments independents ($n=3-4$). L'estadística es va determinar per tests T Student de mostres aparellades; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

El canvi més evident era l'augment d'expressió d'hCNT1 a Huh7 després del silenciament. A HT-29 també semblava intuir-se un increment del doble, mentre que a HepG2 l'expressió d'hCNT1 es mostrava invariable. Aquests resultats s'assemblen molt als mostrats en el subapartat anterior, ja que el tractament amb ABM durant 48 hores produïa un augment d'expressió d'hCNT1 d'aproximadament 7 vegades a Huh7 (Figura 83), pràcticament el mateix que en silenciar E2F1. La semblança entre els dos resultats indicava que E2F1 era intermediari dels efectes d'inhibir farmacològicament CDK4. Respecte hCNT2, a Huh7 i HT-29 l'expressió es va mantenir força constant en silenciar E2F1. A HepG2, però, va mostrar un augment significatiu d'aproximadament 3 vegades. En la figura anterior (Figura 86) s'havia observat com la sobreexpressió d'E2F1 a HepG2 semblava induir un augment de l'expressió d'hCNT2, i en aquesta s'aprecia un augment d'hCNT2 després de silenciar E2F1. El problema potser es troba en què sobreexpressar una proteïna en un sistema en què aquesta mateixa proteïna presenta nivells elevats podria generar un estat de saturació i per tant no veure els canvis esperats. Pel que fa hENT1, en les tres línies cel·lulars es va observar com el silenciament augmentava l'expressió d'hENT1, de manera significativa a Huh7. Tanmateix, aquests augments són molt petits. Per tant, amb aquests resultats es va proposar que E2F1 regulava l'expressió d'hCNT1, hCNT2 i hENT1 amb funció repressora.

Es va procedir a comprovar si els canvis detectats a nivell d'mRNA es traduïen a canvis a nivell de proteïna, de manera que es va mesurar l'expressió proteica mitjançant western blot d'hCNT1 i hENT1, a les 48 i a les 72 hores de silenciament. Es va afegir aquest últim temps per si l'augment observat a nivell d'mRNA a les 48 hores es reflectia més tard a nivell de proteïna. Els resultats d'hCNT1 van mostrar un doblet d'uns 70kDa i una banda a uns 60kDa (Figura 88A). El doblet semblava disminuir d'expressió en silenciar E2F1, mentre que l'expressió de la banda de 60 augmentava. En el primer bloc d'aquesta tesi s'ha discutit sobre les múltiples bandes d'hCNT1 detectades per western blot. Si la banda de 60kDa correspon a la proteïna naixent, aleshores aquests resultats indicarien que el transportador hCNT1 augmenta en silenciar E2F1. Respecte hENT1, el silenciament durant 48 hores semblava intuir un lleuger augment de l'expressió d'aquest transportador equilibratiu, mentre que a 72 hores no es detecten canvis (Figura 88B). La diferència entre els dos temps podria deure's a què el silenciament d'E2F1 afectés altres proteïnes vinculades a l'expressió d'hENT1 amb vides mitjanes més llargues.

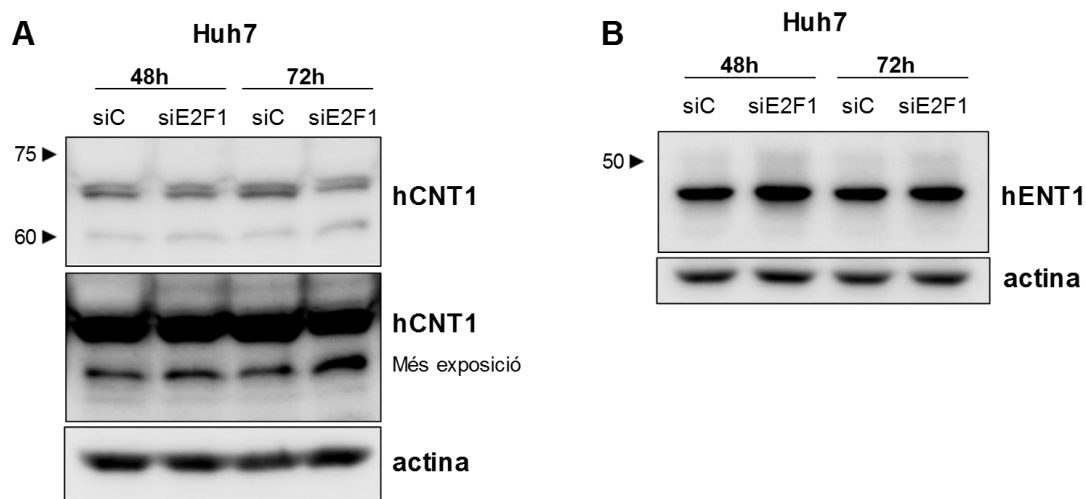


Figura 88. El silenciament d'E2F1 exerceix una modulació molt subtil de l'expressió dels transportadors hCNT1 i hENT1 a nivell proteic. E2F1 es va silenciar durant els temps indicats. (A) Anàlisi de 100µg de proteïna total. Es mostren dos temps d'exposició diferents per a detectar hCNT1 endogen. (B) Anàlisi de 20µg de proteïna total per a detectar hENT1.

Així doncs, s'ha vist que el silenciament d'E2F1 produeix increment d'expressió a nivell d'mRNA d'hCNT1, hCNT2 i hENT1, i pel cas d'hCNT1 els efectes són molt semblants al tractament amb abemaciclib durant 48 hores. El següent pas seria comprovar els efectes del *knockdown* d'E2F1 a temps més curts, i especular així si els efectes que s'han vist per abemaciclib estan mitjançants per E2F1. Una opció seria un CRISPR d'E2F1 induïble, un sistema en què el *knockout* fos induït només per acció farmacològica (Aubrey et al. 2015). D'aquesta manera es podrien analitzar tant els efectes a curt termini com els efectes d'una posterior restitució d'E2F1.

En l'apartat anterior s'havien definit diferents fragments dels promotors dels gens *SLC28A1* i *SLC28A2*, que codifiquen hCNT1 i hCNT2 respectivament. Per *SLC28A1* també s'havien indicat els llocs d'unió putatius dels membres de la família E2F, obtinguts a partir de l'anàlisi de la seqüència amb MatInspector. El mateix anàlisi però per *SLC28A2* va mostrar també 5 llocs d'unió putatius de membres de la família E2F (Figura 89).

No s'havia analitzat on hi havia lloc d'unió putatiu per E2F1 en el promotor d'*SLC29A1*, que codifica hENT1. El promotor d'*SLC29A1* ha estat definit en varis treballs. En un principi es va estudiar la zona *upstream* respecte l'inici de traducció, a la qual es van identificar llocs d'unió per a factors de transcripció com PPARα o HIF-1α (Eltzschig et al. 2005; Puebla et al. 2008; Farías et al. 2010; Montero et al. 2012). Un estudi més recent indica 3 zones diferencials amb activitat promotora en el *locus* d'*SLC29A1*, una *upstream* de l'ATG (la ja identificada) i les altres dues a -3,7 i -7,7kb respecte l'ATG (Furihata et al. 2014b). La zona de -3,7kb coincideix amb l'inici de transcripció del gen. Es va procedir a identificar la regió en què es podria unir E2F1 mitjançant

la base de dades ENCODE ANNOTATIONS, i el resultat va ser que la zona putativa es trobava entre -14kb i +309kb respecte l'inici de transcripció (Figura 89).

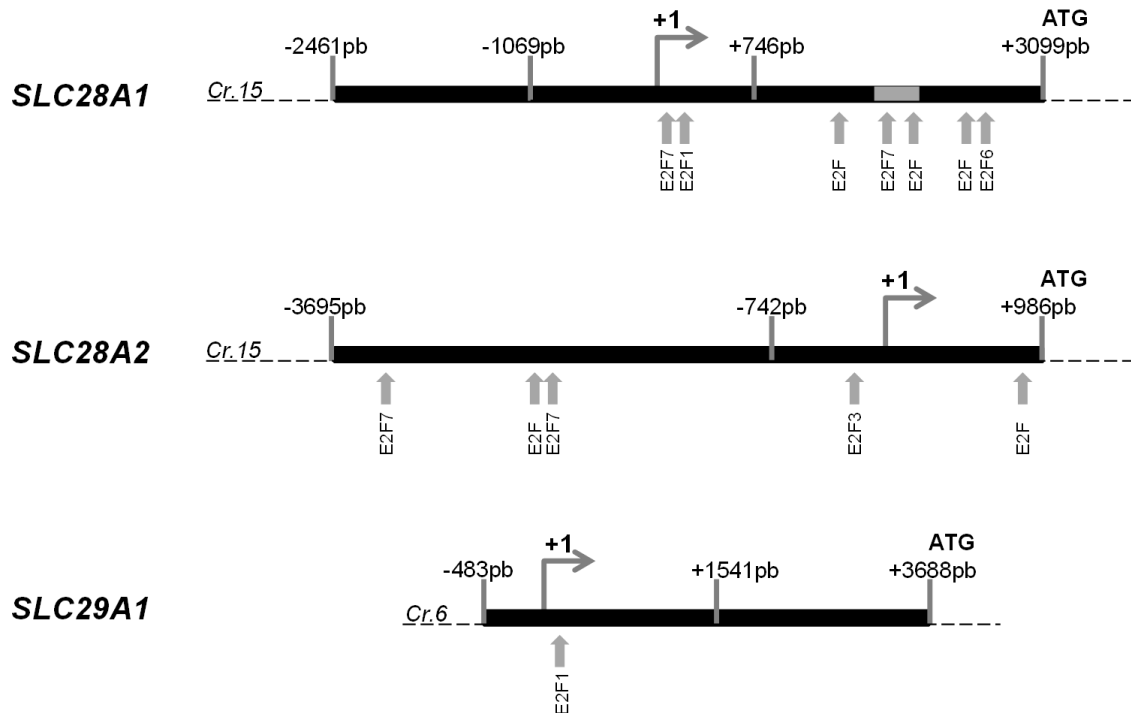


Figura 89. Esquema representatiu dels promotors dels gens *SLC28A1*, *SLC28A2* i *SLC29A1*. S'indiquen el lloc d'inici de transcripció (+1), l'ATG i els llocs putatius d'unió de membres de la família E2F.

Per tant, es va procedir a analitzar l'impacte de la sobreexpressió d'E2F1 sobre l'activitat dels fragments de promotors dels transportadors de nucleòsids (Figura 90). Respecte *SLC28A1*, es van emprar les construccions 7, 12 i *down* per tal d'avaluar l'impacte dels diferents llocs putatius d'unió. La sobreexpressió d'E2F1 semblava tenir un mínim impacte sobre l'activitat luciferasa d'aquests fragments de promotor, tant a Huh7 com a HepG2 (Figura 91A). S'intuïa certa repressió de l'activitat del fragment 12 en ambdues línies cel·lulars, i del *down* a Huh7, però les diferències eren molt baixes. Respecte *SLC28A2*, es va analitzar l'impacte sobre les 4 construccions dissenyades. En aquest cas la repressió de l'activitat promotora era molt evident, sobretot a Huh7, en què totes les activitats disminuïen considerablement. A HepG2 la disminució no era tan dràstica (Figura 91B). El promotor d'*SLC29A1* que tenim al laboratori correspon al clonat a Farías et al. 2010, que comprèn des de +1535 respecte el TSS fins l'ATG. El lloc putatiu d'E2F1 per a *SLC29A1* es troba proper al TSS. Es va provar de mesurar increments en l'activitat luciferasa d'aquest fragment de promotor en condicions de sobreexpressió d'E2F1 i, com era

d'esperar, no es van detectar canvis. Actualment s'està clonant la regió promotora corresponent.

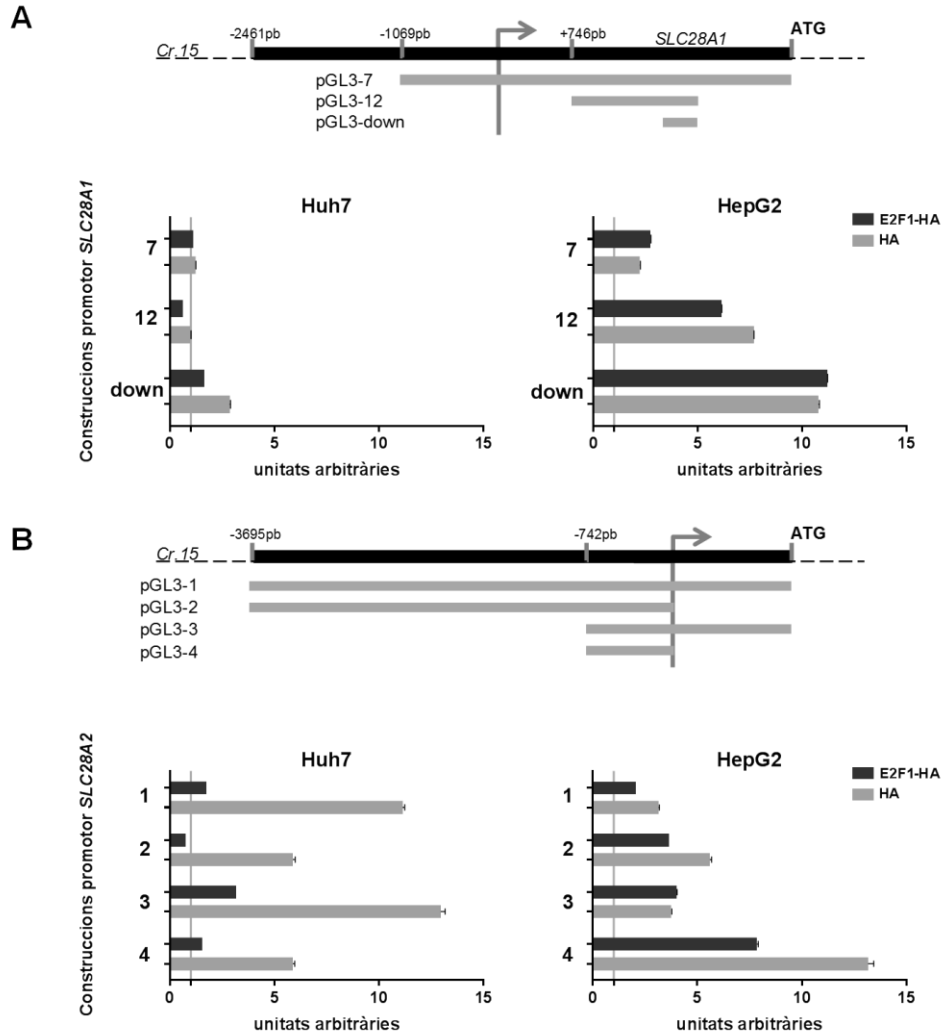


Figura 90. La sobreexpressió d'E2F1 redueix l'activitat de les construccions dels promotors d'SLC28A1 i SLC28A2. Es van co-transfectar les construccions indicades dels promotors d'SLC28A1 (A) i SLC28A2 (B) i pRL-TK, juntament amb els vectors pSGL5HA o pSGL5HA-E2F1. A les 48 hores es va mesurar l'activitat luciferasa (vector pGL3) i renilla (vector pRL-TK). La *ratio* entre ambdues activitats correspon a l'activitat del fragment del promotor. Les dades corresponen a un sol experiment, i les barres representen la mitjana \pm SEM de les rèpliques intraexperimentals.

A continuació es va procedir a determinar si E2F1 s'unia als promotors d'SLC28A1 i SLC29A1. Es va descartar analitzar la unió al promotor d'SLC28A2 per manca de resultats consistents respecte la modulació d'expressió d'hCNT2 en variar els nivells d'E2F1. Les dades de ChIP-seq presentades en els antecedents només havien revelat hENT1 com a candidat, però la modulació de l'expressió d'hCNT1 era més clara, i per això es va analitzar la unió d'E2F1 al promotor d'SLC28A1. Així doncs, es va realitzar un assaig d'immunoprecipitació de la cromatina amb

anticòs específic d'E2F1 a Huh7, i es va determinar mitjançant PCR si s'havia precipitat DNA corresponent als promotors analitzats (Figura 91).

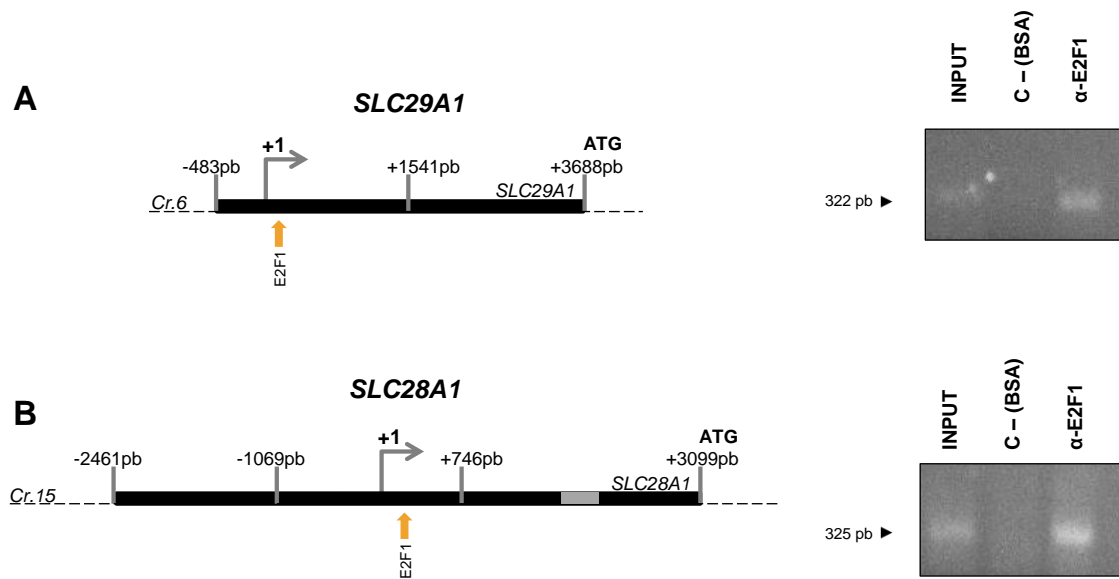


Figura 91. E2F1 s'uneix als promotors d'*SLC29A1* i *SLC28A1*. S'indiquen les localitzacions corresponents dels llocs d'unió d'E2F1 en el promotor d'*SLC29A1* (A) i *SLC28A1* (B), així com el resultat de l'assaig d'immunoprecipitació de la cromatina. La cromatina després del *crosslinking* es va sonicar, i es va immunoprecipitar E2F1 O/N unit a ProteinG Dynabeads. L'endemà es va procedir a l'elució de la cromatina resultant, el *des-crosslinking* i purificació del DNA.

Es va confirmar la unió d'E2F1 al promotor d'*SLC29A1*, en el lloc d'unió indicat per ENCODE ANNOTATIONS (Figura 91A). A més, es va determinar que E2F1 s'unia al promotor d'*SLC28A1*, sent el primer cop que es relacionava aquest factor de transcripció amb hCNT1 (Figura 91B). Es van analitzar tots els llocs putatius de la família E2F, però només va resultar positiu l'indicat amb la fletxa; de fet, els resultats de MatInspector ja havien indicat específicament que E2F1 s'unia en aquest *locus*.

Els resultats presentats en aquest bloc indiquen que el factor de transcripció E2F1 regula l'expressió d'hCNT1 i hENT1. En un principi s'havia especulat que la regulació podria ser diferencial, ja que l'expressió dels transportadors concentratius s'associa a epitelis diferenciats, mentre que l'expressió dels transportadors equilibratius està més associada a proliferació (Pastor-Anglada et al. 2018). Per altra banda, la restitució de cadascun dels transportadors ha estat relacionada amb cicle cel·lular en models tumorals, ja que en restituir hCNT1 les cèl·lules s'arresten en fase S (Pérez-Torras et al. 2013) mentre que en sobreexpressar hENT1 l'arrest es produeix en fase G₁ (Pérez-Torras et al. 2008). S'ha vist que en les mateixes condicions, E2F1 es troba unit alhora al promotor d'*SLC28A1* (hCNT1) i *SLC29A1* (hENT1). En fer un *knockdown* transitori d'aquest factor de transcripció es va determinar que, almenys en Huh7, l'expressió

tant d'hCNT1 com d'hENT1 incrementa; així, les dades suggerien que E2F1 era repressor d'ambdós transportadors de nucleòsids. Val a dir que l'expressió d'hCNT1 augmentava molt més que la d'hENT1, suggerint que la regulació era diferent.

Les dades proporcionades per la inhibició farmacològica amb abemaciclib indiquen que, tal i com s'havia anticipat, la regulació dels hCNTs i dels hENTs no es dona en el mateix sentit. S'ha vist com hi ha increment de l'expressió dels transportadors concentratius de nucleòsids hCNT1 i hCNT2. Aquesta regulació també és diferent, ja que hCNT1 presenta un perfil més tardà, en què l'augment es detecta a les 24 hores, mentre que l'increment d'expressió d'hCNT2 és major a les 6 que a les 24 hores. Per altra banda, l'expressió d'hENT1 està reprimida des de les 6 hores i se sosté fins a les 24 hores. Els canvis observats en hCNT2 i hENT1 no es mantenen a les 48 hores, a diferència d'hCNT1. Tenint en compte les dades del silenciament d'E2F1, els resultats de la inhibició amb abemaciclib suggereixen que E2F1 forma part de complexos reguladors diferents quan s'uneix a *SLC28A1* o a *SLC29A1*. El complex que formen E2F1 i Rb té funcions repressores sobre varis gens, sobretot gens importants en la progressió del cicle cel·lular. Aquestes funcions repressores són exercides mitjançant el bloqueig del reclutament d'elements co-activadors i la unió amb altres elements co-repressors transcripcionals (Vélez-Cruz and Johnson 2017). Els efectes sobre el promotor d'*SLC29A1* es podrien explicar, precisament, per la unió d'E2F1 quan forma part d'un complex co-repressor amb Rb. Abemaciclib inhibeix CDK4, de manera que Rb es troba en estat hipofosforilat i per tant s'afavoreix la formació de complexos repressors Rb-E2F1. Si s'incrementés l'acumulació d'aquests complexos, l'acció repressora sobre el promotor d'*SLC29A1* seria major, i per tant l'expressió d'hENT1 disminuiria, que és el que s'ha observat. Les dades de silenciament d'E2F1 també lligarien amb aquest fet, ja que a menor presència d'aquest factor de transcripció, menor proporció de complexos repressors i per tant pot augmentar l'expressió d'hENT1. Per tal de confirmar-ho caldria realitzar un assaig CHIP amb les mateixes condicions però immunoprecipitant Rb, i comprovar si es detecta el mateix *locus* del promotor d'*SLC29A1*.

Per altra banda, la regulació del gen *SLC28A1* s'anticipa més complexa. E2F1 sembla exercir com a repressor, tal i com indiquen les dades de silenciar aquest factor de transcripció. Tanmateix, les dades del tractament amb abemaciclib suggereixen que, a diferència d'hENT1, la repressió no s'exerciria a través del complex amb Rb sinó que els actors serien diferents. En aquest cas, E2F1 formaria part d'un complex repressor en el que no hi hauria Rb i que caldria determinar. Dins el paper de l'eix CDK4-pRb-E2F1 cal tenir en compte els altres membres de la família E2F. La família E2F està formada per 8 membres en humans. Alguns d'aquests membres, com E2F3, presenten fenòmens d'*splicing* alternatiu que donen lloc a isoformes amb diferents funcions. Els

membres d'E2F es classifiquen en activadors (E2F1-E2F3a), repressors (E2F3b-E2F6) i atípics (E2F7-E2F8); aquests últims també presenten funcions repressores. Tot i que presenten funcions oposades o contràries, en el seu conjunt modulen finament l'activitat de la família E2F i són essencials per a l'homeòstasi normal de les cèl·lules (Kent and Leone 2019). Les dades de MatInspector van revelar dos llocs d'unió putatius per E2F7 i un per E2F8 en el promotor d'*SLC28A1*, mentre que el promotor d'*SLC28A2* presentava dos llocs per a E2F7. No es pot descartar que aquests dos membres també participin de la regulació de l'expressió d'hCNT1. E2F1 incrementa l'expressió d'E2F8 (Christensen et al. 2005; Kent et al. 2016). Tant E2F7 com E2F8 comencen a expressar-se a l'inici de la fase S del cicle cel·lular, i la seva expressió incrementa a fase S tardana (Westendorp et al. 2012). A més, s'ha vist que l'expressió d'E2F8 està incrementada en hepatocarcinoma (Baiz et al. 2014), el qual es relaciona amb el procés d'hepatocarcinogènesi (Lv et al. 2017b). Aquestes dades podrien indicar un possible *loop* repressiu de l'expressió d'hCNT1 mitjançant E2F1-E2F8, tant a cèl·lules normals, en què el pic d'expressió d'hCNT1 a la fase S disminuiria en paral·lel a l'increment d'E2F8, com en cèl·lules tumorals, en què s'ha detectat disminució de l'expressió d'hCNT1 però augment d'E2F8. Per aquest motiu els resultats en hCNT1 són més clars que pels altres transportadors. Caldria explorar aquesta via modulant específicament l'expressió d'E2F8, així com realitzant un ChIP específic per aquest membre no canònic de la família E2F.

La participació d'E2F1 en l'expressió dels transportadors de nucleòsids confirmaria que els efectes d'inhibir CDK4 amb abemaciclib serien realitzats, almenys en part, per E2F1. Tanmateix, no es poden descartar efectes fora de l'eix CDK4-pRb-E2F1 que també puguin modular l'expressió dels transportadors, els quals podrien explicar els canvis en l'expressió d'hCNT2, que no es mostren tan consistents com per a hCNT1 i hENT1.

DISCUSSIÓ GENERAL

En humans, hi ha casos en què proteïnes diferents exerceixen aparentment la mateixa funció. És el cas dels enzims lisina acetil transferasa CBP i p300, o els canals aniònics dependent de voltatge mitocondrials VDAC (Caterino et al. 2017; Lipinski et al. 2019). Quelcom semblant succeeix amb els transportadors de nucleòsids. Estan classificats en dues famílies evolutivament diferents. Per un cantó hi ha la família *SLC29*, que codifica els transportadors equilibratius de nucleòsids (hENTs), en què els seus membres més estudiats, hENT1 i hENT2, presenten expressió ubíqua. Per altra banda, la família *SLC28* codifica els transportadors concentratius de nucleòsids (hCNTs), i inclou els membres hCNT1, hCNT2 i hCNT3, codificats pels gens *SLC28A1*, *SLC28A2* i *SLC28A3* respectivament. Difereixen en quant a la selectivitat de substrat, ja que hCNT1 transporta pirimidines, hCNT2 purines i uridina i hCNT3 ambdós tipus de nucleòsids. El patró d'expressió també difereix entre els diferents hCNTs, però coincideixen en teixits epitelials especialitzats en l'absorció/reabsorció com són el fetge, l'intestí prim i el ronyó (Molina-Arcas et al. 2009; Young et al. 2013).

S'ha detectat que l'expressió dels transportadors concentratius de nucleòsids disminueix en càncer, un context en què, a priori, s'hauria d'afavorir la recaptació de nucleòsids per fer front a la demanda provinent de l'alta taxa de duplicació de les cèl·lules. Aquest fet ha estat demostrat sobretot per a hCNT1, del qual se n'ha descrit la pèrdua en tumors ginecològics (Farré et al. 2004), hepatocarcinoma (Zollner et al. 2005; Martinez-Becerra et al. 2012), tumors en bufeta urinària (Mey et al. 2006), càncer de mama (Gloeckner-Hofmann et al. 2006; Lane et al. 2010), adenocarcinoma pancreàtic (Bhutia et al. 2011; Mohelnikova-Duchonova et al. 2013) i colangiocarcinoma (Urtasun et al. 2017). A més, les línies cel·lulars tampoc presenten activitat associada a hCNT1, tot i que es pot detectar tènuement a nivell de proteïna i d'mRNA. La restitució d'hCNT1 en models de tumors de pàncrees va demostrar que hCNT1 és un transceptor i que indueix canvis en les cèl·lules independentment de la seva capacitat translocadora (Pérez-Torras et al. 2013). El conjunt de canvis tenen efecte supressor de tumors. Per tant, amb aquests antecedents s'hipotetitzava que la pèrdua d'expressió d'hCNT1 es produeix en un pas primerenc en el procés carcinogènic.

En el marc de la tesi doctoral de la Dra. Hamsa Banjer es va analitzar mitjançant microarray l'efecte de la restitució de l'expressió d'hCNT1 en les línies tumorals derivades d'hepatocarcinoma BCLC-3 i BCLC-5, i es van trobar canvis d'expressió en més de 2000 gens. Aquests gens es podien classificar en diferents famílies segons la funció. Per exemple, en les BCLC-3 hi havia increment de l'expressió de gens relacionats amb la progressió del cicle cel·lular com són E2F2, CDK4 o RB1. Per altra banda es van trobar canvis en varis factors de transcripció, com disminució de C/EBP β , de C/EBP δ ,

d'HNF1 β , de KLF6, d'STAT3 o de p53. Si tots aquests factors participen en l'expressió d'hCNT1, aleshores la restitució d'aquest transportador podria conduir a una mena d'efecte *feedback* negatiu sobre tots ells.

En aquesta tesi s'ha pretès entendre precisament el contrari: quins elements condicionen l'expressió del gen *SLC28A1*, des de marques epigenètiques fins a la degradació de la proteïna hCNT1, passant per factors de transcripció i altres actors que participen del correcte funcionament d'aquest transceptor. El model d'estudi han estat línies cel·lulars d'origen tumoral majoritàriament, el qual suposa un handicap degut a la pèrdua d'expressió del propi hCNT1. Tanmateix, suposa un model òptim per tal d'esbrinar a partir de quins mecanismes es podria restituir hCNT1 en tumors.

Seguint l'ordre DNA – proteïna funcional, el primer pas ha estat establir el promotor per als gens *SLC28A1* i *SLC28A2*. A l'inici, l'estudi es focalitzava en conèixer quins factors causaven la pèrdua d'hCNT1 i hCNT2 en tumors, de manera que es van determinar els promotors d'ambdós gens. En paral·lel a aquesta tesi, en el marc de la tesi doctoral de la Clara Boces-Pascual, es va analitzar l'expressió dels transportadors en mostres aparellades de tumor i teixit sa adjacent. Es va confirmar la pèrdua d'expressió d'hCNT1, però per a hCNT2 els resultats no eren tan clars, ja que en alguns tipus de tumor es mostrava augment d'expressió enlloc de disminució com s'havia vist fins el moment. La mesura d'activitat dels fragments de promotor putatiu enllaçava amb aquests resultats. Les activitats corresponents es van analitzar en línies cel·lulars, i comparant els resultats entre promotor d'*SLC28A1* i promotor d'*SLC28A2* es va veure com en el darrer l'activitat era més de 10 vegades superior. Per tant, l'estudi es va centrar amb hCNT1. Respecte el promotor d'*SLC28A1*, es van identificar dos fets a destacar. El primer va ser l'alt nivell de repressió al qual estava sotmès el promotor en les línies cel·lulars testades, ja que pràcticament la majoria de fragments clonats de promotor mostraven menys activitat que el basal (corresponent al vector buit). El segon fet va ser que un fragment de 400pb situat a +1695pb respecte el TSS era el que presentava major activitat en la majoria de línies testades – excepte les derivades d'adenocarcinoma ductal pancreàtic. Així doncs, aquest fragment anomenat *down* semblava conferir l'activitat promotora al gen *SLC28A1*. Tanmateix, estudis anteriors havien demostrat que l'expressió d'hCNT1 estava regulada pel factor de transcripció HNF4 α i per àcids biliars, ambdós relacionats entre si (Fernández-Veledo et al. 2007; Klein et al. 2009). El lloc d'unió d'HNF4 α es trobava just abans de l'inici de transcripció, però l'anàlisi d'aquesta regió no va mostrar activitat excepte a les línies derivades de tumors hepàtics. Donat que HNF4 α s'expressa a pàncrees (Guo and Lu 2019), s'esperaria també activitat en les línies derivades

d'adenocarcinoma pancreàtic. Per aquest motiu caldria analitzar el promotor en un model d'origen no tumoral, com podria ser la línia cel·lular HPDE, que prové de la immortalització de cèl·lules epitelials de ducte pancreàtic, o fins i tot en hepatòcits humans. Les dades d'activitat, en comparació amb les dades obtingudes de línies cel·lulars d'origen tumoral, podrien indicar quins factors podrien estar implicats en l'expressió d'hCNT1 i que perden el seu efecte durant el procés carcinogènic.

Atès que es va identificar activitat promotora en un *locus* on no se n'havia descrit prèviament (el segment *down*), es va procedir a analitzar més profundament quins altres factors de transcripció estaven implicats en l'expressió del gen *SLC28A1*. Els candidats varen ser KLF6, p53, STAT3, YY1 i E2F1; aquest últim va sorgir a partir d'un altre projecte. Com s'ha mencionat abans, en paral·lel al desenvolupament d'aquesta tesi en el grup es va realitzar un microarray després de la restauració de l'expressió d'hCNT1 en línies derivades d'hepatocarcinoma. L'expressió dels factors de transcripció p53, KLF6 (les variants supressores de tumors), STAT3 i YY1 disminuïa en restituir hCNT1, indicant que hCNT1 podria modular d'alguna manera les vies de senyalització a les quals pertanyen aquests factors de transcripció.

No s'ha analitzat el paper que juga STAT3 en la regulació d'hCNT1, però es va postular com a candidat degut a la presència de dos llocs d'unió putatius dins la regió *down*. Les línies derivades d'adenocarcinoma ductal pancreàtic, com són CP15T i NP-29, no presentaven activitat del fragment *down*, i STAT3 ha estat identificat com un factor oncogènic clau en el desenvolupament d'aquest tipus de tumor (Corcoran et al. 2011). Així doncs, caldria estudiar si l'activitat d'STAT3 està alterada en aquestes línies tumorals en comparació amb la resta de línies d'origen gastrointestinal, i determinar si participa en l'expressió del gen *SLC28A1*.

Quant a KLF6, s'ha vist que l'expressió heteròloga d'aquest factor de transcripció causa tendències d'increment d'expressió d'hCNT1, augment de l'entrada sodi dependent de citidina a les cèl·lules i increment de l'activitat del fragment *down* del promotor d'*SLC28A1*, però en cap cas ha estat estadísticament significatiu. Es podria especular que el fet que la vida mitjana de la proteïna sigui molt curta compliqui l'estudi de la capacitat reguladora d'aquest factor de transcripció. En canvi, sí que es va detectar la unió de KLF6 al promotor d'*SLC28A1*, just abans de l'inici de transcripció i abans del lloc d'unió d'HNF4 α . S'ha vist que que KLF6, un cop activat mitjançant acetilació, forma part de complexos activadors juntament amb PCAF, CBP i p300, amb activitat histona acetiltransferasa (Camolotto et al. 2013). Això indicaria que l'estatus epigenètic de les cèl·lules, així com el balanç dels enzims modificadors d'histones, podrien regular la funció de KLF6. En aquest sentit, el

tractament amb SAHA podria afavorir l'acció de KLF6 i incrementar així l'expressió d'hCNT1. De totes maneres cal tenir en compte que KLF6 té vèries variants d'*splicing*, entre les quals n'hi ha de caràcter supressor de tumors i una d'oncogènica. Caldria elucidar si només KLF6-WT participaria en la regulació d'hCNT1, o si les diferents variants tenen algun paper modulador.

Un altre factor de transcripció identificat va ser YY1. Es va hipotetitzar que podria ser repressor, però la deleció dels llocs putatius d'unió va mostrar una reducció de l'activitat promotora, intuït funció activadora. El paper de YY1 en càncer és dual, ja que s'ha trobat casos en què és supressor de tumors (Liu et al. 2018) però la seva sobreexpressió en altres tipus de càncer està relacionada amb pitjor prognosi (Kang et al. 2014). El rol d'aquesta proteïna és molt divers, ja que pot exercir de factor de transcripció, modula l'activitat i expressió d'altres factors de transcripció mitjançant interaccions proteïna-proteïna, i fins i tot participa en la regulació de l'epigenoma (revisat a Ruosi et al. 2017). Dins el seu ventall d'interaccions es troba la formació d'un complex ternari juntament amb p53 i Mdm2, en el qual la seva funció és promoure la correcta ubiquïtinització de p53; per tant, YY1 regula negativament p53 (Sui et al. 2004). En aquesta tesi s'ha vist que tant p53 com l'estat de la cromatina són rellevants per a l'expressió d'hCNT1, de manera que el paper de YY1 en l'expressió d'hCNT1 podria estar més encarat al seu rol regulador que no pas a la seva funció de factor de transcripció. També s'ha descrit la participació de p53 en l'expressió d'hCNT1. Malgrat que no s'ha pogut demostrar la interacció directa entre el factor de transcripció i el promotor d'*SLC28A1*, la modulació de l'expressió de p53 induïa canvis en l'expressió d'hCNT1, i l'activitat del promotor diferia segons l'estatus de p53 de la línia cel·lular. Precisament el fet que p53 estigui mutat amb guany de funció en moltes línies cel·lulars en dificulta l'estudi, ja que s'ha vist que pot interaccionar amb altres elements reguladors com ETS2 i unir-se a llocs atípics en els promotors dels gens diana (Kollareddy et al. 2015). Així doncs, caldria determinar les diferències entre p53-WT i p53-mutant respecte l'expressió d'hCNT1. Per altra banda, recentment s'ha descrit la relació entre p53 i algunes marques de cromatina, com la marca activadora H3K4me3, en què p53 primer efectua una transactivació del gen diana i posteriorment s'observa un increment de la marca H3K4me3 (Menendez et al. 2013). S'ha demostrat l'associació entre H3K4me3 i el gen *SLC28A1* en una línia p53-WT; la marca es trobaria situada just després de l'inici de transcripció. Així, s'hauria de determinar si el rol de p53 consistiria en reclutar elements activadors per afavorir l'expressió d'hCNT1, o la regulació és directa.

Així, tal i com s'ha comentat, en aquesta tesi s'han identificat dos elements que podrien contribuir a l'expressió d'hCNT1 que han estat relacionats amb l'epigenoma de les cèl·lules, que són YY1 i p53. Mitjançant l'ús d'un fàrmac epigenètic, SAHA, es va demostrar que l'acetilació d'histones afavoria l'expressió dels transportadors concentratius de nucleòsids hCNT1 i hCNT2. El conjunt de canvis en el patró epigenètic de les cèl·lules està considerat un dels *hallmarks* del càncer (revisat a Hanahan and Weinberg 2011), i aquests canvis són primerencs durant la tumorigènesi. Coincidiria, doncs, amb la pèrdua d'expressió del gen *SLC28A1*, a la qual s'associa tant la metilació com l'acetilació d'histones. De nou, les dades indiquen que la regulació d'hCNT1 és molt complexa i dirigida per elements que es mostren desregulats en tumors.

L'últim element identificat va ser E2F1. Aquest factor de transcripció ha estat relacionat amb la progressió del cicle cel·lular a través de l'eix CDK4-pRb-E2F1, el qual promou el pas de fase G₁ a fase S del cicle. La majoria de tumors presenten desregulació d'aquest eix, tant de les tres proteïnes indicades com de p16^{INK4A}, el qual inhibeix l'activitat CDK4. Precisament p16^{INK4A} és un supressor de tumors que està altament regulat, entre altres, per esdeveniments epigenètics. Per exemple, s'ha trobat la marca repressora H3K9me3 associada al gen *Ink4b/ARF/Ink4a*, que codifica p14^{ARF} i p16^{INK4A}, així com repressió transcripcional efectuada per complexos en els quals participen enzims histona desacetilasa HDAC (Rayess et al. 2012). En aquest sentit, SAHA afavoriria l'activitat de p16^{INK4A}, i per tant la inhibició de CDK4, que afavoreix la retenció d'E2F1 amb Rb.

Tanmateix, en els darrers anys s'ha identificat que E2F1 juga un paper important en el metabolisme homeostàtic i tumoral (revisat a Denechaud et al. 2017). Per aquest motiu s'havia proposat en primera instància que E2F1 regularia hCNT2, ja que aquest transportador havia estat relacionat amb el metabolisme cel·lular a través de la seva interacció amb GRP58 i AldolasaB. Els primers experiments no van mostrar regulació d'hCNT2 a través de la modulació d'E2F1. En paral·lel es va identificar el gen *SLC29A1*, que codifica hENT1, com a diana d'E2F1 mitjançant un assaig ChIP-seq. Conseqüentment es va decidir analitzar la implicació d'E2F1 en l'expressió dels transportadors de nucleòsids. La primera estratègia va ser mitjançant la inhibició farmacològica de CDK4/6 amb abemaciclib. Els tractaments a temps curts produïen un augment dels hCNTs, amb certes diferències donat que a 6 hores augmentava més hCNT2 i a les 24 hores incrementaven hCNT1 i hCNT3. En canvi, l'expressió d'hENT1 disminuïa. De tots aquests canvis només es mantenia l'augment d'hCNT1 a temps llargs. Aquests resultats anticipen una regulació diferencial dels transportadors de nucleòsids per part de l'eix CDK4-pRb-E2F1. S'ha vist que el patró d'expressió dels transportadors

de nucleòsids difereix segons l'estat proliferatiu de les cèl·lules, de manera que els hCNTs estan més associats a fenotips diferenciats i els hENTs a fenotips més proliferatius (Pastor-Anglada et al. 2018). Així, la relació entre transportadors de nucleòsids i cicle cel·lular podria explicar-se per E2F1. Es va sobreexpressar aquest factor de transcripció i només es va detectar disminució dràstica de l'expressió d'hCNT1. El silenciament d'E2F1 augmentava mínimament l'expressió d'hENT1, mentre que els increments d'hCNT1 eren majors. A més, es va veure que E2F1 s'unia alhora als promotors d'*SLC28A1* i *SLC29A1*. Tot en conjunt semblava suggerir un paper repressor d'E2F1 tant per hCNT1 com per hENT1. Tanmateix, les dades d'abemaciclib indicaven que precisament la regulació no es donava en el mateix sentit. Per tant, es podria especular que E2F1 formaria part de dos complexos diferents per a regular l'expressió dels gens *SLC28A1* i *SLC29A1*. Determinar els membres d'aquests complexos permetria elucidar els mecanismes a través dels quals els transportadors de nucleòsids estan relacionats amb el cicle cel·lular.

hCNT1 també podria estar regulat a nivell post-transcripcional, mitjançant un segon mecanisme epigenètic. En el marc de la tesi doctoral de la Clara Boces-Pascual s'està estudiant el paper dels miRNAs en la regulació de l'expressió dels transportadors de nucleòsids. S'ha confirmat que dos miRNAs s'uneixen al 3'UTR d'hCNT1 i en disminueixen l'expressió. A més, en mostres aparellades de tumor i teixit sa s'ha vist com l'expressió d'aquests miRNAs augmenta en tumor i la d'hCNT1 disminueix, mostrant així una correlació negativa entre els dos elements (manuscrit en preparació). Per tant, l'expressió d'hCNT1 està molt finament regulada en cadascun dels passos previs a la traducció. Un altre punt és la regulació de la funció d'hCNT1 un cop ja és traduït, que es discuteix a continuació.

En aquesta tesi s'ha descrit el primer cas clínic amb uridina-citidinúria probablement relacionada amb la deficiència funcional d'hCNT1. El treball va ser publicat sota el títol *Deficiency of perforin and hCNT1, a novel inborn error of pyrimidine metabolism, associated with a rapidly developing lethal phenotype due to multi-organ failure*, a BBA-Molecular Basis of Disease (Pérez-Torras et al. 2019). L'estudi del cas clínic va determinar que la presència de dos errors monogènics en els gens que codifiquen hCNT1 i Perforina-1 van contribuir a la ràpida deterioració del pacient, conduint a una fallada multiorgànica a les 9 setmanes de vida. La majoria de la simptomatologia coincidia amb la presentada pels pacients amb Limfocitocidosi hematològica familiar de tipus 2, a la qual s'han associat les deficiències en PRF-1. Tanmateix, cap cas d'aquesta patologia havia presentat nivells elevats de pirimidines en orina, i per tant es van associar a deficiència d'hCNT1. Es van identificar

dues variants, c.1528C>T (p.R510C) i c.1682G>A (p.R561Q) en el gen *SLC28A1*, i les proteïnes resultants presentaven alteracions en el patró de glicosilació i disminució de la vida mitjana. L'emulació del genotip del pacient va mostrar com clarament l'heterozigosi composta, provinent de la co-expressió d'ambdues variants, comprometia l'activitat d'hCNT1. En canvi, la conservació d'una còpia d'hCNT1 WT era suficient per a preservar la funció d'aquest transportador de pirimidines, tot i la presència d'una de les dues variants. Per tant, probablement les diferències es podrien explicar per fenòmens d'oligomerització. És la primera vegada que es mostren evidències que hCNT1 podria oligomeritzar, i que l'estat de glicosilació del transportador podria ser determinant per a la formació del complex proteic. El model estructural va permetre analitzar els possibles canvis produïts per alteracions en la glicosilació, donat que els residus susceptibles de ser glicosilats no es troben en l'ortòleg procariota cristal·litzat i, per tant, no apareixen en el model d'homologia generat.

En revisar el cas clínic presentat des d'una perspectiva més fisiològica es va observar que en plasma el pacient presentava nivells d'uridina normals i lleugerament elevats de citidina. En canvi, en orina la pirimidinúria era més evident. Aquest fenomen es podia explicar per la distribució de l'expressió d'hCNT1 dins la nefrona, ja que es troba en la cara apical de les cèl·lules del túbul contornejat proximal i en el glomèrul, de manera que és responsable de la reabsorció de citidina i uridina (Rodríguez-Mulero et al. 2005). Per altra banda, el sistema nerviós central presenta diverses funcions vitals per les quals necessita pirimidines (a més de la síntesi d'àcids nucleics), i sobretot uridina (Cansev 2006; Dobolyi et al. 2011). La uridina es comporta com a anticonvulsiu en varis models de convulsions, i inhibeix GABA de forma competitiva mitjançant la unió a les membranes del cerebel, còrtex frontal, hipocamp i tàlem, en rates (Connolly and Duley 1999; Dobolyi et al. 2011). Així, no es pot descartar que la deficiència d'hCNT1 afectés els nivells intracel·lulars d'uridina i que per tant alterés l'homeòstasi de la uridina en el cervell, produint la disfunció cerebral lleu trobada en el pacient.

D'aquesta manera, l'estudi del cas clínic ha permès identificar característiques del transportador hCNT1 que no s'havien descrit amb anterioritat, com per exemple que la glicosilació és necessària per a la seva funció, o que la seva expressió està regulada per la funció proteasoma. La interacció amb l'enzim E3 ubiquitina lligasa RNF41, identificada mitjançant la tècnica MYTH en el marc de la tesi del Dr. Albert Viel i validada en el marc de la tesi de la Dra. Sandra Moro, podria suposar en nexa d'unió entre hCNT1 i el proteasoma. En aquesta tesi s'ha demostrat que la manipulació de l'expressió d'RNF41 modula l'activitat d'hCNT1. Tanmateix, no s'ha pogut demostrar la

ubiquïtinització del transportador, si bé s'ha confirmat que la inhibició de la funció del proteasoma produeix una acumulació del transportador de pirimidines. Per tant, queda pendent entendre la funció de la interacció entre hCNT1 i RNF41, la qual podria estar vinculada al reciclatge del transportador més que a la seva degradació.

A mode de resum, s'ha plantejat de forma esquemàtica el mecanisme d'expressió per hCNT1, des de nivell gènic fins a la proteïna funcional (Figura 92). Els resultats d'aquesta tesi han permès determinar que la regulació d'hCNT1 és altament complexa. L'anàlisi funcional és complicat en el model cel·lular escollit, degut a la relació entre hCNT1 i el procés carcinogènic; tanmateix, és difícil trobar un model adequat per a l'estudi dels transportadors de nucleòsids. Tot i així, d'han pogut identificar alguns elements que participen en l'expressió d'hCNT1, la majoria dels quals són proteïnes relacionades amb l'oncogènesi i que estan interrelacionades entre si.

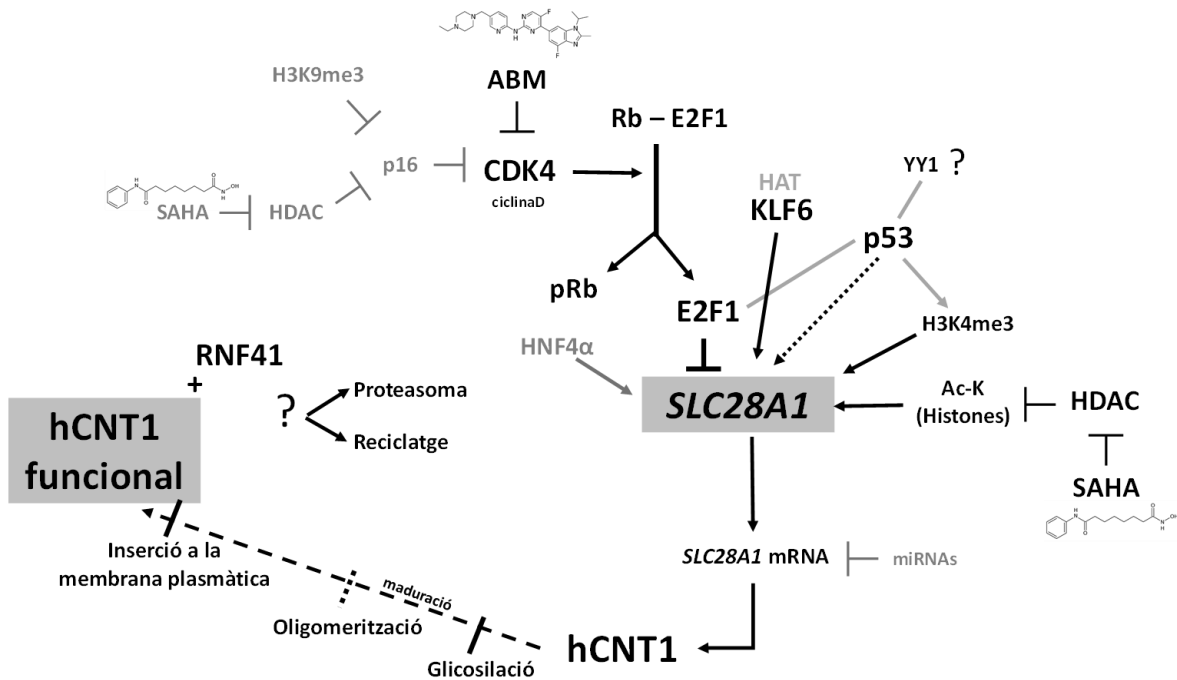


Figura 92. Model de regulació de l'expressió d'hCNT1. En negre s'indiquen vies o interaccions descrites en aquesta tesi, mentre que en gris s'indiquen resultats procedents de la bibliografia o trobats en el marc d'altres tesis doctorals del grup.

CONCLUSIONS

1. Es presenta el primer cas clínic associat a una deficiència del transportador concentratiu de nucleòsids hCNT1. El fenotip del pacient es va veure agreujat per la coexistència d'un altre defecte monogènic, concretament en el gen que codifica Perforina-1. La coexistència de dues variants en disposició al·lèlica *trans*, hCNT1R510C i hCNT1R561Q, va reduir la capacitat de translocar pirimidines en el pacient, el que podria explicar la pirimidinúria detectada.
2. La proteïna hCNT1 és glicosilada, i la glicosilació és necessària per tal que es pugui insertar a la membrana plasmàtica i exercir la funció transportadora. Les variants hCNT1R510C i hCNT1R561Q presenten un patró alterat de glicosilació, així com reducció de la vida mitjana. Aquestes diferències explicarien la menor presència de les variants a la membrana plasmàtica i, conseqüentment, la seva activitat reduïda en comparació amb hCNT1WT.
3. L'E3 lligasa RNF41 és una proteïna d'interacció d'hCNT1 i està involucrada amb l'activitat d'aquest transportador. Aquests efectes podrien ser deguts a la funció del proteasoma de forma directa sobre el transportador o indirecta sobre el reciclatge.
4. La inhibició farmacològica dels enzims HDAC amb SAHA incrementa l'expressió d'hCNT1 i hCNT2 a temps curts, en un panell de línies cel·lulars tumorals d'origen gastrointestinal. Aquest augment d'expressió es tradueix en/correspon amb un increment del transport dependent de sodi de nucleòsids a les línies HT-29 i CP15T.
5. S'ha identificat regions reguladores del promotor del gen *SLC28A1*, compreses entre -1069pb respecte l'inici de transcripció i fins l'ATG. El promotor es troba altament reprimat en un panell de línies cel·lulars tumorals d'origen gastrointestinal, excepte la regió que hem anomenat *down*, situada a +1695pb respecte l'inici de transcripció, que conserva certa activitat en gairebé totes les línies testades.
6. L'expressió del gen *SLC28A1* ha estat associada a factors de transcripció de caràcter supressor de tumor. Així, KLF6 s'uneix al promotor del gen *SLC28A1* i indueix l'expressió d'hCNT1. Mentre que, per altra banda, l'estatus mutacional de p53 de les línies tumorals estudiades condiciona l'activitat del promotor del gen *SLC28A1*.

7. La inhibició farmacològica de CDK4/6 amb abemaciclib modula l'expressió dels transportadors de nucleòsids hCNT1, hCNT2 i hENT1 a temps curts, i d'hCNT1 a temps més llargs, en línies derivades d'hepatocarcinoma i d'adenocarcinoma ductal pancreàtic. Aquests efectes estarien coordinats per E2F1, el qual s'uneix als promotors dels gens *SLC28A1* i *SLC29A1*.

BIBLIOGRAFIA

A

- Abdulla P, Coe IR (2007) Characterization and functional analysis of the promoter for the human equilibrative nucleoside transporter gene, hENT1. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. doi: 10.1080/15257770601052331
- Abella A, Dubus P, Malumbres M, Rane SG, Kiyokawa H, Sicard A, Vignon F, Langin D, Barbacid M, Fajas L (2005) Cdk4 promotes adipogenesis through PPAR γ activation. *Cell Metab*. doi: 10.1016/j.cmet.2005.09.003
- Aguilar V, Fajas L (2010) Cycling through metabolism. *EMBO Mol. Med*.
- Alekseyenko A V., Kim N, Lee CJ (2007) Global analysis of exon creation versus loss and the role of alternative splicing in 17 vertebrate genomes. *RNA*. doi: 10.1261/rna.325107
- Annicotte JS, Blanchet E, Chavey C, Iankova I, Costes S, Assou S, Teyssier J, Dalle S, Sardet C, Fajas L (2009) The CDK4-pRB-E2F1 pathway controls insulin secretion. *Nat Cell Biol*. doi: 10.1038/ncb1915
- Arimany-Nardi C, Claudio-Montero A, Viel-Oliva A, Schmidtke P, Estarellas C, Barril X, Bidon-Chanal A, Pastor-Anglada M (2017) Identification and Characterization of a Secondary Sodium-Binding Site and the Main Selectivity Determinants in the Human Concentrative Nucleoside Transporter 3. *Mol Pharm*. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00085
- Arimany-Nardi C, Errasti-Murugarren E, Minuesa G, Martinez-Picado J, Gorboulev V, Koepsell H, Pastor-Anglada M (2014) Nucleoside transporters and human organic cation transporter 1 determine the cellular handling of DNA-methyltransferase inhibitors. *Br J Pharmacol*. doi: 10.1111/bph.12748
- Aubrey BJ, Kelly GL, Kueh AJ, Brennan MS, O'Connor L, Milla L, Wilcox S, Tai L, Strasser A, Herold MJ (2015) An Inducible Lentiviral Guide RNA Platform Enables the Identification of Tumor-Essential Genes and Tumor-Promoting Mutations InVivo. *Cell Rep*. doi: 10.1016/j.celrep.2015.02.002
- Aymerich I, Foufelle F, Ferré P, Casado FJ, Pastor-Anglada M (2006) Extracellular adenosine activates AMP-dependent protein kinase (AMPK). *J Cell Sci*. doi: 10.1242/jcs.02865
- Aymerich I, Pastor-Anglada M, Casado FJ (2004) Long Term Endocrine Regulation of Nucleoside Transporters in Rat Intestinal Epithelial Cells. *J Gen Physiol*. doi: 10.1085/jgp.200409086

B

- Badagnani I, Chan W, Castro RA, Brett CM, Huang CC, Stryke D, Kawamoto M, Johns SJ, Ferrin TE, Carlson EJ, Burchard EG, Giacomini KM (2005) Functional analysis of genetic variants in the human concentrative nucleoside transporter 3 (CNT3; SLC28A3). *Pharmacogenomics J* 5:157–165 . doi: 10.1038/sj.tpj.6500303
- Baiz D, Dapas B, Farra R, Scaggiante B, Pozzato G, Zanconati F, Fiotti N, Consoloni L, Chiaretti S, Grassi G (2014) Bortezomib effect on E2F and cyclin family members in human hepatocellular carcinoma cell lines. *World J Gastroenterol*. doi: 10.3748/wjg.v20.i3.795
- Balasubramaniam S, Duley JA, Christodoulou J (2014) Inborn errors of pyrimidine metabolism: clinical update and therapy. *J. Inherit. Metab. Dis.*
- Baldwin SA, Beal PR, Yao SYM, King AE, Cass CE, Young JD (2004) The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 447:735–743 . doi: 10.1007/s00424-003-1103-2
- Baldwin SA, Yao SYM, Hyde RJ, Ng AML, Foppolo S, Barnes K, Ritzel MWL, Cass CE, Young JD (2005) Functional characterization of novel human and mouse equilibrative nucleoside transporters (hENT3 and mENT3) located in intracellular membranes. *J Biol Chem*. doi: 10.1074/jbc.M414337200
- Bär F, Sina C, Fellermann K (2013) Thiopurines in inflammatory bowel disease revisited. *World J Gastroenterol*.
- Baritaki S, Chapman A, Yeung K, Spandidos DA, Palladino M, Bonavida B (2009) Inhibition of epithelial to mesenchymal transition in metastatic prostate cancer cells by the novel proteasome inhibitor, NPI-0052: Pivotal roles of Snail repression and RKIP induction. *Oncogene*. doi: 10.1038/onc.2009.214
- Barnes K, Dobrzynski H, Foppolo S, Beal PR, Ismat F, Scullion ER, Sun L, Tellez J, Ritzel MWL, Claycomb WC, Cass CE, Young JD, Billeter-Clark R, Boyett MR, Baldwin SA (2006) Distribution and functional characterization of equilibrative nucleoside transporter-4, a novel cardiac adenosine transporter activated at acidic pH. *Circ Res*. doi: 10.1161/01.RES.0000238359.18495.42
- Bartel DP (2009) MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*
- Basu S, Gnanapradeepan K, Barnoud T, Kung CP, Tavecchio M, Scott J, Watters A, Chen Q,

- Kossenkov A V., Murphy ME (2018) Mutant p53 controls tumor metabolism and metastasis by regulating PGC-1 α . *Genes Dev.* doi: 10.1101/gad.309062.117
- Baud MGJ, Bauer MR, Verduci L, Dingler FA, Patel KJ, Horil Roy D, Joerger AC, Fersht AR (2018) Aminobenzothiazole derivatives stabilize the thermolabile p53 cancer mutant Y220C and show anticancer activity in p53-Y220C cell lines. *Eur J Med Chem.* doi: 10.1016/j.ejmech.2018.04.035
- Baylin SB, Jones PA (2011) A decade of exploring the cancer epigenome-biological and translational implications. *Nat. Rev. Cancer*
- Bhatia B, Hsieh M, Kenney AM, Nahlé Z (2011) Mitogenic Sonic hedgehog signaling drives E2F1-dependent lipogenesis in progenitor cells and medulloblastoma. *Oncogene.* doi: 10.1038/onc.2010.454
- Bhutia YD, Hung SW, Patel B, Lovin D, Govindarajan R (2011) CNT1 expression influences proliferation and chemosensitivity in drug-resistant pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2736
- Bicket A, Coe IR (2016) N-linked glycosylation of N48 is required for equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) function. *Biosci Rep.* doi: 10.1042/BSR20160063
- Bicket A, Mehrabi P, Naydenova Z, Wong V, Donaldson L, Stagljar I, Coe IR (2016) Novel regulation of equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) by receptorstimulated Ca²⁺-dependent calmodulin binding. *Am J Physiol - Cell Physiol.* doi: 10.1152/ajpcell.00243.2015
- Bieker JJ (2001) Krüppel-like Factors: Three Fingers in Many Pies. *J. Biol. Chem.*
- Blanchet E, Annicotte JS, Lagarrigue S, Aguilar V, Clapé C, Chavey C, Fritz V, Casas F, Apparailly F, Auwerx J, Fajas L (2011) E2F transcription factor-1 regulates oxidative metabolism. *Nat Cell Biol.* doi: 10.1038/ncb2309
- Bockenbauer D, Jaureguiberry G (2016) HNF1B-associated clinical phenotypes: the kidney and beyond. *Pediatr. Nephrol.*
- Bolze A, Abhyankar A, Grant A V., Patel B, Yadav R, Byun M, Caillez D, Emile JF, Pastor-Anglada M, Abel L, Puel A, Govindarajan R, de Pontual L, Casanova JL (2012) A mild form of slc29a3 disorder: A frameshift deletion leads to the paradoxical translation of an otherwise noncoding mrna splice variant. *PLoS One.* doi: 10.1371/journal.pone.0029708
- Bonavida B, Baritaki S (2011) The novel role of yin yang 1 in the regulation of epithelial to

mesenchymal transition in cancer via the dysregulated NF- κ B/snail/YY1/RKIP/PTEN circuitry. *Crit Rev Oncog*. doi: 10.1615/CritRevOncog.v16.i3-4.50

Bonavida B, Kaufhold S (2015) Prognostic significance of YY1 protein expression and mRNA levels by bioinformatics analysis in human cancers: A therapeutic target. *Pharmacol. Ther.*

Buj R, Aird KM (2018) Deoxyribonucleotide triphosphate metabolism in cancer and metabolic disease. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*.

C

Camolotto SA, Racca AC, Ridano ME, Genti-Raimondi S, Panzetta-Dutari GM (2013) PSG Gene Expression Is Up-Regulated by Lysine Acetylation Involving Histone and Nonhistone Proteins. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0055992

Cano-Soldado P, Gorraitz E, Errasti-Murugarren E, Casado FJ, Lostao MP, Pastor-Anglada M (2011) Functional analysis of the human concentrative nucleoside transporter-1 variant hCNT1S546P provides insight into the sodium-binding pocket. *Am J Physiol Physiol*. doi: 10.1152/ajpcell.00198.2011

Cano-Soldado P, Larráyoz IM, Molina-Arcas M, Casado FJ, Martinez-Picado J, Lostao MP, Pastor-Anglada M (2004) Interaction of nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase with the concentrative nucleoside transporter-1 (SLC28A1). *Antivir Ther*

Cano-Soldado P, Pastor-Anglada M (2012) Transporters that translocate nucleosides and structural similar drugs: Structural requirements for substrate recognition. *Med Res Rev*. doi: 10.1002/med.20221

Cansev M (2006) Uridine and cytidine in the brain: Their transport and utilization. *Brain Res. Rev.*

Cao Z, Wu X, Yen L, Sweeney C, Carraway KL (2007) Neuregulin-Induced ErbB3 Downregulation Is Mediated by a Protein Stability Cascade Involving the E3 Ubiquitin Ligase Nrdp1. *Mol Cell Biol*. doi: 10.1128/mcb.01245-06

Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, Frisch M, Bayerlein M, Werner T (2005) MatInspector and beyond: Promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics*. doi: 10.1093/bioinformatics/bti473

Caterino M, Ruoppolo M, Mandola A, Costanzo M, Orrù S, Imperlini E (2017) Protein-protein interaction networks as a new perspective to evaluate distinct functional roles of voltage-dependent anion channel isoforms. *Mol. Biosyst.*

- Chandrashekar DS, Bashel B, Balasubramanya SAH, Creighton CJ, Ponce-Rodriguez I, Chakravarthi BVSK, Varambally S (2017) UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and Survival Analyses. *Neoplasia* (United States). doi: 10.1016/j.neo.2017.05.002
- Chen H kui, Liu X qiong, Lin J, Chen T yu, Feng Q sheng, Zeng Y xin (2002) Mutation analysis of KLF6 gene in human nasopharyngeal carcinomas. *Ai Zheng*
- Cheng Y, Vapurcuyan A, Shahidullah M, Aleksunes LM, Pelis RM (2012) Expression of organic anion transporter 2 in the human kidney and its potential role in the tubular secretion of guanine-containing antiviral drugs. *Drug Metab Dispos*. doi: 10.1124/dmd.111.042036
- Cho YG, Kim CJ, Park CH, Yang YM, Kim SY, Nam SW, Lee SH, Yoo NJ, Lee JY, Park WS (2005) Genetic alterations of the KLF6 gene in gastric cancer. *Oncogene*. doi: 10.1038/sj.onc.1208670
- Christensen J, Cloos P, Toftegaard U, Klinkenberg D, Bracken AP, Trinh E, Heeran M, Di Stefano L, Helin K (2005) Characterization of E2F8, a novel E2F-like cell-cycle regulated repressor of E2F-activated transcription. *Nucleic Acids Res*. doi: 10.1093/nar/gki855
- Cihlar T, Ho ES, Lin DC, Mulato AS (2001) Human renal organic anion transporter 1 (hOAT1) and its role in the nephrotoxicity of antiviral nucleotide analogs. In: *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*
- Cihlar T, Lin DC, Pritchard JB, Fuller MD, Mendel DB, Sweet DH (1999) The antiviral nucleotide analogs cidofovir and adefovir are novel substrates for human and rat renal organic anion transporter 1. *Mol Pharmacol*. doi: 10.1124/mol.56.3.570
- Clarke ML, Damaraju VL, Zhang J, Mowles D, Tackaberry T, Lang T, Smith KM, Young JD, Tomkinson B, Cass CE (2006) The role of human nucleoside transporters in cellular uptake of 4'-Thio- β -D-arabinofuranosylcytosine and β -D-arabinosylcytosine. *Mol Pharmacol*. doi: 10.1124/mol.105.021543
- Cliffe ST, Kramer JM, Hussain K, Robben JH, De Jong EK, De Brouwer AP, Nibbeling E, Kamsteeg EJ, Wong M, Prendiville J, James C, Padidela R, Becknell C, van Bokhoven H, Deen PMT, Hennekam RCM, Lindeman R, Schenck A, Roscioli T, Buckley MF (2009) SLC29A3 gene is mutated in pigmented hypertrichosis with insulin-dependent diabetes mellitus syndrome and interacts with the insulin signaling pathway. *Hum Mol Genet*. doi: 10.1093/hmg/ddp161

Connolly GP, Duley JA (1999) Uridine and its nucleotides: Biological actions, therapeutic potentials. *Trends Pharmacol. Sci.*

Coothankandaswamy V, Elangovan S, Singh N, Prasad PD, Thangaraju M, Ganapathy V (2013) The plasma membrane transporter SLC5A8 suppresses tumour progression through depletion of survivin without involving its transport function. *Biochem J.* doi: 10.1042/BJ20121248

Corcoran RB, Contino G, Deshpande V, Tzatsos A, Conrad C, Benes CH, Levy DE, Settleman J, Engelman JA, Bardeesy N (2011) STAT3 plays a critical role in KRAS-induced pancreatic tumorigenesis. *Cancer Res.* doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0908

Czuba LC, Hillgren KM, Swaan PW (2018) Post-translational modifications of transporters. *Pharmacol. Ther.*

D

Damaraju VL, Elwi AN, Hunter C, Carpenter P, Santos C, Barron GM, Sun X, Baldwin SA, Young JD, Mackey JR, Sawyer MB, Cass CE (2007) Localization of broadly selective equilibrative and concentrative nucleoside transporters, hENT1 and hCNT3, in human kidney. *Am J Physiol - Ren Physiol.* doi: 10.1152/ajprenal.00007.2007

Damaraju VL, Mowles D, Yao S, Ng A, Young JD, Cass CE, Tong Z (2012) Role of human nucleoside transporters in the uptake and cytotoxicity of azacitidine and decitabine. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids.* doi: 10.1080/15257770.2011.652330

Daniels G, Ballif BA, Helias V, Saison C, Grimsley S, Mannessier L, Hustinx H, Lee E, Cartron JP, Peyrard T, Arnaud L (2015) Lack of the nucleoside transporter ENT1 results in the Augustine-null blood type and ectopic mineralization. *Blood.* doi: 10.1182/blood-2015-03-631598

Dawson MA, Kouzarides T (2012) Cancer epigenetics: From mechanism to therapy. *Cell*

De Ceuninck L, Wauman J, Masschaele D, Peelman F, Tavernier J (2013) Reciprocal cross-regulation between RNF41 and USP8 controls cytokine receptor sorting and processing. *J Cell Sci.* doi: 10.1242/jcs.131250

De Clercq E, Holý A (2005) Case history: Acyclic nucleoside phosphonates: A key class of antiviral drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.*

Del Santo B, Tarafa G, Felipe A, Casado FJ, Pastor-Anglada M (2001) Developmental regulation

- of the concentrative nucleoside transporters CNT1 and CNT2 in rat liver. *J Hepatol* 34:873–880 . doi: 10.1016/S0168-8278(01)00036-8
- Denechaud PD, Fajas L, Giralt A (2017) E2F1, a novel regulator of metabolism. *Front. Endocrinol.* (Lausanne).
- Denechaud PD, Lopez-Mejia IC, Giralt A, Lai Q, Blanchet E, Delacuisine B, Nicolay BN, Dyson NJ, Bonner C, Pattou F, Annicotte JS, Fajas L (2016) E2F1 mediates sustained lipogenesis and contributes to hepatic steatosis. *J Clin Invest.* doi: 10.1172/JCI81542
- Deng T, Pan H, Han RB, Huang DZ, Li HL, Zhou LK, Wang X, Bai M, Li X, Liu R, Ge SH, Ning T, Zhang L, Ba Y (2014) Gemcitabine sensitivity factors, hENT1 and RRM1 as potential prognostic biomarker for advanced biliary tract cancer. *Int J Clin Exp Med*
- Deshpande A, Sicinski P, Hinds PW (2005) Cyclins and cdks in development and cancer: A perspective. *Oncogene*
- Dhir T, Schultz CW, Jain A, Brown SZ, Haber A, Goetz A, Xi C, Su GH, Xu L, Posey J, Jiang W, Yeo CJ, Golan T, Pishvaian MJ, Brody JR (2019) Abemaciclib is effective against pancreatic cancer cells and synergizes with HuR and YAP1 inhibition. *Mol Cancer Res.* doi: 10.1158/1541-7786.mcr-19-0589
- Di Fiore R, D'Anneo A, Tesoriere G, Vento R (2013) RB1 in cancer: Different mechanisms of RB1 inactivation and alterations of pRb pathway in tumorigenesis. *J. Cell. Physiol.*
- Diab T, Hanoun N, Bureau C, Christol C, Buscail L, Cordelier P, Torrisani J (2014) The role of the 3' untranslated region in the post-transcriptional regulation of KLF6 gene expression in hepatocellular carcinoma. *Cancers (Basel).* doi: 10.3390/cancers6010028
- Diamonti AJ, Guy PM, Ivanof C, Wong K, Sweeney C, Carraway KL (2002) An RBCC protein implicated in maintenance of steady-state neuregulin receptor levels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* doi: 10.1073/pnas.052709799
- Díez-Sampedro A, Hirayama BA, Osswald C, Gorboulev V, Baumgarten K, Volk C, Wright EM, Koepsell H (2003) A glucose sensor hiding in a family of transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* doi: 10.1073/pnas.1733027100
- DiFeo A, Martignetti JA, Narla G (2009) The role of KLF6 and its splice variants in cancer therapy. *Drug Resist Updat.* doi: 10.1016/j.drug.2008.11.001
- DiFeo A, Narla G, Hirshfeld J, Camacho-Vanegas O, Narla J, Rose SL, Kalir T, Yao S, Levine A, Birrer

- MJ, Bonome T, Friedman SL, Buller RE, Martignetti JA (2006) Roles of KLF6 and KLF6-SV1 in ovarian cancer progression and intraperitoneal dissemination. *Clin Cancer Res.* doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0054
- Diller L, Kassel J, Nelson CE, Gryka MA, Litwak G, Gebhardt M, Bressac B, Ozturk M, Baker SJ, Vogelstein B (1990) p53 functions as a cell cycle control protein in osteosarcomas. *Mol Cell Biol.* doi: 10.1128/mcb.10.11.5772
- Dimaras H, Corson TW (2019) Retinoblastoma, the visible CNS tumor: A review. *J. Neurosci. Res.*
- Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A, Tanzer A, Lagarde J, Lin W, Schlesinger F, Xue C, Marinov GK, Khatun J, Williams BA, Zaleski C, Rozowsky J, Röder M, Kokocinski F, Abdelhamid RF, Alioto T, Antoshechkin I, Baer MT, Bar NS, Batut P, Bell K, Bell I, Chakraborty S, Chen X, Chrast J, Curado J, Derrien T, Drenkow J, Dumais E, Dumais J, Duttagupta R, Falconnet E, Fastuca M, Fejes-Toth K, Ferreira P, Foissac S, Fullwood MJ, Gao H, Gonzalez D, Gordon A, Gunawardena H, Howald C, Jha S, Johnson R, Kapranov P, King B, Kingswood C, Luo OJ, Park E, Persaud K, Preall JB, Ribeca P, Risk B, Robyr D, Sammeth M, Schaffer L, See LH, Shahab A, Skancke J, Suzuki AM, Takahashi H, Tilgner H, Trout D, Walters N, Wang H, Wrobel J, Yu Y, Ruan X, Hayashizaki Y, Harrow J, Gerstein M, Hubbard T, Reymond A, Antonarakis SE, Hannon G, Giddings MC, Ruan Y, Wold B, Carninci P, Guig R, Gingeras TR (2012) Landscape of transcription in human cells. *Nature.* doi: 10.1038/nature11233
- Dobolyi A, Juhasz G, Kovacs Z, Kardos J (2011) Uridine Function in the Central Nervous System. *Curr Top Med Chem.* doi: 10.2174/156802611795347618
- Docquier A, Augereau P, Lapierre M, Harmand PO, Badia E, Annicotte JS, Fajas L, Cavaillès V (2012) The RIP140 gene is a transcriptional target of E2F1. *PLoS One.* doi: 10.1371/journal.pone.0035839
- Donaton MCV, Holsbeeks I, Lagatie O, Van Zeebroeck G, Crauwels M, Winderickx J, Thevelein JM (2003) The Gap1 general amino acid permease acts as an amino acid sensor for activation of protein kinase A targets in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03732.x
- Dong S, Ma X, Wang Z, Han B, Zou H, Wu Z, Zang Y, Zhuang L (2017) YY1 promotes HDAC1 expression and decreases sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to HDAC inhibitor. *Oncotarget.* doi: 10.18632/oncotarget.17196

Dos Santos-Rodrigues A, Grañé-Boladeras N, Bicket A, Coe IR (2014) Nucleoside transporters in the purinome. *Neurochem. Int.*

Dowless M, Lowery CD, Shackelford T, Renschler M, Stephens J, Flack R, Blosser W, Gupta S, Stewart J, Webster Y, Dempsey J, VanWye AB, Ebert P, Iversen P, Olsen JB, Gong X, Buchanan S, Houghton P, Stancato L (2018) Abemaciclib is active in preclinical models of Ewing sarcoma via multipronged regulation of cell cycle, DNA methylation, and interferon pathway signaling. *Clin Cancer Res.* doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1256

Drew D, Boudker O (2016) Shared Molecular Mechanisms of Membrane Transporters. *Annu Rev Biochem.* doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014520

Duflot S, Riera B, Fernandez-Veledo S, Casado V, Norman RI, Casado FJ, Lluís C, Franco R, Pastor-Anglada M (2004) ATP-Sensitive K⁺ Channels Regulate the Concentrative Adenosine Transporter CNT2 following Activation by A1 Adenosine Receptors. *Mol Cell Biol.* doi: 10.1128/mcb.24.7.2710-2719.2004

E

Eltzschig HK, Abdulla P, Hoffman E, Hamilton KE, Daniels D, Schönfeld C, Löffler M, Reyes G, Duszenko M, Karhausen J, Robinson A, Westerman KA, Coe IR, Colgan SP (2005) HIF-1-dependent repression of equilibrative nucleoside transporter (ENT) in hypoxia. *J Exp Med.* doi: 10.1084/jem.20050177

Engel K (2005) Interaction of Organic Cations with a Newly Identified Plasma Membrane Monoamine Transporter. *Mol Pharmacol.* doi: 10.1124/mol.105.016832

Ericson KG, Fadeel B, Nilsson-Ardnor S, Söderhäll C, Samuelsson A, Janka G, Schneider M, Gürgey A, Yalman N, Révész T, Egeler RM, Jahnukainen K, Storm-Mathiesen I, Haraldsson A, Poole J, De Saint Basile G, Nordenskjöld M, Henter JI (2001) Spectrum of perforin gene mutations in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Am J Hum Genet.* doi: 10.1086/318796

Errasti-Murugarren E, Fernández-Calotti P, Veyhl-Wichmann M, Diepold M, Pinilla-Macua I, Pérez-Torras S, Kipp H, Koepsell H, Pastor-Anglada M (2012) Role of the transporter regulator protein (RS1) in the modulation of concentrative nucleoside transporters (CNTs) in epithelia. *Mol Pharmacol.* doi: 10.1124/mol.111.076992

Errasti-Murugarren E, Molina-Arcas M, Casado FJ, Pastor-Anglada M (2010) The Human Concentrative Nucleoside Transporter-3 C602R Variant Shows Impaired Sorting to Lipid Rafts and Altered Specificity for Nucleoside-Derived Drugs. *Mol Pharmacol.* doi:

10.1124/mol.110.063552

Errasti-Murugarren E, Molina-Arcas M, Casado FJ, Pastor-Anglada M (2008) A splice variant of the SLC28A3 gene encodes a novel human concentrative nucleoside transporter-3 (hCNT3) protein localized in the endoplasmic reticulum . *FASEB J.* doi: 10.1096/fj.08-113902

Errasti-Murugarren E, Pastor-Anglada M (2010) Drug transporter pharmacogenetics in nucleoside-based therapies. *Pharmacogenomics* 11:809–841 . doi: 10.2217/pgs.10.70

Errasti-murugarren E, Pastor-Anglada M, Casado FJ (2007) Role of CNT3 in the transepithelial flux of nucleosides and nucleoside-derived drugs. *J Physiol.* doi: 10.1113/jphysiol.2007.130138

F

Fabrizio E, El Messaoudi S, Polanowska J, Paul C, Cook JR, Lee JH, Nère V, Rousset M, Pestka S, Le Cam A, Sardet C (2002) Negative regulation of transcription by the type II arginine methyltransferase PRMT5. *EMBO Rep.* doi: 10.1093/embo-reports/kvf136

Fairman JW, Wijerathna SR, Ahmad MF, Xu H, Nakano R, Jha S, Prendergast J, Welin RM, Flodin S, Roos A, Nordlund P, Li Z, Walz T, Dealwis CG (2011) Structural basis for allosteric regulation of human ribonucleotide reductase by nucleotide-induced oligomerization. *Nat Struct Mol Biol.* doi: 10.1038/nsmb.2007

Fajas L, Annicotte JS, Miard S, Sarruf D, Watanabe M, Auwerx J (2004) Impaired pancreatic growth, β cell mass, and β cell function in E2F1-7/- mice. *J Clin Invest.* doi: 10.1172/JCI18555

Fajas L, Blanchet E, Annicotte JS (2010) The CDK4-pRB-E2F1 pathway: A new modulator of insulin secretion. *Islets.* doi: 10.4161/isl.2.1.10338

Fajas L, Landsberg RL, Huss-Garcia Y, Sardet C, Lees JA, Auwerx J (2002) E2Fs regulate adipocyte differentiation. *Dev Cell.* doi: 10.1016/S1534-5807(02)00190-9

Farías M, Puebla C, Westermeier F, Jo MJ, Pastor-Anglada M, Casanello P, Sobrevia L (2010) Nitric oxide reduces SLC29A1 promoter activity and adenosine transport involving transcription factor complex hCHOP-C/EBP α in human umbilical vein endothelial cells from gestational diabetes. *Cardiovasc Res.* doi: 10.1093/cvr/cvp410

Farré X, Guillén-Gómez E, Sánchez L, Hardisson D, Plaza Y, Lloberas J, Casado FJ, Palacios J, Pastor-Anglada M (2004) Expression of the nucleoside-derived drug transporters hCNT1,

- hENT1 and hENT2 in gynecologic tumors. *Int J Cancer* 112:959–966 . doi: 10.1002/ijc.20524
- Fedier A, Dedes KJ, Imesch P, Von Bueren AO, Fink D (2007) The histone deacetylase inhibitors suberoylanilide hydroxamic (Vorinostat) and valproic acid induce irreversible and MDR1-independent resistance in human colon cancer cells. *Int J Oncol*
- Fernández-Calotti P, Casulleras O, Antolin M, Guarner F, Pastor-Anglada M (2016) Galectin-4 interacts with the drug transporter human concentrative nucleoside transporter 3 to regulate its function. *FASEB J*. doi: 10.1096/fj.15-272773
- Fernández-Calotti P, Pastor-Anglada M (2010) All-trans-retinoic acid promotes trafficking of human concentrative nucleoside transporter-3 (hCNT3) to the plasma membrane by a TGF- β 1-mediated mechanism. *J Biol Chem*. doi: 10.1074/jbc.M109.055673
- Fernández-Veledo S, Huber-Ruano I, Aymerich I, Dufлот S, Casado FJ, Pastor-Anglada M (2006) Bile acids alter the subcellular localization of CNT2 (concentrative nucleoside cotransporter) and increase CNT2-related transport activity in liver parenchymal cells. *Biochem J* 395:337–344 . doi: 10.1042/BJ20051232
- Fernández-Veledo S, Jover R, Casado FJ, Gómez-Lechón MJ, Pastor-Anglada M (2007) Transcription factors involved in the expression of SLC28 genes in human liver parenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.12.021
- Fernández-Veledo S, Valdés R, Wallenius V, Casado FJ, Pastor-Anglada M (2004) Up-regulation of the high-affinity pyrimidine-preferring nucleoside transporter concentrative nucleoside transporter 1 by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in liver parenchymal cells. *J Hepatol*. doi: 10.1016/j.jhep.2004.06.008
- Fischer M (2017) Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene*
- Flavahan WA, Gaskell E, Bernstein BE (2017) Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer. *Science* (80-.).
- Forrest LR (2015) Structural Symmetry in Membrane Proteins. *Annu Rev Biophys*. doi: 10.1146/annurev-biophys-051013-023008
- Fotoohi AK, Lindqvist M, Peterson C, Albertioni F (2006) Involvement of the concentrative nucleoside transporter 3 and equilibrative nucleoside transporter 2 in the resistance of T-lymphoblastic cell lines to thiopurines. *Biochem Biophys Res Commun*. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.02.134

- French JB, Zhao H, An S, Niessen S, Deng Y, Cravatt BF, Benkovic SJ (2013) Hsp70/Hsp90 chaperone machinery is involved in the assembly of the purinosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. doi: 10.1073/pnas.1300173110
- Friedman AB, Sparrow MP, Gibson PR (2014) The role of thiopurine metabolites in inflammatory bowel disease and rheumatological disorders. *Int. J. Rheum. Dis.*
- Fukuchi Y, Furihata T, Hashizume M, Iikura M, Chiba K (2010) Characterization of ribavirin uptake systems in human hepatocytes. *J Hepatol*. doi: 10.1016/j.jhep.2010.01.011
- Furihata T, Matsumoto S, Fu Z, Tsubota A, Sun Y, Matsumoto S, Kobayashi K, Chibaa K (2014a) Different interaction profiles of direct-acting anti-hepatitis C virus agents with human organic anion transporting polypeptides. *Antimicrob Agents Chemother*. doi: 10.1128/AAC.02724-14
- Furihata T, Mizuguchi M, Suzuki Y, Matsumoto S, Kobayashi K, Chiba K (2014b) Identification of primary equilibrative nucleoside transporter 1 mRNA isoforms resulting from alternative promoter usage in human hepatocytes. *Drug Metab Pharmacokinet*. doi: 10.2133/dmpk.DMPK-13-RG-135
- Furukawa J, Inoue K, Maeda J, Yasujima T, Ohta K, Kanai Y, Takada T, Matsuo H, Yuasa H (2015) Functional identification of SLC43A3 as an equilibrative nucleobase transporter involved in purine salvage in mammals. *Sci Rep*. doi: 10.1038/srep15057

G

- Gabriele M, Vulto-van Silfhout AT, Germain PL, Vitriolo A, Kumar R, Douglas E, Haan E, Kosaki K, Takenouchi T, Rauch A, Steindl K, Frengen E, Misceo D, Pedurupillay CRJ, Stromme P, Rosenfeld JA, Shao Y, Craigen WJ, Schaaf CP, Rodriguez-Buritica D, Farach L, Friedman J, Thulin P, McLean SD, Nugent KM, Morton J, Nicholl J, Andrieux J, Stray-Pedersen A, Chambon P, Patrier S, Lynch SA, Kjaergaard S, Tørring PM, Brasch-Andersen C, Ronan A, van Haeringen A, Anderson PJ, Powis Z, Brunner HG, Pfundt R, Schuurs-Hoeijmakers JHM, van Bon BWM, Lelieveld S, Gilissen C, Nillesen WM, Vissers LELM, Gecz J, Koolen DA, Testa G, de Vries BBA (2017) YY1 Haploinsufficiency Causes an Intellectual Disability Syndrome Featuring Transcriptional and Chromatin Dysfunction. *Am J Hum Genet*. doi: 10.1016/j.ajhg.2017.05.006
- Ganapathy ME, Huang W, Wang H, Ganapathy V, Leibach FH (1998) Valacyclovir: A substrate for the intestinal and renal peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *Biochem Biophys Res*

- Commun. doi: 10.1006/bbrc.1998.8628
- Gennaro VJ, Stanek TJ, Peck AR, Sun Y, Wang F, Qie S, Knudsen KE, Rui H, Butt T, Diehl JA, McMahon SB (2018) Control of CCND1 ubiquitylation by the catalytic SAGA subunit USP22 is essential for cell cycle progression through G1 in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. doi: 10.1073/pnas.1807704115
- Giralt A, Denechaud PD, Lopez-Mejia IC, Delacuisine B, Blanchet E, Bonner C, Pattou F, Annicotte JS, Fajas L (2018) E2F1 promotes hepatic gluconeogenesis and contributes to hyperglycemia during diabetes. *Mol Metab*. doi: 10.1016/j.molmet.2018.02.011
- Gloeckner-Hofmann K, Guillén-Gómez E, Schmidtgen C, Porstmann R, Ziegler R, Stoss O, Casado FJ, Rüschoff J, Pastor-Anglada M (2006) Expression of the high-affinity fluoropyrimidine-preferring nucleoside transporter hCNT1 correlates with decreased disease-free survival in breast cancer. *Oncology*. doi: 10.1159/000094541
- Goberdhan DCI, Meredith D, Boyd CAR, Wilson C (2005) PAT-related amino acid transporters regulate growth via a novel mechanism that does not require bulk transport of amino acids. *Development*. doi: 10.1242/dev.01821
- Godoy V, Banales JM, Medina JF, Pastor-Anglada M (2014) Functional crosstalk between the adenosine transporter CNT3 and purinergic receptors in the biliary epithelia. *J Hepatol*. doi: 10.1016/j.jhep.2014.06.036
- Govindarajan R, Leung GPH, Zhou M, Tse CM, Wang J, Unadkat JD (2009) Facilitated mitochondrial import of antiviral and anticancer nucleoside drugs by human equilibrative nucleoside transporter-3. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. doi: 10.1152/ajpgi.90672.2008
- Grabbe C, Husnjak K, Dikic I (2011) The spatial and temporal organization of ubiquitin networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*.
- Grañé-Boladeras N, Spring CM, Hanna WJB, Pastor-Anglada M, Coe IR (2016) Novel nuclear hENT2 isoforms regulate cell cycle progression via controlling nucleoside transport and nuclear reservoir. *Cell Mol Life Sci*. doi: 10.1007/s00018-016-2288-9
- Grañé-Boladeras N, Williams D, Tarmakova Z, Stevanovic K, Villani LA, Mehrabi P, Siu KWM, Pastor-Anglada M, Coe IR (2019) Oligomerization of equilibrative nucleoside transporters: a novel regulatory and functional mechanism involving PKC and PP1. *FASEB J*. doi: 10.1096/fj.201800440rr

- Gray JH (2004) Functional and Genetic Diversity in the Concentrative Nucleoside Transporter, CNT1, in Human Populations. *Mol Pharmacol* 65:512–519 . doi: 10.1124/mol.65.3.512
- Grice GL, Nathan JA (2016) The recognition of ubiquitinated proteins by the proteasome. *Cell. Mol. Life Sci.*
- Guérillon C, Bigot N, Pedeux R (2014) The ING tumor suppressor genes: Status in human tumors. *Cancer Lett.*
- Guillén-Gómez E, Calbet M, Casado J, De Lecea L, Soriano E, Pastor-Anglada M, Burgaya F (2004) Distribution of CNT2 and ENT1 transcripts in rat brain: Selective decrease of CNT2 mRNA in the cerebral cortex of sleep-deprived rats. *J Neurochem.* doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02545.x
- Guitart X, Bonaventura J, Rea W, Orrú M, Cellai L, Dettori I, Pedata F, Brugarolas M, Cortés A, Casadó V, Chang CP, Narayanan M, Chern Y, Ferré S (2016) Equilibrative nucleoside transporter ENT1 as a biomarker of Huntington disease. *Neurobiol Dis.* doi: 10.1016/j.nbd.2016.08.013
- Guo S, Lu H (2019) Novel mechanisms of regulation of the expression and transcriptional activity of hepatocyte nuclear factor 4 α . *J Cell Biochem* 120:519–532 . doi: 10.1002/jcb.27407

H

- Haim Y, Blüher M, Konrad D, Goldstein N, Klötting N, Harman-Boehm I, Kirshtein B, Ginsberg D, Tarnovskii T, Gepner Y, Shai I, Rudich A (2017) ASK1 (MAP3K5) is transcriptionally upregulated by E2F1 in adipose tissue in obesity, molecularly defining a human dys-metabolic obese phenotype. *Mol Metab.* doi: 10.1016/j.molmet.2017.05.003
- Haim Y, Blüher M, Slutsky N, Goldstein N, Klötting N, Harman-Boehm I, Kirshtein B, Ginsberg D, Gericke M, Jurado EG, Kovsan J, Tarnovskii T, Kachko L, Bashan N, Gepner Y, Shai I, Rudich A (2015) Elevated autophagy gene expression in adipose tissue of obese humans: A potential non-cell-cycle-dependent function of E2F1. *Autophagy.* doi: 10.1080/15548627.2015.1094597
- Hamilton SR, Yao SYM, Ingram JC, Hadden DA, Ritzel MWL, Gallagher MP, Henderson PJF, Cass CE, Young JD, Baldwin SA (2001) Subcellular Distribution and Membrane Topology of the Mammalian Concentrative Na⁺-Nucleoside Cotransporter rCNT1. *J Biol Chem.* doi: 10.1074/jbc.M100518200

- Han J, Meng J, Chen S, Wang X, Yin S, Zhang Q, Liu H, Qin R, Li Z, Zhong W, Zhang C, Zhang H, Tang Y, Lin T, Gao W, Zhang X, Yang L, Liu Y, Zhou HG, Sun T, Yang C (2019) YY1 complex promotes quaking expression via super-enhancer binding during EMT of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-2238
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*
- Hanoun N, Bureau C, Diab T, Gayet O, Dusetti N, Selves J, Vinel JP, Buscail L, Cordelier P, Torrisani J (2010) The SV2 variant of KLF6 is down-regulated in hepatocellular carcinoma and displays anti-proliferative and pro-apoptotic functions. *J Hepatol.* doi: 10.1016/j.jhep.2010.04.038
- Harris NJ, Charalambous K, Findlay HE, Booth PJ (2018) Lipids modulate the insertion and folding of the nascent chains of alpha helical membrane proteins. *Biochem. Soc. Trans.*
- Hatanaka T, Haramura M, Fei YJ, Miyauchi S, Bridges CC, Ganapathy PS, Smith SB, Ganapathy V, Ganapathy ME (2004) Transport of Amino Acid-Based Prodrugs by the Na⁺- and Cl⁻-Coupled Amino Acid Transporter ATBO₊ and Expression of the Transporter in Tissues Amenable for Drug Delivery. *J Pharmacol Exp Ther.* doi: 10.1124/jpet.103.057109
- Herraez E, Lozano E, Macias RIR, Vaquero J, Bujanda L, Banales JM, Marin JGG, Briz O (2013) Expression of SLC22A1 variants may affect the response of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma to sorafenib. *Hepatology.* doi: 10.1002/hep.26425
- Hesler RA, Huang JJ, Starr MD, Treboschi VM, Bernanke AG, Nixon AB, McCall SJ, White RR, Blobel GC (2016) TGF- β -induced stromal CYR61 promotes resistance to gemcitabine in pancreatic ductal adenocarcinoma through downregulation of the nucleoside transporters hENT1 and hCNT3. *Carcinogenesis.* doi: 10.1093/carcin/bgw093
- Hinton DJ, Lee MR, Jang JS, Choi DS (2014) Type 1 equilibrative nucleoside transporter regulates astrocyte-specific glial fibrillary acidic protein expression in the striatum. *Brain Behav.* doi: 10.1002/brb3.283
- Hirschi M, Johnson ZL, Lee SY (2017) Visualizing multistep elevator-like transitions of a nucleoside transporter. *Nature.* doi: 10.1038/nature22057
- Hochstrasser M (2009) Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature*
- Howe FS, Fischl H, Murray SC, Mellor J (2017) Is H3K4me3 instructive for transcription activation? *BioEssays.* doi: 10.1002/bies.201600095

- Hsieh FS, Chen YL, Hung MH, Chu PY, Tsai MH, Chen LJ, Hsiao YJ, Shih CT, Chang MJ, Chao TI, Shiau CW, Chen KF (2017) Palbociclib induces activation of AMPK and inhibits hepatocellular carcinoma in a CDK4/6-independent manner. *Mol Oncol*. doi: 10.1002/1878-0261.12072
- Hsu C-L, Lin W, Seshasayee D, Chen Y-H, Ding X, Lin Z, Suto E, Huang Z, Lee WP, Park H, Xu M, Sun M, Rangell L, Lutman JL, Ulufatu S, Stefanich E, Chalouni C, Sagolla M, Diehl L, Fielder P, Dean B, Balazs M, Martin F (2012) Equilibrative Nucleoside Transporter 3 Deficiency Perturbs Lysosome Function and Macrophage Homeostasis. *Science* (80-). doi: 10.1126/science.1213682
- Hu H, Endres CJ, Chang C, Umapathy NS, Lee EW, Fei YJ, Itagaki S, Swaan PW, Ganapathy V, Unadkat JD (2006) Electrophysiological characterization and modeling of the structure activity relationship of the human concentrative nucleoside transporter 3 (hCNT3). *Mol Pharmacol*. doi: 10.1124/mol.105.018945
- Hu Q, Qin Y, Zhang B, Liang C, Ji S, Shi S, Xu W, Xiang J, Liang D, Ni Q, Yu X, Xu J (2017) FBW7 increases the chemosensitivity of pancreatic cancer cells to gemcitabine through upregulation of ENT1. *Oncol Rep*. doi: 10.3892/or.2017.5856
- Huber-Ruano I, Errasti-Murugarren E, Godoy V, Vera Á, Andreu AL, Garcia-Arumi E, Martí R, Pastor-Anglada M (2012) Functional outcome of a novel SLC29A3 mutation identified in a patient with H syndrome. *Biochem Biophys Res Commun*. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.09.143
- Huber-Ruano I, Pinilla-Macua I, Torres G, Casado FJ, Pastor-Anglada M (2010) Link between high-affinity adenosine concentrative nucleoside transporter-2 (CNT2) and energy metabolism in intestinal and liver parenchymal cells. *J Cell Physiol*. doi: 10.1002/jcp.22254
- Hughes SJ, Cravetchi X, Vilas G, Hammond JR (2015) Adenosine A1 receptor activation modulates human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) activity via PKC-mediated phosphorylation of serine-281. *Cell Signal*. doi: 10.1016/j.cellsig.2015.02.023
- Hyde R, Cwiklinski EL, MacAulay K, Taylor PM, Hundal HS (2007) Distinct sensor pathways in the hierarchical control of SNAT2, a putative amino acid transceptor, by amino acid availability. *J Biol Chem*. doi: 10.1074/jbc.M611520200
- Hyde RJ, Cass CE, Young JD, Baldwin SA (2001) The ENT family of eukaryote nucleoside and nucleobase transporters: Recent advances in the investigation of structure/function relationships and the identification of novel isoforms. *Mol Membr Biol* 18:53–63 . doi:

10.1080/09687680118799

I

Inoue K, Fry EA, Frazier DP (2016) Transcription factors that interact with p53 and Mdm2. *Int. J. Cancer*

J

Jarvis SM, Thorn JA, Glue P (1998) Ribavirin uptake by human erythrocytes and the involvement of nitrobenzylthioinosine-sensitive (es)-nucleoside transporters. *Br J Pharmacol.* doi: 10.1038/sj.bjp.0701775

Jeng YM, Hsu HC (2003) KLF6, a putative tumor suppressor gene, is mutated in astrocytic gliomas. *Int J Cancer.* doi: 10.1002/ijc.11123

Jing X, Infante J, Nachtman RG, Jurecic R (2008) E3 ligase FLRF (Rnf41) regulates differentiation of hematopoietic progenitors by governing steady-state levels of cytokine and retinoic acid receptors. *Exp Hematol.* doi: 10.1016/j.exphem.2008.04.001

Joerger AC, Fersht AR (2007) Structure-function-rescue: The diverse nature of common p53 cancer mutants. *Oncogene*

Johnson ZL, Cheong CG, Lee SY (2012) Crystal structure of a concentrative nucleoside transporter from *Vibrio cholerae* at 2.4 Å. *Nature.* doi: 10.1038/nature10882

Jones PA, Issa JPJ, Baylin S (2016) Targeting the cancer epigenome for therapy. *Nat. Rev. Genet.*

Jordheim LP, Durantel D, Zoulim F, Dumontet C (2013) Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nat Rev Drug Discov* 12:447–464 . doi: 10.1038/nrd4010

Jung N, Lehmann C, Rubbert A, Knispel M, Hartmann P, Van Lunzen J, Stellbrink HJ, Faetkenheuer G, Taubert D (2008) Relevance of the organic cation transporters 1 and 2 for antiretroviral drug therapy in human immunodeficiency virus infection. *Drug Metab Dispos.* doi: 10.1124/dmd.108.020826

Jurecka A (2009) Inborn errors of purine and pyrimidine metabolism. *J Inherit Metab Dis.* doi: 10.1007/s10545-009-1094-z

K

- Kang N, Jun AH, Bhutia YD, Kannan N, Unadkat JD, Govindarajan R (2010) Human equilibrative nucleoside transporter-3 (hENT3) spectrum disorder mutations impair nucleoside transport, protein localization, and stability. *J Biol Chem*. doi: 10.1074/jbc.M110.109199
- Kang W, Tong JHM, Chan AWH, Zhao J, Dong Y, Wang S, Yang W, Sin FMC, Ng SSM, Yu J, Cheng ASL, To KF (2014) Yin Yang 1 contributes to gastric carcinogenesis and its nuclear expression correlates with shorter survival in patients with early stage gastric adenocarcinoma. *J Transl Med*. doi: 10.1186/1479-5876-12-80
- Kent LN, Bae S, Tsai SY, Tang X, Srivastava A, Koivisto C, Martin CK, Ridolfi E, Miller GC, Zorko SM, Plevris E, Hadjiyannis Y, Perez M, Nolan E, Kladney R, Westendorp B, De Bruin A, Fernandez S, Rosol TJ, Pohar KS, Pipas JM, Leone G (2017) Dosage-dependent copy number gains in E2f1 and E2f3 drive hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest*. doi: 10.1172/JCI87583
- Kent LN, Leone G (2019) The broken cycle: E2F dysfunction in cancer. *Nat. Rev. Cancer*
- Kent LN, Rakijas JB, Pandit SK, Westendorp B, Chen HZ, Huntington JT, Tang X, Bae S, Srivastava A, Senapati S, Koivisto C, Martin CK, Cuitino MC, Perez M, Clouse JM, Chokshi V, Shinde N, Kladney R, Sun D, Perez-Castro A, Matondo RB, Nantasanti S, Mokry M, Huang K, Machiraju R, Fernandez S, Rosol TJ, Coppola V, Pohar KS, Pipas JM, Schmidt CR, De Bruin A, Leone G (2016) E2f8 mediates tumor suppression in postnatal liver development. *J Clin Invest*. doi: 10.1172/JCI85506
- Kim J, Kim H, Lee J chan, Kim JW, Paik WH, Lee SH, Hwang JH, Ryu JK, Kim YT (2018) Human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) expression as a predictive biomarker for gemcitabine chemotherapy in biliary tract cancer. *PLoS One* 13:1–12 . doi: 10.1371/journal.pone.0209104
- Kim JW, Kim S, Kim S, Lee H, Lee JO, Jin MS (2017) Structural insights into the elevator-like mechanism of the sodium/citrate symporter CitS. *Sci Rep* 7:1–10 . doi: 10.1038/s41598-017-02794-x
- King KM, Damaraju VL, Vickers MF, Yao SY, Lang T, Tackaberry TE, Mowles DA, Ng AML, Young JD, Cass CE (2006) A comparison of the transportability, and its role in cytotoxicity, of clofarabine, cladribine, and fludarabine by recombinant human nucleoside transporters produced in three model expression systems. *Mol Pharmacol*. doi: 10.1124/mol.105.015768

- Klein K, Kullak-Ublick GA, Wagner M, Trauner M, Eloranta JJ (2009) Hepatocyte nuclear factor-4 α and bile acids regulate human concentrative nucleoside transporter-1 gene expression. *Am J Physiol Liver Physiol*. doi: 10.1152/ajpgi.90678.2008
- Knudsen ES, Knudsen KE (2006) Retinoblastoma tumor suppressor: Where cancer meets the cell cycle. *Exp. Biol. Med.*
- Kobayashi Y, Ohshiro N, Sakai R, Ohbayashi M, Kohyama N, Yamamoto T (2005) Transport mechanism and substrate specificity of human organic anion transporter 2 (hOat2 [SLC22A7]) . *J Pharm Pharmacol*. doi: 10.1211/0022357055966
- Kollareddy M, Dimitrova E, Vallabhaneni KC, Chan A, Le T, Chauhan KM, Carrero ZI, Ramakrishnan G, Watabe K, Haupt Y, Haupt S, Pochampally R, Boss GR, Romero DG, Radu CG, Martinez LA (2015) Regulation of nucleotide metabolism by mutant p53 contributes to its gain-of-function activities. *Nat Commun*. doi: 10.1038/ncomms8389
- Kolupaeva V, Janssens V (2013) PP1 and PP2A phosphatases - Cooperating partners in modulating retinoblastoma protein activation. *FEBS J*.
- Korn T, Kühlkamp T, Track C, Schatz I, Baumgarten K, Gorboulev V, Koepsell H (2001) The Plasma Membrane-associated Protein RS1 Decreases Transcription of the Transporter SGLT1 in Confluent LLC-PK1 Cells. *J Biol Chem*. doi: 10.1074/jbc.M105975200
- Kosovec JE, Zaidi AH, Omstead AN, Matsui D, Biedka MJ, Cox EJ, Campbell PT, Biederman RWW, Kelly RJ, Jobe BA (2017) CDK4/6 dual inhibitor abemaciclib demonstrates compelling preclinical activity against esophageal adenocarcinoma: A novel therapeutic option for a deadly disease. *Oncotarget*. doi: 10.18632/oncotarget.22244
- Kremer-Tal S, Narla G, Chen Y, Hod E, DiFeo A, Yea S, Lee JS, Schwartz M, Thung SN, Fiel IM, Banck M, Zimran E, Thorgeirsson SS, Mazzaferro V, Bruix J, Martignetti JA, Llovet JM, Friedman SL (2007) Downregulation of KLF6 is an early event in hepatocarcinogenesis, and stimulates proliferation while reducing differentiation. *J Hepatol*. doi: 10.1016/j.jhep.2006.10.012
- Kremer-Tal S, Reeves HL, Narla G, Thung SN, Schwartz M, Difeo A, Katz A, Bruix J, Bioulac-Sage P, Martignetti JA, Friedman SL (2004) Frequent inactivation of the tumor suppressor Kruppel-like Factor 6 (KLF6) in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. doi: 10.1002/hep.20460
- Kwon YT, Ciechanover A (2017) The Ubiquitin Code in the Ubiquitin-Proteasome System and

Autophagy. Trends Biochem. Sci.

L

Lacoste C, Hervé J, Nader MB, Santos A Dos, Moniaux N, Valogne Y, Montjean R, Dorseuil O, Samuel D, Cassio D, Portulano C, Carrasco N, Bréchet C, Faivre J (2012) Iodide transporter NIS regulates cancer cell motility and invasiveness by interacting with the rho guanine nucleotide exchange factor LARG. *Cancer Res.* doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0516

Lagarrigue S, Lopez-Mejia IC, Denechaud PD, Escoté X, Castillo-Armengol J, Jimenez V, Chavey C, Giralt A, Lai Q, Zhang L, Martinez-Carreres L, Delacuisine B, Annicotte JS, Blanchet E, Huré S, Abella A, Tinahones FJ, Vendrell J, Dubus P, Bosch F, Kahn CR, Fajas L (2016) CDK4 is an essential insulin effector in adipocytes. *J Clin Invest.* doi: 10.1172/JCI81480

Lai Y, Tse CM, Unadkat JD (2004) Mitochondrial Expression of the Human Equilibrative Nucleoside Transporter 1 (hENT1) Results in Enhanced Mitochondrial Toxicity of Antiviral Drugs. *J Biol Chem.* doi: 10.1074/jbc.M307938200

Lan W, Bian B, Xia Y, Dou S, Gayet O, Bigonnet M, Santofimia-Castaño P, Cong M, Peng L, Dusetti N, Iovanna J (2018) E2F signature is predictive for the pancreatic adenocarcinoma clinical outcome and sensitivity to E2F inhibitors, but not for the response to cytotoxic-based treatments. *Sci Rep.* doi: 10.1038/s41598-018-26613-z

Lane AN, Fan TWM (2015) Regulation of mammalian nucleotide metabolism and biosynthesis. *Nucleic Acids Res.*

Lane D, Levine A (2010) p53 Research: the past thirty years and the next thirty years. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*

Lane J, Martin TA, McGuigan C, Mason MD, Jiang WG (2010) The differential expression of hCNT1 and hENT1 in breast cancer and the possible impact on breast cancer therapy. *J Exp Ther Oncol*

Lang TT, Selner M, Young JD, Cass CE (2001) Acquisition of human concentrative nucleoside transporter 2 (hCNT2) activity by gene transfer confers sensitivity to fluoropyrimidine nucleosides in drug-resistant leukemia cells. *Mol Pharmacol.* doi: 10.1124/mol.60.5.1143

Lang UE, Kocabayoglu P, Cheng GZ, Ghiassi-Nejad Z, Muñoz U, Vetter D, Eckstein DA, Hannivoort RA, Walsh MJ, Friedman SL (2013) GSK3 β phosphorylation of the KLF6 tumor suppressor promotes its transactivation of p21. *Oncogene.* doi: 10.1038/onc.2012.457

- Leabman MK, Huang CC, DeYoung J, Carlson EJ, Taylor TR, de la Cruz M, Johns SJ, Stryke D, Kawamoto M, Urban TJ, Kroetz DL, Ferrin TE, Clark AG, Risch N, Herskowitz I, Giacomini KM, Investigators P of MT (2003) Natural variation in human membrane transporter genes reveal evolutionary and functional constraints. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5896–5901
- Leach MD, Brown AJP (2012) Posttranslational modifications of proteins in the pathobiology of medically relevant fungi. *Eukaryot Cell*. doi: 10.1128/EC.05238-11
- Lee C, Kang HJ, Ballmoos C Von, Newstead S, Dotson DL, Iwata S, Beckstein O, Alexander D, Drew D (2014) Europe PMC Funders Group Europe PMC Funders Author Manuscripts A two-domain elevator mechanism for sodium / proton antiport. *501:573–577* . doi: 10.1038/nature12484.A
- Leto D, Saltiel AR (2012) Regulation of glucose transport by insulin: Traffic control of GLUT4. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*
- Li D, Yea S, Li S, Chen Z, Narla G, Banck M, Laborda J, Tan S, Friedman JM, Friedman SL, Walsh MJ (2005) Krüppel-like factor-6 promotes preadipocyte differentiation through histone deacetylase 3-dependent repression of DLK1. *J Biol Chem*. doi: 10.1074/jbc.M500463200
- Li L, Koo SH, Hong IHK, Lee EJD (2009) Identification of functional promoter haplotypes of human concentrative nucleoside transporter 2, hCNT2 (SLC28A2). *Drug Metab Pharmacokinet*. doi: 10.2133/dmpk.24.161
- Li L, Tan CMF, Koo SH, Chong KT, Lee EJD (2007) Identification and functional analysis of variants in the human concentrative nucleoside transporter 2, hCNT2 (SLC28A2) in Chinese, Malays and Indians. *Pharmacogenet Genomics*. doi: 10.1097/FPC.0b013e3281c10e41
- Li Y, Slansky JE, Myers DJ, Drinkwater NR, Kaelin WG, Farnham PJ (1994) Cloning, chromosomal location, and characterization of mouse E2F1. *Mol Cell Biol*. doi: 10.1128/mcb.14.3.1861
- Liew CW, Boucher J, Cheong JK, Vernochet C, Koh HJ, Mallol C, Townsend K, Langin D, Kawamori D, Hu J, Tseng YH, Hellerstein MK, Farmer SR, Goodyear L, Doria A, Blüher M, Hsu SIH, Kulkarni RN (2013) Ablation of TRIP-Br2, a regulator of fat lipolysis, thermogenesis and oxidative metabolism, prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Nat Med*. doi: 10.1038/nm.3056
- Lipinski M, del Blanco B, Barco A (2019) CBP/p300 in brain development and plasticity: disentangling the KAT's cradle. *Curr. Opin. Neurobiol.*

- Liu D, Zhang J, Wu Y, Shi G, Yuan H, Lu Z, Zhu Q, Wu P, Lu C, Guo F, Chen J, Jiang K, Miao Y (2018) YY1 suppresses proliferation and migration of pancreatic ductal adenocarcinoma by regulating the CDKN3/MdM2/P53/P21 signaling pathway. *Int J Cancer*. doi: 10.1002/ijc.31173
- Loewen SK, Ng AML, Yao SYM, Cass CE, Baldwin SA, Young JD (1999) Identification of amino acid residues responsible for the pyrimidine and purine nucleoside specificities of human concentrative Na⁺ nucleoside cotransporters hCNT1 and hCNT2. *J Biol Chem*. doi: 10.1074/jbc.274.35.24475
- Lopez-Mejia IC, Lagarrigue S, Giralto A, Martinez-Carreres L, Zanou N, Denechaud PD, Castillo-Armengol J, Chavey C, Orpinell M, Delacuisine B, Nasrallah A, Collodet C, Zhang L, Viollet B, Hardie DG, Fajas L (2017) CDK4 Phosphorylates AMPK α 2 to Inhibit Its Activity and Repress Fatty Acid Oxidation. *Mol Cell*. doi: 10.1016/j.molcel.2017.09.034
- Lu Y, Xu D, Peng J, Luo Z, Chen C, Chen Y, Chen H, Zheng M, Yin P, Wang Z (2019) HNF1A inhibition induces the resistance of pancreatic cancer cells to gemcitabine by targeting ABCB1. *EBioMedicine*. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.05.013
- Lv T, Wu X, Sun L, Hu Q, Wan Y, Wang L, Zhao Z, Tu X, Xiao ZXJ (2017a) p53-R273H upregulates neuropilin-2 to promote cell mobility and tumor metastasis. *Cell Death Dis*. doi: 10.1038/cddis.2017.376
- Lv Y, Xiao J, Liu J, Xing F (2017b) E2F8 is a potential therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *J. Cancer*

M

- Mackey JR, Yao SYM, Smith KM, Karpinski E, Baldwin SA, Cass CE, Young JD (1999) Gemcitabine transport in *Xenopus* oocytes expressing recombinant plasma membrane mammalian nucleoside transporters. *J Natl Cancer Inst*. doi: 10.1093/jnci/91.21.1876
- Maiuolo J, Oppedisano F, Gratteri S, Muscoli C, Mollace V (2016) Regulation of uric acid metabolism and excretion. *Int J Cardiol*. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.08.109
- Mangravite LM, Lipschutz JH, Mostov KE, Giacomini KM (2001) Localization of GFP-tagged concentrative nucleoside transporters in a renal polarized epithelial cell line. *Am J Physiol - Ren Physiol*
- Mangravite LM, Xiao G, Giacomini KM (2003) Localization of human equilibrative nucleoside

- transporters, hENT1 and hENT2, in renal epithelial cells. *Am J Physiol - Ren Physiol*
- Mani RS, Hammond JR, Marjan JMJ, Graham KA, Young JD, Baldwin SA, Cass CE (1998) Demonstration of equilibrative nucleoside transporters (hENT1 and hENT2) in nuclear envelopes of cultured human choriocarcinoma (BeWo) cells by functional reconstitution in proteoliposomes. *J Biol Chem*. doi: 10.1074/jbc.273.46.30818
- Marin MC, Jost CA, Brooks LA, Irwin MS, O’Nions J, Tidy JA, James N, McGregor JM, Harwood CA, Yulug IG, Vousden KH, Allday MJ, Gusterson B, Ikawa S, Hinds PW, Crook T, Kaelin WG (2000) A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. *Nat Genet*. doi: 10.1038/75586
- Marke R, Van Leeuwen FN, Scheijen B (2018) The many faces of IKZF1 in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*
- Martinez-Becerra P, Vaquero J, Romero MR, Lozano E, Anadon C, Maclas RIR, Serrano MA, Grañé-Boladeras N, Muñoz-Bellvis L, Alvarez L, Sangro B, Pastor-Anglada M, Marin JJG (2012) No correlation between the expression of FXR and genes involved in multidrug resistance phenotype of primary liver tumors. *Mol Pharm*. doi: 10.1021/mp300028a
- Martínez-Carreres L, Puyal J, Leal-Esteban LC, Orpinell M, Castillo-Armengol J, Giralt A, Dergai O, Moret C, Barquissau V, Nasrallah A, Pabois A, Zhang L, Romero P, Lopez-Mejia IC, Fajas L (2019) CDK4 regulates lysosomal function and mTORC1 activation to promote cancer cell survival. *Cancer Res* canres.0708.2019 . doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-0708
- Mata JF, García-Manteiga JM, Lostao MP, Fernández-Veledo S, Guillén-Gómez E, Larrayoz IM, Lloberas J, Casado FJ, Pastor-Anglada M (2001) Role of the human concentrative nucleoside transporter (hCNT1) in the cytotoxic action of 5[prime]-deoxy-5-fluorouridine, an active intermediate metabolite of capecitabine, a novel oral anticancer drug. *Mol Pharmacol*. doi: 10.1124/mol.59.6.1542
- Matsumoto N, Kubo A, Liu H, Akita K, Laub F, Ramirez F, Keller G, Friedman SL (2006) Developmental regulation of yolk sac hematopoiesis by Krüppel-like factor 6. *Blood*. doi: 10.1182/blood-2005-05-1916
- Medina-Pulido L, Molina-Arcas M, Justicia C, Soriano E, Burgaya F, Planas AM, Pastor-Anglada M (2013) Hypoxia and P1 receptor activation regulate the high-affinity concentrative adenosine transporter CNT2 in differentiated neuronal PC12 cells. *Biochem J*. doi: 10.1042/bj20130231

- Menendez D, Nguyen TA, Freudenberg JM, Mathew VJ, Anderson CW, Jothi R, Resnick MA (2013) Diverse stresses dramatically alter genome-wide p53 binding and transactivation landscape in human cancer cells. *Nucleic Acids Res.* doi: 10.1093/nar/gkt504
- Meo-Evoli N, Almacellas E, Massucci FA, Gentilella A, Ambrosio S, Kozma SC, Thomas G, Tauler A (2015) V-ATPase: A master effector of E2F1-mediated lysosomal trafficking, mTORC1 activation and autophagy. *Oncotarget.* doi: 10.18632/oncotarget.4812
- Mey V, Giovannetti E, De Braud F, Nannizzi S, Curigliano G, Verweij F, De Cobelli O, Pece S, Del Tacca M, Danesi R (2006) In vitro synergistic cytotoxicity of gemcitabine and pemetrexed and pharmacogenetic evaluation of response to gemcitabine in bladder cancer patients. *Br J Cancer.* doi: 10.1038/sj.bjc.6603242
- Minuesa G, Huber-Ruano I, Pastor-Anglada M, Koepsell H, Clotet B, Martinez-Picado J (2011) Drug uptake transporters in antiretroviral therapy. *Pharmacol. Ther.*
- Minuesa G, Volk C, Molina-Arcas M, Gorboulev V, Erkizia I, Arndt P, Clotet B, Pastor-Anglada M, Koepsell H, Martinez-Picado J (2009) Transport of lamivudine [(-)- β -L-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine] and high-affinity interaction of nucleoside reverse transcriptase inhibitors with human organic cation transporters 1, 2, and 3. *J Pharmacol Exp Ther.* doi: 10.1124/jpet.108.146225
- Mohelnikova-Duchonova B, Brynychova V, Hlavac V, Kocik M, Oliverius M, Hlavsa J, Honsova E, Mazanec J, Kala Z, Melichar B, Soucek P (2013) The association between the expression of solute carrier transporters and the prognosis of pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* doi: 10.1007/s00280-013-2246-2
- Molho-Pessach V, Lerer I, Abeliovich D, Agha Z, Abu Libdeh A, Broshtilova V, Elpeleg O, Zlotogorski A (2008) The H Syndrome Is Caused by Mutations in the Nucleoside Transporter hENT3. *Am J Hum Genet.* doi: 10.1016/j.ajhg.2008.09.013
- Molina-Arcas M, Casado F, Pastor-Anglada M (2009) Nucleoside Transporter Proteins. *Curr Vasc Pharmacol.* doi: 10.2174/157016109789043892
- Molina-Arcas M, Moreno-Bueno G, Cano-Soldado P, Hernández-Vargas H, Casado FJ, Palacios J, Pastor-Anglada M (2006) Human equilibrative nucleoside transporter-1 (hENT1) is required for the transcriptomic response of the nucleoside-derived drug 5'-DFUR in breast cancer MCF7 cells. *Biochem Pharmacol.* doi: 10.1016/j.bcp.2006.07.036
- Molina-Arcas M, Pastor-Anglada FJC and M (2009) Nucleoside Transporter Proteins. *Curr. Vasc.*

Pharmacol. 7:426–434

Molleran Lee S, Villanueva J, Sumegi J, Zhang K, Kogawa K, Davis J, Filipovich AH (2004) Characterisation of diverse PRF1 mutations leading to decreased natural killer cell activity in North American families with haemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Med Genet*

Montero TD, Racordon D, Bravo L, Owen GI, Bronfman ML, Leisewitz A V. (2012) PPAR α and PPAR γ regulate the nucleoside transporter hENT1. *Biochem Biophys Res Commun*. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.02.035

Morgan N V., Morris MR, Cangul H, Gleeson D, Straatman-Iwanowska A, Davies N, Keenan S, Pasha S, Rahman F, Gentle D, Vreeswijk MPG, Devilee P, Knowles MA, Ceylaner S, Trembath RC, Dalence C, Kismet E, Lu VK, Rossbach HC, Gissen P, Tannahill D, Maher ER (2010) Mutations in SLC29a3, encoding an equilibrative nucleoside transporter ENT3, cause a familial histiocytosis syndrome (Faisalabad histiocytosis) and familial Rosai-Dorfman disease. *PLoS Genet*. doi: 10.1371/journal.pgen.1000833

Morote-Garcia JC, Rosenberger P, Nivillac NMI, Coe IR, Eltzhig HK (2009) Hypoxia-Inducible Factor-Dependent Repression of Equilibrative Nucleoside Transporter 2 Attenuates Mucosal Inflammation During Intestinal Hypoxia. *Gastroenterology*. doi: 10.1053/j.gastro.2008.10.037

Mulinta R, Yao SYM, Ng AML, Cass CE, Young JD (2017) Substituted Cysteine accessibility method (SCAM) analysis of the transport domain of human concentrative nucleoside transporter 3 (hCNT3) and other family members reveals features of structural and functional importance. *J Biol Chem*. doi: 10.1074/jbc.M116.743997

Muller PAJ, Vousden KH (2013) P53 mutations in cancer. *Nat. Cell Biol*.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1992) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology*

Murugan AK (2019) mTOR: Role in cancer, metastasis and drug resistance. *Semin Cancer Biol*. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.07.003

N

Nam HW, Hinton DJ, Kang NY, Kim T, Lee MR, Oliveros A, Adams C, Ruby CL, Choi DS (2013) Adenosine transporter ENT1 regulates the acquisition of goal-directed behavior and ethanol drinking through A2A receptor in the dorsomedial striatum. *J Neurosci*. doi:

10.1523/JNEUROSCI.3094-12.2013

Nam HW, Lee MR, Zhu Y, Wu J, Hinton DJ, Choi S, Kim T, Hammack N, Yin JCP, Choi DS (2011) Type 1 equilibrative nucleoside transporter regulates ethanol drinking through accumbal N-methyl-D-aspartate receptor signaling. *Biol Psychiatry*. doi: 10.1016/j.biopsych.2011.02.013

Nammo T, Yamagata K, Tanaka T, Kodama T, Sladek FM, Fukui K, Katsube F, Sato Y, Miyagawa J ichiro, Shimomura I (2008) Expression of HNF-4 α (MODY1), HNF-1 β (MODY5), and HNF-1 α (MODY3) proteins in the developing mouse pancreas. *Gene Expr Patterns*. doi: 10.1016/j.modgep.2007.09.006

Narla G, Heath KE, Reeves HL, Li D, Giono LE, Kimmelman AC, Glucksman MJ, Narla J, Eng FJ, Chan AM, Ferrari AC, Martignetti JA, Friedman SL (2001) KLF6, a candidate tumor suppressor gene mutated in prostate cancer. *Science* (80-). doi: 10.1126/science.1066326

Narla G, Kremer-Tal S, Matsumoto N, Zhao X, Yao S, Kelley K, Tarocchi M, Friedman SL (2007) In vivo regulation of p21 by the Kruppel-like factor 6 tumor-suppressor gene in mouse liver and human hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. doi: 10.1038/sj.onc.1210223

O

Olivier M, Hollstein M, Hainaut P (2010) TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*.

Osato DH, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ, Stryke D, Wang J, Ferrin TE, Herskowitz I, Giacomini KM (2003) Functional characterization in yeast of genetic variants in the human equilibrative nucleoside transporter, ENT1. *Pharmacogenetics*. doi: 10.1097/00008571-200305000-00010

Owen RP, Gray JH, Taylor TR, Carlson EJ, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ, Stryke D, Ferrin TE, Giacomini KM (2005) Genetic analysis and functional characterization of polymorphisms in the human concentrative nucleoside transporter, CNT2. *Pharmacogenet Genomics* 15:83–90 . doi: 10.1097/01213011-200502000-00004

Owen RP, Lagpacan LL, Taylor TR, De La Cruz M, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ, Stryke D, Ferrin TE, Giacomini KM (2006) Functional characterization and haplotype analysis of polymorphisms in the human equilibrative nucleoside transporter, ENT2. *Drug Metab Dispos*. doi: 10.1124/dmd.105.006270

P

- Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ (2008) Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet.* doi: 10.1038/ng.259
- Pant V, Lozano G (2014) Limiting the power of p53 through the ubiquitin proteasome pathway. *Genes Dev.*
- Park JE, Ryoo G, Lee W (2017) Alternative Splicing: Expanding Diversity in Major ABC and SLC Drug Transporters. *AAPS J.* doi: 10.1208/s12248-017-0150-0
- Parker WB (2009) Enzymology of purine and pyrimidine antimetabolites used in the treatment of cancer. *Chem Rev.* doi: 10.1021/cr900028p
- Parrales A, Iwakuma T (2015) Targeting oncogenic mutant p53 for cancer therapy. *Front. Oncol.*
- Pastor-Anglada M, Cano-Soldado P, Errasti-Murugarren E, Casado FJ (2008) SLC28 genes and concentrative nucleoside transporter (CNT) proteins. *Xenobiotica*
- Pastor-Anglada M, Casado FJ, Valdés R, Mata J, García-Manteiga J, Molina M (2001) Complex regulation of nucleoside transporter expression in epithelial and immune system cells. *Mol Membr Biol* 18:81–85 . doi: 10.1080/096876800110033783
- Pastor-Anglada M, Errasti-Murugarren E, Aymerich I, Casado FJ (2007) Concentrative nucleoside transporters (CNTs) in epithelia: From absorption to cell signaling. *J. Physiol. Biochem.*
- Pastor-Anglada M, Pérez-Torras S (2018) Emerging roles of nucleoside transporters. *Front. Pharmacol.*
- Pastor-Anglada M, Pérez-Torras S (2015) Nucleoside transporter proteins as biomarkers of drug responsiveness and drug targets. *Front Pharmacol* 6:1–14 . doi: 10.3389/fphar.2015.00013
- Pastor-Anglada M, Urtasun N, Pérez-Torras S (2018) Intestinal nucleoside transporters: Function, expression, and regulation. *Compr Physiol* 8:1003–1017 . doi: 10.1002/cphy.c170039
- Patil SD, Ngo LY, Glue P, Unadkat JD (1998) Intestinal absorption of ribavirin is preferentially mediated by the Na⁺-nucleoside purine (N1) transporter. *Pharm Res.* doi: 10.1023/A:1011945103455
- Patnaik A, Rosen LS, Tolaney SM, Tolcher AW, Goldman JW, Gandhi L, Papadopoulos KP, Beeram

- M, Rasco DW, Hilton JF, Nasir A, Beckmann RP, Schade AE, Fulford AD, Nguyen TS, Martinez R, Kulanthaivel P, Li LQ, Frenzel M, Cronier DM, Chan EM, Flaherty KT, Wen PY, Shapiro GI (2016) Efficacy and safety of Abemaciclib, an inhibitor of CDK4 and CDK6, for patients with breast cancer, non-small cell lung cancer, and other solid tumors. *Cancer Discov.* doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-0095
- Peng XX, Shi Z, Damaraju VL, Huang XC, Kruh GD, Wu HC, Zhou Y, Tiwari A, Fu L, Cass CE, Chen ZS (2008) Up-regulation of MRP4 and down-regulation of influx transporters in human leukemic cells with acquired resistance to 6-mercaptopurine. *Leuk Res.* doi: 10.1016/j.leukres.2007.09.015
- Pérez-Torras S, García-Manteiga J, Mercadé E, Casado FJ, Carbó N, Pastor-Anglada M, Mazo A (2008) Adenoviral-mediated overexpression of human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) enhances gemcitabine response in human pancreatic cancer. *Biochem Pharmacol.* doi: 10.1016/j.bcp.2008.05.011
- Pérez-Torras S, Mata-Ventosa A, Drögemöller B, Tarailo-Graovac M, Meijer J, Meinsma R, van Cruchten AG, Kulik W, Viel-Oliva A, Bidon-Chanal A, Ross CJ, Wassermann WW, van Karnebeek CDM, Pastor-Anglada M, van Kuilenburg ABP (2019) Deficiency of perforin and hCNT1, a novel inborn error of pyrimidine metabolism, associated with a rapidly developing lethal phenotype due to multi-organ failure. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* doi: 10.1016/j.bbadis.2019.01.013
- Pérez-Torras S, Vidal-Pla A, Cano-Soldado P, Huber-Ruano I, Mazo A, Pastor-Anglada M (2013) Concentrative nucleoside transporter 1 (hCNT1) promotes phenotypic changes relevant to tumor biology in a translocation-independent manner. *Cell Death Dis* 4:e648 . doi: 10.1038/cddis.2013.173
- Pérez-Torras S, Vidal-Pla A, Miquel R, Almendro V, Fernández-Cruz L, Navarro S, Maurel J, Carbó N, Gascón P, Mazo A (2011) Characterization of human pancreatic orthotopic tumor xenografts suitable for drug screening. *Cell Oncol.* doi: 10.1007/s13402-011-0049-1
- Pierce AM, Gimenez-Conti IB, Schneider-Broussard R, Martinez LA, Conti CJ, Johnson DG (1998) Increased E2F1 activity induces skin tumors in mice heterozygous and nullizygous for p53. *Proc Natl Acad Sci U S A.* doi: 10.1073/pnas.95.15.8858
- Pierce AM, Schneider-Broussard R, Gimenez-Conti IB, Russell JL, Conti CJ, Johnson DG (1999) E2F1 Has Both Oncogenic and Tumor-Suppressive Properties in a Transgenic Model. *Mol Cell Biol.* doi: 10.1128/mcb.19.9.6408

- Pinilla-Macua I, Fernández-Calotti P, Pérez-Del-Pulgar S, Pastor-Anglada M (2014) Ribavirin uptake into human hepatocyte HHL5 cells is enhanced by interferon- α via up-regulation of the human concentrative nucleoside transporter (hCNT2). *Mol Pharm.* doi: 10.1021/mp500263p
- Piper RC, Lehner PJ (2011) Endosomal transport via ubiquitination. *Trends Cell Biol.*
- Pisoni RL, Thoene JG (1991) The transport systems of mammalian lysosomes. *BBA - Rev. Biomembr.*
- Podgorska M, Kocbuch K, Grden M, Szulc A, Szutowicz A, Pawelczyk T (2007) Different signaling pathways utilized by insulin to regulate the expression of ENT2, CNT1, CNT2 nucleoside transporters in rat cardiac fibroblasts. *Arch Biochem Biophys.* doi: 10.1016/j.abb.2007.04.025
- Poppy Roworth A, Ghari F, La Thangue NB (2015) To live or let die—complexity within the E2F1 pathway. *Mol. Cell. Oncol.*
- Poratti M, Marzaro G (2019) Third-generation CDK inhibitors: A review on the synthesis and binding modes of Palbociclib, Ribociclib and Abemaciclib. *Eur. J. Med. Chem.*
- Prus KL, Averett DR, Zimmerman TP (1990) Transport and Metabolism of 9- β -D-Arabinofuranosylguanine in a Human T-Lymphoblastoid Cell Line: Nitrobenzylthioinosine-sensitive and -insensitive Influx. *Cancer Res*
- Puebla C, Farías M, González M, Vecchiola A, Aguayo C, Krause B, Pastor-Anglada M, Casanello P, Sobrevia L (2008) High D-glucose reduces SLC29A1 promoter activity and adenosine transport involving specific protein 1 in human umbilical vein endothelium. *J Cell Physiol.* doi: 10.1002/jcp.21347

Q

- Qie S, Diehl JA (2016) Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment. *J. Mol. Med.*
- Qiu XB, Goldberg AL (2002) Nrdp1/FLRF is a ubiquitin ligase promoting ubiquitination and degradation of the epidermal growth factor receptor family member, ErbB3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* doi: 10.1073/pnas.232580999
- Qiu XB, Markant SL, Yuan J, Goldberg AL (2004) Nrdp1-mediated degradation of the gigantic IAP, BRUCE, is a novel pathway for triggering apoptosis. *EMBO J.* doi:

10.1038/sj.emboj.7600075

R

Ramadan A, Naydenova Z, Stevanovic K, Rose JB, Coe IR (2014) The adenosine transporter, ENT1, in cardiomyocytes is sensitive to inhibition by ethanol in a kinase-dependent manner: Implications for ethanol-dependent cardioprotection and nucleoside analog drug cytotoxicity. *Purinergic Signal*. doi: 10.1007/s11302-013-9391-2

Rayess H, Wang MB, Srivatsan ES (2012) Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *Int J Cancer*. doi: 10.1002/ijc.27316

Reddy PS, Corley RB (1998) Assembly, sorting, and exit of oligomeric proteins from the endoplasmic reticulum. *BioEssays*. doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(199807)20:7<546::AID-BIES5>3.0.CO;2-I

Reeves HL, Narla G, Ogunbiyi O, Haq AI, Katz A, Benzeno S, Hod E, Harpaz N, Goldberg S, Tal-Kremer S, Eng FJ, Arthur MJP, Martignetti JA, Friedman SL (2004) Kruppel-Like Factor 6 (KLF6) Is a Tumor-Suppressor Gene Frequently Inactivated in Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. doi: 10.1053/j.gastro.2004.01.005

Reyes-Turcu FE, Ventii KH, Wilkinson KD (2009) Regulation and Cellular Roles of Ubiquitin-Specific Deubiquitinating Enzymes. *Annu Rev Biochem*. doi: 10.1146/annurev.biochem.78.082307.091526

Reyes G, Nivillac NMI, Karim MZ, Desouza L, Siu KWM, Coe IR (2011) The equilibrative nucleoside transporter (ENT1) can be phosphorylated at multiple sites by PKC and PKA. *Mol Membr Biol*. doi: 10.3109/09687688.2011.604861

Reyes N, Ginter C, Boudker O (2009) Transport mechanism of a bacterial homologue of glutamate transporters. *Nature*. doi: 10.1038/nature08616

Risma KA, Frayer RW, Filipovich AH, Sumegi J (2006) Aberrant maturation of mutant perforin underlies the clinical diversity of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Clin Invest*. doi: 10.1172/JCI26217

Ritzel MWL, Ng AML, Yao SYM, Graham K, Loewen SK, Smith KM, Hyde RJ, Karpinski E, Cass CE, Baldwin SA, Young JD (2001a) Recent molecular advances in studies of the concentrative Na⁺-dependent nucleoside transporter (CNT) family: Identification and characterization of novel human and mouse proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and

- pyrimidine nucleosides (s. *Mol Membr Biol* 18:65–72 . doi: 10.1080/09687680118530
- Ritzel MWL, Ng AML, Yao SYM, Graham K, Loewen SK, Smith KM, Ritzel RG, Mowles DA, Carpenter P, Chen XZ, Karpinski E, Hyde RJ, Baldwin SA, Cass CE, Young JD (2001b) Molecular Identification and Characterization of Novel Human and Mouse Concentrative Na⁺-Nucleoside Cotransporter Proteins (hCNT3 and mCNT3) Broadly Selective for Purine and Pyrimidine Nucleosides (System cib). *J Biol Chem*. doi: 10.1074/jbc.M007746200
- Ritzel MWL, Yao SYM, Huang MY, Elliott JF, Cass CE, Young JD (1997) Molecular cloning and functional expression of cDNAs encoding a human Na⁺-nucleoside cotransporter (hCNT1). *Am J Physiol - Cell Physiol* 272:707–714
- Rius M, Stresemann C, Keller D, Brom M, Schirrmacher E, Keppler D, Lyko F (2009) Human concentrative nucleoside transporter 1-mediated uptake of 5-azacytidine enhances DNA demethylation. *Mol Cancer Ther*. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0743
- Ritzel MWL, Yao SYM, Ng AML, Mackeyt JR, Cass CE, Young JD (1998) Molecular cloning, functional expression and chromosomal localization of a cDNA encoding a human Na⁺ /nucleoside cotransporter (hCNT2) selective for purine nucleosides and uridine . *Mol Membr Biol* 15:203–211 . doi: 10.3109/09687689709044322
- Robillard KR, Bone DBJ, Park JS, Hammond JR (2008) Characterization of mENT1 11, a Novel Alternative Splice Variant of the Mouse Equilibrative Nucleoside Transporter 1. *Mol Pharmacol*. doi: 10.1124/mol.107.041871
- Robinson DR, Wu YM, Lonigro RJ, Vats P, Cobain E, Everett J, Cao X, Rabban E, Kumar-Sinha C, Raymond V, Schuetze S, Alva A, Siddiqui J, Chugh R, Worden F, Zalupski MM, Innis J, Mody RJ, Tomlins SA, Lucas D, Baker LH, Ramnath N, Schott AF, Hayes DF, Vijai J, Offit K, Stoffel EM, Roberts JS, Smith DC, Kunju LP, Talpaz M, Cieřlik M, Chinnaiyan AM (2017) Integrative clinical genomics of metastatic cancer. *Nature*. doi: 10.1038/nature23306
- Rodríguez-Mulero S, Errasti-Murugarren E, Ballarín J, Felipe A, Doucet A, Casado FJ, Pastor-Anglada M (2005) Expression of concentrative nucleoside transporters SLC28 (CNT1, CNT2, and CNT3) along the rat nephron: Effect of diabetes. *Kidney Int*. doi: 10.1111/j.1523-1755.2005.00444.x
- Rogato A, D'Apuzzo E, Chiurazzi M (2010) The multiple plant response to high ammonium conditions: The Lotus japonicus AMT1; 3 protein acts as a putative transceptor. *Plant Signal Behav*. doi: 10.4161/psb.5.12.13856

Rose JB, Naydenova Z, Bang A, Eguchi M, Sweeney G, Choi DS, Hammond JR, Coe IR (2010) Equilibrative nucleoside transporter 1 plays an essential role in cardioprotection. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. doi: 10.1152/ajpheart.00711.2009

Rubio-Teixeira M, Van Zeebroeck G, Voordeckers K, Thevelein JM (2010) *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane nutrient sensors and their role in PKA signaling. *FEMS Yeast Res*.

Ruosi C, Colella G, Fazioli F, Miceli R, Gallo M, Di Salvatore MG, Cimmino A, De Nigris F (2017) Yin Yang i as an epimodulator of miRNAs in the metastatic cascade. *Crit Rev Oncog*. doi: 10.1615/CritRevOncog.2017020855

S

Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NCT, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T (2002) Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature*. doi: 10.1038/nature01080

Schnekenburger M, Dicato M, Diederich M (2014) Epigenetic modulators from “The Big Blue”: A treasure to fight against cancer. *Cancer Lett*.

Schothorst J, Zeebroeck G Van, Thevelein JM (2017) Identification of Ftr1 and Zrt1 as iron and zinc micronutrient transceptors for activation of the PKA pathway in *saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell*. doi: 10.15698/mic2017.03.561

Schulze A, Zerfass K, Spitkovsky D, Middendorp S, Bergès J, Helin K, Jansen-Dürr P, Henglein B (1995) Cell cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site. *Proc Natl Acad Sci U S A*. doi: 10.1073/pnas.92.24.11264

Schwartz L, Supuran C, Alfarouk K (2017) The Warburg Effect and the Hallmarks of Cancer. *Anticancer Agents Med Chem*. doi: 10.2174/1871520616666161031143301

Seshachalam VP, Sekar K, Hui KM (2018) Insights into the etiology-associated gene regulatory networks in hepatocellular carcinoma from The Cancer Genome Atlas. *J Gastroenterol Hepatol*. doi: 10.1111/jgh.14262

Sharifi-Zarchi A, Gerovska D, Adachi K, Totonchi M, Pezeshk H, Taft RJ, Schöler HR, Chitsaz H, Sadeghi M, Baharvand H, Araúzo-Bravo MJ (2017) DNA methylation regulates discrimination of enhancers from promoters through a H3K4me1-H3K4me3 seesaw mechanism. *BMC Genomics*. doi: 10.1186/s12864-017-4353-7

- Sharma S, Kelly TK, Jones PA (2009) Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31:27–36 . doi: 10.1093/carcin/bgp220
- Sharpless NE, Sherr CJ (2015) Forging a signature of in vivo senescence. *Nat. Rev. Cancer*
- Sheppard KE, McArthur GA (2013) The cell-cycle regulator CDK4: An emerging therapeutic target in melanoma. *Clin Cancer Res.* doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0259
- Shizuya H, Kouros-Mehr H (2001) The development and applications of the bacterial artificial chromosome cloning system. *Keio J. Med.*
- Slansky JE, Li Y, Kaelin WG, Farnham PJ (1993) A protein synthesis-dependent increase in E2F1 mRNA correlates with growth regulation of the dihydrofolate reductase promoter. *Mol Cell Biol.* doi: 10.1128/mcb.13.3.1610
- Smith KM, Ng AML, Yao SYM, Labedz KA, Knaus EE, Wiebe LI, Cass CE, Baldwin SA, Chen XZ, Karpinski E, Young JD (2004) Electrophysiological characterization of a recombinant human Na⁺-coupled nucleoside transporter (hCNT1) produced in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.*
- Smith KM, Slugoski MD, Loewen SK, Ng AML, Yao SYM, Chen XZ, Karpinski E, Cass CE, Baldwin SA, Young JD (2005) The broadly selective human Na⁺/nucleoside cotransporter (hCNT3) exhibits novel cation-coupled nucleoside transport characteristics. *J Biol Chem* 280:25436–25449 . doi: 10.1074/jbc.M409454200
- Snider J, Kittanakom S, Curak J, Stagljar I (2010) Split-ubiquitin based membrane yeast two-hybrid (MYTH) system: A powerful tool for identifying protein-protein interactions. *J Vis Exp.* doi: 10.3791/1698
- Song A, Zhang Y, Han L, Yegutkin GG, Liu H, Sun K, D’Alessandro A, Li J, Karmouty-Quintana H, Iriyama T, Weng T, Zhao S, Wang W, Wu H, Nemkov T, Subudhi AW, Jameson-Van Houten S, Julian CG, Lovering AT, Hansen KC, Zhang H, Bogdanov M, Dowhan W, Jin J, Kellems RE, Eltzschig HK, Blackburn M, Roach RC, Xia Y (2017) Erythrocytes retain hypoxic adenosine response for faster acclimatization upon re-ascent. *Nat Commun.* doi: 10.1038/ncomms14108
- Stecula A, Schlessinger A, Giacomini KM, Sali A (2017) Human Concentrative Nucleoside Transporter 3 (hCNT3, SLC28A3) Forms a Cyclic Homotrimer. *Biochemistry.* doi: 10.1021/acs.biochem.7b00339
- Stepp SE, Dufourcq-Lagelouse R, Le Deist F, Bhawan S, Certain S, Mathew PA, Henter JI, Bennett M, Fischer A, De Saint Basile G, Kumar V (1999) Perforin gene defects in familial

- hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Science* (80-). doi: 10.1126/science.286.5446.1957
- Sugawara M, Huang W, Fei YJ, Leibach FH, Ganapathy V, Ganapathy ME (2000) Transport of valganciclovir, a ganciclovir prodrug, via peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *J Pharm Sci*. doi: 10.1002/(SICI)1520-6017(200006)89:6<781::AID-JPS10>3.0.CO;2-7
- Sui G, Affar EB, Shi Y, Brignone C, Wall NR, Yin P, Donohoe M, Luke MP, Calvo D, Grossman SR, Shi Y (2004) Yin Yang 1 is a negative regulator of p53. *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2004.06.004
- Sundar D, Yu Y, Katiyar SP, Putri JF, Dhanjal JK, Wang J, Sari AN, Kolettas E, Kaul SC, Wadhwa R (2019) Wild type p53 function in p53Y220C mutant harboring cells by treatment with Ashwagandha derived anticancer withanolides: bioinformatics and experimental evidence. *J Exp Clin Cancer Res*. doi: 10.1186/s13046-019-1099-x
- Sundaram M, Yao SYM, Ingram JC, Berry ZA, Abidi F, Cass CE, Baldwin SA, Young JD (2001) Topology of a Human Equilibrative, Nitrobenzylthioinosine (NBMPR) -sensitive Nucleoside Transporter (hENT1) Implicated in the Cellular Uptake of Adenosine and Anti-cancer Drugs. *J Biol Chem* 276:45270–45275 . doi: 10.1074/jbc.M107169200

T

- Takeda M, Khamdang S, Narikawa S, Kimura H, Kobayashi Y, Yamamoto T, Cha SHO, Sekine T, Endou H (2002) Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal antiviral transport. *J Pharmacol Exp Ther*. doi: 10.1124/jpet.300.3.918
- Tanaka T, Doe JM, Horstmann SA, Ahmad S, Ahmad A, Min SJ, Reynolds PR, Suram S, Gaydos J, Burnham EL, Vandivier RW (2014) Neuroendocrine signaling via the serotonin transporter regulates clearance of apoptotic cells. *J Biol Chem*. doi: 10.1074/jbc.M113.482299
- Tang B, Li Y, Qi G, Yuan S, Wang Z, Yu S, Li B, He S (2015) Clinicopathological Significance of CDKN2A Promoter Hypermethylation Frequency with Pancreatic Cancer. *Sci Rep*. doi: 10.1038/srep13563
- Tarailo-Graovac M, Shyr C, Ross CJ, Horvath GA, Salvarinova R, Ye XC, Zhang LH, Bhavsar AP, Lee JJY, Drögemöller BI, Abdelsayed M, Alfadhel M, Armstrong L, Baumgartner MR, Burda P, Connolly MB, Cameron J, Demos M, Dewan T, Dionne J, Evans AM, Friedman JM, Garber I, Lewis S, Ling J, Mandal R, Mattman A, McKinnon M, Michoulas A, Metzger D, Ogunbayo OA, Rakic B, Rozmus J, Ruben P, Sayson B, Santra S, Schultz KR, Selby K, Shekel P, Sirrs S, Skrypnik C, Superti-Furga A, Turvey SE, Van Allen MI, Wishart D, Wu J, Wu J, Zafeiriou D, Kluijtmans L, Wevers RA, Eydoux P, Lehman AM, Vallance H, Stockler-Ipsiroglu S, Sinclair

- G, Wasserman WW, Van Karnebeek CD (2016) Exome sequencing and the management of neurometabolic disorders. *N Engl J Med*. doi: 10.1056/NEJMoa1515792
- Tarangelo A, Lo N, Teng R, Kim E, Le L, Watson D, Furth EE, Raman P, Ehmer U, Viatour P (2015) Recruitment of Pontin/Reptin by E2f1 amplifies E2f transcriptional response during cancer progression. *Nat Commun*. doi: 10.1038/ncomms10028
- Tavano F, Fontana A, Pellegrini F, Burbacci FP, Rappa F, Cappello F, Copetti M, Maiello E, Lombardi L, Graziano P, Vinciguerra M, di Mola FF, di Sebastiano P, Andriulli A, Paziienza V (2014) Modeling interactions between Human Equilibrative Nucleoside Transporter-1 and other factors involved in the response to gemcitabine treatment to predict clinical outcomes in pancreatic ductal adenocarcinoma patients. *J Transl Med*. doi: 10.1186/s12967-014-0248-4
- Torres-Guzmán R, Calsina B, Hermoso A, Baquero C, Alvarez B, Amat J, McNulty AM, Gong X, Boehnke K, Du J, de Dios A, Beckmann RP, Buchanan S, Lallena MJ (2017) Preclinical characterization of abemaciclib in hormone receptor positive breast cancer. *Oncotarget*. doi: 10.18632/oncotarget.17778
- Trizzino A, Zur Stadt U, Ueda I, Risma K, Janka G, Ishii E, Beutel K, Sumegi J, Cannella S, Pende D, Mian A, Henter JI, Griffiths G, Santoro A, Filipovich A, Aricò M (2008) Genotype-phenotype study of familial haemophagocytic lymphohistiocytosis due to perforin mutations. *J Med Genet*. doi: 10.1136/jmg.2007.052670

U

- Umapathy NS, Ganapathy V, Ganapathy ME (2004) Transport of amino acid esters and the amino-acid-based prodrug valganciclovir by the amino acid transporter ATB 0,+ . *Pharm Res*. doi: 10.1023/B:PHAM.0000033019.49737.28
- Urtasun N, Boces-Pascual C, Boix L, Bruix J, Pastor-Anglada M, Pérez-Torras S (2017) Role of drug-dependent transporter modulation on the chemosensitivity of cholangiocarcinoma. *Oncotarget* 8:90185–90196 . doi: 10.18632/oncotarget.21624
- Urtti a, Johns SJ, Sadée W (2001) Genomic structure of proton-coupled oligopeptide transporter hPEPT1 and pH-sensing regulatory splice variant. *AAPS Pharmsci*. doi: 10.1208/ps030106
- Uwai Y, Ida H, Tsuji Y, Katsura T, Inui KI (2007) Renal transport of adefovir, cidofovir, and tenofovir by SLC22A family members (hOAT1, hOAT3, and hOCT2). *Pharm Res*. doi: 10.1007/s11095-006-9196-x

V

- Valdés R, Fernández-Veledo S, Aymerich I, Casado FJ, Pastor-Anglada M (2006) TGF- β transcriptionally activates the gene encoding the high-affinity adenosine transporter CNT2 in rat liver parenchymal cells. *Cell Mol Life Sci*. doi: 10.1007/s00018-006-6240-2
- Valdés R, Javier Casado F, Pastoranglada M (2002) Cell-cycle-dependent regulation of CNT1, a concentrative nucleoside transporter involved in the uptake of cell-cycle-dependent nucleoside-derived anticancer drugs. *Biochem Biophys Res Commun*. doi: 10.1016/S0006-291X(02)00919-1
- Valdés R, Ortega MA, Casado FJ, Felipe A, Gil A, Sánchez-Pozo A, Pastor-Anglada M (2000) Nutritional regulation of nucleoside transporter expression in rat small intestine. *Gastroenterology* 119:1623–1630 . doi: 10.1053/gast.2000.20183
- Vara D, Bicknell KA, Coxon CH, Brooks G (2003) Inhibition of E2F abrogates the development of cardiac myocyte hypertrophy. *J Biol Chem*. doi: 10.1074/jbc.M212612200
- Vaseva A V., Moll UM (2009) The mitochondrial p53 pathway. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*
- Vélez-Cruz R, Johnson DG (2017) The retinoblastoma (RB) tumor suppressor: Pushing back against genome instability on multiple fronts. *Int. J. Mol. Sci.*
- Ververis K, Hiong A, Karagiannis TC, Licciardi P V. (2013) Histone deacetylase inhibitors (HDACIS): Multitargeted anticancer agents. *Biol. Targets Ther.*
- Veyhl-Wichmann M, Friedrich A, Vernaleken A, Singh S, Kipp H, Gorboulev V, Keller T, Chintalapati C, Pipkorn R, Pastor-Anglada M, Groll J, Koepsell H (2016) Phosphorylation of RS1 (RSC1A1) steers inhibition of different exocytotic pathways for glucose transporter SGLT1 and nucleoside transporter CNT1, and an rs1-derived peptide inhibits glucose absorption. *Mol Pharmacol*. doi: 10.1124/mol.115.101162
- Villanueva A, García C, Paules AB, Vicente M, Megías M, Reyes G, De Villalonga P, Agell N, Lluís F, Bachs O, Capellá G (1998) Disruption of the antiproliferative TGF- β signaling pathways in human pancreatic cancer cells. *Oncogene* 17:1969–1978 . doi: 10.1038/sj.onc.1202118
- Vincenzi B, Stacchiotti S, Collini P, Pantano F, Rabitti C, Perrone G, Iuliani M, Baldi A, Badalamenti G, Sanfilippo R, Santini D, Muda AO, Gronchi A, Casali P, Dei Tos AP, Tonini G (2017) Human equilibrative nucleoside transporter 1 gene expression is associated with gemcitabine efficacy in advanced leiomyosarcoma and angiosarcoma. *Br J Cancer*. doi:

10.1038/bjc.2017.187

Visser F, Vickers MF, Ng AML, Baldwin SA, Young JD, Cass CE (2002) Mutation of residue 33 of human equilibrative nucleoside transporters 1 and 2 alters sensitivity to inhibition of transport by dilazep and dipyridamole. *J Biol Chem*. doi: 10.1074/jbc.M105324200

Vladimirovna Snezhkina A, Sergeevich Krasnov G, Rostislavovich Zaretsky A, Zhavoronkov A, Mikhailovich Nyushko K, Alexandrovich Moskalev A, Yurievna Karpova I, Isaevna Afremova A, Valerievna Lipatova A, Vladimirovich Kochetkov D, Sergeena Fedorova M, Nikolaevna Volchenko N, Fayazovna Sadritdinova A, Vladimirovna Melnikova N, Vladimirovich Sidorov D, Yurievich Popov A, Valerievich Kalinin D, Dmitrievich Kaprin A, Yakovlevich Alekseev B, Alexandrovich Dmitriev A, Viktorovna Kudryavtseva A (2016) Differential expression of alternatively spliced transcripts related to energy metabolism in colorectal cancer. *BMC Genomics*. doi: 10.1186/s12864-016-3351-5

W

Wang C, Chen T, Zhang J, Yang M, Li N, Xu X, Cao X (2009) The E3 ubiquitin ligase Nrdp1 “preferentially” promotes TLR-mediated production of type I interferon. *Nat Immunol*. doi: 10.1038/ni.1742

Wang ET, Sandberg R, Luo S, Khrebtkova I, Zhang L, Mayr C, Kingsmore SF, Schroth GP, Burge CB (2008) Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*. doi: 10.1038/nature07509

Wang J, Huang Q, Tang W, Nadal-Ginard B (1996) E2F1 inhibition of transcription activation by myogenic basic helix- loop-helix regulators. *J Cell Biochem*. doi: 10.1002/(SICI)1097-4644(199609)62:3<405::AID-JCB10>3.3.CO;2-K

Wang K, Zhou LY, Wang JX, Wang Y, Sun T, Zhao B, Yang YJ, An T, Long B, Li N, Liu CY, Gong Y, Gao JN, Dong YH, Zhang J, Li PF (2015) E2F1-dependent MIR-421 regulates mitochondrial fragmentation and myocardial infarction by targeting Pink1. *Nat Commun*. doi: 10.1038/ncomms8619

Wang LY, Hung CL, Chen YR, Yang JC, Wang J, Campbell M, Izumiya Y, Chen HW, Wang WC, Ann DK, Kung HJ (2016) KDM4A Coactivates E2F1 to Regulate the PDK-Dependent Metabolic Switch between Mitochondrial Oxidation and Glycolysis. *Cell Rep*. doi: 10.1016/j.celrep.2016.08.018

Wang X, Herr RA, Chua WJ, Lybarger L, Wiertz EJHJ, Hansen TH (2007) Ubiquitination of serine,

- threonine, or lysine residues on the cytoplasmic tail can induce ERAD of MHC-I by viral E3 ligase mK3. *J Cell Biol.* doi: 10.1083/jcb.200611063
- Wang XW, Wei W, Wang WQ, Zhao XY, Guo H, Fang DC (2014) RING finger proteins are involved in the progression of Barrett esophagus to esophageal adenocarcinoma: A preliminary study. *Gut Liver.* doi: 10.5009/gnl13133
- Wang Y, Wu S, Huang C, Li Y, Zhao H, Kasim V (2018) Yin Yang 1 promotes the Warburg effect and tumorigenesis via glucose transporter GLUT3. *Cancer Sci.* doi: 10.1111/cas.13662
- Ward JL, Leung GPH, Toan SV, Tse CM (2003) Functional analysis of site-directed glycosylation mutants of the human equilibrative nucleoside transporter-2. *Arch Biochem Biophys.* doi: 10.1016/S0003-9861(02)00718-X
- Warg LA, Oakes JL, Burton R, Neidermyer AJ, Rutledge HR, Groshong S, Schwartz DA, Yang I V. (2012) The role of the E2F1 transcription factor in the innate immune response to systemic LPS. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol.* doi: 10.1152/ajplung.00369.2011
- Wasternack C (1980) Degradation of pyrimidines and pyrimidine analogs-Pathways and mutual influences. *Pharmacol Ther.* doi: 10.1016/0163-7258(80)90079-0
- Wauman J, De Ceuninck L, Vanderroost N, Lievens S, Tavernier J (2011) RNF41 (Nrdp1) controls type 1 cytokine receptor degradation and ectodomain shedding. *J Cell Sci.* doi: 10.1242/jcs.078055
- Wen W, Peng C, Kim MO, Ho Jeong C, Zhu F, Yao K, Zykova T, Ma W, Carper A, Langfald A, Bode AM, Dong Z (2014) Knockdown of RNF2 induces apoptosis by regulating MDM2 and p53 stability. *Oncogene.* doi: 10.1038/onc.2012.605
- Westendorp B, Mokry M, Groot Koerkamp MJA, Holstege FCP, Cuppen E, De Bruin A (2012) E2F7 represses a network of oscillating cell cycle genes to control S-phase progression. *Nucleic Acids Res.* doi: 10.1093/nar/gkr1203
- Wiley JS, Smith CL, Jamieson GP (1991) Transport of 2'-deoxycoformycin in human leukemia and lymphoma cells. *Biochem Pharmacol.* doi: 10.1016/0006-2952(91)90338-6
- Wölfel T, Hauer M, Schneider J, Serrano M, Wölfel C, Klehmann-Hieb E, De Plaen E, Hankeln T, Meyer Zum Büschenfelde KH, Beach D (1995) A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* (80-). doi: 10.1126/science.7652577

Wright NJ, Lee SY (2019) Structures of human ENT1 in complex with adenosine reuptake inhibitors. *Nat Struct Mol Biol* 26:599–606 . doi: 10.1038/s41594-019-0245-7

X

Xiao C Le, Zhu S, He M, Chen D, Zhang Q, Chen Y, Yu G, Liu J, Xie SQ, Luo F, Liang Z, Wang DP, Bo XC, Gu XF, Wang K, Yan GR (2018) N⁶-Methyladenine DNA Modification in the Human Genome. *Mol Cell*. doi: 10.1016/j.molcel.2018.06.015

Xu Q, Wang C, Meng Q, Liu Q, Sun H, Peng J, Ma X, Kaku T, Liu K (2013) OAT1 and OAT3: Targets of drug-drug interaction between entecavir and JBP485. *Eur J Pharm Sci*. doi: 10.1016/j.ejps.2012.12.024

Xu Q, Wang C, Meng Q, Liu Q, Sun P, Sun H, Guo X, Liu K (2014) The oligopeptide transporter 2-mediated reabsorption of entecavir in rat kidney. *Eur J Pharm Sci*. doi: 10.1016/j.ejps.2013.10.010

Y

Yang F, Ma J, Tang Q, Zhang W, Fu Q, Sun J, Wang H, Song B (2018) MicroRNA-543 promotes the proliferation and invasion of clear cell renal cell carcinoma cells by targeting Krüppel-like factor 6. *Biomed Pharmacother*. doi: 10.1016/j.biopha.2017.10.136

Yao SYM, Ng AML, Cass CE, Baldwin SA, Young JD (2011) Nucleobase transport by human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1). *J Biol Chem*. doi: 10.1074/jbc.M111.236117

Yao SYM, Ng AML, Sundaram M, Cass CE, Baldwin SA, Young JD (2001) Transport of antiviral 3'-deoxy-nucleoside drugs by recombinant human and rat equilibrative, nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-insensitive (ENT2) nucleoside transporter proteins produced in *Xenopus* oocytes. *Mol Membr Biol*

Yao SYM, Young JD (2018) Inward- and outward-facing homology modeling of human concentrative nucleoside transporter 3 (hCNT3) predicts an elevator-type transport mechanism. *Channels*

Yee SW, Shima JE, Hesselson S, Nguyen L, De Val S, Lafond RJ, Kawamoto M, Johns SJ, Stryke D, Kwok PY, Ferrin TE, Black BL, Gurwitz D, Ahituv N, Giacomini KM (2009) Identification and characterization of proximal promoter polymorphisms in the human concentrative nucleoside transporter 2 (SLC28A2). *J Pharmacol Exp Ther*. doi: 10.1124/jpet.108.147207

Yen L, Cao Z, Wu X, Ingalla ERQ, Baron C, Young LJT, Gregg JP, Cardiff RD, Borowsky AD, Sweeney C, Carraway KL (2006) Loss of Nrdp1 enhances ErbB2/ErbB3-dependent breast tumor cell growth. *Cancer Res.* doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2319

Young JD, Yao SYM, Baldwin JM, Cass CE, Baldwin SA (2013) The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. *Mol Aspects Med* 34:529–547 . doi: 10.1016/j.mam.2012.05.007

Yu F, Zhou J (2008) Parkin is ubiquitinated by Nrdp1 and abrogates Nrdp1-induced oxidative stress. *Neurosci Lett.* doi: 10.1016/j.neulet.2008.05.052

Z

Zhang B, Guo DD, Zheng JY, Wu YA (2018) Expression of KLF6-SV2 in colorectal cancer and its impact on proliferation and apoptosis. *Eur J Cancer Prev.* doi: 10.1097/CEJ.0000000000000410

Zhang HS, Gavin M, Dahiya A, Postigo AA, Ma D, Luo RX, Harbour JW, Dean DC (2000) Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and RB-hSWI/SNF. *Cell.* doi: 10.1016/S0092-8674(00)80625-X

Zhang Q, Hong M, Duan P, Pan Z, Ma J, You G (2008) Organic anion transporter OAT1 undergoes constitutive and protein kinase C-regulated trafficking through a dynamin- and clathrin-dependent pathway. *J Biol Chem.* doi: 10.1074/jbc.M800298200

Zhang Q, Li S, Patterson C, You G (2013) Lysine 48-linked polyubiquitination of organic anion transporter-1 is essential for its protein kinase C-regulated endocytosis. *Mol Pharmacol.* doi: 10.1124/mol.112.082065

Zhou X, Levin EJ, Pan Y, McCoy JG, Sharma R, Kloss B, Bruni R, Quick M, Zhou M (2014) Structural basis of the alternating-access mechanism in a bile acid transporter. *Nature.* doi: 10.1038/nature12811

Zhu J, Zhao C, Zhuang T, Jonsson P, Sinha I, Williams C, Strömblad S, Dahlman-Wright K (2016) RING finger protein 31 promotes p53 degradation in breast cancer cells. *Oncogene.* doi: 10.1038/onc.2015.260

Zollner G, Wagner M, Fickert P, Silbert D, Fuchsbichler A, Zatloukal K, Denk H, Trauner M (2005) Hepatobiliary transporter expression in human hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* doi: 10.1111/j.1478-3231.2005.01033.x

Zur Stadt U, Beutel K, Kolberg S, Schneppenheim R, Kabisch H, Janka G, Hennies HC (2006)
Mutation. Spectrum in children with primary hemophagocytic lymphohistiocytosis:
Molecular and functional analyses of PRF1, UNC13D, STX11, and RAB27A. Hum Mutat. doi:
10.1002/humu.20274

ANNEX



Contents lists available at ScienceDirect

BBA - Molecular Basis of Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbadis

Deficiency of perforin and hCNT1, a novel inborn error of pyrimidine metabolism, associated with a rapidly developing lethal phenotype due to multi-organ failure



Sandra Pérez-Torras^{a,1}, Aida Mata-Ventosa^{a,1}, Britt Drögemöller^{b,c,2}, Maja Tarailo-Graovac^{d,e,2}, Judith Meijer^f, Rutger Meinsma^f, Arno G. van Cruchten^f, Wim Kulik^f, Albert Viel-Oliva^a, Axel Bidon-Chanal^g, Colin J. Ross^{b,c}, Wyeth W. Wassermann^h, Clara D.M. van Karnebeek^{f,h,3}, Marçal Pastor-Anglada^{a,*,3,4}, André B.P. van Kuilenburg^{f,*,3,4}

^a Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine, Institute of Biomedicine (IBUB), University of Barcelona, Oncology Program, National Biomedical Research Institute on Liver and Gastrointestinal Diseases (CIBER EHD), Institut de Recerca Sant Joan de Déu (IR SJD), 08028 Barcelona, Spain

^b Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of British Columbia, V6T 1Z3 Vancouver, British Columbia, Canada

^c BC Children's Hospital Research Institute, V5Z 4H4 Vancouver, British Columbia, Canada

^d Departments of Biochemistry, Molecular Biology and Medical Genetics, Cumming School of Medicine, University of Calgary, T2N 4N1 Calgary, AB, Canada

^e Alberta Children's Hospital Research Institute, University of Calgary, T2N 4N1 Calgary, AB, Canada

^f Departments of Clinical Chemistry, Pediatrics and Clinical Genetics, Amsterdam UMC, University of Amsterdam, Amsterdam Gastroenterology & Metabolism, 1105 AZ Amsterdam, the Netherlands

^g Departments of Nutrition, Food Science and Gastronomy, School of Pharmacy and Food Science, Institute of Biomedicine (IBUB), Institute of Theoretical and Computational Chemistry (IQTUCB), University of Barcelona, 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain

^h Departments of Pediatrics and Medical Genetics, Centre for Molecular Medicine and Therapeutics, University of British Columbia, V5Z 4H4 Vancouver, Canada

ARTICLE INFO

Keywords:

hCNT1
Uridine-cytidineuria
Pyrimidine metabolism
PRF1

ABSTRACT

Pyrimidine nucleotides are essential for a vast number of cellular processes and dysregulation of pyrimidine metabolism has been associated with a variety of clinical abnormalities. Inborn errors of pyrimidine metabolism affecting enzymes in the pyrimidine *de novo* and degradation pathway have been identified but no patients have been described with a deficiency in proteins affecting the cellular import of ribonucleosides. In this manuscript, we report the elucidation of the genetic basis of the observed uridine-cytidineuria in a patient presenting with fever, hepatosplenomegaly, persistent lactate acidosis, severely disturbed liver enzymes and ultimately multi-organ failure. Sequence analysis of genes encoding proteins directly involved in the metabolism of uridine and cytidine showed two variants c.1528C > T (p.R510C) and c.1682G > A (p.R561Q) in *SLC28A1*, encoding concentrative nucleotide transporter 1 (hCNT1). Functional analysis showed that these variants affected the three-dimensional structure of hCNT1, altered glycosylation and decreased the half-life of the mutant proteins which resulted in impaired transport activity. Co-transfection of both variants, mimicking the *trans* disposition of c.1528C > T (p.R510C) and c.1682G > A (p.R561Q) in the patient, significantly impaired hCNT1 biological function. Whole genome sequencing identified two pathogenic variants c.50delT; p.(Leu17Argfs*34) and c.853_855del; p.(Lys285del) in the *PRF1* gene, indicating that our patient was also suffering from Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis type 2. The identification of two co-existing monogenic defects might have resulted in a blended phenotype. Thus, the clinical presentation of isolated hCNT1 deficiency remains to be established.

* Correspondence to: M. Pastor-Anglada, University of Barcelona, Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine, 08028 Barcelona, Spain.

** Correspondence to: A.B.P. van Kuilenburg, Amsterdam UMC, Academic Medical Center, Laboratory Genetic Metabolic Diseases, F0-220, Meibergdreef 9, 1105 AZ Amsterdam, the Netherlands.

E-mail addresses: mpastor@ub.edu (M. Pastor-Anglada), a.b.vankuilenburg@amc.uva.nl (A.B.P. van Kuilenburg).

¹ Shared first authors.

² Shared second authors.

³ Co-senior authors.

⁴ Co-corresponding authors.

<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.01.013>

Received 17 August 2018; Received in revised form 7 January 2019; Accepted 9 January 2019

Available online 15 January 2019

0925-4439/© 2019 Published by Elsevier B.V.

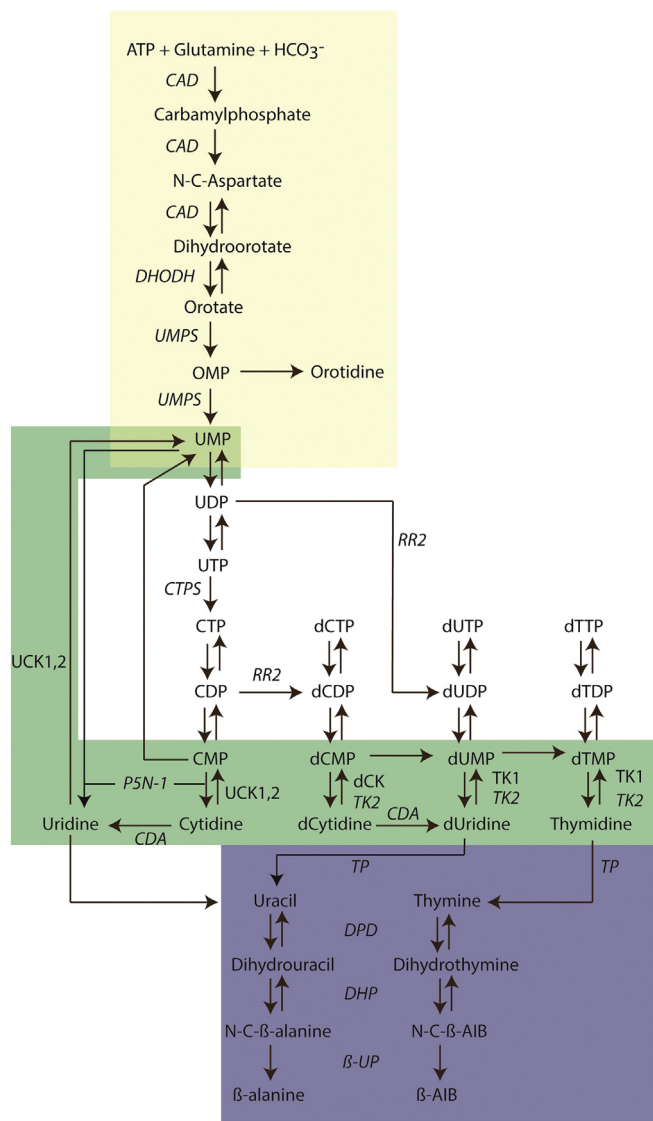


Fig. 1. Schematic representation of pyrimidine metabolism. The pyrimidine *de novo* pathway, salvage pathway and degradation pathway are indicated in yellow, green and purple, respectively. Inborn errors of pyrimidine metabolism are depicted in italics. CAD, Carbamoyl-phosphate synthetase, Aspartate transcarbamylase, Dihydroorotase; CDA, cytidine deaminase; CTPS, CTP synthetase; dCK, deoxycytidine kinase; DPD, dihydropyrimidine dehydrogenase; DHODH, dihydroorotate dehydrogenase; DHP, dihydropyrimidinase; *N*-C- β -alanine, *N*-carbamyl- β -alanine; *N*-C- β -AIB, *N*-carbamyl- β -aminoisobutyric acid; P5N-1, Pyrimidine 5'-nucleotidase type-I; TK1, thymidine kinase 1; TK2, thymidine kinase 2; TP, thymidine phosphorylase; RR2, ribonucleotide reductase; UCK1,2, uridine-cytidine kinase 1,2; UMPS, UMP synthase; β -UP, β -uridopropionase; β -AIB, β -aminoisobutyrate.

1. Introduction

Pyrimidine nucleotides are essential for a vast number of biological processes such as the synthesis of RNA and DNA. Moreover pyrimidine-activated sugars are also involved in synthesis of phospholipids, glycogen, signal transduction, the sialylation and glycosylation of proteins and lipids and glucuronidation in detoxification processes [1]. In addition, pyrimidines play an important role in the regulation of the central nervous system and metabolic changes affecting the levels of pyrimidines may lead to abnormal neurological activity [2,3].

Pyrimidines can be synthesized *de novo* in mammalian cells through multistep processes (Fig. 1). In addition to the *de novo* synthesis, pyrimidine nucleotides can also be synthesized *via* the salvage of the

nucleosides uridine and cytidine. Opposing the action of the enzymes involved in anabolism of pyrimidines are those facilitating the degradation of the pyrimidine nucleosides and pyrimidine bases. The uptake of pyrimidine nucleosides from the extracellular space is mediated by nucleoside-transport proteins that facilitate diffusion or active transport of nucleosides across the plasma membrane. They are encoded by genes belonging to *SLC28* and *SLC29* families [4,5]. *SLC29* genes encode human Equilibrative Nucleoside Transporter (hENT) proteins. This family has four members with only hENT1 (*SLC29A1*) and hENT2 (*SLC29A2*) being plasma membrane nucleoside transporters. The *SLC28* gene family encodes three human Concentrative Nucleoside Transporter (hCNT) proteins, hCNT1, hCNT2, and hCNT3. They all are Na⁺-coupled nucleoside transporters showing substrate preference for pyrimidines (hCNT1), purines and uridine (hCNT2), and for both purine and pyrimidine nucleosides (hCNT3).

Genetic defects involving enzymes essential for pyrimidine nucleotide metabolism have provided insights into the vital physiological functions of these molecules [1,3,6]. Inherited disorders of pyrimidine metabolism have a wide variety of clinical presentations which include, among others, anaemia, immunodeficiency, renal stones, convulsions, intellectual disability, autism and growth retardation [6,7]. The majority of the inborn errors of pyrimidine metabolism affect enzymes of the pyrimidine *de novo* synthesis and degradation pathways.

To date, three individuals lacking hENT1 expression have been reported presenting with ectopic mineralization, but *SLC29A1* variants have not been clearly associated with any human disease yet [8]. In contrast, *SLC29A3*, encoding the intracellular transporter hENT3, is the only gene unequivocally linked to several heterogeneous human diseases, such as H syndrome [9], pigmentary hypertrichosis and non-autoimmune insulin-dependent diabetes mellitus syndromes [10], Faisalabad histiocytosis [11] and Rosai-Dorfman disease [11]. A hENT3 deficiency in mouse has been shown to perturb lysosome function, macrophage homeostasis and T-cell performance [12,13]. To date, no patients with pathogenic *SLC28* gene variants have been identified.

The availability of nucleosides and their derivatives are vital for the activation and survival of T-lymphocytes and deficiencies of for example purine nucleoside phosphorylase [14], CTP synthetase 1 [15] and hENT3 [13], resulting in altered nucleoside metabolism, have been shown to compromise immune response. Cytotoxic lymphocytes and natural killer cells eliminate their target cells infected by intracellular pathogens with the help of the cytotoxic pore-forming protein perforin. The perforin pore enables the entry of granzymes into the cytosol of target cells and thus inducing cell death. A deficiency of perforin may result in an impaired ability to handle intracellular infections and malignancies [16].

In this manuscript, we describe the first patient with a combined hCNT1 and perforin deficiency resulting in the onset of a lethal phenotype due to rapid multi-organ failure.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and antibodies

Cycloheximide, MG-132, hydroxychloroquine sulfate, tunicamycin, and anti-actin antibody were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Anti-CNT1 N17 antibody was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TE, USA). Dead Receptor 5 (DR5) antibody was purchased from Cell Signaling (Danvers, MA, USA). Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3B) was obtained from Cell Signaling. The corresponding horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies were obtained from DakoCytomation (Glostrup, Denmark) and BioRad (Hercules, CA, USA).

2.2. Purine and pyrimidine analysis

Concentrations of purine and pyrimidine nucleosides were

determined using reversed-phase HPLC hyphenated with electrospray tandem mass spectrometry [17,18]. Available urine and plasma samples were at a later stage re-analyzed for the presence of cytidine using a MRM for cytidine of 244 > 112, cone voltage 18 V, collision energy 11 eV. The internal standard [¹³C]-cytidine was analyzed using a MRM of 245 > 112.

2.3. Sequence analysis of *SCL28A1*

Exons 1–18 of *SCL28A1* (hCNT1) and their flanking sequences were amplified using the primer sets, as described in supplementary table 1. Amplification was carried out in 25 µL reaction mixtures containing 20 mM Tris/HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.0 mM MgCl₂, 0.4 µM of each primer, 0.2 mM dNTPs and 0.02 U of Platinum™ *Taq* polymerase (Invitrogen™). After initial denaturation for 5 min at 95 °C, amplification was carried out for 30 cycles (30 s 95 °C, 30 s 55 °C, 60 s 72 °C) with a final extension step of 10 min at 72 °C. PCR products were separated on 1.5% agarose gels and visualized with ethidium bromide. PCR products were treated with exoSAP-IT and used for direct sequencing. Sequence analysis of genomic fragments amplified by PCR was carried out on an Applied Biosystems model 3730 automated DNA sequencer using the Big dye-terminator method. *SCL28A1* sequence of the patient and controls were compared to reference sequence of *SCL28A1* (Ref Seq NM_001287762.1).

2.4. Whole genome sequencing

Singleton whole genome sequencing (WGS) was performed through the TIDEX gene discovery project (UBC IRB approval H12-00067) using the Illumina HiSeq 4000 (Macrogen, Korea). The sequencing reads were aligned to the human reference genome version hg19 and rare variants in both nuclear and mitochondrial DNA were identified and assessed for their potential to disrupt protein function, and subsequently screened under a series of genetic models: homozygous, hemizygous, compound heterozygous and mitochondrial using our default semi-automated bioinformatics pipeline [19].

2.5. Cell culture and transient transfection

Human Embryonic Kidney 293 cell line (HEK293) was purchased from American Type Culture Collection (ATCC, Promochem Partnership, Manassas, VA, USA) and maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂, in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Lonza Verviers SPRL, Verviers, Belgium) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, 2 mM glutamine, and a mixture of antibiotics (20 U/mL penicillin and 20 µg/mL streptomycin) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Cells were subcultured every 3–5 days and confirmed to be mycoplasma free every two weeks by PCR amplification. HEK293 cell line was transiently transfected with the pcDNA3.1-hCNT1 vectors with calcium phosphate.

2.6. Plasmid construction and site-directed mutagenesis

hCNT1 cDNA was cloned from human liver into the expressing vector pcDNA3.1. The R510C and R561Q substitutions were introduced into pcDNA3.1-hCNT1 by Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) using complementary reverse primers, and forward primers containing the variants: R510Cfw 5'-CAAGCAATGCCGCTGGCAGGGGCCGAG-3', R510Crv 5'-CTGCCAGGCGCATTGCTTACTTGGAGA-3', R561Qfw 5'-GGTCCCCAACAGAAGAGCGACTTCTCC-3', R561Qrv 5'-CGCTCTTCTGTTGGGGACCATGAGGT-3'. The R510C;R561Q was generated introducing the R510C substitution into pcDNA3.1-hCNT1(R561Q) with the same primers. All the constructs were verified by DNA sequencing (BigDye Terminator v3.1, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Green fluorescent protein (GFP)-fused constructs for each hCNT1 were generated by

subcloning each insert to pEGFP-C1 (Clontech, Mountain View, CA) vector. All constructs were used for transient transfection.

2.7. Nucleoside transport assay

Cytidine uptake rate was measured by incubating cell monolayers at room temperature for 1 min with [³H] labeled cytidine (1 µM, 1 µCi/mL; Moravek Inc., Brea California, USA) in a sodium-rich or sodium-free transport buffer (137 mM NaCl or 137 mM choline chloride, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, and 10 mM HEPES, pH 7.4). Transport was stopped by washing with cold stop solution (137 mM NaCl and 10 mM HEPES, pH 7.4). Cells were solubilized with 100 mM NaOH containing 0.5% Triton-X100. Protein was determined by BCA reaction (Pierce, Thermo Scientific) and the remaining volume was used for radioactivity counting.

2.8. Western blot analysis

Cell extracts were obtained with lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Na₄P₂O₇, 1 mM Na₃VO₄, 100 mM NaF, 1 mM β-glycerophosphate, 1% Igepal CA-630) containing 1% Complete Mini protease inhibitors (Roche, Mannheim, Germany). Protein concentration was determined by Bradford assay (Bio-rad, Hercules, CA, USA). 40 µg of protein of cell lysates were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis on 10% gels, and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes by standard methods. Membranes were immunoblotted with the indicated primary antibodies. A chemiluminescence detection kit (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel) was used to detect antibody labeling.

2.9. Plasma membrane localization of hCNT1

The localization of the different hCNT1 forms was addressed by confocal microscopy. GFP fused proteins were transfected into HEK293 cells cultured on glass coverslips. Glass coverslips were incubated with 1 µg/mL wheat germ agglutinin conjugated to tetramethylrhodamine B isothiocyanate (WGA-TRITC), and with bisBenzimide H 33342 1 µg/mL (Sigma-Aldrich) for 10 min at room temperature. Cells were rinsed three times in phosphate-buffered saline, fixed for 15 min in 4% paraformaldehyde at room temperature, and rinsed three times in phosphate-buffered saline. Glass coverslips were mounted with ProLong Gold antifade reagent (Thermo Scientific). Images were obtained using a laser-scanning confocal microscope (Leica TCS SP2, Leica Microsystems).

2.10. Homology modelling

The model of the hCNT3 transporter was built using the crystal structure of vcCNT (PDB ID: 3TIJ) [20]. MOE (*Molecular Operating Environment* (MOE), 2013.08; Chemical Computing Group ULC, 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2018.) was used to derive a series of homology models upon sequence alignment between the vcCNT crystal structure and the target hCNT3 sequence. The usual protein model verification tests were run to ascertain the correctness of the structure, including the calculation of the overall contact energies, phi-psi angle populations and verification of angle, distance and contact energy properties throughout the structure.

2.11. Supplementary materials and methods

A detailed description of the methodology describing the minigene approach and the investigation of variants identified in the index patient are described in the supplementary data section.

2.12. Statistical analysis

Statistical analysis was performed by multivariate ANOVA testing to compare experimental data of at least three independent experiments with GraphPad Prism software (La Jolla, CA, USA). Significance of multiple comparisons was assessed by post-hoc Tukey test.

3. Results

3.1. Clinical evaluation

The patient is the second-born male child of healthy, non-congenitously mother (G2P1) and father originating from the Dutch Antilles. The information available for the family history is limited, but largely unremarkable. Pregnancy was complicated by early contractures, possibly related to myomata of the uterus, as well as gradual onset oligohydramnios, which in combination with a breech position, resulted in a planned primary caesarean section at 38 + 1 week. A male was born with a weight of 2750 g, Apgar scores of 9 and 10 after 1 and 5 min respectively; physical exam was unremarkable, including normal size spleen and liver, and tonus. On day 1 he had hypoglycaemias (glucose 2.1 mmol/L at 1 h; 1.9 mmol/L at 6 h) for which glucose infusions were given, with full recovery on day 2.

During the following weeks the mother noticed irritability and 2–3 min episodes of symmetrical jerky limb movements. At 3 weeks he was re-admitted for seizure evaluation and found to be hypertonic. Liver and spleen were not enlarged. Brain sonography, glucose levels, as well as electrolytes and blood gas, were within normal limits. Repeated EEGs showed multifocal theta activity on an immature background, without epileptic activity. The paediatric neurologist concluded the movements to be myoclonia and not epilepsy. At home the spontaneous movements continued. As metabolic evaluation of urine showed increased levels of uridine, he was re-admitted for further clinical evaluation at 2 months of age. Length was 53 cm (80th percentile), weight 4800 g (98th percentile), and occipitofrontal circumference 38.5 cm (90th percentile). He had a mild fever, with an X-thorax showing signs of pneumonia with pleural effusions; intravenous antibiotics were started. Repeated metabolic analysis of urine showed persistently increased uridine excretion.

The fever disappeared with antibiotic management, but the boy became more ill. Haematologic parameters pointed to a viral infection, although all serological parameters have remained negative. He developed a lactate acidosis [pH 7.22 (ref: 7.35–7.45)]; BE –6.9 mmol/L; (ref: –3 to +3) lactate 16.6 mmol/L (ref: 1.1–3.5), severely abnormal liver enzymes (ASAT 2242 U/L (ref: 9–90); ALAT 678 U/L (ref: 13–45); gammaGT 127 U/L (ref: 8–90); LDH 4695 U/L (ref: 180–430)) and gradual ascites and respiratory insufficiency. Patient was intubated for full respiratory support; lactic acidosis worsened (pH 6.88, BE –24 mmol/L; lactate 17.4 mmol/L) accompanied by hypoglycaemia (glucose 1.9 mmol/L; ref: 2.8–5.5). Abdominal sonography showed a mildly enlarged liver (max diameter 8.0 cm; ref.: 4.7–7.5 cm), a markedly enlarged spleen (diameter 8.0 cm; ref.: 3.0–6.0 cm) and acute necrosis of the renal cortex. Echocardiography showed normal cardiac structure and function, as did sonography of the brain. The patient developed multi-organ failure and died at 9 weeks of age; permission for autopsy was not obtained.

3.2. Pyrimidine nucleosides and variant analysis of *SLC28A1*

As part of a selective screening program for inborn errors of metabolism, the purine and pyrimidine metabolites were analyzed in urine and plasma. The urine samples showed strongly elevated levels of uridine and cytidine when compared to controls (Table 1). However, normal levels of uridine and slightly elevated levels of cytidine were observed in plasma.

Sequence analysis of genes encoding proteins directly involved in

Table 1
Pyrimidine nucleosides in the patient with a hCNT1 deficiency.

	Patient			Controls (range) ^a
	4 weeks	8 weeks	9 weeks	
Urine (mmol/mol creatinine)				
Uridine	102	56	48	0.06–2.5 (n = 50)
Cytidine	n.a.	12.6	5.0	0.08–2.2 (n = 50)
Plasma (μM)				
Uridine	n.a.	4.6	6.5	1.3–9.4 (n = 39)
Cytidine	n.a.	0.6	n.a.	< 0.1–0.2 (n = 39)

n.a., not available.

^a Age-matched reference range (0–2 years).

the metabolism of uridine and cytidine was performed and no pathogenic variants were detected in *UPP1*, *UPP2*, *UCK1* and *UCK2* (Supplemental Fig. 1). Sequence analysis of the genomic sequences of exons of *SLC28A1* (Ref Seq NM_001287762.1), including their flanking intronic sequences, demonstrated the presence of 4 intronic, 4 synonymous, 4 missense variants and an in-frame insertion of 3 nucleotides (Supplemental Table 2). Among these 13 variable sites in *SLC28A1*, two rare variants were observed, including 1 intronic variant (c.97–10C > T) and 1 missense variant c.1682G > A (p.R561Q). The c.1528C > T (p.R510C) variant is relatively infrequent in the European population but particularly common in the East Asian population with a minor allele frequency of 1.6% and 36%, respectively (Supplemental Table 2). The proximity of the c.97–10C > T variant to the splice-acceptor site of exon 3, prompted us to develop a minigene which showed that the c.97–10C > T variant did not affect pre-mRNA splicing (Supplemental Fig. 2).

Since no gDNA was available from the parents to determine the mode of inheritance of the two missense variants, an allele specific PCR analysis was performed. As rs2242047 (c.1528C > T; p.R510C) and rs149246522 (c.1682G > A; p.R561Q) are 9119 bp apart, smaller allele specific PCRs were performed to determine whether a variant occurring between these variants (rs28430562 A/G) was in *cis* or *trans* with rs2242047 and rs149246522. The whole genome sequencing (WGS) data showed that this variant was heterozygous in the patient. These analyzes confirmed that rs2242047 and rs149246522 occur in *trans* in the patient (Supplemental Fig. 3).

3.3. *hCNT1* variants R510C and R561Q may affect tertiary structure

The hCNT1 structure was analyzed to ascertain if the c.1528C > T (p.R510C) and c.1682G > A (p.R561Q) variants could be associated with an impaired function of this transporter, thereby explaining the uridine-cytidineuria of this patient. The impact on hCNT1 protein structure of both p.R510C and p.R561Q was analyzed in a hCNT1 model built up by using homology modelling. The model was generated taking advantage of the resolved crystal structure of the prokaryotic nucleoside concentrative transporter vcCNT [20] as previously published [21]. According to this model, p.R510C is extracellular whereas p.R561Q is facing the cytosol (Fig. 2A). The analysis of both variants showed that these changes individually might induce the loss of interactions involved in the tertiary structure stabilization (Fig. 2B). R510 interacts with the negative charge of ASP503 through a charge-charge interaction and through hydrogen bonds with GLN461 and ASN443. On the other side, R561 has similar interactions with ASP564, LEU330, ALA 331 and MET333. Mutation to cysteine causes a drastic change in the interaction pattern of both residues due to its increased hydrophobic nature and shorter side-chain, presumably affecting the stability of the protein or its capacity to interconvert.

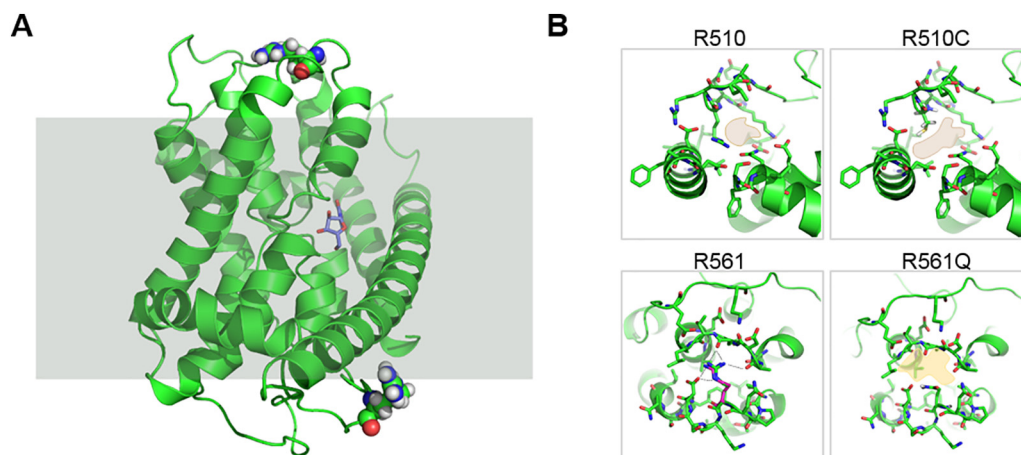


Fig. 2. Changes in the residue interaction pattern upon variant of R510 and R561 of hCNT1. R510 (top, left), R561 (bottom, left) and the residues surrounding them are represented in sticks showing their interactions. The same representation but for the R510C variant is shown on the top right panel. On the bottom left panel, representation in sticks of the R561Q variant and the residues surrounding it. Both variants generate changes in the residue interaction pattern and the residue occupied volume.

3.4. hCNT1 variants impair transport activity

To determine the functional effect of these variants, the wild type (WT), both individually mutated p.R510C and p.R561Q, and the double mutated (p.R510C;p.R561Q) constructs were generated and transfected into human embryonic kidney 293 (HEK293) cells. HEK293 cells were chosen as background for heterologous expression of this transporter protein because they lack hCNT1 activity [21]. The double-mutated hCNT1 was engineered for informative purposes to unveil the functional impact of both variants on transporter expression and performance but might not have clinical relevance because the patient was compound heterozygote for each individual variant. Transport activity of [³H]cytidine of the two variants individually was significantly reduced after 24 h of transfection (Fig. 3A), although with less differences at 48 h (Fig. 3B). Meanwhile, however, the double mutant exhibited a dramatic decrease in activity at both time points (Fig. 3). Moreover, the expression patterns of the three transporters were different from the WT, especially regarding the higher molecular weight bands, which appeared to be directly related to the transport activity (Fig. 3). Thus, the upper bands increased at 48 h for p.R510C and p.R561Q, whereas

for p.R510C;p.R561Q the upper bands were undetectable at both time points assayed.

The same three constructs fused at the N-terminal to GFP were transfected with the plasma membrane marker WGA-TRITC to determine their localization. In line with the previous results, p.R510C and p.R561Q were predominantly located at the cell membrane, mainly at 48 h after transfection, although with a reduced amount of total protein with respect to the WT. Concomitantly, almost no p.R510C;p.R561Q was detected at the cell membrane (Fig. 4).

3.5. hCNT1 variants alter protein turnover

Analysis of protein stability was evaluated under different conditions inhibiting protein synthesis, and proteasome or lysosome function. Cells were transfected with WT and variant constructs and after 24 h were treated with cycloheximide to inhibit protein synthesis. Comparison of protein expression after cycloheximide treatment showed a decrease in the half-life of p.R510C, p.R561Q and p.R510C;p.R561Q compared to the WT (Fig. 5A).

Inhibition of the proteasome and lysosome degradation pathways

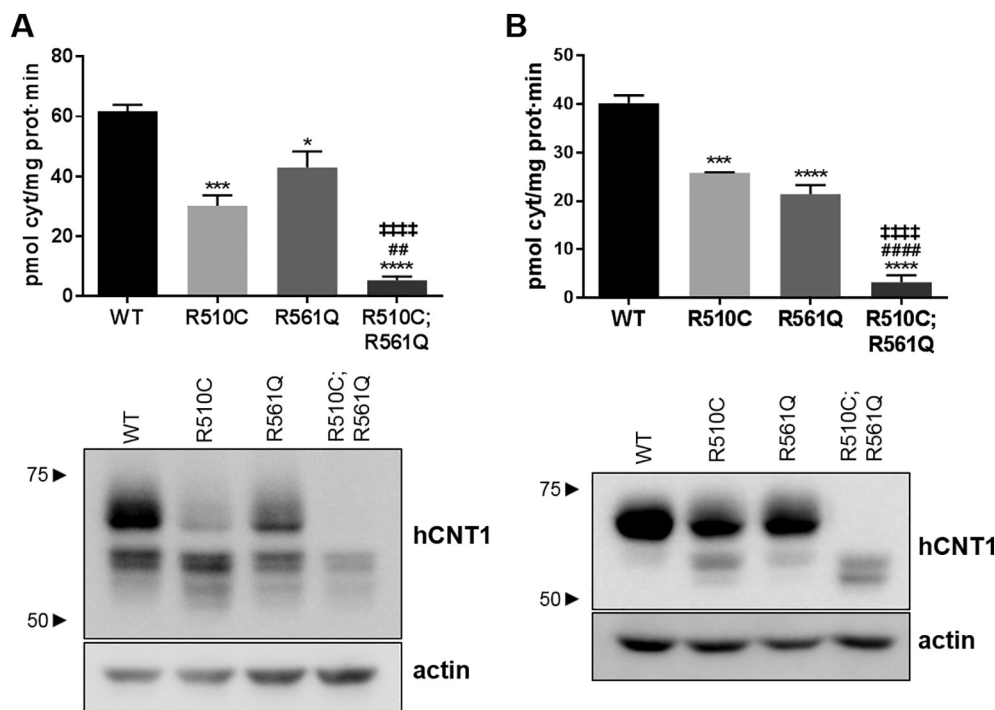


Fig. 3. R510C and R561Q variants modify activity and expression of hCNT1 compared to the WT. HEK293 cells were transfected for either 24 (A) or 48 (B) hours with the different hCNT1 expression vectors, WT, R510C, R561Q and R510C;R561Q. Sodium-dependent transport of [³H]cytidine was calculated as the difference between the cytidine uptake in a NaCl rich medium and in a choline chloride medium. Results were expressed as mean ± SEM (n = 4 for 24 h and n = 3 for 48 h). The statistical significance was determined by 1 way ANOVA; * indicates the comparison of each variant with the WT, * p < 0.05, *** p < 0.005, **** p < 0.0001; # indicates the comparison of each variant with R510C, ## p < 0.01, #### p < 0.001; ‡ indicates the comparison between R561Q and R510C;R561Q, ‡‡‡‡ p < 0.001. Expression of each hCNT1 protein was analyzed under the same experimental conditions. A representative western blot out of 4 (24 h) and 3 (48 h) independent experiments is shown.

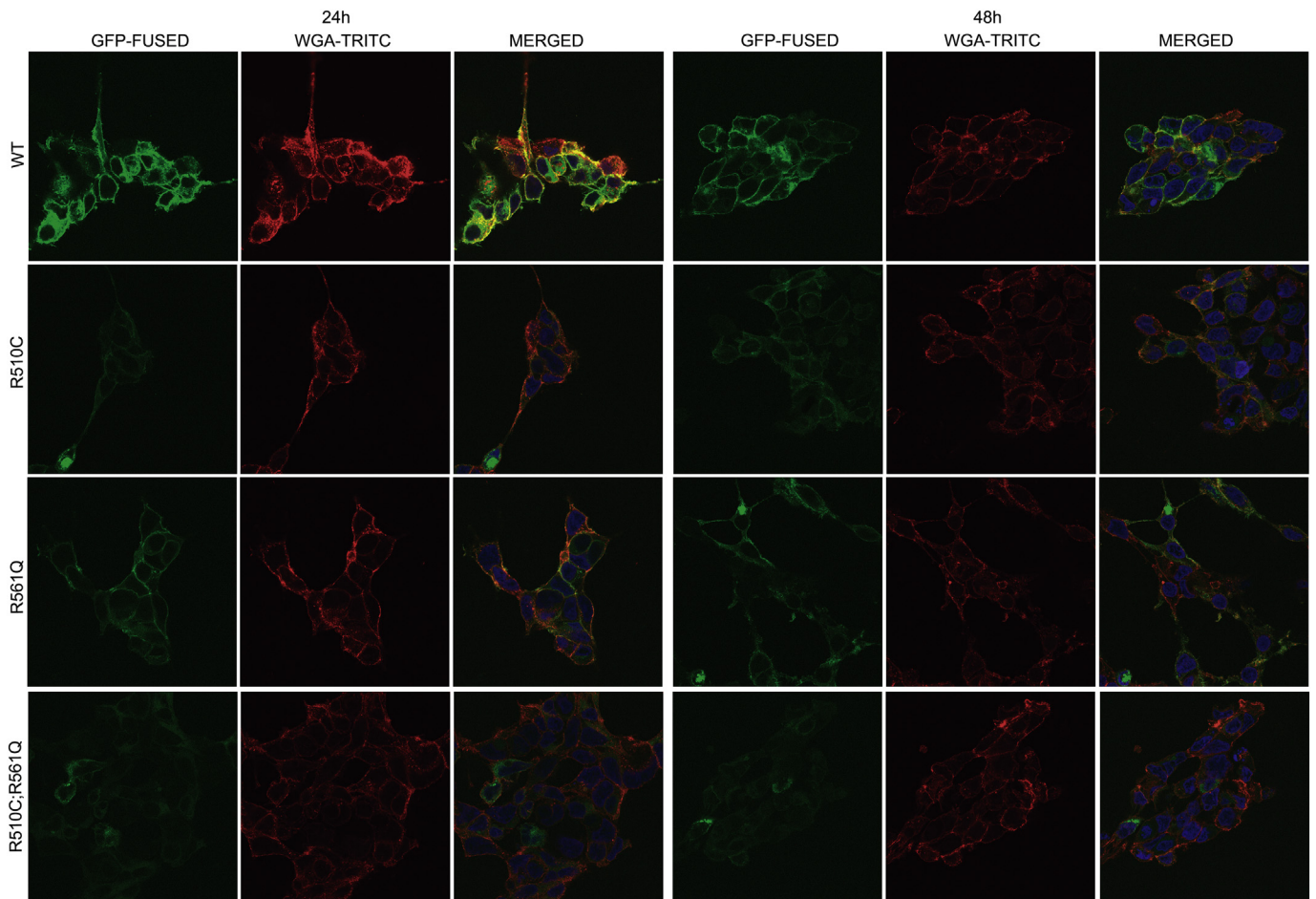


Fig. 4. hCNT1 localization in the plasma membrane is reduced for R510C and R561Q, and imperceptible for R510C;R561Q. Subcellular localization of hCNT1 analyzed by confocal microscopy. GFP-fused hCNT1 vectors were transfected into HEK293 cells for either 24 or 48 h. Cell membrane and nuclei were counterstained with WGA-TRITC and Hoechst, respectively. Magnification $\times 63$.

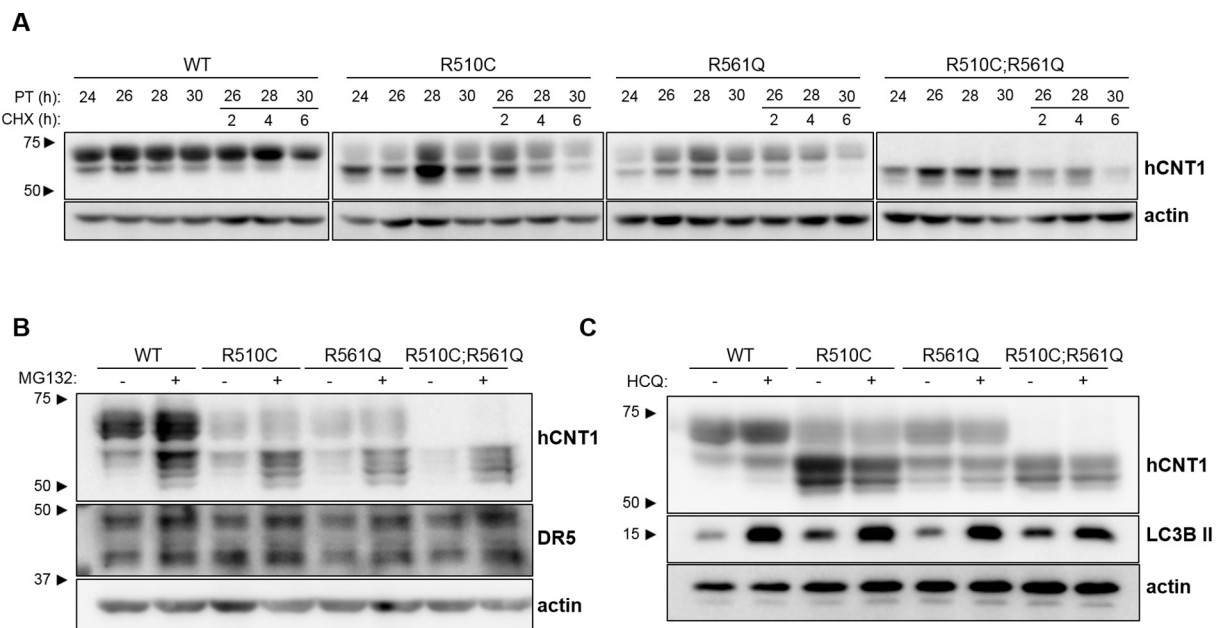


Fig. 5. Protein turnover differs among hCNT1 forms. Western blot analysis of hCNT1 in total cell extracts from transfected HEK293 cells with all the constructs. (A) Cells were treated or not with cycloheximide (CHX, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for the indicated time periods after 24 h of transfection. (B) Cells were treated for 16 h at 8 h post-transfection with 5 μM MG-132 or (C) 20 μM hydroxychloroquine sulfate (HCQ). DR5 and LC3B-II were used as positive control, respectively.

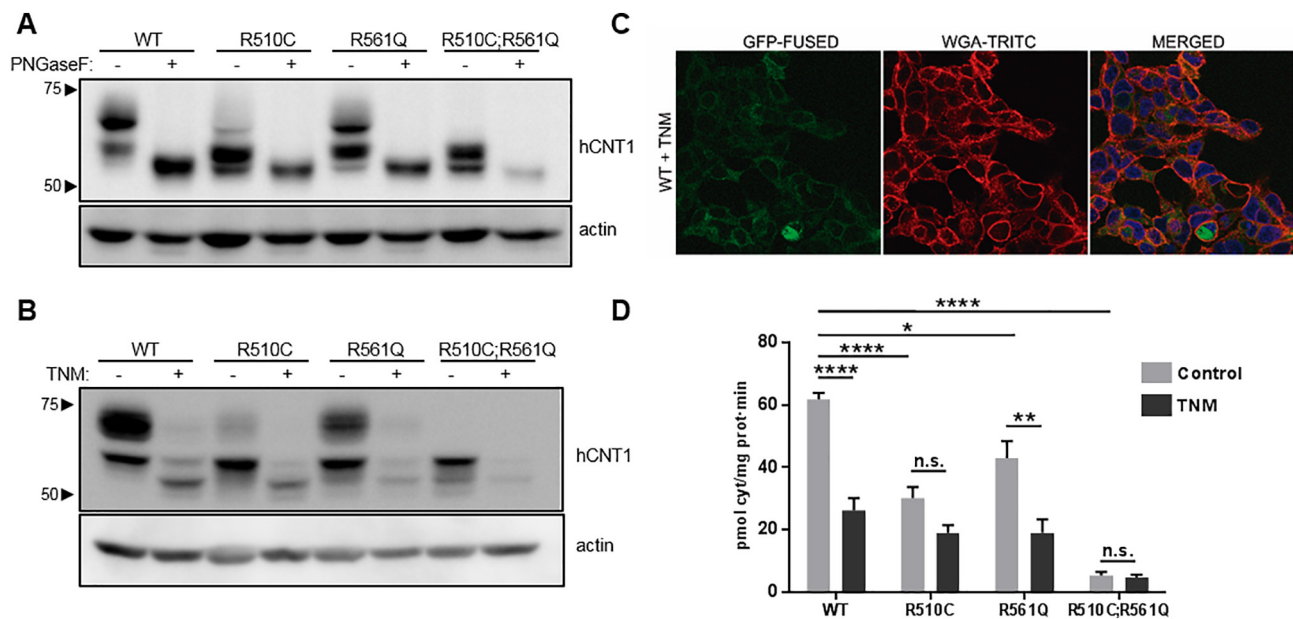


Fig. 6. Glycosylation is determinant for hCNT1 activity. (A) PNGaseF-mediated deglycosylation of N-linked sugars of hCNT1. Cell extracts from transfected HEK293 were treated with PNGaseF for 4 h, and afterwards hCNT1 was detected by western blot. Protein expression (B), localization (C) and activity (D) of HEK293 cells transfected with the different hCNT1 expression vectors, and treated with tunicamycin (TNM, 100 nM) for 16 h. A representative western blot out of 3 independent experiments is shown. hCNT1 sodium-dependent uptake of [³H]cytidine was calculated as the difference between the cytidine uptake in a NaCl medium and in a choline chloride medium. The results were expressed as mean ± SEM (n = 4). The statistical significance was determined by 2 way ANOVA; * p < 0.05, ** p < 0.01, **** p < 0.001.

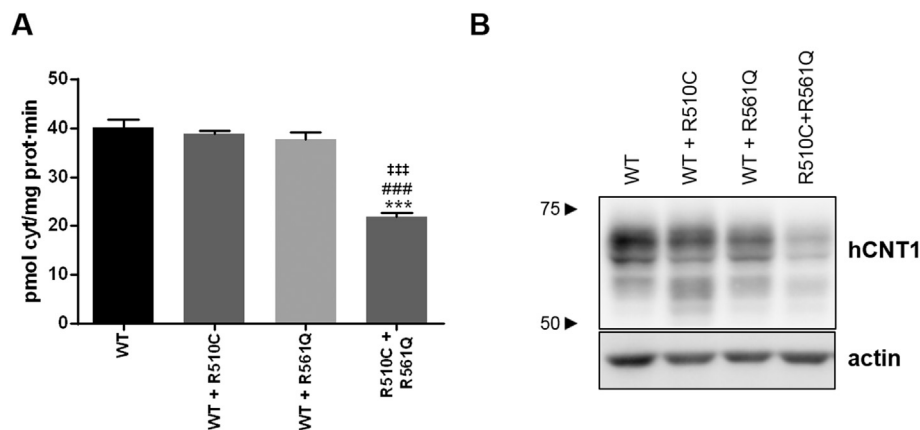


Fig. 7. Allelic disposition of both variants conditions hCNT1 transport activity.

HEK293 cells were cotransfected for 48 h with the different conditions: WT, WT + R510C, WT + R561Q or R510C + R561Q. (A) hCNT1 sodium-dependent uptake of [³H]cytidine, calculated as the difference between the cytidine uptake in a NaCl medium and in a choline chloride medium. The results were expressed as mean ± SEM (n = 3). The statistical significance was determined by 1 way ANOVA; * indicates the comparison of each combination with the WT, *** p < 0.005; # indicates the comparison of each combination with WT + R510C, ### p < 0.005; ‡ indicates the comparison between each combination and WT + R561Q, ‡‡‡ p < 0.005. (B) Expression of each hCNT1 protein. A representative western blot out of 3 independent experiments is shown.

was assessed treating the cells with MG132 and hydroxychloroquine, respectively, for 16 h at 8 h post-transfection. An increase in the amount of all constructs was observed after proteasome inhibition, particularly in the low molecular weight bands, whereas no changes were detected after lysosomal pathway inhibition (Fig. 5B,C). These results suggest a key role of proteasome in hCNT1 degradation which is not affected by the different single variants assayed or the combination of both.

3.6. Glycosylation determines hCNT1 transport activity

The different bands observed in hCNT1 WT immunoblot, together with the changes exerted by the different variants alone or combined, prompted us to analyze whether or not hCNT1 is glycosylated. Analysis of hCNT1 putative glycosylation sites by the 'NetNGlyc' predictor identified two possible N-glycosylation residues. Treatment *in vitro* with PNGase F to cleave N-linked glycosylations removed the higher molecular weight bands observed in the western blot against hCNT1 in the WT protein and all the variants (Fig. 6A). To determine the role of hCNT1 glycosylation in transport activity, treatment with the N-

glycosylation inhibitor, tunicamycin was performed in cells transfected with all the constructs. Tunicamycin significantly reduced hCNT1 higher molecular weight bands (Fig. 6B) and cell membrane localization (Fig. 6C). Accordingly, WT hCNT1 transport activity was significantly impaired reaching similar levels to p.R510C and p.R561Q after tunicamycin treatment. No changes were observed in the almost undetectable activity of the double mutant (Fig. 6D).

3.7. Heterozygotic trans disposition of p.R510C and p.R561Q aggravates patient phenotype

hCNTs transport function appears to be conditioned by oligomerization [20, 22]. Considering that the patient genetic analysis showed that besides of being heterozygous for both variants, p.R510C and p.R561Q were located in *trans* position, we decided to analyze the effect of putative different heterozygotic combinations. Co-expression of both WT hCNT1 with either p.R510C or p.R561Q had no impact on transport activity. However, in the particular case of this patient, the consequence of in *trans* disposition of both variants, investigated by co-

expression of plasmids carrying p.R510C or p.R561Q, resulted in a significantly impaired transport function (Fig. 7).

3.8. WGS analysis of the patient

To further assess the genome of the patient for additional variants, beyond those identified in *SLC28A1*, we performed singleton whole genome sequencing. We identified 109 candidate genes affected by rare variants: 9 homozygous (*STAMBPL1*, *ABI3BP*, *CELSR2*, *OR5P3*, *MEFV*, *TAF4*, *POU4F1*, *NCOA3* and *ZSWIM6*), 11 hemizygous (*MED12*, *RBMX2*, *GJB1*, *TMLHE*, *WNK3*, *BCOR*, *APLN*, *FAM120C*, *BCOR*, *CXorf30* and *MAGEA4*), and 89 compound heterozygous candidates (*ABCA13*, *ABCC11*, *ABI3BP*, *ADAMTS18*, *ADARB2*, *AGRN*, *AKAP13*, *AMDHD2*, *ANKDD1B*, *ANKZF1*, *ARID4A*, *C15ORF37*, *CCDC92*, *CELSR1*, *CLIC6*, *CORO7*, *CRYBG3*, *D2HGDH*, *DCHS2*, *DLC1*, *DNAH10*, *DNAH11*, *DNAH7*, *DNAH9*, *DPYD*, *EI24*, *ELFN1*, *ELP2*, *ENTHD2*, *ENTPD6*, *FAM47E*, *FAT1*, *FAT3*, *FSTL5*, *GDPD4*, *GIGYF2*, *GPX1*, *GRIK4*, *HERC1*, *HMCN1*, *HOXA4*, *KMT2C*, *KRT24*, *LAMA5*, *LAMB1*, *LGR6*, *LOXL4*, *LRPPRC*, *MMP26*, *MOGAT3*, *MTHFS*, *MUC12*, *MUC17*, *MUC6*, *MYPN*, *NCOR2*, *NLRP1*, *NRD1*, *OR56B1*, *PCK1*, *PKHD1L1*, *POLQ*, *PRF1*, *PROM1*, *PTX3*, *QRICH2*, *R3HCC1L*, *RLTPR*, *RNF213*, *RNF223*, *RPUSD4*, *SEC24D*, *SELP*, *SLC28A1*, *STRA6*, *SYNE2*, *SYNPO*, *SYVN1*, *TCHHL1*, *TMC3*, *TMPRSS15*, *TMPRSS9*, *TRIM17*, *TTC40*, *TTN*, *USP53*, *WDR38*, *YBX3* and *ZNF556*). Beyond the compound heterozygous variants that were previously identified through targeted analysis of *SLC28A1*, the only other candidate gene, among these 109, that fit well with the patient's phenotype of immune dysregulation, fever, hepatosplenomegaly, and liver dysfunction, was the *PRF1* (MIM 170280), which was previously implicated in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 2 (MIM 603553). The patient was compound heterozygous for a previously described rs147035858 [23] pathogenic frameshift variant: g.72360608CA > C [c.50delT; p.(Leu17Argfs*34); NP_001076585.1]; and a previously described rs745902829 in-frame deletion of g.70598866_70598868del [c.853_855delAAG; p.Lys285del; NP_001076585.1] [24,25]. To determine the mode of inheritance of these variants fragments containing both variants were cloned and Sanger sequenced, confirming that the variants in *PRF1* were in *trans* (Supplemental Fig. 4).

4. Discussion

In this manuscript, we describe the first patient with uridine-cytidineuria likely to be related to a functional deficiency in the pyrimidine nucleoside transporter hCNT1. The two identified variants c.1528C > T (p.R510C) and c.1682G > A (p.R561Q) in *SLC28A1*, encoding hCNT1, altered glycosylation and decreased the half-life of the mutant proteins, resulting in impaired pyrimidine nucleoside transport activity. Taking into account the high prevalence of the c.1528C > T (p.R510C) variant in the East Asian population, it is unlikely that the homozygous c.1528C > T genotype is associated with uridine-cytidineuria or a deleterious clinical phenotype. Further analyses mimicking the genotype of the patient clearly showed that compound heterozygosity, achieved by co-expression of both variants in *trans*, impaired transport activity. In contrast, no changes in hCNT1 activity were observed when both variants were individually co-expressed with the WT hCNT1. These observations suggest that only the expression of the WT form from one allele is sufficient to preserve the activity and it is likely that oligomerization effects might explain these differences in transporter performance. Indeed vcCNT was crystallized as a trimer [20] and hCNT3 is also known to be a trimer *in vivo* [22]. Nevertheless, although the variants examined in this study are likely to affect the monomer structure, it is not evident if they will prevent trimer assembly. The molecular basis for the alteration of hCNT1 glycosylation associated with these genetic variants cannot be elucidated on the basis of our hCNT1 structural model [21] because the putative N-glycosylation sites are located in domains not present in the prokaryotic

hCNTs and, therefore, are not present in the homology model recently generated.

The concentration of uridine in plasma, bone marrow and CSF range from approximately 3–8 μ M and these levels are tightly regulated by the liver which is the main organ involved in pyrimidine synthesis and degradation [26]. In our patient, normal levels of uridine and only slightly elevated levels of cytidine were observed in plasma, but strongly elevated levels of uridine and cytidine were persistently present in urine. This phenomenon can be explained by the fact that hCNT1 is present in the proximal tubule and glomerulus of the nephron and the apical localization in epithelial cells allows the reabsorption of uridine and cytidine [27].

Uridine and cytidine are essential pyrimidine nucleosides for the brain and the central nervous system and uridine is involved in a number of vital cellular functions, in addition to nucleic acid synthesis [26,28–30]. Uridine behaves as an anticonvulsant in a number of seizure models and uridine competitively inhibited GABA binding to rat cerebellar membranes, frontal cortex, hippocampus and thalamus [26,28]. It is, therefore, conceivable that a hCNT1 deficiency affects intracellular uridine levels and that the altered homeostasis of uridine in the brain is underlying the mild cerebral dysfunction, as indicated by electroencephalographic analysis of our patient.

There is an increased awareness that a combined phenotype of two co-existing monogenic defects resulting in blended phenotypes is an appreciable cause of disease [19]. The rapid deterioration of the patient resulting in multi-organ failure and early death prompted us to investigate whether or not there was another coexisting monogenic defect in the patient. WGS analysis and subsequent determination of the mode of inheritance demonstrated the presence of two in *trans* pathogenic variants c.50delT; p.(Leu17Argfs*34) and c.853_855del; p.(Lys285del) in the *PRF1* gene. Both variants have previously been identified in patients suffering from Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis type 2 (FHL-2) [23–25]. FHL-2 is caused by variants of perforin, a toxic pore-forming protein located in cytoplasmic granules that plays a key role in the elimination of viral-infected cells by cytotoxic T-lymphocytes and natural killer cells [16,31,32]. Patients with FHL suffer from fever, (hepato)splenomegaly, bi- or tricytopenia's, hypertriglyceridemia, elevated ferritin, hypofibrinogenemia, hemaphagocytosis, low or absent natural killer cells and markedly elevated lactate dehydrogenase levels [16,31,32]. The excessive cytokine production and immune dysregulation results in tissue damage and ultimately general organ failure. The average survival of patients with FHL, in the absence of treatment, is < 2 months [31]. The clinical presentation of our patient: fever, hepatosplenomegaly, persistent lactic acidosis, severely disturbed liver enzymes and ultimately multi organ failure fits well with the reported phenotype of patients with FHL-2. To our knowledge, it is not known whether other patients with *PRF1* variants, and suffering from FHL-2, presented with uridine-cytidineuria as well.

It is tempting to speculate that the hCNT1 deficiency might have caused the myoclonia and aggravated the clinical demise of our patient. Uridine and cytidine are essential compounds to sustain proliferation of T-lymphocytes and impaired uptake of these pyrimidine nucleosides might have further hampered a proper immune response to a viral infection [33]. It has recently been reported that a proper control of nucleoside intracellular pools in T-cells is a major determinant of T cell survival upon activation and this might explain some phenotypic features of patients lacking lysosomal hENT3 function [13]. In this regard, although hCNT1 mRNA levels in T-cells are almost negligible, they are up-regulated following cell stimulation with phytohemagglutinin (PHA) *ex vivo* [34]. Therefore, an adaptive response of hCNT1 in T-cells could also contribute to modulate nucleoside pools and this function could have been hampered in our patient. In our case, it is conceivable that the presence of two co-existing monogenic defects resulted in a blended clinical and biochemical phenotype. Thus, the clinical presentation of isolated hCNT1 deficiency remains to be established.

Funding

Work at the Pastor-Anglada laboratory has been funded by grant SAF2014-52067-R (Ministerio de Economía y Competitividad, MINECO, Spain), Fundación Ramón Areces and Universitat de Barcelona. This laboratory is a member of CIBER EHD, an initiative of Instituto de Salud Carlos III, Spain. Aida Mata-Ventosa is being funded by a Ph.D. training grant from Formación de Profesorado Universitario (FPU), Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Spain). Work at the Bidon-Chanal laboratory has been funded by grant 2017SGR1746. Work at the Centre for Molecular Medicine and Therapeutics has been funded by the Canadian Institutes of Health Research (grant number #301221); and informatics infrastructure supported by Genome British Columbia and Genome Canada (ABC4DE Project). Clara van Karnebeek is a recipient of the Michael Smith Foundation for Health Research Scholar Award. Britt Drögemöller was funded through the CIHR Postdoctoral Fellowship and the Michael Smith Foundation for Health Research Trainee Award.

Transparency document

The [Transparency document](#) associated with this article can be found, in online version.

Acknowledgements

We are grateful to the patient and family for their participation in this study. We acknowledge the clinicians and laboratory scientists involved in the management of this patient, as well as the following individuals for their contributions: Ms. Xiaohua Han for Sanger sequencing; Mrs. Ruth Giesbrecht for administrative support; Ms. Dora Pak and Ms. Evelyn Lomba for research management support; Ms. Michelle Higginson for DNA extraction, sample handling, and technical data; and Ms. Lauren Muttumacoroe for data management.

Conflict of interest statement

The authors declare no conflict of interest.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.01.013>.

References

- M. Loffler, L.D. Fairbanks, E. Zameitat, A.M. Marinaki, H.A. Simmonds, Pyrimidine pathways in health and disease, *Trends Mol. Med.* 11 (2005) 430–437.
- G.P. Connolly, H.A. Simmonds, J.A. Duley, Pyrimidines and CNS regulation, *Trends Pharmacol. Sci.* 17 (1996) 106–107.
- M. Loffler, E.A. Carrey, E. Zameitat, New perspectives on the roles of pyrimidines in the central nervous system, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* (2018) 1–17.
- J.D. Young, S.Y. Yao, J.M. Baldwin, C.E. Cass, S.A. Baldwin, The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29, *Mol. Asp. Med.* 34 (2013) 529–547.
- M. Pastor-Anglada, S. Perez-Torras, Emerging roles of nucleoside transporters, *Front. Pharmacol.* 9 (2018) 606.
- S. Balasubramanian, J.A. Duley, J. Christodoulou, Inborn errors of pyrimidine metabolism: clinical update and therapy, *J. Inher. Metab. Dis.* 37 (2014) 687–698.
- N. Kamatani, H.A. Jinnah, R.C.M. Hennekam, A.B.P. van Kuilenburg, Purine and Pyrimidine Metabolism, in: D. Rimoin, R. Pyeritz, F.B. Kor (Eds.), *Emery & Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics*, Elsevier Science Publishing Co Inc., 2013, pp. 1–38.
- G. Daniels, B.A. Ballif, V. Helias, C. Saison, S. Grimsley, L. Mannesier, H. Hustinx, E. Lee, J.P. Carttron, T. Peyrard, L. Arnaud, Lack of the nucleoside transporter ENT1 results in the Augustine-null blood type and ectopic mineralization, *Blood* 125 (2015) 3651–3654.
- V. Molho-Pessach, I. Lerer, D. Abeliovich, Z. Agha, A. Abu Libedh, V. Broshtilova, O. Elpeleg, A. Zlotogorski, The H syndrome is caused by mutations in the nucleoside transporter hENT3, *Am. J. Hum. Genet.* 83 (2008) 529–534.
- S.T. Cliffe, J.M. Kramer, K. Hussain, J.H. Robben, E.K. de Jong, A.P. de Brouwer, E. Nibbeling, E.J. Kamsteeg, M. Wong, J. Prendiville, C. James, R. Padidela, C. Becknell, H. van Bokhoven, P.M. Deen, R.C. Hennekam, R. Lindeman, A. Schenck, T. Roscioli, M.F. Buckley, SLC29A3 gene is mutated in pigmented hypertrichosis with insulin-dependent diabetes mellitus syndrome and interacts with the insulin signaling pathway, *Hum. Mol. Genet.* 18 (2009) 2257–2265.
- N.V. Morgan, M.R. Morris, H. Cangul, D. Gleeson, A. Straatman-Iwanowska, N. Davies, S. Keenan, S. Pasha, F. Rahman, D. Gentle, M.P. Vreeswijk, P. Devilee, M.A. Knowles, S. Ceylaner, R.C. Trembath, C. Dalence, E. Kismet, V. Koseoglu, H.C. Rossbach, P. Gissen, D. Tannahill, E.R. Maher, Mutations in SLC29A3, encoding an equilibrative nucleoside transporter ENT3, cause a familial histiocytosis syndrome (*Faisalabad histiocytosis*) and familial Rosai-Dorfman disease, *PLoS Genet.* 6 (2010) e1000833.
- C.L. Hsu, W. Lin, D. Seshasayee, Y.H. Chen, X. Ding, Z. Lin, E. Suto, Z. Huang, W.P. Lee, H. Park, M. Xu, M. Sun, L. Rangell, J.L. Lutman, S. Ulufatu, E. Stefanich, C. Chalouni, M. Sagolla, L. Diehl, P. Fielder, B. Dean, M. Balazs, F. Martin, Equilibrative nucleoside transporter 3 deficiency perturbs lysosome function and macrophage homeostasis, *Science* 335 (2012) 89–92.
- C.W. Wei, C.Y. Lee, D.J. Lee, C.F. Chu, J.C. Wang, T.C. Wang, W.N. Jane, Z.F. Chang, C.M. Leu, I.L. Dzhagalov, C.L. Hsu, Equilibrative nucleoside transporter 3 regulates T cell homeostasis by coordinating lysosomal function with nucleoside availability, *Cell Rep.* 23 (2018) 2330–2341.
- T. Papinazath, W. Min, S. Sujiththa, A. Cohen, C. Ackerley, C.M. Roifman, E. Grunebaum, Effects of purine nucleoside phosphorylase deficiency on thymocyte development, *J. Allergy Clin. Immunol.* 128 (2011) 854–863 (e851).
- E. Martin, N. Palmic, S. Sanquer, C. Lenoir, F. Hauck, C. Mongellaz, S. Fabrega, P. Nitschke, M.D. Esposti, J. Schwartzentruber, N. Taylor, J. Majewski, N. Jabado, R.F. Wynn, C. Picard, A. Fischer, P.D. Arkwright, S. Latour, CTP synthase 1 deficiency in humans reveals its central role in lymphocyte proliferation, *Nature* 510 (2014) 288–292.
- O. Naneh, T. Avcin, A. Bedina Zavec, Perforin and human diseases, *Subcell. Biochem.* 80 (2014) 221–239.
- H. van Lenthe, A.B.P. van Kuilenburg, T. Ito, A.H. Bootsma, A.G. van Cruchten, Y. Wada, A.H. van Gennip, Defects in pyrimidine degradation identified by HPLC-electrospray tandem mass spectrometry of urine specimens or urine-soaked filter paper strips, *Clin. Chem.* 46 (2000) 1916–1922.
- A.B.P. van Kuilenburg, H. van Lenthe, A.G. van Cruchten, W. Kulik, Quantification of 5,6-dihydrouracil by HPLC-electrospray tandem mass spectrometry, *Clin. Chem.* 50 (2004) 236–238.
- M. Tarailo-Graovac, C. Shyr, C.J. Ross, G.A. Horvath, R. Salvarinova, X.C. Ye, L.H. Zhang, A.P. Bhavsar, J.J. Lee, B.I. Drogemöller, M. Abdelsayed, M. Alfadhel, L. Armstrong, M.R. Baumgartner, P. Burda, M.B. Connolly, J. Cameron, M. Demos, T. Dewan, J. Dionne, A.M. Evans, J.M. Friedman, I. Garber, S. Lewis, J. Ling, R. Mandal, A. Mattman, M. McKinnon, A. Michoulas, D. Metzger, O.A. Ogunbayo, B. Rakic, J. Rozmus, P. Ruben, B. Sayson, S. Santra, K.R. Schultz, K. Selby, P. Shekel, S. Sirrs, C. Skrypnik, A. Superti-Furga, S.E. Turvey, M.I. Van Allen, D. Wishart, J. Wu, J. Wu, D. Zafeiriou, L. Kluijtmans, R.A. Wevers, P. Eydoux, A.M. Lehman, H. Vallance, S. Stockler-Ipsiroglu, G. Sinclair, W.W. Wasserman, C.D. van Karnebeek, Exome sequencing and the management of neurometabolic disorders, *N. Engl. J. Med.* 374 (2016) 2246–2255.
- Z.L. Johnson, C.G. Cheong, S.Y. Lee, Crystal structure of a concentrative nucleoside transporter from *Vibrio cholerae* at 2.4 Å, *Nature* 483 (2012) 489–493.
- C. Arimany-Nardi, A. Claudio-Montero, A. Viel-Oliva, P. Schmidtke, C. Estarellas, X. Barril, A. Bidon-Chanal, M. Pastor-Anglada, Identification and characterization of a secondary sodium-binding site and the main selectivity determinants in the human concentrative nucleoside transporter 3, *Mol. Pharm.* 14 (2017) 1980–1987.
- A. Stecula, A. Schlessinger, K.M. Giacomini, A. Sali, Human concentrative nucleoside transporter 3 (hCNT3, SLC28A3) forms a cyclic homotrimer, *Biochemistry* 56 (2017) 3475–3483.
- S.E. Stepp, R. Dufourcq-Lagelouse, F. Le Deist, S. Bhawan, S. Certain, P.A. Mathew, J.I. Henter, M. Bennett, A. Fischer, G. de Saint Basile, V. Kumar, Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis, *Science* 286 (1999) 1957–1959.
- K. Goransdotter Ericson, B. Fadeel, S. Nilsson-Ardnor, C. Soderhall, A. Samuelsson, G. Janka, M. Schneider, A. Gurgey, N. Yalman, T. Revesz, R. Egeler, K. Jahnukainen, I. Storm-Mathiesen, A. Haraldsson, J. Poole, G. de Saint Basile, M. Nordenskjold, J. Henter, Spectrum of perforin gene mutations in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis, *Am. J. Hum. Genet.* 68 (2001) 590–597.
- U. Zur Stadt, K. Beutel, S. Kolberg, R. Schneppenheim, H. Kabisch, G. Janka, H.C. Hennies, Mutation spectrum in children with primary hemophagocytic lymphohistiocytosis: molecular and functional analyses of PRF1, UNC13D, STX11, and RAB27A, *Hum. Mutat.* 27 (2006) 62–68.
- G.P. Connolly, J.A. Duley, Uridine and its nucleotides: biological actions, therapeutic potentials, *Trends Pharmacol. Sci.* 20 (1999) 218–225.
- S. Rodriguez-Mulero, E. Errasti-Murugarren, J. Ballarin, A. Felipe, A. Doucet, F.J. Casado, M. Pastor-Anglada, Expression of concentrative nucleoside transporters SLC28 (CNT1, CNT2, and CNT3) along the rat nephron: effect of diabetes, *Kidney Int.* 68 (2005) 665–672.
- A. Dobolyi, G. Juhasz, Z. Kovacs, J. Kardos, Uridine function in the central nervous system, *Curr. Top. Med. Chem.* 11 (2011) 1058–1067.
- T. Yamamoto, H. Koyama, M. Kurajoh, T. Shoji, Z. Tsutsumi, Y. Moriwaki, Biochemistry of uridine in plasma, *Clin. Chim. Acta* 412 (2011) 1712–1724.
- M. Cansev, Uridine and cytidine in the brain: their transport and utilization, *Brain Res. Rev.* 52 (2006) 389–397.
- M.R. George, Hemophagocytic lymphohistiocytosis: review of etiologies and management, *J. Blood Med.* 5 (2014) 69–86.
- A. Morimoto, Y. Nakazawa, E. Ishii, Hemophagocytic lymphohistiocytosis:

- pathogenesis, diagnosis, and management, *Pediatr. Int.* 58 (2016) 817–825.
- [33] A.A. van den Berg, H. van Lenthe, S. Busch, D. de Korte, A.B. van Kuilenburg, A.H. van Gennip, The roles of uridine-cytidine kinase and CTP synthetase in the synthesis of CTP in malignant human T-lymphocytic cells, *Leukemia* 8 (1994) 1375–1378.
- [34] G. Minuesa, S. Purcet, I. Erkizia, M. Molina-Arcas, M. Bofill, N. Izquierdo-Useros, F.J. Casado, B. Clotet, M. Pastor-Anglada, J. Martínez-Picado, Expression and functionality of anti-human immunodeficiency virus and anticancer drug uptake transporters in immune cells, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 324 (2008) 558–567.