

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

**TRANSPORTADOR D'ALTA AFINITAT  
D'ADENOSINA CNT2:  
LA SEVA REGULACIÓ I EL SEU PAPER  
COM A REGULADOR METABÒLIC**

**Ivette Aymerich Buch  
Barcelona 2005**

**MEMÒRIA PER OPTAR AL GRAU DE DOCTOR PER  
LA UNIVERSITAT DE BARCELONA  
PROGRAMA DE DOCTORAT DE BIOMEDICINA,  
BIENNI 2000-2002  
(DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR DE LA  
UNIVERSITAT DE BARCELONA)  
PRESENTADA PER**

**IVETTE AYMERICH BUCH**

**La interessada,**

**Ivette Aymerich Buch**

**Vist i plau dels directors,**

**Dr. FRANCISCO JAVIER  
CASADO MEREDIZ  
Prof titular de Bioquímica  
Departament de Bioquímica i  
Biologia Molecular  
Universitat de Barcelona**

**Dr. MARÇAL  
PASTOR-ANGLADA  
Catedràtic de Bioquímica  
Departament de Bioquímica i  
Biologia Molecular  
Universitat de Barcelona**

*Pour moi, ce monde de questions et de provisoire,  
cette chasse à une réponse toujours rapportée au lendemain,  
c'était l'euphorie.  
Je vivais au futur. J'attendais le résultat du lendemain.  
Mon anxiété, j'en avais fait mon métier*

*François Jacob  
La starue intérieure*

*A tots els qui m'han ajudat  
a recórrer aquest camí*

No crec que sigui capaç de plasmar en un full en blanc tot el seguit d'emocions i sentiments que m'envaeixen quan penso en aquests darrers anys. No sé com fer-ho per agrair-vos a tots els qui m'heu ajudat i animat a arribar fins aquí. Espero de tot cor, que en algun dels moments que hem compartit us hagi fet saber, a cadascun de vosaltres, que res se m'agafés fet tant fàcil si no haguéssiu estat al meu costat. Tots passem per moments d'eufòria, en els que ens podríem menjar el món, i en canvi per d'altres etapes en les que el món se'ns menja a nosaltres. Sobretot és durant aquestes petites crisis de confiança i de seguretat en les que no et sents prou vàlid en el què fas quan el suport dels qui t'envolten t'ajuda a tirar endavant. També és en aquests moments en què t'adones de com estimes i com t'estimen i et valoren els que tens al voltant. Perdoneu-me si sóc massa dramàtica i tingueu en compte que en aquest moment, possiblement degut a una barreja d'estrès, ja no només pel cansament i saturació de la tesi sinó també pels canvis que s'acosten, tinc els sentiments a flor de pell. Els qui em coneixeu ja ho sabeu, de tant en tant necessito canvis, les situacions noves m'atrauen, crec que ja és hora de tancar aquesta etapa i començar en un nou laboratori, una línia de recerca desconeguda per mi, i gent a qui conèixer. Estic molt il·lusionada però a la vegada si hi penso gaire ja m'enyoro de tots els que m'heu acompanyat i recolzat fins ara.

A tots els de RST us vull agrair ja no només el vostre ajut en el laboratori, guiant-me en un inici i col·laborant a trobar explicacions als resultats més imprevisibles, sinó també per la vostra paciència a l'hora de treballar al meu costat. Perdoneu-me per les meves tendències cleptomàniques i la desorganització de la "poiata", però us puc assegurar que encara que no ho sembli és un caos organitzat. En el fons, el trobareu a faltar i sinó on anireu a buscar les pipetes, els "timers", les tisoros... Deixant de banda les conyes, gràcies per compartir amb mi tantes experiències. He après coses de cadascun de vosaltres i he viscut moments que no oblidaré. Ja us els imagineu, en José i els seus càntics d'amor en italià, la Sylvie i les seves crêpes de xocolata que feien llepar els dits, els berenars dels divendres després d'una setmana de mals resultats, les festes de casa en Pedro, les tardes de cine que no se sap com però acaben a les 6 de la matinada, l'excursió a Girona i el pisco sour d'en Martxel·lo i encara en queden unes quantes més... Doncs ja ho veieu, enyoraré tot això però alhora el teu bon humor i alegria Isabel, la dolça curiositat de la Laia, tu responsabilidad i constancia Pedro (a cuantas clases de inglés iré sin ti?), Sergi ... no et facis pregar tant per sortir, i Ekaitz què dir-te que no et digués a Bilbao ...ja ho saps... jo també et trobaré a faltar. Això sí, no patiu que encara que uns quants marxem, us quedeu en molt bones mans i amb l'aire fresc i renovat d'una nova generació, la Itziar, la Montse i l'Andrea. També vull donar les gràcies als de TAM, als Insulinos, a la Raquel, la Carmen i en Toni per fer-me el dia a dia més agradable i fàcil i no vull oblidar-me del cafè d'en Manel que a més d'exquisit i aromàtic ens ha donat un tema de conversa inesgotable.

Bé nenes, i ara a vosaltres, què no hem fet juntes durant aquests anys... riure, plorar, ballar, parlar fins a l'esgotament... Miriam, Elena i Sonia, gràcies per tot, la paciència, la confiança, la sinceritat, els consells. Encara que no hem surtin les paraules adients per dir-vos tot el què voldria, desitjo que ens vagi molt bé a les quatre, allà on siguem, i que ens trobem com sempre de tant en tant a la platja del Masnou ... penseu que la Sonia i jo vindrem amb una necessitat desesperada de mar. Elenita, que ilusió ser la tieta Ivette...

*Però res d'això hagués conegut si vosaltres, Marçal i Javi, no m'haguéssiu donat la possibilitat d'endinsar-me en el món de la recerca en el vostre laboratori. Gràcies a tots dos, ja no només per la vostra confiança en mi des d'un inici sinó perquè poc a poc me l'heu transmesa. M'heu ajudat a formar-me i a valer-me tant dins del laboratori com fora, fent-me sentir cada vegada una mica més segura de mi mateixa. Gràcies Javi, per ser-hi en els moments més difícils a l'inici i ara al final. I Marçal, a tu et vull agrair la passió que desprens per la ciència i en veure cadascun dels resultats, i encara que no t'ho acabis de creure de mica en mica m'has encomanat el teu optimisme constant. També us vull agrair no només a vosaltres sinó especialment a en Pascal i la Fabienne la bona acollida en el seu laboratori i així poder realitzar un dels meus petits somnis, viure a Paris, assaborir els petits plaers de la ciutat i a la vegada gaudir d'experiències noves amb gent que no oblidaré mai.*

*Esto va para ti Gorkita, que hubiese hecho sin tu paciencia, tu ayuda y tus intentos fallidos para superar mi vergonya. Y sin los viajes, las cenas para celebrar constantemente y sin pessigolles para desestresarme. Eskerrik asko y espero que la tesis, como tu dices, nos haya quedado molt i molt maca.*

*Fora del laboratori, també sou uns quants els qui m'heu animat tot aquest temps i us ho vull agrair sincerament. Ja sé que unes simples paraules no són res al costat de totes les històries viscudes però és la meva manera de fer-vos ho saber. En primer lloc, res hagués estat el mateix sense el pis de les nenes i tots aquells que hi han passat, la Vero, l'Antonio, la Zoila sense deixar-me la Noa i en Gorkins però sobretot vull donar-te les gràcies a tu Mireia perquè segurament ets la persona amb qui més he rigut, començant pel viatge a Amsterdam i acabant amb les nostres dots de decoradores de disseny. Rubén, crec et mereixeries un full sencer d'agraïments, ja sé que ens ho hem dit milions de vegades aquests últims mesos però t'ho vull tornar a dir, te echaré mucho de menos, sobre tot els nostres sopars i converses que s'allarguen fins que ens tanquen els locals... però ja ho saps, jo ho espero, d'aquí uns tres anys ens tornem a trobar a Barcelona amb vistes al mar, no? Finalment, a vosaltres, David, Elia, Jaume, Montse i a molts altres també us vull donar les gràcies per escoltar-me i oferir-me la vostra amistat i ajut des de ja fa uns quants anys i especialment et vull donar les gràcies a tu Jordi, no cal... ja m'ho has dit però ja ho saps, com diu en Mario Benedetti: "Compañero, usted sabe que puede contar conmigo, no hasta dos o hasta diez sino contar conmigo". Potser ara, amb la distància serà més difícil organitzar els sopars que tant m'agraden al Quinito però espero que res canviï i això sí, no us escapeu d'una visita a Madrid.*

*Ja sé que no sóc la filla més familiar i agràida, em costa dir certes coses, sobre tot a casa. Però vull que sapigueu que us agraeixo que en tot moment hagueu respectat i m'hagueu recolzat en totes les meves decisions. Gràcies pel vostre suport, bé pel de tota la família, la vostra confiança exagerada i em sap greu els nervis i el mal humor que en certes ocasions us ha tocat patir.*

*En definitiva gràcies, gracias, eskerrik asko i merci a tots vosaltres.*

# ÍNDEX





<b>I. INTRODUCCIÓ.</b>	<b>3</b>
<b>1. TRANSPORTADORS INTESTINALS.</b>	<b>3</b>
<b>1.1 MORFOLOGIA FUNCIONAL DE LA MUCOSA INTESTINAL.</b>	<b>3</b>
1.1.1 Bases estructurals de la mucosa intestinal.	
1.1.2 L'enteròcit o cèl·lula absorbiva intestinal.	
<b>1.2 TRANSPORTADORS DE NUTRIENTS.</b>	<b>4</b>
1.2.1 Principals transportadors de nutrients.	
1.2.2 Regulació dels transportadors intestinals.	
1.2.3 Transport de fàrmacs.	
<b>2. TRANSPORTADORS DE NUCLEÒSIDS.</b>	<b>10</b>
<b>2.1 CARACTERITZACIÓ CINÈTICA DELS TRANSPORTADORS DE NUCLEÒSIDS.</b>	<b>10</b>
2.1.1 Sistemes equilibratius.	
2.1.2 Sistemes concentratius.	
<b>2.2 CARACTERITZACIÓ MOLECULAR DELS TRANSPORTADORS DE NUCLEÒSIDS.</b>	<b>13</b>
2.2.1 Transportadors equilibratius.	
2.2.2 Transportadors concentratius.	
<b>2.3 TRANSPORTADORS DE NUCLEÒSIDS EN EPITELIS ABSORTIUS I REABSORPTIUS.</b>	<b>23</b>
<b>2.4 TRANSPORT DE FÀRMACS DERIVATS DE NUCLEÒSIDS.</b>	<b>26</b>
2.4.1 Paper terapèutic dels fàrmacs derivats de nucleòsids.	
2.4.2 Principals fàrmacs usats en teràpia antitumoral i antiviral.	
2.4.3 Implicació dels NTs en la resistència als anàlegs de nucleòsids.	
<b>3. REGULACIÓ DELS TRANSPORTADORS DE NUCLEÒSIDS.</b>	<b>37</b>
<b>3.1 DIFERENCIACIÓ I PROLIFERACIÓ CEL·LULAR.</b>	<b>37</b>
<b>3.2 REGULACIÓ PER FACTORS HORMONALS I DE CREIXEMENT.</b>	<b>40</b>
<b>3.3 REGULACIÓ PURINÈRGICA.</b>	<b>43</b>
<b>3.4 REGULACIÓ NUTRICIONAL I PER ASSEQUIBILITAT DE SUBSTRAT.</b>	<b>45</b>
<b>3.5 REGULACIÓ DEL TRÀFIC I DE LA INSERCIÓ A MEMBRANA.</b>	<b>46</b>
<b>4. METABOLISME DE NUCLEÒSIDS I METABOLISME ENERGÈTIC.</b>	<b>47</b>
<b>4.1 METABOLISME DE NUCLEÒT(S)IDS.</b>	<b>47</b>
4.1.1 Biosíntesi de nucleòtids púrics.	
4.1.2 Biosíntesi de nucleòtids pirimidínics.	
4.1.3 Formació de desoxiribonucleòtids.	
4.1.4 Catabolisme de nucleòsids.	
<b>4.2 NUCLEÒSIDS DE LA DIETA.</b>	<b>55</b>
<b>4.3 ACTIVACIÓ PURINÈRGICA.</b>	<b>57</b>

4.4	PROTEÏNA QUINASA DEPENDENT D'AMP (AMPK).	59
4.4.1	Estructura de l'AMPK.	
4.4.2	Regulació de l'AMPK.	
4.4.3	Paper de l'AMPK en la regulació del metabolisme cel·lular.	
II.	<b>OBJECTIUS I DISSENY EXPERIMENTAL.</b>	<b>69</b>
III.	<b>MATERIALS I MÈTODES.</b>	<b>75</b>
1.	<b>CULTIUS CEL·LULARS.</b>	<b>77</b>
1.1	INSTRUMENTACIÓ NECESSÀRIA.	77
1.2	MANTENIMENT DELS CULTIUS CEL·LULARS.	78
1.2.1	Tripsinització i replaqueig.	
1.2.2	Congelació-Descongelació.	
1.3	LÍNIES CEL·LULARS UTILITZADES.	81
1.4	CULTIUS PRIMARIS.	87
1.4.1	Avantatges dels cultius primaris.	
1.4.2	Aïllament d'hepatòcits de rata adulta.	
1.4.3	Cultiu primari d'hepatòcits.	
2.	<b>TRACTAMENTS EN CULTIUS CEL·LULARS.</b>	<b>92</b>
2.1	REGULACIÓ HORMONAL I PER FACTORS DE CREIXEMENT.	93
2.2	REGULACIÓ PER ASSEQUIBILITAT DE SUBSTRAT.	94
2.3	REGULACIÓ DE L'AMPK PER ADENOSINA.	94
2.4	INHIBIDORS DE DIFERENTS VIES DE TRANSDUCCIÓ DE SENYALS.	95
3.	<b>TRANSPORT DE NUCLEÒSIDS.</b>	<b>98</b>
3.1	ASSAIG DE TRANSPORT.	98
3.2	VALORACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE PROTEÏNA.	100
3.3	CÀLCULS.	101
4.	<b>ANÀLISI DELS NUCLEÒTIDS D'ADENINA PER HPLC</b>	<b>102</b>
4.1	EXTRACCIÓ DE LES MOSTRES	102
4.2	CONDICIONS DE LA CROMATOGRAFIA	102
5.	<b>ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ DE PROTEÏNES.</b>	<b>103</b>
5.1	OBTENCIÓ DELS LISATS CEL·LULARS.	103
5.2	ELECTROFORESI EN SDS-PAGE.	104

5.3 ASSAIG D'IMMUNOBLLOT (WESTERN BLOT).	106
5.3.1 Electrotransferència de proteïnes.	
5.3.2 Immunodetecció.	
5.3.3 Revelat amb el mètode ECL.	
6. MESURA DE L'ACTIVITAT QUINASA.	109
6.1 IMMUNOPRECIPITACIÓ.	110
6.2 ASSAIG DE L'ACTIVITAT AMPK.	112
7. IMMUNOCITOQUÍMICA.	113
7.1 PRETRACTAMENT DE LES MOSTRES.	113
7.2 IMMUNODETECCIÓ.	114
7.3 ÀNALISI DELS RESULTATS PER MICROSCÒPIA.	116
8. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ DE RNA.	117
8.1 OBTENCIÓ DE RNA TOTAL EN CULTIUS I DE TEIXIT.	117
8.2 ANÀLISI DE LA QUALITAT I QUANTITAT DE RNA PURIFICAT.	118
8.2.1 Quantificació per espectrofotometria.	
8.2.2 Electroforesi en gel d'agarosa desnaturalitzant.	
8.3 REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA I TÈCNiques AFINS.	120
8.3.1 Síntesi de cDNA per retrotranscripció del mRNA.	
8.3.2 Reacció d'amplificació: PCR.	
8.3.3 PCR a temps real.	
9. TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR.	128
9.1 CREIXEMENT BACTERIÀ I BACTERIS COMPETENTS.	129
9.2 TRANSFORMACIÓ DE BACTERIS COMPETENTS.	130
9.3 AÏLLAMENT DEL DNA PLASMÍDIC.	131
9.4 PREPARACIÓ I AÏLLAMENT DELS INSERTS I VECTORS.	132
9.4.1 Tria de les dianes de restricció i disseny dels primers.	
9.4.2 Reacció de PCR.	
9.5 DIGESTIÓ DELS FRAGMENTS DE DNA AMB ENDONUCLEASES.	135
9.6 PURIFICACIÓ DEL DNA.	136
9.7 L·LIGACIÓ DE FRAGMENTS AMB DNA LLIGASA.	136
9.8 MUTAGÈNESI DIRIGIDA.	137
9.9 COMPROVACIÓ: SEQÜENCIACIÓ PER PCR.	138

<b>10. TÈCNiques D'EXPRESSIÓ HETERÒLOGA.</b>	<b>139</b>
10.1 <b>TRANSFECCIÓ TRANSITÒRIA.</b>	<b>139</b>
10.2 <b>TRANSFECCIÓ ESTABLE.</b>	<b>140</b>
10.3 <b>INFECCIÓ AMB ADENOVIRUS.</b>	<b>141</b>
<b>11. ESTADÍSTICA I REPRESENTACIÓ DE DADES.</b>	<b>142</b>
<b>IV. RESULTATS I DISCUSSIÓ.</b>	<b>145</b>
1. REGULACIÓ ENDOCRINA DELS TRANSPORTADORS DE NUCLEÒSIDS I ESTUDI DEL FLUX VECTORIAL DE NUCLEÒSIDS EN MODELS D'EPITELI ABSORTIU INTESTINAL.	147
2. REGULACIÓ DELS SISTEMES DE TRANSPORT DE NUCLEÒSIDS PER ASSEQUIBILITAT DE SUBSTRAT.	175
3. EFECTE DE L'ADENOSINA EXTRACEL·LULAR SOBRE LA PROTEÍNA QUINASA DEPENDENT D'AMP I ESTUDI DEL PAPER DELS TRANSPORTADORS DE NUCLEÒSIDS EN LA REGULACIÓ DE LA VIA DE L'AMPK.	187
4. ESTUDI DE LA LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR I ANÀLISI DELS DETERMINANTS MOLECULARS IMPLICATS EN EL TRÀFIC I LA INSERCIÓ DEL TRANSPORTADOR CONCENTRATIU DE NUCLEÒSIDS CNT2 A LA MEMBRANA PLASMÀTICA.	203
<b>V. DISCUSSIÓ GENERAL.</b>	<b>221</b>
<b>VI. CONCLUSIONS.</b>	<b>231</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA.</b>	<b>235</b>