



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR  
FACULTAD DE BIOLOGÍA  
UNIVERSIDAD DE BARCELONA**

**Localización subcelular y regulación  
post-traducciona del transportador  
hepático de adenosina rCNT2**

**SYLVIE DUFLOT  
Barcelona 2004**



# **Localización subcelular y regulación post-traducciona del transportador hepático de adenosina rCNT2**

Memoria presentada por  
**Sylvie Duflot**

Para optar al grado de  
**Doctora en Bioquímica**

Tesis realizada bajo la dirección del Dr. Marçal Pastor Anglada y del Dr. Francisco Javier Casado Merediz en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Barcelona. Programa de doctorado de Biomedicina, bienio 2000-2002.

La doctoranda,

Sylvie Duflot

Visto bueno de los Directores,

Dr. Marçal Pastor Anglada  
Catedrático de Bioquímica

Dr Francisco Javier Casado Merediz  
Profesor titular



A Gaël, ce petit être que je porte et que je ne connais pas encore....



## Agradecimientos

Cómo comenzar a agradecer a todas las personas que han estado a mi alrededor y me han apoyado durante todo este tiempo, esa gente que ha hecho que mi día a día haya sido mucho más llevadero...

Gracias Marçal por haberme aceptado en tu grupo sin conocerme, por tus explicaciones, tus ideas ingeniosas, tu buen humor y tu enorme paciencia; gracias por transmitirme tu pasión por la ciencia y sobre todo por toda la atención que me has prestado, ayudándome en más de una ocasión.

Gracias Javi por tu ayuda en esos momentos en que todo parece tan complicado, por tu constante apoyo, por esas escapadas a la montaña para esquiar o hacer rafting y por hacerme probar los mejores «mojitos» del condado de Barcelona.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio, por todos esos buenos momentos que hemos pasado juntos, por vuestra ayuda en el trabajo y vuestro apoyo moral en los momentos difíciles. En general, gracias por no haberos comportado sólo como compañeros de trabajo sino también como amigos. Sonia, nunca podré agradecerte lo suficiente tu esfuerzo para tenerme siempre al corriente de todo lo que pasaba en el laboratorio cuando no me enteraba de nada en mis primeros meses en el grupo. Y que decir de las alegrías y penas que hemos compartido juntas en todos estos años. Gracias Jose por todas tus explicaciones minuciosas, por todas esas tardes del martes que he disfrutado en tu compañía, por haberme descubierto la música italiana y porque sé que siempre podré contar con tu amistad. Gracias Miriam, mi «canetera» preferida, por tu simpatía y por transmitirme esa tranquilidad que te caracteriza. Y que decir de mis compañeras de poyata. Gracias Elena por todas tus buenas ideas, tu franqueza y por haberme escuchado y reconfortado cuando más lo necesitaba. Nunca olvidaré tus consejos ; Sonia tiene razón cuando dice que tienes un «don». Gracias Ivette, simplemente por ser como eres: sencilla, simpática, activa, y por dejar siempre el material cerca de mí. Gracias Sergi, por tu buen humor, tu simpatía y tu sensibilidad. Gracia Isabel por tu invaluable ayuda en el laboratorio, espero que nunca dejes de transmitir a tu alrededor esta alegría que te caracteriza. Gracias Pedro y Ekaitz por llenar de vida el laboratorio. Doy gracias también a Maite, Cristina, y Joao, con los que compartí los primeros años de tesis, por todos esos buenos momentos que hemos pasado juntos.

Además de mis compañeros de laboratorio, quiero agradecer a todos los otros grupos del Departamento, siempre atentos para cualquier ayuda o consejo. Gracias al grupo MP: Rubén, Antonio, Txell y Nuria por vuestra compañía en el laboratorio. Qué decir del grupo de Insulina del que tanta ayuda he recibido en esta tesis. Gracias a Nuri porque eres un «angel», gracias a Lorena, Susana, Joan, Luc, Manu, Sara, Meri, Maite, Jose Carlos, Carles, Francesc, César, Miriam, Noemi...por todas las sonrisas y los «holas» intercambiados. Gracias Espe, Nuri, Josep, Marta Camps por la asistencia técnica. Gracias al grupo TAM, y de ellos particularmente a las inseparables Yolanda y Carine por todas las conversaciones y risas en cultivo. Et que sería el departamento sin Toni, Raquel y los miembros del secretaria Pilar, Georgina, Merce... Gracias a todos.

Gracias a la gente del estabulario y del servicio de secuenciación...

Gracias Marta Gilralt y Pedro Marrero por todo el trabajo que os ha dado la beca Nature y gracias Marta por tu apoyo para resolver algunos problemas del doctorado.

Gracias a todas las personas que han colaborado en esta tesis, gracias Carles Enrich, fue un verdadero placer trabajar contigo, gracias Maria Calvo y Marta Taules por vuestra ayuda en el microscopio. Gracias al grupo «receptor», gracias Carmen Lluís por tus ideas, gracias Barbara y Vicent por vuestra ayuda.

Como agradecer a mis compañeras de piso con las que he convivido durante tanto tiempo... Gracias Marta por proponerme vivir contigo, con Espe y Mónica. Jamás olvidaré ni la simpatía y amabilidad que te caracterizan, ni esos desayunos y cenas en compañía tuya. Gracias Espe y Mónica por ser «mi familia» de Barcelona durante estos años. Como agradeceremos vuestra amistad y esos buenos momentos que hemos pasado juntas. No encuentro palabras para expresar lo que os echaré de menos en adelante... Espe, estoy segura que todo saldrá bien en Cambridge: trabajo, amor, amigos... tienes un don especial para hacerte querer. Mónica, te veo tan radiante últimamente que sólo puedo desearte que continúes así.

Gracias a todos los amigos que he hecho en Barcelona durante estos cinco años... Gracias *alla mia amica italiana che mi mancherà troppo*, gracias Paola por tu simpatía. Gracias a las dos chicas checas, Katka y Svata, por todos estos momentos únicos que he pasado con vosotras. Espero con impaciencia nuestro próximo tequila... Gracias Carolina, Alexis, Javi, Nuria, Aline, Miquel, Glòria, Guillermo, Begoña, Isaac, Herni, Elena, Stefano, Pedro, Vanesa, Gisella, Mari Lo, Arly, Martin, Valérie por esas veladas y risas compartidas.

Gracias a toda mi familia por estar, a pesar de la lejanía, tan presente en mi corazón. Gracias Maman y Jean Marc por haber tenido siempre confianza en mí y por haberme apoyado en todo momento. Seguro Maman que serás una abuela maravillosa... Gracias a mis hermanos y hermanas, tan diferentes entre ellos y tan importantes a mis ojos.

Gracias a mis *Beaux Parents* por su amabilidad y simpatía; Asunción, no sé como agradecerte que hayas hecho así de fácil la llegada del bebe.

Gracias Christian, simplemente por ser tú y porque te amo...

## **Agraïments**

Com començar a agrair a totes les persones que han estat al meu voltant i m'han recolzat durant tot aquest temps, aquella gent que ha fet que el meu dia a dia hagi estat molt més senzill ?

Gràcies Marçal per haber-me acceptat en el teu grup sense conèixer-me, per les teves explicacions, les teves idees enginyoses, el teu bon humor i la teva gran paciència ; gràcies per transmetre'm la teva passió per la ciència i sobre tot per tota l'atenció que m'has dedicat, ajudant-me en moltes ocasions.

Gràcies Javi per la teva ajuda en aquells moments en què tot sembla tant complicat, pel teu recolzament constant, per les escapades a la muntanya per esquiar o fer ràfting, i per fer-me tastar els millors mojitos de Barcelona.

Gràcies a tots els meus companys de laboratori, per tots els bons moments que hem passat junts, per la vostra ajuda en la feina i el recolzament moral en els moments difícils. En general, gràcies per no haber estat només companys de feina sino també amics. Sonia, mai podré agrair-te prou el teu esforç per mantenir-me sempre al corrent de tot el que passava al laboratori quan no entenia res els primers mesos en el grup. I què dir de les alegries i les penes que hem compartit juntes en tots aquests anys. Gràcies Jose per totes les teves explicacions detallades, per totes les tardes de dimarts que he gaudit de la teva companyia, per haber-me fet descobrir la música italiana i perquè sempre sé que podré comptar amb la teva amistat. Gràcies Miriam, la meva « canetera » preferida, per la teva simpatía i per transmetre'm aquella tranquil·litat que et caracteritza. I què dir de les meves companyes de poyata. Gràcies Elena per les teves bones idees, la teva franquesa i per haber-me escoltat i reconfortat quan més ho he necessitat. Mai oblidaré els teus consells ; la Sonia té raó quan diu que tens un do. Gràcies Ivette, simplement per ser com ets : senzilla, simpàtica, activa, i per deixar sempre el material prop meu. Gràcies Sergi pel teu bon humor, la teva simpatía i la teva sensibilitat. Gràcies Isabel per la teva



invalorable ajuda en el laboratori, espero que mai deixis de transmetre al teu voltant aquesta alegria que et caracteritza. Gràcies Pedro i Ekaitz per omplir de vida el laboratori. També vull donar gràcies a la Maite, Cristina i Joao, amb qui vaig compartir els primers anys de tesi, per tots els bons moments que hem passat junts.

A part dels meus companys de laboratori, també vull agrair a tots els dels altres grups del Departament, sempre a punt per donar qualsevol ajuda o consell. Gràcies al grup MP : Rubén, Antonio, Txell i Nuria per la vostra companyia al laboratori. Què dir del grup d'Insulina del que tanta ajuda he rebut durant aquesta tesi. Gràcies a la Nuri perquè ets un àngel, gràcies a la Lorena, Susanna, Joan, Luc, Manu, Sara, Meri, Maite, Jose Carlos, Carles, Francesc, César, Miriam, Noemi... per tots els somriures i els « hola » intercanviats. Gràcies Espe, Nuri, Josep, Marta Camps per l'assistència tècnica. Gràcies al grup TAM, i d'ells particularment a les inseparables Yolanda i Carine per totes les converses i rialles a cultius. I què seria del departament sense en Toni, la Raquel i els membres de secretaria Pilar, Georgina, Merce... Gràcies a tothom.

Gràcies a la Marta Giralt i en Pedro Marrero per tota la feina que us ha portat la beca Nature i gràcies Marta pel teu recolzament per resoldre alguns problemes del doctorat.

Gràcies a totes les persones que han col.laborat en aquesta tesi, gràcies a Carles Enrich, va ser un veritable plaer treballar amb tu, gràcies Maria Calvo i Marta Taules per la vostra ajuda amb el microscopi. Gràcies al grup « receptor », a la Carme Lluís per les teves idees, i a la Barbara i en Vicent per la vostra ajuda.

Com agrair a les meves companyes de pis amb qui he conviscut durant tant temps... Gràcies Marta per proposar-me viure amb tu, i amb l'Espe i la Mónica. Mai oblidaré la simpatia i l'amabilitat que et caracteritzen, ni aquells esmorzars i sopars en la teva companyia. Gràcies Espe i Mónica per ser la meva família a Barcelona durant aquests anys. Com agrair-vos la vostra amistat i els bons moments que hem passat juntes. No trobo paraules per expressar com us trobaré a faltar d'ara endavant... Espe, estic segura que tot sortirà bé a Cambridge : feina, amor, amics... Tens un do especial per fer-te estimar. Mónica, et veig tan radiant darrerament que només puc desitjar-te que segueixis així.

Gràcies a tots els amics que he fet a Barcelona durant aquests cinc anys... Gràcies *alla mia amica italiana che mi mancherà troppo*, gràcies Paola per la teva simpatia. Gràcies a les dues *chicas checas*, Katka i Svata, per tots els moments únics que he passat amb vosaltres. Espero amb impaciència el proper tequila... Gràcies Carolina, Alexis, Javi, Nuria, Aline, Miquel, Glòria, Guillermo, Begoña, Isaac, Elena, Stefano, Pedro, Vanesa, Gisella, Mari Lo, Arly, Martin, Valérie per les vetllades i rialles compartides.

Gràcies a tota la meva família per estar, tot i la llunyania, tan present en el meu cor. Gràcies Maman i Jean Marc per haber tingut sempre confiança en mi i per haber-me recolzat en tot moment. Segur Maman que seràs una àvia meravellosa... Gràcies als meus germans i germanes, tant diferents entre ells i tant importants als meus ulls.

Gràcies als meus *Beaux Parents* per la seva amabilitat i simpatia; Asunción, no sé com agrair-te que hags fet així de fàcil l'arribada del petit.

Gràcies Christian, simplement per ser tu i perquè t'estimo...

## Remerciements

Comment remercier toutes les personnes qui m'ont aidée et entourée durant toutes ces années de thèse, toutes ses personnes qui m'ont rendu la vie quotidienne tellement facile?

Merci Marçal pour m'avoir acceptée dans ton groupe sans même me connaître, pour tes explications, tes idées « ingénieuses », pour ta bonne humeur, pour me communiquer ta passion de la science, pour ta patience et pour toute ton attention qui m'a aidé bien plus d'une fois.

Merci Javi pour ton aide quand tout paraît tellement compliqué, pour ton soutien, pour nos sorties à la montagne en ski et en rafting et pour les meilleurs « mojitos » de Barcelone.

Merci à tous mes compagnons de laboratoire, pour tous les bons moments passés ensemble, pour votre aide au niveau du travail et pour votre appui moral dans les moments difficiles. Merci pour ne pas vous être seulement comporter comme compagnons de travail mais aussi comme amis. Je me rappelle des premiers mois dans le groupe où je ne comprenais personne et jamais je ne te remercierai suffisamment Sonia pour toujours essayer de me tenir au courant de tout ce qui se passait au laboratoire et que dire de ces moments de joies et de larmes que nous avons partagés. Merci Jose pour toutes tes explications tellement détaillées, pour toutes ces mardi soirs passés en ta compagnie, pour m'avoir fait découvrir la musique italienne et parce que je sais que je pourrai toujours compter sur ton amitié. Merci Miriam pour communiquer toute ta tranquillité et ta gentillesse. Et que dire de mes compagnes de paillasse. Merci Elena pour toutes tes bonnes idées, pour ta franchise et tous tes conseils que j'essaierai de ne jamais oublier. Merci de m'avoir écoutée et réconfortée quand j'en avais le plus besoin, Sonia a bien raison quand elle dit que tu as un « don ». Merci Ivette pour être tout simplement comme tu es, sincère, gentille, active et pour toujours laisser le matériel à mes côtés. Merci Sergi pour ta bonne humeur, ta sympathie et ta sensibilité. Merci Isabel pour ta précieuse aide au laboratoire, j'espère que tu ne cesseras jamais de communiquer cette gaieté qui te caractérise autour de toi. Merci Pedro et Ekaitz, pour apporter tant de vie au laboratoire. Merci aussi à Maite, Cristina y Joao avec qui j'ai partagé les premières années de thèse, pour tous les bons moments passés en votre compagnie.

En plus de mes compagnons de laboratoire, je souhaite remercier tous les autres groupes du Département, toujours prêts à aider et à conseiller. Merci au groupe MP, Rubén, Antonio, Txell y Nuria pour votre compagnie dans le laboratoire. Que dire du groupe Insulina qui m'a tant aidé dans cette thèse. Merci Nuri, parce que tu es un « ange », merci Lorena, Susana, Joan, Luc, Manu, Sara, Meri, Maite, Jose Carlos, Carles, Francesc, Cesar, Miriam, Noemi... pour tous ces sourires et « hola » échangés. Merci Espe, Nuri, Josep, Marta Camps pour votre aide « technique ». Merci au groupe TAM, et tout particulièrement aux inséparables Yolanda et Carine pour toutes ces conversations et ces rires dans la salle de culture. Et que serait le Département sans Toni, Raquel et les membres de secrétariat Pilar, Georgina, Merce... Merci à vous tous.

Merci au service de séquençage, à « l'estabulario »...

Merci Marta Gilralt et Pedro Marrero pour tout le travail que vous a donné la bourse « Nature » et merci Marta pour résoudre certains problèmes que m'ont posés le doctorat.

Merci à toutes les personnes qui ont collaborées à cette thèse, merci Carles Enrich, ce fut un réel plaisir de travailler avec toi, merci Maria Calvo et Marta Taules pour votre aide au microscope. Merci au groupe « Receptor », merci Carmen Lluís pour toutes tes idées, merci Barbara et Vicent pour votre aide.

Comment remercier mes colocataires avec qui j'ai passé tellement de temps...Merci Marta de m'avoir proposée de venir habiter avec toi, Espe et Monica. Jamais je n'oublierai ta gentillesse

qui te caractérise, ces dîners et ces petits déjeuners passés en ta compagnie. Merci Espe et Monica pour avoir été « ma famille » de Barcelone durant toutes ces années. Comment vous remercier pour tous ces bons moments passés ensemble et pour toute votre amitié. Je ne trouve pas les mots pour vous dire comme vous allez me manquer... Espe, j'espère que tout te réussira à Cambridge, travail, amour, amis,... de toute façon tu as comme un don pour savoir te faire aimer. Monica, je te vois tellement rayonnante ces derniers temps que je ne peux que souhaiter que tout continue ainsi.

Merci à tous les amis que je me suis fait durant ces 5 années à Barcelone... Merci *alla mia amica italiana che mi mancherà troppo*, merci Paola pour toute ta gentillesse. Merci a las dos *chicas tchecas* Katka et Svata, pour tous ces moments uniques que j'ai passé avec vous. J'attends avec impatience notre prochaine tequila... Merci Carolina, Alexis, Javi, Nuria, Aline, Miquel, Glòria, Guillermo, Begoña, Isaac, Elena, Stefano, Pedro, Vanesa, Gisella, Mari Lo, Arly, Martin, Valérie pour tous ces rires et ces soirées partagées.

Merci à toute ma famille pour être à la fois si loin et toujours présente dans mon cœur. Merci Maman et Jean-Marc pour toujours avoir eu confiance en moi et pour toujours m'avoir soutenue. Maman, tu feras une Grand-Mère merveilleuse... Merci à mes frères et sœurs, tous tellement différents et tellement importants à mes yeux.

Merci à mes Beaux Parents pour leur gentillesse et comment te remercier Asunción pour rendre l'arrivée du bébé si facile.

Merci Christian, tout simplement pour être tel que tu es et parce que je t'aime....

Sylvie



## **Abreviaturas**

**ABC:** *Adenosine triphosphate binding cassettes.*

**APS:** Acrónimo inglés del persulfato de amonio.

**AMPc:** Adenosina monofosfato cíclico

**BSA:** *Bovine Serum albumine.*

**Chelerythrine Chloride:** *1,2-Dimethoxy-N-methyl(1,3)benzodioxolo(5,6-c)phenantridium chloride.*

**cDNA:** DNA complementario a una secuencia de RNA sintetizada a partir de una reacción de transcripción.

**CGS 21680:** *2-[p-(2-carboxy-ethyl)phenethylamino]-5'-ethylcarboxamidoadenosine.*

**CEF:** *Caveolin enriched factor.*

**CNTs:** *Concentrative nucleoside transporters.*

**CPA :** *N6-cycloptyladenosine.*

**CURL:** *Compartment of uncoupling receptors.*

**dbtAMPc o Dibutyryl-cAMP:** *N<sup>6</sup>, O<sup>2'</sup>-Dibutyryl adenosine 3',5' monophosphate sodium salt.*

**DEA-NONOate o Diethylamine**

**NONOate:** *2-(N,N-Diethylamino)-diazolate2-oxide.*

**Diazoxida:** *7-chloro-3-methyl-2H-1,2,4-benzothiadizine-1,1-diazoxide.*

**DMSO:** Dimetilsulfóxido. Solvente orgánico que entre otras cosas, se utiliza como crioprotector.

**dNTPs:** Abreviatura que designa cualquier desoxiribonucleótido o la mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP y dTTP.

**DPCPX:** *8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine.*

**EDTA:** Ácido etilen-diamoina-tetraacético. Agente quelante de cationes de doble carga.

**EGF:** *Epidermal growth factor.*

**ENTs:** *Equilibrative nucleoside transporters.*

**FBS:** *Fetal bovine serum.*

**GFP:** *Green Florescent Protein.*

**Glibenclamida:** *5-Chloro-N-[2-(4-[[[(cyclohexylamino)carbonyl]amino]sulfonyl]phenyl]ethyl]-2-methoxybenzamide.*

**HEPES:** Reactivo tamponador de pH.

**HGF:** *Hepatic growth factor.*

**IFN:** *Interferon.*

**IL-6:** *Interleukin-6.*

**K<sub>ATP</sub>:** canales de potasio dependientes de ATP.

**Kb:** Kilobase.

**kda:** Kilodalton.

**K<sub>i</sub>:** constante de inhibición.

**K<sub>m</sub>:** Constante de Michaelis (K<sub>0.5</sub>).

**LB:** Medio "Luria Broth".

**LDL:** *low-density protein.*

**L-NMMA:** *N<sup>G</sup>-Monomethyl-L-arginine acetate.*

**L-NAME:** *N<sup>G</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride.*

**LPS:** Lipopolisacáridos.

**LSB:** *Laemmliu Sample Buffer.*

**M-CSF:** *Macrophage colony stimulating factor.*

**MVB:** *Multivesicular bodies.*

**NBTI:** *Nitrobenzylthioinosine.*

**NECA:** *5'-N-ethylcarboxamidoadenosine.*

**NO:** Óxido Nítrico.

**NOS:** Óxido nítrico sintasa.

**NTPs:** Ribonucleótidos.

**PAGE:** *Polyacrilamide Gel Electrophoresis.*

**PBS:** *Phosphate Buffer Saline.*

**PCR:** *Polymerase Chain reaction.*

**PKC:** *Proteína quinasa C.*

**PKA:** *Proteína quinasa A.*

**PMA:** *Phorbol 12-myristate 13-acetate.*

**R-PIA:** *(-)-N<sup>6</sup>-(2-phenylisopropyl)adenosine.*

**RRC:** *Receptor recycling compartment.*

**RT:** *Retrotranscripción.*

**SDS:** *Sodium dodecyl sulfate.*

**SNAP:** *S-nitroso-N-acetylpenicillamine.*

**STAT:** *Signal of transduction and activator of transcription.*

**TEMED:** *N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine.*

**TGN:** *Trans Golgi Network.*

**TGF:** *Tumor growth factor.*

**Tolbutamida:** *1-Butyl-3-(4-methylbenzenesulfonyl)urea.*

**Tris:** Reactivo tamponador de pH.

**TX-100:** Tritón X-100.

**V<sub>max</sub>:** Velocidad Máxima.

**XAC:** *8(4-[[[(2-aminoethyl)amino]carbonyl]-oxy]phenyl)-1,3-dipropylxanthine.*

**YFP:** *Yellow Fluorescent Protein.*



## ***ÍNDICE***





<b>I. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>1. El hígado</b>	<b>1</b>
1.1. Funciones	1
1.2. Vascularización hepática	1
1.3. Estructura del sinusoides hepático	2
1.4. Los hepatocitos, células polarizadas	2
1.5. Mecanismos de inserción de las proteínas de membrana en el hepatocito	3
1.6. Organización de la vía endocítica	3
<b>2. Regulación y papel de los nucleósidos y nucleótidos en el hígado</b>	<b>7</b>
2.1. Papel metabólico de los nucleótidos y nucleósidos	7
2.1.1. Los nucleótidos	7
2.1.2. Los nucleósidos	8
2.1.3. Metabolismo de la purinas y pirimidinas	9
2.2. Regulación purinérgica	10
2.2.1. Generalidades	10
2.2.2. Los receptores purinérgicos	11
2.3. Modulación de la regulación purinérgica	13
2.3.1. Proteína quinasa C	13
2.3.2. Proteína quinasa A	14
2.3.3. Los canales de potasio dependientes de ATP	14
2.3.4. El óxido nítrico	16
<b>3. Los transportadores de nucleósidos</b>	<b>17</b>
3.1. Papel fisiológico de los transportadores de nucleósidos	18
3.2. Características moleculares de los transportadores de nucleósidos	19
3.2.1. Características moleculares de los transportadores de nucleósidos concentrativos (CNTs)	19
3.2.1. Características moleculares de los transportadores de nucleósidos equilibrativos (ENTs)	22
3.3. Especificidades de los transportadores de nucleósidos	25
3.4. Los transportadores de nucleósidos en hepatocitos	25
3.5. Regulación de los transportadores de nucleósidos	27
3.5.1. Regulación de los transportadores de nucleósidos en hígado y en células epiteliales	27
3.5.2. Regulación de los transportadores de nucleósidos en células del sistema inmunitario	31
3.6. Transporte de los derivados de nucleósidos	
3.6.1. Acciones farmacológicas de los derivados de nucleósidos	32
3.6.2. Mecanismos de acción de los análogos de nucleósidos	34
3.6.3. Propiedades farmacológicas de los transportadores de nucleósidos	34

## **II. Objetivos generales** **37**

---

## **III. Materiales y Métodos** **39**

---

<b>1. El cultivo celular</b>	<b>39</b>
<b>1.1. Procedimiento</b>	<b>39</b>
1.1.1. Aparatos y material	39
1.1.2. Normas generales de manipulación	40
1.1.3. Cultivo de líneas celulares	40
<b>1.2. Líneas celulares</b>	<b>41</b>
1.2.1. Aislamiento y cultivo primario de hepatocitos	41
1.2.1.1. Obtención de células parenquimales hepáticas de rata adulta	41
1.2.1.2. Cultivo primario de hepatocitos	44
1.2.2. La línea celular Fao	45
1.2.3. La línea celular CHO-K1	46
<b>2. Técnicas de análisis de la expresión de proteínas</b>	<b>46</b>
<b>2.1. Aislamiento de membranas y endosomas</b>	<b>46</b>
2.1.1. Aislamiento de membranas totales de células en cultivo	46
2.1.2. Aislamiento de membranas totales de tejido	47
2.1.3. Aislamiento de membranas basolaterales de hígado de rata	48
2.1.4. Aislamiento de membranas canaliculares de hígado de rata	49
2.1.5. Aislamiento de endosomas de hígado de rata	50
<b>2.2. Determinación de la pureza de las membranas plasmáticas aisladas, cuantificación de la actividad 5'-nucleotidasa</b>	<b>52</b>
<b>2.3. Valoración de proteínas</b>	<b>53</b>
<b>2.4. Detección de las proteínas por Western-blot</b>	<b>54</b>
2.4.1. Electroforesis en geles de SDS-Poliacrilamida (SDS PAGE)	54
2.4.2. Electrotransferencia de las proteínas e inmunoblot	56
<b>2.5. Detección de las proteínas por microscopía</b>	<b>58</b>
2.5.1. Criofijación del hígado para microscopía electrónica y confocal	58
2.5.2. Microscopía electrónica	58
2.5.3. Microscopía óptica confocal	59
<b>3. Transporte de nucleósidos</b>	<b>61</b>
<b>3.1. Transporte en células</b>	<b>61</b>
<b>3.2. Transporte en vesículas</b>	<b>63</b>
<b>3.3. Inhibidores y activadores utilizados durante los transportes realizados</b>	<b>64</b>
<b>4. Amplificación por PCR</b>	<b>64</b>
<b>4.1. Análisis de la expresión del mRNA por RT-PCR cualitativa</b>	<b>65</b>
4.1.1. Aislamiento de RNA	65
4.1.2. Síntesis de cDNA a partir de RNA	65

4.1.3. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	66
4.1.3.1. Diseño de los primers	66
4.1.3.2. Reacción de polimerización por PCR	66
<b>5. Realización de las construcciones hCNT1-pGFP, rCNT2-pEYFP y myc-rCNT2-pcDNA3</b>	<b>67</b>
<b>5.1. Plásmidos y insertos</b>	<b>67</b>
<b>5.2. Transformación de las bacterias competentes</b>	<b>68</b>
5.2.1. Obtención de las bacterias competentes	68
5.2.2. Transformación de las células competentes	69
5.2.3. Aislamiento del DNA plasmídico	70
5.2.4. Preparación y aislamiento del inserto	70
5.2.4.1. Diseño de los <i>primers</i>	70
5.2.4.2. Amplificación de los primers por PCR	72
5.2.4.3. Electroforesis en gel no desnaturizante de agarosa	73
5.2.5. Purificación de las bandas de DNA	73
5.2.6. Cuantificación del DNA	74
5.2.7. Ligación de fragmentos con DNA ligasa	74
5.2.8. Secuenciación del DNA	75
5.2.9. Transfección transitoria en líneas celulares	75
<b><u>IV. Resultados</u></b>	<b><u>77</u></b>
<b><u>Capítulo 1: Distribución subcelular de los transportadores concentrativos rCNT1 y rCNT2 en hepatocitos de rata.</u></b>	<b><u>77</u></b>
<b>Antecedentes</b>	<b>78</b>
<b>Resultados</b>	<b>78</b>
<b>1.1. Determinación del enriquecimiento de las membranas aisladas</b>	<b>78</b>
<b>1.2. Expresión de los CNTs en membranas canaliculares y basolaterales</b>	<b>80</b>
1.2.1. Expresión proteica	80
1.2.2. Expresión de la actividad de transporte de nucleósidos en membranas basolaterales y canaliculares	80
<b>1.3. Expresión de CNT1 en fracciones intracelulares</b>	<b>81</b>
<b>1.4. Análisis por microscopía de fluorescencia de la localización de CNT1 y de las caveolinas</b>	<b>83</b>
<b>1.5. Localización subcelular de CNT1 y CNT2 por microscopía electrónica</b>	<b>84</b>
1.5.1. Inmunolocalización de CNT1 y CNT2	84
1.5.2. Distribución subcelular de CNT1 y CNT2	85

<b><u>Capítulo 2: Regulación post-traducciona del transportador CNT2 por agonistas purinérgicos en hígado de rata.</u></b>	<b>87</b>
<b>Antecedentes</b>	<b>88</b>
<b>Resultados</b>	<b>89</b>
2.1. Expresión de CNT2 y del receptor A <sub>1</sub> en hígado de rata	89
2.2. Inducción de la actividad de transporte CNT2 mediante incubaciones de las células con R-PIA	90
2.3. Efecto de la inducción de R-PIA sobre la cinética del transportador CNT2	93
2.4. Implicación de los canales de potasio en la activación de CNT2 mediante R-PIA	93
2.5. Efecto de la activación purinérgica sobre la expresión en membrana plasmática de CNT2	96
2.6. Expresión de los canales K <sub>ATP</sub> expresados en células de hepatoma y en hepatocitos de rata	97
2.7. Colocalización de los canales K <sub>ATP</sub> con el receptor A <sub>1</sub> y CNT2 en células Fao	98
2.8. La activación purinérgica es dependiente de la glucosa extracelular	99
<b><u>Capítulo 3: Papel del óxido nítrico y de la PKC en la activación post-traducciona de CNT2 en hígado de rata.</u></b>	<b>101</b>
<b>Antecedentes</b>	<b>102</b>
<b>Resultados</b>	<b>103</b>
3.1. Modulación de la actividad de transporte de CNT2 en ausencia de NO	103
3.2. Influencia de la concentración en glucosa del medio	105
3.3. Mediación de la respuesta a la disminución del NO por los canales K <sub>ATP</sub>	106
3.4. Comparación de las vías de activación de CNT2 por L-NAME y por inducción de los receptores A <sub>1</sub>	107
<b><u>Capítulo 4: Modulación post-traducciona del transportador rCNT2 por ácidos biliares. Generación de herramientas para el estudio de los mecanismos responsables del tráfico intracelular de los transportadores CNT1 y CNT2</u></b>	<b>111</b>
<b>Antecedentes</b>	<b>112</b>
<b>Resultados</b>	<b>112</b>

4.1. Identificación de los ácidos biliares como moduladores de la actividad del transportador rCNT2	112
4.2. Generación de construcciones	114
4.3. Expresión transitoria y caracterización funcional de las construcciones	115
4.4. Estudio de la regulación de rCNT2 por los ácidos biliares mediante la construcción EYFP-rCNT2	117
<b><u>V. Discusión</u></b>	<b>119</b>
<b><u>VI. Conclusiones</u></b>	<b>129</b>
<b><u>VII. Bibliografía</u></b>	<b>131</b>
<b><u>VIII. Apartados</u></b>	<b>145</b>



## ***INTRODUCCIÓN***





# 1. El hígado

## 1.1. Funciones

En parte, las funciones del hígado son importantes debido a su localización estratégica entre el sistema digestivo (que aporta tanto los productos de digestión como las hormonas gastrointestinales y pancreáticas) y el resto del cuerpo (circulación sistémica). El hígado tiene un papel fundamental en la regulación de la concentración sanguínea de multitud de moléculas, ya que controla una gran cantidad de nutrientes tales como aminoácidos, carbohidratos, lípidos y vitaminas procedentes de la dieta. Así, el suministro adecuado de los nutrientes a los diferentes órganos del cuerpo depende del buen funcionamiento del hígado.

El hígado desarrolla muchas funciones esenciales entre las cuales podemos destacar: su implicación en la homeostasis corporal (metabolismo lipídico, proteico y de carbohidratos), en la producción y excreción de la bilis, en la activación de numerosos enzimas, en la síntesis de proteínas plasmáticas como la albúmina o la globulina, en el almacenaje de glucógeno, vitaminas y minerales, así como en la detoxificación y purificación de la sangre mediante la excreción de bilirrubina y sustancias tóxicas.

Las funciones bioquímicas del hígado dependen de complejas interrelaciones entre la vascularización, el drenaje biliar, las células parenquimales y otros tipos celulares. Se encuentra en el hígado una gran variedad de tipos celulares, las células parenquimales o hepatocitos que representan una parte importante de la masa del órgano (60-80%) (Alpini et al, 1994) y otras células tales como las células de Kupffer (macrófagos hepáticos), las células endoteliales sinusoidales, las células estrelladas o de Ito (lipocitos responsables del almacenamiento de grasa), las células endoteliales biliares que forman el sistema biliar, las células madre u ovas (stem cells) y las células de Pit (linfocitos “natural killer” hepáticos).

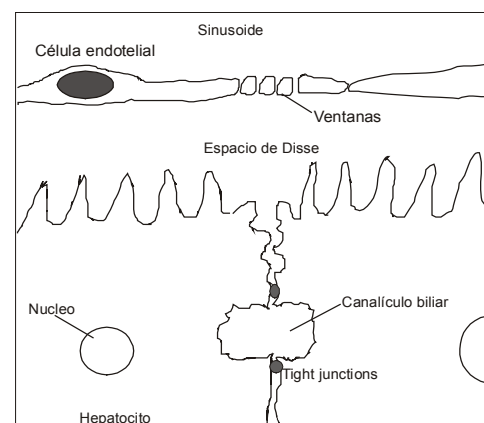
## 1.2. Vascularización hepática

El hígado es un órgano muy vascularizado, irrigado por sangre oxigenada procedente de la arteria hepática y por sangre procedente del tracto digestivo (rica en aminoácidos, lípidos y carbohidratos) y del bazo (rica en productos de degradación de la hemoglobina), que llega por la vena porta hepática. La sangre fluye por los hepatocitos a través de los sinusoides (sistema de canales vasculares) y pasa modificada a las venas centrales y a las venas hepáticas antes de llegar finalmente a la vena cava inferior. Los canales biliares transportan la bilis hasta la vesícula biliar.

La bilis es una secreción vital, esencial para la digestión intestinal y la absorción de lípidos. Es una ruta esencial para la eliminación de toxinas, carcinógenos, drogas y xenobioticos y también es una ruta muy importante para la excreción de componentes endógenos como el colesterol, la bilirrubina y las hormonas. La bilis es secretada por los hepatocitos a los canalículos. Esta secreción es un proceso osmótico mediado mayoritariamente por una excreción activa de solutos orgánicos al canalículo, seguido por un flujo pasivo de agua y electrolitos desde el hepatocito. La formación de la bilis depende no solamente de sus sistemas de transporte, sino también de un citosqueleto intacto que permite el movimiento de las vesículas, las contracciones del canalículo y los contactos de unión que permiten el cierre del canal. Los sales biliares se concentran en la bilis mediante sistemas de transporte activos. Los componentes de la bilis provienen, en su mayoría, de la membrana basolateral que está en contacto directo con la vena porta (Boyer et al, 1980).

### **1.3. Estructura del sinusoide hepático**

Los sinusoides están revestidos por un endotelio fino, discontinuo, con ventanas. Los hepatocitos no entran en contacto directo con la sangre. Existe un espacio, el espacio de Disse, entre el hepatocito y el endotelio discontinuo que tapiza el sinusoide (figura 1). En este espacio, se hace la mayor parte de la transferencia de sustancias entre la sangre de los sinusoides y los hepatocitos, en los dos sentidos. En el espacio de Disse, se encuentran los microvellosidades de los hepatocitos, que son fibras de reticulina de colágeno que forman el esqueleto de sostenimiento del hígado.



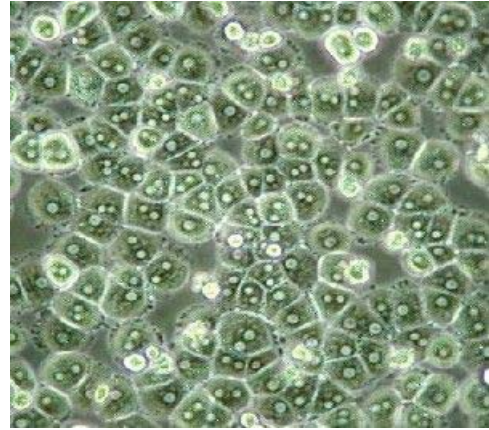
**Figura 1**

### **1.4. Los hepatocitos, células polarizadas**

Los hepatocitos son células epiteliales altamente polarizadas (figura 2). Se caracterizan por tener una membrana plasmática diferenciada en tres dominios funcionales diferentes: la membrana basal, la lateral y la apical. Respecto a la superficie total del hepatocito, el dominio sinusoidal representa un 72%, el lateral un 15% y el canalicular un 13%.

El dominio sinusoidal está especializado en los intercambios de metabolitos con la sangre. En la membrana basal o sinusoidal se realiza la actividad endocrina, la secreción de proteínas y lipoproteínas por fusión de vesículas secretoras con la membrana y la internalización de

macromoléculas circulantes a través de vías dependientes o no de clatrina. El dominio lateral es la zona de anclaje del hepatocito a otros hepatocitos vecinos. Este anclaje se lleva a cabo mediante las *tight-junctions* y los desmosomas. También es la zona de la membrana por la que los hepatocitos se comunican entre sí, mediante las *gap-junctions*, poros que permiten el intercambio de moléculas de bajo peso molecular entre hepatocitos vecinos. Las *tight junctions* definen un dominio particular de la membrana, aislado del resto: el dominio apical. La actividad exocrina especializada de los hepatocitos tiene lugar en la membrana canalicular o apical y corresponde al transporte de los ácidos biliares y productos de detoxificación, a través de la bicapa, a la bilis. La membrana canalicular forma los bordes del canalículo biliar, por el que circula la bilis excretada.



**Figura 2: Cultivo de hepatocitos aislados de rata**

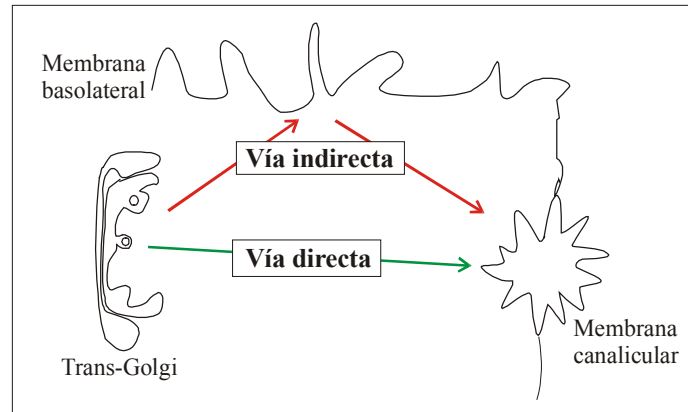
Además de sus diferencias funcionales, las membranas plasmáticas basolateral, lateral y canalicular tienen una composición bioquímica diferente. Las *tight-junctions* que separan la membrana lateral de la membrana canalicular permiten el cierre del canalículo formando una barrera anatómica y manteniendo los gradientes de concentración entre la sangre y la bilis. *In vivo*, las *tights junctions* permiten el cierre del canalículo juntando las membranas canaliculares de las dos células adyacentes. *In vitro*, por aislamiento convencional de hepatocitos (con colagenasa), las células obtenidas están separadas unas de las otras y las *tight junctions* permiten la formación de un polo biliar por reorganización del canalículo pre-existente (Coleman et al., 2000 ).

En resumen, la polaridad de los hepatocitos está determinada por 1) la presencia de las *tight junctions*, que permiten el cierre del canalículo, 2) la distribución diferencial del citosqueleto y de las moléculas asociadas, y 3) la distribución diferencial de los transportadores y el sentido de desplazamiento de las moléculas específicas y del material vesicular (Gautam et al, 1987).

### **1.5. Mecanismos de inserción de las proteínas de membrana en el hepatocito**

La célula hepática es un modelo interesante para el estudio de la ruta endocítica por dos razones principales. Primero, los hepatocitos son muy activos metabólicamente, contienen muchos receptores que participan en la endocitosis y metabolizan una gran variedad de ligandos. En segundo lugar, tiene dos dominios diferentes en la membrana plasmática capaces de producir transcitosis desde la sangre a la bilis (Enrich et al., 1999).

La mayoría de las proteínas destinadas a la bilis, una vez endocitadas, son transportadas desde el trans Golgi a la membrana sinusoidal hacia la membrana apical donde serán liberadas. La mayoría de las proteínas de la membrana apical, como la 5'nucleotidasa y la fosfatasa alcalina, siguen esta vía, llamada vía indirecta (Schell et al., 1992). También existe una vía directa, es decir, un transporte directo de las proteínas desde el TGN a la membrana apical sin pasar por la membrana basolateral (ver figura 3). Esta vía fue descrita para los transportadores ABC (*adenosine triphosphate binding cassettes*) (Kipp et al., 2000).



**Figura 3: vías endocíticas de las proteínas destinadas a la membrana canalicular en hepatocitos.**

## 1.6. Organización de la vía endocítica

El compartimiento endocítico consiste en una red de membranas tubulo-vesiculares que se extiende desde la superficie de la célula a la zona perinuclear. La organización de la ruta endocítica es relativamente sencilla. Receptores y otras proteínas de membrana aparecen en los endosomas precoces y allí aproximadamente la mitad de las proteínas internalizadas son rápidamente recicladas, volviendo a la membrana plasmática. Las otras proteínas son transportadas en los endosomas tardíos y, después, en los lisosomas, donde serán degradadas. Los endosomas precoces se forman *de novo* a partir de la membrana plasmática. Su composición cambia siempre por el hecho de que unos de sus compuestos serán reciclados y otros, que proceden del trans-golgi, serán añadidos, antes de que se transformen en endosomas tardíos y se fusionen con los lisosomas. Los endosomas tardíos y precoces se diferencian por sus localizaciones subcelulares, por su morfología, sus proteínas y por sus propiedades de acidificación (Gruenberg et al., 1995).

Los metabolitos como la LDL (*low-density lipoprotein*), las hormonas (insulina, estradiol), las prostaglandinas, los factores de crecimiento (*epidermal growth factor*, *hepatic growth factor*) y varias proteínas, como las asialoglicoproteínas, se internalizan y se transportan hacia su destino

final en el hepatocito. Esto ocurre después de su unión a un receptor específico en la membrana plasmática sinusoidal (Geuze et al., 1984). Se sabe poco de como los hepatocitos distinguen las proteínas destinadas a la membrana apical de las destinadas a la membrana basolateral. Ohno y colaboradores descubrieron una subunidad, mu1B, que se expresa en células epiteliales no polarizadas y no en hepatocitos (Ohno et al., 1999). Mu1B es una subunidad del complejo adaptador de clatrina AP-1, adaptador que permite descodificar las señales de las proteínas destinadas a la membrana basolateral en células epiteliales no polarizadas. La ausencia de mu1B está en correlación con la ruta indirecta en los hepatocitos (Koivisto et al., 2001).

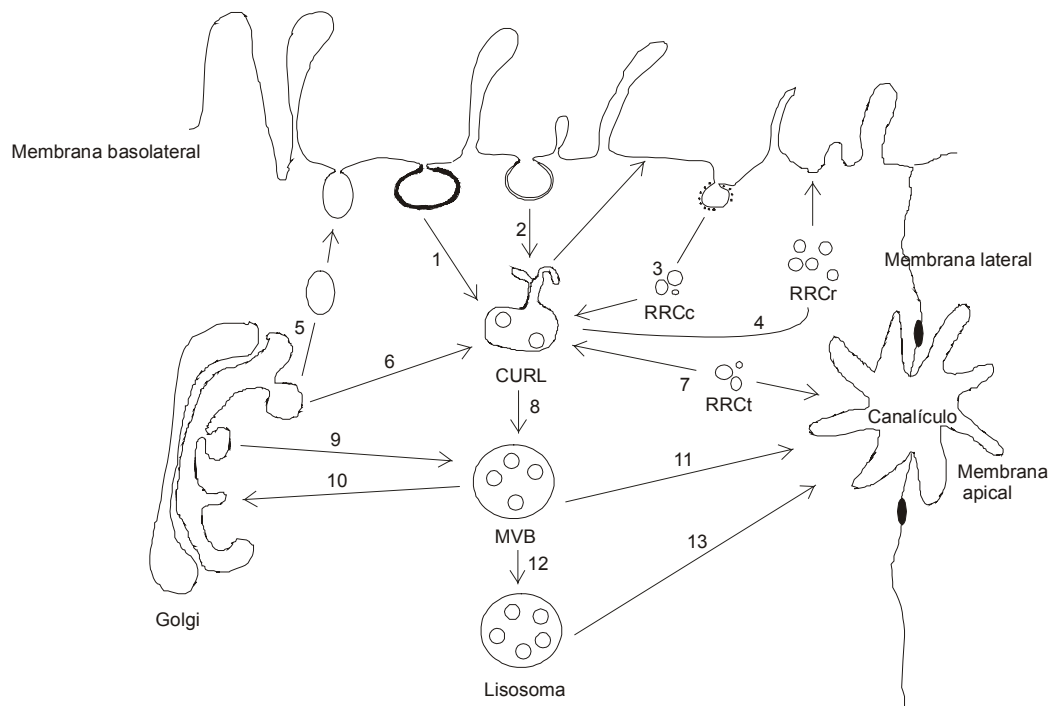
La endocitosis en la célula empieza por la internalización de moléculas extracelulares a través de la membrana plasmática. La membrana plasmática actúa como barrera selectiva permeable, permite la compartimentación de la célula, el transporte de solutos o macromoléculas a través de ella, la transducción de señales y de energía y las interacciones intercelulares. Existen diferentes vías de internalización en las células eucariotas, que se diferencian por su dependencia o no de la clatrina. Las invaginaciones recubiertas de clatrina de la membrana permiten la captación de los ligandos unidos a sus receptores y de los fluidos extracelulares. La clatrina es un complejo heterohexamérico compuesto por tres cadenas pesadas de 190 Kda y otras tres ligeras de 23 o 25 Kda (Kirchhausen et al., 1993). Los sistemas independientes de clatrina son la fagocitosis, la macropinocitosis, las caveolas y otros sistemas que todavía no están bien caracterizados. Las caveolas son microdominios de membrana, que contienen una proteína estructural, la caveolina, y están enriquecidas en glicosfingolípidos y colesterol. Las caveolas se distinguen de las otras vías de internalización por sus proteínas estructurales y por su composición lipídica particular. Se ha demostrado que la caveolina induce la curvatura de la caveola permitiendo la invaginación de la caveola y la formación de vesículas (Fra et al., 1995; Li et al., 1996). Su función y su composición molecular asociada puede variar según el tipo celular. La formación de vesículas derivadas de caveolas y la internalización de los ligandos por esta vía es un fenómeno muy lento, de dos a cuatro veces más lento que la formación de vesículas recubiertas de clatrina (Tran et al., 1987). Se ha mostrado la presencia de caveolinas en el compartimiento endocítico del hígado y en fracciones de membrana plasmática, enriquecidas en caveolas, aisladas a partir de hígado de rata, (Pol et al., 1999).

En los hepatocitos, se han aislado y caracterizado tres tipos de fracciones endosomales: CURL (*compartment of uncoupling receptors*), MVB (*Multivesicular bodies*) y RRC (*receptor recycling compartment*) (Belcher et al., 1987; Pol et al., 1997). Estas fracciones se diferencian por su morfología y por su asociación o no con distintos ligandos.

La fracción MVB es la más homogénea, contiene estructuras multivesiculares y tiene un diámetro medio de 500 nm. Es la fracción de densidad más alta. Correspondería a los endosomas tardíos y tiene una estructura pre-lisosomal.

La fracción CURL tiene una densidad intermedia y correspondería a los endosomas tempranos. Tiene un diámetro medio de 350 nm. Es el compartimento implicado en el reparto de las proteínas transportadas.

La fracción RRC es la menos densa y más heterogénea, contiene vesículas de diferente tamaño, no parece tener lipoproteínas y está enriquecida en receptores de reciclaje. Corresponde a los endosomas de reciclaje. El proceso de reciclaje involucra dos poblaciones de endosomas diferentes: unos que permiten el reciclaje en la periferia y otros que permiten el reciclaje perinuclear. En la fracción RRC, se distinguen tres sub-compartimientos con funciones diferentes: RRCr, que permite mayoritariamente el reciclaje de los receptores; RRCt, implicado en el transporte de moléculas a la bilis; y RRCc, involucrado en el reciclaje de las estructuras enriquecidas en caveolinas-1 (Enrich et al., 1999).



**Figura 4. Vías endocíticas en el hepatocito**

1. endocitosis mediada por clatrina- 2. internalización sin clatrina- 3. internalización mediada por caveolae- 4. endosomas de reciclaje de receptores- 5. exocitosis- 6. transporte del TGN a los endosomas precoces- 7. transcitosis de proteínas hacia el canalículo- 8. transporte de CURL a MVB- 9. transporte del TGN a los endosomas tardíos- 10. transporte desde los endosomas tardíos al TGN- 11. secreción apical de los endosomas tardíos a la bilis- 12. transporte del MVB a los lisosomas- 13. transporte de los lisosomas a la bilis.

## **2. Regulación y papel de los nucleótidos y nucleósidos en el hígado**

### **2.1. Papel metabólico de los nucleótidos y nucleósidos**

#### **2.1.1. Los Nucleótidos**

Los nucleótidos son conocidos principalmente por constituir los elementos estructurales de los ácidos nucleicos, por actuar en el metabolismo energético y por su participación en numerosos eventos bioquímicos. Sólo un pequeño porcentaje de nucleótidos es incorporado a los ácidos nucleicos (2 a 5%). En el metabolismo energético, el ATP es la fuente energética más común. También el GTP interviene como fuente energética en la síntesis proteica, mientras que el UTP participa en la activación de la glucosa y la galactosa y el CTP en el metabolismo de los lípidos. Muchas células liberan ATP, GTP y UTP como respuesta a señales fisiológicas. En condiciones normales, los nucleótidos y nucleósidos siempre se encuentran a bajas concentraciones en la sangre (en un rango  $\mu\text{M}$ ), en la bilis y en los fluidos intersticiales. Un pequeño aumento de la permeabilidad de la membrana a los nucleótidos, provocando la salida de nucleótidos de la célula, es suficiente para que empiece toda una cascada de señalización dentro de la célula.

Los nucleótidos ejercen acciones similares a las hormonas a través de sus uniones a receptores específicos localizados en la membrana plasmática, ya que actúan como potentes agonistas y activan las cascadas de transducción de señales, entre las cuales se destacan las vías del AMPc y del inositol/calcio. Los receptores de nucleótidos se encuentran en todos los grandes sistemas del organismo, y pueden tener acciones múltiples: sobre el ritmo cardíaco, liberación de neurotransmisores, agregación plaquetaria, etc. Existen muchos tipos de receptores de nucleótidos y muchos de ellos pueden encontrarse en el mismo tejido, lo que dificulta el conocimiento del papel específico que juega cada uno de ellos en el tejido.

El hepatocito responde a una situación de estrés, en ausencia de lesiones y necrosis, a través de la liberación de ATP y UTP (Schlosser et al., 1996) y de la modulación de su volumen celular (Roman et al., 1997). En las neuronas, el ATP se libera como transmisor o co-transmisor y, en las células endoteliales, la liberación del ATP ocurre como respuesta a los enzimas proteolíticos o a un cambio del flujo sanguíneo.

Los nucleótidos extracelulares liberados tienen una vida media muy corta (dos minutos en el caso del ATP), como consecuencia de la hidrólisis en nucleósidos por las diferentes nucleotidasas. Este fenómeno está altamente regulado por activación purinérgica. Los nucleótidos juegan un papel fundamental en el control de la función celular, ejerciendo un control rápido,

preciso y específico. Por tanto, los nucleótidos y sus derivados pueden ser utilizados con fines terapéuticos.

Los nucleótidos permiten la estimulación de la regeneración hepática después de una hepatectomía parcial (Jackson et al., 1997). El mecanismo de regeneración de los tejidos mediado por los nucleótidos no está todavía muy claro. Podría ser que los nucleótidos sirvieran de precursores para la síntesis de los ácidos nucleicos, en la vía de recuperación, limitando así los gastos energéticos de la vía de síntesis *de novo*.

Ratones alimentados con dietas libres de nucleótidos tienen los sistemas inmunitario y humoral afectados. Este efecto desaparece cuando los animales vuelven a una dieta normal. Los nucleótidos parecen afectar muchas funciones inmunológicas, como la reversión de la inmunosupresión inducida por la malnutrición, la maduración y la función de las células T, la actividad de las células *killer* o la resistencia a diferentes agentes infecciosos como los *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* (Adjei et al., 1995).

### **2.1.2. Los nucleósidos**

Los nucleósidos individuales actúan también como mediadores de una gran variedad de funciones específicas y tienen un papel muy relevante en la fisiología humana (Plagemann et al., 1988). Así, la adenosina, a través de la interacción con sus receptores de membrana, participa en una gran variedad de procesos fisiológicos como la neuromodulación, la actividad cardiovascular, la lipólisis o la agregación plaquetaria. Por otro lado, la inosina ha sido descrita como la principal fuente de energía para eritrocitos de cerdo adulto, los cuales no tienen transportadores de glucosa funcional. Es más, junto con la adenosina, representa un sustrato energético primario para los eritrocitos de gallina, adultos y embrionarios (Jarvis et al., 1980; Young et al., 1986).

El hígado es una fuente de bases púricas, pirimidínicas y de nucleósidos utilizados por otros tejidos. Los hepatocitos y los enterocitos son los primeros recicladores de nucleósidos de la circulación extra-hepática y de la luz intestinal, respectivamente. A través del sistema vascular del hígado, se proporcionan las purinas y pirimidinas preformadas al resto del organismo.

Las purinas, principalmente la adenosina, tienen un papel multifactorial en la fisiología del hígado, modulando el metabolismo del hepatocito. En hepatocitos aislados de rata, la presencia de adenosina en el medio de incubación induce la liberación de AMPc provocando una disminución de la concentración de fructosa 2,6-bisfosfato, la inactivación de la piruvato quinasa y la 6-fosfofructo-2-quinasa y la activación de la fosforilasa y la 2,6-bisfosfatasa (Bartrons et al., 1984). La adenosina



y sus análogos, pueden estimular de manera directa la glicogenolisis (Buxton et al., 1987). Además, en relación a estos resultados, se demostró que la adenosina puede inhibir la gluconeogénesis a través de su conversión por la adenosina quinasa (Lavoinne et al., 1990). La adenosina también puede influir en la autorregulación de la presión arterial hepática (Ezzat et al., 1987), la vasodilatación (Granger et al., 1978) y la generación de aniones superóxido (Cronstein et al., 1983). El papel de la adenosina en la regulación purinérgica se discute más adelante.

### 2.1.3. Metabolismo de las purinas y pirimidinas

Los nucleótidos y nucleósidos no son componentes esenciales de la alimentación. El organismo puede sintetizarlos de novo, recuperarlos y reutilizarlos. Los nucleótidos son hidrolizados en nucleósidos y Pi por las nucleotidasas. Los nucleósidos son transportados al enterocito por difusión o por un transporte sodio dependiente. Las bases púricas y pirimidínicas liberadas serán degradadas o recicladas para reincorporarse a los nucleótidos. A diferencia del DNA, el *pool* de nucleótidos y el RNA tienen que renovarse en las células. Los procesos catalíticos de las bases púricas y pirimidínicas son diferentes. Las bases púricas son desaminadas y oxidadas a ácido úrico. El ácido úrico se forma en el hígado y será excretado por el riñón en la orina. Las bases pirimidínicas son reducidas con NADPH a amonio, CO<sub>2</sub> y a beta-aminoácidos, como la beta-alanina, que serán excretados o incorporados por el cerebro y los músculos. El catabolismo de estas bases produce muy poca energía.

Los nucleósidos y las bases que no se degradan son reciclados. Este reciclaje no es suficiente por las necesidades del organismo, lo que implica la existencia de una síntesis *de novo*. La vía *de novo* supone un gasto de energía (ATP) importante y está restringida a algunos tipos celulares además del hígado como las células de la médula ósea, algunas células cerebrales, eritrocitos, leucocitos. La vía de recuperación ("*salvage*") es menos costosa energéticamente pero imprescindible en aquellas células que no pueden sintetizar los nucleótidos de novo (Lajtha et al., 1958; Fontenelle et al., 1969; Rudolph et al., 1984). Es en el hígado donde la síntesis *de novo* es más activa.

La síntesis de nucleótidos está finamente regulada. Las concentraciones intracelulares de ribonucleótidos (NTPs) suelen mantenerse constantes, en un rango mM, mientras que las concentraciones en desoxirribonucleótidos (dNTPs), en un rango  $\mu$ M, fluctúan con el ciclo celular. La concentración de los componentes individuales puede variar pero la concentración celular total está fijada dentro de unos márgenes muy estrictos.

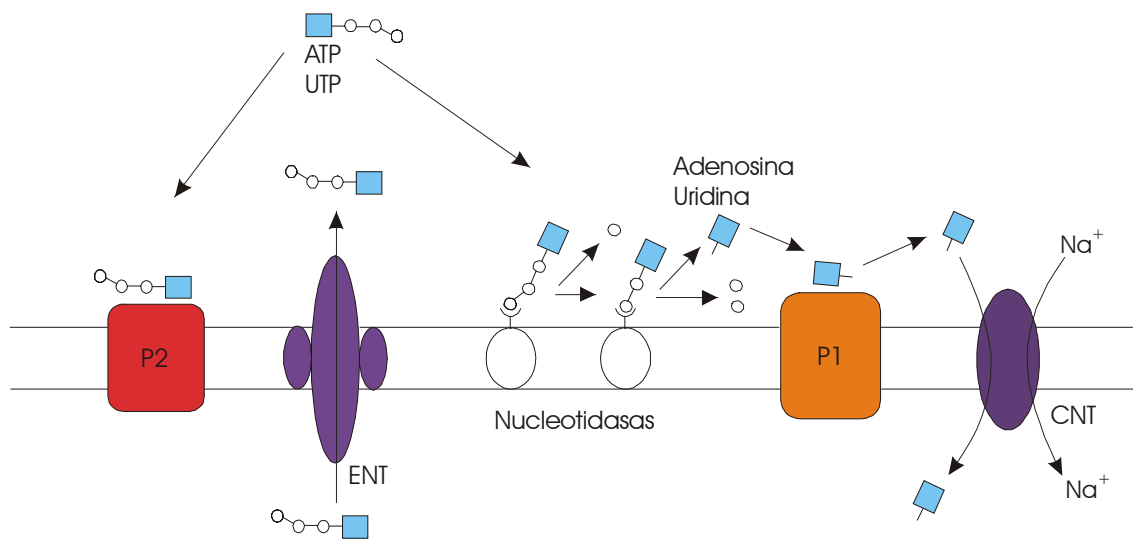
## 2.2. Regulación purinérgica

### 2.2.1. Generalidades

La señalización purinérgica está mejor definida en los modelos neuronales y en los músculos lisos que en las células epiteliales aunque puede ser muy relevante también en el parénquima hepático. Los receptores purinérgicos se activan por su unión específica a nucleótidos, nucleótidos o agonistas de nucleótidos y nucleósidos y contribuye al control del metabolismo celular, de la secreción, de la actividad de los canales iónicos y del volumen de la célula.

La mayoría de los modelos de señalización purinérgica depende de interacciones funcionales entre tres tipos de procesos (figura 5):

- La liberación de nucleótidos o nucleósidos por medio de algún tipo de transportador de membrana.
- La degradación del nucleótido por las nucleotidasas y la generación de metabolitos activos (nucleótidos y nucleósidos).
- La unión de los nucleósidos o nucleótidos extracelulares con los receptores purinérgicos, lo que provoca la transducción de señales específicas al interior de la célula.



**Figura 5. Vía de señalización purinérgica:** el ATP y el UTP extracelulares, liberados de la célula ante diferentes estímulos mediante los transportadores equilibrativos (ENT), pueden unirse a los receptores purinérgicos P2 o ser degradados por las nucleotidasas a nucleósidos. Los nucleósidos se unirán a los receptores purinérgicos P1 o entrarán en las células mediante los transportadores concentrativos (CNTs).

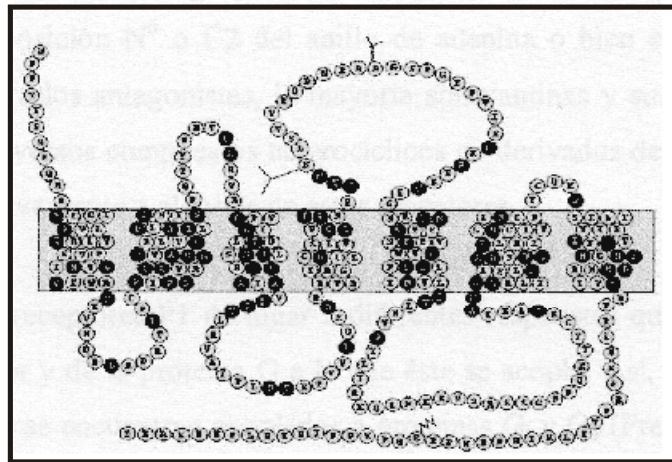
## 2.2.2. Los receptores purinérgicos

Estudios farmacológicos y fisiológicos permitieron clasificar los receptores purinérgicos en dos categorías principales: los receptores P1 y los receptores P2 (Burnstock et al., 1996). Los receptores P1 se unen preferentemente a la adenosina y modulan la actividad de la adenilato ciclasa, mientras los receptores P2 son más selectivos de ATP y modulan la actividad de la fosfolipasa C y la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . Se conocen cuatro tipos de receptores P1 ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  y  $A_3$ ) y catorce de tipo P2 (Fredholm et al., 1997). En esta tesis, centraremos nuestro interés particularmente sobre los receptores P1, dado que sus agonistas son nucleósidos como la adenosina y la inosina, sustrato de los transportadores de nucleósidos.

Nomenclatura	Proteína G acoplada	Agonistas	Antagonistas	Efectores acoplados
$A_1$	$G_{i/o}$	R-PIA=CPA>NECA>>CGS	DPCPX>XAC>>ZM	↓ AMPc ↑ $\text{IP}_3$ ↑ $\text{K}^+$ ↓ $\text{Ca}^{2+}$
$A_{2A}$	$G_s$	NECA>CGS>>R-PIA=CPA	ZM>>XAC>>DPCPX	↑ AMPc
$A_{2B}$	$G_s/G_q$	NECA>R-PIA=CPA>CGS	ZM>DPCPX>>XAC	↑ AMPc ↑ $\text{IP}_3$ ↑ $\text{Ca}^{2+}$
$A_3$	$G_i/G_q$	NECA>R-PIA>>CPA>>CGS	XAC>>DPCPX>ZM	↓ AMPc ↑ $\text{IP}_3$

**Tabla 1: Receptores P1 de adenosina**

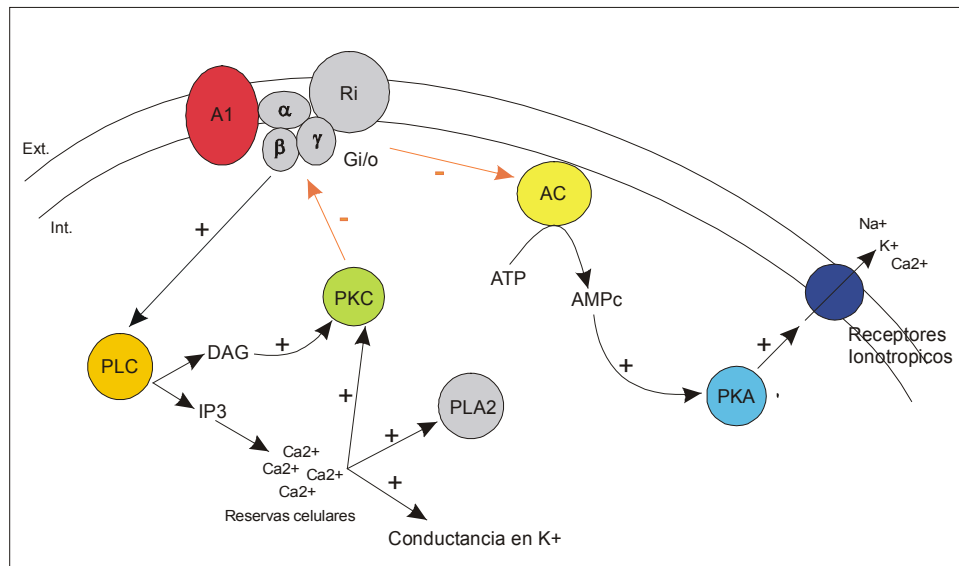
Los receptores P1 pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G y pueden activar distintos sistemas efectoros (tabla 1). Todos los subtipos de estos receptores han sido clonados en muchas especies diferentes. Son polipéptidos de 36 a 45 Kda con el extremo N-terminal extracelular, el extremo C terminal intracelular y siete segmentos transmembrana ( $\alpha$ -hélices de 21 a 28 amino ácidos) que dan lugar a tres bucles hidrofílicos extracelulares y tres citoplasmáticas. La homología de secuencia entre cada tipo de receptor es baja, oscila entre el 40% y el 60%, dependiendo del tipo de receptor y de la especie, y se concentra en los segmentos transmembrana. La unión del ligando al receptor tiene lugar a través de una cavidad en las zonas de los segmentos transmembrana, en el dominio extracelular.



**Figura 6: Estructura del receptor purinérgico A<sub>1</sub>.** En gris se muestran los aminoácidos conservados para los cuatro subtipos de receptores P1.

Los agonistas y antagonistas específicos de cada tipo de receptor han permitido la realización de estudios funcionales. Los agonistas y antagonistas tienen mayor afinidad y estabilidad que el ligando natural, la adenosina (Fredholm et al., 2001a, Fredholm et al., 2001b). Los receptores A<sub>1</sub> (figura 6), A<sub>2a</sub> y A<sub>3</sub> pueden activarse con concentraciones fisiológicas de adenosina mientras la activación del receptor A<sub>2B</sub> requiere concentraciones de adenosina patofisiológicas (Fredholm et al., 2001a). Los agonistas selectivos suelen ser derivados de adenosina sustituidos en posición N6 del anillo de adenina, como la CHA y la R-PIA. Otros se generan por una sustitución en C2, como la CCPA. Los antagonistas selectivos son, en su mayoría, derivados de la estructura de la xantina, como por ejemplo los derivados de sustituciones hidrofóbicas (fenil o cicloalquil) en posición 8 del anillo de xantina, como DPCPX o XAC.

La activación de los receptores P1 da lugar a diferentes respuestas que varían en función del tipo de receptor y de la proteína G a la que se acopla (tabla 1). La activación de los receptores A<sub>1</sub> (figura 7) acoplados a la proteína G<sub>i/o</sub> (Freissmuth et al., 1991; Munshi et al., 1991) produce una inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa (van Calker et al., 1978; Londos et al., 1980), una activación de la PLC (Gerwins et al., 1992), un incremento de la conductancia de K<sup>+</sup> (Belardinelli et al., 1983; Trussell et al., 1985) y una disminución en la conductancia de Ca<sup>2+</sup> (Dolphin et al., 1986; Scholz et al., 1991; Mogul et al., 1993). Por el contrario, una activación de los receptores A<sub>2A</sub> y A<sub>2B</sub> produce un incremento de la actividad de la adenilato ciclasa, una activación de la PLC y un incremento dependiente de IP<sub>3</sub> del Ca<sup>2+</sup> intracelular (Feoktistov et al., 1995). A<sub>2A</sub> está acoplado a la proteína G<sub>s</sub> (Daly et al., 1983) y A<sub>2B</sub> a las proteínas G<sub>s</sub> y G<sub>q</sub>. El receptor A<sub>3</sub> está acoplado a las proteínas G<sub>i</sub> y G<sub>q</sub> y, como el receptor A<sub>1</sub>, disminuye la actividad de la adenilato ciclasa y activa la PLC (Zhou et al., 1992; Palmer et al., 1995).



**Figura 7: Efectores acoplados al receptor de adenosina A<sub>1</sub>.**

## 2.3. Modulación de la regulación purinérgica

Como se deriva fácilmente de lo anterior, la regulación purinérgica juega un papel crucial en el control de múltiples procesos celulares, gracias, sobre todo, al gran número de sistemas efectores sobre los que puede activar. A continuación, se describen brevemente algunos de estos sistemas efectores.

### 2.3.1. Proteína quinasa C

La proteína quinasa C o PKC es una familia de isoenzimas multifuncionales que transduce las señales celulares que promueven la hidrólisis de lípidos. Se han descrito hasta el momento diez isotipos de PKC diferentes, cada isotipo tiene un rol distinto (Nishizuka et al., 1995). Este enzima de 80 kda es reclutado a la membrana plasmática por el diacilglicerol y, en muchos casos, por el calcio. El enzima es activado por diacilglicerol y fosfolípidos y se cree que sufre un cambio conformacional tras su incorporación a la membrana.

En cuanto a la regulación purinérgica, se sabe que los receptores A<sub>1</sub> estimulados activan la PLC y la PLD, vía las proteínas G (Gerwins et al., 1995; Abebe et al., 1998), produciendo una acumulación intracelular de DAG (Gerwins et al., 1995) provocando expresión y activación de la PKC (figura 7).

La PKC juega un papel muy importante en las señales de transducción y *crosstalk* intracelular, a través de la fosforilación de residuos de serina/treonina de proteínas diana que controlan el crecimiento y la diferenciación celular, entre las que se incluyen receptores, enzimas, proteínas contráctiles, factores de transcripción y otras quinasas.

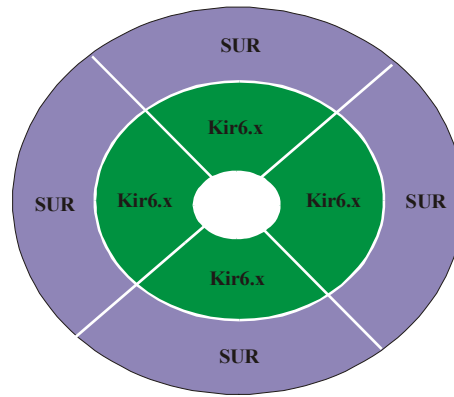
### **2.3.2. Proteína quinasa A**

La proteína quinasa A o dependiente de AMPc (PKA) es un enzima importante en la transducción de señales. Regula diferentes procesos celulares como el crecimiento y la diferenciación celular y también la conductividad de los canales iónicos, la liberación de neurotransmisores sinápticos, el metabolismo y la transcripción. Es una proteína heterotetramérica con dos subunidades catalíticas y dos reguladoras (que esconden la zona activa del enzima). El AMPc se une a las subunidades reguladoras, produciendo un cambio de conformación del enzima y la activación de las subunidades catalíticas, que podrán actuar fosforilando los residuos de serina y treonina de sus sustratos (Houslay et al., 2000).

### **2.3.3. Canales de potasio dependientes de ATP**

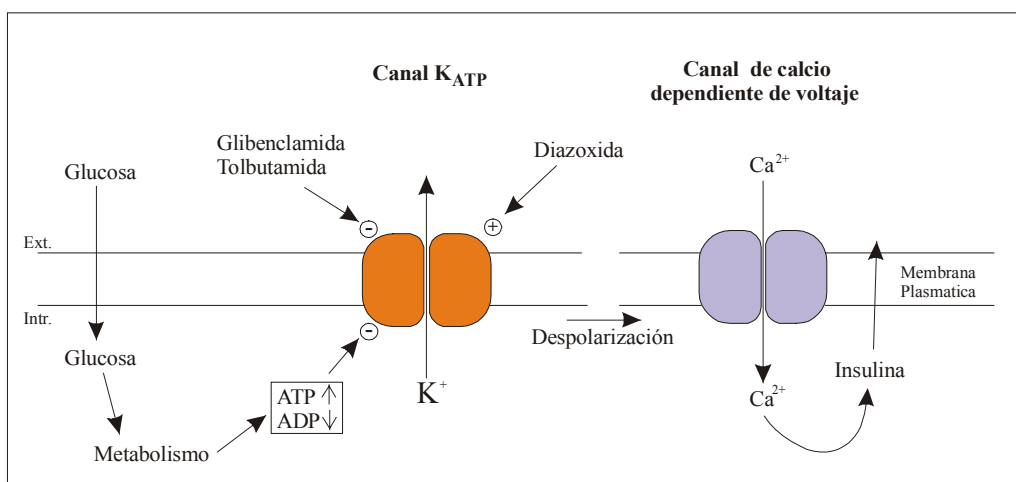
Los canales de potasio ATP dependientes ( $K_{ATP}$ ) permiten acoplar el estado metabólico de la célula con su potencial de membrana. Tienen un papel crucial en varias funciones celulares. Los canales  $K_{ATP}$  son hetero-octámeros (figura 8), compuestos de dos tipos de subunidades: las subunidades kir6.x (kir6.1 o kir6.2), que forman el poro, y las subunidades reguladoras, los receptores de sulfonilureas SUR (SUR1 o SUR2). Las subunidades kir6.x pertenecen a la familia de los canales de potasio *inward rectifier*; las subunidades SUR pertenecen a la superfamilia de las proteínas *ATP-binding cassette*. Se han podido reconstituir diferentes tipos de canales  $K_{ATP}$  correspondientes a diferentes combinaciones de Kir6.1 o Kir6.2 y SUR1, SUR2A o SUR2B, con distintas propiedades electrofisiológicas y sensibilidades diferentes a los nucleótidos y fármacos. El papel fisiológico y patofisiológico de los canales  $K_{ATP}$  ha sido estudiado mediante el uso de activadores e inhibidores de estos mismos canales (Seino et al., 2003).

Los canales  $K_{ATP}$  son dependientes de la relación  $[ATP]/[ADP]$  intracelular: cuando la concentración intracelular de ATP es superior a la concentración de ADP, el ATP intracelular inhibe estos canales uniéndose a las subunidades Kir6.x. Esta dependencia ATP/ADP permite a los canales  $K_{ATP}$  conectar el metabolismo con la excitabilidad, lo que puede ser muy relevante para muchas funciones fisiológicas como la secreción de insulina y la protección de las células durante los períodos de isquemia (Baukrowitz et al., 2000).



**Figura 8: estructura molecular de los canales  $K_{ATP}$**

En las células  $\beta$  del páncreas endocrino, la metabolización de la glucosa tiene como consecuencia el aumento del ATP intracelular y una disminución del ADP, induciendo así el cierre de los canales  $K_{ATP}$ , provocando la despolarización de la membrana, la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje y una entrada de  $Ca^{2+}$  en la célula que induce la liberación de insulina (Ashcroft et al., 1988; Cook et al., 1984). Algunos fármacos utilizados para la alteración de la secreción de la insulina tienen como diana los canales  $K_{ATP}$  (Sturgess et al., 1985; Trube et al., 1986). Las sulfonilureas como la tolbutamida o la glibenclamida, utilizadas en el tratamiento de la diabetes de tipo II porque activan la secreción de insulina, inhiben los canales  $K_{ATP}$ . Por el contrario, las sulfonamidas como la diazoxida, utilizadas para el tratamiento de la hiperinsulinemia porque inhiben la secreción de insulina, permiten la apertura de los canales (Loubatieres et al., 1966). Las sulfonilureas y las sulfonamidas ejercen una acción directa sobre el canal, a diferencia de la glucosa (figura 9).



**Figura 9: Papel de los canales  $K_{ATP}$  en el control de la secreción de insulina**

Los canales de potasio regulan el crecimiento y la proliferación de muchos tipos celulares como los linfocitos, adipocitos y células epiteliales (Wondergem et al., 1998; Woodfork et al., 1995). Henderson y colaboradores han encontrado corrientes de potasio con propiedades características de los canales  $K_{ATP}$  en hepatocitos (Henderson et al., 1989). Estas corrientes aumentan en presencia de activadores de los canales  $K_{ATP}$  (minoxidil y pinacidil) y están atenuadas en presencia de inhibidores como la glibenclamida (Malhi et al., 2000). Malhi y colaboradores destacaron de sus estudios electrofisiológicos que los canales  $K_{ATP}$  tienen un papel significativo en la regulación de la proliferación de las células parenquimales hepáticas (Malhi et al., 2000).

#### **2.3.4. El óxido nítrico**

El óxido nítrico (NO), descubierto por Furchgott y colaboradores (Furchgott et al., 1980), es un radical libre y un importante regulador de las funciones inmunitarias y de transducción de señal. El NO está implicado en muchas funciones fisiológicas como la vasodilatación, la neurotransmisión y las defensas inmunitarias (Jaffrey et al., 1995). El NO juega un papel crucial en la inflamación, en las respuestas a infecciones (Taylor et al., 1998) y en el metabolismo de la glucosa (Balon et al., 1994). Se han descrito relaciones entre la liberación del NO y la regulación purinérgica, particularmente en el fenómeno de isquemia. La producción de radicales libres durante la isquemia, como el NO y otros reactivos oxigenados aumenta la liberación de adenosina extracelular (Fallahi et al., 1996).

La síntesis de NO está catalizada por la familia de las óxido nítrico sintasas (NOS) a partir de L-arginina (Palmer et al., 1988). Se han encontrado tres isoformas de NOS: la NOS endotelial (eNOS), la neuronal (nNOS) y la inducible (iNOS) (Wang et al., 1995). La principal vía de señalización transducciona de NO pasa por su unión de alta afinidad al guanilato ciclasa soluble (Ignarro et al., 1982) activando así el enzima que aumenta la producción de cGMP (Murad et al., 1994). El NO reacciona con el oxígeno y el agua produciendo nitratos y nitritos.

Los hepatocitos producen NO, mediante los enzimas iNOS y eNOS. El NO es un regulador importante de las funciones del hepatocito; éste puede inhibir la síntesis de proteínas, mecanismo aparentemente dependiente del GMPc (Curran et al., 1991), y tiene un efecto inhibitorio sobre el metabolismo de los carbohidratos. Brass y colaboradores descubrieron que el donador del NO, S-nitroso-N-acetil-penicilamina (SNAP), inhibe la AMPc, la glicogenolisis hepática activada por glucagón y la gluconeogénesis (Brass and Vetter, 1993), de modo que el NO parece tener un control parcial en el metabolismo de la glucosa.



### 3. Los transportadores de nucleósidos

#### 3.1. Características funcionales de los transportadores de nucleósidos

Los sistemas de transporte de nucleósidos se han clasificado según sus características cinéticas y, por ahora se han descrito siete actividades de transporte diferentes. Estos transportadores se dividen en dos grandes categorías: los transportadores equilibrativos, independientes de sodio, que transportan los nucleósidos por difusión facilitada según el gradiente de concentración y los transportadores concentrativos, dependientes de sodio, que contribuyen a la acumulación de nucleósidos dentro de la célula (Griffith et al., 1996; Pastor-Anglada et al., 1998; Baldwin et al., 1999). En la tabla 2 se muestra la clasificación de estos transportadores.

	Transportadores de nucleósidos						
	Equilibrativos		Concentrativos				
	ei	es	N1	N2	N3	N4	N5
<b>Sodio-dependencia</b>	-	-	+	+	+	+	+
<b>Inhibiciones:</b>							
por NBTI	-	+	-	-	-	-	+
por dipiridamol (*)	+/-	+/-	-	-	-	-	+
<b>Sustratos:</b>							
adenosina	+	+	+	+	+	+	+ (**)
guanosina	+	+	+	-	+	+	+
formicina B	+	+	+	-	+	-	-
inosina	+	+	+	-	+	-	-
uridina	+	+	+	+	+	+	+
timidina	+	+	-	+	+	+	-
citidina	+	+	-	+	+	+	-

(\*): isoformas humana/rata

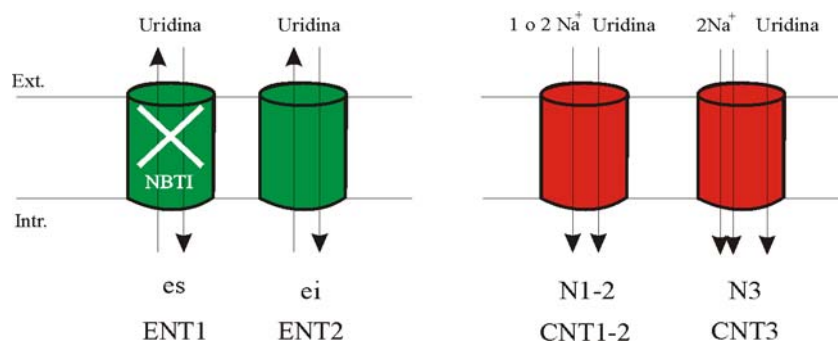
(\*\*): como inhibidor no como sustrato

**Tabla 2: Propiedades cinéticas de los transportadores de nucleósidos**

Los **transportadores equilibrativos** son proteínas que facilitan la difusión de los nucleósidos a través de la membrana plasmática, según su gradiente de concentración. Son independientes de sodio, transportan los nucleósidos de manera bi-direccional (figura 10) y presentan una amplia especificidad de sustratos, aceptando tanto las purinas como las pirimidinas. Existen dos sistemas de transportadores equilibrativos, uno sensible a la nitrobenziltioinosina o NBTI (*es*), que se inhibe con concentraciones del orden nanomolar, y otro insensible a NBTI (*ei*) que se inhibe sólo con concentraciones de NBTI superiores a 1  $\mu\text{M}$ . El NBTI es un análogo estructural de la adenosina y la cantidad de moléculas de NBTI que se une a los transportadores es

proporcional al grado de inhibición observado, con una estequiometría inhibidor/transportador de 1:1.

Existen otros tipos de inhibidores, como los agentes vasodilatadores dilazep, draflazina y dipiridamol, que afectan a los dos sistemas de transporte pero con más afinidad por el sistema *es* (rango del nM). Tanto el dipiridamol como el dilazep tienen la particularidad de inhibir de manera diferencial los transportadores de diferentes especies; pueden inhibir la actividad de transporte *es* y *ei* humanos y de otras especies, pero no de rata (Griffith et al., 1996; Sundaram et al., 1998). Los derivados 2-halogenados de adenosina (2-cloradenosina, 2-fluoradenosina) y la solufazina, análogo de la draflazina, son los únicos compuestos que tienen una afinidad superior por *ei* que por *es*. Se ha demostrado también que *ei*, pero no *es*, puede transportar nucleobases como la hipoxantina (Osses et al., 1996). La hipoxantina se produce de modo continuo a partir del catabolismo de los nucleótidos púricos y supone una fuente importante de recuperación, particularmente en las células de la médula ósea donde puede llegar a concentraciones de 30  $\mu\text{M}$  (Tattersall et al., 1983).



**Figura 10: cinética de los transportadores de nucleósidos**

*es* y *ei*: transporte equilibrativo y ENTs sus entidades moleculares

N: transporte concentrativo  $\text{Na}^+$  dependiente y CNTs sus entidades moleculares

Los **transportadores concentrativos de nucleósidos** se clasifican en función de su especificidad de sustrato (tabla 2). Son proteínas dependientes del gradiente transmembrana de sodio con una estequiometría  $\text{Na}^+$ /nucleósido de 2:1 para N3 y de 1:1 o 1:2 para los otros (figura 10). Recientemente dos grupos de investigación caracterizaron electrofisiológicamente la estequiometría  $\text{Na}^+$ /nucleósido del transportador hCNT1 pero, por un lado, Larrayoz y colaboradores encontraron una estequiometría  $\text{Na}^+$ /nucleósido de 2:1 (Larrayoz et al., 2004) y por otro lado, Smith y colaboradores una estequiometría  $\text{Na}^+$ /nucleósido de 1:1 (Smith et al., 2004).

N1, anteriormente llamado *cif*, sistema concentrativo insensible a NBTI y permeable a la formicina B, transporta nucleósidos púricos y uridina. N2, antes llamado *cit*, sistema concentrativo

insensible a NBTI y permeable a la timidina, transporta nucleósidos pirimidínicos y adenosina. N3 o *cib*, nombre debido a su amplia especificidad de sustrato, se caracteriza por tener una estioquometría  $\text{Na}^+$ /nucleósido de 2:1. N4 y N5 fueron descritos posteriormente en tipos celulares muy concretos. N4 fue caracterizado en vesículas de riñón humano (Gutierrez et al., 1993), acepta purinas y pirimidinas pero no formicina B ni inosina y es guanosina-preferente. N5 o *cgs* es el único sistema concentrativo inhibible por NBTI y dipiridamol. Fue descrito en células humanas NB4 de leucemia (Flanagan et al., 1997) y en linfocitos B humanos, en nuestro grupo (Soler et al., 1998). Actualmente parece probable que N4 y N5 sean variante polimórficas de alguno de los transportadores clonados de la familia CNT.

### **3.2. Características moleculares de los transportadores de nucleósidos**

#### **3.2.1. Características moleculares de los transportadores de nucleósidos concentrativos (CNTs)**

El primer transportador concentrativo se clonó en 1994, mediante la técnica de clonaje por expresión funcional en oocitos de *Xenopus laevis*. Es una aproximación basada en la actividad de transporte, ya que, por su baja proporción en relación al total de proteínas de membrana, no se pudo purificar directamente. Así, se aisló un cDNA de 2.4 Kb de epitelio de yeyuno de rata, correspondiente a la actividad de transporte N2 (Huang et al., 1994). Existían evidencias previas de la expresión funcional de N2 por microinyecciones de mRNA de mucosa intestinal de conejo (Jarvis et al., 1991) y de corteza renal humana (Gutierrez et al., 1994). El cDNA clonado, a partir de yeyuno de rata, codificaba una proteína transportadora de nucleósidos de 648 aminoácidos (71 kda), identificada como rCNT1 (*Concentrative Nucleoside Transporter 1*) y que correspondía a la actividad funcional N2. Este transportador se detectó inicialmente en riñón y yeyuno por técnicas de Northern-blot.

A partir de riñón humano y mediante clonaje por homología, se aisló una serie de cDNAs codificantes de las isoformas humanas de CNT1, denominadas hCNT1a y hCNT1b (Ritzel et al., 1997). hCNT1a tiene 650 aminoácidos con una homología de 83% con rCNT1. hCNT1a y hCNT1b tienen la misma actividad de transporte. La diferencia entre las dos isoformas podría ser la consecuencia de un polimorfismo génico. El gen de hCNT1 está localizado en el cromosoma 15q25-26.

En 1995, se clonó por expresión funcional en oocitos de *Xenopus laevis* otro sistema de transporte concentrativo y dependiente de sodio, expresado en hígado de rata, correspondiente a la actividad de transporte N1 (Che et al., 1995). Se obtuvo un cDNA de 2.9 Kb, llamado inicialmente

SPNT (*Sodium-dependent Purine-preferring Nucleoside Transporter*) y más tarde rCNT2 (*rat Concentrative Nucleoside Transporter 2*), que codifica una proteína de 659 aminoácidos (72 Kb). rCNT1 y rCNT2 tienen un 64% de sus aminoácidos homólogos. Por técnicas de Northern-blot, rCNT2 se identificó en hígado, yeyuno, bazo y corazón, y por RT-PCR, en cerebro (Anderson et al., 1996). Los dos transportadores rCNT1 y rCNT2 formarían parte de una misma superfamilia génica que incluyen algunos transportadores de nucleósidos bacterianos como NupC de *Escherichia coli* (Craig et al., 1994).

A partir de riñón humano y mediante las técnicas de clonaje por homología y RT-PCR, se aisló un cDNA correspondiente a la actividad N1, llamado hSPNT1 codificante de una proteína de 658 aminoácidos e idéntica en un 81% a la isoforma de rata rCNT2 (Wang et al., 1997b). Este cDNA se detectó en muchos tejidos humanos como riñón, corazón, hígado, intestino, músculo esquelético y páncreas.

SISTEMAS CONCENTRATIVOS							
CDNA	Tejido de origen	Metodo de clonaje	Tejido de expresión	Actividad de transporte	Sustrato (Km)	Inhibición (Ki)	Tamaño de la proteína
rCNT1	yeyuno de rata	Expresión	Yeyuno, riñón, hígado, cerebro	N2	U (37 µM) A (26 µM)	+++ U,T,C +++ A - G,I	648 aa (71 kDa)
hCNT1	riñón humano	Homología	riñón	N2	U (40-60 µM) T (6 µM) C (34 µM)	+++ U,T,C +++ A +++ dA(46 µM)	649 aa (71 kDa)
rCNT2	hígado de rata	Expresión	Hígado, bazo, yeyuno, riñón, corazón, cerebro, ...	N1	A (6 µM) T (13 µM) I (28 µM) U (20 µM)	+++ U +++ G,FB,I + T,C	659 aa (72 kDa)
hCNT2	intestino y riñón humano	Homología	Riñón, intestino, corazón, hígado, cerebro, pulmón, músculos esq., páncreas...	N1	U (80 µM) I (4,5 µM) A (8 µM) G (21 µM)	+++ U +++ G,I,A (6µM) +++ dA(30 µM) +++ FB - C,T,Hp	658 aa (72 kDa)
hCNT3	Células HL-60, glándula mamaria	Por BLAST	Yeyuno, traquea, páncreas, hígado, medula ósea, próstata, placenta, glándula mamaria...	N3	U (21.6 µM) C (15.4 µM) T (21.2 µM) A (15.1 µM) G (43 µM)	No determinado	698 aa
mCNT3	Hígado de ratón	por BLAST	No determinado	N3	No determinado	No determinado	703 aa

A:adenosina, T:timidina, C:citidina, G:guanósina, I:inosina, U:uridina, dA:desoxiadenosina, FB:formicina B, Hp:hipoxantina

**Tabla 3: Propiedades de los transportadores concentrativos de nucleósidos clonados**

Otros estudios permitieron el clonaje, a partir de intestino humano, de un transportador correspondiente a la actividad N1, denominado hCNT2 (Ritzel et al., 1997). hCNT2, como

hSPNT1, contiene 658 aminoácidos pero difieren en el residuo 75 (Arg por Ser), así que se pueden considerar como la misma isoforma. hCNT2 presenta una homología del 83% con rCNT2 y del 72% con hCNT1. El gen correspondiente a hCNT2 está localizado en el cromosoma 15q15. En ratón, se clonó por técnicas de PCR un cDNA de 2653 pb que codifica la isoforma mCNT2. Su secuencia proteica tiene una homología del 93 y del 80% con rCNT2 y hCNT2 respectivamente. El gen de mCNT2 se encuentra en el cromosoma 2e3 del ratón y mide 13.7 Kb (Patel et al., 2000).

La actividad N3 se describió en plexo coroideo de conejo (Wu et al., 1992), en oocitos de *Xenopus laevis* micro inyectados con mRNA de yeyuno de rata (Huang et al., 1993) y en células neoplásicas (Belt et al., 1993). De estos estudios se identificaron unos ESTs (*Expressed Sequences Tags*) que codifican para regiones correspondientes al extremo C terminal de un CNT humano, diferente de hCNT1 y hCNT2. El cDNA completo se obtuvo por técnicas de 5'-RACE y RT-PCR a partir de las células HL-60 diferenciadas con ésteres de forbol y de glándula mamaria, fuentes de actividad N3. Este cDNA codifica una proteína de 691 aminoácidos (77 kDa) correspondiente a hCNT3. A partir de glándulas mamarias de ratón, del cDNA de hCNT3 y de ESTs correspondientes al extremo C terminal de la isoforma de ratón y de la misma manera que para hCNT1 (por técnicas de 5'-RACE y RT-PCR), a partir de hígado, se encontró el cDNA entero codificante de mCNT3, proteína de 703 aminoácidos (Ritzel et al., 2001a; Ritzel et al., 2001b). hCNT3 presenta poca similitud de secuencia con hCNT1 y hCNT2 (48 y 49 % aminoácidos respectivamente).

La estructura de la proteína rCNT1 propuesta inicialmente tenía catorce dominios transmembrana, tres posibles lugares de N-glicosilación, cuatro de O-glicosilación y cuatro puntos presumiblemente fosforilables por la PKC. La estructura de la proteína rCNT2 es muy parecida a la de rCNT1, aunque con cinco posibles lugares de N-glicosilación, diversos puntos presumiblemente fosforilables por la PKC y PKA y un motivo de unión ATP/GTP en el extremo N terminal. Los dominios estructurales involucrados en la unión de los sustratos y los determinantes moleculares de las diferencias al nivel de selectividad de transporte fueron identificados mediante una generación de quimeras realizadas a partir de los clones de rCNT1 y rCNT2 (Wang et al., 1999a). La sustitución de los dominios transmembrana 8-9 de la isoforma rCNT1 por los de la isoforma rCNT2, transforma rCNT1 de transportador pirimidina-preferente a purina-preferente. Si se sustituye únicamente el dominio 8, la quimera muestra una amplia especificidad de sustrato y tiene una actividad parecida a la de N3 (Wang et al., 1997a) pero con una estequiometría sodio/nucleósido de 1:1. El dominio 8 de rCNT1 y rCNT2 se diferencian en 5 aminoácidos. La sustitución de cada aminoácido, uno por uno, ha permitido la identificación de los residuos críticos en la selectividad de los sustratos. Sólo uno de los 5 residuos parece estar implicado en la especificidad de sustrato, ya que si se sustituye la Ser<sup>318</sup> por la Gly equivalente de rCNT2, en rCNT1, este último pierde su afinidad por los nucleósidos pirimidínicos. La Gln<sup>319</sup> adyacente parece

contribuir a la modulación de la afinidad aparente del transportador (Wang et al., 1999b). Son los mismos aminoácidos responsables de la especificidad de sustrato en las isoformas humanas. Así, la sustitución de la Ser<sup>319</sup> de hCNT1 por la Gly<sup>313</sup> equivalente en hCNT2, convierte la actividad N2 en actividad N3. Un cambio adicional de la Ser<sup>353</sup> en el dominio transmembrana 8 de hCNT1, por la Thr<sup>347</sup> de hCNT2, convierte la nueva actividad N3 en actividad N1. La sustitución de los residuos Gln<sup>320</sup> y Leu<sup>354</sup> en hCNT1 por los equivalentes en hCNT2 produce un aumento de la actividad de transporte (Loewen et al., 1999).

Con la generación de anticuerpos contra las isoformas rCNT1 y rCNT2, la topología de los transportadores concentrativos estudiados cambia. El estudio por Western blot de membranas de oocitos inyectados con mRNA de rCNT1 indica un aumento después de un tratamiento con endoglicosidasa-F, indicador de al menos una N-glicosilación. Considerando los lugares hipotéticos de N-glicosilación de rCNT1, en una disposición correcta, el dominio carboxilo terminal tiene que ser extracelular, por lo que rCNT1 no tendrá 14 sino 13 dominios transmembrana (Hamilton et al., 2001), por lo que el ultimo modelo propuesto para rCNT1 tiene 13 dominios transmembrana, un extremo N-terminal citoplasmático y un extremo C-terminal extracelular (figura 11).

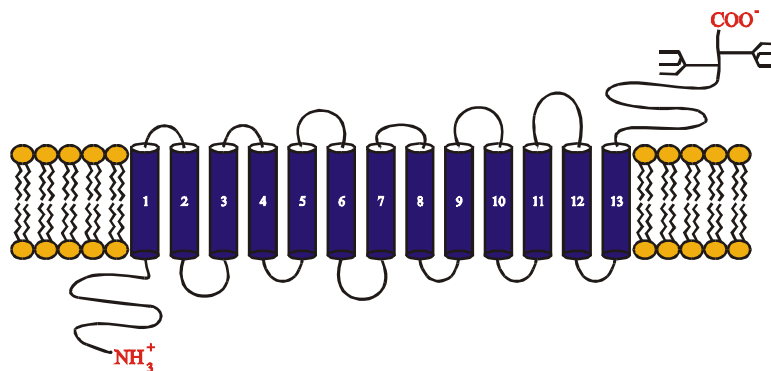


Figura 11: Estructura molecular de la familia génica de los transportadores concentrativos de nucleósidos (CNTs).

### 3.2.2. Características moleculares de los transportadores de nucleósidos equilibrativos (ENTs)

El estudio de las características moleculares de los sistemas equilibrativos de transporte de nucleósidos empezó antes de su clonaje. Uno de los tipos celulares más utilizados para este estudio son los eritrocitos humanos por su fácil aislamiento. El sistema de transporte descrito en estas células corresponde a un sistema equilibrativo de difusión facilitada, independiente del gradiente de sodio y sensible a NBTI (actividad *es*). A partir de la información sobre la secuencia en

aminoácidos del transportador *es* en eritrocitos, obtenida por purificación parcial de la proteína utilizando las propiedades de unión con NBTI (Jarvis et al., 1981), se aisló un cDNA de placenta humano, que codifica para una proteína de 456 aminoácidos (50 kDa) denominada hENT1 (*human Equilibrative Nucleoside Transporter 1*) que presenta todas las características de la actividad de transporte *es*.

SISTEMAS EQUILIBRATIVOS							
ADNc	Tejido de origen	Método de clonaje	Tejido de expresión	Actividad de transporte	Sustrato (Km)	inhibición (Ki)	Tamaño de la proteína
rENT1	yeyuno de rata	Homología	Yeyuno, hígado	<i>es</i>	U (0,15 mM)	+++ U,T,C +++ A,G,I +++ NBTI	457 aa (50 kDa)
hENT1	placenta humano	actividad de unión con NBTI	eritrocitos, hígado corazón, placenta, pulmón, colón...	<i>es</i>	U (0,24 mM) A (40 µM) G (0.14 mM) C (0.58 mM) T (0.3 mM) I (52.5 µM)	+++ U,T,C +++ A,G,I +++ NBTI	456 aa (50 kDa)
rENT2	yeyuno de rata	Homología	Hígado	<i>ei</i>	U(0,30 mM)	+++ U,T +++ A,G,I ++ C - NBTI	456 aa (50 kDa)
hENT2	a) placenta humana y b) células HeLa	a) Homología y b) complem. génica	Riñón, intestino, corazón, hígado, cerebro, pulmón, páncreas...	<i>ei</i>	U (0,25 mM) A (0,1 mM) T (0.71 mM) C (5.61 mM) I (50 µM)	+++ U,A,T,I ++ G,C,Hp +/- NBTI - nucleobases	456 aa (50 kDa)

A:adenosina, T:timidina, C:citidina, G:guanosa, I:inosina,U:uridina, Hp:hipoxantina

**Tabla 4: propiedades de los transportadores equilibrativos de nucleósidos clonados**

hENT1 se expresa en muchos tejidos de todas las especies estudiadas (Griffiths et al., 1997a) y se han identificado ortólogos en una gran variedad de eucariotas, como levaduras, hongos, nematodos, plantas, mamíferos y también en protozoos parásitos. El gen de hENT1 está situado en el cromosoma 6p21.1-p21.2 b en humano (Coe et al., 1997).

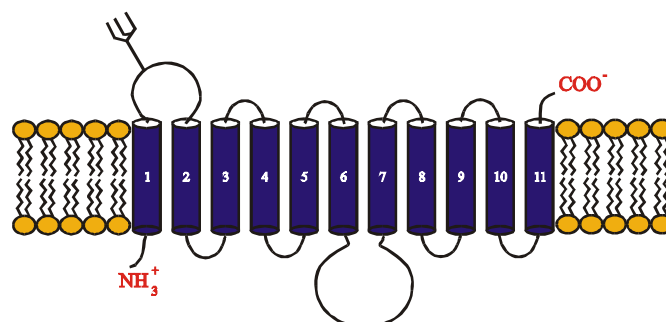
Posteriormente, se clonaron y caracterizaron funcionalmente los dos transportadores rENT1 y rENT2 (Yao et al., 1997). Los cDNA se caracterizaron por homología y expresión funcional en oocitos de *Xenopus*. El cDNA correspondiente a rENT1 se aisló en pulmón, en yeyuno y en hígado de rata y codifica una proteína de 457 aminoácidos (50 kDa). rENT1 presenta un 78% de homología con la secuencia en aminoácidos de su homólogo humano. El cDNA codificante del transportador

rENT2 de 456 aminoácidos, fue aislado en yeyuno de rata, tiene un 49% y 50% de homología con rENT1 y hENT1 respectivamente.

hENT2 fue clonado de manera simultánea por dos grupos de investigación diferentes. Por técnicas de homología y expresión funcional en oocitos (Griffiths et al., 1997b) se aisló un primer cDNA de placenta humana codificante para hENT2. El otro se obtuvo por complementación funcional en una sub-línea mutada de leucemia humana CEM, deficiente en el transporte de nucleósidos (Crawford et al., 1998). hENT2 es una proteína de 465 aminoácidos con una homología con hENT1 del 46-50%, se expresa en placenta, corazón, cerebro y ovario. En el año 2000, se clonaron las isoformas mENT1 y mENT2 de los transportadores equilibrativos (Kiss et al., 2000).

Recientemente, se han identificado dos nuevas isoformas denominadas ENT3 y ENT4 en tejidos humanos y de ratón (Hyde et al., 2001; Baldwin et al., 2004). hENT3, de 475 residuos, presenta una baja homología con hENT1 (29%) en contrapartida con la isoforma murina mENT3 (74%). Tanto hENT3 y mENT3 se caracterizan por presentar una región amino terminal extensa y muy hidrofílica. Su expresión es abundante en placenta, tejido a partir del cual fue clonado. hENT4, de 530 residuos, presenta una homología del 86% con su ortólogo murino (Acimovic and Coe, 2002). Ambas isoformas presentan una ubicación intracelular, no obstante, y hasta la fecha, se desconocen las características cinéticas y funcionales de estos dos transportadores clonados recientemente.

hENT1 presenta 11 dominios transmembrana conectados por regiones hidrofílicas cortas y dos *loops* más grandes situados entre los dominios transmembrana 1-2 (que parecen contener 3 posibles sitios de N-glicosilación) y 6-7 (figura 12). La topología de rENT1 y rENT2 (Yao et al., 1997) es similar a la de hENT1 pero con un *loop* extracelular más corto (14 aminoácidos menos), un *loop* intracelular más largo (14 aminoácidos más) y dos únicos sitios potenciales de N-glicosilación (figura 12).



**Figura 12: Estructura molecular de la familia génica de los transportadores equilibrativos de nucleósidos (ENTs).**



De la misma manera que para los CNTs, se generaron quimeras de los ENTs para determinar los dominios responsables de la especificidad de sustrato de los transportadores. En el caso de la actividad *es*, se pudo aprovechar el uso de los inhibidores, como el NBTI, que comparten los mismos requisitos estructurales que los sustratos naturales. Las regiones presumiblemente involucradas en la translocación de los nucleósidos se sitúan entre los dominios transmembrana 3 y 6 (Sundaram et al., 1998; Sundaram et al., 2001). La sustitución de la Gly154 de hENT1 por el residuo equivalente de hENT2 no afecta la actividad de transporte pero provoca la pérdida de la sensibilidad al NBTI. El proceso contrario no sensibiliza hENT2, por lo que otros residuos, aparte de la Gly154, participan en la sensibilidad diferencial de *es* y *ei* a NBTI (Hyde et al., 2001).

### 3.3. Especificidades de los transportadores de nucleósidos

La mayoría de las células animales combinan diversos sistemas de transporte de nucleósidos. Las entidades equilibrativas fueron las primeras en ser caracterizadas y son todavía más estudiadas que las concentrativas. El transporte concentrativo se estudiaba básicamente en los epitelios especializados. Ahora se sabe que ambos tipos de sistema presentan una amplia distribución tisular en muchos tipos celulares normales y tumorales. De hecho, parece que existe un cambio en la dotación de estos sistemas de transporte cuando la célula normal se transforma en tumoral. Por ejemplo, se ha descrito que muchas células neoplásicas humanas expresan mayoritariamente una actividad *es*, mientras que las correspondientes células no transformadas expresan una actividad concentrativa (Belt et al., 1993). Recientemente, mediante inmunohistoquímicas sobre *arrays* de tejidos ginecológicos tumorales se analizó la expresión de los transportadores de nucleósidos hENT1, hENT2 y hCNT1 con anticuerpos caracterizados en nuestro grupo por la doctoranda Elena Guillén (Farré et al., in press). En los tres tipos de tumores estudiados, hCNT1 es la isoforma que más pierde su expresión. Este cambio de dotación entre actividades de transporte ha permitido diferentes estudios con finalidad quimioterapéutica.

### 3.4. Los transportadores de nucleósidos en hepatocitos

En 1978, se descubrió, estudiando el transporte de timidina en hepatocito, una primera evidencia de la actividad de un sistema de transporte concentrativo, dependiente de sodio, en hígado (Ungemach et al., 1978). Este transporte de timidina  $\text{Na}^+$ -dependiente parecía insensible a la mayoría de los nucleósidos. En 1984, Wu y Young identificaron la presencia de un sistema de transporte sensible a NBTI en vesículas de membrana plasmática de hígado de rata y cobayo (Wu and Young, 1984). Basaron sus estudios en el análisis de la unión del transportador con NBTI. Plagemann y Wohlueter descubrieron, en hepatocitos de rata, la existencia de sitios de unión de

alta afinidad a NBTI asociados a un transporte de uridina sensible a NBTI (Plagemann and Wohlueter, 1985).

Más tarde y casi simultáneamente, tres grupos de investigación describieron la presencia de sistemas de transporte  $\text{Na}^+$ -dependientes en vesículas de membrana plasmática de hígado de rata (Moseley et al., 1991; Ruiz-Montasell et al., 1992; Che et al., 1992). El hígado, órgano clave del metabolismo de los nucleósidos, es muy eficiente en la extracción de nucleósidos de la sangre generando así altas concentraciones intracelulares de nucleósidos (Gasser et al., 1981; Holstege et al., 1991; Holstege et al., 1992). En nuestro grupo, Ruiz-Montasell caracterizó cinéticamente la actividad de los transportadores de nucleósidos en vesículas de membrana plasmática de hígado de rata, utilizando uridina como sustrato (Ruiz-Montasell et al., 1992). El principal agente responsable de la entrada de nucleósidos en estas membranas era un sistema de transporte concentrativo  $\text{Na}^+$ -dependiente. El transporte analizado era electrogénico y con una estequiometría aparente  $\text{Na}^+$ /nucleósido de 1:1. En este estudio, como en los de Moseley y Che (Moseley et al., 1991; Che et al., 1992), el transporte no se inhibía con NBTI, lo que contradecía los estudios de Plagemann (Plagemann et al., 1985) y Wu (Wu et al., 1984). Existe la posibilidad de que los componentes sensibles a NBTI puedan perderse durante el proceso de aislamiento de las membranas, ya que las preparaciones de membranas purificadas no preservan de manera segura todas las funciones biológicas de las proteínas. El sistema o los sistemas de transporte concentrativos descritos dan una  $K_m$  para uridina y guanósina de 6-12 y 8-14  $\mu\text{M}$  respectivamente, valores en el rango de las concentraciones fisiológicas de nucleósidos (Darnowski et al., 1987).

En nuestro grupo, Mercader et al. exploraron las características de la entrada de uridina dependiente e independiente de sodio en hepatocitos de rata aislados (Mercader et al., 1996). Los hepatocitos tienen una actividad de transporte de uridina  $\text{Na}^+$ -dependiente similar a la descrita en vesículas de membrana plasmática de hígado. Estudios con inhibidores revelan que los hepatocitos expresan más de un sistema de transporte  $\text{Na}^+$ -dependiente. Esta evidencia se basa en dos hechos: (1) la curva de la actividad de transporte  $\text{Na}^+$ -dependiente de uridina inhibida por concentraciones crecientes de inosina es bifásica; (2) la entrada concentrativa de uridina en la célula no se bloquea totalmente con concentraciones altas de guanósina y tampoco con concentraciones altas de timidina. Los autores se refieren a dos sistemas de transporte concentrativos con afinidades similares por la uridina, uno preferente de purinas y otro preferente de pirimidinas.

Además de los transportadores  $\text{Na}^+$ -dependientes, existe un sistema de transporte  $\text{Na}^+$ -independiente responsable del transporte de una fracción significativa de nucleósidos en hepatocitos. Este último sistema es altamente resistente a la inhibición con NBTI. Sin embargo, en las mismas condiciones, las líneas celulares de hepatoma humano HepG2 y de hepatoma de rata

Fao tienen una actividad de transporte  $\text{Na}^+$ -independiente más importante y sensible a NBTI (Mercader et al., 1996). Existe la posibilidad de que durante el aislamiento de los hepatocitos con colagenasa, las proteínas de transporte pierdan algunas propiedades, como su sensibilidad a NBTI.

Che y colaboradores aislaron un cDNA, en hígado de rata, que codifica un transportador concentrativo  $\text{Na}^+$ -dependiente y purina preferente correspondiente a rCNT2 (Che et al., 1995). Después, en nuestro grupo, Felipe y colaboradores clonaron en hígado de rata, por homología mediante PCR, una segunda isoforma de transportadores concentrativos  $\text{Na}^+$ -dependiente pirimidina preferente que parecía corresponder a rCNT1 (Felipe et al., 1998), proteína ya detectada en yeyuno y riñón de rata (Huang et al., 1994).

La generación de los anticuerpos rCNT1 y rCNT2 permitieron corroborar la presencia de estos dos transportadores en hígado. Las isoformas rCNT1 y rCNT2 parecen tener localizaciones subcelulares diferentes en hígado. Se observó en membranas basolaterales de hígado de rata un enriquecimiento en proteínas rCNT2 y una pérdida de rCNT1, en comparación con el homogenado total de hígado (Felipe et al., 1998). Las dos isoformas se diferencian también en su movilidad electroforética.

La generación de sondas de cDNA de rENT1 y rENT2 en nuestro laboratorio y análisis por Northern blot permitieron la detección del mRNA de estas isoformas en hígado de rata (del Santo et al., 1998). Sin embargo, estos resultados no coinciden con la actividad funcional del transporte equilibrativo insensible a NBTI caracterizado. La diferencia entre la actividad biológica medida y el nivel de mRNA detectado se podría explicar por la presencia de un control post-transcripcional de los genes de los transportadores rENT1 y rENT2.

### **3.5. Regulación de los transportadores de nucleósidos**

#### **3.5.1. Regulación de los transportadores de nucleósidos en hígado y en células epiteliales**

Las células parenquimales ejercen un papel muy importante en la inter-conversión de los nutrientes que llegan al hígado, desde la vena porta. Los transportadores de membrana plasmática son los responsables de la entrada de los nutrientes desde la sangre aferente. Estos sistemas de transporte son regulados por factores endocrinos y nutricionales

En la mayoría de las células, transporte y metabolismo están acoplados de manera que la concentración citosólica sea baja, por lo que los transportadores más involucrados suelen ser de tipo equilibrativo (Plagemann et al., 1988). Una de las particularidades del hígado está en el hecho de

que tiene concentraciones de nucleósidos intracelulares más altas que en sangre (Darnowski et al., 1987), así que los transportadores concentrativos quizás juegan un papel más importante en el hígado que en otros órganos.

#### **- Regulación endocrina:**

En nuestro grupo, Gomez-Angelats y colaboradores analizaron la regulación de la actividad de transporte  $\text{Na}^+$ -dependiente por el glucagón y la insulina en hepatocitos de rata (Gomez-Angelats et al., 1996). El glucagón produce una estimulación transitoria de la entrada de uridina  $\text{Na}^+$ -dependiente, efecto mimetizado por el dibutilil AMP cíclico, agente inductor de la hiperpolarización de la membrana. La insulina también provoca la activación, del transporte concentrativo de uridina en la célula, de manera estable en la membrana plasmática. Esta inducción concuerda con un mecanismo de regulación que implica la síntesis y la inserción de transportadores en la membrana. En conclusión, la actividad de transporte de nucleósidos está bajo dos tipos de regulación hormonal, una regulación a corto plazo que podría implicar la despolarización de la membrana y una regulación a largo plazo en relación con la síntesis *de novo* de proteínas de transporte (Ferrer-Martinez et al., 1995).

#### **- Regulación del transporte de nucleósidos durante el crecimiento celular:**

Después de una hepatectomía parcial, en la fase pre-replicativa, la actividad de los transportadores concentrativos está estimulada. Esta inducción, detectada en vesículas de membrana plasmática de hígado de rata (Ruiz-Montasell et al., 1993), está asociada con una acumulación de mRNA de rCNT2 (Felipe et al., 1997). Del Santo y colaboradores analizaron una posible relación entre la expresión de los diferentes sistemas de transporte de nucleósidos y la proliferación celular *in vivo*, tras una hepatectomía parcial, e *in vitro*, por proliferación sincronizada de la línea celular Fao. Durante la proliferación el nivel de mRNA de CNT2 aumenta y la actividad de este transportador está inducida en células parenquimales como en células Fao. La línea celular Fao, a diferencia de los hepatocitos, expresa de manera significativa los transportadores equilibrativos rENT1 y rENT2. La isoforma ENT2 parece inducirse durante la fase de crecimiento del hígado, con acumulación de su mRNA (del Santo et al., 1998), lo que contrasta con el nivel de mRNA de ENT1 que, en las mismas condiciones, no varía. Después de una hepatectomía parcial, se detectó también un aumento de los niveles proteicos de CNT1 (Felipe et al., 1998).

Recientemente, en nuestro grupo, Fernández-Veledo y colaboradores trataron de identificar agentes reguladores fisiológicos responsables de la expresión proteica de CNT1 (Fernández-Veledo et al, in press). Descubrieron un efecto inductor de dos citoquinas,  $\text{TNF}\alpha$  (Tumor Necrosis Factor

$\alpha$ ) e IL6 (Interleukin-6) sobre la expresión proteica de CNT1, tanto en hepatocitos como en Fao, que actuaban por mecanismos distintos. TNF $\alpha$  e IL6 son dos reguladores bien caracterizados del proceso de “*priming*” de los hepatocitos, que promueven la inducción de la proliferación de factores de crecimiento, tales como EGF, HGF y TGF $\alpha$  (Michalopoulos et al., 1997).

En nuestro grupo también, la doctoranda Ivette Aymerich está estudiando la regulación de los transportadores de nucleósidos después de exponer células epiteliales intestinales de rata (IEC-6) a agentes de proliferación como EGF y TGF- $\alpha$ . Una estimulación de la proliferación celular induce la actividad de transporte de nucleósidos equilibrativa (sobre todo la de ENT1). En el intestino, los transportadores equilibrativos están situados en la membrana basolateral (Mangravite et al., 2003), así que son los transportadores más adecuados por la recuperación de los nucleósidos necesarios a la proliferación celular en el flujo sanguíneo.

### **- Regulación del transporte de nucleósidos y diferenciación celular:**

La actividad de transporte de nucleósidos en células de hepatoma, células muy poco diferenciadas suele ser más alta que en hepatocitos, sin embargo las células Fao tienen una actividad de transporte Na<sup>+</sup>-dependiente más baja. También tienen un nivel más bajo en mRNA de rCNT2 pero niveles de mRNA de rENT1 y rENT2 más altos que en hepatocitos. Así pues, la transformación celular aparece asociada a cambios de expresión de los sistemas de transporte. En células de hepatoma humano HepG2, como en la línea celular Fao, la actividad de transporte de uridina medida es sobre todo Na<sup>+</sup>-independiente de tipo *es*, actividad dependiente de la densidad celular y poco modulable por hormonas pancreáticas y por privación de suero (Pastor-Anglada et al., 1998). Esta baja capacidad de regulación nos sugiere que la expresión de los transportadores equilibrativos de nucleósidos en células de hepatoma es constitutiva.

Con el objetivo de estudiar la posibilidad de que la expresión de CNT1 y CNT2 sea dependiente del estado de proliferación y de diferenciación celular en hígado, del Santo y colaboradores (del Santo et al., 2001) analizaron la actividad y la expresión de estos transportadores en hepatocitos fetales y neonatales. Los hepatocitos fetales y neonatales tienen una actividad Na<sup>+</sup>-dependiente y un nivel de expresión de CNT1 y CNT2 más bajo que en los hepatocitos adultos. Al igual que la línea celular Fao, los hepatocitos fetales expresan de manera significativa el transportador equilibrativo de tipo *es*, a diferencia de los hepatocitos neonatales y adultos. Por otra parte, del Santo y colaboradores utilizaron una combinación de dexametasona y T3, agentes inductores de la diferenciación celular, en hepatocitos fetales. El resultado fue una inducción de la actividad de transporte Na<sup>+</sup>-dependiente seguida de un aumento proteico y de mRNA de CNT2 pero

no de CNT1 y tampoco de ENT1. La expresión de ENT1 parece estar regulada diferencialmente durante el desarrollo y la expresión de CNT2 es dependiente del ciclo celular.

De la misma manera, para determinar si CNT1 y CNT2, en intestino, se regulan diferencialmente durante el desarrollo, Ngo y colaboradores estudiaron la actividad de estos transportadores en vesículas de intestino fetal humano. La actividad medida, en intestino fetal, era más baja que en intestino adulto pero el gradiente de actividad de CNT1 y CNT2 observado en adulto, se encuentra en intestino fetal (Ngo et al., 2001). En nuestro grupo, Ivette Aymerich estudió la regulación de los transportadores de nucleósidos después de exponer células epiteliales intestinales de rata (IEC-6) a agentes de diferenciación como los glucocorticoides. Descubrió que en intestino, los glucocorticoides inducen la actividad y la cantidad de mRNA de los transportadores de nucleósidos dependiente de sodio CNT1 y CNT2, mientras no parecen afectar la actividad de transporte equilibrativo.

### **- Regulación nutricional**

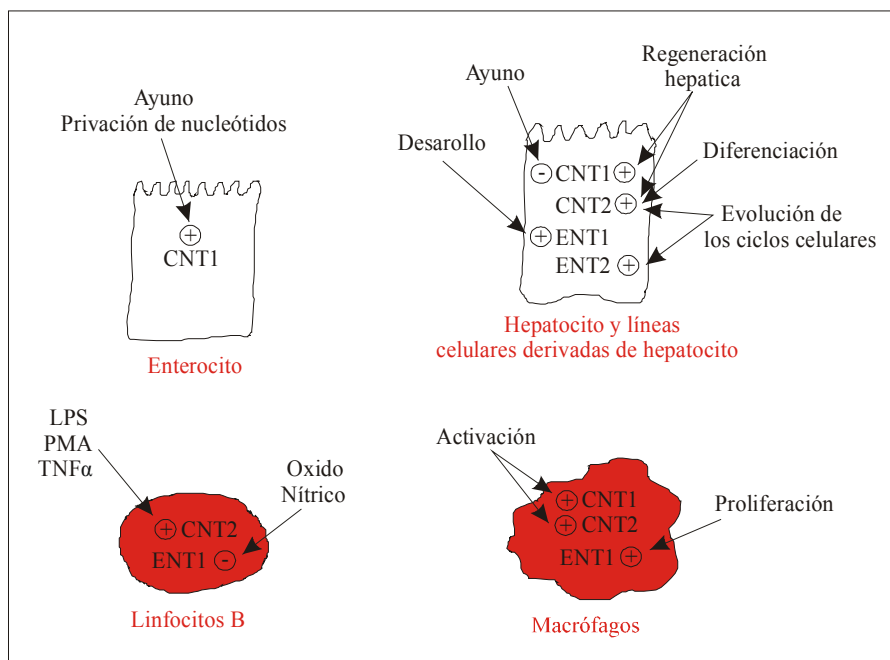
Los nucleótidos suministrados por la dieta se presentan mayoritariamente como nucleoproteínas sobre las cuales actúan enzimas proteolíticas del jugo gástrico y pancreático, encargados de liberar los ácidos nucleicos. Éstos son degradados por la acción de ribonucleasas, desoxiribonucleasas, fosfodiesterasas y nucleotidasas generando en última instancia una mezcla de nucleósidos y bases libres. Cerca del 90% de los nucleósidos y nucleobases de la dieta son captados a través de los correspondientes sistemas de transporte, fundamentalmente en la región proximal del intestino. A partir de aquí, una gran parte de estos sustratos son degradados dentro del mismo enterocito y los productos resultantes del catabolismo son excretados o, en un pequeño porcentaje, incorporados. Parece ser, sin embargo, que durante procesos de crecimiento rápido y alimentación limitada, su retención en los diferentes tejidos se ve incrementada (Kolassa et al., 1977; Sonoda y Tatibani, 1978; Salati et al., 1984). Dentro de este contexto, se podría pensar que los transportadores de nucleósidos estén involucrados en el proceso de absorción, así como en su modulación por asequibilidad de sustrato

Los nucleótidos y nucleósidos extracelulares modulan tanto el crecimiento como la regeneración hepática (Ohyanagi et al., 1989). Tras agresiones o lesiones del hígado, la biosíntesis de nucleótidos a través de las vías de novo y de recuperación se activa y el flujo de nucleósidos hacia el interior celular se ve incrementado, favoreciendo la regeneración del tejido. Estudios realizados en ratas sometidas a lesión hepática o hepatectomía parcial indican como la administración parenteral de una mezcla de nucleótidos y nucleósidos aumenta las funciones del órgano (Ogoshi et al., 1985; Ogoshi et al., 1989).

En nuestro grupo, Valdés y colaboradores realizaron estudios de regulación de los transportadores de nucleósidos en ratas sometidas a diferentes dietas. Después de un ayuno de 48 horas, las ratas tienen un nivel proteico en CNT1 más alto en yeyuno y más bajo en hígado que las ratas control. En consecuencia, la actividad de CNT1 en vesículas de membrana *brush borders* de yeyuno es mayor en ratas en ayuno que en ratas alimentadas. Este efecto es mimetizado al administrar a las ratas dietas libres en nucleósidos (Valdés et al., 2000). Estos resultados ponen de manifiesto una regulación nutricional de CNT1 específica del tejido y dependiente del sustrato.

### 3.5.2. Regulación de los transportadores de nucleósidos en células del sistema inmunitario

El sistema inmunitario está constituido por una familia heterogénea de tipos celulares con funciones altamente específicas, que son activadas y que proliferan según las necesidades funcionales. En nuestro grupo se ha estudiado dos modelos de este sistema, los linfocitos B humanos y los macrófagos murinos de la médula ósea (Pastor-Anglada et al., 2001). Al no poder sintetizar *de novo* los nucleótidos, necesitan más nucleósidos exógenos para responder a sus necesidades metabólicas.



**Figura 13: Regulación de los transportadores de nucleósidos en células epiteliales de yeyuno, hepatocitos y células derivadas de hepatocito, linfocitos B y macrófagos de la médula ósea. Sólo se presentan los transportadores regulados.**

Los macrófagos derivados de la médula ósea permiten un estudio separado de la proliferación y de la activación metabólica (Xaus et al., 1999, Valledor et al., 2000). A partir de este modelo, en nuestro laboratorio, Soler y colaboradores, por una parte, indujeron la proliferación de los macrófagos y la síntesis de DNA y RNA con M-CSF (*Macrophage Colony-Stimulating Factor*) y, por otra parte activaron la síntesis de RNA, bloqueando la proliferación celular con IFN- $\gamma$  (interferón- $\gamma$ ). Las incubaciones con M-CSF produjeron una inducción de la actividad *es* pero no la de CNT1 ni CNT2, mientras que la activación por IFN- $\gamma$  aumenta la actividad de transporte concentrativo dependiente de sodio pero disminuye la actividad *es* (Soler et al., 2001a). Más tarde Soler y colaboradores demostraron que la inhibición de la actividad de ENT1 por IFN- $\gamma$  es dependiente de STAT1 (*Signal Transduction and Activator of Transcription 1*), mientras que la inducción de la actividad de CNT1 y CNT2 es independiente de esta señal y parece ocurrir a nivel transcripcional (Soler et al., 2003). Así pues, el sistema *es* parece indispensable para la proliferación de los macrófagos. La necesidad de nucleósidos para la síntesis de ácidos nucleicos, durante la proliferación y la activación celular, es similar, pero, como lo indica los estudios de Soler y colaboradores, los sistemas de transporte implicados son distintos.

En linfocitos B humanos, en presencia de lipopolisacárido bacteriano (LPS) , ésteres de forbol (PMA) o el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), se detecta una inducción de la actividad de transporte concentrativo de uridina y una disminución de la actividad de transporte equilibrativo (Soler et al., 1998) que depende de la producción de óxido nítrico (Soler et al., 2000). La inducción de la actividad concentrativa y la disminución de la actividad equilibrativa por LPS y PMA puede ser bloqueada con inhibidores de la PKC. Sólo la activación de los transportadores concentrativos inducidos por TNF- $\alpha$  es dependiente de la PKC (Soler et al., 1998). Se descubrió más tarde que la inducción de la apoptosis por LPS, vía TNF- $\alpha$ , se asocia a la modulación de los receptores concentrativos (Soler et al., 2001b). Estas observaciones corroboran el papel de los CNTs en la modulación de la disponibilidad de los nucleósidos extracelulares y de la apoptosis en macrófagos.

### **3.6. Transporte de los derivados de nucleósidos**

#### **3.6.1. Acciones farmacológicas de los derivados de nucleósidos**

Existen enfermedades con impactos clínicos muy altos, como el cáncer y el SIDA, que suelen ser tratadas con derivados de nucleósidos. Estos derivados farmacológicos tienen que ser estructuralmente semejantes al análogo del cual derivan para poder ser transportados y metabolizados como los nucleósidos naturales, pero lo suficientemente diferentes como para interferir con la síntesis de ácidos nucleicos, de manera que puedan tener efectos anti-proliferativos en las células tumorales e inhibir la replicación viral en las células infectadas.



Se ha descubierto que, además de provocar mutagénesis, algunos de estos derivados de nucleósidos provocan una depleción del *pool* de nucleótidos intracelular de las células infectadas (Bofill et al., 1995; Airaksinen et al., 2003), lo que podría ser el resultado de una biosíntesis de nucleótidos afectada y de una reducción del proceso de recuperación de los nucleótidos extracelulares (Pastor-Anglada et al., 2004 in press).

- Papel de los derivados de nucleósidos en el tratamiento del SIDA:

La zidovudina (3'-azido-2',3'-didesoxitimidine), más conocido como AZT, fue el primer análogo de nucleósido en ser utilizado en el tratamiento del SIDA. Actualmente existen más análogos como la stavudina (2',3'-dideshydro-3'-desoxitimidina o d4T), la ddI (2'3'-didesoxiinosina), la zalcitabina (didesoxicidina o ddC) y la lamivudina [(-)-2',3'-didesoxi-3'-tiacitidina o 3TC). Estos análogos serán incorporados en el DNA viral en crecimiento, donde actuarán como potentes terminadores de la cadena inhibiendo así la acción de la transcriptasa reversa (Pastor-Anglada et al, 1998).

- Papel de los derivados de nucleósidos en el tratamiento del cáncer:

Los análogos de nucleósidos utilizados en el tratamiento del cáncer pueden tener propiedades citotóxicas propias o sensibilizar las células tumorales a las radiaciones alterando el metabolismo de los nucleótidos. Los derivados farmacológicos más utilizados en estos tipos de tratamientos son las fluoropirimidinas y los análogos de purinas.

Las fluoropirimidinas, como la fluorodesoxiuridina, permiten la inhibición de la timidilato sintasa (TS), enzima responsable de la conversión del dUMP en dTMP. La depleción de los deoxitimidilatos (dTMP, dTDP y dTTP) puede llevar a la apoptosis (Bouffard et al., 1995) o a la sensibilización de las células a las radiaciones, reteniendo las células en la fase más sensible del ciclo celular, la fase S (McGinn et al., 1994).

La gemcitabina (2',2'-difluorodesoxicidina o dFdC), una vez fosforilada, inhibe la ribonucleótido reductasa, enzima responsable de la síntesis de los desoxirribonucleótidos, y puede también incorporarse en el DNA de la célula y actuar escondiendo la zona de terminación de la cadena de replicación. De la misma manera que la gemcitabina, los análogos de timidinas, como la bromodesoxiuridina y la iododesoxiuridina, después de ser fosforilados, se incorporan en el DNA y permiten la depleción del pool de dTTP.

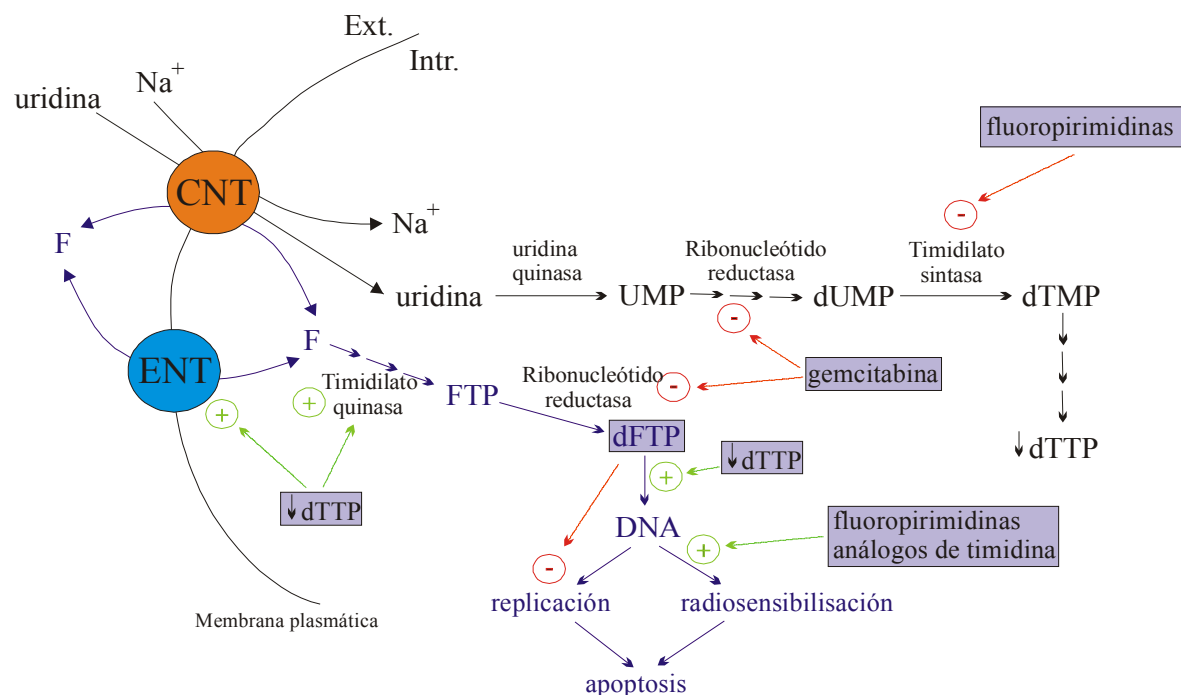
Los análogos de purina, como la clatribina (2-clorodesoxiadenosina) y la fludarabina (fluoroarabinonosiladenosina), han sido muy utilizados en el tratamiento de enfermedades linfoproliferativas. Estos fármacos al igual que la gemcitabina pueden inhibir la actividad de la ribonucleótido reductasa e incorporarse en el DNA. La clatribina y la fludarabina fueron los

primeros análogos de nucleósidos en ser utilizados por el tratamiento de malignidades de los linfocitos B, enfermedades tales como la leucemia crónica linfática (CLL), la linfoma folicular y la leucemia de las células peludas (Johnson et al., 2001; Kipps et al., 2000). Evidencias experimentales indican que, en las células de pacientes de CLL, la mayoría de los análogos de nucleósidos induce la apoptosis *ex vivo* (Pastor-Anglada et al., 2004).

### 3.6.2. Mecanismos de acción de los análogos de nucleósidos

Los transportadores de nucleósidos equilibrativos y concentrativos permiten la entrada de fármacos derivados de nucleósidos a través de la membrana plasmática (Pastor-Anglada et al., 1998; Baldwin et al., 1999). Estos transportadores pueden reconocer los derivados de nucleósidos y permitir su entrada en la célula. Para determinar las propiedades cinéticas que tienen los transportadores con respecto a estos fármacos, se realizaron estudios de inhibiciones cruzadas.

La acción de los derivados de nucleósidos sigue tres pasos, la entrada de la molécula por los transportadores de nucleósidos, su activación metabólica y su acción farmacológica (figura 14).



**Figura 14: Entrada de los fármacos derivados de nucleósidos y posibles funciones citotóxicas de estas moléculas.** Los fármacos (F), derivados de los nucleósidos son internalizados en la célula mediante los mismos transportadores que los sustratos naturales.

### 3.6.3. Propiedades farmacológicas de los transportadores de nucleósidos

Las propiedades farmacológicas de los transportadores concentrativos y equilibrativos están resumidas en la tabla 5 (Casado et al., 2002). Como ya hemos visto, el tipo de transportadores de nucleósidos expresado en la célula es dependiente del tipo celular, de su estado de proliferación y de diferenciación.

Transportadores concentrativos	Drogas testadas como sustratos (Km)	Transportadores equilibrativos	Drogas testadas como sustratos (Km)
hCNT1	gemcitabina ++++ (17µM) 5'-DFUR (209 µM) citarabina + fludarabina - cladribina - lamivudina <sup>a</sup> #	hENT1	gemcitabina ++++ (160µM) citarabina ++++ fludarabina +++ cladribina ++++ ddI ++ ddC ++ AZT - AZT <sup>a</sup> ### 5-fluorouridina ++
hCNT2	cladribina + fludarabina - gemcitabina - ddI -	hENT2	gemcitabina ++ (740 µM) fludarabina ++ cladribina ++ ddC +++ ddI +++ AZT +++ citarabina <sup>a</sup> # 5-fluorouridina <sup>a</sup> ##
hCNT3	cladribina +++ fludarabina ++ gemcitabina ++ AZT + ddC + ddI + ganciclovir + zebularina +++		

ddC (dideoxycitidina);ddI(dideoxiinosina). - : no transportado.

+,++,+++,++++ : muy poco, poco, bastante, muy transportado, respectivamente

<sup>a</sup> : drogas testadas como inhibidores.#,##,### baja, media, alta potencia de inhibición

**Tabla 5: Propiedades farmacológicas de los transportadores de nucleósidos concentrativos y equilibrativos.**

Las fluoropirimidinas utilizadas en el tratamiento de tumores, como la gemcitabina, aparecieron como sustratos apropiados a hCNT1, Lostao y colaboradores mostraron que la afinidad de hCNT1 por la gemcitabina es más alta que por la uridina, su sustrato natural y demostraron que la fludarabina, que no es sustrato de hCNT1, permite la inhibición del transporte de uridina por este transportador (Lostao et al., 2000). La gemcitabina, además de ser transportada por hCNT1, puede

pasar la membrana plasmática mediante los transportadores equilibrativos, pero con una afinidad más baja (Mackey et al., 1999). La fludarabina, utilizada en el tratamiento de la leucemia linfática crónica, está transportada mayoritariamente por los transportadores de nucleosidos de tipo ENT. En nuestro grupo, se han descrito claras correlaciones entre la actividad biológica de estos transportadores equilibrativos y la citotoxicidad de la fludarabina (Molina-Arcas et al., 2003).

La capecitabina es un derivado de nucleósidos utilizado en la terapia que debe ser activado para poder actuar, convirtiéndose primero en 5-DFUR, forma inactiva, y ya en el tumor, en 5-FU, la forma citóxica final. Se sabía que el tratamiento con capecitabina permitía alcanzar concentraciones celulares al 5-FU más elevadas que con la administración directa de 5-FU, y esto podía resultar útil en el tratamiento de tumores virtualmente incurables, como el colangiocarcinoma. Mediante estudios electrofisiológicos (Lostao et al., 2000; Mata et al., 2001), nuestro grupo pudo ilustrar que la 5-DFUR es sustrato de hCNT1 y este hecho podría ser la causa de su elevada citotoxicidad, ya que la expresión heteróloga de hCNT1 sensibilizaría las células al efecto de este fármaco.

Recientemente en nuestro grupo, Pedro Cano y colaboradores han demostrado que los derivados de nucleósidos pirimidínicos que no tienen el hidroxilo en la posición 3' de la ribosa tales como los inhibidores de *HIV-1 reverse transcriptase*, son muy poco transportados por hCNT1.

## ***OBJETIVOS GENERALES***



## ***Objetivos Generales:***

- 1. Identificación de la localización subcelular y del tráfico intracelular de los transportadores concentrativos rCNT1 y rCNT2 en hepatocitos de rata.**
- 2. Análisis de los mecanismos de la regulación post-traducciona del transportador concentrativo de adenosina de alta afinidad rCNT2 en hígado de rata.**





## ***MATERIALES Y MÉTODOS***



## 1. Cultivo celular

El cultivo celular es el mantenimiento de las células *in vitro*, preservando al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas.

### 1.1. Procedimiento

#### 1.1.1. Aparatos y material

- Campana de flujo laminar con sistema de luz U.V. y un mechero.
- Incubador de células con atmósfera controlada (5% de CO<sub>2</sub>, 95% de O<sub>2</sub>, 95% de humedad parcial y una temperatura de 37°C).
- Microscopio invertido (Olympus CK2)
- Congeladores (-20°C y -80°C).
- Instalación de criogenia que incluye un depósito de congelación gradual de células y un tanque de nitrógeno líquido para conservar las células.
- Baño termostático
- Pipetas de plástico estéril
- Pipetas automáticas
- Placas, frascos de cultivo (Cultek)
- Filtros de 0.22 µm (Schleicher & Schuell FP030/3)
- Materiales estériles diversos

#### 1.1.2. Normas generales de manipulación

La manipulación de las células en cultivo debe seguir unas normas muy estrictas de limpieza. Se trabaja siempre dentro de una campana de flujo vertical que se limpia con etanol 70% antes de comenzar a trabajar. El uso de llama dentro de ésta es opcional. Para evitar contaminaciones no se debe pasar las manos ni cualquier objeto no estéril sobre el material estéril. Los medios de cultivo, las soluciones y todos los materiales que entran en contacto con las células han de estar esterilizados, bien por filtración con filtros de 0.22 µm de diámetro de poro o por otros métodos como autoclave, irradiación, etc. Estas condiciones sólo se mantienen cuando las botellas se abren y se cierran dentro de la campana. Además, estas soluciones se atemperan a 37°C antes de ser utilizadas. Los restos biológicos se tratan con lejía al 30% y los materiales utilizados se autoclavan. Una vez finalizado el trabajo dentro de la campana se limpia la superficie con etanol al 70% y se reduce el flujo a las condiciones de mantenimiento.

### **1.1.3. Cultivo de líneas celulares**

El cultivo de líneas celulares implica la propagación de células inmortalizadas y/o transformadas en superficies, principalmente de plástico, donde se adhieren y forman una monocapa. Las células deben ser pasadas de una placa o frasco a otro cuando cubren la superficie del soporte en su totalidad. Este proceso se llama tripsinización o pase. Las líneas celulares no pueden ser pasadas de manera indefinida, ya que así pueden acumular mutaciones que las hacen diferentes a las células originales. Por ello, se deben congelar los cultivos celulares y mantener un stock de células que mantengan las características que definen a la línea. Este proceso es la criogenia o congelación.

- **Tripsinización o pase de células**

La tripsinización consiste en la disgregación de la monocapa mediante un proceso enzimático y mecánico que permite la recuperación de las células y el subsiguiente replaqueo con medio fresco en una nueva placa o frasco de cultivo.

Este proceso comienza por la aspiración del medio de cultivo con una pipeta *pasteur* estéril y el lavado de las células con PBS estéril a 37°C (NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.1 mM) para eliminar todo resto de medio de cultivo que podría inhibir la acción de la tripsina. Se aspira el PBS y se añade 1 ó 2 ml de tripsina-EDTA atemperada y estéril. Si se deja la tripsina en el frasco, se tendrá que centrifugar el cultivo para eliminarla del medio. Cuando las células se desenganchan del plástico, se para la tripsinización añadiendo medio de cultivo fresco. El estado de las células se puede ver a simple vista o comprobarse al microscopio invertido. El tiempo de tripsinización depende del tipo celular. Se homogeniza la suspensión de células con la pipeta y ya se puede plaquear o congelar.

- **Recuento de células con cámara de Neubauer y azul de tripano**

La cámara de Neubauer es una cámara de recuento adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases.

Para determinar la viabilidad celular se utiliza la tinción de las células con azul de tripano. El azul de tripano es un coloide que se introduce en el interior de las células que presentan roturas en la membrana. Para preparar 100 ml de solución, se necesitan 0.4g de azul de tripano (Sigma), 0.81g de NaCl y 0.66g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Esta solución se ajusta a un pH de 7,3 con NaOH 1N. Las

células muertas incorporan el colorante (el citoplasma y el núcleo se tiñen de azul) y las células intactas, no.

- **Congelación y descongelación**

Es importante tener siempre un stock de células de pase bajo para evitar procesos de senescencia, cambios genéticos o muerte del cultivo por contaminación. Después de la tripsinización, el total de la suspensión se centrifuga 3 minutos a 1500 r.p.m. a temperatura ambiente. Se aspira el sobrenadante y se resuspende el precipitado en 1 ó 2 ml de medio de congelación (mezcla de suero fetal bovino con DMSO al 10% v/v). El DMSO tiene función de agente crioprotector. Se alicuota rápidamente en uno o dos criotubos que se colocarán en un congelador de viales de células con isopropanol que permite una bajada paulatina de la temperatura a - 80°C. Cuando las células alcanzan una temperatura inferior a -50°C se almacenan en nitrógeno líquido (- 196°C) durante un largo periodo de tiempo (incluso durante varios años).

Para descongelar las células, se sacan los viales del contenedor de nitrógeno líquido y se descongelan rápidamente en un baño termostatzado a 37°C. El DMSO debe retirarse del medio lo antes posible. Por ello, se vierte el contenido del vial recién descongelado en un tubo estéril, se homogeniza con medio de cultivo fresco y se centrifugan las células 3 minutos a 1500 r.p.m. Se resuspende el pellet de células en medio fresco y ya se puede plaquear.

## **1.2. Las líneas celulares**

### **1.2.1. Aislamiento y cultivo primario de hepatocitos**

#### **1.2.1.1. Obtención de células parenquimales hepáticas de rata adulta**

##### Animales de experimentación y condiciones de estabulación

Los animales utilizados en este estudio fueron ratas albinas machos (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar (Interfauna, Harlan Ibérica. Se utilizan machos con un peso comprendido entre 200 y 250 gramos. Los animales se mantienen en condiciones ambientales controladas (22°C de temperatura y 75% de humedad). Siguen, además, un ciclo de iluminación diaria de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, iniciando el periodo de luz a las 8 de la mañana.

El tipo de alimentación administrada consiste en un pienso compacto suministrado por B.K. Universal G.J., S.L. con una valor calórico de 3.4kcal/g y una composición centesimal de:

- Proteínas 16.5%
- Lípidos 2.4%

### *Localización subcelular y regulación post-traducciona de rCNT2*

- Glúcidos 71%
- Celulosa 3.6%
- Fósforo 0.75%
- Calcio 0.75%
- Cenizas 5.2%

Cada pienso esta suplementado con vitaminas A (18000 U.I./Kg), D<sub>3</sub>(1800 U.I./Kg) y E (24 mg/Kg).

#### Aparatos y Material:

- Baño y termostato Selecta
- Bomba peristáltica Gilson Minipuls
- Centrífuga Super Minor (MSE)
- Microscopio Nikon con objetivos de 10X y 40X y oculares de 10X
- Material diverso de plástico y de vidrio
- Material de cirugía
- Cánulas Gilson de cloruro de polivinilo
- Media de nylon
- Hemocitómetro de Neubauer

#### Reactivos y medios de aislamiento:

- Carbógeno (O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 19:1)
- Solución de pentobarbital sódico (30 mg/ml)
- Colagenasa A (clostridiopeptidasa A) 0.3 U/mg de *Clostridium histolyticum* (Boehringer Mannheim)
- **Tampón 1:** Solución de sales de Hank, libre de calcio y magnesio y con EGTA, quelante de calcio. Se utiliza como tampón de lavado durante la perfusión del hígado del animal. Se prepara 10 veces concentrado y se conserva a 4°C, aproximadamente durante un mes. Su composición es:

	g/L	Concentración 10X
KCl	4	54 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,6	4,4 mM
NaCl	80	1368 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,6	3,3 mM

El tampón 1 (10x), se diluye a 1x y justo antes de su utilización se añade la preparación siguiente:

	g/L	Concentración
NaHCO <sub>3</sub>	0.35	4.2 mM
D-glucosa	1	5.5 mM
HEPES	4.76	20 mM
EGTA	0.19	0.5 mM

Se preparan 500 ml de tampón que se saturará con carbógeno durante unos 20 minutos. Una vez gaseado, se ajusta el pH a 7.3 con KOH 10N y se mantiene el tampón en un baño a 38-39°C, carbogenándose.

- **Tampón 2:** Medio “Leibovitz”, resultado de una modificación de la solución de sales del medio Leibovitz original (1963). Es el tampón de perfusión, allí se disolverá la colagenasa. Se prepara 10 veces concentrado y se conserva a 4°C. Su composición es:

	g/L	Concentración 10X
KCl	4	54 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,6	4,4 mM
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2	9,8 mM
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2	8,1 mM
NaCl	80	1368 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,4	13,3 mM

El tampón 2 (10x), se diluye a 1x y justo antes de su utilización se añade la preparación siguiente:

	g/L	Concentración
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.18	5 mM
D-glucosa	1	5,5 mM
HEPES	4.8	20 mM

Se prepara 1 litro de tampón que se saturará con carbógeno durante unos 20 minutos. Una vez gaseado, se ajusta el pH a 7.4 con KOH 10N y se mantiene el tampón en un baño a 38-39°C, carbogenándose y, justo antes de empezar le perfusión, se añade entre 0,4 y 0.5 mg de colagenasa por ml de tampón.

- **Tampón 3:** Se prepara de la misma manera que el tampón 2, pero una vez carbogenado y con el pH ajustado a 7,4 no se añade la colagenasa sino 1% de albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos (Boehringer). Se mantiene en hielo hasta su utilización. Se preparan 300 ml.

Procedimiento:

El aislamiento de los hepatocitos de rata adulta se realiza a partir del método clásico de perfusión con colagenasa establecido por Moreno y colaboradores (Moreno et al., 1989) y las modificaciones descritas por Gomez-Angelats y colaboradores (Gomez-Angelats et al., 1995). Ambos trabajos proceden de un método original descrito por Berry y Friend (Berry and Friend, 1969) y readaptado por Seglen (Seglen, 1976). Inicialmente, se anestesian los animales por inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (60mg/Kg de peso corporal). Una vez dormido, se realiza una laparotomía en V invertida desde la línea alba inferior. Cuando la pared abdominal esta abierta, se coloca un primer hilo en torno a la vena porta, a 1,5 – 2 cm de la entrada del hígado y otro en torno a la vena cava inferior encima del riñón derecho. Se canula la vena porta con una cánula de plástico con una aguja de 1 mm de diámetro. Rápidamente, se ata el hilo alrededor de la vena para mantener fija la cánula y empieza la perfusión del hígado con el tampón de lavado (tampón 1) impulsado por una bomba peristáltica que mantiene un flujo continuado de 40 ml/min. En este momento, se secciona la vena cava inferior. El lavado con el tampón 1 (10-15 minutos) elimina la sangre y los iones calcio del hígado apreciándose rápidamente el cambio de color del órgano (marrón claro). Durante esta perfusión, se abre la caja torácica y se pasa un tercer hilo alrededor de la vena cava superior, justo delante de la entrada al corazón por la aurícula derecha y se introduce una segunda cánula que bajará por la vena cava hasta la altura del diafragma. Se ata el hilo para fijar la aguja de la cánula y se hace un nudo pasando alrededor de la vena cava posterior, permitiendo al tampón pasar por la cava al nivel del corazón. A continuación, se cambia el tampón de lavado por el tampón 2 que contiene la colagenasa. Cuando el órgano adquiere una apariencia esponjosa, se extrae con cuidado de la caja torácica y se pone en una placa de petri, en presencia de tampón 2 para que no se seque. El hígado se coge con una pinza por el tejido conjuntivo y, bajo oxigenación constante, se realiza la disgregación del órgano con un peine de plástico. La suspensión resultante se filtra a través de una media de nylon, colocada en un embudo y se recoge en un tubo de plástico. Se añade tampón 3 hasta alcanzar los 50 ml. La solución filtrada se centrifuga a 1000 r.p.m. durante dos minutos a temperatura ambiente. Se descarta el sobrenadante y se resuspende con el tampón 3 hasta un volumen de 40 ml. Se homogeniza y se centrifuga en las mismas condiciones dos veces más. Una alta compactación del precipitado indica un elevado grado de viabilidad celular. Después de la última resuspensión, la preparación de hepatocitos se mantiene en hielo hasta sembrar las células.



### **1.2.1.2. Cultivo primario de hepatocitos**

#### Medios de cultivo:

**Medio 1:** medio E-199 de sales de Earl (Innogenetics, BioWhittaker, ref. 12-119F) suplementado con un 2% de suero fetal bovino (Reactiva) y con 1% de una mezcla de antibióticos y antimicóticos (Gibco) formada por penicilina (10000 U/ml), estreptomina (10000 u/ml) y fungizona (25 UG/ml).

**Medio 2:** medio E-199 de sales de Earl (BioWhittaker) suplementado con un 0.2% de albumina sérica bovina (fracción V libre de ácidos grasos, Boehringer) y con 1% de una mezcla de antibióticos y antimicóticos (Gibco) formada por penicilina (10000 U/ml), estreptomina (10000 u/ml) y fungizona (25 UG/ml). La albumina se prepara a un 10% (p/v), se filtra con filtros de 0.2 µm y se conserva a – 20°C.

#### Procedimiento:

La suspensión de hepatocitos obtenida se centrifuga a 1000 r.p.m y a 4°C durante 1 minuto. A partir de este momento, se trabaja en condiciones estériles dentro de la campana. El precipitado de hepatocitos se resuspende en el medio 1 (conviene en este momento volver a contar las células, ya que la viabilidad de los hepatocitos puede haber disminuido con las centrifugaciones). Las células se diluyen en un volumen total de medio que permita la siembra de  $0.3 \times 10^6$  células por placa de 35 mm, a razón de 2 ml/placa. Después de 4 horas, cuando las células ya se han adherido, se cambia el medio 1 por el medio 2, eliminando así las células no adheridas y los restos celulares.

### **1.2.2. La línea celular Fao**

La línea celular Fao, derivada de la línea celular H4-II-E-C3 que proviene del hepatoma de rata Reuber H35, se caracteriza por su alto grado de diferenciación y por muchas características parecidas al hepatocito adulto. Estas células expresan el receptor de insulina y el receptor de IGF-II, pero no el del glucagón. La actividad  $\gamma$ -glutamyltransferasa se detecta fácilmente en la membrana plasmática. Estudios realizados con diferentes glucocorticoides y esteroides sexuales han demostrado la existencia de un receptor específico de la  $\gamma$ -glutamyltransferasa. Fao expresa también enzimas gluconeogénicas como la fructosa-1,6-bisfosfatasa o la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCQ) y puede crecer en medio privado de glucosa. Esta línea se ha utilizado como herramienta para el estudio de la regulación de la actividad monooxigenasa y el papel de ésta en la activación de xenobióticos, tales como carcinógenos, drogas y pesticidas (Wiebel et al., 1984).

Medios de cultivo y suplementos:

Estas células crecen en medio COONS F-12 (Sigma, ref: F6636), modificación del medio Ham's F-12 (con cantidades de aminoácidos y piruvato sódico dobladas, con presencia de ácido ascórbico y con un suplemento de 0.863 mg/L de sulfato de zinc). El medio se suplementa con 10% de suero fetal bovino (Invitrogen) y con 1% de una mezcla de antibióticos y antimicóticos (penicilina 1000 U/ml, estreptomina 1000 U/ml y fungizona 25 UG/ml). También se puede añadir 1% de L-Glutamina (Invitrogen) 200 mM. El buen mantenimiento de la línea celular implica cambiar el medio celular cada dos o tres días.

Crecimiento

Las células Fao, pequeñas y romboédricas, presentan una morfología intermedia entre la del hepatocito y la de las células HepG2, línea de hepatoma humana. Su núcleo, de tonalidad más clara que el citoplasma, ocupa casi la totalidad de la célula. Crecen de forma regular sobre un soporte formando una monocapa. El tiempo de duplicación es rápido, entre 20 y 24 horas. La confluencia recomendada para los ensayos de transporte, la extracción de RNA o de proteínas es de 75-80%. Para las transfecciones, se trabaja con una densidad ligeramente inferior.

**1.2.3. La línea celular CHO-K1.**

La línea CHO-K1, de tipo fibroblasto, es el resultado del aislamiento de un subclón de la línea parental CHO, obtenida a partir de una biopsia de ovario de hámster chino adulto (*Cricetulus griseus*) en el año 1957.

Medios de cultivo y suplementos:

Estas células crecen en medio EMEM (Medio Mínimo Esencial d'Eagle) sin L-glutamina (Innogenetics, ref. 12-125F). Se suplementa con un 5% de suero fetal bovino (Invitrogen), un 1% de piruvato sódico 100 mM (BioWhittaker), un 1% de aminoácidos no esenciales (NEAA) 10 mM (BioWhittaker), y un 1% de la mezcla de antibióticos y antimicóticos (penicilina 1000 U/ml, estreptomina 1000 U/ml y fungizona 25 UG/ml) (Invitrogen). El buen mantenimiento de la línea implica cambiar el medio de cultivo cada dos días.

Crecimiento

Las células CHO-K1, de morfología fusiforme, crecen en monocapa hasta llegar a confluencia; a partir de este punto pierden la viabilidad.

## 2. Técnicas de análisis de la expresión de proteínas.

### 2.1. Aislamiento de membranas y endosomas.

#### 2.1.1. Aislamiento de membranas totales de células en cultivo.

##### Material y reactivos:

- placa de células en cultivo de 100 mm de diámetro.
- Tampón de homogenización pH 7.4: Hepes 25 mM, EDTA 4 mM, Sacarosa 250 mM, inhibidores de proteasas. Se prepara en el momento y se mantiene a 4°C.
- *Scraper* de plástico (Reactiva) para despegar las células de la superficie de la placa.
- Jeringa de 25G.
- Tubos de 1,5 ml para ultracentrifuga Beckman.
- PBS pH 7.4.

##### Procedimiento:

Se aspira el medio de cultivo de la placa y las células se lavan dos veces con PBS a temperatura ambiente. Se añade 4 ml de tampón de homogenización frío y se congela como mínimo 30 min a -20°C. Se despegan las células, manteniendo la placa sobre hielo, con ayuda de un *scraper*. El volumen de tampón depende de la densidad celular. Así, se añade 1 ml de tampón en el caso que las placas se encuentren a una confluencia del 100% y 500 µl si se encuentran a un 50%. Se recoge la suspensión obtenida en un tubo y se homogeneiza con una aguja de 25 G 10-15 veces evitando la formación de espuma. Este homogenado se centrifuga a 4°C durante 5 min a 5000 r.p.m. para precipitar núcleos y aquellos orgánulos que no se han roto en la centrifugación. El sobrenadante se ultracentrifuga en un tubo de centrifuga Beckman a 200000g durante 1h a 4°C (se puede guardar un poco de este homogenado como control). Las membranas precipitadas se resuspenden en tampón de homogenización. La cantidad del tampón depende del tamaño del pellet (entre 50 y 100 µl).

#### 2.1.2. Aislamiento de membranas totales de tejido.

##### Material y Reactivos:

- Suero salino fisiológico.
- Tampón de homogenización: Hepes 25 mM (pH 7.4), EDTA 4 mM, Sacarosa 250 mM, inhibidores de proteasas. Se prepara en el momento y se mantiene a 4°C.
- Material de cirugía.
- Politron CPCU.
- Tubos Beckman de ultracentrifugación de 10.4 ml de capacidad.

- Jeringas de plástico de 1 ml 25-Gauge

Procedimiento:

Se extraen los tejidos que se limpian de sangre con suero salino frío. Pueden congelarse en nitrógeno líquido y conservarse a -80°C hasta su utilización. La homogenización se lleva a cabo en un politron CPU a 6 unidades de su escala y a intervalos de 30 segundos. Se añaden 8 ml de tampón por cada 0.5-1 g de tejido (se mantiene en hielo durante todo el proceso de homogenización). El homogenado se somete a una centrifugación de 10000g (centrífuga Sorvall, rotor SA600) durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se somete a una segunda centrifugación a 200000 g (ultracentrífuga Sorvall, rotor T-875) durante 1h 30min a 4°C. El pellet (proteínas de membrana total) se resuspende en 100-500 µl de tampón de homogenización según su tamaño. Para alcanzar una resuspensión homogénea, primero se utiliza una pipeta P200 y después una jeringa de 1 ml 25-Gauge. Durante todo este proceso las proteínas deben mantenerse en hielo. Las alícuotas de proteínas se conservan a -20°C.

**2.1.3. Aislamiento de membranas basolaterales de hígado de rata:**

La técnica utilizada es la descrita por Pastor-Anglada y colaboradores (Pastor-Anglada et al., 1987).

Material y Reactivos

- Solución A: sacarosa 1.25 M, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, Hepes 50 mM, pH 7.4.
- Solución B: EDTA 100 mM.
- Solución de Percoll isotónica: Mezcla de Percoll (Pharmacia) y sacarosa 2.5 M ajustado a pH 7.5 con HCl.
- Material de cirugía.
- Suero salino fisiológico.
- Un homogeneizador manual de vidrio con un émbolo de teflón.

Procedimiento:

Los animales, ratas macho de la cepa Wistar, se sacrifican por decapitación y el hígado se extrae rápidamente, se pesa y se lava con solución fisiológica. A partir de este momento se trabaja en frío. El hígado se coloca en un vaso de precipitado en el tampón 1 (tampón A diluido 5 veces) y se corta en trocitos con tijeras para facilitar su homogenización. La homogenización se realiza en un homogeneizador manual con 15 pasadas en 80 ml de tampón 1. El homogenado se filtra con una media de nylon fina y se recoge en una probeta que contiene 1.8 ml de tampón B. Se añade el

tampón 1 hasta alcanzar un volumen final de 180 ml para obtener una concentración final de EDTA de 1 mM.

Se recogen alícuotas del homogenado y se congelan en nitrógeno líquido antes de guardarlas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . El resto se reparte en 4 tubos de policarbonato de 40 ml y se centrifuga a 30000g durante 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  (centrífuga Sorvall, rotor SA600). El sobrenadante de esta primera centrifugación se elimina por decantación y el precipitado se resuspende en el tampón 2 (tampón 1 suplementado con EDTA 1 mM) y se recoge en un único tubo de 40 ml que se centrifuga 10 minutos a 700g a  $4^{\circ}\text{C}$  (centrífuga Sorvall, rotor SA600). Se recoge el sobrenadante en una probeta de 50 ml (en hielo) mientras se vuelve a centrifugar el precipitado resuspendido en 5 ml del mismo tampón y en las mismas condiciones que antes. El nuevo sobrenadante se mezcla al anterior y se añade tampón 2 hasta obtener un volumen final de 50 ml. Después de agitar por inversión, se reparte la solución en dos tubos de policarbonato de 40 ml y se añade a cada tubo 3 ml de la solución de percoll (que se prepara en el momento) para obtener una solución de percoll al 11%. Las muestras se centrifugan 20 minutos a 30000g. En esta centrifugación se forma un gradiente de densidad, en el cual la fracción rica en membranas queda diferenciada en la parte superior del tubo a una densidad de 1.038 unidades. Esta fracción, que aparece blanca y bastante viscosa, se recoge con una pipeta Pasteur. El percoll tiene una viscosidad más baja que la sacarosa y define los gradientes con más resolución y más rápidamente. Una vez obtenidas las fracciones de membrana se realizan dos centrifugaciones consecutivas de 30000g durante 30 min, cada una en tampón 1 para lavar las membranas. El precipitado de membrana se resuspende en tres volúmenes de tampón 1. Se homogeniza con una jeringa de plástico con aguja 25-G, se alícuota, se congela en nitrógeno líquido y se conserva a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

La presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  es indispensable al inicio del proceso de manera que se preserve al máximo la integridad de las membranas durante la homogenización. Después, se añade el EDTA para acomplejar el catión evitando la sedimentación rápida de las membranas y su vesiculación en un medio donde están presentes componentes citosólicos (que se eliminan mayoritariamente durante la primera centrifugación).

Las últimas etapas de lavado permiten la eliminación de una cantidad importante de proteínas solubles y los restos de percoll en la preparación. Finalmente, la resuspensión de las membranas en un medio con  $\text{Ca}^{2+}$  (sin EDTA) provoca la vesiculación de las membranas en un medio controlado y libre al máximo de contaminaciones.

#### **2.1.4. Aislamiento de membranas canaliculares de hígado de rata**

Material y Reactivos:

- Tampón de homogenización:  $\text{N}_2\text{HCO}_3$ , 1 mM pH 7.5,  $\text{CaCl}_2$  0.5 mM.
- Soluciones de sacarosa, pH 7.4, a 2.5 M, a 8% (p/v), 43%(p/v), 48%(p/v) y 54%(p/v).
- Homogeneizador de vidrio *Dounce*.
- Material de cirugía.
- Suero salino fisiológico.

Procedimiento:

Los animales, ratas macho de la cepa Wistar de 200-250 g, se sacrifican por decapitación y se extrae rápidamente el hígado, se pesa y se lava en solución fisiológica. A partir de este momento se trabaja en frío. Se suelen utilizar 4 hígados por cada preparación. Los hígados se homogenizan en el tampón de homogenización con 8 pasadas en el homogeneizador. El homogenizado se centrifuga 15 min a 2500 r.p.m con el rotor Beckman SW28. El sobrenadante se descarta y se lava el sedimento con 1/3 del volumen de muestra original disuelta en el tampón de homogenización. Se centrifuga a 2500 r.p.m durante 10 min, se vuelve a lavar el sedimento de la misma manera y se centrifuga una última vez a 5000 r.p.m. durante 10 min. El sedimento se mezcla con la solución de sacarosa 2.5 M y se carga la solución en el fondo de un gradiente discontinuo de sacarosa compuesto por las siguientes fases: 8%, 43%, 48% y 54%. Se centrifuga a 25000 r.p.m. durante 3 h en el rotor Beckman SW28. El porcentaje de sacarosa se verifica con un refractómetro.

Las membranas canaliculares se localizan en la interfase 8% y 43% Se recogen con una pipeta Pasteur, se sedimentan y se resuspenden en NaCl 0.9%. Se homogeneizan con una jeringa de 25G, se congelan en nitrógeno líquido y se conservan a  $-80^\circ\text{C}$ .

#### **2.1.5. Aislamiento de endosomas de hígado de rata.**

Este protocolo se ha desarrollado en el Departamento de Biología Celular y Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona, con la colaboración del grupo del Doctor Carles Enrich.

Material y Reactivos:

- 17- $\alpha$ -etinilestradiol (Sigma) disuelto en propilen glicol (Sigma).
- LDL humana previamente dializada durante 24 h en NaCl 0.9% y EDTA 0.1% a  $4^\circ\text{C}$ .
- Solución NaCl 0.9% y EDTA 0.1%.
- tampón de homogenización: sacarosa 0.25 M con inhibidores de proteasas.

- un homogenizador *dounce* con émbolos *loose* y *tight*.
- solución de Percoll, (Pharmacia): 3 ml de sacarosa 2.5 M con 27 ml de Percoll, pH 7.4, 4°C.
- tubos del rotor tipo 30 de Beckman.
- marcador de densidad de 1.062 g/ml (Pharmacia).
- Soluciones de sacarosa: 1.06 M (36.37%), 0.84 M (28.8%), 0.56 M (19.5%), 0.24 M (8.24%) y 2.5M.
- Refractómetro

Procedimiento:

Se utilizan ratas Sprague-Dawley (200-250 g). Durante 3 días las ratas reciben por inyección subcutánea 1 mg/ml de 17- $\alpha$ -etinilestradiol (5mg/kg de rata). Unos 20 minutos antes de extraer el hígado, se inyectan por vía femoral 5 mg de LDL humana a 30°C (15 mg/kg de rata). El hígado se extrae y se perfunde con la solución de NaCl y EDTA a 4°C. A partir de este momento se trabaja en frío. Antes de pesarlo, el hígado se seca con una gasa y se corta con cortes secos de bisturí durante 6 minutos. Se homogenizan 8.1 g de hígado en tampón de homogenización hasta un volumen final de 24 ml con un homogeneizador *dounce*, con 3 pasadas con el émbolo *loose* y una con el *tight*. El homogenado se centrifuga durante 10 minutos a 2100 r.p.m. (600g) a 4°C en el rotor SW28 Beckman. El sobrenadante se vuelve a centrifugar durante 20 minutos a 119000 r.p.m. (12200g) a 4°C en el rotor tipo 30 de Beckman. Se recoge el sobrenadante con una pipeta descartando la parte más cercana al pellet para evitar contaminaciones del Golgi (capa blanca situada encima del pellet) y se diluye a razón de 64 ml de sobrenadante por 30 ml de solución de Percoll. Esta solución se reparte en tubos del rotor tipo 30 de Beckman que contienen una gota del marcador de densidad de 1.062 g/ml. Se recoge el sobrenadante situado sobre el marcador de densidad y se mezcla con el doble de volumen de NaCl 0.9% con inhibidores de proteasas a 4°C. Esta solución se carga sobre una solución de sacarosa 2.5 M y se centrifuga en el rotor Beckman SW28, a 4°C, 45 min a 11600 r.p.m. (17800g). Con una pipeta se descarta el sobrenadante y se recoge la banda blanca situada sobre el *cojín* de sacarosa a la cual se añade sacarosa 2.5 M según la fórmula: volumen de la banda x 0.3786.

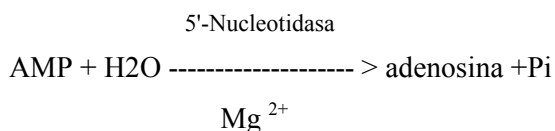
Se prepara un gradiente discontinuo con las interfases: 8 ml de la solución muestra (muestra a la cual se añade un volumen de sacarosa 1.15 M hasta obtener un volumen final de 8 ml) y capas de 7.5 ml de sacarosa a diferentes concentraciones 1.06 M (36.37%), 0.84 M (28.8%), 0.56 M (19.5%) y 0.24 M (8.24%). El gradiente se centrifuga durante 2 h y 50 min a 28000 r.p.m. (104000g) en el rotor Beckman SW28. Las soluciones de sacarosa se preparan por dilución de una solución madre a 2.5 M y el porcentaje de sacarosa se verifica con un refractómetro.

Las fracciones endosomales se pueden recoger en las diferentes interfases: MVB (0.24/0.56M), CURL (0.56/0.84M), RRC (0.84/1.06M), CEF (1.06/1.16M). Para obtener fracciones isotónicas, se añade agua a 4°C hasta un volumen final calculado mediante la fórmula siguiente: (densidad de la fracción [ % w/v] / 8.4) x volumen de la muestra, en la cual la densidad de la fracción se mide con el refractómetro.

Las fracciones se centrifugan 30 min a 20800 r.p.m. (52000g) con el rotor Ti 50 de Beckman. Se elimina el sobrenadante y se resuspende en un volumen mínimo de NaCl 0.9%. Se homogeniza con una jeringa de 25G y se congela en nitrógeno líquido y conservar a - 80° C.

## **2.2. Determinación de la pureza de las membranas plasmáticas aisladas, cuantificación de la actividad 5'-nucleotidasa:**

La 5'-nucleotidasa es un enzima presente en la membrana plasmática que se utiliza como marcador de estas mismas membranas, de modo que, para conocer el nivel de enriquecimiento de las preparaciones de membranas plasmáticas, se puede cuantificar la actividad de la 5'-nucleotidasa. Esta técnica se basa en el método de Aronson y Touster (Aronson and Touster, 1974) y consiste en la cuantificación del fósforo inorgánico presente en la fracción estudiada, producido como consecuencia de la acción de este enzima, según la reacción:



### Reactivos:

- Mezcla de reacción: 1ml de MgCl<sub>2</sub> (0.1 M), 2 ml de Tampón glicina/NaOH (0.5 M, pH:9.1), 1 ml de AMP (50 mM, pH:7) y 1 ml de agua destilada. La mezcla se tiene que preparar justo antes del ensayo.
- Reactivo de valoración del Pi (Reactivo de Lin y Morales): 10 ml de SDS al 20%, 10 ml de una mezcla de molibdato amónico al 10% y hidróxido amónico al 0.9%, 10 ml de una mezcla de metavanadato de amonio al 0.235% y ácido nítrico al 1.42%, 3.7 ml de ácido nítrico puro y 66.3 ml de agua destilada. La mezcla se preparara el día del ensayo.
- Solución madre de fosfato monopotásico a 10 mM (se puede congelar)

### Valoración:

- Las muestras: se diluye el homogenado crudo (fracción H) a 1:5 y las vesículas (fracción V) a 1:10 con agua destilada. Se utilizaran 100 µl por duplicado de cada muestra.



- Los blancos: se utiliza 100  $\mu\text{l}$  de las fracciones H y V diluidas a 1:5 y 1:10 respectivamente, por duplicado.
- La patrón: Diluir la solución madre a 1:10 para obtener así una solución a 1  $\text{nmol}/\mu\text{l}$ , con la cual se realiza una recta patrón:

nmol Pi/500 $\mu\text{l}$	solución madre a 1:10 ( $\mu\text{l}$ )	mezcla de reacción ( $\mu\text{l}$ )
0	0	500
50	50	450
100	100	400
200	200	300
300	300	200

Procedimiento:

Las muestras, los blancos, la patrón y la mezcla de reacción se preincuban en un baño con agitación a 37°C unos 5 minutos. Sin quitar del baño los tubos, se añade a los blancos 0.5 ml de reactivo de valoración de Pi, manteniendo la agitación continua de los tubos. Al tiempo 0, se añade a las muestras y a los blancos 0.4 ml de la mezcla de reacción (se puede trabajar con intervalos de 15 a 30 segundos). Los tubos se incuban a 37°C durante 15 minutos y se añade a las muestras y a la patrón, respetando los intervalos, 0.5 ml de reactivo de valoración de Pi. Una vez añadido el último reactivo, se pueden quitar los tubos del baño y se añaden 3 ml de agua destilada. Después se dejan los tubos 20 minutos a temperatura ambiente y se lee la DO a 350 nm.

**2.3. Valoración de proteínas:**

El método utilizado es el método de Bradford (Bradford, 1976), basado en el cambio de coloración del azul de Coomassie ante diferentes concentraciones de proteína. La cuantificación se basa en la medida de la absorbancia de la luz de los diferentes aminoácidos respecto a un estándar de concentración conocido.

Material y Reactivos:

- Solución comercial del reactivo Bradford: “Bio-Rad Protein Assay”, compuesto de azul brillante de Coomassie, ácido fosfórico y metanol (Bio-Rad).
- Disolución acuosa al 0.1% de albúmina sérica bovina.
- Espectrofotómetro con longitud de onda de 595 nm.
- Cubetas semimicro de espectrofotómetro de 1.5 ml (Rubilabor).

Procedimiento:

La solución comercial de Bradford se diluye a 1:4 (v/v) y se transfiere 1 ml de ésta a cada cubeta. Al reactivo de Bradford se le añade o bien la solución de albúmina de concentración conocida para realizar una recta patrón o bien de 1 a 20 µl de muestra (depende de la concentración en proteínas esperada). Se mezcla y se lee la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. A partir de la recta patrón, se pueden estimar las concentraciones de proteínas de las diferentes muestras.

## **2.4. Detección de las proteínas por Western-blot**

### **2.4.1. Electroforesis en geles de SDS-Poliacrilamida (SDS PAGE)**

La utilización de este método permite separar las proteínas en función de su movilidad electroforética (Laemmli, 1970).

La ebullición de las muestras y la utilización de un agente reductor como el β-mercaptoetanol provocan la desnaturalización de las proteínas presentes en la muestra. El SDS (dodecil sulfato de sodio) es un detergente aniónico que se une a las proteínas y les confiere una carga negativa proporcional a su medida. Se crea un campo eléctrico donde las proteínas migran hacia el ánodo (+) a través de una matriz constituida básicamente por polímeros de acrilamida. La longitud de las moléculas (proporcional a la masa) determina la separación de las proteínas durante la electroforesis en geles de poliacrilamida, las cuales migrarán en el gel a una velocidad inversamente proporcional a su peso molecular.

Se preparan dos geles: un gel concentrador (5% de acrilamida) destinado a alinear las proteínas en la entrada del segundo gel y un gel de resolución, de concentración en acrilamida más alta (de 7 a 15%) donde las proteínas migrarán en función de su tamaño.

Reactivos:

**- *Tampón de electroforesis:***

Se prepara concentrado diez veces.

Tris Base 250 mM, Glicina 1.91 M, SDS 1%

Se conserva a temperatura ambiente.

**- *Tampón de carga:***

Se puede preparar a diferentes concentraciones, en este protocolo está concentrado dos veces.

Para 100 ml de tampón: 1.51g de Tris Base, 20 ml de glicerol, 35 ml de agua destilada, se ajusta a pH 6.5 con HCl concentrado, luego se añaden 4g de SDS y 2 mg de azul de bromofenol.

Se conserva a temperatura ambiente.

En el momento de utilizar este tampón se puede añadir o no  $\beta$ -mercaptoetanol a 10% (depende del anticuerpo primario que se utilizará posteriormente).

**- Geles de acrilamida:**

Se preparan justo antes de su carga a partir de una solución comercial de acrilamida/bis-acrilamida al 30% (Bio-Rad).

▪ **Gel separador:**

Se utilizarán distintos porcentajes de acrilamida, dependiendo del tamaño de las proteínas que se quieren detectar:

	6%	8%	10%	12%	15%
H <sub>2</sub> O (ml)	5.3	4.6	4	3.3	2.3
acrilamida/bis-acrilamida (ml)	2	2.7	3,3	4	5
Tris Base 1,5M, pH 8,8 (ml)	2.5	2.5	2,5	2.5	2.5
SDS 10% ( $\mu$ l)	100	100	100	100	100
persulfato amónico 10 % ( $\mu$ l)	100	100	100	100	100
TEMED ( $\mu$ l)	8	6	4	4	4

▪ **Gel concentrador:**

2.7 ml de H<sub>2</sub>O, 670  $\mu$ l de mezcla acrilamida/bis-acrilamida, 0.5 ml de Tris Base 1,5M, pH 6.8, 40  $\mu$ l de SDS 10%, 40  $\mu$ l de persulfato amónico 10 % y 4  $\mu$ l de TEMED.

**- Marcadores de peso molecular:**

En los Western Blots presentados, se utilizo como estándar de peso molecular, el “Rainbow Mix RPN 756” (Amersham) que contiene marcadores de peso molecular entre 14.3 y 220 kDa.

Procedimiento:

Las muestras se diluyen en tampón de carga suplementado o no con  $\beta$ -mercaptoetanol al 10% y se hierven durante 5 minutos antes de cargarlas.

Se utiliza como sistema de electroforesis el sistema SDS-PAGE de Bio-Rad. El gel separador se introduce entre dos vidrios de superficie plana. Una vez polimerizado, se añade el gel concentrador y en la parte superior se intercala un peine que permite la carga de las muestras. Cuando el segundo gel está polimerizado se quita el peine y se monta el sistema de electroforesis dentro de una cubeta donde se añade el tampón de electroforesis. Se cargan las muestras desnaturadas con una jeringa Hamilton, se cierra el circuito y se administra un voltaje de 120 V hasta que el frente de las muestras llega a la parte frontal del gel.

#### **2.4.2. Electrotransferencia de las proteínas e inmunoblot**

Esta técnica consiste en la detección indirecta de proteínas mediante la hibridación con anticuerpos específicos de una membrana obtenida por la transferencia de un gel de poliacrilamida. Las proteínas quedan retenidas en la membrana por adsorción.

##### Material y Reactivos:

- Tampón de transferencia: Tris-base 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20% (v/v).
- Metanol
- Papel Whatmann 3MM.
- Membrana: Immobilon-P Transfer Membrane (Millipore)
- Aparato de transferencia de geles a membranas: Sistema “Mini Protean” (Bio-Rad).
- Solución de bloqueo: solución de PBS/Tween-20 (Sigma) al 0.2% con leche de polvo desnatada (Sveltesse) a 5% (p/v).
- Agitador
- Solución de PBS/Tween-20 (Sigma) al 0.2%
- Anticuerpo primario (ver tabla anexa)
- Anticuerpo secundario goat anti rabbit (Bio-Rad)
- Reactivo de ECL: ECL RPN 2106 (Amersham)
- “Cassette” de exposición
- Hyperfilm ECL RPN 31034 (Amersham)

##### Procedimiento:

Una vez acabada la electroforesis, las proteínas se transfieren a una membrana Immobilon. La membrana se sumerge previamente en metanol para su activación y se mantiene unos minutos en tampón de transferencia con las esponjas y el papel Whatman. Se monta el sistema de transferencia evitando la formación de burbujas de aire y se realiza la transferencia a un voltaje de 100 V durante una hora.

Para evitar uniones inespecíficas entre el anticuerpo primario y las proteínas retenidas en la membrana se realiza un bloqueo de esta última en una solución rica en proteínas. Después de la transferencia, la membrana se incuba en agitación suave durante una hora a temperatura ambiente o una noche a -4°C en la solución de bloqueo.

**Lista de los anticuerpos utilizados en Western-Blot**

<b>Diana</b>	<b>huésped</b>	<b>Dilución</b>	<b>Procedencia</b>
rCNT1	conejo	1:2000	Dr. Marçal Pastor (Barcelona)
rCNT2	conejo	1:1000	Dr. Marçal Pastor (Barcelona)
Ntcp	conejo	1:5000	Dr. Bruno Stieger (University Hospital, Zurich)
Bsep	conejo	1:2000	Dr. Bruno Stieger (University Hospital, Zurich)
caveolin 1	conejo	1:2000	Transduction Laboratories (San Diego, CA)
Rab 5	conejo	1:100	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz , CA)
ASGP-R	conejo	1:400	Dr Carles Enrich (Barcelona)
pIgR	ratón	1:400	Dr. K.E. Mostov (San Francisco, CA)
Cellubrevin	conejo	1:200	Dr. Joan Blasi (Barcelona)
5' -nucleotidase	conejo	20 µg/ml	Dr. Paul Luzio (Cambridge)
A <sub>1</sub> (PC21)	conejo	3 µg/ml	Dr. Rafael Franco (Barcelona)

Una vez bloqueada la membrana, se incuba en agitación durante una hora a temperatura ambiente o una noche a -4°C con el anticuerpo primario (ver tabla siguiente) diluido en solución de bloqueo. Si el anticuerpo se puede reciclar, se utiliza BSA a 1% (Sigma) en lugar de la leche. Antes de incubar la membrana con el anticuerpo secundario, la membrana se lava tres veces 10 minutos en PBS/Tween-20 al 0.2%, en agitación y a temperatura ambiente. La incubación de la membrana con el anticuerpo secundario se realiza a una dilución de 1:200 en la solución de bloqueo en agitación suave durante una hora a temperatura ambiente. Al finalizar se realizan tres lavados de 10 minutos, uno con PBS/Tween-20 al 0.2% y los dos siguientes con PBS.

Se utiliza un método químico, el reactivo de ECL, para la detección luminiscente de los antígenos específicos inmovilizados y conjugados de forma directa o indirecta con anticuerpos marcados con peroxidasa de rábano (anticuerpo secundario). Después del último lavado, la membrana se humedece con 2.5 ml de una mezcla 1:1 del kit de ECL durante 1 minuto, se elimina el exceso de líquido y la membrana se deposita en una bolsa de plástico. Ésta se expone en un film dentro de un *cassette* en una cámara oscura. El tiempo de exposición varía en función de la sensibilidad del anticuerpo y de las muestras ensayadas.

## 2.5. Detección de las proteínas por microscopía

### 2.5.1. Criofijación del hígado para microscopía electrónica y confocal

Es importante dejar las ratas en ayuno la noche antes de perfundir el hígado para evitar una acumulación de glucógeno. El glucógeno es muy difícil de fijar y provoca agujeros en el corte final.

#### Procedimiento:

Inicialmente se anestesian los animales por inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (60mg/Kg de peso corporal). Una vez dormidos, se realiza una laparotomía en V invertida desde la línea alba inferior. Cuando la pared abdominal esta abierta, se coloca un primer hilo en torno a la vena porta, a 1,5 – 2 cm de la entrada del hígado y otro en torno de la vena cava inferior al enzima del riñón derecho. Se canula la vena porta con una cánula de plástico con una aguja de 1 mm de diámetro. Rápidamente, se ata el hilo alrededor de la vena para mantener fija la cánula y empieza la perfusión del hígado con PBS durante 5-10 minutos, mediante una bomba peristáltica que mantiene un flujo continuado de 40 ml/min. En este momento, se secciona la vena cava inferior. El tampón lava el hígado de su sangre y se puede apreciar enseguida el cambio de color del órgano (marrón claro). A continuación, se fija el hígado con una solución de PBS que contiene 4% de paraformaldehído durante 10-15 minutos, con un flujo de 3 ml/min. El hígado tiene que adquirir una consistencia dura. Se extrae el hígado y se trocea en cubitos de 4 mm sobre hielo. Los trocitos se lavan en PBS con glicina a 0.02 M a 4°C, en agitación orbital, durante dos horas. Después del lavado se realiza la crioprotección, que consiste en incubar el hígado en diferentes soluciones de sacarosa en PBS con concentraciones cada vez más altas (0,6 M durante 2h, 1.3 M durante 4h y 2.3 M toda la noche).

Las muestras se secan con papel de filtro y se congelan sobre cubreobjetos en nitrógeno para microscopía electrónica o en nieve carbónica para la microscopia confocal.

### 2.5.2. Microscopía electrónica

#### “Criotécnicas”

La microscopía electrónica es ideal para la observación de estructuras como, la membrana plasmática, las vesículas, las caveolas, los filamentos o los endosomas. Básicamente el protocolo se divide en cuatro pasos:

- La “Criofijación” (*rapid freeze*) de la muestra, que consiste en la congelación rápida de la muestra en un bloque de corte en nitrógeno líquido.

- El “Criosecado” (*freeze drying*), que consiste en la extracción del agua congelada por sublimación (el agua pasa de la fase sólida a la fase vapor) en una cámara de vacío. El vapor de agua se recoge en una bomba de vacío con una presión de vapor por debajo del nivel de equilibrio, para que se pierda el agua de la superficie de manera continua.
- Obtención de las réplicas: La muestra se sombrea o se metaliza con platino (Pt) y carbono (C). La metalización es rotatoria y se hace antes con Pt a un ángulo pequeño de 23° y con C a 75° en una unidad de “*freeze-etching*”.
- Lavado o digestión de las réplicas: Aunque depende de la muestra, por regla general se realiza con lejía y, si se ha realizado una inmunocitoquímica con oro, se deja en agua más tiempo.

### **Inmunodetección sobre cortes ultra finos**

Las muestras se cortan en *ultrasecciones* con un *Leica Ultracut UCT* sobre rejillas de oro cubiertas de formvar. Las rejillas se conservan en una solución de PBS/gelatina al 2% a 4°C.

Para la inmunodetección de CNT1 y CNT2, las rejillas fueron sucesivamente incubadas a temperatura ambiente 10 minutos a 4°C, en PBS/gelatina al 2%, pH 7.4, 3 minutos en PBS/glicina 0.02 M y 10 minutos en PBS/glicina 0.02 M/FCS 0.1%.

Las rejillas se incuban con los anticuerpos primarios durante una hora. Los anticuerpos se utilizaron a una dilución de 1:100 para rCNT1 y 1: 50 para rCNT2 en PBS/glicina 0.02 M/FCS 0.1%. Después, las rejillas se lavan en el mismo tampón PBS/glicina 0.02 M/FCS 0.1% durante 10 minutos (3 veces) y se incuban con el anticuerpo secundario (proteína A conjugada a unas partículas de oro coloidal) diluido en PBS/glicina 0.02M/FCS 0.1% durante 45 minutos en oscuridad. Las rejillas se lavan con agua y se contrastan con 2% de metilcelulosa y 0.2% de uranilacetato. Finalmente, las muestras se observan en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1010 a 75 KV.

### **2.5.3. Microscopía óptica confocal.**

A diferencia de la microscopía óptica tradicional, la microscopía confocal produce imágenes más finas. El contraste es mucho mejor y usa técnicas de análisis de imagen electrónicas que aumentan la sensibilidad y la resolución de las imágenes obtenidas por inmunofluorescencia. El microscopio confocal es capaz de reconstruir una visión espacial de la muestra sumando las imágenes obtenidas en diferentes planos a varias profundidades de la muestra.

La inmunocitoquímica (detección sobre células) y la inmunohistoquímica (detección sobre secciones semi-finas de tejido) permiten localizar diferentes moléculas, mayoritariamente proteínas, en la estructura celular mediante una reacción específica entre antígenos y anticuerpos.

### **Inmunohistoquímica:**

En este método se utilizan cortes de hígado de 2-8  $\mu\text{m}$  crioprotectados y congelados en nieve carbónica. Los cortes se recogen sobre cubreobjetos de vidrio previamente gelatinizados. Los cortes se hidratan en PBS (tres lavados de 5 minutos), se permeabilizan y se bloquean en PBS/Triton 0.1%/BSA 0.1% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se lavan con PBS durante 5 minutos (3 veces) y se incuban con el anticuerpo primario, anti-rCNT1 o anti-caveolina 1, diluidos respectivamente a 1:200 y 1:10 en PBS/Triton 0.1%/BSA 0.1%. Antes de la incubación con el anticuerpo secundario, las muestras se lavan con PBS 3 veces durante 5 minutos. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron para rCNT1 el “oregon-green anti rabbit” y el “Texas-red-labeled anti mouse” para las caveolinas, diluidos a 1:50 en PBS/Triton 0.1%/BSA 0.1%. Por último, se realizan tres lavados de 5 minutos con PBS. Las muestras se analizan en un microscopio óptico confocal Leica TCS NT.

### **Inmunocitoquímica:**

Las inmunocitoquímicas se realizaron con la línea celular Fao. Se sembraron 50000 células por pocillo en placas de 24 pocillos (Cultek) sobre cubreobjetos de vidrio estériles tratados con poly-D-lysine (Sigma). Se dejan las células crecer hasta un 60-70% de confluencia.

Las células se lavan con PBS, se fijan durante 5 minutos en PBS/paraformaldehído 4%/sacarosa 0.06M y se lavan en PBS/Glicina 20 mM durante 10 minutos. Para permeabilizar, se incuban las células en un tampón PBS/Saponina 0.02% (Sigma) durante 15 minutos y se vuelven a lavar en PBS/Glicina 20 mM durante 10 minutos y en PBS solo. Luego, las células se bloquean en un tampón de bloqueo: PBS/BSA 1%/Goat Serum 2%/NaCl 150 mM/Citrato de Sodio 15 mM, a pH 7.5 durante 1 hora a temperatura ambiente y se incuban con el anticuerpo primario a diferentes concentraciones (ver tabla) en el tampón de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de esta incubación las células se lavan durante 10 minutos en un tampón de lavado: PBS/Triton X-100 0.05%/NaCl 150 mM/Citrato de Sodio 15 mM a pH 7.5 y se incuban con el anticuerpo secundario diluido (ver tabla) en tampón de bloqueo durante 45 minutos, en oscuridad y a temperatura ambiente. Los cubreobjetos se lavan dos veces con el tampón de lavado durante 10



minutos y se montan en un medio especial para inmunofluorescencia (ICN). Las muestras se analizan en un microscopio óptico confocal Olympus modelo IX-70.

**Lista de los anticuerpos utilizados en Inmunocitoquímica:**

<b>Diana anticuerpos</b> <b>1<sup>arios</sup></b>	<b>huésped</b>	<b>Dilución</b>	<b>Procedencia</b>
rCNT2-Cyn5	conejo	10 µg/ml	Dr Marçal Pastor-Anglada (Barcelona)
PC21-Cyn 3	conejo	10 µg/ml	Dr Rafael Franco (Barcelona)
Kir6.1	conejo	1:100	Dr Robert I. Norman (Leicester, UK)
Kir6.2	conejo	1:100	Dr Robert I. Norman (Leicester, UK)
SUR2A	conejo	1:250	Dr Robert I. Norman (Leicester, UK)
SUR2B	conejo	1:250	Dr Robert I. Norman (Leicester, UK)

<b>Diana anticuerpos</b> <b>2<sup>arios</sup></b>	<b>huésped</b>	<b>Dilución</b>	<b>Procedencia</b>
Alexa-488	conejo	1:1000	Molecular Probes, Eugene, OR
Alexa-11070	conejo	1:1000	Molecular Probes, Eugene, OR

**3. Transporte de nucleósidos**

El método utilizado para la medida de la captación de nucleósidos en cultivos celulares en monocapa y en vesículas es una variación del descrito consistente en la incubación de las células o de las vesículas en presencia de una concentración conocida de sustrato no radioactivo y de una proporción adecuada del mismo sustrato marcado radioactivamente. La radioactividad incorporada por las células y por las vesículas será indicativa de la cantidad de sustrato total captado por ellas.

**3.1. Transporte en células**

Reactivos:

- Medio con Sodio: NaCl 137 mM, KCl 1.8 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, Hepes 10 mM. Se ajusta a pH 7.4 con Tris Base 10 mM.

### *Localización subcelular y regulación post-traducciona de rCNT2*

- Medio con Colina: ChOCl 137 mM, KCl 1.8 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, Hepes 10 mM. Se ajusta a pH 7.4 con Tris Base 10 mM.
- Medio *stop*: NaCl 137 mM, Hepes 10 mM. Se ajusta a pH 7.4 con Tris Base 10 mM.
- Medio de transporte: Medio sodio o colina, con diferentes sustratos fríos y sustratos radioactivos (tritiados):
  - Sustratos fríos : uridina, citidina y guanosina (Sigma), utilizados a una concentración de 1 μM y de 1 μM a 100 μM en los ensayos de cinética.
  - Stock de nucleósidos tritiados: [5,6-<sup>3</sup>H] uridina (Amersham), [5,6-<sup>3</sup>H(N)] citidina (Nucliber) y [8-<sup>3</sup>H] guanosina (Nucliber) a 1 μCi/ml.
- Medio de homogenización: SDS 1%, NaOH 100 mM.
- Líquido de centelleo Ecolite (ICN).

#### Material:

- Placas de 24 pocillos (Cultek).
- Contador de radioactividad beta (Packard 1500 Tri-Carb).
- Cubetas semimicro de espectrofotómetro (Afora).
- Espectrofotómetro (Shimadzu UV-160)

#### Procedimiento:

En el momento de realizar el transporte, las células se lavan dos veces con medio sodio o medio colina. Se elimina al máximo el medio y se procede a la incubación de las células con el medio de transporte (220 μl de medio/pocillo) durante un tiempo predeterminado, en condiciones V<sub>0</sub> (1 minuto por la línea celular Fao y los hepatocitos, 90 segundos por la línea celular CHO). Rápidamente, se elimina el medio de transporte y se procede a dos lavados seguidos de las células con el medio *stop* frío. Así, el transporte se detiene por la bajada de temperatura y por la dilución con el medio *stop*. Las células se pueden congelar u homogenizar en este momento. La homogenización se realiza añadiendo 100 μl de medio de homogenización por pocillo. Para medir la concentración de proteína correspondiente a cada pocillo se utilizan 10 μl de la muestra y el resto se añade a 3 ml de líquido de centelleo para medir la radioactividad.

Aunque se intenta sembrar las células de la manera más homogénea posible, el número de células en cada pocillo siempre es ligeramente diferente. Por tanto, hace falta corregir los valores de radioactividad por la concentración real de proteínas presente en cada muestra. La valoración de las proteínas se hace con reactivo de Bradford (ver apartado 2.2.).

Cálculos:

Las medidas realizadas en presencia de sodio corresponden al transporte total (transporte dependiente de sodio, transporte independiente de sodio y difusión pasiva) y las medidas realizadas en presencia de colina corresponden al transporte independiente de sodio y a la difusión pasiva. Así, la diferencia entre las medidas en sodio y en colina corresponde a la componente dependiente de sodio.

A partir de los datos obtenidos, se calcula la actividad de transporte de las células, que se expresa en pmol de sustrato por mg de proteína. La actividad específica (A.E.) se mide a partir de alícuotas de los medios de transporte utilizados en el ensayo:

$$\text{A.E. (dpm/pmol)} = \text{dpm estándar/volumen estándar} \times [\text{sustrato}]$$

Se puede calcular la actividad de transporte de la siguiente forma:

$$\text{Actividad (pmol/mg prot.)} = \frac{[\text{DPM(muestra)} \times 10^3]}{[\text{A.E} \times \text{Vol. Medio transp}(\mu\text{L}) \times \text{proteína}(\mu\text{g}/\mu\text{L})]}$$

### 3.2. Transporte en vesículas

Reactivos:

- Medio de transporte Sodio: Sacarosa 0.25M, CaCl<sub>2</sub> 0.2mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, Sulfocianato de sodio 10mM, nucleósidos fríos 1 μM y nucleósidos tritiados 1 μCi por incubación.
- Medio de transporte con potasio: Sacarosa 0.25M, CaCl<sub>2</sub> 0.2mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, Sulfocianato de potasio 10mM, nucleósidos fríos 1 μM y nucleósidos tritiados 1 μCi por incubación.
- Medio *stop*: sacarosa 0.25 M, CaCl<sub>2</sub> 0.2 mM, Hepes 10 mM, NaCl pH 7.4.
- Stock de nucleósidos tritiados: Uridina <sup>3</sup>H (Sigma), Citidina <sup>3</sup>H y Guanosina <sup>3</sup>H (Nucliber).
- Líquido de centelleo Ecolite (ICN).

Procedimiento:

Como lo describen Pastor-Anglada y colaboradores (Pastor-Anglada et al., 1987), el transporte se realiza mezclando en un eppendorf 20 μl de vesículas de membranas (10-20 μg de proteínas/μl) con 20 μl de un medio de transporte. Las vesículas son filtradas en filtros de nitrocelulosa (Millipore) de 0.45 μm y lavados varias veces con el medio *stop* frío. A partir de los filtros, se cuenta la radioactividad presente en las vesículas en 3 ml de líquido de centelleo. Estos ensayos se realizaron tanto para vesículas basolaterales como para vesículas canaliculares de hígado de rata.

Cálculos:

La diferencia entre las medidas obtenidas en medio de transporte de sodio y de potasio corresponde al transporte dependiente de sodio. Los resultados de actividad se calculan y se expresan de la misma forma que se ha descarto para el transporte en células.

**3.3. Inhibidores y activadores utilizados durante los transportes realizados**

Con el objetivo de inhibir o activar efectores posiblemente involucrados en la regulación de los sistemas estudiados, las células fueron pre-incubadas, a diferentes tiempos y concentraciones, con diferentes inhibidores y activadores, antes de realizar los transportes. En la tabla siguiente están todos los inhibidores y activadores utilizados, con sus concentraciones y tiempos de incubación óptimales.

**Lista de los diferentes activadores y inhibidores utilizados en esta tesis**

compuesto químico	actividad	concentració n	tiempo de incubación	casa comercial
dibutiril AMPc	activador PKA	100 µM	10 min.	Sigma
PMA	activador PKC	100 µM	15 min.	Sigma
PMA	inhibidor PKC	100 µM	20 h.	Sigma
Chelerythrine chloride	inhibidor PKC	1 µM	10 min.	Sigma
BaCl <sub>2</sub>	inhibidor canales de potasio	100 µM	30 min.	Sigma
glibenclamida	inhibidor canales KATP	50 µM	15 min.	Tocris Cookson
tobultamida	inhibidor canales KATP	10 µM	30 min.	Tocris Cookson
diazoxida	activador canales KATP	100 µM	30 min.	Sigma
R-PIA*	agonista de A <sub>1</sub> >A <sub>3</sub> >A <sub>2a</sub> >A <sub>2B</sub>	50 nM	5 min.	Sigma
NECA*	agonista de A <sub>1</sub> ,A <sub>2A</sub> , A <sub>3</sub> >A <sub>2B</sub>	50 nM	5 min.	Sigma
CPA*	agonista de A <sub>1</sub> >A <sub>3</sub> > A <sub>2A</sub> >A <sub>2B</sub>	50 nM	5 min.	Sigma
CGS 21680*	agonista de A <sub>2A</sub> >A <sub>3</sub> ,>A <sub>1</sub> >A <sub>2B</sub>	50 nM	5 min.	Sigma
DPCPX*	antagonista de A <sub>1</sub> >A <sub>2A</sub> , A <sub>2B</sub> >A <sub>3</sub>	1 µM	15 min.	Sigma
XAC*	antagonista A <sub>2A</sub> > A <sub>2B</sub> , A <sub>1</sub> >A <sub>3</sub>	1 µM	15 min.	Sigma
L-NAME	inhibidor de la oxido nítrico sintasa	1 mM	15 min.	Sigma
LNMMMA	inhibidor de la oxido nítrico sintasa	100 µM	15 min.	Sigma
SNAP	activador de la oxido nítrico sintasa	100 µM	30 min.	Sigma
DEA-NONOate	activador de la oxido nítrico sintasa	100 µM	30 min.	Sigma

\* Según las referencias (Fredholm et al., 2001a; Fredholm et al., 2001b)

**4. Amplificación por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)**

La PCR es un método *in vitro* para la síntesis enzimática de secuencias definidas de DNA (Mullis and Faloona, 1987). La reacción utiliza dos *primers* que hibridan en cada una de las dos cadenas complementarias y que flanquean la secuencia a amplificar (diana). Los productos se

sintetizan a partir de la extensión de los *primers* en cada ciclo, así el número de copias del DNA diana se duplica en cada ciclo.

#### **4.1. Análisis de la expresión del mRNA por RT-PCR cualitativa**

La técnica de la RT-PCR permite el análisis de la expresión génica al amplificar y detectar un mRNA específico de entre los transcritos de una población celular en un momento determinado. La técnica consiste en aislar el RNA total de las células y transformar los mRNA en copias de DNA (cDNA). Usando el cDNA como molde, se amplifican los transcritos deseados mediante la reacción en cadena de la polimerasa por PCR.

En esta tesis se ha utilizado la RT-PCR para identificar los canales de potasio ATP dependientes presentes en las líneas celulares Fao y hepatocitos, utilizando como control positivo DNA de páncreas.

##### **4.1.1. Aislamiento de RNA**

El RNA total se aísla a partir de páncreas de rata, de células Fao, hepatocitos y células PC12 con el kit “SV total RNA isolation system” (Promega). Por las células, se puede aislar el RNA a partir de una sola placa de cultivo de 10 cm (Cultek) en confluencia y se necesitan aproximadamente 30 mg de tejido de páncreas, la cantidad de tejido necesaria varía según el caso (en el kit están indicados las cantidades recomendadas para cada tipo de tejido). Después de lisar las células y homogeneizar los tejidos con un politron, se diluye el RNA y se pasa el lisado en columnas que permiten el aislamiento y la purificación del RNA total.

##### **4.1.2. Síntesis del cDNA a partir de RNA**

Una vez aislado el RNA total, se procede a la síntesis del cDNA, utilizando un kit de síntesis de cDNA “Reverse transcription system” (Promega, nº A3500). Sólo el RNA mensajero (mRNA), que corresponde a un 1% del RNA total, se utiliza por la síntesis del cDNA. Siguiendo el protocolo del kit, se incuba el mRNA (1µg) con una mezcla de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs, 1mM), oligodT (0.5 µg), un inhibidor de ribonucleasas (RNAsin, 0,5 unidad) y la transcriptasa reversa de AMV (AMV-RT, 15 unidades). Se añade H<sub>2</sub>O bidestilada hasta alcanzar un volumen final de 20 µl. La AMV-RT retrotranscribe el RNA en DNA utilizando los dNTPs a partir de las colas de polyA y el oligodT como cebador. La mezcla se incuba a 42°C durante 30 min en el tampón del kit en presencia de MgCl<sub>2</sub> (5 mM).

#### 4.1.3. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Una vez obtenido el cDNA, molde de la reacción de amplificación, se puede detectar con una alta sensibilidad la presencia de un mRNA concreto de manera específica, utilizando oligonucleótidos específicos para los genes estudiados. La reacción utiliza dos oligonucleótidos o *primers* que hibridan en cada una de las dos cadenas complementarias y que flanquean la secuencia a amplificar (diana).

##### 4.1.3.1. Diseño de los *primers*:

Los *primers* se pueden diseñar utilizando programas como por ejemplo <http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>. La longitud de los *primers* es de 18 a 25 nucleótidos, la temperatura de hibridación o *annealing* tiene que ser idealmente de 50-65°C.

En esta tesis se diseñaron *primers* para la identificación de las subunidades de los canales potasio ATP dependientes (Kir 6.1, Kir 6.2, SUR 1 y SUR 2) en Fao y en hepatocitos. El cDNA de páncreas se utiliza como control positivo de cada subunidad y el cDNA de la línea celular PC12 como control negativo de la subunidad Kir 6.1. rGAPDH se utiliza como control del cDNA.

Genes	Primer Forward	Primer Reverse	Bases
Kir 6.1	GAGTGAAGTGTGCGCACCAGA		1292-1311
		CGATCACCAGAACTCAGCAAAC	1935-1518
Kir 6.2	TCCAACAGCCCGCTCTAC		787-804
		GATGGGGACAAAACGCTG	954-937
SUR 1	CCCAGAGAAGAAATGCTCAGACAGC		4579-4603
		GAGAAGCTTTTCCGGCTTGTC	4957-4937
SUR 2	ACCTGCTCCAGCACAAGAAT		4853-4872
		TCTCTTCATCACAATGACCAGG	4997-4976
rGAPDH	CTACCCACGGCAAGTTCAAT		176-195
		CCACAGTCTTCTGAGTGGCA	589-570

##### 4.1.3.2. Reacción de polimerización por PCR

La DNA polimerasa se añade a una temperatura de 80°C (temperatura de máxima eficiencia de la enzima) tras un paso de 5 minutos a 94°C, evitando así extensiones inespecíficas.

Se realizaron 35 ciclos de PCR para kir 6.1, Kir 6.2, SUR1 y rGAPDH y, para SUR2, 40 ciclos con una desnaturalización de 2.5 minutos a 92°C.:

- La desnaturalización: 2 minutos a 94°C.
- Annealing (union de los *primers*): 1.5 minutos a 53°C.

- Extensión de los primers: para fragmentos hasta 3 kb la extensión se lleva a cabo a 72°C durante 1 minuto. La Taq DNA polimerasa puede añadir aproximadamente 60 bases por segundo a esta temperatura.
- Extensión final: para favorecer la extensión de los fragmentos que hayan podido quedar parcialmente sintetizados, después del último ciclo de amplificación se mantiene una temperatura de 72°C durante 15 minutos.

	concentración inicial	concentración final	μl
Primers (F y R)	20 μM	400 μM	1
Tampón	10 x		5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,5 mM	3
dNTPs	10 mM	200 μM	1
cDNA	100 ng		
DNA polimerasa (Promega)		2,5 unidades	
Volumen final			50

## 5. Realización de las construcciones hCNT1-pGFP, rCNT2-pEYFP y myc-rCNT2-pcDNA3.

### 5.1. Plásmidos y insertos

#### Los plásmidos:

- **pcDNA3.1 (+)** de Invitrogen (5.4 kb)

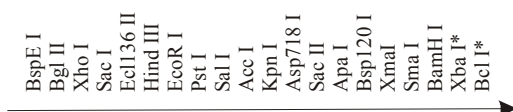
Mapa de restricción:



Resistencia: Ampicilina

- **pEGFP-C1** de Clontech (4.7 kb)

Mapa de restricción:

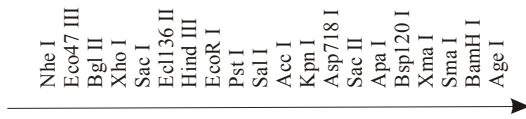


\* sitios metilados

Resistencia: Kanamicina

- **pEYFP-N1** de Clontech (4.7 kb)

Mapa de restricción:



Resistencia: Kanamicina

### **Los insertos y plásmidos de origen:**

- **hCNT1** (Gene bank accession number: U62966):

Plásmido de origen: pcDNA3.1(+) (invitrogen)

Clonado en pcDNA3.1(+) con EcoR I (en 5' y 3') en el *multi-cloning site*, realizado en el grupo por Joao Mata.

- **rCNT2** (Gene bank accession number: U66723)

Plásmido de origen: pCMV.SPORT6 (4396 pb), resistencia a ampicilina.

Clonado en pCMV.SPORT6 entre en Sal I (5') y Not I (3') en el *multi-cloning site* por Rubén Boado (UCLA).

Clonado en pcDNA3.1(+) durante esta tesis entre EcoR I (5') y Not I en (3') en el *multi-cloning site*, con primers descritos en el capítulo 5.2.4.

## **5.2. Transformación de las bacterias competentes.**

El proceso de transformación de bacterias con plásmidos tiene por objetivo introducir fragmentos de DNA en la bacteria con el fin de que se repliquen y permitan su posterior aislamiento y purificación. Este proceso se realiza por choque térmico y las bacterias deben hacerse previamente competentes.

### **5.2.1. Obtención de las bacterias competentes:**

#### Reactivos:

- Medio líquido Luria-Broth (LB) estéril: triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v), NaCl 1% (p/v) y NaOH 2 mM. pH:7 y autoclavado.
- Medio SOB: triptona 2% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v), NaCl 10 mM y KCl 2.5 mM. Se autoclavado y se por cada litro se suplementa con 2.5 ml de MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 2M y 2.5 ml MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2M previamente esterilizados por filtración.



- Medio RF1 estéril por filtración (por 1L): RbCl 12 g, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 9.9g, KAc 1M (pH 7.5) 30 ml, CaCl<sub>2</sub> 1.11 g, Glicerol 150 g. Se ajusta a pH 6.8 con ácido acético.
- Medio RF2 estéril por filtración (por 1L): MOPS 0.5M (pH 6.8) 20 ml, RbCl 1,2 g, CaCl<sub>2</sub> 8.32 g, Glicerol 172.4 ml a 87%. Se ajusta a pH 6.8 con ácido acético.

Procedimiento de obtención de bacterias competentes:

Se pican células E.coli de la cepa XL1-Blue congeladas en 3 ml de medio LB. Se incuban en agitación a 37°C toda la noche. Se inocula 1 ml del medio anterior en 50 ml de medio SOB en Erlenmeyer estéril de 500 ml y se mantiene en agitación a 37°C y cada 15 min. se verifica la absorbancia a 550 nm hasta que la densidad óptica alcance un valor de 0.375 a 0.4. Estas densidades corresponden al momento de crecimiento exponencial de las células. En ese momento son ya competentes.

Las células competentes se transfieren a tubos de polipropileno estériles y se dejan en hielo durante 15 minutos. Se centrifugan a 3000 rpm (Sorvall SA600) 15 min a 4°C. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet suavemente en un tercio del volumen inicial en medio RF1. Se incuban los tubos 20 minutos en hielo y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones. Se descarta el sobrenadante y el pellet se resuspende en un volumen 1/12.5 del volumen inicial en medio RF2. Las células se congelan directamente en nitrógeno líquido y se almacenan a -80°C.

### **5.2.2. Transformación de las células competentes**

Reactivos:

- Medio líquido Luria-Broth (LB) estéril: triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v), NaCl 1% (p/v) y NaOH 2 mM. pH:7 y autoclavado.
- Placas de agar/LB con ampicilina o kanamicina (50-100 µg/ml). Se añade al LB, antes de autoclavar, el agar bacteriológico (Pronadis) a 1.5% (p/v) y se añade el antibiótico una vez que la temperatura ha bajado a 60°C.

Procedimiento:

Se descongelan en hielo 50-100 µL de células competentes por muestra. Si se quiere transformar con un plásmido purificado, se necesita 0.5 µg de DNA y en el caso de transformar el producto de una ligación, se utiliza la totalidad de la reacción (5-10 µL). Se mezclan las células y el DNA con suavidad, sin utilizar el vortex y se incuban 30 minutos en hielo. El choque térmico se realiza a 42°C durante exactamente 1 minuto y 45 segundos (el tiempo puede variar según la cepa). Inmediatamente después se disponen los tubos en hielo durante 2 minutos, se añade 1 ml de LB suplementado con MgSO<sub>4</sub> 20 mM estéril y se incuban a 37°C con agitación durante una hora.

Después de la incubación, la muestra se puede centrifugar 5 minutos a 2000 rpm si se sospecha que la eficiencia de la transformación puede ser baja.

Se puede proceder, en este momento, a la siembra del crecimiento bacteriano en placas de agar-LB que contengan el antibiótico adecuado para seleccionar aquellas bacterias que hayan incorporado el plásmido. Se añaden diferentes volúmenes de transformación para conseguir un crecimiento que nos permita aislar colonias provenientes de una única bacteria. Se extiende el líquido con una asa triangular de vidrio de manera estéril (La asa se esteriliza a la llama tras bañarse en etanol cada vez). Se incuban las placas toda la noche a 37°C.

Si la transformación es positiva, se puede escoger los clones que se amplificarán toda la noche en LB suplementado con el antibiótico adecuado.

### **5.2.3. Aislamiento del DNA plasmídico**

Los protocolos de aislamiento de DNA plasmídico se pueden separarse en relación a la cantidad y a la pureza del plásmido que se obtiene. Con la mini-prep (Promega) se obtiene una cantidad pequeña y poco pura de plásmido pero es un método muy rápido. Para obtener cantidades mayores y más puras de plásmido es conveniente realizar una midi o maxi-prep (Qiagen).

### **5.2.4. Preparación y aislamiento del inserto**

Es conveniente tener partes cohesivas entre el plásmido y el inserto que queremos ligar. En el plásmido existe un *multi-cloning site*, secuencias con diversas dianas de restricción que se pueden utilizar para ligar el inserto. Deben elegirse enzimas que no corten dentro del inserto (existen diferentes programas en la web como por ejemplo: <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) y, si se eligen dos enzimas diferentes en 3' y en 5', éstas idealmente deberían poder reaccionar en el mismo tampón.

#### **5.2.4.1. Diseño de los *primers***

Una vez elegidos los enzimas, se puede diseñar *primers*, con dianas de restricción que añadiremos por polimerización a los insertos. Es importante que después de la ligación se conserve la pauta de lectura. Es preferible acabar los *primers* por los nucleósidos C o G.

Modelo del primer:

5' NNNN NNNNNN NNNNNN ATG.....3'

NNNN: Cola de 4 nucleósidos elegidos de tal manera que no se forme una doble hélice con el resto del primer.

NNNNNN: Diana de restricción.

NNNNNN: Nucleósidos presentes por delante del ATG en el inserto. Su número permite de mantener la pauta de lectura.

NNNNNNATG.....: Parte del primer complementaria al inserto. 12 nucleósidos complementarios son suficientes.

Primers de rCNT1-GFP:

Enzimas de restricción: EcoRI en 5' y SmaI en 3'.

Primer con diana Eco RI: 5' ATCGGAATTCCTGGGACATGGAGAACGAC<sub>3</sub>'

Primer con diana SmaI: 5' AAAACCCGGGGGAGAACAGCCC<sub>3</sub>'

Primers de pcDNA3-rCNT2:

Enzimas de restricción: EcoRI en 5' y NotI en 3'.

Primer con diana Eco RI:

5' GGGGGAATTCAGATGGCGAAGTCAGAGGG<sub>3</sub>'

Primer con diana NotI: 5' TTTTGCGGCCGCTCCCTTGTCTTGCCAGGG<sub>3</sub>'

Primers de rCNT2-EYFP:

Enzimas de restricción: EcoRI en 5' y SmaI en 3'.

Primer con diana Eco RI: 5' GGGGGAATTCAGATGGCGAAGTCAGAGGG<sub>3</sub>'

Primer con diana SmaI: 5' TTTTCCCGGACTTGTCTTGCCAGGG<sub>3</sub>'

Primers de pcDNA3-MYC-rCNT2:

Enzimas de restricción: EcoRI en 5' y NotI en 3'.

Primer con diana Eco RI y la secuencia MYC:

5' GGGGGAATTCAGATGGAGCAAAGCTGATTTCTGAGGAGGATCTGGTCATG  
GCCGAAGTCAGAGGG<sub>3</sub>'

ATGGAGCAAAGCTGATTTCTGAGGAGGATCTGGTC: secuencia de MYC.

Primer con diana NotI: 5' TTTTGCGGCCGCTCCCTTGTCTTGCCAGGG<sub>3</sub>'

### 5.2.4.2. Amplificación de los *primers* por PCR

A partir de los *primers* del inserto y del kit de polimerasa (Expand High fidelity PCR System, Invitrogen) se puede amplificar por PCR el inserto añadiéndole las dianas de restricción para facilitar su subclonación en otros plásmidos.

Se utiliza una polimerasa de alta fidelidad para evitar mutaciones en el inserto amplificado. La amplificación se realiza siguiendo las instrucciones del kit.

Para los oligonucleótidos más largos, superiores a 30 nucleótidos, se puede añadir 1  $\mu$ l de DMSO para facilitar la unión del primer

#### Reactivos:

	concentración inicial	concentración final	$\mu$ l/muestra
Primers (F y R)	20 mM	400 $\mu$ M	1
Tampón con MgCl <sub>2</sub>	10 x		5
dNTPs	10 mM	200 $\mu$ M	1
cDNA	100 ng		x
DNA polimerasa (Taq High fidelity)		2 unidades	0.5
H <sub>2</sub> O milli Q			50 – 7.5 – x
Volumen final			50

#### Procedimiento:

La DNA polimerasa se añade a una temperatura de 80°C (temperatura de máxima eficiencia de la enzima) tras un paso de 5 minutos a 94°C, evitando así extensiones inespecíficas

Se realizaron 35 ciclos de PCR:

- La desnaturalización: 30 s a 94°C.
- Annealing (unión de los primers): 30 s a 50°C.
- Extensión de los primers: para fragmentos hasta 3 kb la extensión se lleva a cabo a 72°C durante 2 minutos.
- Extensión final: para favorecer la extensión de los fragmentos que hayan podido quedar parcialmente sintetizados, después del último ciclo de amplificación se mantiene una temperatura de 72°C durante 7 minutos.

### **5.2.4.3. Electroforesis en gel no desnaturizante de agarosa**

Para saber si la amplificación es positiva, se puede cargar el producto de PCR y el plásmido inicial en un gel de electroforesis.

En electroforesis de geles de agarosa, los fragmentos de DNA se separan en función de su tamaño. Se suele utilizar una concentración de agarosa del 1% en tampón TAE 1X o TBE 0.5X. Para ver fragmentos de DNA pequeños (300 Kb o menos) es mejor aumentar la concentración de agarosa.

#### Reactivos:

- Agarosa SeaKem (FMC BioProducts).
- Tampón TAE 10x: Tris Base 0.4 M, ácido acético glacial 0.2M, EDTA 0.01 M.
- Tampón TBE 10x: Tris Base 0.89M, ácido bórico 0.89 M, EDTA 0.02M.
- Loading dye ND: Sacarosa 40% (p/v), Cianol Xileno 0.25%, azul de bromofenol 0.25%.
- Bromuro de Etidio 10 mg/ml (Sigma).

#### Procedimiento:

Para un gel pequeño (aparato de electroforesis horizontal de Gibco-BRL, minigel modelo 200) se disuelven 0.3 g de agarosa en 30 ml de tampón TAE 1x o TBE 0.5x y se calienta hasta que la agarosa este disuelta totalmente. Se deja enfriar unos segundos y se añade 1.5 µL de bromuro de etidio. Se introduce un peine que permita cargar las muestras y se deja polimerizar el gel unos 20 minutos. Se quita el peine, se cubre el gel con tampón TAE 1x o con TBE 0.5X y se cargan las muestras a las que se añade 10% del volumen total de Loading Dye buffer. Se conecta la cubeta a una fuente de voltaje de manera que el DNA migre hacia el polo positivo. Una vez acabada la electroforesis, se observa el gel con luz ultravioleta, el DNA produce una fluorescencia rosada ya que el bromuro de etidio se intercala entre las bases de nucleótidos.

Para purificar las bandas de DNA obtenidas, es mejor utilizar el tampón TAE, ya que la eficiencia de recuperación es más alta.

### **5.2.5. Purificación de las bandas de DNA**

Las bandas se purifican con un kit de purificación “QIA quick Gel Extraction Kit” (Quiagen). Este kit permite la extracción y la purificación de 70 pb a 10 kb de DNA a partir de geles TAE o TBE. Con una cuchilla se corta la parte del gel que contiene el fragmento de DNA, se

disuelve el gel y se pasa la solución obtenida en una columna donde el DNA quedará retenido para su posterior purificación.

### **5.2.6. Cuantificación del DNA**

El DNA se puede cuantificar por electroforesis en gel de agarosa utilizando un marcador “DNA mass ladder” (invitrogen), o bien por espectrofotometría. Cuando la cantidad de DNA es muy baja el primer método es el más adecuado.

Por espectrofotometría, las muestras se diluyen en proporción 0.5-3 µl en 400 µl de agua destilada y se valoran en cubetas de cuarzo. Generalmente se realiza una doble lectura a dos longitudes de onda, 260 nm (longitud de máxima absorción de los ácidos nucleicos) y 280 nm (longitud de máxima absorción de las proteínas). La relación teóricamente óptima se encuentra entre 1.8 y 2. Si es superior, los ácidos nucleicos pueden estar degradados y, si es inferior, las muestras pueden contener un exceso de proteínas. La concentración se puede obtener con la fórmula siguiente:

$$[\text{DNA}](\mu\text{g}/\mu\text{l}) = [(\text{D.O.}(260\text{nm})/20 \mu\text{l}/\mu\text{g})] \times [(400+x) \mu\text{l en la cubeta}/x \mu\text{l de muestra}]$$

### **5.2.7. Ligación de fragmentos con DNA ligasa**

La DNA ligasa es un enzima que utiliza ATP como fuente de energía para catalizar la unión de dos cadenas de DNA entre los grupos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo de los nucleótidos adyacentes en extremos protuberantes o romos resultante de la digestión con enzimas de restricción. Se recomienda probar diferentes relaciones molares entre el vector y el inserto, se suelen utilizar las concentraciones de 1:1 y 1:3. Para calcular las cantidades de inserto y vector, se utiliza la fórmula siguiente:

$$\frac{\text{ng vector} \times \text{kb inserto}}{\text{kb vector}} \times \text{relación molar} \frac{\text{inserto}}{\text{vector}} = \text{ng inserto}$$

#### Procedimiento:

Es importante trabajar con material de partida muy concentrado de manera que se pueda obtener volúmenes de reacción bajos, inferiores a 10 µl. Se suele utilizar una cantidad de vector de 100 ng pero se puede trabajar con cantidades menores. Todas las ligaciones de esta tesis fueron

realizadas en incubaciones de 16°C durante toda la noche. Posteriormente, se transforman las células competentes con el producto de ligación (4.1.1.).

### **5.2.8. Secuenciación del DNA**

La secuenciación se realiza a partir del kit 2.0 “ABIPRISM BigDye Terminator Cycle Ready Reaction” de Applied Biosystems.

#### Procedimiento:

Se sintetizan fragmentos de DNA de todas las longitudes en el sentido 3'-5' tanto de una cadena como de su complementaria gracias a los terminadores del kit y de oligonucleótidos específicos del DNA a secuenciar por PCR.

Se necesita para cada secuenciación una cantidad de plásmido que puede variar entre 0.2 y 0.5 µg, 3.2 pmol de oligonucleotidos, 8 µl de *reaction Mix* del kit de secuenciación y agua bidestilada libre de nucleasas hasta un volumen final de 20 µl. Una vez obtenido el producto de PCR siguiendo las instrucciones del kit (25 ciclos a 96°C 10 s, 50°C 5s y 60°C 4 min), el DNA se precipita con etanol. Para precipitar, se añaden a los 20 µl de DNA, 60 µl de etanol (100%) y 5 µl de EDTA (125 mM), la mezcla se deja a temperatura ambiente durante 15 min, se centrifuga 20 min, a 14000 rpm, a 4°C, se elimina el etanol y se añade 200 µl de etanol a 70 %, que se elimina después de una ultima centrifugación a 14000 rpm durante 2 min a 4°C. Las muestras así purificadas se pueden analizar, en el servicio de secuenciación de la Universidad de Barcelona, utilizando un secuenciador de DNA por electroforesis capilar ABIPRISM 3700 de Applied Biosystems.

### **5.2.9. Transfección transitoria en líneas celulares**

La adquisición del transgén de interés por parte de la célula puede ser transitorio o estable. En el primer caso, el DNA tiene una situación extracromosómica y se pierde durante la división celular. En esta tesis, se utilizó como método de transfección el “Fugene 6 Transfection Reagent” (Boehringer), que es una mezcla multi-lipídica de formulación no liposomal. Este sistema se caracteriza por una alta eficiencia de transfección y una ausencia de toxicidad.

#### Procedimiento:

Las transfecciones de esta tesis se realizaron en líneas celulares CHO-K1 en placas de 24 pocillos (Cultek). Las placas se siembran a una densidad que permita obtener, después de uno o dos días, una confluencia de 50-70%. La transfección se realiza con una confluencia de 50%

aproximadamente con el “Fugene<sup>TM</sup>6 Transfection Reagent” (Boehringer Mannheim), mezcla multi-lipídica. En placas de 24 pocillos, la relación Fugene/DNA es de 3  $\mu$ l de fugene/ $\mu$ g de DNA y se suele utilizar 0.4  $\mu$ g de DNA por pocillo. El medio de cultivo utilizado durante la transfección no contiene suero sino BSA, así se puede optimizar la eficiencia de la transfección. Se calculan 25  $\mu$ l de medio por pocillo que se ponen en un tubo eppendorf, se añade el Fugene y solo después el DNA. Después de una incubación a temperatura ambiente de 15-30 minutos, se puede añadir la mezcla a las células. El medio se podrá cambiar sólo 4 horas después de la transfección.



## ***RESULTADOS***



# **Capítulo 1**

## **Distribución subcelular de los transportadores concentrativos rCNT1 y rCNT2 en hepatocitos de rata.**

Duflot S, Calvo M, Casado FJ, Enrich C, Pastor-Anglada M. **Concentrative nucleoside transporter (rCNT1) is targeted to the apical membrane through the hepatic transcytotic pathway.** *Exp Cell Res.* 2002 Nov 15;281(1):77-85.

## **Antecedentes**

El origen y el mantenimiento de la polaridad funcional del hepatocito depende esencialmente de su tráfico proteico intracelular. Las proteínas de membrana, una vez maduras, se localizan según sus funciones en la membrana plasmática basolateral o en la membrana plasmática canalicular. Las proteínas de la membrana canalicular llegan a su destino de dos maneras diferentes: a) por una vía indirecta o vía de transcitosis, es decir desde el TGN a la membrana basolateral y de esta finalmente a la membrana canalicular (Bartles et al., 1987; Schell et al., 1992), b) por una vía directa o vía alternativa, desde el TGN a la membrana canalicular, como ocurre para los transportadores ABC canaliculares. (Kipp and Arias, 2000).

Como ya se ha indicado en el apartado de Introducción, estudios cinéticos, llevados a cabo en nuestro grupo, permitieron identificar las actividades de transporte N1 y N2 en hígado (Mercader et al., 1996). En hígado de rata, Che y colaboradores aislaron el cDNA codificando el transportador, rCNT2 (Che et al., 1995) y más tarde en nuestro grupo, Felipe y colaboradores clonaron rCNT1 (Felipe et al., 1998). La generación de los anticuerpos rCNT1 y rCNT2 permitieron corroborar la presencia de estos dos transportadores en hígado. La generación de anticuerpos contra CNT1 y CNT2 permitió determinar el enriquecimiento proteico de CNT2 y la baja presencia de CNT1 en membranas basolaterales de hígado de rata (Felipe et al., 1998).

En 1995, Che y colaboradores, lanzaron la hipótesis, teniendo en cuenta la importante producción de nucleósidos generada por las ecto-ATPasas de la membrana canalicular, de que los transportadores de nucleósidos podrían estar presentes en la membrana plasmática canalicular (Che et al., 1995).

Teniendo en cuenta estos antecedentes y con el objetivo de conocer mejor el metabolismo de los nucleósidos en hepatocitos, decidimos realizar un estudio para establecer la localización y de la distribución subcelular de los transportadores CNT1 y CNT2.

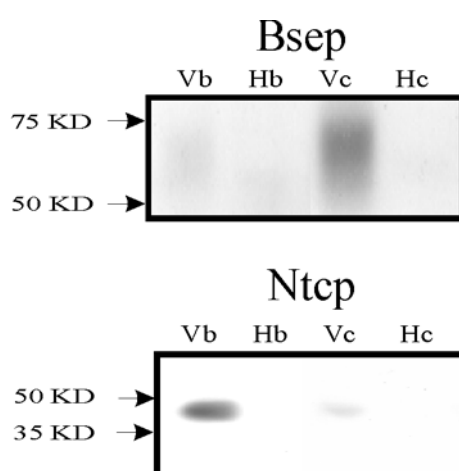
## **Resultados**

### **1.1. Determinación del enriquecimiento de las membranas aisladas**

Para determinar la presencia de las proteínas CNT1 y CNT2, en los diferentes dominios del hepatocito, aislamos y purificamos, a partir de hígado de rata, fracciones de membranas plasmáticas enriquecidas en dominios canalicular y basolateral de hepatocitos.

El enriquecimiento de estas membranas fue examinado analizando en cada preparación la actividad de la enzima 5'-nucleotidasa, respecto al homogenado de extracto crudo del hígado utilizado para su preparación. La 5'-nucleotidasa es una enzima específica de las membranas plasmáticas. El enriquecimiento medido era de 14 veces para las membranas canaliculares y de 28 para las membranas basolaterales, respecto a los homogenados iniciales.

También, mediante los anticuerpos contra los transportadores de ácidos biliares Bsep y Ntcp, marcadores específicos de las membrana canalicular y basolateral, respectivamente, analizamos por Western blot la pureza de las preparaciones (figura 15). Este último estudio permite un análisis más específico de cada fracción aislada que el simple análisis de la actividad 5'-nucleotidasa. En la figura 15 se observa un enriquecimiento de Bsep en la preparación de membrana canalicular y de Ntcp en la preparación de membrana basolateral. La presencia de Bsep y de Ntcp en la membrana basolateral y canalicular, respectivamente, es casi inexistente, así que las contaminaciones en cada preparación parecen insignificantes. De aquí se deduce que los métodos utilizados garantizan un correcto aislamiento de los dominios canalicular y basolateral de la membrana plasmática del hepatocito.

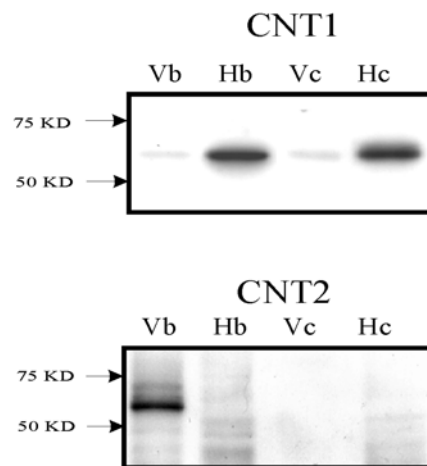


**Figura 15: Análisis por Western blot del enriquecimiento de las preparaciones de membrana basolateral (Vb) y canalicular (Vc) comparando con sus homogenados respectivos (Hb y Hc), mediante anticuerpos contra Bsep y Ntcp, transportadores de ácidos biliares de la membrana canalicular y basolateral respectivamente.**

## 1.2. Expresión de los CNTs en membranas canaliculares y basolaterales

### 1.2.1. Expresión proteica

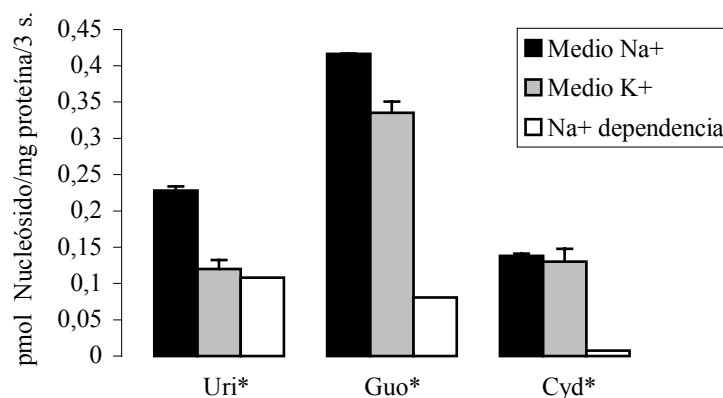
En las fracciones arriba caracterizadas analizamos por Western blot la presencia de CNT1 y CNT2 (figura 16). CNT1 se detecta en homogenados crudos y se expresa también, pero en cantidad menor, en las membranas basolaterales y canaliculares. En las preparaciones de membrana se detecta un tercio de la cantidad de CNT1 presente en los homogenados, lo que nos indica que la mayor parte de CNT1 expresado en hígado de rata debe ser intracelular. CNT2, a diferencia de CNT1 es casi inexistente en homogenados crudos y en membranas canaliculares mientras que se detecta abundantemente en membranas basolaterales.



**Figura 16: Distribución de rCNT1 y rCNT2 en membranas basolaterales y canaliculares de hígado de rata.** Análisis Western blot de CNT1 y CNT2 en las preparaciones de membrana basolateral (Vb) y canalicular (Vc) comparado con sus homogenados respectivos (Hb y Hc).

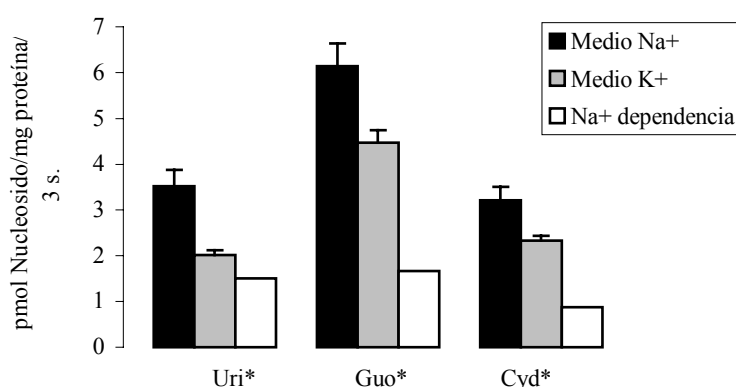
### 1.2.2. Expresión de la actividad de transporte de nucleósidos en membranas basolaterales y canaliculares

La actividad de transporte de uridina detectada en vesículas de membrana basolateral es similar a la actividad de transporte mediado por CNT2: no se detecta transporte concentrativo de citidina (sustrato de CNT1) y la entrada de guanosina (sustrato de CNT2) es dependiente de sodio (figura 18). Además, cuando se añade citidina durante el transporte de uridina, no se observa ninguna inhibición (no presentado). Estas observaciones concuerdan con la alta abundancia de la proteína CNT2 en este tipo de membrana.



**Figura 18: Actividades de transporte en membranas basolaterales.** Los sustratos trititados utilizados son la uridina (Uri) la guanosina (Guo) y la citidina (Cyd), a una concentración de 1  $\mu$ M. Los resultados provienen de 5 experimentos independientes.

Las vesículas de membrana canalicular, a diferencia de las vesículas de membrana basolateral, tienen una actividad de transporte de uridina dependiente de sodio, característica de la actividad mediada por CNT1 (figura 19). Sin embargo, se detecta también una entrada significativa de guanosina dependiente de sodio (Figura 19), transporte inhibible parcialmente por altas concentraciones de citidina (30% de inhibición con citidina a 100  $\mu$ M). Como ya hemos visto por Western blot, CNT2 no se detecta en membranas canaliculares; además, si CNT2 fuera responsable del transporte de guanosina en estas membranas, su actividad no tendría que ser inhibida por un nucleósido pirimidínico. Por lo tanto, este transporte de guanosina puede ser debido a otro transportador concentrativo, CNT3.

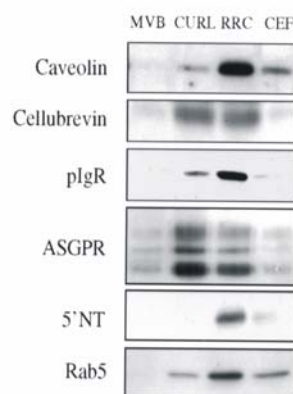


**Figura 19: Actividades de transporte en membranas canaliculares.** Los sustratos trititados utilizados son la uridina (Uri), la guanosina (Guo) y la citidina (Cyd), a una concentración 1  $\mu$ M. Los resultados provienen de 5 experimentos independientes.

### 1.3. Expresión de CNT1 en fracciones intracelulares

Con el objetivo de identificar por qué ruta (directa o indirecta) llega a insertarse CNT1 en la membrana canalicular, aislamos varias fracciones endocíticas y analizamos la presencia de este transportador. Aislamos tres tipos de fracciones endosomales: MVB (*multivesicular bodies*), CURL (*Compartment of uncoupling receptors ligands*) y RRC (*receptor-recycling compartment*), y una fracción de membrana plasmática sinusoidal enriquecida en caveolas (CEF). Estas fracciones aisladas en el laboratorio del Dr Carles Enrich (Barcelona) fueron caracterizadas bioquímicamente y morfológicamente (Pol et al., 1997; Pol et al., 1999). Cada fracción endosomal fue caracterizada por Western blot, con los siguientes marcadores específicos (figura 20): Cellubrevin y Rab 5, dos proteínas de los endosomas precoces; el receptor de inmunoglobulina polimérico (pIgR) y la 5'-nucleotidasa (5'NT), proteínas de transcitosis, y la ASGP-R, marcador de receptores reciclados. La caveolina es un marcador de las fracciones CEF. Análisis bioquímicos y de microscopía electrónica previos mostraron que estas estructuras provienen de la membrana plasmática sinusoidal (Pol et al., 1999).

Por análisis de Western blot detectamos la presencia de la caveolina en las fracciones CURL, RRC y CEF, pero no en los endosomas tardíos (MVB). La figura 20 muestra que el enriquecimiento en caveolinas parece más alto en la fracción RRC que en la fracción CEF ( $10.5 \pm 3$  y  $4.6 \pm 2$ , respectivamente), pero considerando la cantidad de proteínas cargadas en este Western blot, es en la fracción CEF (con un 61%) donde se detecta la cantidad más grande de caveolinas, seguida de la fracción RRC (con un 35%) y la fracción CURL (con un 4%).

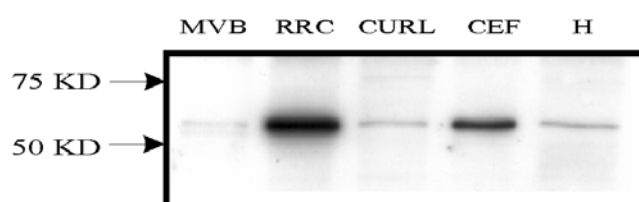


**Figura 20: Caracterización bioquímica de las fracciones endosomales enriquecidas en caveolas.**

MVB: endosomas tardíos, CURL: endosomas precoces, RRC: compartimento de reciclaje de receptores y CEF: fracción de membrana sinusoidal enriquecida en caveolas. Cellubrevin y Rab5: marcadores endosomales, pIgR y ASGPR: receptores hepáticos presentes en los endosomas, 5'nucleotidasa (5'NT): proteína GPI-anchored enriquecida en RRC.



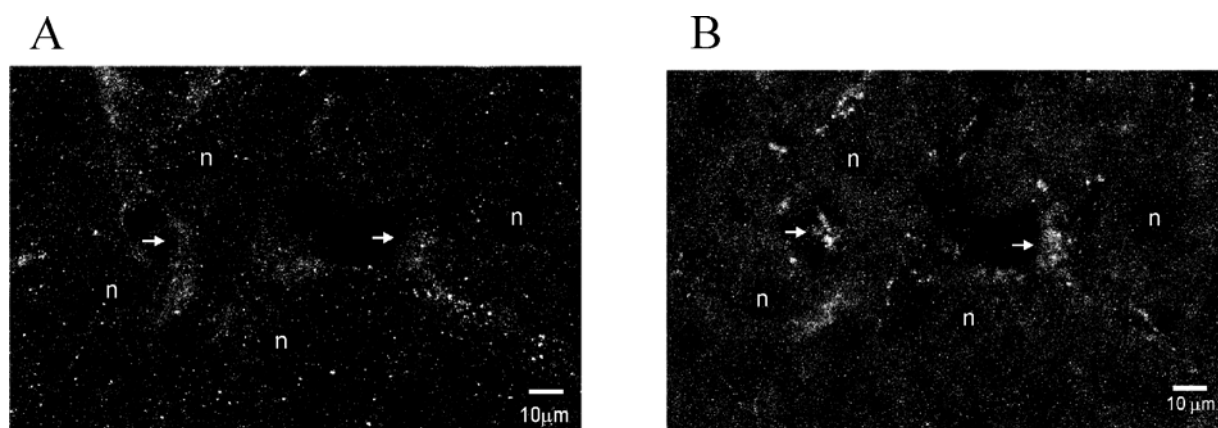
En las fracciones endosomales y en CEF, analizamos la presencia de los transportadores CNT1 y CNT2 por Western blot. Como se muestra en la figura 21, el transportador CNT1 se detecta en las tres fracciones endosomales y en CEF, en cantidad variable según la fracción, mientras que CNT2 no se detecta en ninguna. El enriquecimiento de CNT1, en cada fracción subcelular, ha sido calculado en relación a la cantidad de proteína detectada en el homogenado crudo y la cantidad de proteína detectada en cada fracción endosomal y es de 6.3 para RRC, 3.0 para CEF, 0.8 para CURL y 0.4 para MVB. Estos datos nos permiten confirmar que una gran parte de CNT1 expresada en hepatocito es intracelular.



**Figura 21: Análisis por Western blot de la distribución del transportador de nucleósidos CNT1 en fracciones endosomales MVB, RRC y CURL, en fracción enriquecida en caveolas (CEF) y en homogenado de rata (H).**

#### 1.4. Análisis por microscopía de fluorescencia de la localización de CNT1 y de las caveolinas

Como en las fracciones enriquecidas en caveolinas se puede detectar el transportador CNT1, analizamos la localización de CNT1 y las caveolinas en cortes congelados de hígado previamente fijados en paraformaldehído (figura 22). En la membrana sinusoidal (figura 22) existe una cierta proximidad entre las proteínas CNT1 y caveolina, pero no se observa colocalización.

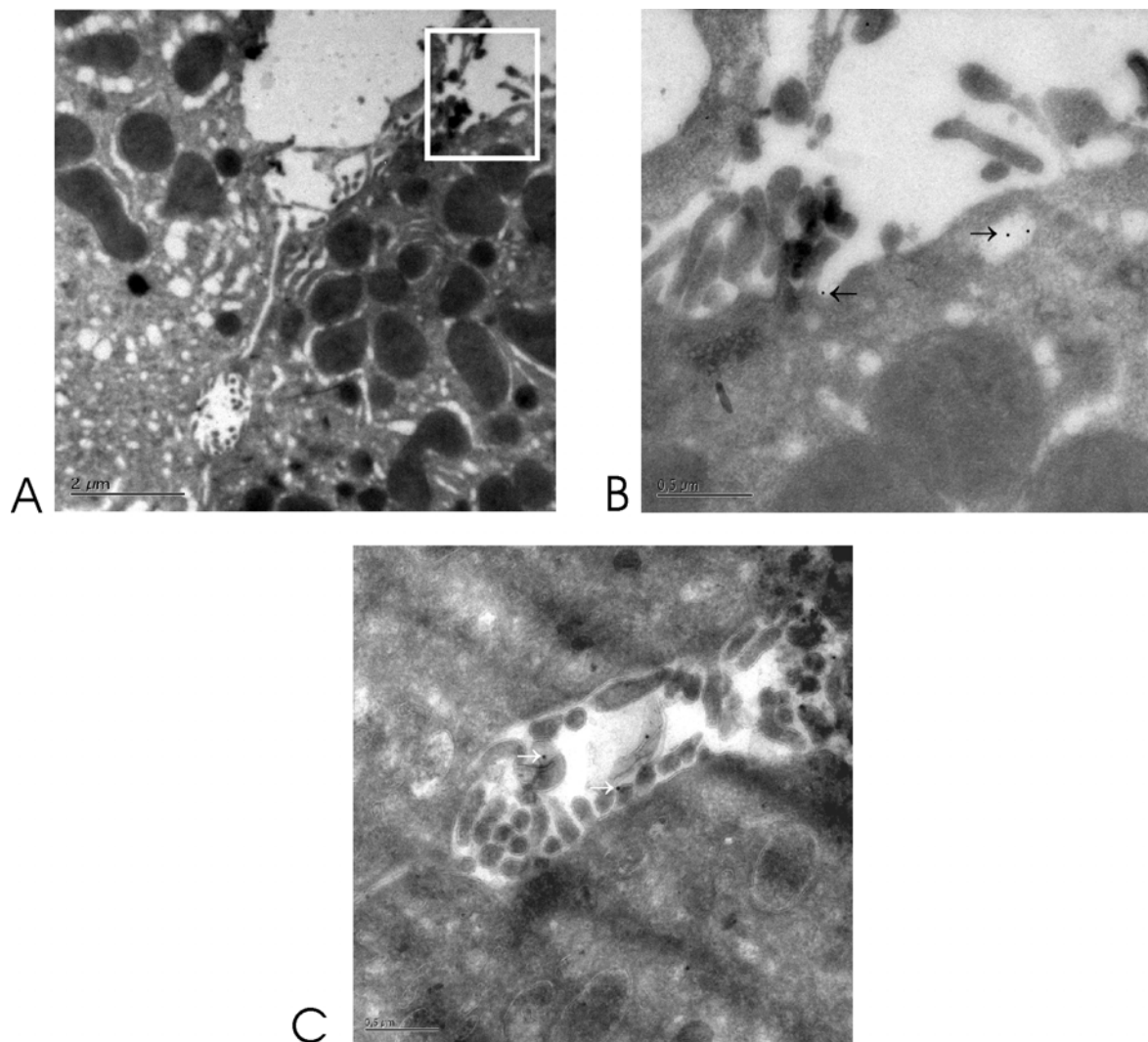


**Figura 22: Inmunohistoquímica de rCNT1 (A) y caveolinas (B) realizadas en cortes de hígado de rata fijados con paraformaldehído. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron para CNT1, el anti-conejo oregon-green y el anti-conejo Texas-red para caveolina. Se puede apreciar una localización cercana de las proteínas a nivel de la membrana basolateral (flechas blancas). n: núcleo.**

## 1.5. Localización subcelular de CNT1 y CNT2 por microscopía electrónica

### 1.5.1. Inmunolocalización de CNT1 y CNT2

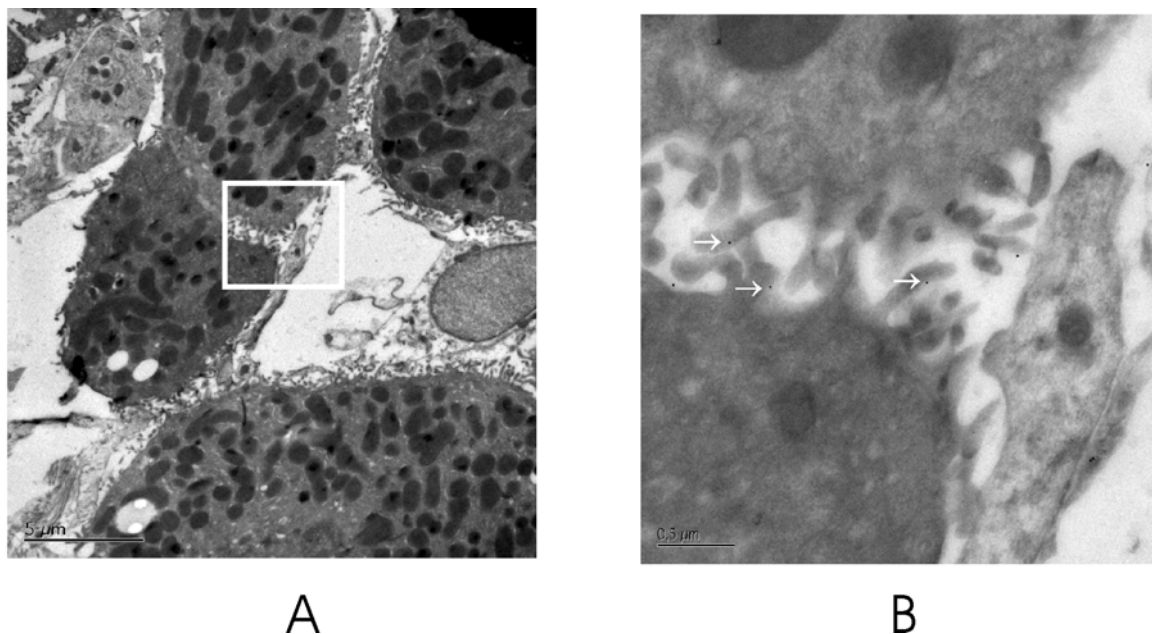
La figura 23A muestra el dominio sinusoidal amplificado en la figura 23B, en el cual CNT1 está localizado a nivel de la membrana plasmática, en zonas de invaginaciones y en vesículas endosomales precoces. La presencia de CNT1 en zonas de invaginaciones concuerda con su detección en las fracciones CEF por Western blot. En la figura 23B, se puede ver la presencia del marcaje de CNT1 en las microvellosidades de la membrana apical del hepatocito.



**Figura 23: Inmunolocalización de rCNT1 en CEF, vesículas endosomales y en membrana canalicular.**

Los cortes ultrafinos preparados por crioinmuno-electromicroscopía fueron marcados con el anticuerpo policlona rCNT1. El dominio basal que se muestra en A está amplificado en B, se puede observar rCNT1 en la membrana basolateral y en las vesícula endosomales precoces (indicado por flechas). Se puede ver la presencia de rCNT1 en la membrana canalicular, mostrada por flechas en C.

En la figura 24A está presentado el dominio sinusoidal amplificado en la figura 24B. El transportador rCNT2 está localizado en las microvellosidades de la membrana plasmática basolateral, lo que concuerda con la actividad de transporte y con el análisis Western-blot de las vesículas de membrana basolateral.



**Figura 24: Inmunolocalización de rCNT2 en la membrana plasmática basolateral.** Los cortes ultrafinos preparados por crioinmuno-electromicroscopía fueron marcados con el anticuerpo policlonal rCNT2. El dominio basal que se muestra en A está amplificado en B, se puede observar rCNT2 en las microvellosidades de la membrana basolateral (ver flechas).

### 1.5.2. Distribución subcelular de CNT1 y CNT2

A partir de cortes ultrafinos de hígado de rata previamente fijados con paraformaldehído y crioprottegidos en sacarosa, analizamos por microscopía electrónica la localización subcelular de los transportadores CNT1 y CNT2 (figuras 23 y 24).

La tabla 6 muestra la distribución de CNT1 y CNT2 en las membranas de hepatocito, a partir de las diferentes inmunohistoquímicas realizadas. CNT2 se localiza fundamentalmente en las microvellosidades del dominio sinusoidal del hepatocito con un 84% del marcaje total. CNT1 es principalmente intracelular, localizado en la membrana apical y en las vesículas intracelulares, con un 35% y un 37%, respectivamente, del marcaje total.

CNT2 es mayoritariamente basolateral y no se detecta en membranas canaliculares, mientras que CNT1 es esencialmente intracelular y canalicular.

	Membrana plasmática	Oro % del total	Vesículas intracelulares	Membranas intracelulares	Otros
CNT1	Basolateral	6,25	37	18,8	3
	Apical	35			
CNT2	Basolateral	84	2	4	10
	Apical	N.D.			

**Tabla 6: Distribución de rCNT1 y rCNT en membranas de hepatocitos.** rCNT1 y rCNT2 fueron detectados en criosecciones de hígado de rata marcadas con los anticuerpos anti-CNT1 y anti-CNT2 y Proteína A gold (10 nm). Las secciones fueron examinadas, digitalizadas y fotografiadas mediante un microscopio electrónico JEOL JEM 1010. Un total de 310 (210, CNT1 y 100, CNT2) partículas de oro asociadas a membrana fueron contadas, correspondiente a 50 campos procedentes de 10 secciones. El porcentaje total de oro corresponde a la cantidad total de partículas de oro encontradas en un dominio subcelular particular. Las partículas de oro asociadas a membrana (basolateral o canalicular) fueron distinguidas por marcaje en las vesículas intracelulares o membranas intracelulares o asociadas con células no parenquimales o en los componentes de la matriz extracelular (otros).

## **Capítulo 2**

### **Regulación post-traducciona del transportador CNT2 por agonistas purinérgicos en hígado de rata.**

Duflot S, Riera B, Fernandez-Veledo S, Casado V, Norman RI, Casado FJ, Lluís C, Franco R, Pastor-Anglada M. **ATP-sensitive K(+) channels regulate the concentration of adenosine transporter CNT2 following activation by A(1) adenosine receptors.** Mol Cell Biol. 2004 Apr;24(7):2710-9.

## **Antecedentes**

La señalización purinérgica es un proceso fundamental en la regulación de casi todos los tipos celulares estudiados hasta ahora. Las células parenquimales del hígado expresan varios receptores de adenosina (P1) y de nucleótidos purinérgicos (P2). En el hígado, la activación de los receptores purinérgicos por unión específica de nucleótidos o nucleósidos y sus agonistas, contribuye a la regulación del metabolismo, la activación de la síntesis proteica, la inducción de los canales iónicos, la regulación del volumen celular, la secreción y la formación de la bilis (Feranchak and Fitz, 2002). La estimulación purinérgica en hígados perfundidos y aislados tiene efectos similares a una inducción de las células hepáticas con glucagón, ya que afecta significativamente a la glucogenogénesis y la ureogénesis (Haussinger et al., 1987; Keppens and De Wulf, 1991).

La adenosina ha sido estudiada sobre todo por su papel como neurotransmisor en el sistema nervioso central, mientras que su papel en la regulación de las funciones hepáticas es poco conocido todavía. No obstante el hígado expresa todos los receptores de adenosina ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  y  $A_3$ ) (Dixon et al., 1996). Se sabe que en hepatocitos aislados de rata, la activación del receptor  $A_1$  y de  $A_3$  disminuyen el nivel de AMPc intracelular y provocan, sobretodo  $A_1$ , la glicogenogénesis mediante la liberación de  $Ca^{2+}$  mientras que la activación del receptor  $A_2$  activa la formación de AMPc, induciendo así la gluconeogénesis (Gonzalez-Benitez et al., 2002). La adenosina disponible para esos receptores depende de la hidrólisis, catalizada por las ectonucleotidasas, del ATP, ADP y AMP (Roman and Fitz, 1999; Latini and Pedata, 2001). Los transportadores de nucleósidos podrían estar implicados en la modulación de la disponibilidad de adenosina para los receptores. Existen evidencias de la implicación de los transportadores equilibrativos (ENTs) en este proceso aunque casi todas provienen del estudio de sistemas neuronales (Correia-de-Sa and Ribeiro, 1996; Parkinson et al., 2000; Ackley et al., 2003).

En la mayoría de las células, transporte y metabolismo están acoplados de manera que la concentración citosólica de nucleósidos sea baja, por lo que los transportadores más involucrados suelen ser de tipo equilibrativo (Plagemann et al., 1988). Una de las particularidades del hígado está en el hecho de tener concentraciones de nucleósidos intracelulares más altas que en sangre (Darnowski et al., 1987), así que los transportadores concentrativos pueden tener un papel más importante en hígado que en otros órganos. El transportador de nucleósidos concentrativo CNT2, preferente por purinas, presenta una  $K_m$  más baja para adenosina e inosina que el transportador ENT1 (8 *versus* 40  $\mu M$  y 4 *versus* 170  $\mu M$ , respectivamente) (Wang et al., 1997; Mackey et al.,

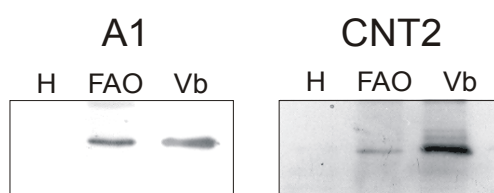
1999; Ward et al., 2000), lo que sugiere que es el mejor candidato por modular las concentraciones extracelulares de adenosina.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos plantamos poner de manifiesto si existe alguna relación funcional entre la regulación purinérgica y el transportador de alta afinidad para la adenosina CNT2. Para ello hemos analizado si la actividad de CNT2 está regulada por agonistas de receptores de adenosina.

## Resultados

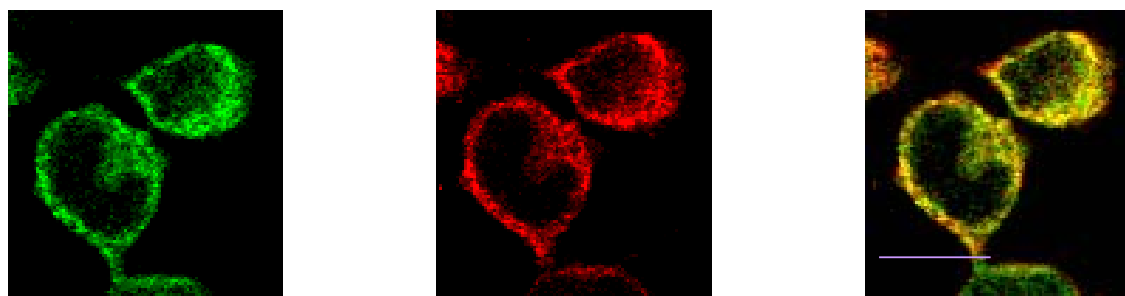
### 2.1. Expresión de CNT2 y del receptor A<sub>1</sub> en hígado de rata

Detectamos por análisis Western blot (figura 25), la presencia de las proteínas de CNT2 y del receptor A<sub>1</sub> en la membrana plasmática basolateral de hígado de rata. Asimismo pudimos detectar estas dos proteínas en extractos crudos de células Fao.



**Figura 25: Análisis Western blot del receptor de adenosina A<sub>1</sub> y del transportador concentrativo de nucleósido CNT2 en membrana plasmática basolateral de hígado de rata y en la línea celular de hepatoma de rata Fao.** Se observa un enriquecimiento del receptor A<sub>1</sub> y del transportador CNT2 en membrana basolateral (Vb), estas proteínas se detectan también en la línea celular Fao pero no en homogenados crudos de rata (H).

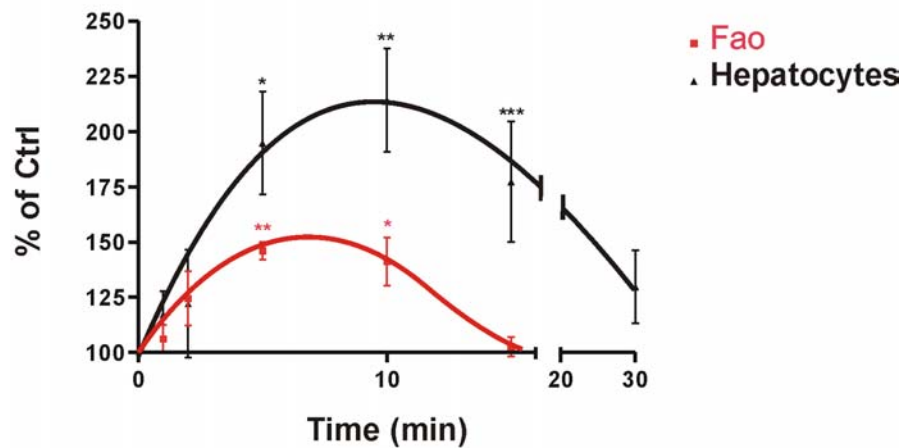
Por ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal, en la línea celular Fao, detectamos en la membrana plasmática colocalizaciones parciales del transportador CNT2 y del receptor A<sub>1</sub> (ver figura 26).



**Figura 26: Detección por microscopía confocal de la colocalización del transportador CNT2 y del receptor A<sub>1</sub> en células Fao.** Las células permeabilizadas fueron marcadas con el anticuerpo anti CNT2 conjugado con Cyn5 (verde) y el anticuerpo anti A<sub>1</sub> conjugado con cyn3 (rojo). En la última imagen, la superposición de las imágenes de CNT1 y CNT2 revela, en amarillo, la colocalización de ambas proteínas. La barra de escala es de 10 µm.

## 2.2. Inducción de la actividad de transporte CNT2 mediante incubaciones de las células con R-PIA

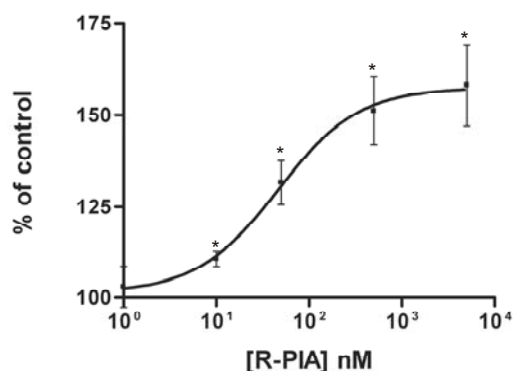
Con el objetivo de determinar si la actividad de transporte de CNT2 está modulada por la activación de receptores de adenosina, preincubamos de los tipos celulares estudiados, cultivo primario de hepatocitos de rata y de la línea celular Fao con el agonista de los receptores de adenosina R-PIA, a diferentes tiempos, antes de medir el transporte de uridina (figura 27). Se puede observar una inducción de la actividad de transporte de uridina dependiente de sodio, con un efecto máximo entre 5 y 10 minutos, después de añadir la R-PIA. La activación de este transporte inducido por R-PIA tiene más amplitud y es más duradera en hepatocitos que en Fao. La inducción del transporte de uridina dependiente de sodio en las células Fao se mantiene inalterada cuando se cambia el sustrato por guanosina (sustrato preferente de CNT2 en estas células), pero no cuando se utiliza citidina (sustrato preferente de CNT1 y CNT3, ausentes en células Fao). Por lo tanto, en experimentos posteriores, pasamos a utilizar el sustrato más específico de CNT2, la guanosina. De esta manera, también evitábamos la utilización de adenosina, que podría interferir en los resultados debido a su doble papel, como sustrato del transportador y como ligando de los receptores de adenosina.



**Figura 27: Activación purinérgica de CNT2.** Estudio de la entrada de uridina dependiente de sodio en hepatocitos y en células Fao, mediante el transportador CNT2, después de incubar las células durante diferentes tiempos (1, 2, 5, 10, 15, 20 y 30 min) con R-PIA (50 nM). Los resultados, realizados por cuadruplicado provienen de 9 y 10 experimentos independientes en hepatocitos y Fao, respectivamente. Los datos expresan, en porcentaje, la actividad de transporte dependiente de sodio calculada después de las incubaciones, respecto a la actividad basal control. Los valores medios de las actividades basales son en hepatocitos y en Fao, respectivamente, de  $4 \pm 0.3$  y de  $8 \pm 0.7$   $\mu\text{mol}$  de uridina/mg de proteína. El análisis de la varianza indica actividades de transporte es significativamente elevada ( $P < 0.01$ ). (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  y \*\*\*:  $p < 0.001$ , t-student vs control).

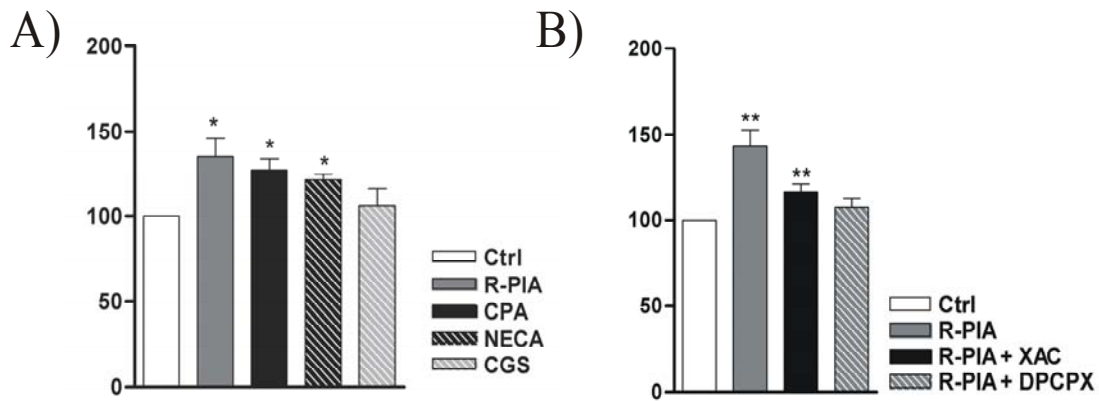


Tanto en la línea celular Fao como en hepatocitos, el transporte sodio-independiente de guanosina es sensible a NBTI, y por lo tanto, corresponde a ENT1, cuando se estudió esta componente de transporte en presencia de R-PIA, no se observó ningún efecto (no mostrado). Al analizar la curva dosis-respuesta del transporte dependiente de sodio de guanosina frente a la R-PIA, se pudo obtener un valor de  $IC_{50}$  (dosis de R-PIA eficaz en un 50%) de  $40 \pm 10$  nM (Figura 28).



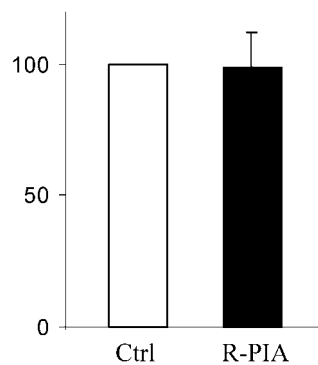
**Figura 28: Estudio de la actividad de transporte de guanosina dependiente de sodio, en la línea celular Fao, después de tratamientos durante 5 min con diferentes concentraciones de R-PIA.** Los resultados, obtenidos por cuadruplicado provienen de 4 experimentos independientes. Los datos expresan, en porcentaje, la actividad de transporte dependiente de sodio calculada después de las incubaciones, respecto a la actividad basal control. Los valores medios de las actividades basales son de  $15.9 \pm 0.0$   $\mu$ mol de guanosina/min/mg de proteína. (\* :  $p < 0.05$ , t student vs control).

No obstante, como ya se ha indicado, R-PIA, además de ser agonista del receptor  $A_1$ , es también agonista de los receptores  $A_{2a}$ ,  $A_{2b}$  y  $A_3$  pero de manera menos específica (Fredholm et al., 2001). Para identificar el receptor de adenosina implicado en la regulación purinérgica de CNT2, utilizamos diferentes agonistas y antagonistas más o menos afines por los diferentes receptores de adenosina. La actividad de transporte de CNT2 medida después de preincubar las células Fao con los diferentes agonistas se induce de manera diferencial según el agonista utilizado (figura 29A). Se detecta una inducción mayor con R-PIA, menor con CPA y NECA e inexistente con CGS, orden de potencia correspondiente a la afinidad del receptor  $A_1$  por aquellos agonistas. Con el objetivo de caracterizar el antagonista más específico del receptor involucrado en la inducción de CNT2, antes del tratamiento con R-PIA (50 nM), preincubamos las células Fao con los antagonistas XAC y DPCPX, durante 15 minutos, a una concentración de 1  $\mu$ M, y medimos la actividad de transporte de guanosina dependiente de sodio (figura 29B). XAC contrarresta parcialmente la activación de CNT2 inducida por R-PIA, mientras que DPCPX la bloquea completamente. Estos últimos resultados corroboran la activación de CNT2 mediante el receptor  $A_1$ , ya que este receptor tiene más afinidad por DPCPX que por XAC.



**Figura 29: Efectos de diferentes agonistas y antagonistas en la actividad de transporte de CNT2 en la línea celular FaO.** (A) Actividad de transporte de guanosina dependiente de sodio medida después de preincubar las células 5 min con diferentes agonistas de los receptores de adenosina (R-PIA, CPA, NECA y CGS, a 50 nM cada uno). (B) Actividad de transporte de guanosina dependiente de sodio medida después de preincubar las células 15 minutos, con XAC y DPCPX (1  $\mu$ M), dos antagonistas de los receptores de adenosina y con R-PIA (50 nM) durante 5 min. Los datos expresan, en porcentaje, la actividad de transporte dependiente de sodio calculada después de las incubaciones, respecto a la actividad basal control. Los valores medios de las actividades basales son de  $15.9 \pm 0.0$   $\mu$ mol de guanosina/min/mg de proteína. (\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ , t-student vs control).

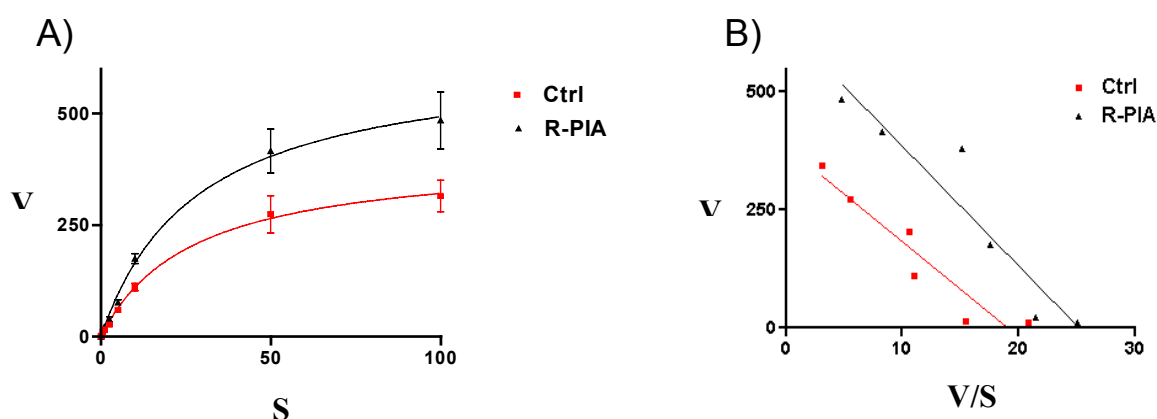
Para demostrar la especificidad de la activación purinérgica de CNT2, medimos la actividad de transporte dependiente de sodio del aminoácido alanina (0.1 mM) en la línea celular FaO tras incubación con R-PIA (50 nM) durante 5 minutos (Figura 30). La figura 30 muestra que el agonista del receptor  $A_1$  no afecta en absoluto el transporte dependiente de sodio de alanina.



**Figura 30: Estudio de la actividad de transporte de alanina dependiente de sodio, en células FaO, tras tratamientos con R-PIA.** Actividad de transporte de alanina (0.1 mM) dependiente de sodio medida tras preincubar las células 5 min con R-PIA (50 nM). Los resultados, obtenidos por cuadruplicado provienen de 3 experimentos independientes. Los datos expresan, en porcentaje, la actividad de transporte dependiente de sodio calculada después de las incubaciones, respecto a la actividad basal control. Los valores medios de las actividades basales son de  $8.4 \pm 0.9$  nmol de alanina/min/mg de proteína.

### 2.3. Efecto de la inducción de R-PIA sobre la cinética del transportador CNT2

La activación rápida de la entrada de nucleósidos mediada por CNT2 podría estar relacionada con una disminución de los valores de la  $K_m$  aparente de los sustratos o un aumento de la  $V_{max}$ . Para determinar el impacto de R-PIA sobre la cinética de CNT2, medimos el transporte de guanosina dependiente de sodio utilizando diferentes concentraciones de guanosina (de 1 a 100  $\mu\text{M}$ ), en ausencia y en presencia de pre-incubaciones con R-PIA a 50 nM durante 5 minutos (Figura 31). Se calcularon las  $K_m$  y las  $V_{max}$  según dos métodos, el método de Michaelis-Menten (Figura 31A) y de Eadie-Hofstee (figura 31B). Comparando las  $V_{max}$  y las  $K_m$  de la cinética control y de la cinética realizada después de la inducción purinérgica, vemos que la  $K_m$  es relativamente estable (14 versus 19  $\mu\text{M}$ ), mientras que la  $V_{max}$  es casi un 60% más alta en las células pre-incubadas con R-PIA (693 versus 426 pmol de guanosina/min/mg de proteína). El estudio estadístico de la varianza de este cambio cinético es significativo:  $p < 0.01$ .



**Figura 31: Caracterización cinética del efecto de R-PIA sobre la actividad de transporte de CNT2 en células FAO.** (A) Caracterización cinética de tipo Michaelis-Menten, del transporte de guanosina dependiente de sodio utilizado a varias concentraciones (de 1 a 100  $\mu\text{M}$ ) con pre-incubaciones con R-PIA a 50 nM durante 5 min (R-PIA) y sin incubaciones (Ctrl). (B) Caracterización cinética de tipo Eadie-Hofstee de los datos de A. Los resultados representan la media y el error estándar, de cuadruplicado, de 7 determinaciones cinéticas independientes.

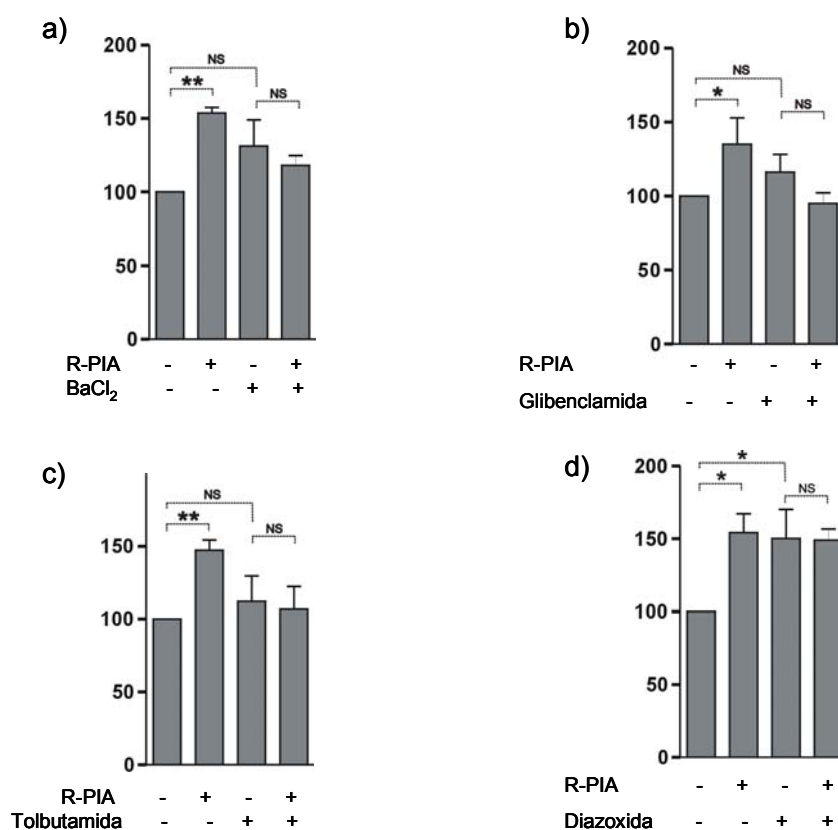
### 2.4. Implicación de los canales de potasio en la activación de CNT2 mediante R-PIA

Se ha propuesto, en algunos tipos celulares, que la activación purinérgica podría aumentar la conductancia de  $\text{K}^+$  (Baxter and Yellon, 1999; Light et al., 2001; Nayeem and Mustafa, 2002). Para saber si los canales de potasio están involucrados en la activación de CNT2 mediante la inducción del receptor  $\text{A}_1$ , estudiamos el efecto de un inhibidor de la conductancia de  $\text{K}^+$ , el  $\text{BaCl}_2$ .

Incubamos las células Fao con BaCl<sub>2</sub>, a 100 μM durante 30 minutos, antes de tratarlas o no con R-PIA. El tratamiento de las células con BaCl<sub>2</sub> no afecta significativamente al transporte basal de guanosina dependiente de sodio pero bloquea la activación purinérgica de CNT2 (ver figura 32a).

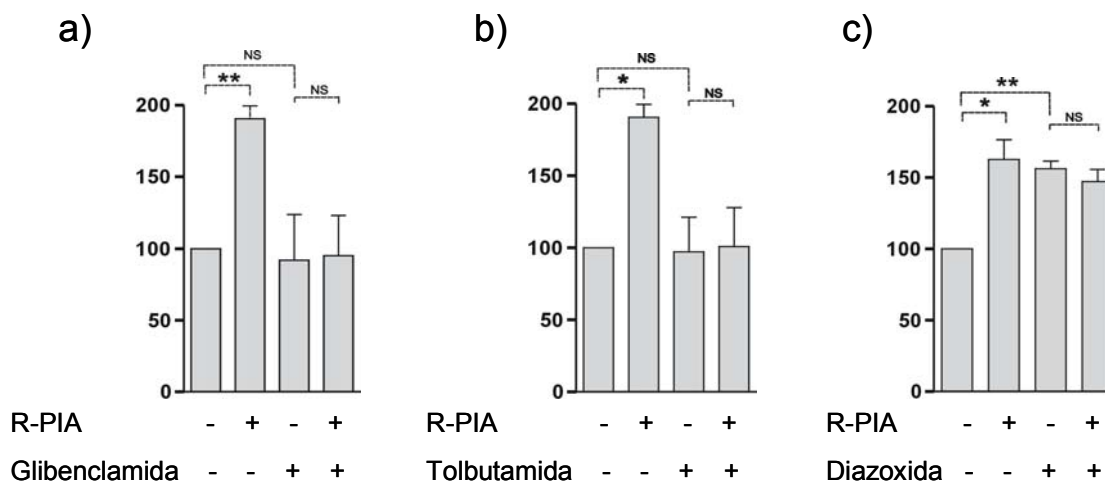
Existen diferentes tipos de canales de potasio y la utilización de diferentes inhibidores y activadores más específicos que el BaCl<sub>2</sub> puede permitirnos distinguir qué tipo de canal de potasio está involucrado en la regulación purinérgica de CNT2. La glibenclamida y la tolbutamida, por ejemplo, son dos inhibidores específicos de los canales de K<sup>+</sup> dependientes de ATP (K<sub>ATP</sub>). De la misma manera que con el BaCl<sub>2</sub>, preincubamos las células Fao con glibenclamida a 50 μM durante 15 minutos y con tolbutamida a 10 μM durante 30 minutos. El resultado de estas inhibiciones se muestra en la figura 32. Tanto la glibenclamida (figura 32b) como la tolbutamida (figura 32c) bloquean, en las células Fao, el efecto provocado por la R-PIA, sin tener ningún efecto significativo sobre la actividad basal de CNT2.

De la misma manera, preincubamos las células Fao con un inductor de la apertura de los canales K<sub>ATP</sub> (diazoxida, 100 μM) durante 30 minutos,. La diazoxida induce la actividad de transporte de guanosina dependiente de sodio, mediante CNT2, al mismo nivel que la activación mediada por R-PIA (figura 32d) y su efecto no es aditivo al de la R-PIA. Resultados similares fueron obtenidos abriendo el canal después de tratar las células con R-PIA. En este caso, la diazoxida mimetiza completamente la inducción del transportador CNT2 mediante la activación del receptor A<sub>1</sub>.



**Figura 32: Efecto de los bloqueadores de los canales de potasio BaCl<sub>2</sub>, glibenclamida y tolbutamida, y del activador diazoxida sobre la activación del transportador CNT2 inducida por R-PIA, en células Fao.** El transporte de guanósina fue medido en presencia o en ausencia de R-PIA (50 nM durante 5 min), y en presencia o en ausencia de diversos inhibidores de la conductancia de K<sup>+</sup>: BaCl<sub>2</sub> a 100 μM durante 30 min (a), con glibenclamida a 50 μM durante 15 min (b) y con tolbutamida a 10 μM durante 30 min (c). También medimos la activación de CNT2 inducida por R-PIA después de activar los canales K<sub>ATP</sub> con pre-incubaciones con diazoxida 100 μM durante 30 min (d). Los resultados son medias y errores estándares de cuadruplicado, de 6 experimentos independientes. Los datos expresan, en porcentaje, la actividad de transporte dependiente de sodio calculada después de las incubaciones, respecto a la actividad basal control. Los valores medios de las actividades basales son de 11.6 ± 0.1 μmol de guanósina/min/mg de proteína. (\* : p<0.05, \*\*: p<0.01, NS: no significativo, t-student vs control).

Para tener una prueba más fisiológica de este mecanismo de acción, realizamos los mismos experimentos en cultivo primario de hepatocitos. La figura 33 muestra el efecto de la glibenclamida (figura 33a), de la tolbutamida (figura 33b) y de la diazoxida (figura 33c) sobre la actividad de transporte de guanósina dependiente de sodio, medida en cultivo primario de hepatocitos de rata, en presencia o en ausencia de R-PIA (50 nM durante 5 minutos). En hepatocitos, al igual que en la línea celular Fao, el cierre de los canales K<sub>ATP</sub> por glibenclamida y tolbutamida provoca la inhibición del efecto de R-PIA sobre CNT2 y la apertura de aquellos canales por la diazoxida mimetiza el efecto de inducción del agonista del receptor A<sub>1</sub> (Figura 33c).



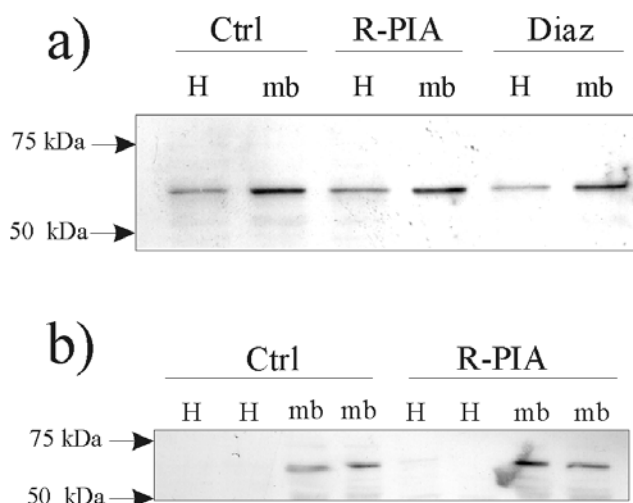
**Figura 33: Efecto de los bloqueadores de los canales  $K_{ATP}$ , glibenclamida y tolbutamida, y del activador diazoxida sobre la activación del transportador CNT2 inducida por R-PIA, en cultivo primario de hepatocitos de rata.** El transporte de guanosina fue medido en presencia o en ausencia de R-PIA (50 nM durante 5 min), y en presencia o en ausencia de diversos inhibidores de la conductancia de  $K^+$ : de glibenclamida a 50  $\mu$ M durante 15 min (b) y de tolbutamida a 10  $\mu$ M durante 30 min (c). También medimos la activación de CNT2 inducida por R-PIA después de activar los canales  $K_{ATP}$  con pre-incubaciones con diazoxida 100  $\mu$ M durante 30 min (d). Los resultados son medias y errores estándares de cuadruplicado, de 6 experimentos independientes. Los datos expresan, en porcentaje, la actividad de transporte dependiente de sodio calculada después de las incubaciones, respecto a la actividad basal control. Los valores medios de las actividades basales son de  $9.4 \pm 0.1$   $\mu$ mol de guanosina/min/mg de proteína. (\* :  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , NS: no significativo, t-student vs control).

## 2.5. Efecto de la activación purinérgica sobre la expresión en membrana plasmática de CNT2

Con el objetivo de determinar si la R-PIA y la diazoxida inducen la actividad de CNT2 mediante un incremento de la cantidad de estos transportadores en la membrana plasmática, examinamos por Western blot la presencia de CNT2 en homogenados y en fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas, después de incubar las células Fao con R-PIA y con diazoxida. Este experimento se realizó también en cultivos primarios de hepatocitos pero sólo incubando las células con R-PIA (figura 34).

Como lo indican las análisis Western blot de la figura 34, ni en Fao (Figura 34a) ni tampoco en hepatocitos (Figura 34b) la inducción de la actividad de transporte de nucleósidos por R-PIA vía CNT2 se asocia a un aumento de la cantidad de este transportador en membrana. La inducción de la actividad de CNT2 mediante la activación de los canales por la diazoxida en células

Fao, no parece ser debida tampoco a un incremento en el número de transportadores insertados en la membrana (figura 34a).

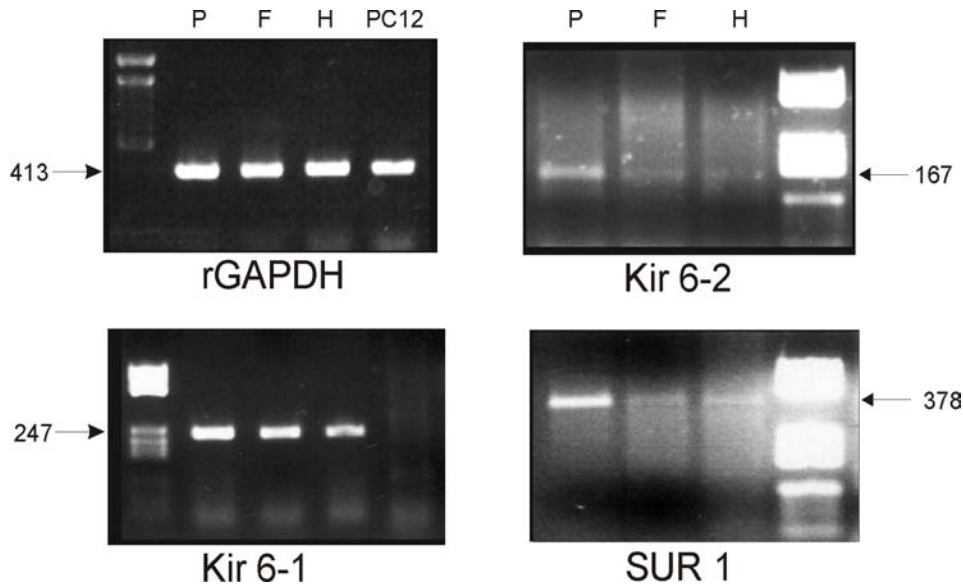


**Figura 34: análisis Western blot del efecto de R-PIA y diazoxida sobre la cantidad de CNT2 presente en membrana plasmática.** (a): Western blot realizado en fracciones de homogenados (H) y enriquecidos en membrana plasmática (mb) de células Fao preincubadas o no con R-PIA (50 nM, 5 min) y diazoxida (100  $\mu$ M, 30 min). (b): Western blot realizado en fracciones de homogenados (H) y enriquecidos en membrana plasmática (mb) de hepatocitos primarios preincubados o no con R-PIA (50 nM, 5 min).

## 2.6. Expresión de los canales $K_{ATP}$ expresados en células de hepatoma y en hepatocitos de rata

Aunque la implicación de los canales  $K_{ATP}$  parecía evidente en la respuesta purinérgica de CNT2, tanto en hepatocitos como en la línea de hepatoma Fao, el hecho que la magnitud del efecto fuese menor en esta última línea celular nos llevó a plantearnos qué isoformas de canales  $K_{ATP}$  se expresan en ambas isoformas. Con ese objetivo amplificamos por RT-PCR, a partir de los oligonucleótidos descritos en el capítulo Materiales y Métodos, los cDNAs correspondientes a los cuatro genes que codifican para las subunidades proteicas Kir6.1, Kir6.2, SUR1 y SUR2. Estas cuatro subunidades generan diferentes heterodímeros Kir6x-SURx correspondientes a los diferentes tipos de canales  $K_{ATP}$ . La figura 35 representa los resultados de esas amplificaciones. Después de 35 ciclos se amplifican los mRNAs de Kir6.1, Kir6.2 y SUR1 en las células Fao, en los hepatocitos y en páncreas, utilizado como control positivo, ya que se sabe que el páncreas expresa todas las subunidades de los canales  $K_{ATP}$ . Utilizamos rGAPDH como control de los diferentes cDNAs utilizados en los ensayos. Las células PC12 fueron utilizadas como control negativo de Kir 6.1, ya que se ha descrito que estas células no expresan esta subunidad (Inagaki et al., 1995). El mRNA de SUR2 sólo se amplificaba después de 50 ciclos de PCR (no mostrado), tanto en células Fao como

en hepatocitos, por lo que se puede concluir que el mRNA de esta subunidad se encuentra en unos niveles muy reducidos. Estos resultados permiten sugerir que los hepatocitos y las células Fao expresan un perfil de expresión de canales  $K_{ATP}$  cualitativamente (y quizás cuantitativamente) muy similar.



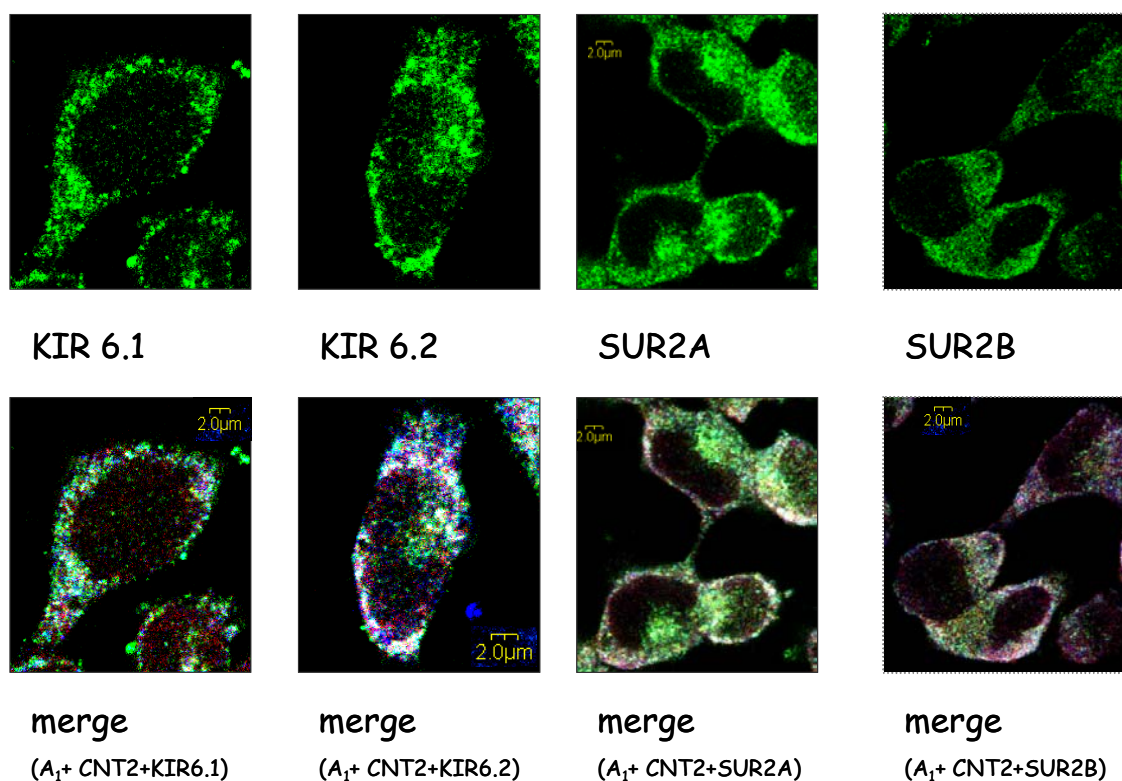
**Figura 35: Expresión de las isoformas de las subunidades SURx y Kir6.x en hepatocitos y en células Fao.** Kir 6.1, Kir 6.2 y SUR1 fueron amplificadas por RT-PCR en células Fao (F) y en hepatocitos de rata (H). rGAPDH es un control positivo de los cDNA utilizados. El páncreas (P), conocido por expresar cada isoforma de las subunidades de los  $K_{ATP}$ , se utilizó como control positivo y las células PC12, conocidas por no expresar Kir 6.1, fueron utilizadas como control negativo de la expresión de aquella isoforma. La representación de los geles de agarosa muestran la amplificación de los fragmentos de cDNAs, el peso molecular de los fragmentos está indicado por una flecha.

## 2.7. Colocalización de los canales $K_{ATP}$ con el receptor $A_1$ y CNT2 en células Fao

Los anticuerpos contra las subunidades de los canales de potasio Kir 6.1, Kir 6.2, SUR2A y SUR2B se utilizaron para la inmunolocalización de estas proteínas en células Fao. En las imágenes de la parte superior de la figura 36, se puede observar que las cuatro subunidades se expresan en las células Fao. Por RT-PCR, ya habíamos podido establecer la presencia de Kir6.1, Kir6.2 y SUR1 en estas células, pero no de forma clara la de SUR2. El análisis por inmunocolocalización viene a complementar aquellos resultados, confirmando la presencia tanto de SUR2A como de SUR2B en células Fao. La ausencia de un anticuerpo apropiado para el análisis por inmunofluorescencia de SUR1, no nos ha permitido detectar esta subunidad a nivel proteico.



El estudio de la colocalización del transportador CNT2 y del receptor  $A_1$  con las subunidades Kir6.1, Kir6.2, SUR2A y SUR2B ha sido realizado por triple marcaje y fue visualizado por microscopía cofocal. La colocalización de las subunidades de los canales  $K_{ATP}$  (en verde), CNT2 (en rojo) y el receptor  $A_1$  (en azul) está representada en blanco en las imágenes de la parte inferior de la figura 36.



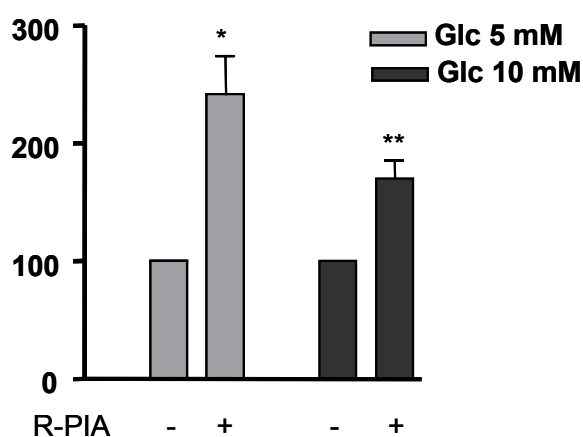
**Figura 36: Colocalización de Kir 6.1, Kir 6.2, SUR2A y SUR2B con CNT2 y el receptor  $A_1$  en células FaO.** Las células permeabilizadas se marcaron con los anticuerpos primarios Kir6.1, Kir6.2, SUR2A y SUR2B y con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a Alexa-488 (verde) por una parte y luego se marcaron con los anticuerpos anti-CNT2 conjugado a Cyn5 (rojo) y anti- $A_1$  conjugado a Cyn3 (azul). Las imágenes superiores representan el marcaje de las subunidades de los canales  $K_{ATP}$  y las imágenes inferiores el triple marcaje. La superposición de los tres marcajes revelan los lugares de colocalización de CNT2, de  $A_1$  con Kir6.1, Kir6.2, SUR2A y SUR2B en blanco.

## 2.8. La activación purinérgica es dependiente de la glucosa extracelular

Es bien conocido que el estado energético de la célula afecta a la actividad de los canales  $K_{ATP}$  y también se sabe que estos canales participan en el mecanismo sensor de la concentración de glucosa que existe en las células  $\beta$  del páncreas (Dunne et al., 1999; Ashcroft, 2000; Nichols and Koster, 2002). Dado que no parece haber diferencias sensibles en el patrón de expresión de los monómeros de los canales  $K_{ATP}$  entre hepatocitos y la células FaO, consideramos que la distinta

magnitud en la respuesta de CNT2 a agonistas purinérgicos podría quizás deberse al hecho que, al contrario de los hepatocitos, las células Fao por ser derivadas de hepatoma, normalmente se cultivan con glucosa elevada. Por todo ello decidimos estudiar la influencia de los cambios en la concentración extracelular de glucosa sobre la inducción de CNT2 mediada por R-PIA. Para ello, 24 horas antes de realizar los experimentos de activación purinérgica se cambiaba el medio normal de cultivo de las células Fao ([Glc]=10 mM) por un nuevo medio idéntico al anterior pero con una concentración de glucosa de 10 mM o de 5.5 mM.

Tal como se observa en la figura 37, la incubación con glucosa en el rango fisiológico (5.5 mM) se traduce en un nivel de activación de CNT2 similar al que se observó en cultivos primarios de hepatocitos, por lo que cabe anticipar que la diferencia en la magnitud de la respuesta se debe muy probablemente a la glucemia del medio de cultivo.



**Figura 37: Efecto de la glucosa en el medio de cultivo en la activación purinérgica de CNT2.** Las células Fao se cultivaron en medios de cultivos con concentraciones en glucosa diferentes: 5 y 10 mM durante 24 horas. El transporte de guanosina fue medido después de incubar las células en ausencia o presencia de R-PIA (50 nM durante 5 min). Los resultados son medias y errores estándares de cuadruplicado, de 3 experimentos independientes. Los datos expresan, en porcentaje, la actividad de transporte dependiente de sodio calculada después de las incubaciones, respecto a la actividad basal control. Los valores medios de las actividades basales son de  $16.2 \pm 0.5$  y  $17.5 \pm 0.5$   $\mu\text{mol}$  de guanosina/min/mg de proteína en medio con glucosa a 5 mM y 10 mM, respectivamente. (\* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , t student vs control).

## **Capítulo 3**

**Papel del óxido nítrico y de la PKC en la activación post-traduccionaI de CNT2 en hígado de rata.**

## **Antecedentes**

El óxido nítrico (NO) es un regulador importante de las funciones del hepatocito; éste puede inhibir la síntesis de proteínas, mecanismo aparentemente dependiente del GMPc (Curran et al., 1991) y tiene un efecto inhibitor sobre el metabolismo de los carbohidratos. Brass y colaboradores descubrieron que el donador del NO, S-nitroso-N-acetil-penicillamino (SNAP), inhibe la producción de AMPc, la glicogenolisis hepática activada por glucagón y la gluconeogénesis (Brass and Vetter, 1993), de modo que el NO parece tener un control parcial de la homeostasis de la glucosa. Por otro lado, se ha descubierto que la hiperglucemia altera la producción endogena de NO, por destrucción oxidativa de la molécula (Sowers and Lester, 1999; Sowers, 2002).

El efecto fisiológico del NO está principalmente inducido por el GMPc, pero Csont y colaboradores sugirieron que el gliceril trinitrato derivado del NO podría generar un efecto cardioprotector directo, involucrando una activación de los canales  $K_{ATP}$ , independientemente del GMPc (Csont et al., 1999).

La producción de radicales libres, como el NO y otros reactivos oxigenados, durante la isquemia aumenta la liberación de adenosina extracelular (Fallahi et al., 1996). Peralta y colaboradores observaron que durante el acondicionamiento isquémico del hígado, una concentración de adenosina extracelular elevada activa los receptores  $A_2$  que inducen la síntesis del NO, confiriendo citoprotección al hígado isquémico (Peralta et al., 1999). El acondicionamiento es un fenómeno, observado tras isquemias breves alternadas con fases de reperfusión, que permite al órgano ser más tolerante a los daños provocados por una isquemia prolongada. La isquemia está mayoritariamente estudiada en corazón, donde se sabe que la protección inducida por acondicionamiento requiere la activación de los receptores de adenosina. A pesar de saber que los receptores están involucrados en el proceso de acondicionamiento, las contribuciones de cada tipo de receptor de adenosina no está bien definida. Liu y colaboradores descubrieron que el acondicionamiento del corazón activa los receptores  $A_1$  y provoca la liberación de NO (Liu et al., 1991) por un mecanismo dependiente del GMPc (Sterin-Borda et al., 2002).

Existe la observación previa en nuestro grupo de experimentación que demuestra que la inhibición de la producción de NO en linfocitos B, después de 4 horas de incubación con LNMMA se asocia a una caída en la actividad de CNT2, mientras que la acción del donador de NO, NOC18, se asocia a una activación del transportador (Soler et al., 2000).

Los hepatocitos producen NO mediante las enzimas iNOS y eNOS. Las enzimas iNOS se expresan en hepatocitos en respuesta condicionada por la activación de las células de Kupffer por la presencia en el medio de LPS y IFN- $\gamma$  (Curran et al., 1989). El TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  secretados por las células de Kupffer son directamente responsables de la inducción de iNOS en hepatocitos (Curran et al., 1990). Tanto LPS como el TNF- $\alpha$  y el IFN- $\gamma$  son potentes activadores de la expresión de CNT2 en macrófagos (Soler et al., 2000; Soler et al., 2001).

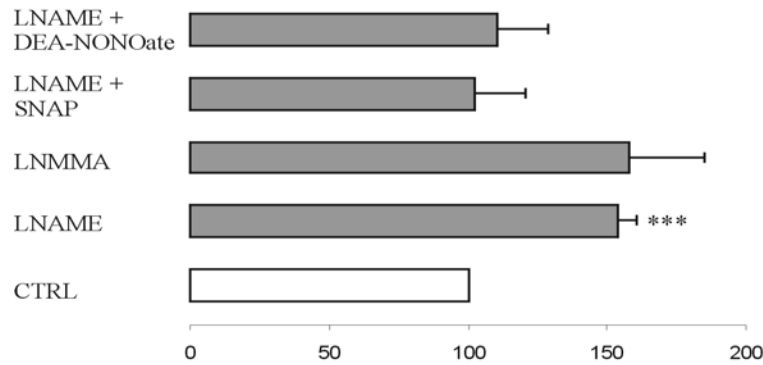
En base a estos antecedentes parecía interesante analizar si la asequibilidad de óxido nítrico modulaba a corto plazo la funcionabilidad del transportador de adenosina.

## **Resultados**

### **3.1. Modulación de la actividad de transporte de CNT2 en ausencia de NO**

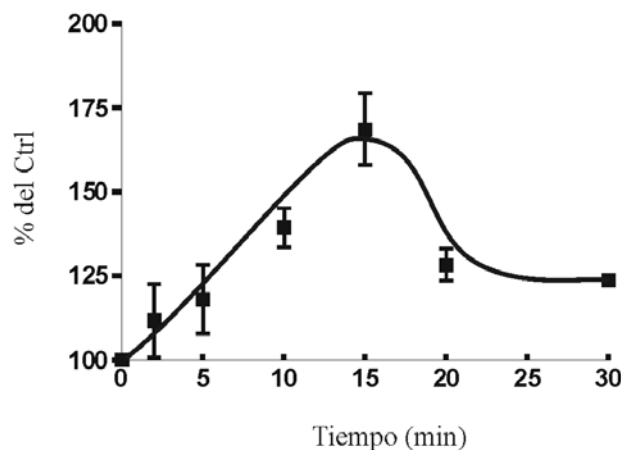
Para determinar si el NO puede modular la actividad de transporte de CNT2, medimos la actividad de transporte dependiente de sodio de guanosina en la línea celular Fao, después de tratar las células con los donadores de NO, SNAP y DEA-NONOate y los con inhibidores de la NOS, LNAME y LNMMA, que actúan compitiendo con la L-arginina por los sitios activos de la NOS (figura 38).

Los inhibidores LNAME (1 mM) y LNMMA (100  $\mu$ M) activan el transporte de guanosina dependiente de sodio en un 60%, en células Fao (figura 38). Mientras que el tratamiento de las células con los donadores de NO, SNAP y DEA-NONOate, no tiene ningún efecto sobre el transporte de guanosina dependiente de sodio (no mostrado). Si se añaden el SNAP (100  $\mu$ M durante 30 min) y el DEA-NONOate (100  $\mu$ M durante 30 min) antes del tratamiento con LNAME, la activación de CNT2 se revierte (figura 38).



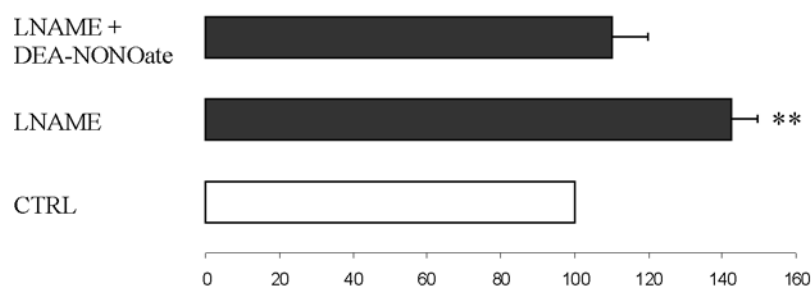
**Figura 38: Activación de CNT2 por los inhibidores de la NOS, LNAME y LNMMA en células FaO.** Estudio de la entrada de guanosina dependiente de sodio en FaO mediante el transportador CNT2, después de incubar las células FaO 15 min con LNAME (1 mM), 15 min con LNMMA (100), 30 min y con LNAME a 1 mM, durante 15 min en células previamente tratadas con los inhibidores SNAP (100  $\mu$ M durante 30 min) o con DEA-NONOate (100  $\mu$ M durante 30 min). Los resultados, realizados por cuadruplicado, provienen de 4 experimentos independientes. Los datos expresan, en porcentaje, la actividad de transporte dependiente de sodio calculada después de las incubaciones, partidas por la actividad basal control (CTRL). Los valores medios de las actividades basales son de  $9.2 \pm 0.8 \mu$ mol de guanosina/mg de proteína. (\*\*\*)  $p < 0.001$ , t student vs control)

El tiempo de tratamiento óptimo con los inhibidores de NO fue determinado con LNAME a 1 mM mediante el *time course* presentado en la figura 39. Se trata de un efecto a corto plazo con una magnitud óptima con incubaciones de LNAME de 15 minutos



**Figura 39: Activación de CNT2 por LNAME.** Estudio de la entrada de guanosina dependiente de sodio en FaO mediante el transportador CNT2, después de incubar las células durante diferentes tiempos (2, 5, 10, 15, 20 y 30 min) con LNAME (1 mM) en células FaO. Los resultados, realizados por cuadruplicado, provienen de 4 experimentos independientes. Los datos expresan, en porcentaje, la actividad de transporte dependiente de sodio calculada después de las incubaciones, respecto a la actividad basal. Los valores medios de las actividades basales son de  $8.7 \pm 0.2 \mu$ mol de guanosina/mg de proteína.

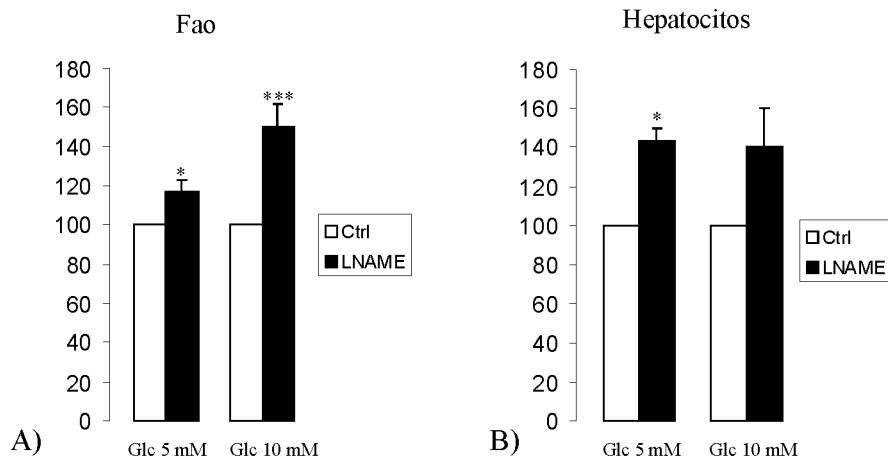
Para comprobar si la inducción de la actividad de CNT2 por estimulación de la NOS se repite en un modelo fisiológico, estudiamos de la misma manera que en la línea celular Fao, el efecto de LNAME (1 mM durante 15 min) en cultivos primarios de hepatocitos de rata (ver figura 40). Como en la línea celular Fao, LNAME activa el transporte de guanosina dependiente de sodio en células parenquimales en un 50%; efecto que se revierte cuando las células se tratan previamente con DEA-NONOate (100  $\mu$ M durante 30 min).



**Figura 40: Activación de CNT2 por el activador de la NOS, LNAME en hepatocitos de rata.** Estudio de la entrada de guanosina dependiente de sodio en cultivo primario de hepatocitos de rata mediante el transportador CNT2, después de incubar las células 15 min con LNAME (1 mM) y con LNAME a 1 mM, durante 15 min en células previamente tratadas con los inhibidores con DEA-NONOate (100  $\mu$ M durante 30 min). Los resultados, realizados por cuadruplicados, provienen de 3 experimentos independientes. Los datos expresan, en porcentajes, la actividad de transporte dependiente de sodio calculada después de las incubaciones, partidas por la actividad basal control (CTRL). Los valores medios de las actividades basales son de  $9.2 \pm 0.8$   $\mu$ mol de guanosina/mg de proteína. (\*\*;  $p < 0.01$ , t student vs control)

### 3.2. Influencia de la concentración de glucosa del medio

Como el NO en hígado parece ser implicado en el metabolismo de la glucosa, nos planteamos estudiar si la concentración de glucosa del medio está involucrada en la inducción de la actividad del transportador CNT2 mediante este radical libre. Para ello, determinamos si la activación de CNT2 por LNAME depende de la concentración de glucosa del medio. Por tanto, analizamos la actividad de transporte de guanosina dependiente de sodio, en la línea celular Fao y en cultivo primario de hepatocitos de rata, con y sin tratamiento con LNAME a 1 mM durante 15 min, en medios de cultivo de concentraciones de glucosa distintas a 5 y 10 mM (figura 41). Como indica la figura 41, la activación de CNT2 por LNAME es mayor en concentraciones de glucosa de 10 mM en Fao, mientras que en el modelo fisiológico, el cultivo primario de hepatocitos de rata, la concentración de glucosa no afecta la activación de CNT2 por el inhibidor de la NOS.

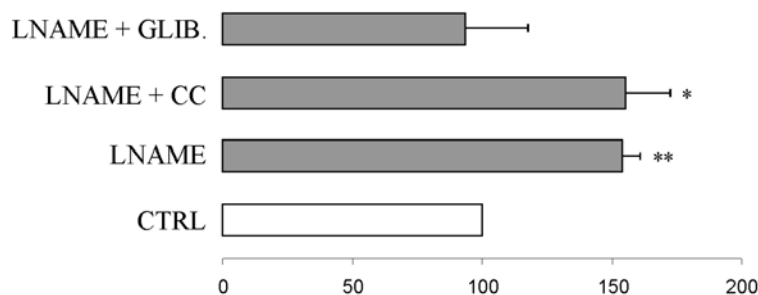


**Figura 41: Efecto de la concentración de glucosa sobre la activación de CNT2 por LNAME.** Estudio de la entrada de guanosina dependiente de sodio (A) en células Fao y (B) en cultivo primario de hepatocitos de rata, mediante el transportador CNT2, tras incubar las células *overnight* en medios con glucosa 5 y 10 mM, con y sin LNAME a 1 mM durante 15 min. Los resultados, realizados por cuadruplicado, provienen de 8 experimentos independientes. Los datos expresan, en porcentaje, la actividad de transporte dependiente de sodio calculada después de las incubaciones, en relación a la actividad del control (transporte realizado en medio de glucosa 10 mM para las Fao y 5 mM para los hepatocitos y sin pretratamientos). Los valores medios de las actividades basales son de  $8.6 \pm 1.0$  y de  $9.2 \pm 0.7$   $\mu\text{mol}$  de guanosina/mg de proteína en células Fao, en medio de Glc a 5 y 10 mM respectivamente, y de  $7.4 \pm 2.0$  y  $5.3 \pm 2.4$   $\mu\text{mol}$  de guanosina/mg de proteína en hepatocitos, en medio de Glc a 5 y 10 mM respectivamente. (\* :  $p < 0.05$ , \*\*\*;  $p < 0.001$ , t student vs control)

### 3.3. Mediación de la respuesta a la disminución del NO por los canales $K_{ATP}$

Con el objetivo de determinar si la inhibición de NOS y su efecto sobre CNT2 de alguna manera estaba mediado por canales  $K_{ATP}$  y/o por la PKC, medimos la actividad de CNT2 inducida por LNAME inhibiendo los canales  $K_{ATP}$  con glibenclamida a 50  $\mu\text{M}$  durante 15 min e inhibiendo la PKC con cheleritrine cloride a 1  $\mu\text{M}$  durante 30 min., ya que se han descrito varias interacciones entre el NO, los canales  $K_{ATP}$  y la PKC (Armstead, 1999; Nayeem and Mustafa, 2002; Otani et al., 2003). Los resultados, indicados en la figura 42, nos indican que, mientras la PKC no parece intervenir en la activación de CNT2 por inhibición de la NOS, la inhibición de los canales  $K_{ATP}$  bloquea la inducción de la actividad de este transportador por LNAME.



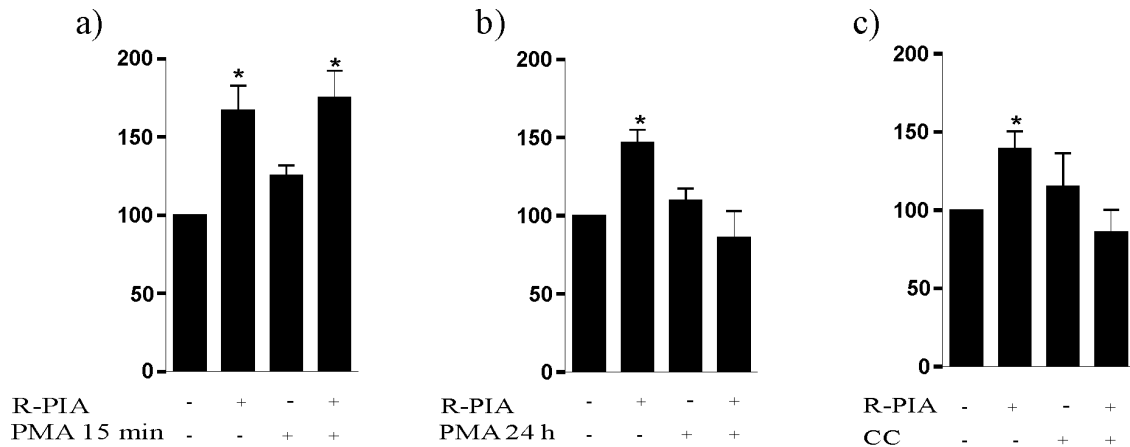


**Figura 42: Efecto de la inhibición de la NOS y la inhibición de los canales  $K_{ATP}$  sobre el transportador CNT2 en células Fao.** El transporte de guanosina fue medido después de tratar las células Fao o no con LNAME a 1 mM durante 15 min para inhibir la NOS y con varias incubaciones con un inhibidor de la PKC, chelerythrine chloride (CC) a 1  $\mu$ M durante 10 min. y con un inhibidor de los canales  $K_{ATP}$ , Glibencalmida a 50  $\mu$ M durante 15 min. Los resultados son promedios y errores estándares de cuadruplicados de 5 experimentos independientes. Los datos expresan, en porcentajes, la actividad de transporte dependiente de sodio calculada después de las incubaciones, partidas por la actividad basal control. Los valores medios de las actividades basales son de  $10.9 \pm 0.9$   $\mu$ mol de guanosina/min/mg de proteína. (\* :  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , t student vs control)

### 3.4. Comparación de las vías de activación de CNT2 por L.NAME y por inducción de los receptores $A_1$

Aparentemente, al igual que ocurría con la inducción purinérgica de CNT2 (Capítulo 2), el inhibidor de la NOS, LNAME, activa el transportador CNT2 de forma dependiente de los canales  $K_{ATP}$  pero independiente de PKC. La inducción de la actividad de CNT2 por LNAME no parece dependiente de la glucosa como es el caso en la regulación de este transportador por el receptor  $A_1$ . Para distinguir más claramente estas dos vías de regulación de CNT2, nos planteamos estudiar el efecto de la PKC sobre la regulación purinérgica de este transportador, ya que esta descrito que este enzima, activada por adenosina, parece modular la actividad de los canales  $K_{ATP}$ , ya que puede activarlos directamente por fosforilación y, cuando el enzima está sometido a una activación prolongada, favorece la internalización de estos canales en la membrana (Hu et al., 2003). En la figura 43, estudiamos el efecto de la activación y la inhibición de la PKC sobre la inducción del transporte de guanosina dependiente de sodio por R-PIA, preincubando las células Fao con PMA (100  $\mu$ M). A tiempos cortos (15 min) la PMA activa la PKC y a tiempo largos (24h) la inactiva. Para evitar el eventual efecto toxico de incubaciones largas con PMA, también se inhibió la PKC con chlerythrine chloride (1  $\mu$ M) preincubando durante 30 min. La figura 43 muestra como la inhibición de la PKC bloquea la activación purinérgica de CNT2 (Figura 43b y 43c), mientras que la activación de la enzima no tiene ningún efecto (Figura 43a).

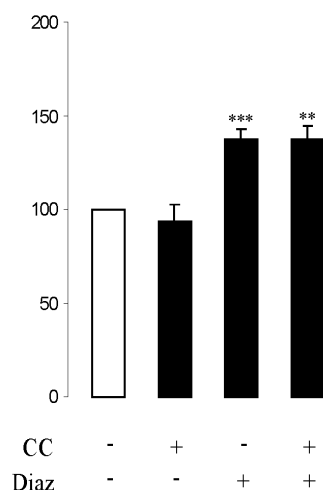
Ya que sabemos que la inhibición de la PKC puede bloquear la inducción de CNT2 mediada por R-PIA, intentamos determinar a que nivel de esta regulación la enzima regula esta activación. Existían dos posibilidades: (i) entre la inducción del receptor  $A_1$  y la activación del canal  $K_{ATP}$  o (ii) entre la activación de este canal y el transportador CNT2.



**Figura 43: Efecto de la activación y inhibición de la PKC sobre la inducción purinérgica de CNT2 en células Fao.** El transporte de guanosina fue medido en presencia y ausencia de R-PIA (50 nM durante 5 min) y de (a) PMA a 100  $\mu$ M durante 15 min para activar la PKC, (b) PMA a 100  $\mu$ M durante 24h y (c) chlerytrine chloride (CC) a 1  $\mu$ M durante 30 min para inhibir la PKC. Los resultados son medias y errores estándares de cuadruplicado, de 4 experimentos independientes. Los datos expresan, en porcentaje, la actividad de transporte dependiente de sodio calculada después de las incubaciones, respecto a la actividad basal control. Los valores medios de las actividades basales son de  $10.4 \pm 2.1$ ,  $19.8 \pm 1.6$  y  $19.3 \pm 2.2$   $\mu$ mol de guanosina/min/mg de proteína en los experimentos con PMA 15 min, PMA 24h y chlerytrine chloride, respectivamente. (\* :  $p < 0.05$ , t student vs control)

Para descubrir cuál de estas dos posibilidades era correcta, analizamos si la inhibición de la PKC modulaba o no la activación de CNT2 por inducción del canal  $K_{ATP}$  con diazoxida. Por ello, medimos la actividad de transporte de guanosina dependiente de sodio en células Fao tratadas o no con diazoxida 100  $\mu$ M durante 30 minutos y en células tratadas a la vez con diazoxida en las mismas condiciones y con chlerytrine chloride a 1  $\mu$ M durante 30 minutos (figura 44).

La inhibición de la PKC no modifica significativamente la capacidad de la diazoxida de activar CNT2 (figura 44), por lo que cabe suponer que la PKC está involucrada en la apertura de los canales  $K_{ATP}$  inducida por activación purinérgica del receptor  $A_1$ .



**Figura 44: Efecto de la inhibición de la PKC sobre la activación del transportador CNT2 por apertura del canal  $K_{ATP}$  inducida por diazoxida en Fao.** El transporte de guanosina dependiente de sodio se determinó en condiciones basales (barra blanca) y tras preincubar las células con diazoxida a 100  $\mu$ M durante 30 min y con chlerytrine chloride (CC) a 1  $\mu$ M durante 30 min. Los resultados son medias y errores estándares de cuadruplicado, de 4 experimentos independientes. Los datos expresan, en porcentaje, la actividad de transporte dependiente de sodio calculada después de las incubaciones, respecto a la actividad basal control. Los valores medios de las actividades basales son de  $9.6 \pm 0.7$   $\mu$ mol de guanosina/min/mg de proteína. (\*\*,  $p < 0.01$ , \*\*\*,  $p < 0.001$ , t student vs control)



## **Capítulo 4:**

**Modulación post-traducciona del transportador rCNT2 por ácidos biliares. Generación de herramientas para el estudio de los mecanismos responsables del tráfico intracelular de los transportadores CNT1 y CNT2.**

## **Antecedentes:**

Son numerosos los estudios que han descrito mecanismos independientes de la síntesis proteica según los cuales es posible que se produzca un aumento de la actividad de transporte determinando así la existencia de una regulación a corto plazo de diferentes transportadores de membrana. Asimismo, parece claro que el mecanismo responsable de la distribución asimétrica de algunos transportadores en células epiteliales polarizadas puede regular la propia función de la proteína de transporte. Por otro lado, se sabe que muchos transportadores no son componentes constitutivos de la superficie celular sino que se encuentran en compartimentos intracelulares a la espera de una demanda funcional. Este es el caso por ejemplo de diversos miembros de la familia de transportadores de ácidos biliares (Kipp and Arias, 2000), del transportador de glucosa GLUT4 en cardiomiocitos y músculo esquelético (Zorzano et al., 1997; Bryant et al., 2002).

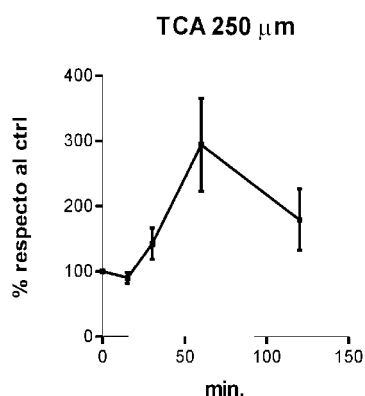
El objetivo de este capítulo, en colaboración con la Dra Sonia Fernandez-Veledo, se basa en la búsqueda de efectores capaces de modular la inserción en membrana plasmática de los transportadores de nucleósidos y la generación de construcciones para su estudio.

## **Resultados**

### **4.1. Identificación de los ácidos biliares como moduladores de la actividad del transportador rCNT2**

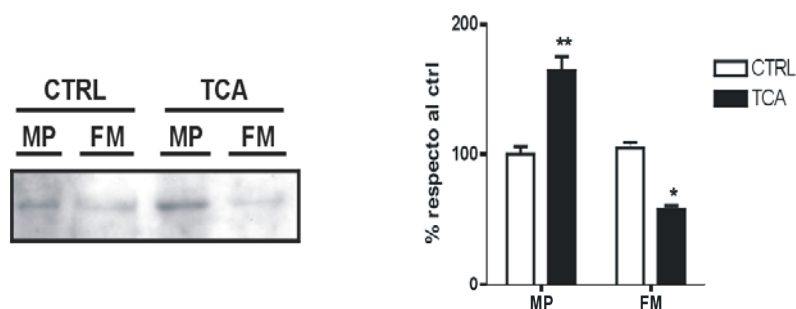
La Dra Sonia Fernández-Veledo en su tesis, analizó el posible efecto regulador de los ácidos biliares sobre los transportadores de nucleósidos concentrativos en base al papel fundamental que ejercen los hepatocitos en la formación de la bilis. Asimismo, algunos autores han comprobado que los ácidos biliares pueden modular el metabolismo de nucleótidos y nucleósidos durante el proceso de regeneración hepática, situación en la cual se observa un incremento de la actividad de rCNT2. El ácido taurocólico, en particular, promueve bien el catabolismo de nucleósidos, bien su incorporación al DNA, en función del estado nutricional de los animales (Marin et al., 1993; Barbero et al., 1995; Monte et al., 1996; Villanueva et al., 1996). Gracias a la circulación enterohepática, el hepatocito está en contacto con los ácidos biliares tanto por la membrana basolateral (captación de los ácidos biliares primarios y secundarios por su posterior conjugación) como por la membrana canalicular (por donde son excretados hacia el canalículo biliar). Se ha demostrado que los ácidos biliares son ligandos fisiológicos de receptores nucleares específicos de manera que son capaces de modular transcripcionalmente tanto enzimas de su propio metabolismo como la expresión del transportador basolateral de ácidos biliares dependiente de

sodio Ntcp y por otro lado tienen la capacidad de promover la translocación del transportador canalicular Bsep (Trauner and Boyer, 2003). La incubación de las células durante una hora con el ácido taurocólico a 250  $\mu\text{M}$  provoca un aumento del transporte de guanosina dependiente de sodio, atribuible al transportador CNT2, en cultivos primarios de hepatocitos y en la línea celular Fao pero no del transporte concentrativo de citidina (CNT1). La figura 45 muestra la caracterización del *time course* del efecto del ácido taurocólico sobre el transporte concentrativo de guanosina en células Fao.



**Figura 45: Time course del efecto del ácido taurocólico sobre la actividad del transportador CNT2 en la línea celular Fao.** El transporte de guanosina dependiente de sodio se determinó tras incubación de las células Fao en presencia de ácido taurocólico (250  $\mu\text{M}$ ) durante los tiempos indicados. Los resultados son medias y errores estándares de cuadruplicado, de 3 experimentos independientes.

El análisis de esta respuesta por fraccionamiento subcelular y Western blot (Figura 46) parecía sugerir que el aumento de la actividad de CNT2 podría ser debido a un aumento de su presencia en la membrana, pero no por aumento de su síntesis, sino por la movilización de moléculas de transportador preexistentes, desde un compartimiento intracelular.



**Figura 46: Efecto del ácido taurocólico sobre la expresión de rCNT2 en la membrana plasmática de células Fao.** Las células fueron incubadas con ácido taurocólico (TCA, 250  $\mu\text{M}$ ) durante 1 hora. Posteriormente se realizó el fraccionamiento subcelular se analizó la expresión de rCNT2 por Western blot en fracciones enriquecidas en membrana plasmática (MP) y en fracciones microsomales (FM) (n=3). Se muestra un gel representativo. El análisis densitométrico muestra los cambios de expresión de rCNT2 en las diferentes fracciones.

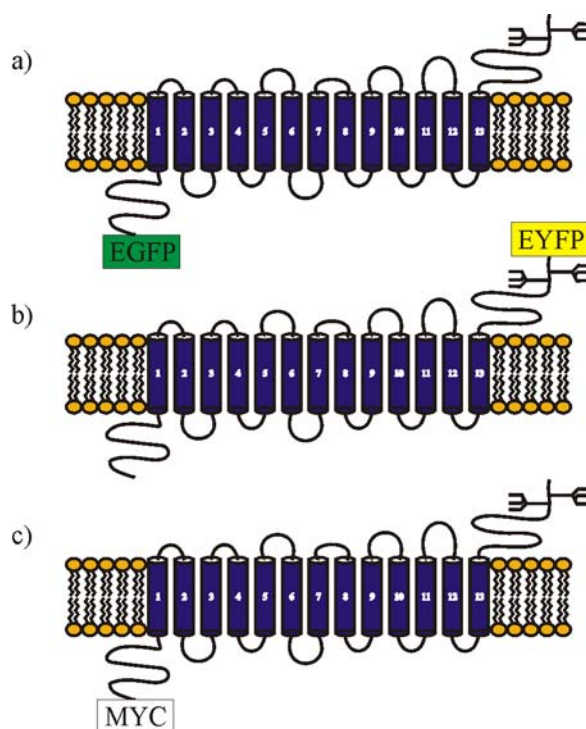
Para verificar la hipótesis de que el ácido taurocólico actúa sobre vesículas intracelulares induciendo un incremento de la expresión de CNT2 en la superficie celular, decidimos subclonar rCNT2 en el plásmido EYFP, para observar el efecto del ácido biliar in vivo mediante transfecciones transitorias de las células Fao.

#### **4.2. Generación de construcciones**

Con el objetivo de profundizar en el estudio de la regulación de los transportadores de nucleósidos, decidimos fabricar una serie de construcciones que nos aportasen nuevas herramientas en este terreno. De esta forma, pretendimos asociar el transportador rCNT2 con la YFP y además, el transportador hCNT1 con la GFP, para permitir su observación por inmunofluorescencia, previa transfección en el modelo celular escogido. También nos propusimos añadir un “tag” myc a rCNT2; este dominio myc está constituido por una secuencia de 33 nucleótidos que codifica una corta secuencia de aminoácidos para la que se dispone de anticuerpos específicos que permiten su inmunoprecipitación. Así que esta última construcción nos permitirá inmunoprecipitar rCNT2, ya que, después de varias pruebas realizadas en el laboratorio, el anticuerpo contra este transportador se reveló inadecuado para este tipo de ensayo.

Según el plásmido utilizado, el “tag” se puede situar al extremo 3’ o 5’ de la proteína clonada. La figura 47 indica la posición de cada “tag” en las construcciones realizadas.

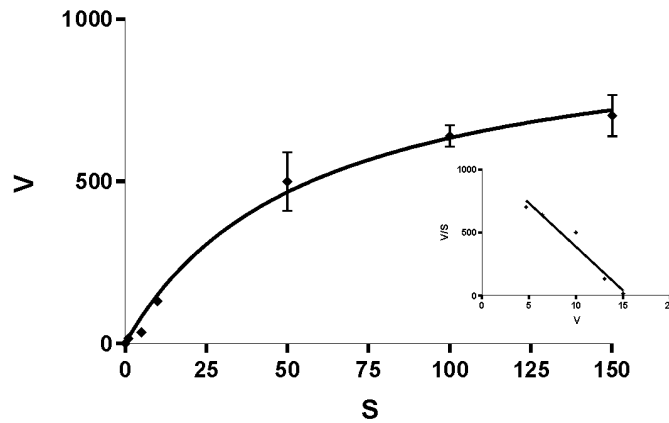




**Figura 47: Topología de las construcciones EGFP-hCNT1 (a), EYFP-rCNT2 (b) y myc-rCNT2 (c)**

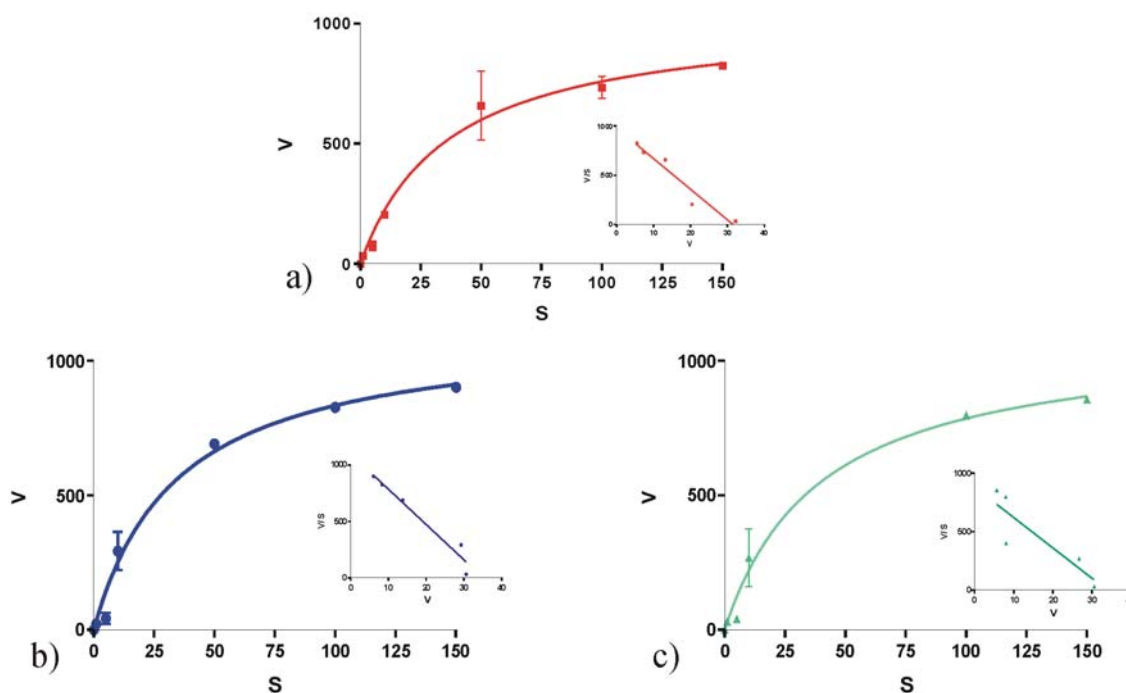
### 4.3. Expresión transitoria y caracterización funcional de las construcciones

La caracterización funcional de las construcciones fue realizada en la línea celular CHO, por transfección transitoria con Fugene, tal como se explica en el capítulo Materiales y Métodos (apartado 5.2.11). Las caracterizaciones cinéticas, representadas en las figuras 47 y 48, corresponden al transporte de guanosina sodio-dependiente, utilizando varias concentraciones de sustrato después de haber transfectado transitoriamente las células CHO con las diferentes construcciones. Para rCNT2, además de realizar las construcciones EYFP-rCNT2 y myc-CNT2, se clonó el rCNT2 en pcDNA3, de modo que en la figura 48 caracterizamos, además de las construcciones con CNT2, el transportador rCNT2 clonado en pcDNA3. El transportador hCNT1 en pcDNA3 ya había sido caracterizado en el grupo y tiene una  $K_m$  de  $3.1 \pm 1.4 \mu\text{M}$  y una  $V_{max}$  de  $256.6 \pm 36.25 \text{ pmol cit/min/mg proteína}$ . En la figura 48 caracterizamos la  $K_m$  y la  $V_{max}$  de GFP-hCNT1 que son respectivamente,  $55.74 \mu\text{M}$  y  $987.4 \pm 80.4 \text{ pmol cit/min/mg proteína}$ .



**Figura 48: Caracterización cinética de GFP-hCNT1 transfectado transitoriamente en la línea celular CHO.** Caracterización cinética de tipo Michaelis-Menten y de tipo Eadie-Hofstee (en pequeño), del transporte de citidina, sustrato preferente de CNT1, dependiente de sodio utilizado a varias concentraciones (de 1 a 150  $\mu\text{M}$ ). La  $K_m$  y la  $V_m$  calculadas con estos métodos son de  $55.74 \pm 11.8 \mu\text{M}$  y de  $987.4 \pm 80.4 \text{ pmol cit/min/mg proteína}$ . Los resultados representan la media y la desviación estándar de la media de cuadruplicados de 3 determinaciones cinéticas independientes.

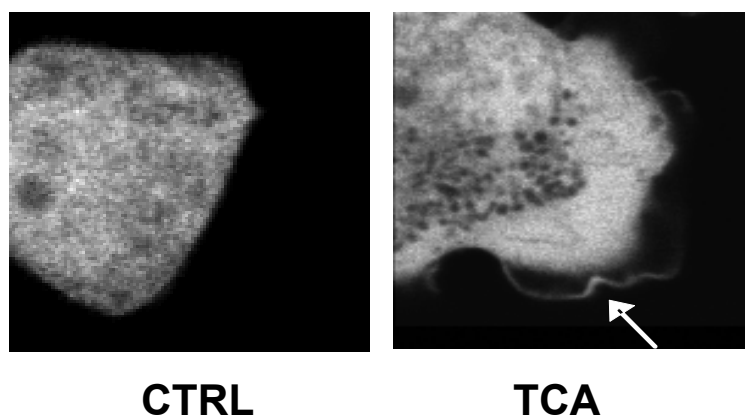
Las caracterizaciones funcionales del transportador rCNT2 están representadas en la figura 49a, la de EYFP-rCNT2 en la figura 49b y la de myc-rCNT2 en la figura 49c. Los valores de  $K_m$  y de  $V_{max}$  de las construcciones de EYFP-rCNT2 y myc-rCNT2 son muy parecidos a los de rCNT2. rCNT2 tiene una  $K_m$  de  $31.15 \pm 4.7 \mu\text{M}$  y una  $V_{max}$  de  $980.5 \pm 86.6 \text{ pmol gua/min/mg proteína}$ , EYFP-rCNT2 tiene una  $K_m$  de  $31.34 \pm 4.7 \mu\text{M}$  y una  $V_{max}$  de  $1100 \pm 80.6 \text{ pmol gua/min/mg proteína}$  y, myc-rCNT2 tiene una  $K_m$  de  $26.67 \pm 8.2 \mu\text{M}$  y una  $V_{max}$  de  $882.9 \pm 156.5 \text{ pmol gua/min/mg proteína}$ .



**Figura 49: Caracterización cinética de rCNT2 en pcDNA3 (a) y de las construcciones EYFP-rCNT2 (b) y myc-rCNT2 (c) transfectados transitoriamente en la línea celular CHO.** Caracterización cinética de tipo Michaelis-Menten y de tipo de tipo Eadie-Hofstee (en el inserto), del transporte de citidina, dependiente de sodio utilizado a varias concentraciones (de 1 a 150  $\mu\text{M}$ ). La  $K_m$  calculadas son de  $31.15 \pm 4.7 \mu\text{M}$  para rCNT2 en pcDNA3,  $31.34 \pm 4.7 \mu\text{M}$  para YFP-rCNT2 y  $26.67 \pm 8.2 \mu\text{M}$  para myc-rCNT2, y las  $V_{max}$  de  $980.5 \pm 86.6 \text{ pmol cit/min/mg proteína}$  para rCNT2 en pcDNA3,  $1100 \pm 80.6 \text{ pmol cit/min/mg proteína}$  para YFP-rCNT2 y  $882.9 \pm 156.5 \text{ pmol cit/min/mg proteína}$  por myc-rCNT2. Los resultados representan la media y la desviación estándar de la media de cuadruplicados de 3 determinaciones cinéticas independientes.

#### 4.4. Estudio de la regulación de rCNT2 por los ácidos biliares mediante la construcción EYFP-rCNT2

En colaboración con la Dra Sonia Fernández-Veledo, mediante utilización de la construcción EYFP-CNT2 pudimos corroborar la hipótesis de que el ácido taurocólico induce un incremento de la expresión de CNT2 en la superficie celular. Para ello, se transfectó transitoriamente las células Fao con la construcción EYFP-CNT2 y se analizó el efecto del ácido taurocólico durante 2 horas *in vivo*. Después del tratamiento, se observó una cierta translocación del transportador CNT2 hacia la membrana plasmática de la célula (Figura 50).



**Figura 50: Análisis de la expresión de rCNT2 en la superficie celular de células FaO en presencia de ácido taurocólico.** Las células FaO transfectadas con el constructo EYFP-rCNT2, fueron observadas in vivo en microscopía confocal durante el tratamiento con ácido taurocólico (250  $\mu$ m) durante 2 horas.

## ***DISCUSIÓN***



- **Localización subcelular de CNT1 y CNT2 en hígado**

En el primer capítulo de esta memoria, estudiamos la distribución subcelular de los transportadores CNT1 y CNT2 en hepatocitos de rata. Previamente, ya se había demostrado en nuestro grupo que ambos transportadores se expresan en hepatocitos (Mercader et al., 1996; Felipe et al., 1998). La generación de anticuerpos contra los transportadores concentrativos rCNT1 y rCNT2 permitieron observar que las membranas plasmáticas basolaterales no están enriquecidas igualmente en ambas isoformas (Ruiz-Montasell et al., 1992; Felipe et al., 1998). CNT1 y CNT2 se expresan también en células epiteliales como enterocitos (Iseki et al., 1996) y células tubulares proximales renales (Ward and Tse, 1999), donde ambos transportadores se expresan en la membrana apical. Sin embargo, antes de realizar esta tesis, se desconocían la localización subcelular exacta y el tráfico intracelular de estas proteínas de estos transportadores en células parenquimales hepáticas.

A partir de vesículas purificadas de membranas plasmáticas basolaterales y canaliculares de hígado y mediante análisis de Western blot, pudimos detectar la presencia de los transportadores CNT2 y CNT1, en cantidades menores, en la membrana basolateral, mientras que sólo CNT1 se detecta en membranas canaliculares. La presencia de CNT1 en la membrana canalicular del hepatocito fue también caracterizada, al mismo tiempo, por Hamilton y colaboradores (Hamilton et al., 2001). Las vesículas de membrana basolateral tienen una actividad de transporte dependiente de sodio relativamente alta no sólo de nucleósidos, sino también de otros sustratos como, por ejemplo, algunos aminoácidos (Pastor-Anglada et al., 1987). En nuestro grupo, se ha descrito que la actividad de transporte de nucleósidos dependiente de sodio, en estas vesículas, es insensible a NBTI (Ruiz-Montasell et al., 1992). En esta tesis demostramos que, en estas membranas, el transporte de nucleósidos pirimidínicos parece esencialmente equilibrativo y que el transportador CNT2 purina preferente parece ser el único transportador implicado en la actividad de transporte concentrativo de nucleósidos. Por contra, en la membrana canalicular se ha observado que existe una actividad de transporte concentrativo para los dos tipos de nucleósidos, tanto púricos como pirimidínicos. Estudios preliminares sugirieron la presencia de bajos niveles de CNT2 en la membrana canalicular (Che et al., 1995), lo que concordaría con la presencia de una actividad de transporte concentrativo de guanosina en estas membranas. Sin embargo, en esta tesis no detectamos CNT2 en la membrana apical ni por análisis Western blot, ni por microscopía electrónica. Por lo tanto, suponemos que el transportador concentrativo responsable de la entrada de los nucleósidos púricos por esta membrana podría ser CNT3, ya que se sabe que se expresa en hígado (Ritzel et al., 2001). Esta hipótesis no se ha podido verificar todavía al no existir anticuerpos contra ninguno de los ortólogos de CNT3.

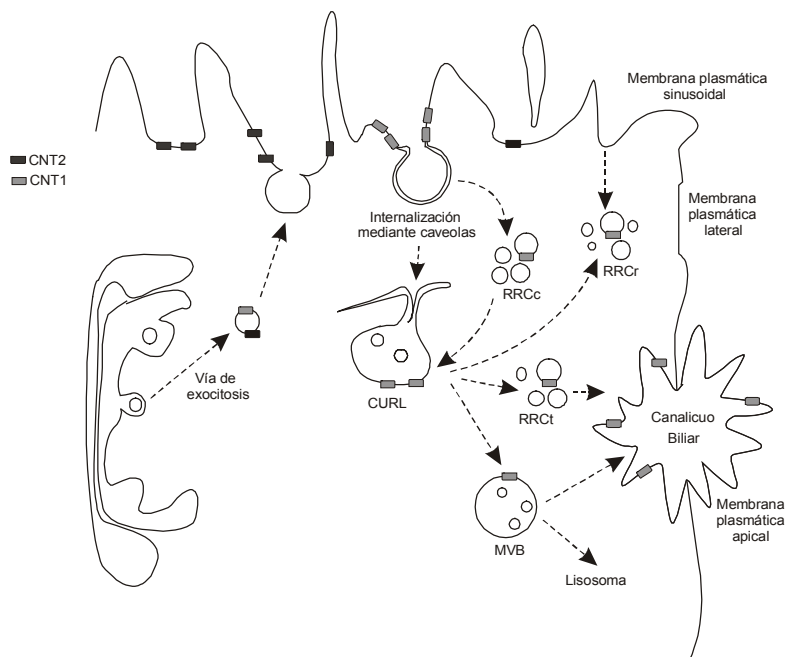
Las proteínas de membrana hepáticas destinadas al dominio apical pueden seguir, como se explica en la Introducción, dos vías diferentes para llegar a su destino desde el Trans-Golgi, una ruta directa y una ruta indirecta, mediante la membrana basolateral. Para determinar la ruta seguida por CNT1, examinamos su presencia por análisis Western blot en fracciones endocíticas purificadas (RRC y CURL), caracterizadas morfológica y bioquímicamente (Neville, 1960; Belcher et al., 1987; Enrich et al., 1996; Anderson, 1998; Pol et al., 1998; Enrich et al., 1999; Calvo et al., 2000), y en fracciones de membrana plasmática enriquecidas en caveolas (CEF) previamente caracterizadas (Belcher et al., 1987; Pol et al., 1999). Las fracciones endosomales RRC contienen vesículas de diferentes tamaños y transportan diferentes receptores reciclados, marcadores de transcitosis y también caveolares. Existen estudios de cinética de transporte de muchos ligandos endocitados, tales como la LDL, la asialofetúina, la pIgA, la transferrina y el EGF, detectados en aquellas fracciones endocíticas (Jackle et al., 1991; Enrich et al., 1996). La detección de CNT1 en las fracciones RRC coincide con el hecho de que estas fracciones endosomales transporten proteínas de transcitosis, tales como las proteínas de anclaje a GPI, hacia el dominio apical. Por lo tanto, la presencia de CNT1 en las fracciones enriquecidas en caveolas (CEF) y en los endosomas RRC, nos indica que este transportador para llegar a su destino (la membrana apical) sigue en hepatocitos la ruta indirecta, vía una eventual inserción transitoria en la membrana basolateral.

Los análisis por microscopía electrónica de CNT1 y CNT2 en cortes de hígado de rata corroboran las observaciones precedentes, ya que CNT2 se detecta principalmente en el dominio sinusoidal, mientras que CNT1, además de tener una presencia mayoritariamente intracelular, se detecta en las membranas sinusoidales y apicales. En la membrana basolateral, la inserción de CNT1, pero no la de CNT2, se realiza en microdominios especializados enriquecidos en caveolas, en las microvellosidades de la membrana.

Aunque este estudio muestra evidencias de un tráfico de rCNT1 hacia la membrana plasmática apical por transcitosis o vía indirecta, no se excluye la posibilidad de que siga en paralelo una ruta directa.

En el esquema de la figura 51, está resumido el tráfico de los transportadores CNT1 y CNT2 en el hepatocito. Estos resultados abren una nueva vía para la regulación de la actividad de transporte de nucleósidos concentrativo en células parenquimales de hígado, sobre todo para CNT1, que depende de todo un proceso endocítico para llegar a la membrana apical, donde es activo.





**Figura 51: Modelo de la distribución intracelular de rCNT1 y rCNT2 y de la vía endocítica seguida por rCNT1 en hepatocito de rata.** Este modelo concuerda con la distribución de rCNT1 en las diferentes fracciones endosomales y de membrana plasmática. En la membrana basolateral, rCNT1 está situado cerca de las caveolas y rCNT2 en las microvellosidades de la membrana donde es activo. Después, rCNT1 se internaliza en la membrana y es transportado hacia la membrana canalicular donde será insertado.

Las estructuras vesiculares que permiten el transporte endocítico de CNT1 contienen moléculas involucradas en la transducción de señal de la MAPK ERK (Pol et al., 1998). Se sabe que inyecciones del factor de crecimiento EGF (*epidermal growth factor*) en la vena porta inducen una rápida translocación de la MAPKKK Raf-1 desde las fracciones de membrana enriquecidas en caveolinas (CEF) hacia los diferentes compartimentos endocíticos CURL y RRC, provocando así la fosforilación de la MAPK Mek y probablemente la activación de ERK. La posibilidad de que los factores de crecimientos modulen los transportadores de nucleósidos, particularmente CNT1, ha sido estudiado en paralelo a esta tesis, en nuestro grupo de investigación, por la Dra Sonia Fernández-Veledo. En su tesis, demuestra que las citoquinas TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) e IL6 (Interleukin-6) promueven una inducción de la expresión proteica de CNT1 tanto en cultivo primario de hepatocitos como en la línea celular Fao por dos mecanismos independientes (Fernández-Veledo et al., in press). TNF $\alpha$  e IL6 juegan un papel muy importante en la regeneración hepática. Ambos citoquinas son dos reguladores del proceso de *priming* en el cual los hepatocitos adquieren capacidad de proliferación (Michalopoulos and DeFrances, 1997). Durante las fases tempranas de la regeneración hepática se observa un incremento de TNF $\alpha$  e IL6 que permite a los hepatocitos responder ante los diferentes estímulos mitogénicos provocados por la aparición

posterior de determinados factores de crecimiento. Es muy probable que durante la regeneración hepática se produzca un incremento de la vía de reciclaje de nucleósidos, cuyo objetivo sería un consumo energético menor y donde la regulación de CNT1 contribuiría a esta respuesta adaptativa. Únicamente en el caso del cultivo primario de hepatocitos de rata, el incremento de los niveles proteicos de CNT1, inducido por TNF $\alpha$  e IL6, se ve reflejado en un aumento de su actividad de transporte y en una mayor expresión del transportador en membrana (Fernández-Veledo et al., in press). Esta observación sugiere una posible pérdida selectiva, en células derivadas de hepatoma, de los elementos implicados en la inserción en membrana del transportador.

A pesar de que actualmente se desconoce la función fisiológica del transportador hepático CNT1, su expresión canalicular podría explicar la baja concentración de uridina detectada en la bilis respecto al plasma. CNT1 podría ser un buen candidato en la recuperación de nucleósidos pirimidínicos en células diferenciadas bajo un complejo control de factores de crecimiento y de citoquinas que permitiría mantener el equilibrio entre las reservas de nucleósidos endógenas (síntesis *de novo*) y exógenas.

- **Regulación post-traducciona del transportador hepático rCNT2**

Los estudios presentados en esta tesis se centran en la regulación del transportador CNT2 en hígado. Demostramos por primera vez que la actividad de un transportador concentrativo de nucleósidos puede ser modulada por regulación purinérgica y por óxido nítrico.

En la mayoría de las células, el transporte y el metabolismo están acoplados de manera que la concentración citosólica de sustratos sea baja. Una de las particularidades del hígado es tener concentraciones de nucleósidos intracelulares más elevadas que en la sangre (Darnowski et al., 1987), así que los transportadores de nucleósidos concentrativos tienen un papel muy importante en este órgano. CNT2 es el único transportador concentrativo activo en la membrana basolateral, membrana a través de la cual se realizan todos los intercambios de metabolitos entre el hepatocito y la sangre. Debido a que CNT2 es el transportador de nucleósidos con mayor afinidad para la adenosina (Wang et al., 1997) y que en hepatocitos la concentración de nucleósidos citosólica es más alta que en la sangre, este transportador concentrativo parece ser el mejor candidato para modular las concentraciones extracelulares de dicho nucleósido. Por ello, supusimos que la entrada de adenosina mediada por CNT2 en el hepatocito pudiera ser modulada por regulación purinérgica. De hecho, la señal purinérgica inducida por R-PIA, agonista de los receptores de adenosina, permite la activación del transportador CNT2, aumentando su  $V_{max}$  en un 60%. Se trata de una regulación a corto plazo, ya que tiene un efecto máximo a los 5-10 minutos de la incubación con R-PIA. Esta

activación no parece inducir un aumento del número de transportadores en la membrana plasmática, como sí es el caso de la regulación de CNT2 por los ácidos biliares estudiado en colaboración con la Dra Sonia Fernández-Veledo.

Para determinar el tipo de receptor de adenosina implicado en la inducción de CNT2, realizamos ensayos de transporte utilizando varios agonistas y antagonistas de estos receptores. Conociendo la afinidad de cada receptor por sus agonistas y antagonistas (Fredholm et al., 2001a; Fredholm et al., 2001b), determinamos que el receptor de adenosina involucrado en la inducción de CNT2 es el receptor  $A_1$ . Durante esta tesis realizamos varias construcciones de CNT2 con el objetivo de determinar qué tipo de interacción existe entre este receptor y este transportador. Por un lado, la construcción CNT2-myc nos permitirá inmunoprecipitar CNT2 ya que se sabe que el anticuerpo anti-CNT2 no inmunoprecipita, para saber si CNT2 y  $A_1$  co-inmunoprecipitan. Por otro lado, la construcción CNT2-EYFP se podrá co-transfectar con la construcción  $A_1$ -GFP realizada en el laboratorio del Dr Rafael Franco (Universidad de Barcelona) para la eventual realización de estudios de interacción molecular (FRET).

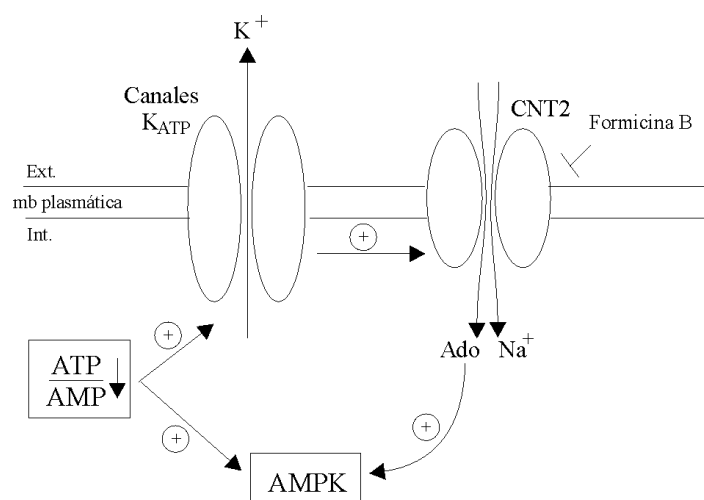
A pesar de que no hayamos podido determinar si existen interacciones moleculares entre el receptor  $A_1$  y el transportador CNT2, tratamos de identificar efectores susceptibles de modular esta activación purinérgica. Demostramos que la activación de CNT2 por R-PIA es dependiente de la activación de los canales  $K_{ATP}$ , ya que cuando estos canales están cerrados, el efecto de R-PIA sobre CNT2 no se observa. En esta tesis demostramos un nuevo papel fisiológico de los canales  $K_{ATP}$ : estos canales mediarían una señal que permite el control de la recuperación de la adenosina extracelular y la entrada de adenosina en la célula, contribuyendo así a un posible control del *pool* de nucleótidos en la célula. El tratamiento con glibenclamida, inhibidor de los canales  $K_{ATP}$ , en cultivos primarios de hepatocitos de rata a la que se ha inducido la proliferación con HGF, provoca una inhibición dosis dependiente de la incorporación de timidina tritiada en el DNA (Malhi et al., 2000). Así pues, los canales  $K_{ATP}$  parecen tener un papel importante en la proliferación de los hepatocitos. Se sabe que el nivel de mRNA de CNT2, en células Fao, está regulado por el ciclo celular (del Santo et al., 1998) y la cantidad de proteína de CNT2 aumenta durante la regeneración hepática (Felipe et al., 1998), por lo que la existencia de interacciones entre CNT2 y los canales  $K_{ATP}$  podría tener implicaciones fisiológicas importantes durante la proliferación hepática.

Los canales  $K_{ATP}$  juegan un papel muy importante en la regulación del tono arterial controlando el potencial de membrana de las células de los músculos vasculares lisos (Standen et al., 1989). En este sentido, estos canales están implicados en la protección contra las lesiones isquémicas, situaciones en las que la concentración de adenosina extracelular es muy alta. La adenosina es un activador endógeno de los canales  $K_{ATP}$  que provoca la relajación a corto plazo de

los músculos vasculares lisos, efecto que revierten los inhibidores tales como la tolbutamida y la glibenclamida (Quayle and Standen, 1994). Se ha descrito en miocitos que los canales  $K_{ATP}$  pueden ser estimulados mediante la inducción de los receptores  $A_1$  y permitirían la protección por acondicionamiento de las células contra lesiones celulares (Liang, 1997). Aunque la activación de los canales  $K_{ATP}$  durante un estrés metabólico tiene una acción protectora, una apertura excesiva de estos canales puede tener consecuencias muy perjudiciales y provocar arritmia del corazón y el silenciamiento de las neuronas en el cerebro (Janse and Wit, 1989; Wilde, 1993). Hu y colaboradores descubrieron en miocitos ventriculares y en neuronas del hipocampo que la adenosina, además de activar los canales  $K_{ATP}$  a corto plazo, provoca la internalización de estos canales mediante activación de la PKC, permitiendo así un retrocontrol de la activación de los canales  $K_{ATP}$  (Hu et al., 2003). En este contexto, la activación de CNT2 podría contribuir a la depleción del *pool* de adenosina extracelular.

Como la activación de CNT2 por inducción de los receptores  $A_1$  se efectúa vía los canales  $K_{ATP}$ , quisimos determinar si la diferencia de magnitud de la respuesta existente en las células Fao y en cultivo primario de hepatocitos pudiera ser la consecuencia de una diferencia de expresión de estos canales en estos tipos celulares. Por RT-PCR demostramos que los hepatocitos y las células Fao expresan todas las subunidades de los canales  $K_{ATP}$  con un perfil de expresión cualitativamente (y quizás cuantitativamente) muy similar. Por otro lado, se sabe que la concentración intracelular de glucosa influye sobre la activación de los canales  $K_{ATP}$  (Ashcroft et al., 1984). La entrada de glucosa en la célula provoca un incremento de la relación  $[ATP]/[ADP]$  intracelular que lleva al cierre de los canales  $K_{ATP}$  (Rorsman and Trube, 1985) provocando la despolarización de la célula y por tanto, la inhibición de la señal purinérgica que induce la actividad de CNT2. Dado que no parece haber diferencias sensibles en el patrón de expresión de los monómeros de los canales  $K_{ATP}$  entre hepatocitos y las células Fao, consideramos que la distinta magnitud en la respuesta de CNT2 a agonistas purinérgicos podría quizás deberse al hecho de que, al contrario de los hepatocitos, las células Fao normalmente se cultivan con glucosa elevada. Por todo ello decidimos estudiar la influencia de los cambios en la concentración extracelular de glucosa sobre la inducción de CNT2 mediada por R-PIA. Destacamos de estos experimentos que la activación de CNT2 por inducción purinérgica es dependiente de la concentración de glucosa del medio celular. Se observa una mayor estimulación de la actividad de CNT2 cuando las células se cultivan en medios de concentración de glucosa de 5,5 mM que de 10 mM. Esto ocurre tanto en el cultivo primario de hepatocitos como en el de células Fao. La incubación con glucosa en el rango fisiológico (5.5 mM) se traduce en un nivel de activación de CNT2, en células Fao, similar al que se observó en cultivos primarios de hepatocitos, por lo que cabe anticipar que la diferencia en la magnitud de la respuesta se debe muy probablemente a la glucemia del medio de cultivo.

Estas últimas observaciones nos indican que la regulación de CNT2 por inducción purinérgica vía los canales  $K_{ATP}$  es función del nivel energético celular. Por otro lado, en nuestro grupo de investigación, Ivette Aymerich descubrió que la incubación de las células en presencia de adenosina provoca la activación de la AMPK (*AMP-activated protein kinase*), enzima que se activa cuando la célula se encuentra en un estado energético bajo, es decir cuando la relación  $[ATP]/[AMP]$  intracelular es baja. Este enzima está implicado en el metabolismo glucídico y lipídico (Musí and Goodyear, 2002; Kemp et al., 2003; Rutter et al., 2003). La inducción de la actividad de la AMPK mediante incubaciones con adenosina parece dependiente de la entrada de adenosina por el transportador de alta afinidad CNT2, ya que la utilización de formicina B (que a concentraciones de 100  $\mu M$  inhibe la actividad de transporte de CNT2 en un 60%, sin modificar las actividades de los transportadores equilibrativos) bloquea la inducción de la enzima. Estos resultados apuntan hacia una regulación específica de la captación de adenosina por parte de CNT2 en función del nivel energético celular. La figura 52 representa un esquema de la regulación de la captación de adenosina por CNT2 en función del nivel energético celular.



**Figura 52: Regulación específica de la captación de adenosina por CNT2 en función del nivel energético celular.**

Lo que queda por destacar de la activación de CNT2 vía los canales  $K_{ATP}$ , es el modo de acción de los canales sobre el transportador. Una de la hipótesis más obvia era que la activación del transportador se hiciera por cambio de la polarización de la membrana plasmática ya que una vez activados, los canales  $K_{ATP}$  hiperpolarizan la membrana. El hecho de que la actividad de transporte de alanina dependiente de sodio en la línea celular Fao, no se modula en presencia de R-PIA, nos permite concluir que la activación de los canales  $K_{ATP}$ , por inducción de los receptores  $A_1$ , no provoca un aumento general de la actividad de transporte dependiente de sodio. No obstante, la activación de CNT2 mediante los canales  $K_{ATP}$  podría ser el resultado de una hiperpolarización

local de la membrana. De hecho, hemos demostrado que en células Fao, las subunidades de los canales  $K_{ATP}$  (excepto la subunidad SUR1, contra la cual no teníamos anticuerpos adecuados) colocalizan con CNT2 y el receptor  $A_1$  en dominios específicos de la membrana.

A día de hoy no se puede explicar exactamente como activan los canales  $K_{ATP}$  a los transportadores CNT2. En nuestro grupo y en colaboración con el Dr Robert Norman, Isabel Huber trata de determinar las subunidades de los canales  $K_{ATP}$  implicadas en esta activación mediante ensayos de transporte en células transfectadas con dominantes negativos de las diferentes subunidades. Además, se planea co-inmunoprecipitar las diferentes subunidades de los canales  $K_{ATP}$  con CNT2, con el objetivo de identificar posibles interacciones moleculares entre estos dos tipos de proteínas.

Otro mecanismo de regulación, quizás convergente en el sistema canales  $K_{ATP}$ -CNT2, parece involucrar al óxido nítrico (NO). El NO es un regulador importante de las funciones del hepatocito. Puede inhibir la síntesis proteica (Curran et al., 1991), tiene efectos inhibitorios sobre el metabolismo de los carbohidratos inhibiendo la glicogénesis y la gluconeogénesis (Brass and Vetter, 1993), y se sabe que tiene un efecto citoprotector durante el periodo de isquemia mediante activación purinérgica (Peralta et al., 1999). En nuestro grupo, Soler y colaboradores demostraron que la ausencia de NO en linfocitos B, provoca una disminución de la actividad de CNT2 (Soler et al., 2000). Todos estos efectos nos indicaban que muy probablemente, el NO pudiera estar implicado en la regulación de la actividad de CNT2 en hígado. Como se describe en el capítulo 3 de esta memoria, medimos la actividad de transporte de CNT2 en células Fao y en cultivo primario de hepatocitos después de incubar las células con diferentes activadores e inhibidores de la óxido nítrico sintasa (NOS). El resultado fue que la inhibición de la NOS provoca un aumento de la actividad de transporte de CNT2 de un 60%, tanto en hepatomas de rata como en cultivo primario de hepatocitos de rata. Corresponde a un efecto a corto plazo ya que tiene una amplitud máxima a los 15 minutos de incubación con el inhibidor de la NOS, LNAME. Sabemos que los hepatocitos producen NO mediante los enzimas iNOS y eNOS. LNAME y LNMMA pueden inhibir los dos enzimas, sin embargo las incubaciones con estos inhibidores son tan cortas que parece muy improbable que la iNOS sea implicada en este efecto.

Igual que la activación de CNT2 por inducción del receptor  $A_1$  estudiada anteriormente, el efecto del inhibidor de la NOS, LNAME sobre CNT2 es rápido y no se puede comparar con el efecto encontrado en linfocitos B que era a largo plazo (Soler et al., 2000); lo que nos llevo a determinar si la activación de CNT2 por LNAME y por el agonista R-PIA dependían de la misma vía de regulación. Por lo tanto, estudiamos el efecto de la glucosa sobre la activación de CNT2 por inhibición de la NOS, ya que concentraciones altas de glucosa afectan la activación de CNT2 por

R-PIA, además, en hígado, el NO parece controlar la homeostasis de la glucosa, inhibiendo la glicogénesis y la gluconeogénesis (Brass and Vetter, 1993). La inducción de la actividad de CNT2 por LNAME, en cultivo primario de hepatocitos es igual tanto a concentraciones de 5.5 mM como de 10 mM, así que la concentración de glucosa del medio no parece afectar el aumento de actividad de CNT2 inducido por LNAME a nivel fisiológico. Sin embargo, en la línea celular Fao, el efecto de LNAME es mayor con concentraciones altas de glucosa. Como hemos visto previamente, las células Fao, al ser derivadas de células de hepatoma, se suelen cultivar en glucosa alta, donde tienen un crecimiento celular óptimo, así que el hecho de incubar las células en medios de glucosa de concentración más baja podría ser un factor limitante de su actividad celular.

Siguiendo la hipótesis de que la acción de LNAME y de R-PIA sobre CNT2 pudieran seguir la misma vía de regulación y a pesar de que la concentración de glucosa no afecte el aumento de actividad de CNT2 inducido por LNAME, nos planteamos estudiar la implicación de los canales  $K_{ATP}$  en la regulación de CNT2 por el NO. Demostramos que la inhibición de los canales  $K_{ATP}$  por glibenclamida revierte el efecto del inhibidor de la NOS sobre CNT2. De la misma manera que R-PIA, LNAME parece inducir la actividad de CNT2 mediante la activación de los canales  $K_{ATP}$ .

Al igual que los receptores  $A_1$ , el NO está muy implicado en fenómenos de preconditionamiento isquémico en los que la PKC parece ser uno de los mediadores centrales (Nakano et al., 2000). La PKC, activada por adenosina, tiene un efecto doble en la modulación de la actividad de los canales  $K_{ATP}$ , ya que puede activarlos directamente por fosforilación y, cuando el enzima está sometido a una activación prolongada, favorece su internalización reduciendo así el número de canales en la membrana (Hu et al., 2003). Como además se han descrito varias interacciones entre el NO, los canales  $K_{ATP}$  y la PKC (Armstead, 1999; Nayeem and Mustafa, 2002; Otani et al., 2003), nos propusimos estudiar el posible papel de este enzima en la activación de los transportadores CNT2 por LNAME, por una parte, y por R-PIA, por otra. La inhibición de la PKC por la chelerythrine chloride no afecta la inducción de la actividad de CNT2 por LNAME, pero revierte la activación de este transportador por R-PIA.

Mientras que la activación de CNT2 mediante inducción del receptor  $A_1$  es dependiente de la PKC, la activación de este transportador por el activador de los canales  $K_{ATP}$ , diazoxida, no está modulado por este enzima. Estos resultados nos indican que la PKC está implicada en la activación de los canales  $K_{ATP}$  por el receptor  $A_1$  pero no en la activación de CNT2 por estos canales. La inducción del receptor  $A_1$  por su agonista R-PIA permite la activación de los canales  $K_{ATP}$  vía PKC (figura 53). No se sabe a día de hoy cómo actúa la PKC sobre los canales  $K_{ATP}$  en el modelo estudiado en esta tesis.

Mediante inhibición de la NOS y mediante inducción del receptor  $A_1$ , por dos vías de regulación aparentemente distintas, se activan los canales  $K_{ATP}$ , lo que provoca la inducción, probablemente por hiperpolarización local de la membrana, de la actividad de los transportadores de adenosina de alta afinidad CNT2 (figura 53); ésto permitiría la entrada de adenosina en la célula y de este modo el control de la señal purinérgica por eliminación del *pool* de adenosina extracelular.

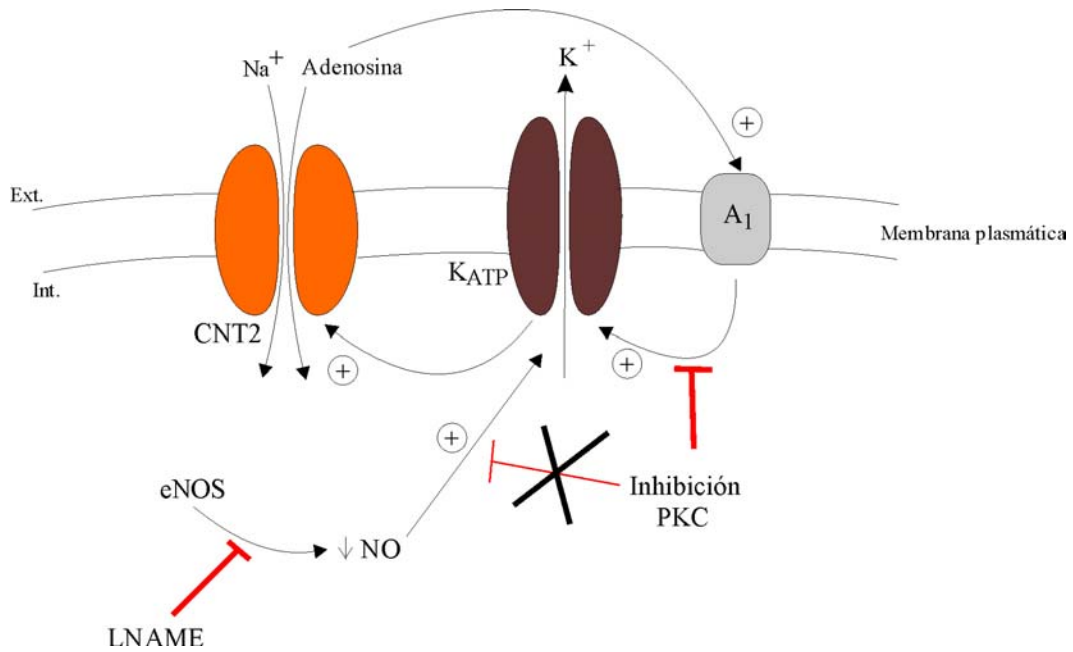


Figura 53: Modelo de la activación del transportador CNT2 por inducción del receptor de adenosina  $A_1$  y por inhibición de la NOS



***CONCLUSIONES***



1. En hepatocitos, células polarizadas, la localización y el tráfico subcelular de CNT1 y CNT2 deben estar diferencialmente regulados ya que CNT1 tiene por diana la membrana canalicular y CNT2 la membrana basolateral.
2. CNT1 llega a la membrana canalicular por una ruta indirecta a través de la membrana basolateral. Su inserción se realiza cerca de microdominios especializados enriquecidos en caveolas. Creemos que esta es la primera evidencia de la transcitosis hasta la membrana canalicular de un transportador de membrana plasmática en células parenquimales hepáticas.
3. A nivel funcional, el transporte concentrativo de nucleósidos en la membrana basolateral es purina-preferente, vía CNT2 exclusivamente, mientras que en la membrana canalicular se detecta una actividad de transporte concentrativo tanto de purinas como de pirimidinas, compatibles con la co-expresión de CNT1 y probablemente CNT3.
4. El transportador concentrativo de adenosina hepático CNT2 está bajo regulación purinérgica. La activación del receptor de adenosina  $A_1$  induce, a corto plazo, la actividad del transportador mediante la activación de los canales  $K_{ATP}$ , de manera dependiente de PKC.
5. Una disminución de la concentración intracelular de óxido nítrico contribuye en la activación, a corto plazo, del transportador CNT2 mediante la activación, independientemente de la PKC, de los canales  $K_{ATP}$ .
6. La inserción en membrana de CNT2 está regulada por ácidos biliares, siendo este un segundo tipo de mecanismo de regulación post traduccional del transportador CNT2.



## ***BIBLIOGRAFÍA***



## A

- Abebe, W. and Mustafa, S.J.:** A1 adenosine receptor-mediated Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> generation in allergic rabbit airway smooth muscle. *Am J Physiol* 275 (1998) L990-7.
- Acimovic, Y. and Coe, I.R.:** Molecular evolution of the equilibrative nucleoside transporter family: identification of novel family members in prokaryotes and eukaryotes. *Mol Biol Evol* 19 (2002) 2199-210.
- Ackley, M.A., Governo, R.J., Cass, C.E., Young, J.D., Baldwin, S.A. and King, A.E.:** Control of glutamatergic neurotransmission in the rat spinal dorsal horn by the nucleoside transporter ENT1. *J Physiol* 548 (2003) 507-17.
- Adjei, A.A. and Yamamoto, S.:** A dietary nucleoside-nucleotide mixture inhibits endotoxin-induced bacterial translocation in mice fed protein-free diet. *J Nutr* 125 (1995) 42-8.
- Airaksinen, A., Pariente, N., Menendez-Arias, L. and Domingo, E.:** Curing of foot-and-mouth disease virus from persistently infected cells by ribavirin involves enhanced mutagenesis. *Virology* 311 (2003) 339-49.
- Anderson, C.M., Xiong, W., Young, J.D., Cass, C.E. and Parkinson, F.E.:** Demonstration of the existence of mRNAs encoding N1/cif and N2/cit sodium/nucleoside cotransporters in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 42 (1996) 358-61.
- Armstead, W.M.:** Superoxide generation links protein kinase C activation to impaired ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel function after brain injury. *Stroke* 30 (1999) 153-9.
- Aronson, N.N., Jr. and Touster, O.:** Isolation of rat liver plasma membrane fragments in isotonic sucrose. *Methods Enzymol* 31 (1974) 90-102.
- Ashcroft, F.M., Harrison, D.E. and Ashcroft, S.J.:** Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature* 312 (1984) 446-8.
- Ashcroft, F.M.:** Adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels. *Annu Rev Neurosci* 11 (1988) 97-118.

## B

- Baldwin, S.A., Mackey, J.R., Cass, C.E. and Young, J.D.:** Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development. *Mol Med Today* 5 (1999) 216-24.
- Baldwin, S.A., Beal, P.R., Yao, S.Y., King, A.E., Cass, C.E. and Young, J.D.:** The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch* 447 (2004) 735-43.
- Balon, T.W. and Nadler, J.L.:** Nitric oxide release is present from incubated skeletal muscle preparations. *J Appl Physiol* 77 (1994) 2519-21.
- Barbero, E.R., Herrera, M.C., Monte, M.J., Serrano, M.A. and Marin, J.J.:** Role of amidation in bile acid effect on DNA synthesis by regenerating mouse liver. *Am J Physiol* 268 (1995) G1051-9.
- Bartles, J.R., Feracci, H.M., Stieger, B. and Hubbard, A.L.:** Biogenesis of the rat hepatocyte plasma membrane in vivo: comparison of the pathways taken by apical and basolateral proteins using subcellular fractionation. *J Cell Biol* 105 (1987) 1241-51.
- Baukrowitz, T. and Fakler, B.:** KATP channels gated by intracellular nucleotides and phospholipids. *Eur J Biochem* 267 (2000) 5842-8.
- Baxter, G.F. and Yellon, D.M.:** ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels mediate the delayed cardioprotective effect of adenosine A1 receptor activation. *J Mol Cell Cardiol* 31 (1999) 981-9.
- Belardinelli, L. and Isenberg, G.:** Isolated atrial myocytes: adenosine and acetylcholine increase potassium conductance. *Am J Physiol* 244 (1983) H734-7.
- Belcher, J.D., Hamilton, R.L., Brady, S.E., Hornick, C.A., Jaeckle, S., Schneider, W.J. and Havel, R.J.:** Isolation and characterization of three endosomal fractions from the liver of estradiol-treated rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1987) 6785-9.
- Belt, J.A., Marina, N.M., Phelps, D.A. and Crawford, C.R.:** Nucleoside transport in normal and neoplastic cells. *Adv Enzyme Regul* 33 (1993) 235-52.

- Berry, M.N. and Friend, D.S.:** High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* 43 (1969) 506-20.
- Bofill, M., Fairbanks, L.D., Ruckemann, K., Lipman, M. and Simmonds, H.A.:** T-lymphocytes from AIDS patients are unable to synthesize ribonucleotides de novo in response to mitogenic stimulation. Impaired pyrimidine responses are already evident at early stages of HIV-1 infection. *J Biol Chem* 270 (1995) 29690-7.
- Bouffard, D.Y. and Momparler, R.L.:** Comparison of the induction of apoptosis in human leukemic cell lines by 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) and cytosine arabinoside. *Leuk Res* 19 (1995) 849-56.
- Boyer, J.L.:** New concepts of mechanisms of hepatocyte bile formation. *Physiol Rev* 60 (1980) 303-26.
- Bradford, M.M.:** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72 (1976) 248-54.
- Brass, E.P. and Vetter, W.H.:** Inhibition of glucagon-stimulated glycogenolysis by S-nitroso-N-acetylpenicillamine. *Pharmacol Toxicol* 72 (1993) 369-72.
- Bryant, N.J., Govers, R. and James, D.E.:** Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (2002) 267-77.
- Burnstock, G.:** P2 purinoceptors: historical perspective and classification. *Ciba Found Symp* 198 (1996) 1-28; discussion 29-34.
- Buxton, D.B., Fisher, R.A., Robertson, S.M. and Olson, M.S.:** Stimulation of glycogenolysis and vasoconstriction by adenosine and adenosine analogues in the perfused rat liver. *Biochem J* 248 (1987) 35-41.

## C

- Calvo, M., Pol, A., Lu, A., Ortega, D., Pons, M., Blasi, J. and Enrich, C.:** Cellubrevin is present in the basolateral endocytic compartment of hepatocytes and follows the transcytotic pathway after IgA internalization. *J Biol Chem* 275 (2000) 7910-7.
- Casado, F.J., Lostao, M.P., Aymerich, I., Larrayoz, I.M., Dufлот, S., Rodriguez-Mulero, S. and Pastor-Anglada, M.:** Nucleoside transporters in absorptive epithelia. *J Physiol Biochem* 58 (2002) 207-16.
- Che, M., Nishida, T., Gatmaitan, Z. and Arias, I.M.:** A nucleoside transporter is functionally linked to ectonucleotidases in rat liver canalicular membrane. *J Biol Chem* 267 (1992) 9684-8.
- Che, M., Ortiz, D.F. and Arias, I.M.:** Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the bile canalicular, purine-specific Na(+)-nucleoside cotransporter. *J Biol Chem* 270 (1995) 13596-9.
- Coe, I.R., Griffiths, M., Young, J.D., Baldwin, S.A. and Cass, C.E.:** Assignment of the human equilibrative nucleoside transporter (hENT1) to 6p21.1-p21.2. *Genomics* 45 (1997) 459-60.
- Coleman, R. and Roma, M.G.:** Hepatocyte couplets. *Biochem Soc Trans* 28 (2000) 136-40.
- Cook, D.L. and Hales, C.N.:** Intracellular ATP directly blocks K<sup>+</sup> channels in pancreatic B-cells. *Nature* 311 (1984) 271-3.
- Correia-de-Sa, P. and Ribeiro, J.A.:** Adenosine uptake and deamination regulate tonic A2a receptor facilitation of evoked [3H]acetylcholine release from the rat motor nerve terminals. *Neuroscience* 73 (1996) 85-92.
- Craig, J.E., Zhang, Y. and Gallagher, M.P.:** Cloning of the nupC gene of *Escherichia coli* encoding a nucleoside transport system, and identification of an adjacent insertion element, IS 186. *Mol Microbiol* 11 (1994) 1159-68.
- Crawford, C.R., Patel, D.H., Naeve, C. and Belt, J.A.:** Cloning of the human equilibrative, nitrobenzylmercaptapurine riboside (NBMPR)-insensitive nucleoside transporter ei by functional expression in a transport-deficient cell line. *J Biol Chem* 273 (1998) 5288-93.



- Cronstein, B.N., Kramer, S.B., Weissmann, G. and Hirschhorn, R.:** Adenosine: a physiological modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. *J Exp Med* 158 (1983) 1160-77.
- Csont, T., Szilvassy, Z., Fulop, F., Nedeianu, S., Pali, T., Tosaki, A., Dux, L. and Ferdinandy, P.:** Direct myocardial anti-ischaemic effect of GTN in both nitrate-tolerant and nontolerant rats: a cyclic GMP-independent activation of KATP. *Br J Pharmacol* 128 (1999) 1427-34.
- Curran, R.D., Billiar, T.R., Stuehr, D.J., Hofmann, K. and Simmons, R.L.:** Hepatocytes produce nitrogen oxides from L-arginine in response to inflammatory products of Kupffer cells. *J Exp Med* 170 (1989) 1769-74.
- Curran, R.D., Billiar, T.R., Stuehr, D.J., Ochoa, J.B., Harbrecht, B.G., Flint, S.G. and Simmons, R.L.:** Multiple cytokines are required to induce hepatocyte nitric oxide production and inhibit total protein synthesis. *Ann Surg* 212 (1990) 462-9; discussion 470-1.
- Curran, R.D., Ferrari, F.K., Kispert, P.H., Stadler, J., Stuehr, D.J., Simmons, R.L. and Billiar, T.R.:** Nitric oxide and nitric oxide-generating compounds inhibit hepatocyte protein synthesis. *Faseb J* 5 (1991) 2085-92.

## D

- Daly, J.W., Butts-Lamb, P. and Padgett, W.:** Subclasses of adenosine receptors in the central nervous system: interaction with caffeine and related methylxanthines. *Cell Mol Neurobiol* 3 (1983) 69-80.
- Darnowski, J.W., Holdridge, C. and Handschumacher, R.E.:** Concentrative uridine transport by murine splenocytes: kinetics, substrate specificity, and sodium dependency. *Cancer Res* 47 (1987) 2614-9.
- del Santo, B., Valdes, R., Mata, J., Felipe, A., Casado, F.J. and Pastor-Anglada, M.:** Differential expression and regulation of nucleoside transport systems in rat liver parenchymal and hepatoma cells. *Hepatology* 28 (1998) 1504-11.
- del Santo, B., Tarafa, G., Felipe, A., Casado, F.J. and Pastor-Anglada, M.:** Developmental regulation of the concentrative nucleoside transporters CNT1 and CNT2 in rat liver. *J Hepatol* 34 (2001) 873-80.
- Dixon, A.K., Gubit, A.K., Sirinathsinghji, D.J., Richardson, P.J. and Freeman, T.C.:** Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br J Pharmacol* 118 (1996) 1461-8.
- Dolphin, A.C., Forda, S.R. and Scott, R.H.:** Calcium-dependent currents in cultured rat dorsal root ganglion neurones are inhibited by an adenosine analogue. *J Physiol* 373 (1986) 47-61.
- Dunne, M.J., Cosgrove, K.E., Shepherd, R.M. and Ammala, C.:** Potassium Channels, Sulphonylurea Receptors and Control of Insulin Release. *Trends Endocrinol Metab* 10 (1999) 146-152.

## E

- Enrich, C., Jackle, S. and Havel, R.J.:** The polymeric immunoglobulin receptor is the major calmodulin-binding protein in an endosome fraction from rat liver enriched in recycling receptors. *Hepatology* 24 (1996) 226-32.
- Enrich, C., Pol, A., Calvo, M., Pons, M. and Jackle, S.:** Dissection of the multifunctional "Receptor-Recycling" endocytic compartment of hepatocytes. *Hepatology* 30 (1999) 1115-20.
- Ezzat, W.R. and Lutt, W.W.:** Hepatic arterial pressure-flow autoregulation is adenosine mediated. *Am J Physiol* 252 (1987) H836-45.

## **F**

- Fallahi, N., Broad, R.M., Jin, S. and Fredholm, B.B.:** Release of adenosine from rat hippocampal slices by nitric oxide donors. *J Neurochem* 67 (1996) 186-93.
- Farre, X., Guillén-Gomez, E., Sánchez, L., Hardisson, D., Plaza, Y., Lloberas, J., Casado, F.J., Palacios, J. and Pastor-Anglada, M.:** Expression of the nucleoside-derived drug transporters hCNT1, hENT1 and hENT2 in gynecologic tumors. *Int. J. cancer*. In press.
- Felipe, A., Ferrer-Martinez, A., Casado, F.J. and Pastor-Anglada, M.:** Expression of sodium-dependent purine nucleoside carrier (SPNT) mRNA correlates with nucleoside transport activity in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 233 (1997) 572-5.
- Felipe, A., Valdes, R., Santo, B., Lloberas, J., Casado, J. and Pastor-Anglada, M.:** Na<sup>+</sup>-dependent nucleoside transport in liver: two different isoforms from the same gene family are expressed in liver cells. *Biochem J* 330 ( Pt 2) (1998) 997-1001.
- Feoktistov, I. and Biaggioni, I.:** Adenosine A<sub>2b</sub> receptors evoke interleukin-8 secretion in human mast cells. An enprofylline-sensitive mechanism with implications for asthma. *J Clin Invest* 96 (1995) 1979-86.
- Feranchak, A.P. and Fitz, J.G.:** Adenosine triphosphate release and purinergic regulation of cholangiocyte transport. *Semin Liver Dis* 22 (2002) 251-62.
- Fernández-Veledo, s., Valdés, R., Wallenius, V., Jansson, J.O., Casado, F.J. and Pastor-Anglada, M.:** Up-regulation of the High affinity pyrimidine-preferring nucleoside transporter CNT1 by tumor necrosis-alpha and interleukin-6 in rat liver parenchymal cells. *J. Hepatology*. In press.
- Ferrer-Martinez, A., Felipe, A., Nicholson, B., Casado, J., Pastor-Anglada, M. and McGivan, J.:** Induction of the high-affinity Na<sup>(+)</sup>-dependent glutamate transport system XAG- by hypertonic stress in the renal epithelial cell line NBL-1. *Biochem J* 310 ( Pt 2) (1995) 689-92.
- Flanagan, S.A. and Meckling-Gill, K.A.:** Characterization of a novel Na<sup>+</sup>-dependent, guanosine-specific, nitrobenzylthioinosine-sensitive transporter in acute promyelocytic leukemia cells. *J Biol Chem* 272 (1997) 18026-32.
- Fontenelle, L.J. and Henderson, J.F.:** Sources of nitrogen as rate-limiting factors for purine biosynthesis de novo in Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta* 177 (1969) 88-93.
- Fra, A.M., Williamson, E., Simons, K. and Parton, R.G.:** De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 8655-9.
- Fredholm, B.B., Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Dubyak, G.R., Harden, T.K., Jacobson, K.A., Schwabe, U. and Williams, M.:** Towards a revised nomenclature for P1 and P2 receptors. *Trends Pharmacol Sci* 18 (1997) 79-82.
- Fredholm, B.B., AP, I.J., Jacobson, K.A., Klotz, K.N. and Linden, J.:** International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 53 (2001a) 527-52.
- Fredholm, B.B., Irenius, E., Kull, B. and Schulte, G.:** Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Biochem Pharmacol* 61 (2001b) 443-8.
- Freissmuth, M., Schutz, W. and Linder, M.E.:** Interactions of the bovine brain A1-adenosine receptor with recombinant G protein alpha-subunits. Selectivity for rGi alpha-3. *J Biol Chem* 266 (1991) 17778-83.
- Furchgott, R.F. and Zawadzki, J.V.:** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288 (1980) 373-6.

## **G**

- Gasser, T., Moyer, J.D. and Handschumacher, R.E.:** Novel single-pass exchange of circulating uridine in rat liver. *Science* 213 (1981) 777-8.

- Gautam, A., Ng, O.C. and Boyer, J.L.:** Isolated rat hepatocyte couplets in short-term culture: structural characteristics and plasma membrane reorganization. *Hepatology* 7 (1987) 216-23.
- Gerwins, P. and Fredholm, B.B.:** Stimulation of adenosine A1 receptors and bradykinin receptors, which act via different G proteins, synergistically raises inositol 1,4,5-trisphosphate and intracellular free calcium in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992) 7330-4.
- Gerwins, P. and Fredholm, B.B.:** Activation of adenosine A1 and bradykinin receptors increases protein kinase C and phospholipase D activity in smooth muscle cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 351 (1995) 186-93.
- Geuze, H.J., Slot, J.W., Strous, G.J., Peppard, J., von Figura, K., Hasilik, A. and Schwartz, A.L.:** Intracellular receptor sorting during endocytosis: comparative immunoelectron microscopy of multiple receptors in rat liver. *Cell* 37 (1984) 195-204.
- Gomez-Angelats, M., Ruiz-Montasell, B., Felipe, A., Marin, J.J., Casado, F.J. and Pastor-Anglada, M.:** Effect of protein malnutrition on neutral amino acid transport by rat hepatocytes during development. *Am J Physiol* 268 (1995) E368-74.
- Gomez-Angelats, M., del Santo, B., Mercader, J., Ferrer-Martinez, A., Felipe, A., Casado, J. and Pastor-Anglada, M.:** Hormonal regulation of concentrative nucleoside transport in liver parenchymal cells. *Biochem J* 313 ( Pt 3) (1996) 915-20.
- Gonzalez-Benitez, E., Guinzberg, R., Diaz-Cruz, A. and Pina, E.:** Regulation of glycogen metabolism in hepatocytes through adenosine receptors. Role of Ca<sup>2+</sup> and cAMP. *Eur J Pharmacol* 437 (2002) 105-11.
- Granger, D.N., Valleau, J.D., Parker, R.E., Lane, R.S. and Taylor, A.E.:** Effects of adenosine on intestinal hemodynamics, oxygen delivery, and capillary fluid exchange. *Am J Physiol* 235 (1978) H707-19.
- Griffith, D.A. and Jarvis, S.M.:** Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1286 (1996) 153-81.
- Griffiths, M., Beaumont, N., Yao, S.Y., Sundaram, M., Boumah, C.E., Davies, A., Kwong, F.Y., Coe, I., Cass, C.E., Young, J.D. and Baldwin, S.A.:** Cloning of a human nucleoside transporter implicated in the cellular uptake of adenosine and chemotherapeutic drugs. *Nat Med* 3 (1997a) 89-93.
- Griffiths, M., Yao, S.Y., Abidi, F., Phillips, S.E., Cass, C.E., Young, J.D. and Baldwin, S.A.:** Molecular cloning and characterization of a nitrobenzylthioinosine-insensitive (ei) equilibrative nucleoside transporter from human placenta. *Biochem J* 328 ( Pt 3) (1997b) 739-43.
- Gruenberg, J. and Kreis, T.E.:** Membranes and sorting. *Curr Opin Cell Biol* 7 (1995) 519-22.
- Gutierrez, M.M., Brett, C.M., Ott, R.J., Hui, A.C. and Giacomini, K.M.:** Nucleoside transport in brush border membrane vesicles from human kidney. *Biochim Biophys Acta* 1105 (1992) 1-9.
- Gutierrez, M.M. and Giacomini, K.M.:** Substrate selectivity, potential sensitivity and stoichiometry of Na<sup>(+)</sup>-nucleoside transport in brush border membrane vesicles from human kidney. *Biochim Biophys Acta* 1149 (1993) 202-8.
- Gutierrez, M.M. and Giacomini, K.M.:** Expression of a human renal sodium nucleoside cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem Pharmacol* 48 (1994) 2251-3.

## H

- Hamilton, S.R., Yao, S.Y., Ingram, J.C., Hadden, D.A., Ritzel, M.W., Gallagher, M.P., Henderson, P.J., Cass, C.E., Young, J.D. and Baldwin, S.A.:** Subcellular distribution and membrane topology of the mammalian concentrative Na<sup>+</sup>-nucleoside cotransporter rCNT1. *J Biol Chem* 276 (2001) 27981-8.
- Haussinger, D., Stehle, T. and Gerok, W.:** Actions of extracellular UTP and ATP in perfused rat liver. A comparative study. *Eur J Biochem* 167 (1987) 65-71.

- Henderson, R.M., Graf, J. and Boyer, J.L.:** Inward-rectifying potassium channels in rat hepatocytes. *Am J Physiol* 256 (1989) G1028-35.
- Holstege, A., Gengenbacher, H.M., Jehle, L. and Hoppmann, J.:** Facilitated diffusion and sodium-dependent transport of purine and pyrimidine nucleosides in rat liver. *Hepatology* 14 (1991) 373-80.
- Holstege, A., Gengenbacher, H.M., Jehle, L. and Gerok, W.:** Uridine catabolism by the isolated perfused rat liver. *J Hepatol* 14 (1992) 335-41.
- Houslay, M.D. and Kolch, W.:** Cell-type specific integration of cross-talk between extracellular signal-regulated kinase and cAMP signaling. *Mol Pharmacol* 58 (2000) 659-68.
- Hu, K., Huang, C.S., Jan, Y.N. and Jan, L.Y.:** ATP-sensitive potassium channel traffic regulation by adenosine and protein kinase C. *Neuron* 38 (2003) 417-32.
- Huang, Q.Q., Harvey, C.M., Paterson, A.R., Cass, C.E. and Young, J.D.:** Functional expression of Na(+)-dependent nucleoside transport systems of rat intestine in isolated oocytes of *Xenopus laevis*. Demonstration that rat jejunum expresses the purine-selective system N1 (cif) and a second, novel system N3 having broad specificity for purine and pyrimidine nucleosides. *J Biol Chem* 268 (1993) 20613-9.
- Huang, Q.Q., Yao, S.Y., Ritzel, M.W., Paterson, A.R., Cass, C.E. and Young, J.D.:** Cloning and functional expression of a complementary DNA encoding a mammalian nucleoside transport protein. *J Biol Chem* 269 (1994) 17757-60.
- Hyde, R.J., Cass, C.E., Young, J.D. and Baldwin, S.A.:** 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 (2001) 53-63.

## I

- Ignarro, L.J., Wood, K.S. and Wolin, M.S.:** Activation of purified soluble guanylate cyclase by protoporphyrin IX. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79 (1982) 2870-3.
- Inagaki, N., Tsuruta, Y., Namba, N., Masuda, K., Gono, T., Horie, M., Seino, Y., Mizuta, M. and Seino, S.:** Cloning and functional characterization of a novel ATP-sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including pancreatic islets, pituitary, skeletal muscle, and heart. *J Biol Chem* 270 (1995) 5691-4.
- Iseki, K., Sugawara, M., Fujiwara, T., Naasani, I., Kobayashi, M. and Miyazaki, K.:** Transport mechanisms of nucleosides and the derivative, 6-mercaptapurine riboside across rat intestinal brush-border membranes. *Biochim Biophys Acta* 1278 (1996) 105-10.

## J

- Jackle, S., Runquist, E.A., Miranda-Brady, S. and Havel, R.J.:** Trafficking of the epidermal growth factor receptor and transferrin in three hepatocytic endosomal fractions. *J Biol Chem* 266 (1991) 1396-402.
- Jackson, C.D., Weis, C., Miller, B.J. and James, S.J.:** Dietary nucleotides: effects on cell proliferation following partial hepatectomy in rats fed NIH-31, AIN-76A, or folate/methyl-deficient diets. *J Nutr* 127 (1997) 834S-837S.
- Jaffrey, S.R. and Snyder, S.H.:** Nitric oxide: a neural messenger. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11 (1995) 417-40.
- Janse, M.J. and Wit, A.L.:** Electrophysiological mechanisms of ventricular arrhythmias resulting from myocardial ischemia and infarction. *Physiol Rev* 69 (1989) 1049-169.
- Jarvis, S.M., Young, J.D. and Ellory, J.C.:** Nucleoside transport in human erythrocytes. Apparent molecular weight of the nitrobenzylthioinosine-binding complex estimated by radiation-inactivation analysis. *Biochem J* 190 (1980) 373-6.

- Jarvis, S.M. and Young, J.D.:** Extraction and partial purification of the nucleoside-transport system from human erythrocytes based on the assay of nitrobenzylthioinosine-binding activity. *Biochem J* 194 (1981) 331-9.
- Jarvis, S.M. and Griffith, D.A.:** Expression of the rabbit intestinal N<sup>2</sup> Na<sup>+</sup>/nucleoside transporter in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem J* 278 ( Pt 2) (1991) 605-7.
- Johnson, S.A.:** Nucleoside analogues in the treatment of haematological malignancies. *Expert Opin Pharmacother* 2 (2001) 929-43.

## K

- Kemp, B.E., Stapleton, D., Campbell, D.J., Chen, Z.P., Murthy, S., Walter, M., Gupta, A., Adams, J.J., Katsis, F., van Denderen, B., Jennings, I.G., Iseli, T., Michell, B.J. and Witters, L.A.:** AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator. *Biochem Soc Trans* 31 (2003) 162-8.
- Keppens, S. and De Wulf, H.:** Characterization of the biological effects of 2-methylthio-ATP on rat hepatocytes: clear-cut differences with ATP. *Br J Pharmacol* 104 (1991) 301-4.
- Kipp, H. and Arias, I.M.:** Newly synthesized canalicular ABC transporters are directly targeted from the Golgi to the hepatocyte apical domain in rat liver. *J Biol Chem* 275 (2000) 15917-25.
- Kipps, T.J.:** Chronic lymphocytic leukemia. *Curr Opin Hematol* 7 (2000) 223-34.
- Kirchhausen, T. and Toyoda, T.:** Immunoelectron microscopic evidence for the extended conformation of light chains in clathrin trimers. *J Biol Chem* 268 (1993) 10268-73.
- Kiss, A., Farah, K., Kim, J., Garriock, R.J., Drysdale, T.A. and Hammond, J.R.:** Molecular cloning and functional characterization of inhibitor-sensitive (mENT1) and inhibitor-resistant (mENT2) equilibrative nucleoside transporters from mouse brain. *Biochem J* 352 Pt 2 (2000) 363-72.
- Koivisto, U.M., Hubbard, A.L. and Mellman, I.:** A novel cellular phenotype for familial hypercholesterolemia due to a defect in polarized targeting of LDL receptor. *Cell* 105 (2001) 575-85.
- Kolassa, N., Stengg, R. and Turnheim, K.:** Salvage of adenosine, inosine, hypoxanthine, and adenisine by the isolated epithelium of guinea pig jejunum. *Can J Physiol Pharmacol* 55 (1977) 1039-44.

## L

- Laemmli, U.K.:** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680-5.
- Lajtha, L.G. and Vane, J.R.:** Dependence of bone marrow cells on the liver for purine supply. *Nature* 182 (1958) 191-2.
- Larrayoz, I.M., Casado, F.J., Pastor-Anglada, M. and Lostao, M.P.:** Electrophysiological characterization of the human Na<sup>(+)</sup>/nucleoside cotransporter 1 (hCNT1) and role of adenosine on hCNT1 function. *J Biol Chem* 279 (2004) 8999-9007.
- Lavoine, A., Claeysens, S. and Chedeville, A.:** Metabolism of adenosine through adenosine kinase inhibits gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 187 (1990) 403-7.
- Latini, S. and Pedata, F.:** Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem* 79 (2001) 463-84.
- Li, S., Song, K.S., Koh, S.S., Kikuchi, A. and Lisanti, M.P.:** Baculovirus-based expression of mammalian caveolin in Sf21 insect cells. A model system for the biochemical and morphological study of caveolae biogenesis. *J Biol Chem* 271 (1996) 28647-54.
- Liang, B.T.:** Protein kinase C-mediated preconditioning of cardiac myocytes: role of adenosine receptor and KATP channel. *Am J Physiol* 273 (1997) H847-53.

- Light, P.E., Kanji, H.D., Fox, J.E. and French, R.J.:** Distinct myoprotective roles of cardiac sarcolemmal and mitochondrial KATP channels during metabolic inhibition and recovery. *Faseb J* 15 (2001) 2586-94.
- Liu, G.S., Thornton, J., Van Winkle, D.M., Stanley, A.W., Olsson, R.A. and Downey, J.M.:** Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation* 84 (1991) 350-6.
- Loewen, S.K., Ng, A.M., Yao, S.Y., Cass, C.E., Baldwin, S.A. and Young, J.D.:** 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* 274 (1999) 24475-84.
- Londos, C., Cooper, D.M. and Wolff, J.:** Subclasses of external adenosine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77 (1980) 2551-4.
- Lostao, M.P., Mata, J.F., Larrayoz, I.M., Inzillo, S.M., Casado, F.J. and Pastor-Anglada, M.:** Electrogenic uptake of nucleosides and nucleoside-derived drugs by the human nucleoside transporter 1 (hCNT1) expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *FEBS Lett* 481 (2000) 137-40.
- Loubatieres, A., Alric, R., Mariani, M.M., de Malbosc, H. and Ribes, G.:** [Diazoxide experimentally exercises an inhibitory action on the basal secretion of insulin]. *C R Seances Soc Biol Fil* 160 (1966) 168-71.

## M

- Mackey, J.R., Yao, S.Y., Smith, K.M., Karpinski, E., Baldwin, S.A., Cass, C.E. and Young, J.D.:** Gemcitabine transport in *xenopus* oocytes expressing recombinant plasma membrane mammalian nucleoside transporters. *J Natl Cancer Inst* 91 (1999) 1876-81.
- Malhi, H., Irani, A.N., Rajvanshi, P., Suadicani, S.O., Spray, D.C., McDonald, T.V. and Gupta, S.:** KATP channels regulate mitogenically induced proliferation in primary rat hepatocytes and human liver cell lines. Implications for liver growth control and potential therapeutic targeting. *J Biol Chem* 275 (2000) 26050-7.
- Mangravite, L.M., Xiao, G. and Giacomini, K.M.:** Localization of human equilibrative nucleoside transporters, hENT1 and hENT2, in renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 284 (2003) F902-10.
- Marin, J.J., Barbero, E.R., Herrera, M.C., Tabernero, A. and Monte, M.J.:** Bile acid-induced modifications in DNA synthesis by the regenerating perfused rat liver. *Hepatology* 18 (1993) 1182-92.
- Mata, J.F., Garcia-Manteiga, J.M., Lostao, M.P., Fernandez-Veledo, S., Guillen-Gomez, E., Larrayoz, I.M., Lloberas, J., Casado, F.J. and Pastor-Anglada, M.:** 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* 59 (2001) 1542-8.
- McGinn, C.J., Miller, E.M., Lindstrom, M.J., Kunugi, K.A., Johnston, P.G. and Kinsella, T.J.:** The role of cell cycle redistribution in radiosensitization: implications regarding the mechanism of fluorodeoxyuridine radiosensitization. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 30 (1994) 851-9.
- Mercader, J., Gomez-Angelats, M., del Santo, B., Casado, F.J., Felipe, A. and Pastor-Anglada, M.:** Nucleoside uptake in rat liver parenchymal cells. *Biochem J* 317 ( Pt 3) (1996) 835-42.
- Michalopoulos, G.K. and DeFrances, M.C.:** Liver regeneration. *Science* 276 (1997) 60-6.
- Mogul, D.J., Adams, M.E. and Fox, A.P.:** Differential activation of adenosine receptors decreases N-type but potentiates P-type Ca<sup>2+</sup> current in hippocampal CA3 neurons. *Neuron* 10 (1993) 327-34.
- Molina-Arcas, M., Bellosillo, B., Casado, F.J., Montserrat, E., Gil, J., Colomer, D. and Pastor-Anglada, M.:** Fludarabine uptake mechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 101 (2003) 2328-34.

- Monte, J.M., Barbero, E.R., Villanueva, G.R., Serrano, M.A. and Marin, J.J.:** Role of rate-limiting enzymes of nucleotide metabolism in taurocholate-induced DNA synthesis inhibition. *J Hepatol* 25 (1996) 191-9.
- Moreno, F., Pastor-Anglada, M., Hollenberg, M.D. and Soley, M.:** Effects of epidermal growth factor (urogastrone) on gluconeogenesis, glucose oxidation, and glycogen synthesis in isolated rat hepatocytes. *Biochem Cell Biol* 67 (1989) 724-9.
- Moseley, R.H., Jarose, S. and Permoad, P.:** Adenosine transport in rat liver plasma membrane vesicles. *Am J Physiol* 261 (1991) G716-22.
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A.:** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155 (1987) 335-50.
- Munshi, R., Pang, I.H., Sternweis, P.C. and Linden, J.:** A1 adenosine receptors of bovine brain couple to guanine nucleotide-binding proteins Gi1, Gi2, and Go. *J Biol Chem* 266 (1991) 22285-9.
- Murad, F.:** The nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system for intracellular and intercellular communication. *Recent Prog Horm Res* 49 (1994) 239-48.
- Musi, N. and Goodyear, L.J.:** Targeting the AMP-activated protein kinase for the treatment of type 2 diabetes. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2 (2002) 119-27.

## N

- Nakano, A., Cohen, M.V. and Downey, J.M.:** Ischemic preconditioning: from basic mechanisms to clinical applications. *Pharmacol Ther* 86 (2000) 263-75.
- Nayem, M.A., Matherne, G.P. and Mustafa, S.J.:** Ischemic and pharmacological preconditioning induces further delayed protection in transgenic mouse cardiac myocytes over-expressing adenosine A1 receptors (A1AR): role of A1AR, iNOS and K(ATP) channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 367 (2003) 219-26.
- Nayem, M.A. and Mustafa, S.J.:** Mechanisms of delayed preconditioning with A1 adenosine receptor activation in porcine coronary smooth muscle cells. *Pol J Pharmacol* 54 (2002) 443-53.
- Neville, D.M., Jr.:** The isolation of a cell membrane fraction from rat liver. *J Biophys Biochem Cytol* 8 (1960) 413-22.
- Ngo, L.Y., Patil, S.D. and Unadkat, J.D.:** Ontogenic and longitudinal activity of Na(+)-nucleoside transporters in the human intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280 (2001) G475-81.
- Nichols, C.G. and Koster, J.C.:** Diabetes and insulin secretion: whither KATP? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283 (2002) E403-12.
- Nishizuka, Y.:** Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *Faseb J* 9 (1995) 484-96.

## O

- Ogoshi, S., Iwasa, M., Yonezawa, T. and Tamiya, T.:** Effect of nucleotide and nucleoside mixture on rats given total parenteral nutrition after 70% hepatectomy. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 9 (1985) 339-42.
- Ogoshi, S., Mizobuchi, S., Iwasa, M. and Tamiya, T.:** Effect of a nucleoside-nucleotide mixture on protein metabolism in rats after seventy percent hepatectomy. *Nutrition* 5 (1989) 173-8.
- Ohno, H., Tomemori, T., Nakatsu, F., Okazaki, Y., Aguilar, R.C., Foelsch, H., Mellman, I., Saito, T., Shirasawa, T. and Bonifacino, J.S.:** Mu1B, a novel adaptor medium chain expressed in polarized epithelial cells. *FEBS Lett* 449 (1999) 215-20.
- Ohyanagi, H., Nishimatsu, S., Kanbara, Y., Usami, M. and Saitoh, Y.:** Effects of nucleosides and a nucleotide on DNA and RNA syntheses by the salvage and de novo

pathway in primary monolayer cultures of hepatocytes and hepatoma cells. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 13 (1989) 51-8.

- Osses, N., Pearson, J.D., Yudilevich, D.L. and Jarvis, S.M.:** Hypoxanthine enters human vascular endothelial cells (ECV 304) via the nitrobenzylthioinosine-insensitive equilibrative nucleoside transporter. *Biochem J* 317 ( Pt 3) (1996) 843-8.
- Otani, H., Okada, T., Fujiwara, H., Uchiyama, T., Sumida, T., Kido, M. and Imamura, H.:** Combined pharmacological preconditioning with a G-protein-coupled receptor agonist, a mitochondrial KATP channel opener and a nitric oxide donor mimics ischaemic preconditioning. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30 (2003) 684-93.

## **P**

- Palmer, T.M., Gettys, T.W. and Stiles, G.L.:** Differential interaction with and regulation of multiple G-proteins by the rat A3 adenosine receptor. *J Biol Chem* 270 (1995) 16895-902.
- Palmer, R.M., Rees, D.D., Ashton, D.S. and Moncada, S.:** L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 153 (1988) 1251-6.
- Parkinson, F.E., Zhang, Y.W., Shepel, P.N., Greenway, S.C., Peeling, J. and Geiger, J.D.:** Effects of nitrobenzylthioinosine on neuronal injury, adenosine levels, and adenosine receptor activity in rat forebrain ischemia. *J Neurochem* 75 (2000) 795-802.
- Pastor, C.M., Morris, S.M., Jr. and Billiar, T.R.:** Sources of arginine for induced nitric oxide synthesis in the isolated perfused liver. *Am J Physiol* 269 (1995) G861-6.
- Pastor-Anglada, M., Remesar, X. and Bourdel, G.:** Alanine uptake by liver at midpregnancy in rats. *Am J Physiol* 252 (1987) E408-13.
- Pastor-Anglada, M., Felipe, A. and Casado, F.J.:** Transport and mode of action of nucleoside derivatives used in chemical and antiviral therapies. *Trends Pharmacol Sci* 19 (1998a) 424-30.
- Pastor-Anglada, M., Felipe, A., Casado, F.J., del Santo, B., Mata, J.F. and Valdes, R.:** Nucleoside transporters and liver cell growth. *Biochem Cell Biol* 76 (1998b) 771-7.
- Pastor-Anglada, M., Casado, F.J., Valdes, R., Mata, J., Garcia-Manteiga, J. and Molina, M.:** Complex regulation of nucleoside transporter expression in epithelial and immune system cells. *Mol Membr Biol* 18 (2001) 81-5.
- Pastor-Anglada, M., Molina-Arcas, M., Casado, F.J., Bellosillo, B., Colomer, D. and Gil, J.:** Nucleoside transporters in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 18 (2004) 385-93.
- Pastor-Anglada, M., Cano-Soldado, P., Molina-Arcas, M., Lostao, M.P., Larrayoz, I., Martinez-Picado, J. and Casado, F.J.:** Cell entry and export of nucleoside analogues. *Virus Research*, in press.
- Patel, D.H., Crawford, C.R., Naeve, C.W. and Belt, J.A.:** Cloning, genomic organization and chromosomal localization of the gene encoding the murine sodium-dependent, purine-selective, concentrative nucleoside transporter (CNT2). *Gene* 242 (2000) 51-8.
- Peralta, C., Hotter, G., Closa, D., Prats, N., Xaus, C., Gelpi, E. and Rosello-Catafau, J.:** The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors. *Hepatology* 29 (1999) 126-32.
- Plagemann, P.G. and Wohlhueter, R.M.:** Nitrobenzylthioinosine-sensitive and -resistant nucleoside transport in normal and transformed rat cells. *Biochim Biophys Acta* 816 (1985) 387-95.
- Plagemann, P.G., Wohlhueter, R.M. and Woffendin, C.:** Nucleoside and nucleobase transport in animal cells. *Biochim Biophys Acta* 947 (1988) 405-43.
- Pol, A., Calvo, M. and Enrich, C.:** Isolated endosomes from quiescent rat liver contain the signal transduction machinery. Differential distribution of activated Raf-1 and Mek in the endocytic compartment. *FEBS Lett* 441 (1998) 34-8.



**Pol, A., Calvo, M., Lu, A. and Enrich, C.:** The "early-sorting" endocytic compartment of rat hepatocytes is involved in the intracellular pathway of caveolin-1 (VIP-21). *Hepatology* 29 (1999) 1848-57.

## Q

**Quayle, J.M. and Standen, N.B.:** KATP channels in vascular smooth muscle. *Cardiovasc Res* 28 (1994) 797-804.

## R

**Ritzel, M.W., Yao, S.Y., Huang, M.Y., Elliott, J.F., Cass, C.E. and Young, J.D.:** Molecular cloning and functional expression of cDNAs encoding a human Na<sup>+</sup>-nucleoside cotransporter (hCNT1). *Am J Physiol* 272 (1997) C707-14.

**Ritzel, M.W., Ng, A.M., Yao, S.Y., Graham, K., Loewen, S.K., Smith, K.M., Hyde, R.J., Karpinski, E., Cass, C.E., Baldwin, S.A. and Young, J.D.:** Recent molecular advances in studies of the concentrative Na<sup>+</sup>-dependent nucleoside transporter (CNT) family: identification and characterization of novel human and mouse proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib). *Mol Membr Biol* 18 (2001a) 65-72.

**Ritzel, M.W., Ng, A.M., Yao, S.Y., Graham, K., Loewen, S.K., Smith, K.M., Ritzel, R.G., Mowles, D.A., Carpenter, P., Chen, X.Z., Karpinski, E., Hyde, R.J., Baldwin, S.A., Cass, C.E. and Young, J.D.:** Molecular identification and characterization of novel human and mouse concentrative Na<sup>+</sup>-nucleoside cotransporter proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib). *J Biol Chem* 276 (2001b) 2914-27.

**Roman, R.M. and Fitz, J.G.:** Emerging roles of purinergic signaling in gastrointestinal epithelial secretion and hepatobiliary function. *Gastroenterology* 116 (1999) 964-79.

**Rorsman, P. and Trube, G.:** Glucose dependent K<sup>+</sup>-channels in pancreatic beta-cells are regulated by intracellular ATP. *Pflugers Arch* 405 (1985) 305-9.

**Rudolph, F.B., Kulkarni, A.D., Schandle, V.B. and Van Buren, C.T.:** Involvement of dietary nucleotides in T lymphocyte function. *Adv Exp Med Biol* 165 Pt B (1984) 175-8.

**Ruiz-Montasell, B., Javier Casado, F., Felipe, A. and Pastor-Anglada, M.:** Uridine transport in basolateral plasma membrane vesicles from rat liver. *J Membr Biol* 128 (1992) 227-33.

**Ruiz-Montasell, B., Martinez-Mas, J.V., Enrich, C., Casado, F.J., Felipe, A. and Pastor-Anglada, M.:** Early induction of Na<sup>(+)</sup>-dependent uridine uptake in the regenerating rat liver. *FEBS Lett* 316 (1993) 85-8.

**Rutter, G.A., Da Silva Xavier, G. and Leclerc, I.:** Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis. *Biochem J* 375 (2003) 1-16.

## S

**Salati, L.M., Gross, C.J., Henderson, L.M. and Savaiano, D.A.:** Absorption and metabolism of adenine, adenosine-5'-monophosphate, adenosine and hypoxanthine by the isolated vascularly perfused rat small intestine. *J Nutr* 114 (1984) 753-60.

**Schell, M.J., Maurice, M., Stieger, B. and Hubbard, A.L.:** 5'nucleotidase is sorted to the apical domain of hepatocytes via an indirect route. *J Cell Biol* 119 (1992) 1173-82.

- Schlosser, S.F., Burgstahler, A.D. and Nathanson, M.H.:** Isolated rat hepatocytes can signal to other hepatocytes and bile duct cells by release of nucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 9948-53.
- Scholz, K.P. and Miller, R.J.:** Analysis of adenosine actions on Ca<sup>2+</sup> currents and synaptic transmission in cultured rat hippocampal pyramidal neurones. *J Physiol* 435 (1991) 373-93.
- Seglen, P.O.:** Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 13 (1976) 29-83.
- Seino, S. and Miki, T.:** Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Prog Biophys Mol Biol* 81 (2003) 133-76.
- Smith, K.M., Ng, A.M., Yao, S.Y., Labeledz, K.A., Knaus, E.E., Wiebe, L.I., Cass, C.E., Baldwin, S.A., Chen, X.Z., Karpinski, E. and Young, J.D.:** Electrophysiological Characterization of a Recombinant Human Na<sup>+</sup>-coupled Nucleoside Transporter (hCNT1) Produced in *Xenopus* Oocytes. *J Physiol* (2004).
- Soler, C., Felipe, A., Mata, J.F., Casado, F.J., Celada, A. and Pastor-Anglada, M.:** Regulation of nucleoside transport by lipopolysaccharide, phorbol esters, and tumor necrosis factor-alpha in human B-lymphocytes. *J Biol Chem* 273 (1998) 26939-45.
- Soler, C., Felipe, A., Casado, F.J., Celada, A. and Pastor-Anglada, M.:** Nitric oxide regulates nucleoside transport in activated B lymphocytes. *J Leukoc Biol* 67 (2000) 345-9.
- Soler, C., Garcia-Manteiga, J., Valdes, R., Xaus, J., Comalada, M., Casado, F.J., Pastor-Anglada, M., Celada, A. and Felipe, A.:** Macrophages require different nucleoside transport systems for proliferation and activation. *Faseb J* 15 (2001a) 1979-88.
- Soler, C., Valdes, R., Garcia-Manteiga, J., Xaus, J., Comalada, M., Casado, F.J., Modolell, M., Nicholson, B., MacLeod, C., Felipe, A., Celada, A. and Pastor-Anglada, M.:** Lipopolysaccharide-induced apoptosis of macrophages determines the up-regulation of concentrative nucleoside transporters Cnt1 and Cnt2 through tumor necrosis factor-alpha-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* 276 (2001b) 30043-9.
- Soler, C., Felipe, A., Garcia-Manteiga, J., Serra, M., Guillen-Gomez, E., Casado, F.J., MacLeod, C., Modolell, M., Pastor-Anglada, M. and Celada, A.:** Interferon-gamma regulates nucleoside transport systems in macrophages through signal transduction and activator of transduction factor 1 (STAT1)-dependent and -independent signalling pathways. *Biochem J* 375 (2003) 777-83.
- Sonoda, T. and Tatibana, M.:** Metabolic fate of pyrimidines and purines in dietary nucleic acids ingested by mice. *Biochim Biophys Acta* 521 (1978) 55-66.
- Sowers, J.R. and Lester, M.A.:** Diabetes and cardiovascular disease. *Diabetes Care* 22 Suppl 3 (1999) C14-20.
- Sowers, J.R.:** Hypertension, angiotensin II, and oxidative stress. *N Engl J Med* 346 (2002) 1999-2001.
- Standen, N.B., Quayle, J.M., Davies, N.W., Brayden, J.E., Huang, Y. and Nelson, M.T.:** Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in arterial smooth muscle. *Science* 245 (1989) 177-80.
- Sterin-Borda, L., Gomez, R.M. and Borda, E.:** Role of nitric oxide/cyclic GMP in myocardial adenosine A1 receptor-inotropic response. *Br J Pharmacol* 135 (2002) 444-50.
- Sturgess, N.C., Ashford, M.L., Cook, D.L. and Hales, C.N.:** The sulphonylurea receptor may be an ATP-sensitive potassium channel. *Lancet* 2 (1985) 474-5.
- Sundaram, M., Yao, S.Y., Ng, A.M., Griffiths, M., Cass, C.E., Baldwin, S.A. and Young, J.D.:** Chimeric constructs between human and rat equilibrative nucleoside transporters (hENT1 and rENT1) reveal hENT1 structural domains interacting with coronary vasoactive drugs. *J Biol Chem* 273 (1998) 21519-25.
- Sundaram, M., Yao, S.Y., Ingram, J.C., Berry, Z.A., Abidi, F., Cass, C.E., Baldwin, S.A. and Young, J.D.:** 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 (2001) 45270-5.

## T

- Tattersall, M.H., Slowiaczek, P. and De Fazio, A.:** Regional variation in human extracellular purine levels. *J Lab Clin Med* 102 (1983) 411-20.
- Taylor, B.S., Alarcon, L.H. and Billiar, T.R.:** Inducible nitric oxide synthase in the liver: regulation and function. *Biochemistry (Mosc)* 63 (1998) 766-81.
- Tran, D., Carpentier, J.L., Sawano, F., Gorden, P. and Orci, L.:** Ligands internalized through coated or noncoated invaginations follow a common intracellular pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1987) 7957-61.
- Trauner, M. and Boyer, J.L.:** Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 83 (2003) 633-71.
- Trube, G., Rorsman, P. and Ohno-Shosaku, T.:** Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent K<sup>+</sup> channel in mouse pancreatic beta-cells. *Pflugers Arch* 407 (1986) 493-9.
- Trussell, L.O. and Jackson, M.B.:** Adenosine-activated potassium conductance in cultured striatal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 (1985) 4857-61.

## U

- Ungemach, F.R. and Hegner, D.:** Uptake of thymidine into isolated rat hepatocytes. Evidence for two transport systems. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 359 (1978) 845-56.

## V

- Valdes, R., Ortega, M.A., Casado, F.J., Felipe, A., Gil, A., Sanchez-Pozo, A. and Pastor-Anglada, M.:** Nutritional regulation of nucleoside transporter expression in rat small intestine. *Gastroenterology* 119 (2000) 1623-30.
- Valledor, A.F., Comalada, M., Xaus, J. and Celada, A.:** The differential time-course of extracellular-regulated kinase activity correlates with the macrophage response toward proliferation or activation. *J Biol Chem* 275 (2000) 7403-9.
- van Calker, D., Muller, M. and Hamprecht, B.:** Adenosine inhibits the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *Nature* 276 (1978) 839-41.
- Villanueva, G.R., Monte, M.J., Barbero, E.R., Serrano, M.A. and Marin, J.J.:** Evidence for dual effect of bile acids on thymidine anabolism and catabolism by the regenerating rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1289 (1996) 136-44.

## W

- Wang, J., Schaner, M.E., Thomassen, S., Su, S.F., Piquette-Miller, M. and Giacomini, K.M.:** Functional and molecular characteristics of Na<sup>(+)</sup>-dependent nucleoside transporters. *Pharm Res* 14 (1997a) 1524-32.
- Wang, J., Su, S.F., Dresser, M.J., Schaner, M.E., Washington, C.B. and Giacomini, K.M.:** Na<sup>(+)</sup>-dependent purine nucleoside transporter from human kidney: cloning and functional characterization. *Am J Physiol* 273 (1997b) F1058-65.
- Wang, J. and Giacomini, K.M.:** Characterization of a bioengineered chimeric Na<sup>+</sup>-nucleoside transporter. *Mol Pharmacol* 55 (1999a) 234-40.
- Wang, J. and Giacomini, K.M.:** Serine 318 is essential for the pyrimidine selectivity of the N2 Na<sup>+</sup>-nucleoside transporter. *J Biol Chem* 274 (1999b) 2298-302.
- Wang, Y. and Marsden, P.A.:** Nitric oxide synthases: gene structure and regulation. *Adv Pharmacol* 34 (1995) 71-90.

- Ward, J.L. and Tse, C.M.:** Nucleoside transport in human colonic epithelial cell lines: evidence for two Na<sup>+</sup>-independent transport systems in T84 and Caco-2 cells. *Biochim Biophys Acta* 1419 (1999) 15-22.
- Ward, J.L., Sherali, A., Mo, Z.P. and Tse, C.M.:** Kinetic and pharmacological properties of cloned human equilibrative nucleoside transporters, ENT1 and ENT2, stably expressed in nucleoside transporter-deficient PK15 cells. Ent2 exhibits a low affinity for guanosine and cytidine but a high affinity for inosine. *J Biol Chem* 275 (2000) 8375-81.
- Wiebel, F.J., Park, S.S., Kiefer, F. and Gelboin, H.V.:** Expression of cytochromes P-450 in rat hepatoma cells. Analysis by monoclonal antibodies specific for cytochromes P-450 from rat liver induced by 3-methylcholanthrene or phenobarbital. *Eur J Biochem* 145 (1984) 455-62.
- Wilde, A.A.:** Role of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel current in ischemic arrhythmias. *Cardiovasc Drugs Ther* 7 Suppl 3 (1993) 521-6.
- Wondergem, R., Cregan, M., Strickler, L., Miller, R. and Suttles, J.:** Membrane potassium channels and human bladder tumor cells: II. Growth properties. *J Membr Biol* 161 (1998) 257-62.
- Woodfork, K.A., Wonderlin, W.F., Peterson, V.A. and Strobl, J.S.:** Inhibition of ATP-sensitive potassium channels causes reversible cell-cycle arrest of human breast cancer cells in tissue culture. *J Cell Physiol* 162 (1995) 163-71.
- Wu, J.S. and Young, J.D.:** Photoaffinity labelling of nucleoside-transport proteins in plasma membranes isolated from rat and guinea-pig liver. *Biochem J* 220 (1984) 499-506.
- Wu, X., Yuan, G., Brett, C.M., Hui, A.C. and Giacomini, K.M.:** Sodium-dependent nucleoside transport in choroid plexus from rabbit. Evidence for a single transporter for purine and pyrimidine nucleosides. *J Biol Chem* 267 (1992) 8813-8.

## X

- Xaus, J., Cardo, M., Valledor, A.F., Soler, C., Lloberas, J. and Celada, A.:** Interferon gamma induces the expression of p21waf-1 and arrests macrophage cell cycle, preventing induction of apoptosis. *Immunity* 11 (1999) 103-13.

## Y

- Yao, S.Y., Ng, A.M., Muzyka, W.R., Griffiths, M., Cass, C.E., Baldwin, S.A. and Young, J.D.:** Molecular cloning and functional characterization of nitrobenzylthioinosine (NBMPr)-sensitive (es) and NBMPr-insensitive (ei) equilibrative nucleoside transporter proteins (rENT1 and rENT2) from rat tissues. *J Biol Chem* 272 (1997) 28423-30.
- Young, J.D., Jarvis, S.M., Clanachan, A.S., Henderson, J.F. and Paterson, A.R.:** Nitrobenzylthioinosine: an in vivo inhibitor of pig erythrocyte energy metabolism. *Am J Physiol* 251 (1986) C90-4.

## Z

- Zhou, Q.Y., Li, C., Olah, M.E., Johnson, R.A., Stiles, G.L. and Civelli, O.:** Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A3 adenosine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992) 7432-6.
- Zorzano, A., Sevilla, L., Camps, M., Becker, C., Meyer, J., Kammermeier, H., Munoz, P., Guma, A., Testar, X., Palacin, M., Blasi, J. and Fischer, Y.:** Regulation of glucose transport, and glucose transporters expression and trafficking in the heart: studies in cardiac myocytes. *Am J Cardiol* 80 (1997) 65A-76A.

***APARTADOS***





## Concentrative Nucleoside Transporter (rCNT1) Is Targeted to the Apical Membrane through the Hepatic Transcytotic Pathway

Sylvie Duflot,\* Maria Calvo,† F. Javier Casado,\* Carlos Enrich,† and Marçal Pastor-Anglada\*<sup>1</sup>

\*Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, and †Departament de Biologia Celular, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain

**The Na<sup>+</sup>-dependent nucleoside transporter CNT1 has been identified in a caveolin-enriched plasma membrane fraction (CEF), in transcytotic endosomes, and in canalicular membranes isolated from quiescent rat liver in which the transporter appears to be biologically active. CNT1 was also detected, albeit in small amounts, in the early/sorting endosomes. Plasma membrane preparations enriched in basolateral markers showed Na<sup>+</sup>-dependent nucleoside transport activity that is mostly, if not exclusively, accounted for by CNT2, a transporter protein which was not detected in CEF nor in the endosomal fractions. These data are consistent with different localization and trafficking pathways of the two isoforms in hepatocytes. CNT1 is the first transporter which is reported to follow the transcytotic pathway to be inserted on the apical side of liver parenchymal cells.** © 2002 Elsevier Science (USA)

**Key Words:** concentrative nucleoside transporter (CNT); hepatocyte; endosome; endocytosis; transcytosis; caveolin.

### INTRODUCTION

Natural nucleosides and nucleoside-derived drugs used in anticancer and antiviral therapies are transported into cells by a variety of plasma membrane carriers belonging to two gene families, CNT and ENT [1–4]. CNT1- and CNT2-related proteins are responsible for the concentrative Na<sup>+</sup>-dependent high-affinity transport of pyrimidine and purine nucleosides, respectively [1–4]. These carrier proteins may be coexpressed in a single cell type and may undergo differential regulation, as reported in rat hepatocytes [5, 6]. A third member of this family showing broad substrate specificity, CNT3, has been recently cloned from human and mouse tissues [7].

<sup>1</sup> To whom correspondence and reprint requests should be addressed at Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, E-08028 Barcelona, Spain. Fax: 34-93-4021559. E-mail: mpastor@porthos.bio.ub.es.

The hepatocyte is a highly polarized epithelial cell with a plasma membrane divided into three major functional domains: sinusoidal, facing the blood and the hepatic endothelial cells; the lateral domain, containing the junction complexes (e.g., desmosomes and gap junctions), and the canalicular plasma membrane, involved in bile secretion [8]. The origin and maintenance of hepatocyte functional polarity depends essentially on the membrane trafficking events, exocytosis, endocytosis, transcytosis, and recycling, which in part are governed by two main distribution centers involved in the sorting of molecules: the TGN and the early/sorting endosome (CURL). The targeting of membrane proteins to the hepatic canalicular plasma membrane was classically believed to be undertaken by the indirect route (transcytosis), via basolateral delivery and the subsequent transport through the endocytic structures [9, 10]. However, a direct route from the TGN to the canalicular membranes was considered an alternative pathway, and this has recently been demonstrated for canalicular ABC transporters [11].

Nucleoside transporter activity in plasma membrane vesicles partially purified from the sinusoidal domain did not show any particular enrichment of the CNT1 protein, although it appears to bear significant amounts of the CNT2 isoform [5]. The possibility that nucleoside transporters are also located at the canalicular plasma membrane was suggested by others on the basis of a special need for salvage of the nucleosides generated by canalicular ecto-ATPases [12] and has been demonstrated for CNT1 in rat liver [13].

Recently, it has been demonstrated that, in the sorting of membrane proteins at the TGN, hepatocytes differ from other epithelial cells (e.g., MDCK cells) since they do not express an epithelial cell specific subunit ( $\mu$ 1B) of the AP1 clathrin adaptor complex [14, 15]. The lack of  $\mu$ 1B correlates with the indirect pathway, which is the major sorting pathway in hepatocytes.

Here we examine the targeting of CNT1, first, by monitoring nucleoside transport properties and CNT expression in isolated basolateral and canalicular membranes; second, by determining CNT protein





amounts and distribution, using polyclonal monospecific antibodies, in highly purified endosomes and caveolae-enriched plasma membrane fraction from rat liver; and, third, by immunogold electron microscopy.

## MATERIALS AND METHODS

*Isolation of endosomes, plasma membrane, and caveolae-enriched fractions from rat liver.* Basolateral plasma membranes initially used to identify CNT1 and CNT2 proteins and their related transport activities were purified from adult rat livers by a Percoll-density method as described [16]. Canalicular plasma membrane fractions were isolated separately [17]. The two types of membrane fraction were then washed twice in a Hepes buffer containing isotonic sucrose, frozen in liquid nitrogen, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Plasma membrane enrichments versus homogenates were calculated from 5'-nucleotidase enzyme activity measurements, as previously described [16].

The isolation of the endosomal fractions involved previous treatment of the rats for 3 days with  $17\text{-}\alpha\text{-ethinyl}$  estradiol, which induces the expression of the low-density lipoprotein (LDL) receptors. Then, rats were anesthetized with isoflurane, and human LDL (5 mg of protein) was injected into the femoral vein. Twenty minutes later livers were removed and homogenized in 0.25 M sucrose in the presence of protease inhibitors. Three distinct endosomal fractions were obtained after centrifugation of a crude endosome fraction in a sucrose gradient: MVB at 8.24%/19.3%, CURL at 19.3%/28.81%, and RRC at 28.81%/36.37% (w/v) interfaces [18, 19]. In this procedure, a fourth band at the interface of 36.37%/46%, just on the cushion of heavy sucrose, was also collected and characterized. Due to its considerable enrichment in caveolin-1 and its morphology, this fraction was called CEF (from caveolin-enriched plasma membrane fraction). This fraction derives from the sinusoidal plasma membrane of the hepatocyte and has been characterized biochemically and morphologically [19, 20]. Each fraction was collected and ice-cold water was added to render the fractions isotonic. These fractions were then pelleted, resuspended in 0.9% NaCl, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

*Nucleoside transport activity in basolateral and canalicular plasma membrane vesicles.* Nucleoside uptake was measured as previously described, using a rapid filtration technique [21]. One micromolar uridine, guanosine, or cytidine transport rates were assessed at very short incubation times (3 s), under, initial velocity conditions, by mixing 20  $\mu\text{l}$  of membrane vesicles (10–20  $\mu\text{g}$  protein/ $\mu\text{l}$ ) with 20  $\mu\text{l}$  of the incubation mixture in Eppendorf tubes to give the following concentrations: 0.25 M sucrose, 0.2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM Hepes/KOH, pH 7.4, 100 mM either Na or K-sulfocyanate (SCN), and the tritiated substrate (routinely 1  $\mu\text{Ci}$  per incubation). The whole content of the tube was then passed through a nitrocellulose filter (Millipore, pore size 0.45  $\mu\text{m}$ ) and washed several times with a cold stop solution. Filters were counted for radioactivity.

*Western blot analysis of the membrane fractions.* Monospecific polyclonal antibodies against the rat CNT1 and CNT2 isoforms have been characterized in our laboratory [5, 22]. The following antibodies were commercially available: anticaveolin 1 (Transduction Laboratories) and Rab 5 (Santa Cruz). The antibody against ASGP-R was raised in our laboratory [23]. Antibodies against the bile acid transporters Ntcp and Bsep had been previously characterized [24] and were a kind gift from Bruno Stieger (University Hospital, Zurich, Switzerland). The antibodies against 5'-nucleotidase, pIgR, and celubrevin were kind gifts from Dr. Paul Luzio (Cambridge, UK), Dr. K. E. Mostov (San Francisco, CA), and Joan Blasi (Barcelona, Spain), respectively, and have been previously used in our laboratory [25]. Five to 10  $\mu\text{g}$  of protein was routinely run on a 10% polyacrylamide-SDS gel. Proteins were transferred onto filters (Immobilon-P, Millipore, 0.45- $\mu\text{m}$  pore size), which were then blocked overnight in a 5%

dry-milk-supplemented, 0.2% Tween 20, phosphate-buffered saline solution prior to immunoreaction. Filters were then incubated for 1 h with the diluted antisera. Dilutions used were as follows: 1/2000 for CNT1, 1/1000 for CNT2, 1/5000 for Ntcp, 1/2000 for Bsep, 1/2000 for caveolin, 1/400 for ASGRP and pIgR, 1/100 for Rab5, 1/200 for celubrevin, and 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for 5'-nucleotidase. A goat anti-rabbit IgG coupled to horseradish peroxidase was used as a second antibody and diluted 1/2000 in dry-milk-supplemented 0.2% Tween 20 PBS. ECL (Amersham) was used to visualize the proteins.

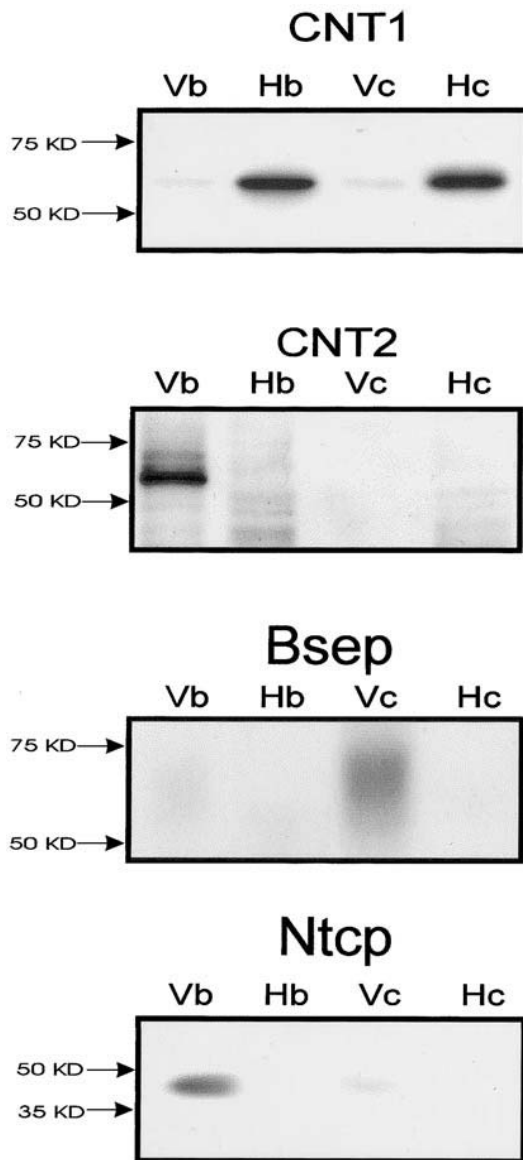
*Immunogold electron microscopy.* Livers of Wistar rats were perfused *in situ* with PBS to wash off blood and then fixed with PBS containing 4% paraformaldehyde, pH 7.4. Liver pieces were placed in cold fixative and further dissected. The tissue was first washed in PBS containing 0.02 M glycine at  $4^{\circ}\text{C}$  for 2 h and then cryoprotected, also in the cold, with subsequent incubations in PBS with increasing concentrations of sucrose (0.6 M for 2 h, 1.3 M for 4 h, and, finally, 2.3 M overnight). Ultrathin sections were cut using a Leica Ultracut UCT, collected onto Formvar-coated gold, and stored on 2% gelatin/PBS at  $4^{\circ}\text{C}$ . For CNT1 and CNT2 localization, grids were sequentially incubated at room temperature for 10 min in PBS, containing 2% gelatine, pH 7.4, for 3 min in PBS containing 0.02 M glycine, and finally for 10 min in the same solution supplemented with 0.1% FCS. Primary antibodies were used at a dilution of 1/100 and 1/50 for rCNT1 and rCNT2, respectively, in 0.02 M glycine, 0.1% FCS PBS. Grids were incubated for 1 h and then washed in the same buffer before a second incubation was begun, using Protein A conjugated to colloidal gold particles, diluted in the same solution, and kept for 45 min at room temperature. After several washes, sections were stained with 2% methylcellulose, 0.2% uranylacetate, and examined using a transmission electron microscope JEOL 1010. As control for single immunostaining, sections were incubated with Protein A-gold only. The labeling was specific, as no signal was obtained in control.

*Immunofluorescence.* Livers were perfused and small pieces were cryoprotected with subsequent incubations in PBS with increasing concentrations of sucrose (10% for 2 h, 20% for 4 h, and, finally, 30% overnight, cryostat sections (6–8  $\mu\text{m}$ ) were obtained, air-dried, and hydrated in PBS before immunostaining. The antiserum against rCNT1 was used at a dilution of 1/200, whereas the antibody against caveolin 1 (IgM) was used at 1/10. Texas-red-labeled anti-mouse and Oregon-green-anti-rabbit antibodies were used as secondary antibodies at 1/50. Prebleed serum for rCNT1 and secondary antibodies alone were used as negative controls.

## RESULTS

### *CNT1 and CNT2 Proteins in Canalicular and Basolateral Plasma Membrane Fractions*

Plasma membrane fractions enriched in canalicular and basolateral domains of the hepatocyte were purified and the amount of CNT1 and CNT2 proteins was monitored by Western blot analysis. Nucleoside transport activities associated with these two membrane fractions were also examined. The purity of these preparations was initially determined by measuring their relative enrichments in 5'-nucleotidase enzyme activity, as well as in well-characterized markers of canalicular and basolateral domains: the bile acid transporters Bsep and Ntcp, respectively, as detected by Western blot analysis. 5'-Nucleotidase activity mean enrichments were 14- and 28-fold for canalicular and basolateral membranes, respectively. Figure 1 shows representative Western blot analyses of crude homog-



**FIG. 1.** rCNT1 and rCNT2 in basolateral and canalicular membranes from rat liver. Representative Western blots of rat liver homogenates (Hb and Hc), basolateral membrane (Vb), and canalicular membrane (Vc) preparations, using antibodies against either rCNT1 or rCNT2, are shown. Hb and Hc refer to crude tissue homogenates obtained for basolateral and canalicular plasma membrane preparations, respectively. Antibodies against Bsep and Ntcp were used as canalicular and basolateral markers, respectively.

enates and basolateral and canalicular membrane fractions, using antibodies against CNT1, CNT2, Bsep, and Ntcp. Ntcp and Bsep were not detected in crude homogenates but were abundant in basolateral and canalicular fractions, respectively. This means that the two fractions were enriched not only in plasma membrane, as deduced from the 5'-nucleotidase data, but also in their respective functional domains. No Bsep was detected in basolateral membranes, nor was Ntcp

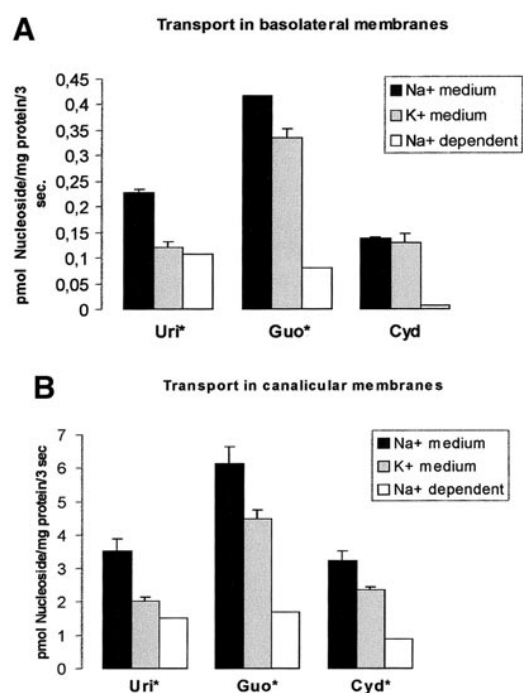
found in significant amounts in canalicular membranes, thus suggesting that cross contamination was very low or even negligible. CNT2 was barely detected in crude homogenates and canalicular membranes, but it was abundant in basolateral fractions. Due to its negligible presence in homogenates a reliable enrichment factor could not be calculated, although this has no bearing on the observation that CNT2 is highly expressed in basolateral plasma membranes of hepatocytes. CNT1 was detected in crude homogenates and present, although to a lesser extent, in plasma membrane fractions from the two origins, basolateral and canalicular. The average amount of CNT1 in vesicles was routinely less than one-third of that found in crude homogenates. This observation suggested, as will be demonstrated below, that a significant amount of CNT1 is located intracellularly in rat hepatocytes.

In accordance with this pattern,  $\text{Na}^+$ -dependent uptake of uridine into basolateral vesicles appeared to be mediated mostly, if not exclusively, by CNT2. Uptake of guanosine (a CNT2 preferring substrate) was  $\text{Na}^+$ -dependent (Fig. 2A), whereas neither transport of cytidine (a CNT1-preferring substrate) (Fig. 2A) nor inhibition of uridine uptake by cytidine (not shown) was detected. Plasma membrane vesicles showed relatively high  $\text{Na}^+$ -independent nucleoside uptake rates. This is a common feature of this *in vitro* model, even when using other substrates, such as amino acids [16]. In any case, as previously reported [21], this  $\text{Na}^+$ -independent nucleoside transport activity is mostly NBTI-insensitive.

Canalicular membranes retained  $\text{Na}^+$ -dependent nucleoside transport activity which was consistent with the expression of, at least, a CNT1-type transporter, as deduced from the fact that, in contrast to the basolateral fractions, concentrative uptake of cytidine was detected at similar levels to that found for uridine (Fig. 2B). However, these vesicles also showed significant  $\text{Na}^+$ -dependent guanosine uptake (Fig. 2B). Interestingly, this transport activity could not be fully inhibited by high concentrations of cytidine (less than 30% inhibition at 100  $\mu\text{M}$  cytidine) (not shown). This purine-preferring transport activity is unlikely to be associated with CNT2, since low amounts of CNT2 protein were found in canalicular vesicles and uptake would not be inhibited by a pyrimidine nucleoside. Thus, it may be the result of the expression of the recently cloned new isoform CNT3, which appears to be expressed in the liver, although it has not yet been found in parenchymal cells.

#### *Detection of the CNT1 Transporter in Intracellular Membrane Fractions*

In the hepatocyte, the apical targeting of membrane proteins is still unclear and two different pathways are

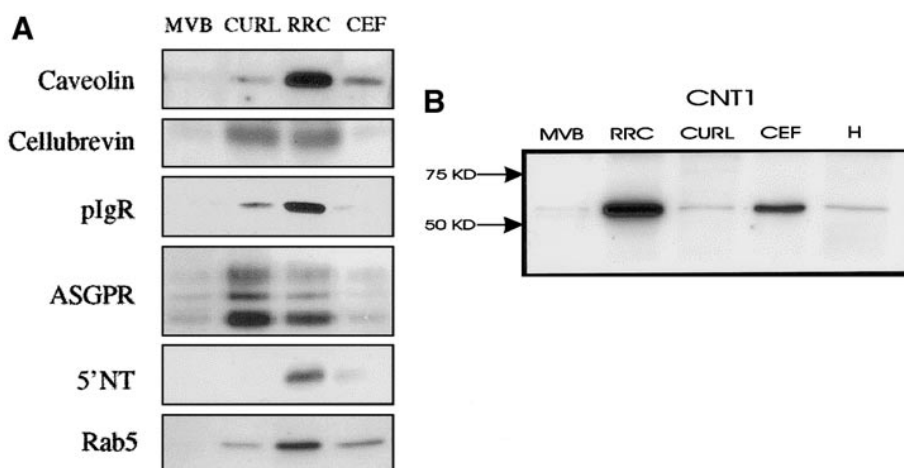


**FIG. 2.** Nucleoside transport activities in basolateral and canalicular plasma membranes from rat liver. Basolateral (A) and canalicular (B) membrane vesicles isolated from rat liver were tested for Na<sup>+</sup>-dependent nucleoside transport activity, using tritiated uridine, guanosine, and cytidine as substrates (all at 1  $\mu$ M). Uptake was measured, as indicated under Materials and, Methods, either in a NaSCN or in a KSCN medium. Na<sup>+</sup>-dependent nucleoside transport was then calculated by subtracting the uptake rates in choline buffer from those measured in sodium medium. Guanosine is a CNT2-specific substrate, whereas cytidine is a CNT1-specific substrate. Results are the mean  $\pm$  SD of five measurements made on pooled vesicles from four rats.

operational: the direct pathway from the TGN to the canalicular plasma membrane, only demonstrated for the ABC transporters, and the indirect pathway, which involves the endocytic/transcytotic compartment. To find out whether the indirect route is involved for the CNT1 transporter, we isolated endocytic fractions from rat liver homogenate. Three endosomal fractions—MVB (multivesicular bodies), CURL (compartment of uncoupling receptors and ligands—early/sorting endosomes), and RRC (receptor-recycling compartment)—and a caveolae-enriched plasma membrane fraction, recently characterized and derived from the sinusoidal plasma membrane domain of hepatocytes, were isolated. These fractions have been comprehensively studied by biochemical and morphological means [23, 25]. Figure 3A shows representative Western blots of markers used to define these fractions. Cellubrevin and Rab5, as early endocytic markers, polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) and 5'-nucleotidase as transcytotic proteins, and the ASGP-R as a recycling receptor were also present in the MVB and CURL. Caveolin is a marker protein for CEF [25].

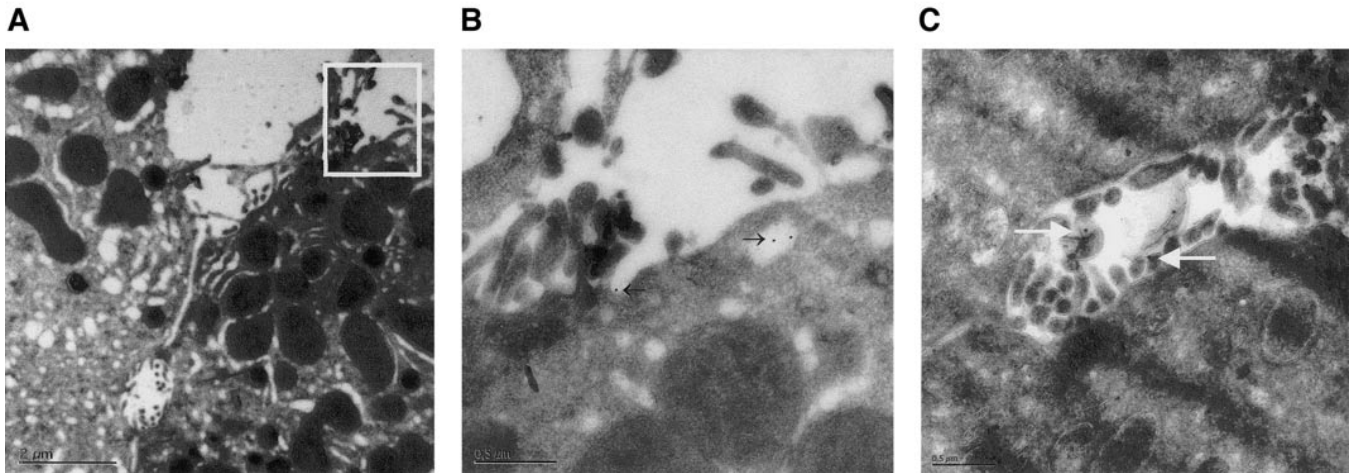
Caveolin was considered a marker of structures enriched in CEF. Electron microscopy and biochemical studies showed that these structures derived from the sinusoidal plasma membrane. In fact, CEF was the only fraction containing the scavenger receptor SR-BI [19], the physiological HDL receptor that mediates the selective uptake of cholesterol esters; SR-BI is enriched in hepatocytes (as well as in adrenal, testis, and ovary) and localized in caveolae [26, 27].

Caveolin was detected, by Western blotting, in the early/sorting endosomes (CURL), RRC, and CEF but



**FIG. 3.** rCNT1 distribution in endosomal fractions and a caveolin-enriched plasma membrane fraction from rat liver. A: Three endosomal fractions, MVB, late endosomes, CURL, early endosomes, RRC, receptor-recycling compartment, and the caveolin-enriched plasma membrane fraction (CEF) were analyzed biochemically using a set of markers. A representative identification of selected proteins by Western blot analysis is shown. Cellubrevin and Rab5 are endosomal markers. pIgR and ASGPR are hepatic receptors present in endosomes; 5'-nucleotidase (5'NT), a GPI-anchored protein, is enriched in RRC. B: rCNT1 and rCNT2 were analyzed in all these fractions. A representative Western blot analysis shows the distribution of the rCNT1 isoform. rCNT2 was not detected in these subcellular fractions.

## CNT1



**FIG. 4.** Immunolocalization of rCNT1 in CEF, endosomal vesicles, and canalicular membranes. Immunoelectron micrographs of ultrathin sections of rat liver labeled with the monospecific polyclonal rabbit rCNT1 antibody, using cryoimmunoelectron microscopy, are shown. The basal domain of the membrane indicated in A is further amplified in B, showing the occurrence of rCNT1 in structures at the plasma membrane as well as in early endosomal vesicles (indicated by arrows). C shows the apical location of rCNT1, according to its functional activity in canalicular rat liver membrane preparations. No rCNT2 was found in the apical side of hepatocytes.

not in the late endocytic fraction (MVB). Although caveolin was more enriched in RRC than in CEF over the postnuclear supernatant ( $10.5 \pm 3$  and  $4.6 \pm 2$ , respectively), CEF (with 61%) was the fraction containing the highest amount of caveolin, followed by RRC (35%) and CURL (4%), when the total amount of protein recovered in each fraction was considered [25]. An identical fraction was isolated and described by Schnitzer *et al.* [28]. These endosomal fractions have been isolated and characterized in detail elsewhere [29–32].

The presence of CNT1 and CNT2 proteins was studied in these endosomal fractions and in CEF by Western blotting. As shown in Fig. 3B, the pyrimidine-preferring nucleoside transporter CNT1 was found in the three endosomal fractions and CEF, although in different amounts. CNT2 was not detected in these membrane preparations with the available antibody. Mean enrichment values for CNT1 in these subcellular fractions versus crude homogenate were as follows: RRC, 6.3; CEF, 3.0; CURL, 0.8; MVB, 0.4. These data are consistent with the hypothesis that a significant amount of CNT1 protein is located intracellularly.

The different subcellular localization of CNT1 and CNT2 was further analyzed by immunoelectron microscopy (Figs. 4 and 5). Figure 4A shows the basal domain of a hepatocyte (amplified in Fig. 4B), in which CNT1 was detected both in vesicular structures (indicated with an arrow), consistent with its presence in early endosomes, and in invaginations of the membrane, in agreement with its detection in CEF. Figure 4C shows the presence of CNT1 in the microvilli on the

apical side of a hepatocyte (canalicular plasma membrane). Figure 5 shows the basolateral membrane location of the CNT2 protein at the microvilli.

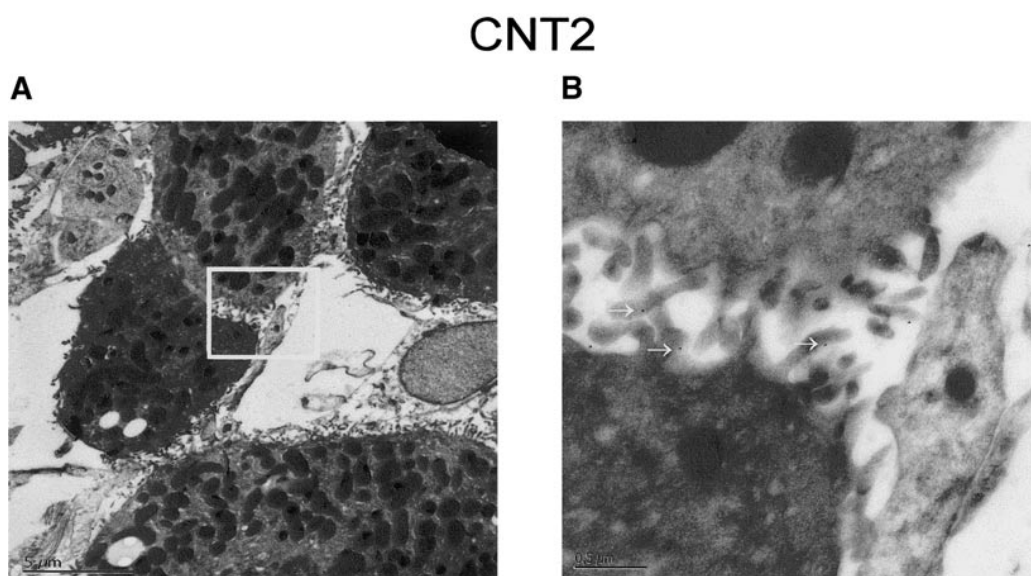
The number of gold particles associated with membranes was counted on 50 fields from 10 sections. Data derived from these analysis are shown in Table 1. As previously pointed out, most of the CNT1 appears to be located intracellularly, but a significant amount is on the apical side. Most of the CNT2 is present on the basolateral side.

Overall, these data are consistent with the results of subcellular fractionation as well as with the biological activity detected at the two poles of the hepatocyte.

Finally, to further analyze the putative proximity of CNT1 to caveolae, double immunohistochemistry was performed on paraformaldehyde-fixed frozen sections of rat liver. As shown in Fig. 6 caveolin and CNT1 stains did not merge, which was as predicted because there is no functional basis to expect colocalization of these two proteins (also, CNT1 does not contain the motif for binding to the scaffolding domain of caveolin). Nevertheless, CNT1 was located close to caveolin and, therefore, we cannot rule out that CNT1 might be in raft microdomains in the close proximity of GPI-anchored proteins (destined to the apical membrane).

### DISCUSSION

Here we examine the evidence that hepatocytes express at least two isoforms of concentrative nucleoside transporters, CNT1 and CNT2 [5, 33], whereas basolateral plasma membranes are not equally enriched in



**FIG. 5.** Immunolocalization of rCNT2 in basal membranes. Immunoelectron micrographs of ultrathin cryosections of rat liver labeled with the monospecific polyclonal rabbit rCNT2 antibody. A shows the area further enlarged in B, corresponding to basal microvilli in which rCNT2 was identified (arrows).

these two transporters [5, 21], which suggests different subcellular locations for these proteins. Moreover, the possibility that CNT1 is targeted to the apical side of the hepatocyte, recently supported by evidence showing CNT1 staining in rat liver canaliculi [13], prompted

**TABLE 1**

rCNT1 and rCNT2 Distribution in Hepatocyte Membranes

	Plasma membrane	Au, % of total	Intracellular vesicles	Intracellular membranes	Other
CNT1					
Basolateral		6.25	37	18.8	3
Apical		35			
CNT2					
Basolateral		84	2	4	10
Apical		N.D.			

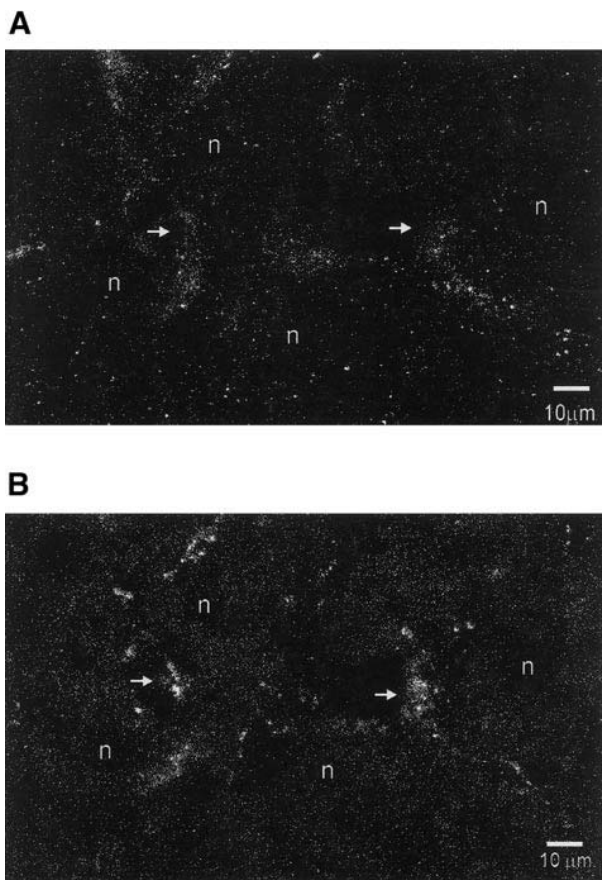
*Note.* rCNT1 and rCNT2 were detected in rat liver cryosections immunolabeled with anti-CNT1 and anti-CNT2 antibodies and Protein A gold (10 nm). Sections were examined, digitized, and photographed using a JEOL JEM 1010 electron microscope. A total of 310 (210, CNT1; 100, CNT2) gold particles associated with membranes were counted, corresponding to 50 fields from 10 sections. Au (% of total) refers to the percentage of the total gold particle amount found in a particular subcellular domain. Gold particles associated with the plasma membrane (sinusoidal, basolateral or canalicular, apical) was distinguished from labeling in intracellular vesicles or intracellular membranes or associated with nonparenchymal cells or in the extracellular matrix components (other). In a more detail examination it was evident that CNT2 almost exclusively labels microvilli structures of the sinusoidal domain of hepatocytes (84%); however, CNT1 labels the apical membrane (35%) as well as a variety of intracellular vesicles (37%).

us to study the trafficking pathways involved in the insertion of CNT1 at the canalicular membrane.

The study of the intracellular pathways involved in the trafficking of the CNT proteins in hepatocytes is important for the understanding of liver physiology, since the two isoforms appear to be up-regulated in the early phases of liver growth after partial hepatectomy [5, 34]. CNT2, at least, may be considered a cell cycle regulated gene [6]. The two transporter proteins are developmentally regulated and CNT2 expression is increased in primary cultures from fetal rat hepatocytes induced to differentiate in culture [35].

Interestingly, CNT2 expression is impaired in chemically induced hepatocarcinomas, whereas CNT1 is not detected in lesions from Alb-SV40 transgenic rat livers [22]. Moreover, both CNT1 and CNT2 are also coexpressed in other epithelia, such as enterocytes and renal proximal tubule cells. They are inserted at the apical side but neither cell type has been examined in an attempt to understand the trafficking pathways for these transporters in absorptive epithelia. This contribution is the first attempt to elucidate trafficking pathways of CNT transporters in polarized cell types.

Our results indicate that CNT2 is mostly basolateral whereas CNT1 is essentially canalicular, although most of the latter appears to be located intracellularly, at least under steady-state conditions. The insertion of CNT transporters in these two domains of the plasma membrane of the hepatocyte is consistent with the biological activity of nucleoside transport found in these two fractions. In agreement with this subcellular

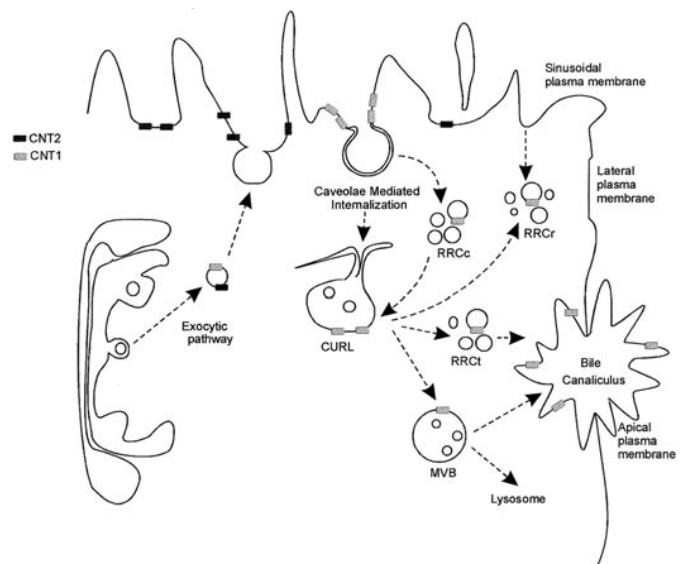


**FIG. 6.** Immunohistochemistry of rCNT1 and caveolin in hepatocytes. Immunofluorescence was used for the histochemical analysis of CNT1 (A) and caveolin (B) in paraformaldehyde-fixed sections of rat liver. Sections were incubated with respective primary antibodies, followed by anti-rabbit Oregon-green labeling and Texas-red-secondary antibodies for CNT1 and caveolin, respectively. A and B show the same section stained with the two antibodies. A similar pattern of CNT1 and caveolin distribution is found at the basolateral membrane level (white arrows). n, nucleus.

location, CNT1 has been identified in transcytotic endocytic fractions and in the early/sorting endosomes. RRC contains vesicles of different sizes and tubular membranes and has recycling receptors and transcytotic and caveolar markers [36]. These endosomal fractions from rat liver have been characterized morphologically and biochemically [17, 18, 36–39], as also shown in this study with a variety of markers. The transport kinetics through these isolated fractions of several endocytosed ligands such as LDL, asialofetuin, pIgA, transferrin, or EGF has also been studied in detail [20, 40]. More recently, a new plasma membrane fraction derived from the sinusoidal plasma membrane but enriched in caveolin (CEF) has been characterized [18, 25]. CEF contained most of the caveolae markers described [25] and, as shown here, it is highly enriched in CNT1 transporters.

This enrichment is consistent with the proposed role of RRC in transporting specific transcytotic proteins, such as GPI-anchored proteins, to the apical surface. In addition, it seems clear that CNT1 takes the indirect route to the apical domain (no TGN–Golgi markers were detected in CEF) [25].

The putative trafficking of CNT1 in hepatocytes is summarized in Fig. 7. CNT1 and CNT2 transporters may be initially inserted into the sinusoidal plasma membrane, but at different microdomains, since CNT2 was not identified in the CEF fraction. This event may determine their functional status. CNT1 may be located in the close proximity of the caveolae and then be internalized into the early endosomes and eventually translocated into the transcytotic structures, prior to its insertion into the apical plasma membrane domain. CNT2 was present in negligible amounts in these fractions, although its activity appeared to be present in canalicular membranes from rat liver [12], in accordance with the concentrative guanosine transport activity found in this study. This apparent discrepancy would be explained if this carrier is present at the canalicular plasma membrane but below the detection level of the antibody or if another concentrative nucleoside transporter, for instance the recently cloned CNT3 isoform [7], is expressed. Although this study does not rule out the possibility of direct targeting of CNT1 into the apical membrane of the hepatocyte, it



**FIG. 7.** Model of rCNT1 pathways in the hepatocyte. This model is consistent with the distribution pattern of rCNT1 in endosomes and plasma membrane domains and suggests that rCNT1 is basically located close to caveolae, in contrast to rCNT2, which appears to be located in other microdomains of the sinusoidal membrane, in which it is fully active. rCNT1 is inserted on the canalicular side of the hepatocyte following the indirect transcytotic pathway.

shows that CNT1 follows, at least, the indirect route for insertion.

These results open a new possibility for the regulation of nucleoside transport activity in liver parenchymal cells, which may rely upon internalization, transcytosis, and insertion of transporter proteins at different domains of the plasma membrane. Interestingly, the same vesicular structures that transport CNT1 also contain molecules involved in the MAPK signal transduction pathway [36]. Indeed, portal injection of EGF leads to rapid translocation of Raf-1 from CEF into different endocytic compartments (RRC and CURL), thus resulting in Mek phosphorylation and, eventually, MAPK activation. The possibility that growth factors modulate nucleoside transport in hepatocytes is now being studied.

In conclusion, CNT1 and CNT2 subcellular localization and trafficking in hepatocytes appear to be differentially regulated. CNT1 follows the transcytotic pathway to the canalicular membrane. This is the first evidence of transcytosis for a plasma membrane transporter in liver parenchymal cells.

This work was supported by Grants SAF99-0115, SAF2002-717, and 2FD97-1268 to MPA and PM99-0166 to CE. We thank the Dr. Marta Taulés for her technical assistance in immunoelectron microscopy, Dr. Marta Camps for her helpful discussions, and Robin Rycroft for his editorial help.

## REFERENCES

- Griffith, D. A., and Jarvis, S. M. (1996). Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1286**, 153–181.
- Wang, J., Schaner, M. E., Thomassen, S., Su, S. F., Piquette-Miller, M., and Giacomini, K. M. (1997). Functional and molecular characteristics of Na<sup>+</sup>-dependent nucleoside transporters. *Pharm. Res.* **14**, 1524–1532.
- Pastor-Anglada, M., Felipe, A., and Casado, F. J. (1998). Transport and mode of action of nucleoside derivatives used in chemical and antiviral therapies. *Trends Pharmacol. Sci.* **19**, 424–430.
- Baldwin, S. A., Mackay, J. R., Cass, C. E. and Young, J. D. (1999). Nucleoside transporters: Molecular biology and implications for therapeutic development *Mol. Med. Today* **5**, 216–224.
- Felipe, A., Valdés, R., del Santo, B., Lloberas, J., Casado, J. and Pastor-Anglada, M. (1998). Na<sup>+</sup>-dependent nucleoside transport in liver: Two different isoforms from the same gene family are expressed in liver cells. *Biochem. J.* **330**, 997–1001.
- del Santo, B., Valdés, R., Mata, J., Felipe, A., Casado, F. J. and Pastor-Anglada, M. (1998). Differential expression and regulation of nucleoside transport systems in rat liver parenchymal and hepatoma cells. *Hepatology* **28**, 1504–1511.
- Ritzel, M. W. L., Ng, A. M. L., Yao, S. Y. M., Graham, K., Loewen, S. K., Smith, K. M., Ritzel, R. G., Mowles, D. A., Carpenter, A., Chen, X. Z., Karpinski, E., Hyde, R. J., Baldwin, S. A., Cass, C. E., and Young, J. D. (2001). Recent molecular advances in studies of the concentrative Na<sup>+</sup>-dependent nucleoside transporter (CNT) family: Identification and characterization of novel human and mouse proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib). *J. Biol. Chem.* **276**, 2914–2927.
- Evans, W. H. (1980). A biochemical dissection of the functional polarity of the plasma membrane of the hepatocyte. *Biochim. Biophys. Acta* **604**, 27–64.
- Bartles, J. R., Feracci, H. M., Stieger, B., and Hubbard, A. L. (1987). Biogenesis of the rat hepatocyte plasma membrane in vivo: Comparison of the pathways taken by apical and basolateral proteins using subcellular fractionation. *J. Cell Biol.* **105**, 1241–1251.
- Schell, M. J., Maurice, M., Stieger, B., and Hubbard, A. L. (1992). 5' nucleotidase is sorted to the apical domain of hepatocytes via an indirect route. *J. Cell Biol.* **119**, 1173–1182.
- Kipp, H., and Arias, I. M. (2000). Newly synthesized canalicular ABC transporters are directly targeted from the Golgi to the hepatocyte apical domain in rat liver. *J. Biol. Chem.* **275**, 15917–15925.
- Che, M., Nishida, T., Gatmaitzan, Z., and Arias, I. M. (1995). Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the bile canalicular, purine-specific Na<sup>+</sup>-nucleoside cotransporter. *J. Biol. Chem.* **270**, 13596–13599.
- Hamilton, S. R., Yao, S. Y. M., Ingram, J. C., Hadden, D. A., Ritzel, M. W. L., Gallagher, M. P., Henderson, P. F., Cass, C. E., Young, J. D. and Baldwin, S. A. (2001). Subcellular distribution and membrane topology of the mammalian concentrative Na<sup>+</sup>-nucleoside cotransporter rCNT1. *J. Biol. Chem.* **276**, 27981–2798.
- Ohno, H., Tomemori, T., Nakatsu, F., Okasaki, Y., Aguilar, R. C., Foelsch, H., Mellman, I., Saito, T., Shirasawa, T., and Bonifacino, J. S. (1999). Mu 1B, a novel adaptor medium chain expressed in polarized epithelial cells. *FEBS Lett.* **449**, (2–3), 215–220.
- Koivisto, U.-M., Hubbard, A. L., and Mellman, I. (2001). A novel cellular phenotype for familial hypercholesterolemia due to a defect in polarized targeting of LDL receptor. *Cell* **105**, 575–585.
- Pastor-Anglada, M., Remesar, X., and Bourdel, G. (1987). Alanine uptake by liver at midpregnancy in rats. *Am. J. Physiol.* **252**, E408–E413.
- Neville, D. M., Jr. (1960). The isolation of a cell membrane fraction from a rat liver. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **8**, 413–422.
- Belcher, J. D., Hamilton, R. L., Brady, S. E., Jäckle, S., Schneider, W. J. and Havel, R. J. (1987). Isolation and characterization of three endosomal fractions from the liver of estradiol-treated rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 6785–6789.
- Calvo, M., and Enrich, C. (2000). Biochemical analysis of a caveolae-enriched plasma membrane fraction from rat liver. *Electrophoresis* **21**, 3386–3395.
- Jäckle, S., Runquist, E. A., Miranda-Brady, S., and Havel, R. J. (1991). Trafficking of the epidermal growth factor receptor and transferrin in three hepatocytic endosomal fractions. *J. Biol. Chem.* **266**, 1396–1402.
- Ruiz-Montasell, B., Casado, F. J., Felipe, A., and Pastor-Anglada, M. (1992). Uridine transport in basolateral plasma membrane vesicles from rat liver. *J. Membrane Biol.* **128**, 227–233.
- Dragan, Y., Valdés, R., Gómez-Angelats, M., Felipe, A., Casado, F. J., Pitot, H. C., and Pastor-Anglada, M. (2000). Selective loss of nucleoside carrier expression in rat hepatocarcinomas. *Hepatology* **32**, 239–246.
- Pol, A., Ortega, D., and Enrich, C. (1997). Identification and distribution of proteins in isolated endosomal fractions of rat

- liver: Involvement in endocytosis, recycling and transcytosis. *Biochem. J.* **323**, 435–443.
24. Stieger, B., Hagenbuch, B., Landmann, L., Hochli, M., Schroeder, A., and Meier, P. J. (1994). In situ localization of the hepatocytic Na<sup>+</sup>/taurocholate cotransporting polypeptide in rat liver. *Gastroenterology* **107**, 1781–1787.
  25. Pol, A., Calvo, M., Lu, A., and Enrich, C. (1999). The “early-sorting” endocytic compartment of rat hepatocytes is involved in the intracellular pathway of caveolin-1 (VIP-21). *Hepatology* **29**, 1848–1857.
  26. Babbitt J., Trigatti, B., Rigotti, A., Smart, E. J., Anderson, R. G. W., Xu, S., and Kriger, M. (1997). Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acid acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. *J. Biol. Chem.* **272**, 13242–13249.
  27. Graf, G. A., Connell, P. M., van der Westhuyzen, D. R. and Smart, E. J. (1999). The class B, type I scavenger receptor promotes the selective uptake of high density lipoprotein cholesterol esters into caveolae. *J. Biol. Chem.* **274**, 12043–12048.
  28. Schnitzer, J. E., McIntosh, D. P., Dvorak, A. M., Liu, J., and Oh, P. (1995). Separation of caveolae from associated microdomains of GPI-anchored proteins. *Science* **269**, 1435–1439.
  29. Luton, F., Vergés, M., Vaerman, J.-P., Sudol, M., and Mostov, K. E. (1999). The SRC family of protein tyrosine kinase p62<sup>yes</sup> controlsymeric IgA transcytosis in vivo. *Mol. Cell* **4**, 627–632.
  30. Vergés, M., Havel, R. J., and Mostov, K. E. (1999). A tubular endosomal fraction from rat liver: Biochemical evidence of receptor sorting by default. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10146–10151.
  31. Pol, A., Calvo, M., Lu, A., and Enrich, C. (2000). EGF triggers caveolin redistribution from the plasma membrane to the early/ sorting endocytic compartment of hepatocytes. *Cell Signal.* **12**, 537–540.
  32. Calvo, M., Tebar, F., Lopez-Iglesias, C., and Enrich, C. (2001). Morphological and functional characterization of caveolae from liver hepatocytes. *Hepatology* **33**, 1259–1269.
  33. Mercader, J., Gómez-Angelats, M., del Santo, B., Casado, J., Felipe, A., and Pastor-Anglada, M. (1996). Nucleoside uptake in rat liver parenchymal cells. *Biochem. J.* **317**, 835–842.
  34. Ruiz-Montasell, B., Martínez-Mas, J. V., Enrich, C., Casado, F. J., Felipe, A., and Pastor-Anglada, M. (1993). Early induction of Na(+)-dependent uridine uptake in the regenerating rat liver. *FEBS Lett.* **316**, 85–88.
  35. del Santo, B., Tarafa, G., Felipe, A., Casado, F. J. and Pastor-Anglada, M. (2001). Developmental regulation of the concentrative nucleoside transporters CNT1 and CNT2 in rat liver. *J. Hepatol.* **34**, 873–880.
  36. Pol, A., Calvo, M., and Enrich, C. (1998). Isolated endosomes from quiescent rat liver contain the signal transduction machinery. Differential distribution of activated Raf-1 and Mek in the endocytic compartment. *FEBS Lett.* **441**, 34–38.
  37. Enrich, C., Pol, A., Calvo, M., Pons, M., and Jäckle, S. (1999). Dissection of the multifunctional “receptor-recycling” endocytic compartment of hepatocytes. *Hepatology* **30**, 1115–1120.
  38. Calvo, M., Pol, A., Lu, A., Ortega, D., Pons, M., Blasi, J., and Enrich, C. (2000). Cellubrevin is present in the basolateral endocytic compartment of hepatocytes and follows the transcytotic pathway after IgA internalization. *J. Biol. Chem.* **275**, 7910–7917.
  39. Anderson, R. G. W. (1998). The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 199–225.
  40. Enrich, C., Jäckle, S., and Havel, R. J. (1996). The polymeric immunoglobulin receptor is the major calmodulin-binding protein in an endosome fraction from rat liver enriched in recycling receptors. *Hepatology* **24**, 226–232.

Received February 13, 2002

Revised version received June 24, 2002

Published online October 11, 2002