



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Regulació del transportador de nucleòsids d'alta afinitat hCNT3 per proteïnes d'interacció

Olga Casulleras Gras

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

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

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



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Programa Doctorat en Biomedicina

Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular

Facultat de Biologia

Universitat de Barcelona

**Regulació del transportador de nucleòsids
d'alta afinitat hCNT3 per proteïnes
d'interacció**

Olga Casulleras Gras

Barcelona, 2018

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

PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOMEDICINA

Memòria presentada per
Olga Casulleras Gras

La interessada,

Olga Casulleras Gras

Vistiplau dels directors,

Dr. Marçal Pastor Anglada

Catedràtic de Bioquímica i Biologia
Molecular

Departament de Bioquímica i Biomedicina
Molecular

Universitat de Barcelona

Dra. Sandra Pérez Torras

Investigadora CIBERehd
Professora Associada

Departament de Bioquímica i Biomedicina
Molecular

Universitat de Barcelona

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOMEDICINA MOLECULAR

FACULTAT DE BIOLOGIA

UNIVERSITAT DE BARCELONA

A la meva família,

LLISTAT D'ACRÒNIMS

BBB: Blood-Brain Barrier

CNT: Concentrative Nucleoside Transporter

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DNA: DeoxyriboNucleic Acid

dpm: disintegrations per minute

ENT: Equilibrative Nucleoside Transporter

FBS: Fetal Bovine Serum

FDA: Food and Drug Administration

GFP: Green Fluorescent Protein

HEK: Human Embryonic Kidney

KM: Constant Michaelis-Menten

MPP+: 1-methyl-4-phenylpyridinium

MYTH: Membrane Yeast Two-Hybrid

NBTI: NitroBenzilTiolnosina

NT: Nucleotide Transporter

OAT: Organic Anion Transporter

OCT: Organic Cation Transporter

PBS: Phosphate Buffered Saline

PCR: Polymerase Chain Reaction

RNA: RiboNucleic Acid

RT-PCR: Real Time- PCR

SDS: Sodium Dodecil Sulfate

SLC: Solute Carrier

TMD: TransMembrane Domain

YFP: Yellow Fluorescent Protein

INTRODUCCIÓ	1
1 EL ROL DELS NUCLEÒT(S)IDS A LA CÈL·LULA	3
1.1 Biosíntesi dels nucleòtids.....	5
1.1.1 Vies de síntesi <i>de novo</i>	6
1.1.2 Vies de recuperació.....	10
1.2 Síntesi de nucleòtids en cèl·lules tumorals	12
2 TRANSPORTADORS DE NUCLEÒSIDS (NTS).....	15
2.1 Transportadors concentratius de nucleòsids (CNTs)	17
2.1.1 Membres de la família <i>SLC28</i> en humans	18
2.1.2 Estructura dels CNTs	20
2.2 Transportadors equilibratius de nucleòsids (ENTs)	22
2.2.1 Membres de la família <i>SLC29</i> en humans	23
2.2.2 Estructura dels ENTs.....	26
2.3 Distribució tissular dels transportadors de nucleòsids	27
2.3.1 Transportadors equilibratius de nucleòsids.....	27
2.3.2 Transportadors concentratius de nucleòsids.....	27
2.3.3 Implicacions funcionals de la distribució cel·lular dels ENTs i CNTs.....	28
2.4 Variabilitat genètica dels transportadors de nucleòsids.....	30
2.4.1 Família gènica <i>SLC28</i>	30
2.4.2 Família gènica <i>SLC29</i>	32
2.5 Mecanismes de regulació dels transportadors de nucleòsids	33
2.5.1 Regulació dels NTs a nivell gènic.....	33
2.5.2 Regulació dels NTs a nivell proteic.....	35
3 IMPLICACIÓ CLÍNICA DELS TRANSPORTADORS DE NUCLEÒSIDS.....	37
3.1 Alteració de l'expressió dels NTs en cèl·lules tumorals	37
3.2 Perfil farmacològic dels transportadors de nucleòsids	38
3.2.1 Anàlegs de nucleòsids en càncer.....	40

3.2.2 Anàlegs de nucleòsids en infeccions víriques	42
3.2.3 Anàlegs de nucleòsids en malalties inflamatòries	43
4 ALTRES CARES DELS TRANSPORTADORS DE NUCLEÒSIDS.....	44
4.1 Transportadors com a biomarcadors.....	44
4.2 De transportador a “transceptor”	45
4.3 Els transportadors de nucleòsids i el seu interactoma	50
4.3.1 Concepte d’interactoma	50
4.3.2 Regulació dels transportadors per interaccions proteiques	52
OBJECTIUS.....	55
RESULTATS i DISCUSSIÓ.....	59
BLOC 1: INTERACTOMA DEL TRANSPORTADOR DE NUCLEÒSIDS HCNT3	61
CAPÍTOL 1: GALECTINA-4	65
1 INTRODUCCIÓ.....	67
2 IDENTIFICACIÓ DE PROTEÏNES CANDIDATES	69
2.1 Assaig <i>pull-down</i>	69
2.2 Proteïnes candidates	70
3 VALIDACIÓ BIOQUÍMICA	72
3.1 Assaig <i>pull-down</i> dirigit	72
3.2 Model cel·lular	72
3.3 Co-immunoprecipitació i co-localització	73
4 VALIDACIÓ FUNCIONAL.....	76

4.1 Efecte de Galectina-4 en l'activitat del transportador hCNT3	76
4.1.2 Mecanisme d'acció de Gal-4 per modificar l'activitat d'hCNT3	79
4.2 Efecte de Galectina-4 en la localització d'hCNT3	81
4.3 Efecte de Galectina-4 sobre l'activitat d'hCNT3 en cèl·lules polaritzades	84
4.4 Altres models cel·lulars	86
5 IMPLICACIÓ EN LA CLÍNICA	88
5.1 Transport de 6-MP per hCNT3 en HT-29	88
CAPÍTOL 2: ADENOSINA QUINASA	93
1 INTRODUCCIÓ	95
2 IDENTIFICACIÓ DE PROTEÏNES CANDIDATES	96
2.1 Assaig pull-down	96
2.2 Proteïnes candidates	97
3 VALIDACIÓ BIOQUÍMICA	100
3.1 Assaig pull-down dirigit	100
3.2 Model cel·lular	100
3.3 Co-immunoprecipitació i co-localització	103
3.3.1 Co-immunoprecipitació.....	103
3.3.2 Co-localització	110
4 VALIDACIÓ FUNCIONAL	112
4.1 Efecte del silenciament d'ADK en el transport d'hCNT3	112
4.1.1 Transport de citidina i uridina	112
4.1.2 Transport d'adenosina	114
4.2 Efecte de la inhibició d'ADK en el transport d'hCNT3	117

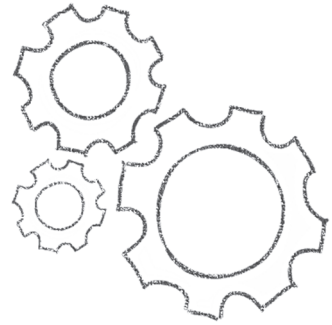
4.3 identificació dels residus del transportador hCNT3 implicats en la interacció amb ADK.....	119
4.4 Anàlisi de la interacció entre ADK i hCNT3 en condicions de velocitat inicial	123
4.4.1 Model HEK293.....	124
4.4.2 Electrofisiologia.....	125
BLOC 2: MODELATGE D'HCNTS I LA INTERACCIÓ AMB ACADESINA	131
1 TRANSPORT D'ACADESINA	136
1.1 Caracterització de les vies d'internalització d'AICAR.....	136
1.2 Cinètiques d'acadesina amb els transportadors	142
2 IDENTIFICACIÓ DELS RESIDUS RESPONSABLES DE LA INTERACCIÓ AMB HCNT3	144
3 IMPLICACIÓ FUNCIONAL	146
3.1 Caracterització del model cel·lular MEC1	146
3.2 Fosforilació d'AMPK induïda per acadesina	149
DISCUSSIÓ GENERAL	153
CONCLUSIONS	161
MATERIALS I MÈTODES	165
1 CULTIUS CEL·LULARS	167
1.1 Introducció.....	167
1.2 Àrea i material de treball	167
1.3 Manteniment dels cultius cel·lulars.....	168
1.3.1 Tripsinització i passatge	168
1.3.1.1 Línies cel·lulars en monocapa.....	169
1.3.1.2 Línies cel·lulars en suspensió.....	169

1.3.2 Recompte cel·lular	169
1.3.3 Congelació i descongelació	170
1.4 Línies cel·lulars utilitzades	171
1.4.1 MEC1	171
1.4.2 HEK293	171
1.4.3 HT-29	172
1.4.4 CaCo2	172
1.5 Test de micoplasma	173
1.5.1 Tractament amb Plasmocin™	173
2 OBTENCIÓ DE MOSTRES CLÍNIQUES.....	174
3 TÈCNiques DE MANIPULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ PROTEICA	175
3.1 Expressió heteròloga de proteïnes	175
3.1.1 Transfecció amb fosfat càlcic	175
3.1.2 Transfecció amb lipofectamina	176
3.2 Silenciament proteic	177
4 DETECCIÓ DE PROTEÏNES MITJANÇANT FLUORESCÈNCIA.....	178
4.1 Immunofluorescència	178
4.2 Localització subcel·lular de proteïnes fluorescents	179
5 TÈCNiques DE VALIDACIÓ D'INTERACCIONS PROTEIQUES	180
5.1 Pull-down i pull-down dirigit	180
5.2 Co-Immunoprecipitació	181
5.3 Immunocol·localització	182
6 TRANSPORT DE NUCLEÒSIDS I DERIVATS DE NUCLEÒSIDS	183
6.1 Medis de transport, reactius i materials	184
6.2 Transport en monocapa	184

6.2.1 Preparació dels medis de transport	184
6.2.2 Assaig de transport en placa	184
6.2.3 Assaig de transport en <i>transwell</i>	185
6.2.4 Valoració de la concentració de proteïna	185
6.2.5 Càlculs	186
6.3 Transport en suspensió.....	186
6.3.1 Preparació dels medis de transport	186
6.3.2 Assaig de transport en suspensió.....	186
6.3.3 Valoració de la concentració de proteïna	187
6.3.4 Càlculs	187
7 ELECTROFISIOLOGIA.....	188
7.1 Metodologia.....	188
7.1.1 Part molecular	188
7.1.2 Part d'electrofisiologia	188
8 ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ DE PROTEÏNES.....	190
8.1 Obtenció d'extractes proteics	190
8.2 Valoració de la concentració proteica	191
8.3 Electroforesi en SDS-PAGE	191
8.4 Western Blot	192
8.4.1 Electrotransferència de proteïnes.....	192
8.4.2 Immunodetecció	193
8.4.3 Revelat amb el mètode ECL	194
9 REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) I TÈCNiques AFINS.....	196
9.1 Obtenció inserts	196
9.1.1 Reacció en cadena de la polimerasa (PCR).....	196
9.1.2 Clonació i subclonació.....	197
9.2 Modificació dels inserts	197
9.2.1 Introducció de dianes de restricció mitjançant PCR	197
9.2.2 Introducció d'etiquetes myc	198

9.3 Comprovació dels inserts	198
9.3.1 Seqüenciació	198
9.3.2 Gel d'agarosa no desnaturalitzant	199
10 ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ DEL RNA	200
10.1 Extracció del RNA total	200
10.2 Síntesi de cDNA per retrotranscripció.....	200
10.3 PCR a temps real (RT-PCR)	201
11 BIOLOGIA MOLECULAR.....	203
11.1 Creixement bacterià i obtenció de bacteris competents	203
11.2 Transformació de bacteris competents	204
11.3 Aïllament de DNA plasmídic.....	204
11.4 Preparació i aïllament dels inserts i vectors necessaris	205
11.4.1 Elecció de les dianes de restricció.....	205
11.4.2 Digestió dels fragments de DNA amb endonucleases.....	205
11.4.3 Purificació del DNA.....	206
11.4.6 Lligació de fragments de DNA	207
12 ESTADÍSTICA I REPRESENTACIÓ DE DADES.....	208
BIBLIOGRAFIA	209

INTRODUCCIÓ



1 El rol dels nucleòt(s)ids a la cèl·lula

La cèl·lula és la unitat estructural i funcional de tot ésser viu en la qual es produeixen un nombre inimaginable de processos per realitzar totes les seves funcions. El conjunt d'aquests processos s'anomena *metabolisme*, del grec *metabole*, que significa canvi i el sufix *-isme*, que fa referència a qualitat, és a dir, la qualitat que tenen els éssers vius de poder canviar químicament la naturalesa de determinades substàncies. Aquests processos complexos són la base de la vida i permeten realitzar les tres funcions vitals: reproducció, relació i nutrició. La cèl·lula, com un ens independent, s'ha de proveir de les biomolècules que necessita per dur a terme totes aquestes funcions. D'entre totes les biomolècules que existeixen, els nucleòtids són de gran importància ja que intervenen en una multitud de processos.

Els nucleòsids són glicosilamines formades per una nucleobase unida a una ribosa o desoxiribosa mitjançant un enllaç β -glicosídic (King AE et al. 2006). Aquests s'anomenen en funció de la base que contenen: una purina (adenina, guanina o hipoxantina) o una pirimidina (citosina, timina o uracil). D'aquesta manera els nucleòsids purínics són l'adenosina, la guanosina i la inosina, mentre que els pirimidínics són la citidina, la timidina i la uridina. La diferència entre els nucleòsids i els nucleòtids és que als nucleòsids els hi manca el grup fosfat. Si aquests són fosforilats per quinases específiques en el grup alcohol del sucre, es formen els nucleòtids. Si s'incorporen un, dos o tres grup fosfats s'anomenen nucleòtid mono-, di o tri-fosfat, respectivament (**Figura 1**) (Kalckar 1950).

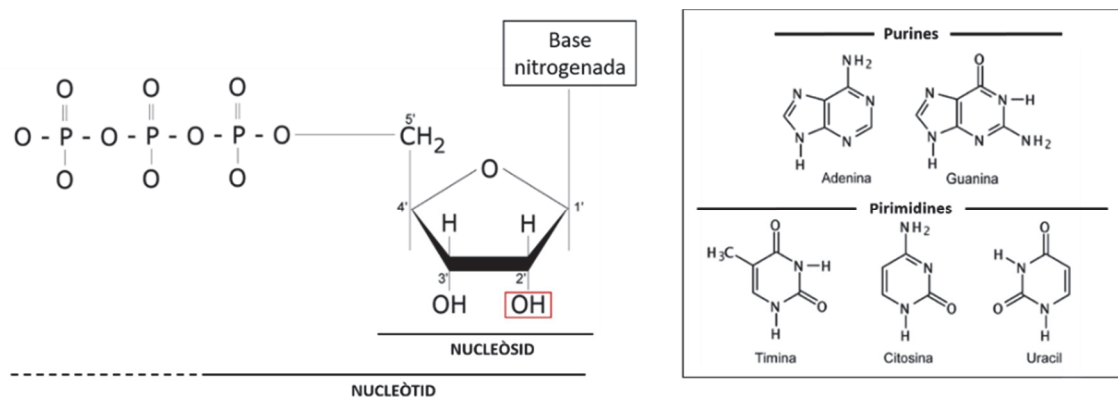


Figura 1. Estructura general dels nucleòt(s)ids amb la enumeració convencional de l'anell de la pentosa. Es mostra l'estructura d'un ribonucleòtid, als desoxiribonucleòtics un -H substitueix al grup -OH del carboni 2' (enquadrat en vermell). També es mostren les estructures de les bases puríniques i pirimidíniques.

Introducció

Els nucleòt(s)ids desenvolupen una àmplia varietat de funcions en el metabolisme cel·lular. Són una moneda energètica en les transaccions metabòliques en forma d'ATP o GTP, són els nexes químics en el sistema cel·lular en resposta a hormones i altres estímuls extracel·lulars i són també components estructurals d'una sèrie de cofactors enzimàtics (NAD, FAD, S-adenosilmetionina i el coenzim A), així com intermediaris biosintètics activadors com la UDP-glucosa i el CDP-diaglicerol i alguns nucleòsids, com el cAMP o cGMP, actuen també com a segons missatgers. Per últim, però no menys important, són els constituents dels àcids nucleics: l'àcid desoxiribonucleic (DNA) i l'àcid ribonucleic (RNA), els dipositaris moleculars de la informació genètica (Nelson, Cox and Lehninger 2015). Per altra banda, l'adenosina, un nucleòsid purínic, està implicada directament en la regulació de gran varietat de processos fisiològics com ara la neurotransmissió, la funció cardiovascular, la funció renal i la resposta immune mitjançant la seva unió a receptors purinèrgics presents a la superfície de la majoria de les cèl·lules (Burnstock et al. 1997, Shryock et al. 1997, Vallon et al, 2006 i Hasko et al. 2008).

La importància dels nucleòtids dins la cèl·lula es pot demostrar ja que la pèrdua de la funció de proteïnes clau implicades amb el seu metabolisme porta a un desequilibri de la seva concentració dins i fora la cèl·lula i això provoca desordres a l'organisme. Alguns d'aquests es detallen tot seguit.

S'ha vist que la causa comuna d'un grup de malalties mitocondrials anomenades síndromes de depleció del DNA mitocondrial (mtDNA) (MDS), que es caracteritzen per tenir una reducció severa del nombre de còpies del mtDNA, en molts casos és una alteració relacionada amb el metabolisme de nucleòtids. Es coneixen els nou gens, que mutats, són els responsables de la MDS: Timidina Quinasa 2 (*TK2*), Desoxiguanosina Quinasa (*DGUOK*), Gamma Polimerasa (*POLG1*), entre d'altres. Aquests gens estan implicats en la replicació del mtDNA, tant codificant per components directes de la maquinària de replicació com codificant per gens relacionats amb la regulació del *pool* de nucleòtids (Suomalainen and Isohanni 2010).

Un altre exemple podria ser la síndrome H, una síndrome que s'ha descrit recentment causat per mutacions diverses al gen *SLC29A3* que codifica pel transportador equilibratiu 3 (hENT3), proteïna responsable de la captació de nucleòsids. És una malaltia autosòmica recessiva que es caracteritza per una hiperpigmentació, histiocitosis, hipertricosi i baixa estatura on la causa de tots aquests desordres es troba en alteracions del metabolisme de nucleòtids (Huber-Ruano et al. 2012).

Una carència genètica de l'activitat hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HGPRT), un enzim implicat en la via de recuperació de la guanina i hipoxantina lliures, es manifesta amb una

sèrie de símptomes que es coneixen com a síndrome de Lesch-Nyhan. Els nens afectats pateixen un retard mental i mala coordinació, el cervell depèn especialment de les rutes de recuperació, fet que pot estar relacionat amb aquests trastorns en el sistema nerviós central que es manifesten en els afectats. Els efectes d'aquesta síndrome són il·lustratius de la importància de les rutes de recuperació. L'absència de la HGPRT fa que augmentin els nivells de fosforribosil pirofosfat (PRPP), el que condueix a un augment de la síntesi *de novo* de purines, que al seu temps repercuteix en els nivells elevats d'àcid úric (Nelson, Cox and Lehninger 2015).

En resum, les alteracions genètiques del metabolisme de purines i pirimidines són molt poc mencionades a la literatura general, però representen un dels reptes més importants en medicina pel que fa al seu diagnòstic i tractament (Jurecka 2009).

1.1 Biosíntesi dels nucleòtids

Hi ha dues rutes metabòliques que condueixen a la formació dels nucleòtids. La primera és la via de síntesi *de novo*, que bàsicament es produeix al fetge però la més abundant és la via de recuperació, és a dir, a través de la ingesta i la posterior digestió dels àcids nucleics (**Figura 2**).

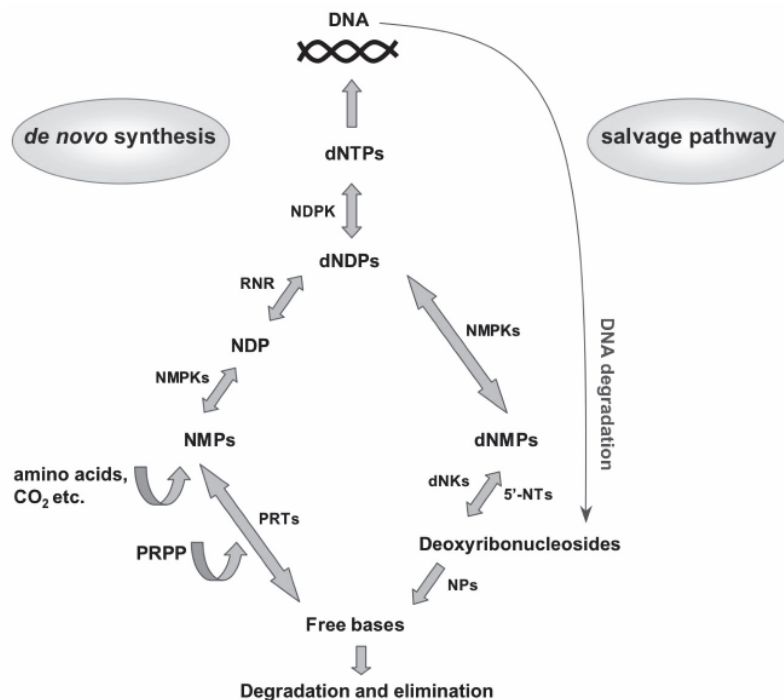


Figura 2. Esquema de les dues rutes metabòliques d'obtenció dels precursors del DNA. dNKs: deoxinucleòsid cinases, NDPK: nucleòsid difosfat cinases, NMPKs: nucleòsid monofosfat cinases, NPs: nucleòsid fosforilases, 5'-NTs: 5'-nucleotidases, PRPP: fosforribosil pirofosfat, PRTs: fosforribosil-transferases, RNR: ribonucleotide reductase. Font: Tesi Doctoral Cecília Carnrot.

Introducció

La síntesi *de novo* dels nucleòtids comença a partir dels seus precursors metabòlics: aminoàcids, ribosa 5-fosfat, CO_2 i NH_3 . En canvi, les rutes de recuperació reciclen les bases lliures i els nucleòsids alliberats de la degradació dels àcids nucleics (Nelson, Cox and Lehninger 2015) (Reichard 1988). A través de la via de síntesi *de novo* es sintetitzen només nucleòtids, mai nucleòsids, aquests últims provenen tots de les vies de recuperació. S'ha de tenir en compte que ambdues rutes són importants i cada una té els seus inconvenients i avantatges. La principal diferència entre les dues vies és que la primera via és una ruta anabòlica que representa una gran despesa energètica per la cèl·lula en comparació a la via de recuperació que aprofita els components procedents del catabolisme o de la dieta per la síntesi de nucleòtids i això suposa un estalvi energètic per la cèl·lula.

1.1.1 Vies de síntesi *de novo*

Les rutes de síntesi *de novo* dels nucleòtids de purina i pirimidina són semblants a pràcticament tots els éssers vius, fet que demostra que són unes vies metabòliques altament conservades al llarg de l'evolució. Tot i així, determinats tipus cel·lulars, com protozous paràsits, eritròcits o cèl·lules de la medul·la òssia de mamífers, no presenten aquesta ruta metabòlica (King AE et al. 2006, Cui et al. 2011 i Leung et al. 2001). Conseqüentment, la via de reciclatge adquireix un paper crucial com la via principal d'entrada dels nucleòsids en aquests tipus cel·lulars (Murray 1971).

La via de síntesi *de novo* dels nucleòtids comença amb els seus precursors metabòlics: ribosa 5-fosfat, CO_2 i NH_3 . La via de síntesi *de novo* per les purines i pirimidines són pràcticament idèntiques a tots els organismes vius. En particular, les bases lliures guanina, adenina, timina, citidina i uracil no són intermediaris en aquesta ruta metabòlica, és a dir, les bases no són sintetitzades com a lliures i després s'uneixen a una ribosa, com seria d'esperar. Sinó que la base purínica es construeix sobre la pentosa pre-formada. Mentre que en les pirimidines, la base es construeix de zero i un cop sintetitzada s'uneix a la pentosa fosforilada.

En la síntesi *de novo* de nucleòtids, tant de purines com de pirimidines, la fosforribosil pirofosfat (PRPP) és important ja que és el substrat inicial que s'obté per la fosforilació de la ribosa 5-fosfat que prové de la via de les pentoses. Aquest és el motiu pel qual aquesta ruta metabòlica tindrà lloc només en condicions anabòliques ja que es necessita potenciar la via de les pentoses fosfat. Específicament, en la síntesi *de novo* de purines es produeixen un seguit de processos intermediaris el qual té un cost global de 5 ATP, 2 glutamines, 1 glicina, 1 aspartat, 1 CO_2 i 2

formiats, tal i com es pot observar a la **Figura 3**. Es considera el producte final aquell que ja té un anell de purina complet, que és anomenat 5' inosina monofosfat (IMP).

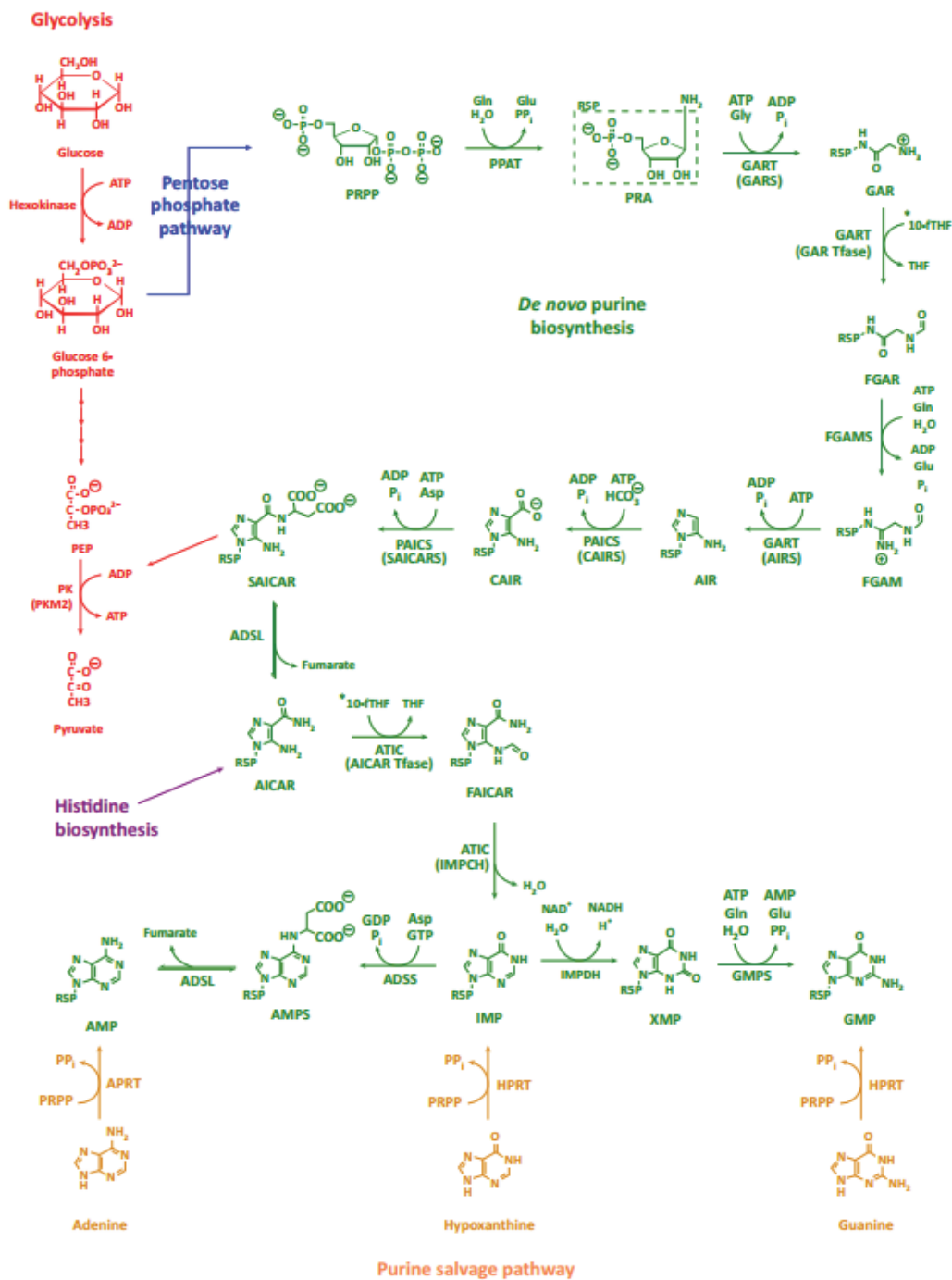


Figura 3. Esquema de la via metabòlica de la síntesi *de novo* de nucleòsids purínics. Representació detallada de la via de síntesi *de novo* dels nucleòsids purínics amb tots els enzims que hi intervenen i els metabòlits que es formen. Font: Pedley and Benkovic 2017.

Les purines són sintetitzades de nou en 10 reaccions químiques catalitzades per sis enzims en eucariotes. Recentment s'ha vist que, sota condicions de depleció de purines aquests sis enzims

Introducció

formen un complex multienzimàtic conegut com el purinosoma (An et al. 2008). Una estratègia que utilitza la cèl·lula per fer més eficient una ruta metabòlica, a la qual hi ha més d'un enzim implicat, és formar una macromolècula o metaboló constituït per totes aquelles proteïnes implicades en la ruta. Aquest complex genera un microambient que segresta tots els intermediaris que es van sintetitzant estabilitzant-los i evitant la interferència amb altres constituents cel·lulars, fent així més eficient la ruta. A diferència d'altres metabolons, sembla ser que la formació del purinosoma és un procés reversible que depèn del cycle cel·lular o de les condicions extracel·lulars com ara la concentració de purines, ja que en absència d'aquest tipus de nucleòtids la cèl·lula requereix la seva síntesi i és quan es forma el purinosoma. La formació d'aquest s'ha proposat com un mecanisme escalonat tal i com es representa a la **Figura 4**. Els tres primers enzims de la síntesi *de novo* (PPAT, GART i FGAMS) formen el cor del purinosoma. PAICS i ADSL formen un complex secundari que finalment interacciona amb el cor del metaboló juntament amb ATIC. Per tant, el purinosoma es pot destacar per ser un nivell organitzatiu enzimàtic innovador dins la cèl·lula, a més d'utilitzar-lo com a diana en teràpies de malalties que tenen el metabolisme de purines alterat, com ara el càncer (Chan et al. 2014, Kyoung et al. 2014 i Pedley and Benkovic 2017).

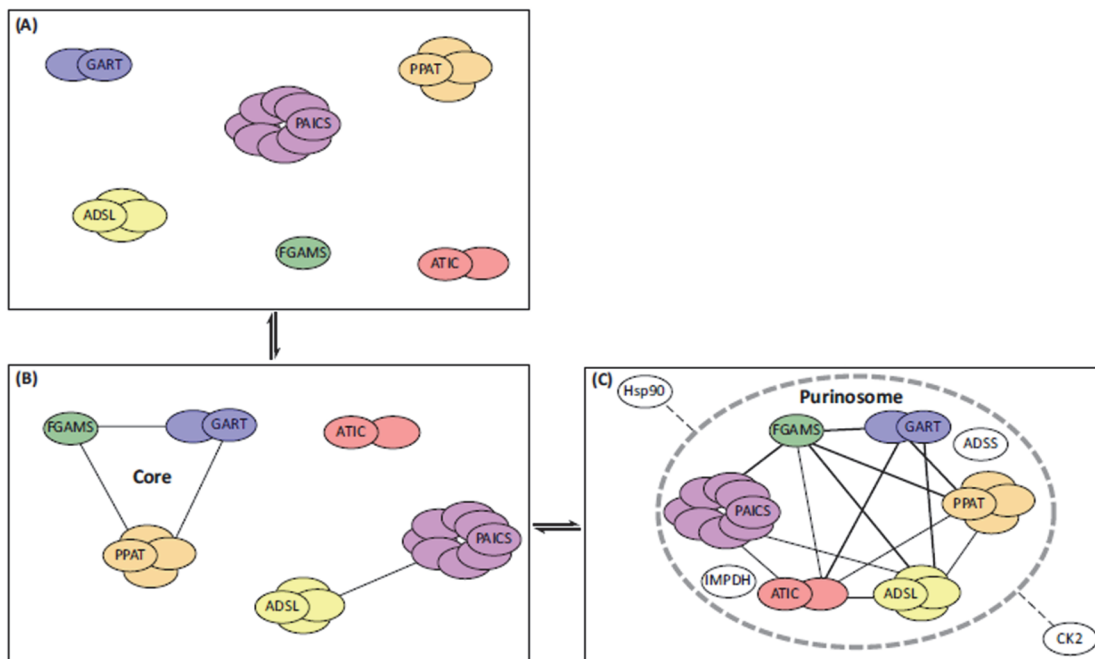


Figura 4. Model proposat per la formació del purinosoma. La formació del purinosoma a les cèl·lules es proposa com un procés que es produeix en diverses fases (A, B i C). Adaptació de Pedley and Benkovic 2017.

Tot i així, existeix una controvèrsia sobre la naturalesa d'aquests complexos ja que molts d'aquests descobriments s'han obtingut utilitzant un model en el qual s'expressava heteròlogament totes les proteïnes implicades en la maquinària de síntesi *de novo* de nucleòtids (Zhao A. et al. 2013 i Zhao et al. 2014).

Pel que fa la biosíntesi *de novo* dels nucleòtids pirimidínics requereix de bicarbonat, aspartat i amoni i de la PRRP (Figura 5).

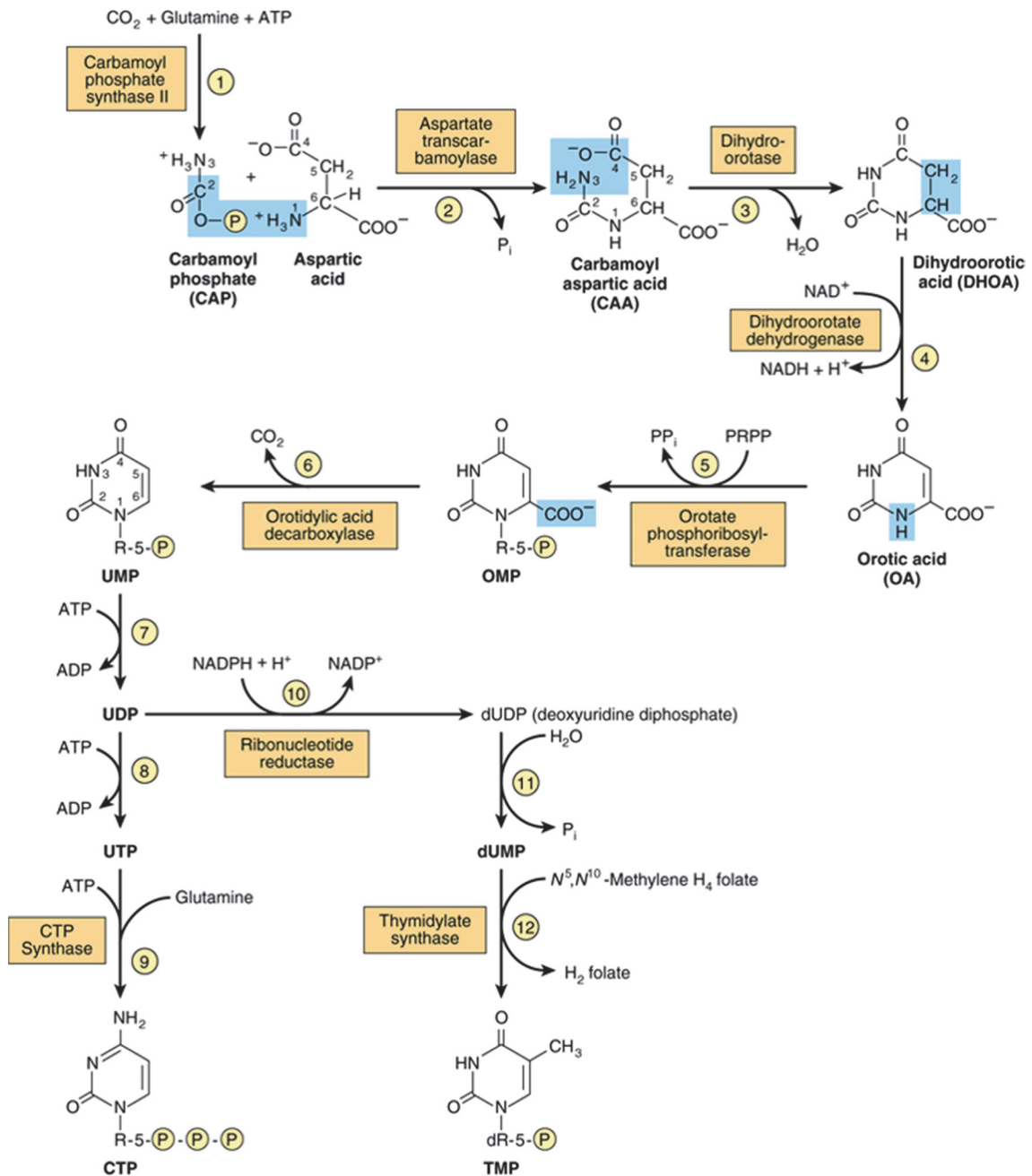


Figura 5. Esquema de la via metabòlica de la síntesi *de novo* de nucleòtids pirimidínics. Representació detallada de la via de síntesi *de novo* dels nucleòtids pirimidínics amb tots els enzims que hi intervenen i els metabòlits que es formen. Font: Murray and Rodwell 29a edició.

Introducció

En total, la síntesi de pirimidines consta de sis reaccions enzimàtiques, les tres primeres es duen a terme per la proteïna trifuncional CAD, que és sintetitzat com un únic polipèptid amb tres activitats enzimàtiques: la carbamoil fosfat sintetasa II (CPSII), l'aspartat transcarbamilasa (ATC) i la dihidroorotasa (DHOase) (Chen et al. 1989, Simmer et al. 1990 i Grayson and Evans 1983). El quart pas es dona a la membrana mitocondrial interna on la dihidroorotat deshidrogenasa (DHODH) catalitza el pas de dihidroorotat a orotat (Hines et al. 1986). Els dos últims passos són catalitzats per la uridina monofosfat sintetasa (UMPS), que és una proteïna amb doble funció. Al seu extrem N-terminal té una activitat orotat fosforibosil transferasa, la qual permet incorporar PRPP a l'orotat i a l'extrem C-terminal té una activitat orotidilat descarboxilasa, que catalitza el pas a uridina monofosfat (UMP) (Floyd and Jones 1985 i Suttle et al. 1988). Finalment aquest substrat pot ser fosforilat per acabar sintetitzant UDP i UTP. Les pirimidines obtingudes bàsicament s'utilitzen per la síntesi *de novo* del DNA i del RNA, tot i que la UTP és també utilitzada per sintetitzar UDP-glucosa, implicada en processos de glicosilació (Bulter and Elling 1999 i Huang and Graves 2002).

1.1.2 Vies de recuperació

Durant la degradació metabòlica cel·lular dels nucleòtids es formen constantment nucleòsids i bases púriques i pirimidíniques lliures. Aquests nucleòsids i bases lliures en gran part es recuperen, juntament amb els que provenen de la dieta i tornen a ser utilitzats per sintetitzar nous nucleòtids (Austin et al. 2012), una ruta molt més senzilla i menys costosa energèticament que la síntesi *de novo* descrita anteriorment. Per exemple, per sintetitzar *de novo* 1 mol de dCTP o dTTP a partir de glucosa, glutamina, aspartat i bicarbonat es necessiten 6 mols d'ATP, mentre que per la via de recuperació es requereix la meitat d'energia, 3 mols d'ATP (Voet and Voet 2004). A més, s'ha de tenir en compte que aquests substrats utilitzats per sintetitzar de nou els nucleòsids, com la glucosa o la glutamina, no podran ser emprats per obtenir energia per altres vies de la cèl·lula. Per tant, la despesa energètica total de la via *de novo* encara resulta més elevada.

La base de la via del reciclatge de les pirimidines i el de les purines és transferir la PRPP a la nucleobase reciclada per tal de formar un nou nucleòsid 5'-monofosfat (NMP). Els enzims que catalitzen aquesta reacció són tres, dos per les purines i un per les pirimidines. La hipoxantina-guanosina fosforibosil transferasa (HGPRT), que té com a substrat la guanina o la hipoxantina (una adenina amb el grup amino substituït per un grup -OH) i l'adenina fosforibosil transferasa (APRT) la qual utilitza adenina lliure, serien els enzims de reciclatge de purines. I la pirimidina nucleòsid monofosfat transferasa que seria l'enzim específic per les pirimidines uracil i timidina

(Nelson, Cox and Lehninger 2015) (**Figura 6**). A més, la via de reciclatge és regulada per alguns enzims limitants, com és la desoxicitidina quinasa (dCK) que fosforila la desoxicitidina per sintetitzar desoxicitidina monofosfat (dCMP), un precursor de desoxicitidina trifosfat (dCTP) i desoxitimidina trifosfat (dTTP) (Sabini et al. 2008). Pel que fa les purines, la deoxiadenosina i deoxiguanosina, també poden ser fosforilades per dCK, però amb una eficàcia menor (Sabini et al. 2008). La timidina quinasa 1 (TK1), la qual sintetitza dTTP a partir de la desoxitimidina monofosfat (dTMP) també és un enzim que pot regular la via de reciclatge (Arnér and Eriksson 1995).

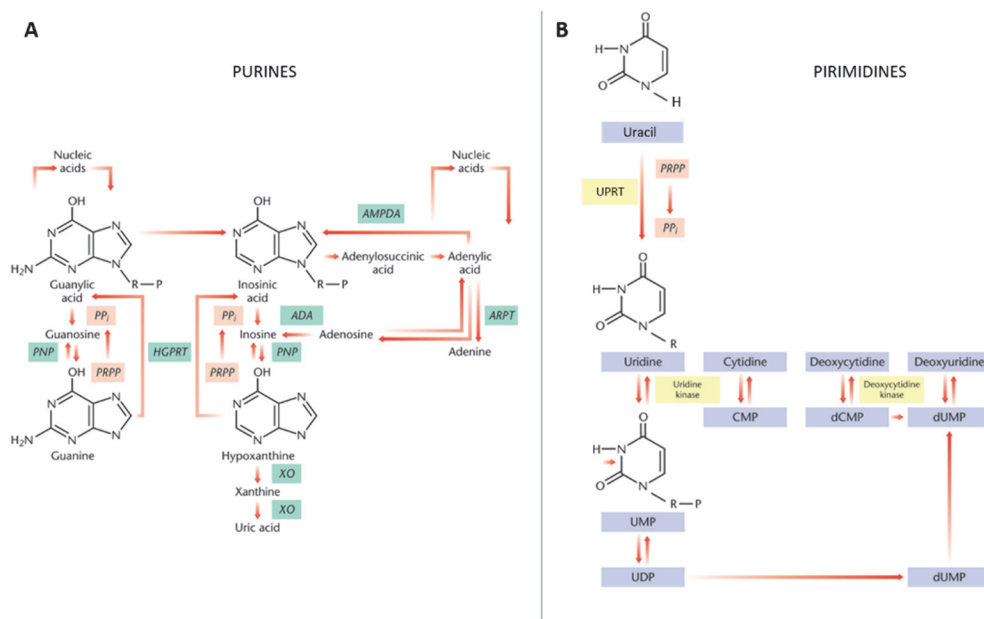


Figura 6. Síntesi de nucleòsids purínics (A) i pirimidínics (B) per la via de recuperació. PNP: Purine Nucleoside Phosphorylase, PPi: pirofosfat, PRPP: fosforibosil pirofosfat, HGPRT: hipoxantina-guanosina fosforibosil transferasa, ADA: adenosina desaminasa, XO: xantina oxidasa, AMPDA: àcid adenílic desaminasa, ARPT: adenina fosforibosil transferasa, UPRT: uracil fosforibosil transferasa, UMP: uracil monofosfat, UDP: uracil difosfat, CMP: citidina monofosfat, dCMP: desoxicitidina monofosfat, dUMP: desoxiuracil monofosfat, dTMP: desoxitimidina monofosfat. Adaptat de Nyhan, 2014.

Sintetitzar els nucleòtids per la via de recuperació suposa un estalvi energètic per la cèl·lula i és per això que s'ha pogut demostrar la importància d'aquesta ruta. En ratolins que no expressen alguns dels enzims imprescindibles per la via de recuperació, com són dCK i TK1, s'observa que els ratolins neixen per sota de les freqüències mendelianes i amb un creixement retardat, per tant no tenir funcional aquesta via té conseqüències biològiques importants (Austin et al. 2012). També s'ha descrit que quan els nivells d'hipoxantina són suficients, es regula negativament la via de síntesi *de novo* i els nucleòsids purínics es sintetitzen per la via de recuperació, ja que això li suposa un estalvi energètic a la cèl·lula. No obstant, quan la cèl·lula entra en fase de divisió, la via de síntesi *de novo* es veu incrementada (Yamaoka et al. 1997 i Yamaoka et al. 2001).

Introducció

A més, s'ha vist que la utilització de la via de síntesi *de novo* per sintetitzar purines depèn del teixit en qüestió. Mentre que s'ha descrit que el múscul esquelètic i el fetge tenen una elevada taxa de biosíntesi, l'activitat d'aquesta via en cèl·lules del cervell és només un 25-30% de l'activitat observada en el fetge. A més, es creu que cèl·lules de la medul·la òssia tenen una capacitat limitada per la via de síntesi *de novo* de purines. Tots aquells teixits que tenen intrínsecament una capacitat limitada en la biosíntesi de purines és d'esperar que depenguin de la via de recuperació de purines o que les obtinguin a partir d'altres teixits (Zhao H. et al. 2013).

1.2 Síntesi de nucleòtids en cèl·lules tumorals

Les cèl·lules tumorals depenen de la biodisponibilitat dels nucleòtids per tal de fer front a l'elevada taxa de síntesi dels àcids nucleics per poder mantenir una elevada proliferació cel·lular. Aquesta demanda metabòlica sembla ser satisfeta provocant una desregulació del metabolisme energètic cel·lular, promovent una glicòlisi aeròbica anomenada efecte Warburg (**Figura 7**). De fet, aquesta reprogramació ha estat identificada com una peça clau del càncer (Hanahan and Weinberg 2011 i Cantor and Sabatini 2012).

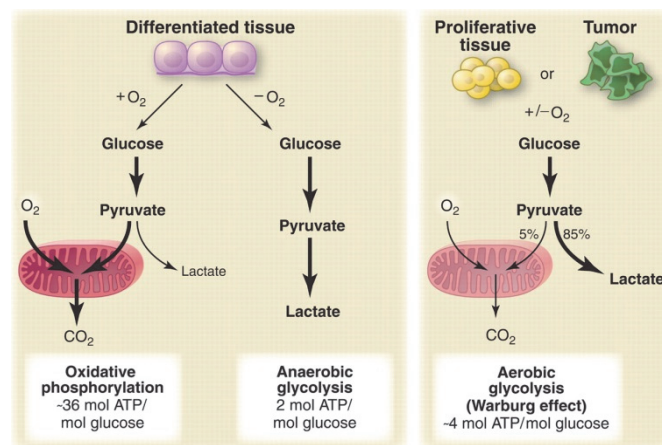


Figura 7. Efecte Warburg. Representació de les diferències entre la fosforilació oxidativa, la glicòlisi anaeròbica i la glicòlisi aeròbica (efecte Warburg). Font: Vander-Heiden et al. 2009.

No obstant, recentment s'ha vist que la fosforilació oxidativa (OXPHOS) també és essencial pel desenvolupament del càncer. Ja que, cèl·lules que no tenen DNA mitocondrial (mtDNA) presenten un creixement tumoral retardat i quan aquestes incorporen el mtDNA, s'observa un augment en la seva proliferació ja que poden restablir la seva capacitat normal de la via OXPHOS (Tan et al. 2015).

Com es produeix tota aquesta reprogramació metabòlica en el càncer i com es relaciona amb la via de síntesi *de novo* de nucleòtids sovint ha estat discutit. Per intentar relacionar aquests

conceptes ens basem amb la idea que la desregulació de la glicòlisi activa la via de les pentoses 5-fosfat per produir suficient ribosa-5-fosfat i, conseqüentment, suficient PRPP per fer front a la síntesi de purines i pirimidines. No obstant, la síntesi de nucleòtids també requereix de la maquinaria adequada de la via d'OXPHOS. L'enzim que catalitza el quart pas de la síntesi *de novo* de pirimidines, anomenat dihidroorotat deshidrogenasa (DHODH), és una proteïna integral de la membrana mitocondrial, la qual té acoblada la seva activitat oxidoreductasa a la maquinaria de la via OXPHOS (Löffler et al. 2015). A més, pel que fa a la síntesi *de novo* de purines, s'ha vist que la glicina té un paper important en la proliferació cel·lular ja que té un rol metabòlic actuant com un precursor dels nucleòtids purínics (Jain et al. 2012). Amb totes aquestes observacions es podria suggerir que la potenciació de la via de síntesi *de novo* de nucleòtids, tant purínics com pirimidínics, és un factor clau per suportar la proliferació cel·lular en el desenvolupament del càncer. No obstant, per aconseguir nucleòtids, no només existeix la via de síntesi *de novo*, sinó que també hi intervé la via de reciclatge. Ambdues vies són totalment dependents de la disponibilitat de PRPP ja que és la molècula que participa en la conversió de les nucleobases a la forma monofosfat dels nucleòtids corresponents. Sembla lògic assumir doncs, que almenys fins a cert punt, la reprogramació metabòlica pot potenciar la via de les pentoses fosfat. A més, mantenir l'equilibri de purines i pirimidines i una correcta biodisponibilitat de nucleòtids també sembla que sigui essencial per la proliferació (Lane and Fan 2015), sent la deficiència de nucleòtids la principal causa d'inestabilitat en fases inicials del desenvolupament del càncer (Bester et al. 2011).

Encara no és sabut quina és la contribució relativa de la síntesi *de novo* de nucleòtids i nucleobases i la via de reciclatge de nucleòtids per tal de satisfer les necessitats de la cèl·lula en la síntesi dels àcids nucleics i progressió del cicle cel·lular. Segueix sense estar clar com la cèl·lula detecta canvis en la disponibilitat de nucleòtids a nivell extracel·lular per tal de promoure una via o l'altra.

Molts dels gens que codifiquen per enzims de la via de síntesi *de novo* estan regulats a nivell transcripcional d'una forma coordinada (Liu et al. 2008). Recentment s'han identificat alguns gens que codifiquen per enzims relacionats amb la síntesi de purines, com a possibles biomarcadors de la progressió del càncer, remarcant la possibilitat d'utilitzar la síntesi de purines com una diana terapèutica (Barfeld et al. 2015 i Goswami et al. 2015). Dins d'aquests gens es troba la fosforibosil aminoimidazol succinocarboxamida sintetasa (PAICS o ADE2), el qual s'ha vist que es troba sobreexpressat en càncer de pulmó i pròstata (Goswami et al. 2015) (Chakravarthi et al. 2016). PAICS és una proteïna bifuncional que té activitat fosforibosil aminoimidazol carboxilasa a l'extrem N-terminal i activitat fosforibosil aminoimidazol

Introducció

succinocarboxamida sintetasa al C-terminal que catalitza les reaccions 6 i 7 de la síntesi *de novo* de purines. Com a producte d'aquestes reaccions, PAICS genera SAICAR el qual és metabolitzat per l'enzim adenilsuccinat liasa (ADSL) formant AICAR. L'ADSL és un enzim que s'inhibeix per AMP, que és el producte natural de la reacció catalitzada per ADK, enzim implicat en la via de reciclatge de nucleòsids purínics.

Curiosament, la síntesi *de novo* de purines i pirimidines són les úniques vies metabòliques en les que hi ha una presència inusual de proteïnes multifuncionals, és a dir, una única proteïna la qual presenta més d'una activitat enzimàtica, alguna d'elles, fins i tot, forma oligòmers. Exemples, podrien ser PAICS per a la síntesi de purines i CAD per a les pirimidines. Aquesta és una adquisició evolutiva que no està present a procariotes. A més, hi ha una evidència la qual suggereix que la regulació d'aquestes proteïnes es produeix mitjançant la formació de complexos multiproteïcs, més que per processos transcripcionals, com seria el cas de la formació del purinosoma anteriorment comentat a l'apartat 1.1.1 de la introducció.

En tot cas, segons tot el que s'ha comentat anteriorment, podria ser que la cèl·lula tingués algun mecanisme el qual funcionés com un sensor de la disponibilitat de nucleòsids al medi extracel·lular i això potenciés una via d'obtenció de nucleòtids o una altra.

2 Transportadors de nucleòsids (NTs)

Cada cèl·lula es troba envoltada per una membrana plasmàtica que delimita l'espai cel·lular i actua com una frontera amb el medi exterior. No obstant, la membrana plasmàtica ha de permetre l'intercanvi de multitud de molècules que són necessàries per la vida cel·lular, de manera que ha d'integrar sistemes de comunicació eficaços entre el medi intracel·lular i l'exterior. El pas a través de la membrana d'ions, nutrients i altres molècules es realitzen a través de diversos mecanismes, on la gran majoria, requereixen de la presència de proteïnes integrals de membrana. De totes les funcions i intercanvis amb el medi extracel·lular que realitza la cèl·lula ens centrarem amb aquelles proteïnes responsables del transport de nucleòsids naturals i molts dels fàrmacs derivats d'aquests nucleòsids. Per tant, l'estudi dels transportadors és una àrea d'interès creixent degut a que aquests també estan implicats en l'absorció, distribució i eliminació de fàrmacs, especialment l'estudi dels transportadors expressats en teixits com ara l'epiteli intestinal, ronyó, fetge o l'endoteli de la barrera hematoencefàlica.

En la via de reciclatge, després de l'absorció dels àcid nucleics obtinguts a través de la dieta, aquests són metabolitzats a molècules de nucleòsids i fosfats mitjançant nucleotidases presents a la superfície cel·lular i el medi extracel·lular (Yegutkin 2008). Al ser molècules de caràcter hidrofílic, els nucleòsids, requereixen de proteïnes integrals de membrana especialitzades per tal de ser incorporats dins la cèl·lula. Aquestes proteïnes s'anomenen transportadors de nucleòsids (NTs) (Molina-Arcas et al. 2009). Els NTs estan compostats de múltiples dominis transmembrana que defineixen una cavitat flexible a través de la qual hi passa el substrat (Yan et al. 2005).

Aquestes proteïnes transportadores tenen, doncs, un paper decisiu en la regulació de l'homeòstasi dels nucleòsids naturals en la regulació de nombrosos processos fisiològics, així com en la farmacocinètica i farmacodinàmica dels fàrmacs anticancerígens i antivirals que transportin (Baldwin et al. 2004, King AE et al. 2006 i Zhang et al. 2007). Un clar exemple és el de l'adenosina, un nucleòsid que depenent de la seva concentració s'unirà selectivament als receptors d'adenosina, els quals tenen diferent afinitat pel substrat. Com a conseqüència, l'adenosina promourà diferents rutes metabòliques i respostes cel·lulars en funció de la seva presència al medi extracel·lular (Choi et al. 2004, Baldwin et al. 2004, Elwi et al. 2006, Naydenova et al. 2008 i Huber-Ruano et al. 2010).

Introducció

Els transportadors de membrana pertanyen a dues grans superfamílies: la família proteica de transportadors SLC (en anglès Solute Carrier) i la família ABC (en anglès ATP-Binding Cassette). La família SLC és una gran superfamília que codifica per una gran varietat de transportadors transmembrana implicats en el transport de nucleòsids així com d'altres metabòlits, nutrients, ions i fàrmacs a través de la membrana cel·lular (**Figura 8**).

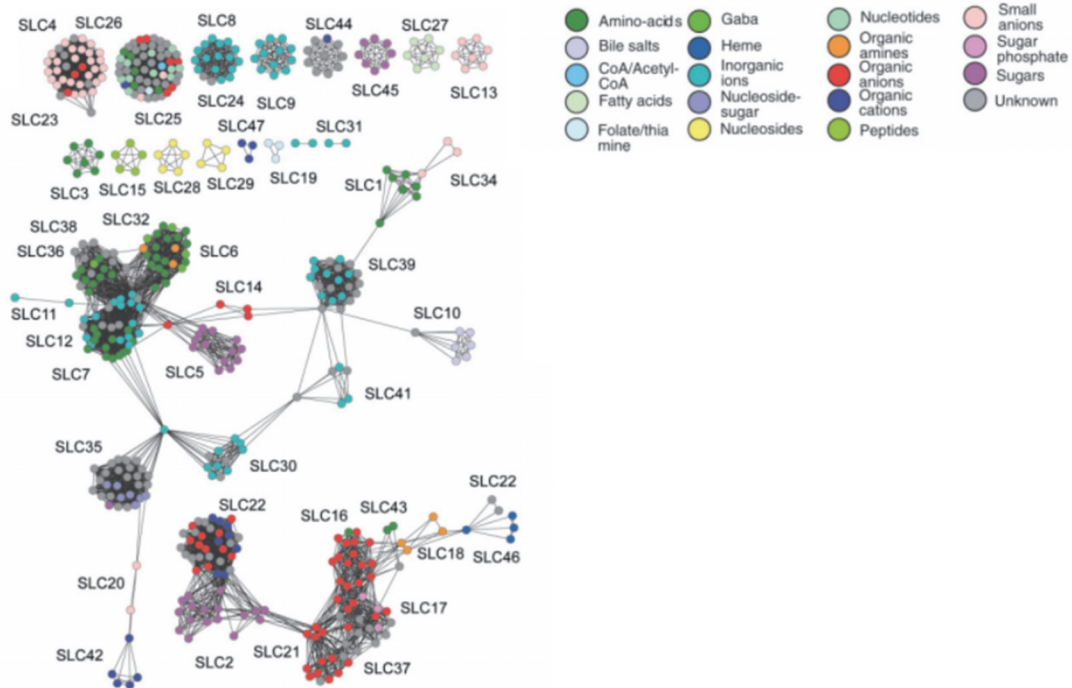


Figura 8. Representació dels diferents transportadors codificats per la superfamília SLC. Mapa de les proteïnes SLC agrupades segons el substrat que transporten. Els colors representen el substrat prototípic dels transportadors. Adaptat de Schlessinger et al. 2010.

Existeixen al voltant de 400 transportadors de la família SLC agrupats en 52 subfamílies en funció de la similitud de les seves seqüències (Nyquist et al. 2017). Els transportadors d'aquestes famílies tenen almenys entre un 20-25% d'homologia entre les seves seqüències i es pensa que han evolucionat a partir d'un ancestre comú. Només alguns dels gens d'aquestes famílies han estat relacionats amb el transport de nucleòsids i els seus derivats. Estudis realitzats en diversos teixits i línies cel·lulars, abans de la identificació molecular d'aquestes proteïnes NTs, han posat de manifest l'existència de múltiples sistemes de transport de nucleòsids que podien realitzar un transport de tipus equilibratiu o concentratiu. Es van descriure fins a set sistemes que podien ser responsables del transport de nucleòsids en cèl·lules de mamífers (Griffith and Jarvis 1996). Dos d'aquests sistemes són sistemes de transport equilibratiu que presenten una baixa afinitat pels substrats. Aquests sistemes corresponen a la família *SLC29* que codifica pels transportadors de tipus equilibratiu (*Equilibrative Nucleoside Transporter* o ENT): ENT1 i ENT2. Tot i que posteriorment es van descriure dos subtipus més, ENT3 i ENT4. Els altres cinc sistemes, en canvi,

es van caracteritzar en base a la seva activitat de transport de tipus concentratiu i pel fet de tenir una elevada afinitat pel substrat. Es van identificar cinc sistemes: N1, N2, N3, N4 i N5. Els sistemes N1 i N2 són principalment selectius de purines i pirimidines, respectivament, encara que N1 pugui transportar uridina també. El sistema N3 té una àmplia selectivitat de substrat, translocant tant purines com pirimidines. El sistema N4, que s'ha identificat en vesícules de ronyó humanes, transporta també ambdós tipus de nucleòsids però té una elevada especificitat per la guanosina (Gutierrez et al. 1992 i Gutierrez and Giacomini 1993). Mentre que el N5 és l'únic sistema concentratiu sensible a NBTI (nitrobenziltioinosina) i transporta guanosina i ha estat descrit a cèl·lules humanes NB4 de leucèmia promielocítica aguda (Flanagan et al. 1997) i en limfòcits B humans (Soler et al. 1998). Tres d'aquests cinc sistemes de transport (N1, N2 i N3) avui en dia estan reconeguts com a transportadors de caràcter concentratiu (*Concentrative Nucleoside Transporter* o CNT) codificats pels gens que pertanyen a la família *SLC28* (Gray et al. 2004a). Tant la família gènica *SLC28* com la *SLC29* són evolutivament antigues, els transportadors CNTs es troben en un ampli ventall d'organismes bacterians i eucariotes, però no en plantes. Mentre que els transportadors equilibratius, ENTs, es troben al domini eucariota on estan àmpliament distribuïts (Young et al. 2013). Els transportadors de tipus concentratiu són filogenèticament més antics que els equilibratius, ja que aquests últims no tenen els ortòlegs procarïotes corresponents, mentre que els concentratius sí que els tenen. Entre els tres membres de la família gènica *SLC28*, el transportador concentratiu tipus 3 humà (hCNT3) és el que presenta una homologia major amb altres ortòlegs primitius (Ritzel et al. 2001). Ambdues famílies transporten nucleòsids però ni posseeixen una seqüència ni una estructura similar i tampoc hi ha cap relació estructural amb altres famílies de transportadors (Dos Santos-Rodrigues et al. 2014).

A dia d'avui, les dificultats per aconseguir cristal·litzar aquestes proteïnes, la toxicitat associada a una sobreexpressió d'aquestes, la coincidència de l'especificitat de substrat o la baixa disponibilitat d'anticossos pel seu estudi són desafiaments constants que es troben en aquest camp d'investigació.

2.1 Transportadors concentratius de nucleòsids (CNTs)

Els sistemes de transport concentratius (CNT) són cotransportadors de sodi i nucleòsids, de manera que incorporen el nucleòsid unidireccionalment a l'interior de la cèl·lula en contra del seu gradient de concentració aprofitant el gradient favorable d'entrada del sodi. Aquest tipus de transport permet l'acumulació dels substrats transportats i mostren una alta afinitat pels seus

Introducció

substrats, amb uns valors de K_M en el rang de micromolar baix i una selectivitat més restringida que l'altra família gènica de transportadors, els de tipus equilibratiu (**Taula 1**).

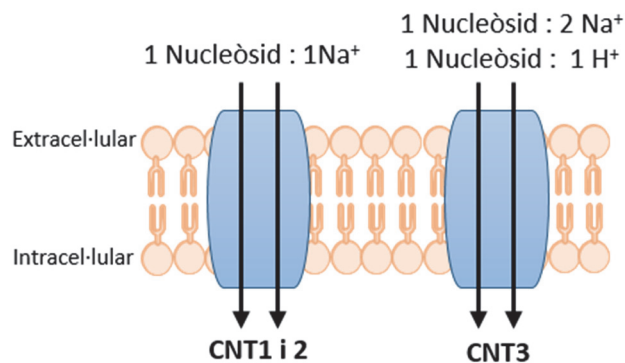


Figura 9. Esquema dels diferents sistemes de transport concentratiu de nucleòsids. Els CNTs realitzen un transport unidireccional, depenent de sodi i en contra de gradient. CNT1 i CNT2 transloquen un nucleòsid amb un ió Na^+ , mentre que CNT3 transloca cada nucleòsid amb 2 ions Na^+ o un protó.

2.1.1 Membres de la família *SLC28* en humans

La família gènica *SLC28* en humans codifica pels transportadors de nucleòsids concentratius o CNTs i està composta per tres membres: hCNT1, hCNT2 i hCNT3, codificats respectivament pels gens *SLC28A1*, *SLC28A2* i *SLC28A3*. Aquestes tres proteïnes corresponen a les activitats N1, N2 i N3 anteriorment esmentades. Els gens que codifiquen per les proteïnes responsables de les activitats N4 i N5 no han sigut identificats en la base de dades del genoma humà i sembla ser molt probable que es tractin de variants polimòrfiques dels tres membres identificats o que estiguin associats a famílies de proteïnes no relacionades amb els CNTs (Lai et al. 2004a).

Tot i que tots tres membres accepten la uridina com a substrat, tots difereixen en funció de la seva selectivitat per altres substrats. hCNT1 és un transportador de pirimidines (Ritzel et al. 1997), i encara que l'adenosina és capaç d'unir-se a hCNT1 amb una elevada afinitat ($K_d = 14 \mu\text{M}$), no és capaç de transportar-la. S'ha demostrat que l'adenosina podria actuar o bé com un inhibidor d'alta afinitat d'hCNT1 (Larráyo et al. 2004) o bé simplement podria ser transportat amb baixa capacitat (Smith et al. 2004). hCNT2 és un transportador de purines, encara que com ja hem comentat, també pot transportar la uridina (Ritzel et al. 1998) i hCNT3 presenta una àmplia selectivitat de substrat ja que pot translocar tant purines com pirimidines (Ritzel et al. 2001 i Wang and Giacomini 1997) (**Figura 10**).

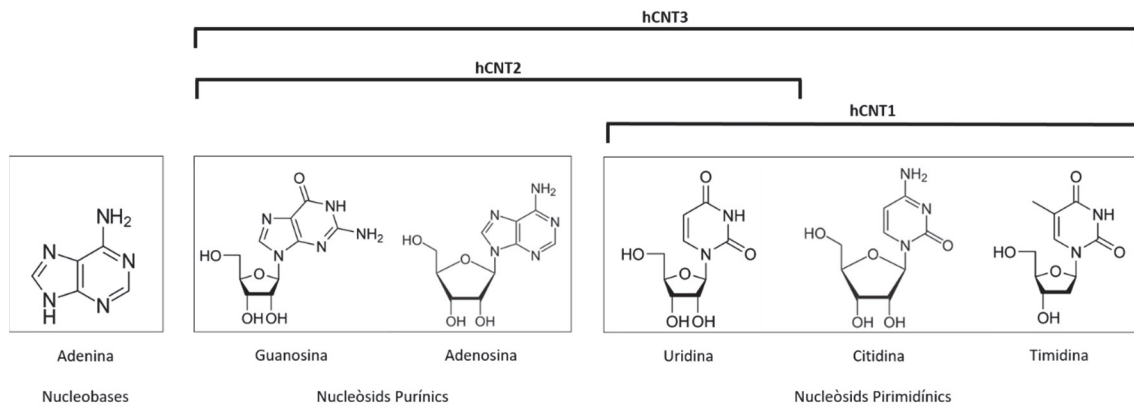


Figura 10. Representació de la selectivitat de substrat dels membres de la família gènica *SLC28*. Adaptat de Parkinson et al. 2011.

A més de les diferències en la selectivitat, els transportadors hCNTs, al tenir un transport acoblat a l'ió sodi, es poden diferenciar en funció de l'estequiometria d'ió sodi necessària per cada nucleòsid transportat. La unió del sodi al transportador fa que aquest incrementi la seva afinitat pel substrat, el qual s'hi unirà després. Les isoformes hCNT1 i hCNT2 realitzen un transport equimolar, és a dir, un ió sodi per un nucleòsid (Larráyoz et al 2004, Smith et al 2004 i Che et al. 1995), mentre que per hCNT3 es necessiten dos ions de sodi per transportar una molècula de nucleòsid (Ritzel et al. 2001). Aquesta relació 2:1 implica una gran capacitat de concentrar nucleòsids i derivats en contra de gradient de concentració aconseguint uns nivells més elevats a l'interior cel·lular. Això fa que hCNT3 sigui el transportador de tipus concentratiu amb una major capacitat concentrativa i una àmplia selectivitat de substrat. A més, hCNT3 és l'únic transportador que pot utilitzar el gradient de protons (H^+) com a força motriu del transport (Smith et al. 2005) en una relació 1:1, és a dir, un protó per cada nucleòsid translocat (Smith et al. 2007).

Transportador	CARACTERÍSTIQUES MOLECULARS		CARACTERÍSTIQUES CINÈTIQUES	
	Gen	Proteïna	Substrat (K_M)	Na ⁺ :nucleòsid
hCNT1	SLC28A1 15q25.3	650aa	Uridina (38 μ M ^a)	1:1
			Timidina (27 μ M ^b)	
			Citidina (3.1 μ M ^a)	
hCNT2	SLC28A2 15q15	659aa	Inosina (13.7 μ M ^a)	1:1
			Adenosina (8 μ M ^b)	
			Uridina (116 μ M ^a)	
			Guanosina (21 μ M)	
hCNT3	SLC28A3 9q22.2	691aa	Uridina (5.3 μ M ^a)	(H ⁺ : 1:1)
			Timidina (10.6 μ M ^a)	
			Citidina (3.5 μ M ^a)	
			Inosina (4.3 μ M ^a)	
			Adenosina (2.4 μ M ^a)	
			Guanosina (8.5 μ M ^a)	

Taula 1. Característiques moleculars i cinètiques dels transportadors concentratius en humans. Selectivitat i especificitat de substrat dels transportadors humans hCNT1, hCNT2 i hCNT3. Valors de K_M determinats en línies cel·lulars^a i oòcits de *Xenopus laevis*^b. Adaptat de Pastor-Anglada et al. 2018.

2.1.2 Estructura dels CNTs

Les proteïnes humanes hCNT1, hCNT2 i hCNT3 estan formades per 650, 659 i 691 aminoàcids, respectivament (**Taula 1**) (Pastor-Anglada et al. 2008). Originalment es va proposar un model estructura de CNTs que consistia en 13 dominis transmembrana units per seqüències hidrofíliques curtes (< 22 residus) on l'extrem N-terminal seria intracel·lular i el C-terminal extracel·lular (Huang et al. 1994 i Hamilton et al. 2001).

No obstant, la recent cristal·lització de l'ortòleg procariota de *Vibrio cholerae* (vcCNT) (Johnson et al. 2012) va permetre definir més acuradament com seria l'estructura dels CNTs eucariotes, canviant la topologia predita de 13 dominis transmembrana a 11 dominis.

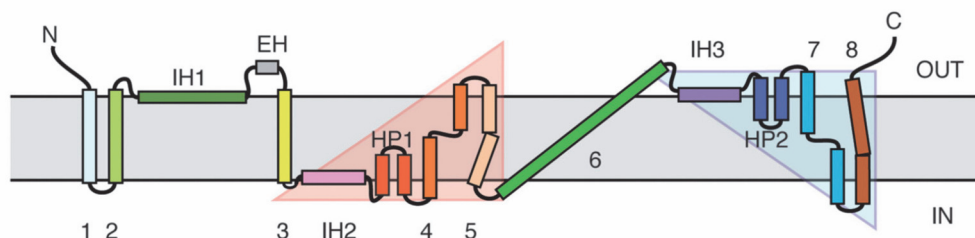


Figura 11. Topologia del transportador CNT de Vibrio cholerae. Representació esquemàtica de la topologia predita per cristal·lització de vcCNT. Font: Johnson et al. 2012

El transportador bacterià és homo-trimèric amb 8 dominis transmembrana, enlloc de 10 com es creia a l'inici. Aquest transportador presenta tres dominis paral·lels al pla de la membrana a la regió interfacial i dos *hairpins* (HP) en orientació oposada a la membrana (**Figura 11**). Els dominis transmembrana 4 i 7 són discontinus amb una regió desconeguda que els uneix (Johnson et al. 2012). De tal manera que si fem extensiu aquest model procariota als CNTs d'eucariotes podríem dir que els eucariotes presentarien 11 dominis transmembrana, sumatori dels 8 dominis de procariotes més tres dominis addicionals dels eucariotes, que no es troben presents a l'estructura dels CNTs procariotes (Craig et al. 1994).

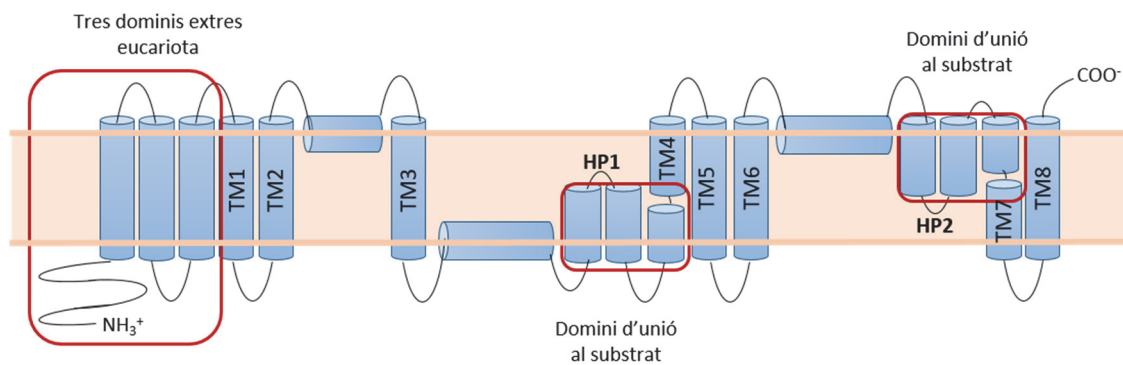


Figura 12. Model predit per l'estructura dels transportadors concentratius de nucleòsids. Aquest model està basat en el de vcCNT (Johnson et al. 2012).

Tenint en compte aquest nou model, els residus d'unió a uridina es trobarien localitzats als dominis HP1 i HP2 i a les regions dels dominis transmembrana 4 i 7. Mentre que, el domini HP1 juntament amb el domini transmembrana 4 serien els responsables del lloc d'unió a l'ió sodi. Pel que fa la localització del lloc d'unió al sodi addicional que ha d'estar present a hCNT3 fins al moment no havia estat identificat (Young et al. 2013). No obstant, el nostre grup de recerca ha obtingut un model estructural d'hCNT3 que ha permès identificar els residus responsables del segon lloc d'unió del sodi, verificats posteriorment per estudis mutagènics. Aquest model suggeriria que aquest segon lloc d'unió es trobaria proper a la cisteïna 602 i treonina 605, que distribuït en l'espai, quedaria pròxim al primer lloc d'unió del sodi (Arimany-Nardi et al. 2017). A més, aquest model explicaria la menor capacitat transportadora que presenta la variant polimòrfica hCNT3-Cys602Arg deguda a una alteració en el lloc d'unió del sodi (Errasti-Murugarren et al. 2008). En conjunt, aquests dos estudis seguirien que el residu de cisteïna 602 seria un dels aminoàcids responsables del segon lloc d'unió de l'ió sodi.

Cap estudi previ suggeria que els CNTs formessin estructures oligomèriques, no obstant, la cristal·lització de vcCNT ha demostrat que el transportador de *Vibrio cholerae* forma un trímer,

el qual té el lloc d'unió al substrat i a l'ió sodi clarament definit en cada un dels monòmers (Johnson et al. 2012). Dades estadístiques mostren que aproximadament el 65% de les proteïnes de membrana formen oligòmers (Forrest 2015). Entre les més de 50 famílies de SLC, moltes d'elles, com ara SLC1, SLC13 o SLC42, tenen membres de la família que formen estructures oligomèriques (Hediger et al. 2013). Un estudi recent ha demostrat dos punts clau respecte el transportador hCNT3: primer, que aquest té un plegament similar al seu homòleg vcCNT (39% d'homologia entre les seves seqüències) i segon, que hCNT3 trimeritza, tal i com està predit amb vcCNT. Segons l'estudi, cada monòmer conté els llocs d'unió al substrat i a l'ió sodi (Stecula et al. 2017). L'alineament de 883 seqüències homòlogues a hCNT3 mostren que el domini implicat en la trimerització està conservat evolutivament. A més, aquesta estructura quaternària crea una base aquosa que significativament redueix la distància de translocació del substrat, tot i que es necessiten més estudis per entendre la globalitat de les conseqüències funcionals d'aquesta trimerització (Stecula et al. 2017).

Les proteïnes homòlogues humanes dels transportadors concentratiu de nucleòsids han allargat l'extrem C-terminal el qual conté múltiples llocs de N-glicosilació, modificació que pot provocar canvis en l'activitat i/o localització de la proteïna. A més han ampliat l'extrem N-terminal afegint tres dominis transmembrana que suposa una cua d'entre 80-100 residus en proteïnes d'un total de 600 aminoàcids aproximadament. S'ha demostrat que aquest domini N-terminal no és essencial per la funció de transport ja que els ortòlegs procariotes no el tenen i quan es genera una proteïna truncada per aquest domini encara reté activitat transportadora (Hamilton et al. 2001). Tot i no ser essencials per la funció de transport, aquests tres dominis extra s'ha vist que són necessaris per realitzar altres funcions com la interacció intracel·lular amb altres proteïnes, la senyalització o el tràfic a membrana dels transportadors (Errasti-Murugarren et al. 2010a, Pinilla-Macua et al. 2012 i Huber-Ruano et al. 2010).

2.2 Transportadors equilibratius de nucleòsids (ENTs)

A diferència dels transportadors concentratius de nucleòsids, els sistemes de transport equilibratius ENT són transportadors que realitzen el transport de nucleòsids o dels anàlegs derivats de nucleòsids a favor de gradient de concentració a través de la membrana plasmàtica, la qual cosa els fa potencialment bidireccionals (**Figura 13**). Són independents de l'ió sodi i transporten tant purines com pirimidines (Rose and Coe 2008, Kong et al. 2004, Parkinson et al. 2011 i Dos Santos-Rodrigues et al. 2014). Aquesta família de transportadors es caracteritza per presentar afinitats i selectivitats baixes pels substrats amb uns valors de K_M dins del rang micromolar alt en comparació als transportadors concentratius.

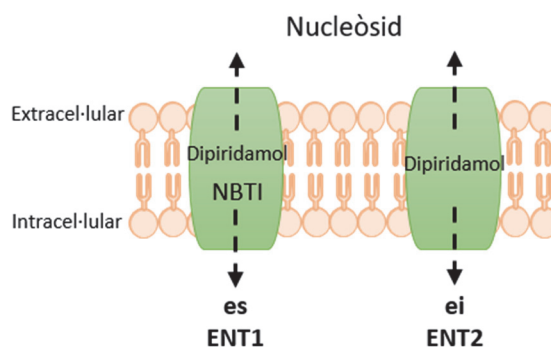


Figura 13. Esquema dels diferents sistemes de transport equilibratiu de nucleòsids. Els sistemes equilibratius tenen un transport bidireccional i independent de sodi. El transportador ENT1 (es) és sensible a concentracions de l'ordre de nanomolar de l'inhibidor NBTI i ENT2 (ei) que no s'inhibeix per NBTI, fins i tot a concentracions superiors a $1\mu\text{M}$. Ambdós transportadors es poden inhibir per dipiridamol.

2.2.1 Membres de la família *SLC29* en humans

La família gènica humana *SLC29* està composta per quatre membres: *SLC29A1*, *SLC29A2*, *SLC29A3* i *SLC29A4*, que codifiquen per les proteïnes hENT1, hENT2, hENT3 i hENT4, respectivament. Els dos membres millor caracteritzats són hENT1 i hENT2 amb una especificitat similar per les purines i pirimidines (Baldwin et al. 2004). hENT1 transporta un ampli rang de nucleòsids purínics i pirimidínics amb uns valors de K_M que oscil·len entre els $40\mu\text{M}$ (adenosina) als $580\mu\text{M}$ (citidina) (**Taula 2**). Mentre que la isoforma hENT2, transporta purines i pirimidines però amb una afinitat més baixa respecte hENT1 i addicionalment pot transportar nucleobases (Baldwin et al. 2004 i Yao et al. 2011). Recentment s'ha vist que ENT1 també pot translocar nucleobases, no obstant, amb una eficiència més baixa que ENT2 (Yao et al. 2011) (**Figura 14**).

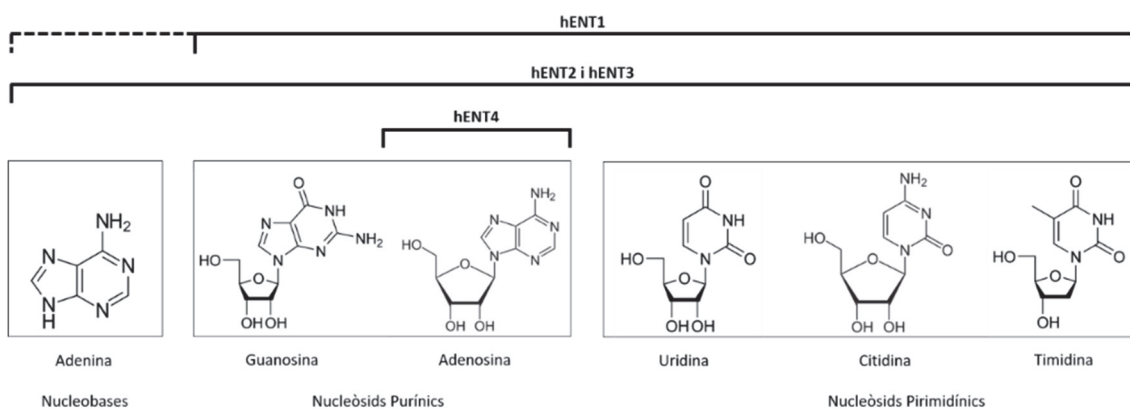


Figura 14. Representació de la selectivitat de substrat dels membres de la família gènica *SLC29*. Adaptat de Parkinson et al. 2011.

La isoforma hENT3 es diferencia de les isoformes 1 i 2 perquè no es localitza a la membrana plasmàtica, sinó que presenta un extrem N-terminal hidrofílic molt llarg (51 residus) que conté

Introducció

seqüències diana per la seva localització a la membrana mitocondrial i lisosomal. És un transportador amb una àmplia selectivitat de substrat, tant de purines com de pirimidines, així com de la nucleobase adenina i alguns dels fàrmacs derivats de nucleòsids. A diferència d'hENT1 i 2, el transport mediat per hENT3 és fortament potenciat en un pH àcid, suggerint que aquest transportador pot estar acoblat als H⁺. Probablement aquest transportador té un paper en l'alliberament dels nucleòsids i les nucleobases produït pel trencament dels àcids nucleics a l'interior dels lisosomes (Baldwin et al. 2005) o en la captació dels nucleòsids a l'interior mitocondrial (Govindarajan et al. 2009).

Per últim, hENT4 també és conegut com PMAT, en anglès *Plasma Membrane Monoamine Transporter*, presenta poca homologia respecte els altres membres de la família. És un transportador dependent del pH i independent de sodi que principalment transporta cations orgànics i neurotransmissors, fet que fa que hENT4 estigui més proper als OCTs (Transportadors de Cations Orgànics) que als ENTs en termes de selectivitat de substrat (Engel and Wang 2005) (Engel et al. 2004), tot i que recentment s'ha demostrat que sota condicions de pH àcid, tant hENT4 com mENT4, poden comportar-se com a transportadors d'adenosina (Barnes et al. 2006) (Zhou et al. 2010).

Històricament, els membres d'aquesta família s'han classificat segons la seva sensibilitat a l'inhibidor anàleg estructural de l'adenosina, nitrobenziltionosina (NBTI) (Griffith and Jarvis 1996). El transportador hENT1 és el subtipus de transportador equilibratiu sensible a NBTI (es) a concentracions de l'ordre de nanomolar (K_i 0.1-10nM), mentre que hENT2 és el subtipus equilibratiu insensible a NBTI (ei) a aquestes concentracions nanomolars però sí que s'arriba a inhibir a concentracions majors de 10µM (Ward et al. 2000, Crawford et al. 1998, Griffiths et al. 1997 i Kong et al. 2004). A més a més, en humans, ambdós transportadors poden ser inhibits per fàrmacs vasodilatadors coronaris com ara dipiridamol, un potenciador de la vasodilatació on hENT1 és més sensible que hENT2 (Visser et al. 2002), dilazep o draflazina. Mentre que hENT3 és més resistent a la inhibició per NBTI i vasodilatadors coronaris que hENT1 i hENT4 no és inhibit per NBTI i només és parcialment inhibit per elevades concentracions de dipiridamol i dilazep (Barnes et al. 2006). Contràriament, els sistemes equilibratius de rata són insensibles a la inhibició amb aquests fàrmacs vasodilatadors, mentre que en ratolí la sensibilitat és intermèdia (Griffith and Jarvis 1996, Yao et al. 1997 i Hammond 2000).

Transportador	CARACTERÍSTIQUES MOLECULARS		CARACTERÍSTIQUES CINÈTIQUES			
	Gen	Proteïna	Substrat (K_M)	Inhibidor		
hENT1	SLC29A1 6p21.1-p21.2	456aa	nucleòsids	Adenosina (40 μ M ^a)	NBTI (0.4nM) Dipiridamol (5nM)	
				Guanosina (140 μ M ^a)		
				Inosina (170 μ M ^a)		
				Uridina (240 μ M ^b)		
				Timidina (300 μ M ^a)		
			Citidina (580 μ M ^a)			
			nucleobases	Hipoxantina (6000 μ M ^b)		
				Adenina (3200 μ M ^b)		
				Timina (6300 μ M ^b)		
				Uracil		
Guanina						
hENT2	SLC29A2 11q13	456aa	nucleòsids	Inosina (50 μ M ^a)	NBTI (2.8 μ M) Dipiridamol (356nM)	
				Adenosina (140 μ M ^a)		
				Uridina (200 μ M ^b)		
				Timidina (710 μ M ^a)		
				Guanosina (2700 μ M ^a)		
			Citidina (5610 μ M ^a)			
			nucleobases	Hipoxantina (700 μ M ^b)		
				Adenina (1100 μ M ^b)		
				Timina (1700 μ M ^b)		
				Uracil (2600 μ M ^b)		
Guanina						
hENT3	SLC29A3	475aa	nucleòsids	Inosina	NBTI (2.8 μ M) Dipiridamol (356nM)	
				Adenosina (1900 μ M ^a)		
				Uridina (2000 μ M ^b)		
				Timidina		
				Guanosina		
			Citidina			
			nucleobases	Adenina		
hENT4	SLC29A4	530aa	nucleòsids	Adenosina (780 μ M ^a)		

Taula 2. Característiques moleculars i cinètiques dels transportadors equilibratius en humans. Selectivitat i especificitat de substrat dels transportadors humans hENT1, hENT2, hENT3i hENT4. Valors de K_M determinats en línies cel·lulars^a i oòcits de *Xenopus laevis*^b. Adaptat de Pastor-Anglada et al. 2018.

2.2.2 Estructura dels ENTs

Els transportadors equilibratius de nucleòsids estan formats per 11 dominis transmembrana amb l'extrem N-terminal citoplasmàtic i el C-terminal extracel·lular (Sundaram et al. 2001a). Els dominis transmembrana 1 i 2 estan units per un llaç extracel·lular, mentre que els dominis 6 i 7 estan connectats amb un llaç hidrofílic, intracel·lular i molt més gran (Sundaram et al. 1998) (**Figura 15**).

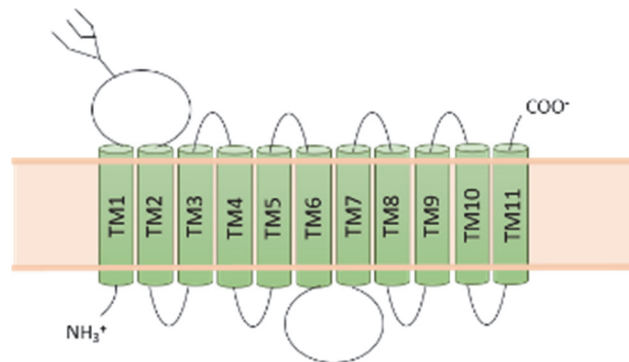


Figura 15. Model predit per l'estructura dels transportadors equilibratius de nucleòsids. Adaptat de Dos Santos-Rodrigues et al. 2014.

La proteïna hENT1 presenta un lloc de N-glicosilació al llaç extracel·lular entre els dominis transmembrana 1 i 2, mentre que hENT2 en conté dos al mateix llaç els quals no són essencials per a l'activitat del transportador (Vickers et al. 1999 i Ward et al. 2003). Però un treball recent ha confirmat que l'eliminació del residu glicosilable N48 afecta la funcionalitat d'hENT1, contradient d'aquesta manera els estudis esmentats anteriorment (Bicket and Coe 2016). Aquesta diferència de resultats pot venir causada per la glicosilació promiscua que és conegut que succeeix en models de llevat, model utilitzat al treball de Vickers et al. 1999. Pel que fa als altres membres de la família, hENT3 i hENT4, també tenen llocs potencialment glicosilables al llaç entre els dominis transmembrana 1 i 2 (Baldwin et al. 2005) i a la regió C-terminal de la proteïna (Barnes et al. 2006), respectivament. Estudis quimèrics amb proteïnes ENTs de rata i humanes han demostrat que les regions entre els dominis transmembrana 3 i 6 contenen residus responsables per la sensibilitat o resistència a NBTI (Sundaram et al. 2001b) i a alguns dels vasodilatadors coronaris (Sundaram et al. 1998). De forma similar, els dominis transmembrana compresos entre l'1 i el 6 tenen un paper clau en el transport dels 3'-deoxinucleòsids (Yao et al. 2001a) en el transportador ENT2 tant de rata com humà, mentre que els dominis transmembrana 5 i 6 estan implicats en el transport de les nucleobases (Yao et al. 2002). Actualment no s'ha aconseguit encara la cristal·lització dels ENTs, encara que s'han fet models tridimensionals d'aquestes proteïnes humanes (Parkinson et al. 2011 i Valdés et al. 2014). Aquestes investigacions amb les quimeres, juntament amb estudis amb diversos mutants d'ENTs

de mamífers, nemàtodes i protozous permeten indicar que els dominis transmembrana 1, 2, 4, 5, 8 i 11 s'agrupen entorn al lloc d'unió del substrat (Hyde et al. 2001, Yao et al. 2001b, SenGupta et al. 2002, Visser et al. 2002, Endres et al. 2004, Arastu-Kapur et al. 2005 i Endres and Unadkat 2005).

2.3 Distribució tissular dels transportadors de nucleòsids

2.3.1 Transportadors equilibratius de nucleòsids

Els transportadors de tipus equilibratiu, i en particular ENT1, presenten una distribució ubiqua, encara que existeix una gran variabilitat entre els diferents teixits pel que fa a l'abundància (Griffith and Jarvis 1996). S'han descrit nivells elevats d'expressió de mRNA o de proteïna en placenta, eritròcits, cervell, cor, fetge, pulmó i colon, entre d'altres (Jennings et al. 2001, Pennycooke et al. 2001). La isoforma ENT1 es pot localitzar intracel·lularment a la membrana nuclear, al reticle endoplasmàtic (Mani et al. 1998) i al mitocondri (Lai et al. 2004b). No obstant, en la majoria de situacions ENT1 i ENT2 són expressats predominantment a la part basolateral de la membrana plasmàtica de les moltes cèl·lules epitelials polaritzades.

La isoforma ENT3 també és expressada en molts teixits, encara que és particularment abundant en placenta. A diferència d'hENT1 i hENT2, hENT3 té una localització majoritàriament intracel·lular, concretament, la seva expressió co-localitza amb marcadors de la membrana lisosomal (Baldwin et al. 2005).

Per últim, hENT4 és abundant al cor, concretament a la membrana ventricular dels miòcits i de les cèl·lules endotelials vasculares. A més de tenir un rol en el transport de la serotonina al cor, s'ha vist que pot contribuir a la regulació extracel·lular de l'adenosina, particularment sota condicions àcídiques associades a la isquèmia (Barnes et al. 2006).

2.3.2 Transportadors concentratius de nucleòsids

A diferència dels transportadors equilibratius, els concentratius no es troben tant àmpliament distribuïts. El transportador concentratiu CNT1 es troba a fetge (Felipe et al. 1998) i ronyó, i en menor mesura a l'intestí prim (Ngo et al. 2000), cor, pulmó, teixit adipós marró i pàncrees. El transportador CNT2 presenta una distribució més àmplia respecte a CNT1, i també s'ha trobat a cor, ronyó, fetge, placenta i pàncrees amb nivells d'expressió variables. En canvi el perfil d'expressió de CNT2 és més similar entre múscul esquelètic i cervell (Che et al. 1995 i Ritzel et al. 1998). Els limfòcits B presenten activitat CNT2 (Soler et al. 1998), i les proteïnes CNT1 i CNT2 han sigut detectades en macròfags de medul·la òssia en ratolins (Soler et al. 2001a i Soler et al.

2001b). Respecte el transportador CNT3, el seu mRNA s'ha detectat en glàndula mamària, pàncrees, medul·la òssia i ronyó, i en menor mesura a l'intestí, fetge, pulmó, placenta, cervell i cor entre d'altres (Ritzel et al. 2001).

La importància fisiològica dels transportadors concentratius és fa patent en els teixits epitelials renal i intestinal (**Figura 16**). L'anàlisi de l'expressió de mRNA en aquests teixits mostra que CNT1 i CNT3 són més abundants al ronyó, mentre que CNT2 es troba 20 cops més expressat que la resta de transportadors a l'intestí (Shin et al. 2003).

A més, els transportadors CNTs també són expressats a cèl·lules no epitelials com ara els macròfags de medul·la òssia de ratolins (Soler et al. 2001a i Soler et al. 2001b) i limfòcits B (Soler et al. 1998). L'expressió de hENT1, hENT2, hCNT2 i hCNT3 també s'ha detectat a cèl·lules de Leucèmia Limfàtica Crònica (LLC), tot i que la funció d'hCNT3 és molt baixa (Molina-Arcas et al. 2003). En cèl·lules T limfocítiques primàries hi trobem hENTs i hCNT2, mentre que en cèl·lules dendrítiques derivades de monòcits expressen bàsicament hCNT3 (Minuesa et al. 2008).

2.3.3 Implicacions funcionals de la distribució cel·lular dels ENTs i CNTs

Encara no hi ha una resposta clara a la pregunta de perquè moltes cèl·lules de mamífer co-expressen transportadors de nucleòsids, si en molts dels casos aquestes proteïnes mostren un solapament o una selectivitat idèntica pel substrat. No obstant, les cèl·lules epitelials poden ser una excepció ja que hi ha evidències que demostren que la co-expressió de CNTs i ENTs a diferents dominis polaritzats de la cèl·lula poden ser la base per facilitar un flux vectorial de nucleòsids a través de les barreres epitelials. Per generar aquest flux vectorial, les cèl·lules epitelials expressen els transportadors de nucleòsids de forma diferencial, sovint amb els transportadors de tipus concentratiu a la membrana apical i els equilibratius a la basolateral (Mangravite et al. 2001 i Mangravite et al. 2003). Això permet a la cèl·lula crear una absorció i/o reabsorció activa dels diferents soluts, d'entre els quals es troben els nucleòsids provinents de la dieta o els anàlegs de nucleòsids que utilitzen aquest sistema per entrar o sortir de l'organisme (Van Aabel et al. 2000 i Pastor-Anglada et al. 2007).

Tal i com es pot observar a la **Figura 16**, aquesta distribució asimètrica dels transportadors de nucleòsids en cèl·lules polaritzades, pot diferir entre les diferents barreres epitelials. En cèl·lules renals i enteròcits es presenta la distribució que hem comentat, els transportadors concentratius a la membrana apical i els equilibratius a la basolateral (Errasti-Murugarren et al. 2007 i Lai et al. 2002). Però hi ha una clara excepció d'aquest model apical/basal que és el fetge. Probablement perquè és la font de nucleòsids més important de l'organisme i això fa que els

hepatòcits regulin la concentració de nucleòsids captant l'excés d'aquests o repartint-los als teixits que ho requereixin.

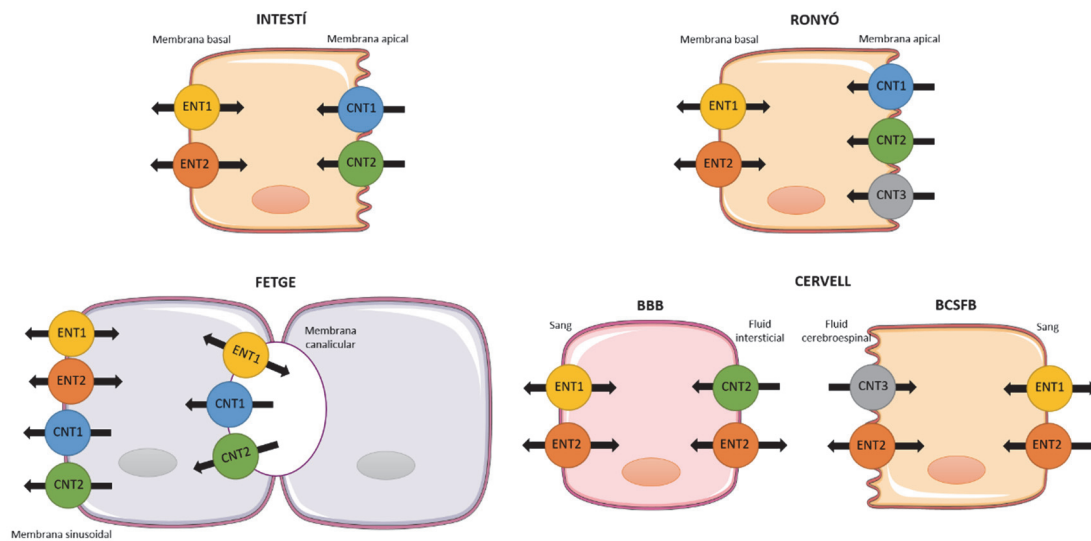


Figura 16. Distribució tissular dels transportadors equilibratius i concentratius de nucleòsids. Distribució dels transportadors hCNTs i hENTs als epitelis polaritzats intestí, ronyó i fetge. Adaptació de Young et al. 2013.

En l'hepatòcit els transportadors hCNT1 i hCNT2 es troben a la membrana sinusoidal facilitant l'absorció dels nucleòsids aportats per la vena porta, a més dels equilibratius hENT1 i hENT2 que faciliten l'entrada o sortida dels substrats en funció de les concentracions intra i extracel·lulars (Govindarajan et al. 2008). A la membrana canalicular, que està en contacte amb el canalicle biliar, es troben CNT1 i CNT2 per absorbir els nucleòsids provinents de l'acció de les ectonucleotidases (enzims de la membrana plasmàtica que s'encarreguen de degradar els nucleòtids a nucleòsids). A més, tal i com s'observa a la **Figura 16** també s'expressa ENT1, evidenciant un cop més la importància dels mecanismes de recuperació i alliberació de nucleòsids en el fetge (Duflot et al. 2002). En el cas de la barrera hematoencefàlica, hCNT2 sembla que sigui el transportador concentratiu més abundant (Cansev 2006 i Li et al. 2001), mentre que hCNT1 és l'únic CNT que s'expressa a cèl·lules de sincitiotrofo blasts de placenta juntament amb els ENTs a les dues membranes cel·lulars (Errasti-Murugarren et al. 2011).

Allà on els transportadors de nucleòsids també són especialment importants és al cervell, ja que el sistema nerviós central (SNC) té molt poca capacitat per la síntesi *de novo* de purines i pirimidines i per tant, requereixen de la via de reciclatge de nucleòsids (Parkinson et al. 2011). Les cèl·lules endotelials que formen la barrera hematoencefàlica (BHE) i la barrera del líquid cefaloraquídic (BCSFB) representen les principals interfases entre el SNC i la circulació perifèrica, i ambdues contribueixen a l'homeòstasi de nucleòsids i nucleobases al SNC (Parkinson et al. 2011). Aquestes cèl·lules presenten múltiples transportadors de nucleòsids a les seves

membranes i un flux bidireccional entre aquestes dues barreres tal i com es mostra a la **Figura 16** (Parkinson et al. 2011).

2.4 Variabilitat genètica dels transportadors de nucleòsids

En comparació a altres gens que codifiquen per proteïnes transportadores, ni la família *SLC28* ni la *SLC29* semblen ser altament polimòrfiques en humans (Errasti-Murugarren and Pastor-Anglada 2010).

2.4.1 Família gènica *SLC28*

Encara que els transportadors de tipus concentratiu no sembla que siguin molt variables a nivell genètic, s'han identificat alguns polimorfismes que poden tenir una rellevància clínica (Errasti-Murugarren and Pastor-Anglada 2010).

Pel que fa a hCNT1, s'han identificat un total de 58 SNPs, 32 dels quals es troben a la regió no codificant del gen (Gray et al. 2004b). Les 26 variants restants, 13 són mutacions no sinònimes, dues de les quals codifiquen per una proteïna no funcional a nivell de transport. La primera és hCNT1-Ser546Pro, una variant que resulta en un canvi d'una serina conservada evolutivament a una prolina al domini transmembrana 12. La segona és hCNT1-1153del, que codifica per una proteïna truncada amb una deleció després del domini transmembrana 8 (Gray et al. 2004b). Altres variants, tot i ser funcionals, exhibeixen canvis en la capacitat de transport de timidina. Per exemple, hCNT1-Leu635Val presenta una capacitat de transport de timidina disminuïda, mentre que hCNT1-Val189Ile i -Asp521Asn presenten un augment del transport de timidina mediat per hCNT1 (Gray et al. 2004b). A més, la variant hCNT1-Val189Ile està associada a una major biodisponibilitat per la mizoribina, un immuno-supressor utilitzat en pacients que han rebut un transplantament de ronyó (Naito et al. 2009). La variant Asp521Asn, s'ha associat a una major risc de toxicitat hematològica en el carcinoma pulmonar no microcític (NSCLC) en pacients tractats amb gemcitabina (Soo et al. 2009). Destacar que, recentment s'ha presentat un cas clínic d'un pacient amb uridina-citidinúria, febre, hepatoesplenomegàlia, acidosis làctica persistent, funció hepàtica compromesa i posterior fallida multiorgànica. En un anàlisi genòmic dels gens relacionats amb el metabolisme de pirimidines es va identificar un polimorfisme de freqüència molt baixa (hCNT1-R510C) i una mutació no descrita anteriorment (hCNT1-R561Q) al gen *SLC28A1*. S'ha pogut demostrar que aquestes variants del transportador d'hCNT1 presenten una menor taxa de transport respecte el *wild type* i el doble mutant no presenta transport ni tampoc localitza a membrana plasmàtica. Aquests resultats estan basats en un únic pacient, per tant, no es pot concloure que aquestes mutacions siguin la causa d'aquest conjunt de símptomes. No

obstant, s'haurien generat les primeres evidències que alteracions en el transportador concentratiu d'hCNT1 podrien ser responsables parcials o totals d'una patologia (Pérez-Torras, Mata-Ventosa et al. 2018-pendent d'acceptar).

En relació a hCNT2, s'han identificat 10 SNPs a la regió codificant del gen, tot i que 6 eren mutacions no sinònimes, totes les variants són capaces de transportar guanosina (Owen et al. 2005). Les variants hCNT2-Phe355Ser, -Glu385Lys i -Met612Thr mostren una disminució en el transport d'uridina (Owen et al. 2005 i Li et al. 2007), que és consistent amb resultats previs (Loewen et al. 1999), indicant que el residu Phe355 pot estar involucrat en el reconeixement i especificitat del substrat. Curiosament, tot i que la gemcitabina no és substrat d'hCNT2, la variant hCNT2-Phe22Leu, que sembla que tingui una capacitat transportadora normal, s'ha associat a un millor prognòs en pacients de carcinoma de pulmó tractats amb aquest anàleg de nucleòsids (Soo et al. 2009). Recentment s'han identificat sis variants a la regió promotora del gen *SLC28A2* les quals afecten a l'activitat transcripcional del gen (Li et al. 2009 i Yee et al. 2009), encara que els seus efectes en l'activitat transportadora i la rellevància clínica són desconeguts.

Per hCNT3 també s'han identificat diverses variants, concretament 16 SNPs a la regió codificant del gen, 10 de les quals codifiquen per una seqüència alterada. Una d'elles, hCNT3-Gly367Arg, s'ha demostrat que provoca una disminució del 80-85% del transport de purines i de pirimidines (Badagnani et al. 2005). Recentment s'ha descrit una variant polimòrfica no sinònima amb una freqüència al·lèlica d'un 1% en la població caucàsica, concretament, hCNT3-Cys602Arg. Aquesta variant incorpora un residu aminoacídic amb càrrega al domini transmembrana 13 que afecta al lloc d'unió d'un dels ions sodi necessaris per la translocació de nucleòsids via hCNT3 (Errasti-Murugarren et al. 2008). De fet, la cisteïna 602 es troba en el segon lloc d'unió del sodi segons el nostre model estructural d'hCNT3 (Arimany-Nardi et al. 2017). A més, la localització d'aquesta variant hCNT3-Cys602Arg a lípid-rafts de membrana es troba alterada (Errasti-Murugarren et al. 2010b). Per altra banda, s'han identificat 16 noves variants, cinc de les quals en regions codificants. D'aquestes variants, tres són mutacions no sinònimes però resulten en proteïnes amb una cinètica i interaccions iòniques idèntiques a la proteïna hCNT3 de referència (Damaraju et al. 2005). Recentment, s'ha vist que la variant rs10868138G/rs56350726T (freqüència al·lèlica 0.74) està associada a la protecció davant anèmia hemolítica en pacients amb hepatitis C crònica sota el tractament amb ribavirina (Doehring et al. 2011).

Comparant totes les seqüències dels transportadors concentratius de nucleòsids, es pot veure que, mentre que hCNT1 presenta la variabilitat genètica i funcional més gran, hCNT3 mostra

menor diversitat genètica. Aquests resultats suggereixen que hCNT3 pot tenir un paper biològic més crític a la cèl·lula que els altres dos membres de la família *SLC28* (Badagnani et al. 2005). Si ens basem amb les propietats bioquímiques de cada transportador, hCNT1 pirimidínic preferent, hCNT2 purínic preferent i hCNT3 capaç de translocar ambdós tipus de nucleòsids, és lògic pensar que si mantenim hCNT3 intacte a la cèl·lula, aquest podrà incorporar tots els tipus de nucleòsids en el cas que hCNT1 o hCNT2 no puguin efectuar la seva funció.

2.4.2 Família gènica *SLC29*

Pel que fa la família de transportadors equilibratius, estudis farmacogenètics d'hENT1 no han permès identificar una rellevància clínica de les variacions interindividuais del gen que codifica per hENT1 (*SLC29A1*). Encara que, s'han identificat polimorfismes de nucleòtids simples (SNPs, en anglès *Single Nucleotide Polymorphisms*) a hENT1, dels quals no s'ha pogut demostrar que cap tingui unes conseqüències funcionals en el transport (Osato et al. 2003 i Kim et al. 2006). Tot i que hi ha diversos estudis que suggereixen que pot haver algun efecte a la cèl·lula segons la variant d'hENT1 que s'expressi. Per exemple, s'ha vist que dos SNPs d'hENT1 (-1050G>A i -1345C>) mostrarien un augment en la transcripció d'aquest gen (Myers et al. 2006), encara que, estudis *in vivo* on s'expressen aquestes variants, no es veu una diferència significativa en l'expressió del gen. A més, estudis recents semblen suggerir que segons la variant genètica de *SLC29A1* que presenti un pacient de Leucèmia Mieloide Aguda (AML) pot respondre més eficientment al tractament de gemcitabina (Kim et al. 2016). Tots aquests estudis comparteixen la idea que es necessiten més estudis per acabar de concloure que les variants genètiques d'hENT1 poden tenir un impacte funcional en la cèl·lula.

Pel que fa hENT2, s'han descrit 4 variants no sinònimes, totes elles, a excepció d'una, codifiquen per proteïnes funcionals. La variant no funcional, hENT2-845-846del, és una proteïna truncada. Les variants hENT2-Asp5Tyr i -551-556del, resulten en una disminució del transport de nucleòsids i d'anàlegs de nucleòsids respectivament. Mentre que la variant hENT2-Asn68Lys exhibeix un augment en el transport de guanosina (Owen et al. 2006). Recentment, però, s'han identificat dues variants d'ENT2 que estan presents la membrana nuclear. En condicions de proliferació cel·lular, aquestes variants es regulen positivament i es recluten a la membrana nuclear per tal que es transloquin nucleòsids al nucli i es pugui sintetitzar el DNA durant la replicació (Grañé-Boladeras et al. 2016).

Respecte als altres membres de la família gènica *SLC29*, tal i com hem comentat anteriorment, hENT3 és l'únic gen de la família *SLC29* que fins al moment ha estat directament implicat en

malalties humanes. Mutacions de pèrdua de funció a aquest gen provoca malalties com el síndrome H (Huber-Ruano et al. 2012), el síndrome PHID (*Pigmented Hypertrichosis with Insulin dependent Diabetes*) amb un fenotip molt similar a l'anterior (Spiegel et al. 2010). Tot i que hi ha controvèrsia sobre la localització subcel·lular d'aquest transportador (Baldwin et al. 2005 i Govindarajan et al. 2009), la probable localització mitocondrial d'hENT3 juntament amb la seva habilitat de translocar alguns fàrmacs que provoquen toxicitat mitocondrial (Govindarajan et al. 2009) dóna a entendre el perquè variacions a la seva seqüència afecta la funció de la proteïna. Hi ha un interès en caracteritzar funcionalment variants genètiques no sinònimes del gen *SLC29A3*, un objectiu que necessita estudis addicionals.

2.5 Mecanismes de regulació dels transportadors de nucleòsids

Amb les dades que es tenen fins al moment es pot dir que la família de transportadors equilibratius pot estar regulada mitjançant diversos processos transcripcionals i post-transcripcionals.

2.5.1 Regulació dels NTs a nivell gènic

El membre de la família ENT1 és el transportador del qual es coneixen més aspectes de la seva regulació transcripcional. Basat en les seqüències consens d'aquest transportador, la seva regulació transcripcional pot venir donada com a conseqüència de la unió de diversos factors de transcripció com CREB, GATA-1 i Sp-1 o MAZ i Sp-1 per mENT1 i hENT1, respectivament (Choi et al. 2000 i Abdulla and Coe 2007). Estudis suggereixen que, en una línia cel·lular leucèmica de ratolí, la via JNK-cJun regula negativament l'expressió de mENT1, i descriuen que podria ser el mecanisme pel qual apareix una resistència al tractament amb anàlegs de nucleòsids (Leisewitz et al. 2011) i que l'activació o sobreexpressió de PPAR α i γ indueix un augment del transport dependent d'ENT1 (Montero et al. 2012). No obstant, el significat fisiològic d'aquests reguladors transcripcionals no és clar, a excepció de la relació entre la senyalització de l'adenosina i l'expressió d'ENTs, que sí que hi ha un sentit fisiològic demostrat. Al cervell i al cor, els promotors d'ENT1 i ENT2 veuen disminuïda la seva expressió per HIF-1 (de l'anglès, *Hypoxia Inducible Factor 1*) (Chu et al. 2013, Eltzhig et al 2005 i Morote-Garcia et al. 2009), i aquesta regulació, que disminueix el nombre de transportadors equilibratius a la membrana plasmàtica, provoca un augment de l'adenosina extracel·lular, la qual promou un efecte protector mitjançant els receptors d'adenosina (Chaudary et al. 2004a i b, Eltzhig et al 2005 i Löffler et al. 2007). També hi ha evidències que demostren que els ENTs estan regulats transcripcionalment en altres situacions fisiològiques, com per exemple a la placenta, on l'expressió dels ENTs es regula de

Introducció

manera diferent ja que nivells alts de glucosa redueixen l'activitat promotora del gen *SLC29A1* a través de la via dependent de MAP cinasa (Puebla et al. 2008).

En referència a la família de transportadors concentratius se sap que múltiples factors, incloent cicle cel·lular (Valdés et al. 2002), insulina (Podgorska et al. 2007), àcids biliars i citocines (Klein et al. 2009) regulen l'expressió de CNT1 i CNT2 en humans i altres cèl·lules de mamífers. De fet, s'ha identificat en cèl·lules parenquimals de fetge a TNF- α com un modulador molt important del transportador de tipus concentratiu CNT1 i s'ha suggerit un paper secundari per la interleucina 6 (IL-6) en l'augment de l'expressió de CNT1 (Fernández-Veledo et al. 2004). En canvi, CNT2 no és sensible a cap d'aquests agents, no obstant, és altament regulat per la citocina pro-apoptòtica TGF- β 1, mitjançant una activació transcripcional del seu gen, *SLC28A2* (Valdés et al. 2006), evidenciant així una diferent regulació d'ambdós transportadors. S'ha vist també, que l'expressió de CNT1 i sobretot CNT2 es veu incrementada en macròfags davant d'estímuls com lipopolisacàrids (LPS) o l'interferó-gamma (IFN- γ) (Soler et al. 2001a, Soler et al. 2001b i Soler et al. 2003).

Una nova àrea d'interès per la regulació transcripcional d'aquests gens són els microRNAs (miRNAs), un tipus de RNA no codificant format entre 21 i 24 nucleòtids que regularia l'expressió dels gens mitjançant el silenciament del mRNA de la proteïna a la qual va dirigit. S'han descrit més d'un miler de miRNAs (Kozomara and Griffiths-Jones 2011). Aquest és un camp molt innovador que és necessari seguir estudiant, tot i així, resultats obtinguts a partir de bases de dades suggereixen que, potencialment hi ha més miRNAs identificats per ENT2 que per ENT1, possiblement suggerint que ENT2 està més regulat pels miRNA (Dos Santos-Rodrigues et al. 2014). Actualment, en el nostre grup de recerca també s'està estudiant en aquesta línia per intentar trobar una nova regulació dels hCNTs mitjançant els miRNAs. Resultats preliminars del grup semblarien proposar el miRNA106a com un candidat per la regulació transcripcional del gen *SLC28A1*, ja que el silenciament de l'expressió d'aquest miRNA provoca un augment dels nivells del mRNA d'hCNT1 (dades no publicades del grup).

En resum, tota aquesta informació ens porta a pensar que cada família de transportadors de nucleòsids, i fins i tot cada membre, tenen una funcionalitat diferent dins la cèl·lula ja que cadascun està regulat de manera específica.

2.5.2 Regulació dels NTs a nivell proteic

A part de totes les regulacions genètiques anteriorment descrites, els transportadors també poden patir modificacions post-traduccionals, és a dir, modificacions un cop la proteïna s'ha sintetitzat. Pel que fa la família dels transportadors equilibratius, s'ha vist que el membre de la família ENT1 pot ser fosforilat en el *loop* intracel·lular entre els dominis transmembrana 6 i 7 per les cinases PKC i PKA (Reyes et al. 2011) i per CK2 en ratolí (Bone et al. 2007). Menys és sabut per ENT2, del qual es coneix que també té els possibles llocs de fosforilació per les mateixes quinases a la seva seqüència (Blom et al. 2004). Addicionalment a la fosforilació, la glicosilació també regula la funció d'aquests transportadors. Tant ENT1 com ENT2 posseeixen llocs de glicosilació. Aquestes modificacions afecten el transport i l'afinitat dels nucleòsids, en el cas d'ENT1 (Vickers et al. 1999, Sundaram et al. 2001b i Ward et al. 2003), mentre que l'absència de glicosilació a ENT2, dóna lloc a una afectació en la proteïna que l'impedeix el correcte ordenament a la membrana plasmàtica (Ward et al. 2003). Al transportador ENT2 també s'ha descrit un fenomen d'*splicing* alternatiu, a través del qual es generen dues variants del transportador, les quals han estat descrites a l'apartat 2.4.2 de la introducció (Grañé-Boladeras et al. 2016).

En referència als transportadors de tipus concentratiu, s'ha pogut demostrar que la proteïna RS1, modula (entre d'altres funcions cel·lulars) la localització de transportadors a la membrana, actuant com un inhibidor de la seva exocitosi (Veyhl et al. 2006 i Vernaleken et al. 2007). A més, també regula negativament i probablement de manera coordinada la localització i l'activitat a la membrana plasmàtica dels tres membres de la família de transportadors concentratius (Errasti-Murugarren et al. 2012).

L'única variant d'*splicing* descrita fins al moment de la família de transportadors concentratius és CNT3ins, que codificaria per a una proteïna que li manquen 69 aminoàcids de l'extrem N-terminal. Aquesta variant queda retinguda al reticle endoplasmàtic on mostra el transport característic per CNT3 en un model polaritzat com són les cèl·lules MDCK (cèl·lules epitelials de ronyó canines) i que presenta un temps de vida molt més curt en comparació a la variant de referència (Errasti-Murugarren et al. 2009). En aquest estudi s'evidencia que existeix una regulació de la degradació proteica d'hCNT3, fenomen que, tot i no estar demostrat en altres transportadors, pot ser que també succeeixi. Aquest aspecte és important ja que l'expressió dels transportadors de nucleòsids és un factor clau per l'assequibilitat de molts fàrmacs (Molina-Arcas et al. 2008). Per exemple, per hCNT3 s'ha vist que l'àcid trans-retinoic (ATRA) incrementa l'activitat del transportador hCNT3 augmentant el seu tràfic cap a la membrana plasmàtica en

Introducció

un model de leucèmia limfàtica crònica (LLC), la línia cel·lular MEC1. Aquest mecanisme és mediat per l'acció de TGF- β 1, el gen del qual és transcripcionalment activat per ATRA d'una manera dependent de p38. TGF- β 1 actua de manera autocrina i paracrina a través de l'activació d'ERK1/2 i de la GTPasa RhoA per tal de promoure el tràfic del transportador a la membrana (Fernández-Calotti and Pastor-Anglada 2010) (**Figura 17**).

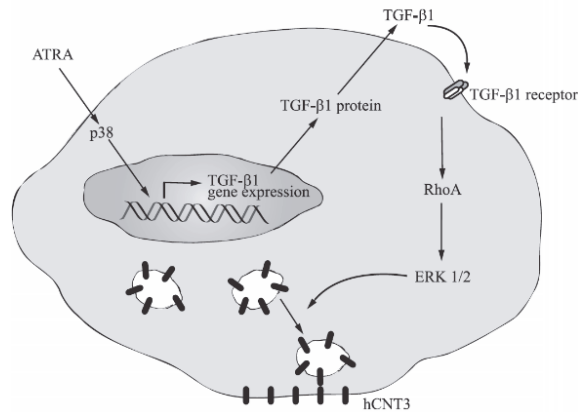


Figura 17. Mecanisme proposat en el qual ATRA augmentaria l'activitat del transportador hCNT3. Model per l'activació post-transcripcional de l'activitat d'hCNT3. El tractament d'ATRA augmenta la fosforilació de p38, la seva activació porta a un augment de l'expressió del mRNA de TGF- β 1 i la secreció de la proteïna. Aquesta induïx l'activació de RhoA, que alhora activa el seu efector, p160ROCK, que és necessari per l'activació de la quinasa ERK1/2. L'activació d'ERK1/2 està relacionat amb el ràpid increment del transportador hCNT3 a la membrana plasmàtica, el qual és l'últim responsable de l'augment observat de l'activitat d'hCNT3. Font: Fernández-Calotti and Pastor-Anglada 2010.

Existeix una població de pacients de LLC resistent a la fludarabina, tractament utilitzat com a teràpia per aquest tipus de leucèmia, i amb una expressió intracel·lular d'hCNT3 elevada sense que aquest mostri una activitat de transport detectable. Combinant aquests dos conceptes, es va avaluar l'efecte d'ATRA en el transportador hCNT3 de cèl·lules primàries de leucèmia limfàtica crònica i es va observar que es produïa una millora de la resposta del tractament basat en la fludarabina ja que el transportador responsable de captar el fàrmac es dirigia a membrana des del citosol gràcies a l'acció d'ATRA (Fernández-Calotti et al. 2012). Aquest fóra un exemple paradigmàtic de com es podria utilitzar la modulació fisiològica d'un transportador de fàrmacs per tal de millorar-ne la resposta terapèutica.

3 Implicació clínica dels transportadors de nucleòsids

3.1 Alteració de l'expressió dels NTs en cèl·lules tumorals

Els transportadors de nucleòsids, no només incorporen els nucleòsids naturals, sinó que també són capaços de translocar fàrmacs anàlegs de nucleòsids utilitzats en la teràpia contra el càncer. Fa anys que s'estudien aquests transportadors en el context d'aquesta malaltia i el paper que poden tenir en l'eficàcia dels diversos tractaments existents. El càncer representa una important condició fisiopatològica que requereix de nivells elevats anormals de nucleòsids per tal de poder dur a terme l'increment de síntesi de DNA associada a aquesta malaltia. Moltes cèl·lules expressen diversos membres de les famílies de transportadors de nucleòsids al mateix temps anticipant una mena de redundància, ja que molts transportadors presenten un solapament o, fins i tot, una idèntica selectivitat pel substrat (Pastor-Anglada and Pérez-Torras 2015). Els transportadors concentratius de nucleòsids, i hCNT1 en particular, són àmpliament detectats en epitelis, encara que la seva expressió sovint és baixa o fins i tot negligible en estadis indiferenciats, com s'ha descrit per les cèl·lules de criptes intestinals, hepatòcits fetals i tumors humans (Lane et al. 2010, Farré et al. 2004, Bhutia et al. 2011 i Govindarajan et al. 2007) (Gloeckner-Hofmann et al. 2006) (**Taula 3**). Tot i així, aquesta evidència de la pèrdua d'expressió d'hCNT1 durant l'oncogènesi necessita més investigació, ja que la majoria d'estudis realitzats s'han basat exclusivament en els nivells de mRNA d'hCNT1 (Pastor-Anglada and Pérez-Torras 2015).

No obstant, els transportadors equilibratius de nucleòsids es poden considerar ubics tot i que amb una variabilitat significativa pel que fa l'abundància a la que es troben a cada teixit (Lu et al. 2004). L'expressió d'ENT1 està majoritàriament vinculada a la proliferació cel·lular (Soler et al. 2001a i Aymerich et al. 2004). Conseqüentment, sembla ser que moltes cèl·lules tumorals depenen del transportador de baixa afinitat i àmplia selectivitat, ENT1, per tal de suplir la demanda de nucleòsids d'aquestes cèl·lules per la seva gran taxa de proliferació utilitzant la via de reciclatge.

Donat que els hCNTs es troben principalment en teixits diferenciats i polaritzats (Molina-Arcas et al. 2008 i Pastor-Anglada et al. 2008), podria ser que la pèrdua d'aquestes proteïnes s'associés a un fenotip més desdiferenciat i semblant al d'una cèl·lula tumoral. Per tant, potser són

Introducció

proteïnes, que a més de fer la seva funció clàssica de transportar nucleòsids i anàlegs de nucleòsids, podrien regular l'expressió gènica provocant canvis fenotípics dins la cèl·lula.

Transportador	Expressió	Càncer	Referència
hCNT1	Disminuïda	Pit	Lane et al. 2010
	Disminuïda		Bhutia et al. 2011
	Disminuïda	Pàncrees	Mohelnikova-Duchonova et al. 2013
	Disminuïda	Ovari	
	Disminuïda	Endometri	Farre et al. 2004
	Disminuïda	Cèrvix uterí	
	Disminuïda	Hepatocarcinoma	Zollner et al. 2005
	Disminuïda	Bufeta	Mey et al. 2006
hCNT3	Disminuïda	Pàncrees	Mohelnikova-Duchonova et al. 2013
hENT1	Disminuïda	Pit	Lane et al. 2010
	Disminuïda	Pàncrees	Mohelnikova-Duchonova et al. 2013

Taula 3. Expressió dels transportadors de nucleòsids en teixits tumorals. Taula adaptada de Pastor-Anglada and Pérez-Torras 2015.

3.2 Perfil farmacològic dels transportadors de nucleòsids

Els anàlegs de nucleòsids han sigut els primers agents quimioterapèutics utilitzats pel tractament d'algunes malalties. De fet, la recerca en anàlegs de purines i pirimidines va ser reconeguda amb el Premi Nobel de Fisiologia i Medicina l'any 1988 a Gertrude Elion i George Hitchings. Avui en dia la funció d'aquests anàlegs està ben establerta mostrant un ampli ventall en el seu ús clínic, des de la teràpia contra el càncer fins a malalties inflamatòries o infeccions virals. Per totes aquestes teràpies s'utilitzen tant anàlegs de nucleòsids de pirimidines com de purines i el seu mecanisme d'acció bàsic és similar a tots els anàlegs (Parker 2009).

L'entrada dels anàlegs de nucleòsids és un procés mediat que involucra als dos tipus de transportadors, als equilibratius i als concentratius. Un cop dins la cèl·lula, aquests són convertits en nucleòtids (sovint la forma activa del fàrmac) mitjançant enzims de la via metabòlica de purines i pirimidines, com ara la deoxicitidina cinasa (dCK), una enzim que permet la retenció del nucleòsid en forma de nucleòsid monofosfat. S'ha de tenir en compte que existeixen fosfatases, com la 5'-nucleotidasa, que poden catalitzar la defosforilació del nucleòsid, convertint-lo altre cop al nucleòsid original, perdent així la capacitat de retenció d'aquest a la cèl·lula i com a conseqüència perdent la seva acció farmacològica (Galmarini et al. 2001). Quan

els fàrmacs o anàlegs de nucleòsids són actius, és quan poden ser incorporats als àcids nucleics. En molts casos la seva incorporació al DNA provoca una inhibició dels enzims implicats en la síntesi del DNA, causant un dany i/o una inducció a l'apoptosi. Existeixen diferències selectives entre els diferents fàrmacs que sovint depenen de la capacitat d'interaccionar amb uns enzims o altres de la via de reciclatge dels nucleòsids (Pastor-Anglada and Pérez-Torras 2015 i Jordheim et al. 2013).

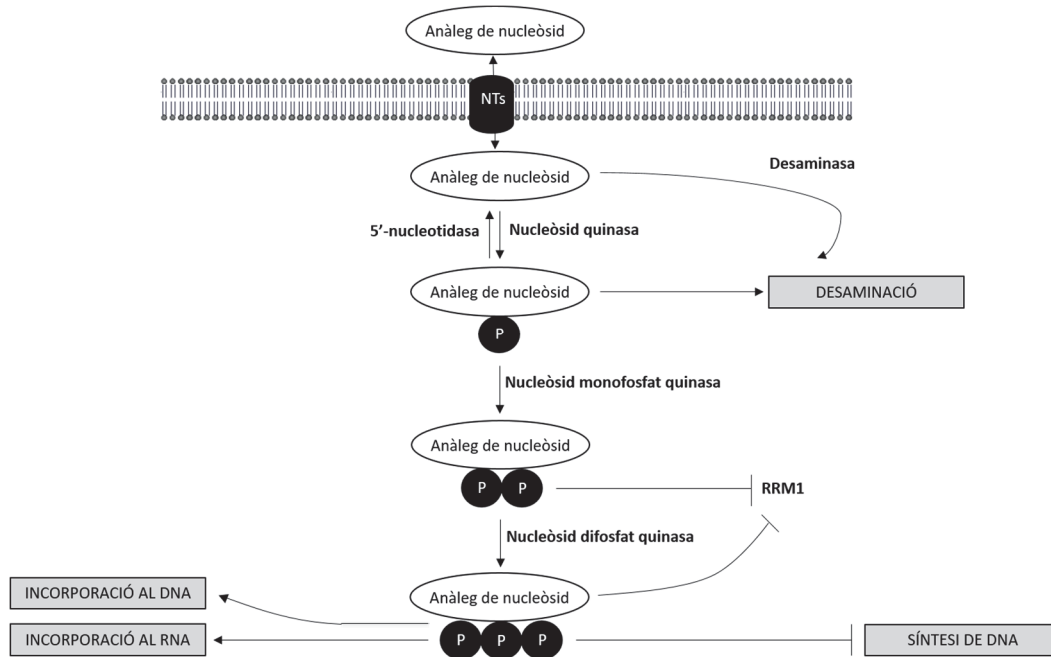


Figura 18. Mecanisme d'acció farmacològica dels anàlegs de nucleòsids. L'entrada dels anàlegs de nucleòsids és un procés actiu en el qual intervenen els transportadors de nucleòsids (NTs). Un cop dins la cèl·lula, l'anàleg de nucleòsid inicia un procés de fosforilació mitjançant una nucleòsids quinasa (enzim limitant de la via) que produeix el metabòlit monofosfat. Una segona fosforilació es produeix per una nucleòsids monofosfat quinasa i una tercera fosforilació per la nucleòsids difosfat quinasa. Els nucleòsids trifosfat es poden incorporar als àcids nucleics o poden inhibir la seva síntesi inhibint enzims claus com ara les polimerases. La ribonucleòtid reductasa M1 (RRM1), un enzim clau del metabolisme dels nucleòtids, pot ser inhibit pels anàlegs de nucleòsids difosfats o trifosfats. Enzims catabòlics redueixen la quantitat de metabòlits actius, com ara la 5'-nucleotidasa i les desaminases. Adaptat de Jordheim et al. 2013.

Fins la data, no hi ha estudis publicats que expliquin la causa d'aquesta pèrdua dels transportadors de nucleòsids en cèl·lules tumorals. No obstant, segueix sent un camp molt interessant per seguir fent recerca ja que la seva restauració podria ser una estratègia per poder millorar l'eficàcia dels fàrmacs anàlegs de nucleòsids utilitzats per la teràpia del càncer. Ja que a més a més, també ens hem d'enfrontar amb una altre problema com són els mecanismes de resistència que apareixen a aquests tipus de fàrmacs. Aquests mecanismes poden ser deguts a una captació insuficient de l'anàleg de nucleòsid o bé perquè hi ha una regulació negativa dels sistemes de transport que els capten o perquè la variant que s'està expressant en aquell context

cel·lular té una activitat o especificitat nul·la o més baixa pel fàrmac. No es pot oblidar tampoc el paper que tenen les bombes ABC, una família de proteïnes de membrana implicades en l'expulsió dels anàlegs un cop fosforilats (Errasti-Murugarren and Pastor-Anglada 2010). O fins i tot, aquesta resistència pot venir causada per una disminució dels enzims que activen els anàlegs de nucleòsids (cinases) o una elevada expressió d'aquells que els degraden o els desfosforilen (nucleotidases i fosfatases, respectivament) (Galmarini et al. 2001).

3.2.1 Anàlegs de nucleòsids en càncer

En general, podríem dir que els anàlegs purínics s'utilitzen per tractar malalties hematològiques, mentre que els pirimidínics típicament mostren eficàcia contra ambdós tipus de càncer, càncers de la sang o tumors sòlids (**Taula 4**). És important també, tenir en compte que els transportadors de nucleòsids presenten diferents afinitats pels anàlegs i la seva selectivitat pels substrats ha estat revisada anteriorment. Com s'espera, anàlegs de purina com la fludarabina, cladribina i clofarabina són substrats per hENT1, hENT2, hCNT2 i hCNT3 (Lang et al. 2001, Molina-Arcas et al. 2005, King KM et al. 2006, Owen et al. 2006 i Errasti-Murugarren and Pastor-Anglada 2010). Contràriament, anàlegs de pirimidines com ara la gemcitabina, citarabina i azacitidina són transportats per hCNT1, hENT1, hENT2 i hCNT3 (Mackey et al. 1999, Smith et al. 2004, Clarke et al. 2006, Endo et al. 2007, Errasti-Murugarren et al. 2007, Errasti-Murugarren and Pastor-Anglada 2010 i Arimany-Nardi et al. 2014). La 6-mercaptapurina (6-MP) o el 5-fluorouracil són dues nucleobases que s'ha vist que interaccionen amb hENT1 i hENT2, tot i que les constants d'afinitat es troben al rang de l'ordre de milimolar (Yao et al. 2011).

En concret, la 6-MP va ser un dels primers fàrmacs aprovats al 1953 per la FDA (*Food and Drug Administration*) pel tractament de la leucèmia infantil i a dia d'avui encara es considera un tractament estàndard i efectiu per aquesta malaltia (Parker 2009). Existeix una evidència de que el silenciament parcial del transportador concentratiu hCNT3 en cèl·lules T limfoblàstiques (MOLT-4) provoca una disminució de la captació de la 6-MP. Aquests resultats suggereixen, doncs, que la 6-MP seria substrat del transportador hCNT3 (Fotoohi et al. 2006).

Actualment, però, existeixen altres fàrmacs com ara alguns derivats de purines com la fludarabina (FA) i la cladribina (2-clorodeoxiadenosina o 2-CdA) que s'utilitzen pel tractament de malalties hematològiques (Molina-Arcas and Pastor Anglada, 2013). La clofarabina, un altre anàleg de nucleòsids, s'ha aprovat pel tractament de pacients resistents amb leucèmia limfoblàstica aguda i limfoma limfoblàstic. O l'acadesina, un nucleòsid soluble en aigua el qual presenta un mecanisme d'acció diferent en comparació als anàlegs de nucleòsids actualment aprovats. S'ha descrit que activaria en alguns casos la proteïna quinasa AMP, però també, podria

causar una situació d'inanició de pirimidines d'una manera independent d'AMPK (Bardeleben et al. 2013). S'han elaborat diversos assaigs clínics per avaluar l'ús de l'acadesina en el tractament de la LLC (Van Den Neste et al. 2013). Tot i així, encara no està aprovada per la FDA per cap tractament de cap neoplàsia hematològica.

Pel que fa als anàlegs de les pirimidines, actualment s'utilitzen pel tractament de neoplàsies hematològiques fàrmacs com l'azacitidina, decitabina, zebularina i citarabina (AraC) (Robak 2011).

Teràpia	Fàrmac	Anàleg	hCNT1	hCNT2	hCNT3	hENT1	hENT2
Malaltia limfoproliferativa	Mercaptopurina	Pu			S		S
	Citarabina	Pi	S	NT	S	S	S
	Fludarabina	Pu	NT	INH	S	S (107µM)	S
	Pentostatina	Pu					
	Cladribina	Pu	NT	S	S	S (23µM)	S
	Azacitidina	Pi	S (63µM)			S	
	Clofarabina	Pu	NS	S (81µM)	S (52µM)	S (108µM)	S (328µM)
	Nelarabina	Pu				S	S
	Decitabina	Pi					
Tumors sòlids	Floxuridina	Pi					
	Gemcitabina	Pi	S (42µM)	NS	S (60µM)	S (160µM)	S (740µM)
	Capecitabina	Pi	S (209µM)	S	S	S	S
	5-Fluorouracil	Pi				S	S

Taula 4. Anàlegs de nucleòsids utilitzats en la teràpia del càncer. S: substrat (la K_M s'especifica quan es coneix), NT: no transporta, INH: inhibeix, Pu: purines, Pi: pirimidines. Taula adaptada de Pastor-Anglada and Pérez-Torras 2015.

3.2.2 Anàlegs de nucleòsids en infeccions víriques

Durant les últimes dues dècades, els fàrmacs antivirals han esdevingut crucials pel tractament de diverses infeccions víriques com ara: Herpes Simple (HSV), Sida (VIH), Hepatitis B (VHB), Hepatitis C (VHC) i Citomegalovirus (CMV). Entre moltes de les teràpies que existeixen, els anàlegs de nucleòsids són un dels tipus més importants. Aquests actuen com agents antivirals potents a través de la seva capacitat d'inhibir les polimerases de DNA víriques i les transcriptases inverses, dos enzims clau en el cicle dels virus. Els nucleòsids antivirals són estructuralment més diversos que els anàlegs de nucleòsids utilitzats pel tractament del càncer, ja que pel tractament d'infeccions víriques existeixen tant nucleòsids, com nucleòtids o fins i tot, nucleòsids acíclics (De Clercq and Holý 2005). Aquest últim tipus de nucleòsids ha estat aprovat pel tractament de varies infeccions de virus de DNA (cidofovir), VHB (adefovir) i VIH (tenofovir) (Pastor-Anglada and Pérez-Torras 2015).

En general, els antivirals són menys eficientment translocats pels transportadors de nucleòsids ja que la principal diferència entre aquests i els anàlegs de nucleòsids utilitzats en càncer, és la falta del grup 3'-hidroxil del sucre en els nucleòsids anàlegs antivirals. Això confirma el fet que petites modificacions en l'estructura del fàrmac pot causar grans canvis en la seva transportabilitat. Alguns transportadors de nucleòsids i en particular hCNT3, però no exclusivament, poden transportar diferents fàrmacs antivirals, com la ribavirina o la zidovudina, entre d'altres (Hu et al. 2006 i Errasti-Murugarren et al. 2007). Alguns dels antivirals més comunament utilitzats es mostren a continuació (**Taula 5**):

Fàrmac	hCNT1	hCNT2	hCNT3	hENT1	hENT2
Zidovudina (AZT)	S (450µM)	NT	S (310Mm)	INH	S
Zalcitabina (ddC)	NT	NT	S	S	S (>7.5mM)
Didanosina (ddl)	NT	S	S	S	S (3mM)
Stavudina (d4T)	S (15.6mM)	NT	S	NT	
Lamivudina (3tC)	NT	NT		NT	
Ribavirina	NT	S (81µM)	S (52µM)	S (160µM)	S (328µM)

Taula 5. Anàlegs de nucleòsids utilitzats en teràpies antivirals. S: substrat (la K_M s'especifica quan es coneix) NT: no transporta INH: inhibeix Taula adaptada de Pastor-Anglada and Pérez-Torras 2015.

Cal tenir en compte que, a part del paper dels ENTs i CNTs en el transport de fàrmacs anti-virals també s'han identificat alguns membres de la família *SLC22*, família gènica que codifica pels transportadors orgànics de cations i anions (OCTs i OATs, respectivament) (Errasti-Murugarren

and Pastor-Anglada 2010). Per exemple, la Lamivudina o el Tenofovir són fàrmacs utilitzats per la infecció del VIH que travessen la membrana plasmàtica a través d'hOCT1, un dels membres de la família *SLC22* (Arimany-Nardi et al. 2016 i Minuesa et al. 2017). Per tant, també s'ha de tenir en compte la seva implicació a l'hora d'estudiar les vies d'entrades de fàrmacs derivats de nucleòsids.

3.2.3 Anàlegs de nucleòsids en malalties inflamatòries

Encara que una gran varietat de nous fàrmacs s'han introduït per la teràpia de les malalties inflamatòries intestinals (IBD, de l'anglès *Inflammatory Bowel Disease*), un tractament definitiu per aquestes malalties està fora de l'abast. La teràpia principal segueix sent un tractament amb antiinflamatoris per induir una remissió seguit d'una teràpia sostinguda amb immunosupressors. Les tiopurines, com la 6-mercaptapurina (6-MP) i el seu profàrmac azatiopurina (AZA), com també la tioguanina, han estat pilars pel tractament de pacients amb IBD, alteracions reumàtiques, problemes dermatològics i immunosupressió en transplantament d'òrgans (Sahasranaman et al. 2008 i Bär et al. 2013).

Les tiopurines són metabolitzades als seus productes finals, 6-metimercaptapurina (6-MMP) i tioguanina (6-TGN) i necessiten ser activades per la HGPRT. Encara que aquests nucleòtids alteren la correcta síntesi del DNA, no s'ha demostrat que siguin les úniques molècules responsables per dur a terme aquesta acció. No obstant, el seu rol immunosupressor sembla ser, en part, mediat per la inducció dels limfòcits a l'apoptosi. Existeix una preocupació respecte els efectes secundaris d'aquests tractaments, ja que s'ha vist que pacients amb una deficiència de l'enzim tiopurina S-metiltransferasa (TPMT), el qual catalitza la S-metilació d'aquests fàrmacs, tenen un risc elevat de patir excessiva toxicitat després de rebre les dosis estàndards de tiopurines (Sahasranaman et al. 2008). A més també s'ha proposat la tioguanina com una alternativa per superar aquests problemes de toxicitat, ja que no es metabolitza a 6-MMP, la qual és una de les responsables de l'hepatotoxicitat (Bär et al. 2013, Frei et al. 2013 i Fridman et al. 2014).

4 Altres cares dels transportadors de nucleòsids

4.1 Transportadors com a biomarcadors

La funció transportadora d'una cèl·lula es pot veure afectada per múltiples factors i pot esdevenir molt variable entre diversos individus (Nies et al. 2009, Sakamoto et al. 2013 i Prasad et al. 2014). Per això, l'heterogeneïtat existent en resposta a una mateixa teràpia pot estar relacionada amb la funció transportadora que cada pacient tingui segons el perfil de transportadors de nucleòsids que expressi. Diferències en l'expressió i funció dels transportadors entre individus i, potser més important, una expressió alterada degut a processos oncològics, infeccions virals o processos inflamatoris, poden modular el perfil de transportadors i conseqüentment determinar quina serà la disponibilitat i acció del fàrmac utilitzat. Per tant, els transportadors de nucleòsids són considerats bons candidats per ser biomarcadors de susceptibilitats a fàrmacs derivats de nucleòsids i de prognosi del tractament (Pastor-Anglada and Pérez-Torras 2015).

A data d'avui, molts estudis en tumors sòlids estan focalitzats en els nivells d'hENT1 i la resposta a la gemcitabina, bàsicament en el càncer de pàncrees. Evidències *in vitro* mostren que l'activitat d'hENT1 és un factor determinant per l'acció de la gemcitabina. Una sobreexpressió del transportador incrementa la resposta al fàrmac en cèl·lules de càncer de pàncrees, i per contra, aquelles cèl·lules que no expressen hENT1 són resistents a gemcitabina (Mori et al. 2017, Pérez-Torras et al. 2008 i Pérez-Torras et al. 2013). A més, s'han fet estudis on es demostra que existeix una correlació positiva entre l'expressió del transportador hENT1 i la resposta al tractament amb gemcitabina (Spratlin et al. 2004 i Giovannetti et al. 2006). També s'ha demostrat que el transportador ENT1 i l'adenosina poden ser biomarcadors dels estadis inicials de la neurodegeneració en la malaltia de Huntington, i a més, ENT1 pot ser una nova diana terapèutica per tal de retardar la progressió de la malaltia (Guitart et al. 2016).

Pel que fa els transportadors concentratius de nucleòsids, l'anàlisi en tumors ginecològics (ovari, endometri i càncer cervical) mostren una pèrdua de l'expressió d'hCNT1 i a més, aquesta pèrdua correlaciona amb una pitjor prognosi de la malaltia (Farré et al. 2004). S'ha vist també que en càncer de mama, hCNT1 pot tenir un valor de prognosi per determinar el risc de recaiguda pels pacients que havien estat sotmesos a cirurgia i havien rebut un tractament de ciclofosfamida, metotrexat i 5-FU (Gloeckner-Hofmann et al. 2006). Recentment també s'ha vist que l'expressió del transportador hCNT3 pot ser utilitzada per tal d'optimitzar els tractaments aplicats a

pacients amb leucèmia aguda mieloide (AML). Un subtipus d'aquest càncer és aquell que porta la translocació cromosòmica t(8;21), que és un dels subtipus d'AML més freqüent i considerat grup de risc. Tot i que aquests pacients responen favorablement al tractament amb citarabina a l'inici de la malaltia, un nombre de pacients presenten una recaiguda i fracassen a l'intentar arribar a una supervivència lliure de malaltia. El gen *SLC28A3*, que codifica per CNT3, es va veure que es trobava elevat en aquells pacients que tenien la translocació t(8;21) respecte a aquells pacients d'AML que no presenten aquesta translocació cromosòmica. Aquesta elevada expressió d'hCNT3 provoca una millor resposta al tractament amb citarabina i una supervivència prolongada en aquells pacients amb t(8;21) (Song et al. 2015).

El principal problema existent en la interpretació de la informació disponible és el fet que la majoria dels estudis adreçats a determinar el paper dels transportadors de nucleòsids com a elements de prognosi en càncer són analitzats en diferents graus de la malaltia sense una comparació directa amb el teixit sa. A més, bona part d'aquests estudis són retrospectius i és difícil realitzar experiments prospectius que permetin associar un determinat biomarcador amb una millora o no al tractament (Pastor-Anglada and Pérez-Torras 2015).

4.2 De transportador a “transceptor”

Les cèl·lules necessiten comunicar-se amb l'entorn per tal d'obtenir nutrients, créixer, proliferar i respondre a senyals relacionades amb l'adaptació de canvis fisiològics o d'estrès. Una qüestió molt bàsica en biologia, és com les cèl·lules, especialment aquelles que viuen en ambients molt canviants, aconseguen detectar tots aquests canvis d'una manera ràpida i eficient. En aquest punt és on intervenen el paper dels receptors, transportadors i canals, proteïnes localitzades a la membrana plasmàtica de la cèl·lula les quals s'encarreguen d'establir aquesta comunicació entre la cèl·lula i el microambient que les envolta. Quan les cèl·lules no disposen d'algun nutrient, la proteïna transportadora d'aquest es veu regulada positivament, mentre que quan aquest es troba disponible un altre cop, es produeix una ràpida endocitosi i un tràfic intracel·lular del transportador. El descobriment que algun d'aquests transportadors actua també com a receptor, suggereix que aquestes proteïnes no només tenen la funció de translocar el substrat, sinó que també intervenen en vies de senyalització. Recentment, s'ha establert un nou concepte de proteïnes anomenat transceptor, proteïnes transmembrana que posseeixen ambdues funcions, és a dir, el transport de metabòlits i la senyalització de vies metabòliques (Diallinas 2017 i Kriel et al. 2011). De fet, la paraula “transceptor” és la contracció de dues paraules: transportador i receptor.

Introducció

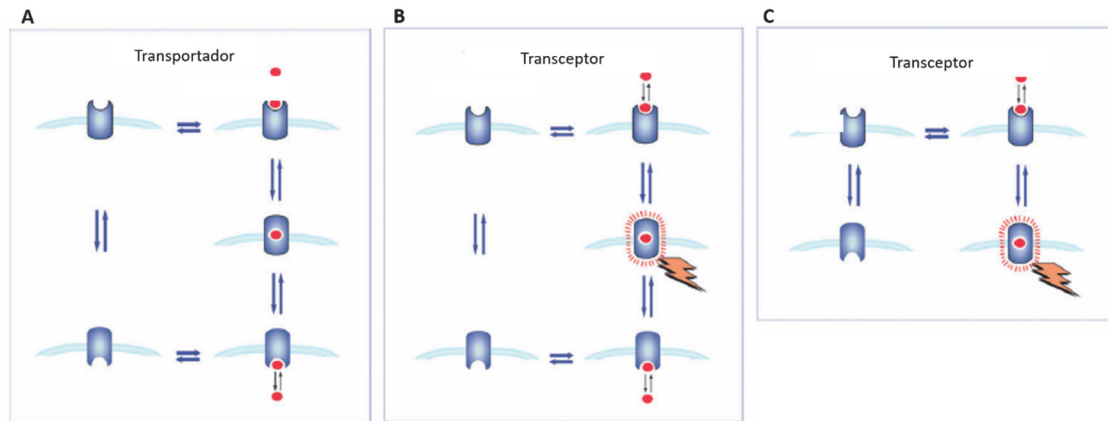


Figura 19. Canvis conformacionals en els transportadors i transceptors. Esquema dels canvis conformacionals en transportadors (A), transceptors que transloquen el substrat i donen una senyal intracel·lular (B) i transceptors que no transporten el substrat però emeten una senyal (C). Adaptat de Thevelein and Voordeckers 2015.

Aquesta hipòtesi està basada en estudis fets en llevats i mamífers, on s'identifiquen transportadors, que d'una manera dependent de la seva capacitat transportadora (**Figura 19B**) o independent (**Figura 19C**) són capaços de modular funcions cel·lulars específiques, comportant-se com una molècula de senyalització o com un receptor.

Originalment, el concepte de transceptor prové d'un descobriment en llevat, on, en aquest microorganisme, es van identificar diverses proteïnes que, d'una forma dependent a la seva activitat transportadora, permetien una ràpida adaptació per activar el procés de fermentació en aquelles cèl·lules que tinguessin disponible al medi els nutrients essencials com el nitrogen i el fosfat. Per tant, s'evidenciava així que existia un mecanisme a la membrana cel·lular que feia de sensor dels nutrients essencials al medi extracel·lular al mateix temps que translocava aquests nutrients (**Figura 19B**). Aquestes proteïnes de membrana eren, doncs, transceptors (Hirimburegama et al. 1992 i Holsbeeks et al. 2004). La proteïna més estudiada en llevat, GAP1, és un transportador d'aminoàcids que, sense perdre la seva capacitat de transportar aminoàcids, regula la senyalització intracel·lular mitjançant la proteïna cinasa A (PKA). De manera que, en absència del substrat la cèl·lula es troba en fase quiescent i amb una baixa activitat PKA. En el moment en que s'afegeixen aminoàcids, l'activació de PKA es produeix a través de la part receptora del transportador i s'activa la via de senyalització per promoure el procés de fermentació (Donaton et al. 2003).

A més, el descobriment de noves proteïnes amb una elevada similitud a proteïnes transportadores però sense una activitat transportadora detectable, suggeria que aquestes

proteïnes també poguessin funcionar com a sensors de la disponibilitat dels nutrients (**Figura 19C**). En llevat, s'han identificat tres d'aquestes proteïnes, Snf3 i Rgt2 són transceptors d'alta i baixa afinitat per la glucosa, respectivament (Özcan et al. 1998) i la tercera, Ssy1 és un transceptor d'aminoàcids (Didion et al. 1998, Iraqui et al. 1999 i Klasson et al. 1999). Totes tres proteïnes no tenen activitat transportadora però desencadenen la inducció dels transportadors de glucosa i d'aminoàcids, respectivament (Forsberg and Ljungdahl 2001). Homòlegs d'aquestes proteïnes s'han trobat en altres llevats (Theevelein and Voordeckers 2009) però no en organismes superiors. Encara que estudiats amb menys detall, existeixen altres transportadors en llevat els quals actuen com a transceptors. Alguns exemples inclouen el transportador d'uracil Fur4 (Galan et al. 1996), el transportador de fosfat Pho84 (Pettersson et al. 1999), diversos transportadors d'ions metàl·lics (Felice et al. 2005) així com sideròfors (Erpapazoglou et al. 2008) (Kim et al. 2002). Tots aquests transportadors estan fortament induïts en absència del seu substrat, en canvi, l'addició d'aquet substrat provoca la pèrdua del transportador a la membrana plasmàtica.

En vista de tots aquests estudis, es podria pensar que evolutivament els receptors provenen de transceptors que, amb el temps, han anat perdent la seva capacitat transportadora. Aquesta teoria es veu recolzada quan el receptor i el transportador presenten una estructura semblant. No obstant, en molts casos no es coneix si el substrat/l·ligand s'uneix en el mateix lloc d'unió en el cas del transportador/transceptor/receptor (Conrad et al. 2014 i Thevelein and Voordwckers 2009).

En un primer moment, es va pensar que aquest tipus de proteïnes podia estar restringit a organismes eucariotes inferiors, però no es va tardar en identificar nous transceptors en mosques, com el sensor d'alta afinitat d'aminoàcids PATH a *Drosophila* (Goberdhan et al. 2005), en plantes, com el transportador d'amoni AMT1-3 (Rogato et al. 2010) o en cèl·lules de mamífers. El transportador de mamífers de glucosa SGLT3, sembla ser que és una proteïna no capacitada per transportar glucosa però s'ha suggerit que la seva funció pugui ser a més, la d'actuar com un sensor de la disponibilitat de glucosa al medi (Díez-Sampedro et al. 2003). O també s'ha descrit el transportador d'aminoàcids SNAT2, com una proteïna transceptora (Hyde et al. 2007).

Com ja s'ha comentat, les proteïnes transportadores de nucleòsids tenen un paper farmacològic molt important ja que a més d'exercir la seva funció intrínseca com a transportadors de nucleòsids, també poden translocar els seus anàlegs utilitzats en la teràpia contra el càncer, malalties víriques o inflamatòries. Si a més se'ls afegeix aquesta capacitat transceptora, poden

Introducció

arribar a ser una nova diana terapèutica interessant per tractar diverses malalties metabòliques. D'aquí neix l'interès per estudiar les proteïnes de la família gènica *SLC*.

Recentment s'han publicat diversos treballs on es demostra que proteïnes transportadores de la família *SLC* tenen aquesta funció reguladora addicional. Com per exemple *SLC5A8*, un transportador de membrana de monocarboxilats, el qual inhibeix la progressió tumoral independentment de la seva activitat transportadora (Coothankandaswamy et al. 2013). O *SLC5A5*, un transportador de iodur que augmenta la capacitat invasiva de cèl·lules tumorals al interaccionar amb una via de senyalització cel·lular (Lacoste et al. 2012). A més del transportador de serotonina codificat en humans pel gen *SLC6A4* pot alterar l'eliminació de cèl·lules apoptòtiques i contribuir a malalties autoimmunes o malalties inflamatòries cròniques (Tanaka et al. 2014).

Pel que fa específicament a la família gènica de transportadors concentratius, el nostre grup ha hipotetitzat que el membre de la família *SLC28* hCNT1 pot tenir papers específics en la fisiologia de la cèl·lula, més enllà del transport de nucleòsids en la via de reciclatge. Ja que com s'ha comentat, hCNT1 és el membre de la família gènica que mostra un complex regulador a través de la insulina en fibroblasts cardíacs (Podgorska et al. 2007), àcids biliars (Klein et al. 2009), factor de necrosi tumoral (TNF)- α i la interleucina 6 (IL)-6 (Fernández-Veledo et al. 2004) en hepatòcits. A més la seva expressió sembla ser dependent de cicle cel·lular mostrant una regulació positiva d'aquesta proteïna a la fase S (Valdés et al. 2002). Tots aquests fenòmens fan que hCNT1 es converteixi en una proteïna candidata a tenir una funció transceptora. El nostre grup va demostrar que la disponibilitat de substrat al medi modulava l'expressió del transportador concentratiu de nucleòsids de tipus 1 a l'intestí prim de ratolins *in vivo* (Valdés et al. 2000). A més, també s'ha vist que l'expressió constitutiva d'hCNT1 en cèl·lules pancreàtiques tumorals indueix una disminució de la seva capacitat proliferativa (Bhutia et al. 2011) i que la seva restitució en tumors subcutanis inhibeix de forma significativa el creixement tumoral (Pérez-Torras et al. 2013). En aquest treball es va veure concretament que, la restitució de la funció de la proteïna hCNT1 en línies cel·lulars d'adenocarcinoma pancreàtic provocava un arrest del cicle cel·lular, un augment de la mort cel·lular mitjançant un mecanisme independent a l'apoptosi, desencadenava canvis en algunes de les cascades intracel·lulars de senyalització i inhibia la migració cel·lular. Tots aquests efectes també podien ser induïts quan a la cèl·lula s'expressava una variant d'hCNT1 mutada, hCNT1-Ser546Pro, la qual pot localitzar a la membrana plasmàtica però li manca la capacitat de translocar substrats (Pérez-Torras et al. 2013).

En el cas del transportador concentratiu de nucleòsids CNT2, que és un transportador d'alta afinitat per adenosina (**Taula 1**), s'ha vist que també pot tenir un rol fisiològic per la cèl·lula més enllà de la seva capacitat com a recaptador de nucleòsids per la via de recuperació. S'ha demostrat que el transportador CNT2 modula la senyal purinèrgica i el metabolisme energètic en cèl·lules epitelials i hepatòcits de rates. Concretament, s'ha vist que CNT2 està regulat pel receptor d'adenosina A₁ en hepatòcits mitjançant l'activació de canals de potassi dependents d'ATP (K_{ATP}) i la disponibilitat de glucosa (Duflo et al. 2004 i Medina-Pulido et al. 2013). Una comunicació semblant entre receptor i transportador s'ha descrit en neurones per CNT2, on s'observa una regulació negativa del transportador al cervell de rata en condicions d'ictus experimental i privació de la son (Medina-Pulido et al. 2013 i Guillén-Gómez et al. 2004). A més, l'adenosina que és transportada per CNT2 és la responsable de l'activació de la proteïna cinasa dependent d'AMP (AMPK) i de la subseqüent fosforilació de l'enzim acetil-CoA carboxilasa (ACC) en models epitelials i neuronals (Aymerich et al. 2006 i Medina-Pulido et al. 2013). Com passa per CNT1, l'expressió de CNT2 sembla ser característica d'hepatòcits diferenciats (del Santo et al. 1998, del Santo et al. 2001 i Dragan et al. 2000) sota una regulació per glucocorticoides i factors de transcripció específics d'hepatòcits (Valdés et al. 2006 i Fernández-Veledo et al. 2007). Per tant, la funció de CNT2 podria ser considerada com un nou factor important en el complex regulador format per AMPK i el metabolisme energètic.

Per altra banda, CNT3, que té una àmplia expressió en teixits epitelials, com a còlon i epiteli biliar, també sembla que sigui un membre clau de la regulació dels nivells d'adenosina extracel·lular. De fet, CNT3 està sota un control purinèrgic a través dels receptors d'adenosina A_{2A} en colangiòcits, contribuint d'aquesta manera al control del flux biliar (Godoy et al. 2014). Aquesta evidència suggereix que algunes proteïnes transportadores de nucleòsids (NT) poden formar part del purinoma, una xarxa molecular de receptors de nucleòsids i nucleòtids (P1 i P2), enzims i transportadors responsables de la regulació purinèrgica de la cèl·lula (Volonté and D'Ambrosi et al. 2009). En tant que algunes de les proteïnes de membrana del purinoma, així com alguns transportadors de fàrmacs, poden eventualment exercir altres efectes fisiològics que no siguin el mer transport o alliberament de fàrmacs, es pot anticipar que implicacions clíniques degudes a canvis produïts al purinoma durant el desenvolupament d'una malaltia haurien de ser analitzades sota diferents perspectives i podrien ser possibles biomarcadors o fins i tot, dianes terapèutiques (Pastor-Anglada and Pérez-Torras 2015).

A nivell de transportadors equilibratius de nucleòsids també hi ha funcions descrites d'aquestes proteïnes que no es refereixen al fet intrínsec del transport de nucleòsids. Com per exemple, es

va veure que en cèl·lules renals la pèrdua o disminució d'expressió d'hENT1 podia portar a un augment de la vulnerabilitat d'induir la transició epitel·li-mesènquima i fibrosis (Guillén-Gómez et al. 2011). A més, en un model *in vivo* on s'inhibia la transició epitel·li-mesènquima es va observar que l'expressió d'hCNT3 i hENT2 es veia incrementada, i com a conseqüència també augmentava la sensibilitat a gemcitabina (Zheng et al. 2015).

4.3 Els transportadors de nucleòsids i el seu interactoma

4.3.1 Concepte d'interactoma

Cap proteïna actua per si sola, per això, l'estudi de les interaccions entre proteïnes és fonamental per entendre la complexitat de la xarxa de funcions cel·lulars i fisiològiques als éssers vius.

El concepte d'interactoma, és a dir, la xarxa d'interaccions funcionals entre proteïnes, va ser definit per primer cop al 1999 (Sánchez et al. 1999) i al 2000 es van publicar els primers resultats d'un interactoma en llevat (Schwikowski et al. 2000). Un treball amb la col·laboració de diversos grups, va dissenyar el primer interactoma a gran escala dels receptors acoblats a proteïna G en humans (GPCR). La família de receptors GPCR és la família de proteïnes de membrana més gran composta per centenars de proteïnes i implicada en la transducció de senyals cel·lulars del metabolisme, proliferació i diferenciació. En total, aquest interactoma descriu 987 noves interaccions proteïna-proteïna en les que participen els GPCR i que es produeixen entre 686 proteïnes, 299 de les quals són proteïnes integrals de membrana (Sokolina et al. 2017) (**Figura 20**).

Degut a que la família GPCR està implicada en la transmissió de senyals intracel·lulars, aquestes proteïnes són dianes de diversos fàrmacs (Lagerström and Schiöth 2008). Per dissenyar nous tractaments per aquestes malalties, és essencial estudiar amb detall tots els processos moleculars que es produeixen durant la transducció de senyal causada pels receptors GPCR, així com totes les proteïnes que interaccionen amb aquests receptors.

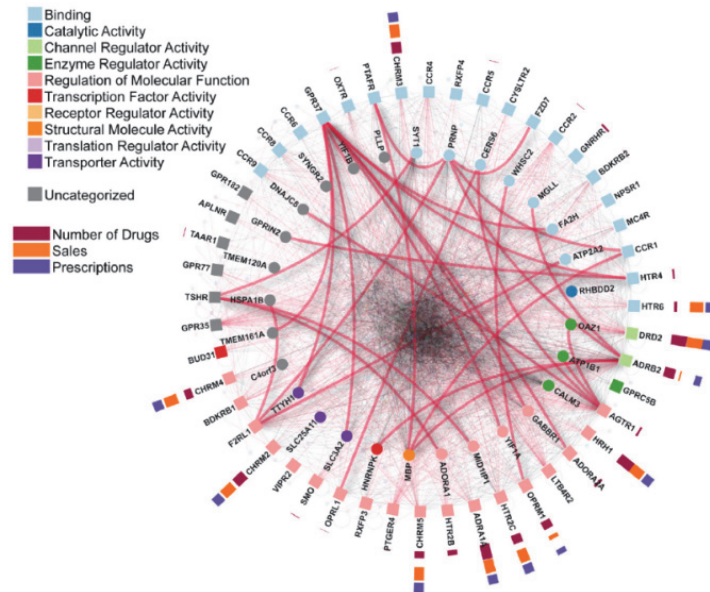


Figura 20. Interactoma de les proteïnes GPCR. 48 receptors rellevants de la família GPCR mapats utilitzant la tècnica MYTH. Font: Sokolina et al. 2017

L'elaboració d'aquest interactoma a gran escala ha aportat un recurs molt valuós per l'anàlisi de les vies de senyalització provocades per aquests receptors i així poder obtenir més informació per elaborar noves estratègies terapèutiques.

D'aquí neix l'interès en el nostre grup d'estudiar l'interactoma dels transportadors de nucleòsids ja que, com ja s'ha comentat, també són proteïnes relacionades amb la teràpia contra diverses malalties com el càncer, infeccions víriques o malalties inflamatòries. Per tant, és necessari conèixer tots els fenòmens que es produeixen a la cèl·lula en relació a aquestes proteïnes per tal de poder dissenyar i millorar les diverses estratègies terapèutiques existents. A més, els transportadors de nucleòsids tenen la característica afegida de poder actuar com a transceptors, per tant, és lògic pensar que aquests transportadors puguin interaccionar amb altres proteïnes.

Per estudiar les interaccions proteïna-proteïna de manera experimental existeixen multitud d'aproximacions metodològiques, acuradament recopilades en el treball de Snider i col·laboradors (Snider et al. 2015). Generalment, la combinació de tècniques és necessària per validar, confirmar i caracteritzar una interacció proteica. D'entre totes les tècniques possibles, algunes destacades són, el sistema de doble híbrid en llevat (Y2H), la purificació d'alta afinitat acoblada a l'espectrometria de masses (TAP/MS), el GST *pull-down*, el GST *pull-down* dirigit o la co-immunoprecipitació (Co-IP). En la present tesi, les tècniques utilitzades per l'estudi de les interaccions proteiques van ser el GST *pull-down* i la co-immunoprecipitació. La primera utilitza

Introducció

una proteïna com a ham (enlloc d'un anticòs) per tal d'arrossegar totes les proteïnes que hi estiguin interaccionant per després purificar-les, aïllar-les i identificar-les. Mentre que la segona tècnica, funciona seleccionant un anticòs que té com a diana una proteïna coneguda que es creu que pertany a un gran complex de proteïnes. Localitzant a aquest membre conegut, es pot aïllar tot el complex proteic i així aïllar i identificar tots els membres desconeguts del complex. Als materials i mètodes d'aquest treball es descriuen més detalladament totes aquestes tècniques.

No obstant, en alguns casos, la metodologia aplicada altera les propietats de l'entorn cel·lular i, per tant, de les proteïnes de l'interactoma. Recentment, s'ha desenvolupat una tècnica innovadora, el doble híbrid de membrana en llevat (MYTH), el protocol utilitzat en l'estudi comentat anteriorment per definir l'interactoma de les proteïnes GPCR (Sokolina et al. 2017), que ha permès solucionar aquesta greu limitació experimental. Aquesta tècnica es basa en els estudis del 1994 (Johnsson and Varshavsky 1994) en els quals es descrivia com la ubiquïtina, dividida en dues meitats (Nub, per N-terminal i Cub pel C-terminal), podien reassociar-se degut a l'elevada afinitat entre les dues meitats entre sí. D'aquesta manera, al fusionar Cub amb la proteïna d'interès i analitzar-la davant d'una llibreria de cDNA amb el Nub fusionat a cada transcrit, permet detectar aquelles proteïnes que interaccionin entre si, és a dir, aquelles que siguin capaces de reassociar la molècula d'ubiquïtina.

Cada aproximació té els seus punts forts i febles, especialment en referència a la sensibilitat o especificitat de la tècnica. A més, l'elevada taxa d'errors, falsos positius i baixa reproductibilitat dels mètodes proteòmics actuals posa de manifest que el coneixement generat mitjançant aquestes tècniques haurà de ser validat posteriorment amb altres tècniques (Stagljär 2016).

4.3.2 Regulació dels transportadors per interaccions proteiques

Les tècniques de detecció d'interaccions proteïna-proteïna han permès conèixer alguns aspectes reguladors lligats al domini N-terminal dels transportadors de nucleòsids. Aquests estudis s'han fet amb el domini N-terminal ja que les proteïnes CNTs d'eucariotes l'han incorporat evolutivament, domini que no està present als procariotes malgrat que els seus ortòlegs més primitius són totalment funcionals (Johnson et al. 2012). D'això es dedueix que aquesta zona N-terminal no és essencial per a l'activitat transportadora però sí que sembla que conté zones reguladores, tal i com s'ha començat a comprovar (Pinilla-Macua et al. 2012 i Errasti-Murugarren et al. 2010a). Per aquest motiu es pot hipotetitzar que el domini N-terminal pot ser rellevant per tal de comprendre totes aquelles funcions associades a aquestes proteïnes transportadores, no necessàriament vinculades estrictament a la seva activitat com a transportadors.

Pel que fa els transportadors concentratius de nucleòsids, el membre de la família hCNT2 és un transportador d'alta afinitat d'adenosina (**Taula 1**) que pot tenir funcions fisiològiques més enllà de la recuperació de nucleòsids. Com ja s'ha descrit, CNT2 es relaciona amb la modulació de la senyal purinèrgica i metabolisme energètic en cèl·lules intestinals i parenquimàtiques hepàtiques. Per tal d'explicar la relació entre aquest transportador i el metabolisme energètic, es van intentar identificar proteïnes d'unió que poguessin conferir aquesta funció al transportador. Es van identificar dues proteïnes d'interacció, la aldolasa B i la GRP58 (de l'anglès *glucose-regulated protein 58*) mitjançant un doble híbrid en bacteris i un GST pull-down, respectivament (Huber-Ruano et al. 2010). Tal i com es mostra a la **Figura 21**, en una situació de manca de glucosa, GRP58 es sobreexpressa i actua com un efector negatiu de la funció de CNT2, per tant, disminueixen els nivells del transportador en la membrana cel·lular. Mentre que un flux glicolític causat per la presència de glucosa, promou la unió de l'aldolasa B amb el transportador provocant un augment de l'afinitat de CNT2 pels seus substrats (Huber-Ruano et al. 2010).

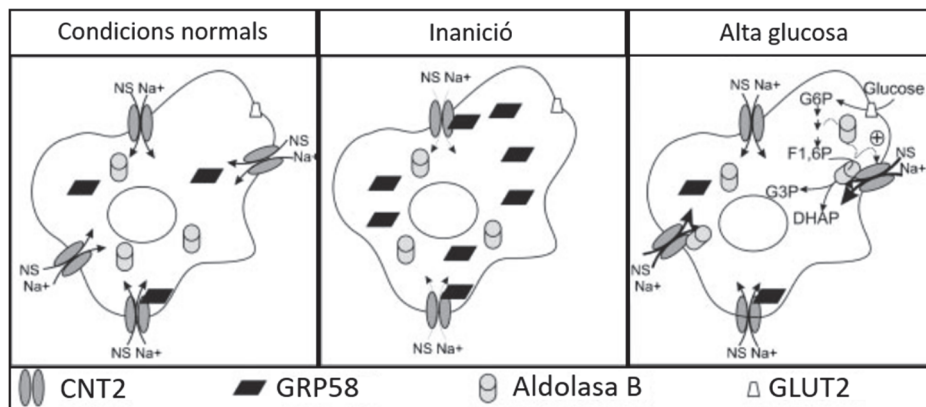


Figura 21. Model conceptual de la regulació de CNT2 per GRP58 i aldolasa B. Sota condicions normals, hCNT2 és el responsable de l'entrada de nucleòsids extracel·lulars. En aquestes condicions, algunes proteïnes GRP58, però no aldolasa B, es troben unides a hCNT2. Durant la inanició, l'expressió proteica de GRP58 augmenta i els nivells de proteïna d'hCNT2 disminueixen, provocant una disminució de l'entrada de nucleòsids. Quan la disponibilitat de glucosa augmenta al medi extracel·lular, la glucosa entra dins la cèl·lula i el flux glicolític creat fa que l'aldolasa B s'uneixi a hCNT2, augmentant la seva activitat. NS: nucleòsids, G6P: glucosa.6-fosfat, F-1,6-P: fructosa-1.6-bifosfat, G3P: gliceraldehid-3-fosfat, DHAP: dihidroxiacetona fosfat. Adaptat de Huber-Ruano et al. 2010.

La identificació d'aquestes proteïnes d'interacció recolzarien la hipòtesi que el transportador CNT2 tindria altres funcions i que establiria un vincle amb el metabolisme energètic cel·lular, tot i que, fins al moment, no s'han detectat funcions transceptoras directes per a CNT2.

En el cas dels hENTs s'han trobat proteïnes d'unió a través de la tècnica MYTH. Pel que fa a hENT1, s'ha pogut identificar la calmodulina (Bicket et al. 2016), de manera que, els nivells de calci intracel·lulars modulen el transport de nucleòsids i derivats a través de la unió de la

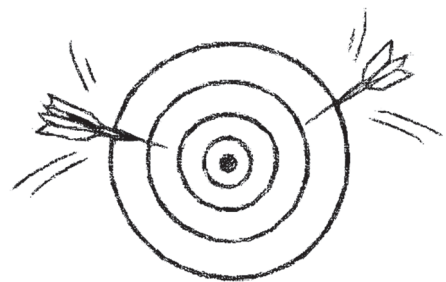
Introducció

calmodulina al transportador hENT1, modulant així l'eficiència del transport de fàrmacs (Bicket et al. 2016). En el cas d'hENT2 s'han identificat 110 possibles proteïnes d'interacció mitjançant la tècnica MYTH, bona part d'aquestes es poden considerar falsos positius de la pròpia tècnica. Sorprenentment, però, els resultats van mostrar un nombre elevat de proteïnes amb una localització nuclear, la majoria relacionades amb processos d'*splicing* o amb el transport de molècules a través de la membrana nuclear. El transportador ENT2 presenta variants d'*splicing* que codifiquen per dues isoformes nuclears del transportador, aquestes conserven el *gran loop* intracel·lular d'hENT2, la única regió on previsiblement la proteïna podria interaccionar amb d'altres. De manera que, els resultats obtinguts amb el MYTH reflecteixen possibles interaccions amb les variants nuclears del transportador. Altres proteïnes interessants identificades han estat determinades cinases i fosfatases, juntament amb la proteïna Gs vinculada a l'activació de PKA per AMP cíclic (cAMP). Tot i que, no s'ha acabat de demostrar la implicació fisiològica que poden tenir totes aquestes proteïnes d'unió a hENT2 (Tesi doctoral - Natàlia Grañé Bladeras).

Recentment s'ha identificat un nou mecanisme de regulació dels transportadors equilibratius a través de la seva oligomerització, per tant, una regulació innovadora basada en la interacció entre proteïnes. En una situació basal, hENT1 bàsicament es troba localitzat a la membrana plasmàtica en forma d'homòmers i hENT2 és constitutivament fosforilat per CKII (Caseïna quinasa II) i localitzat a la regió per sota de la membrana en forma d'homòmers. Després de l'activació de PKC (Proteïna Quinasa C), s'activa PP1 (Proteïna fosfatasa 1) i probablement desfosforila hENT2 el qual es dirigirà cap a la membrana plasmàtica. La presència d'hENT2 a la membrana plasmàtica altera els monòmers hENT1 i hENT2 i promou la formació dels heteròmers hENT1 i hENT2, i conseqüentment cau el transport de 2-cloroadenosina mediat per hENT1 i augmenta el transport d'hipoxantina mediat per hENT2 (Grañé-Boladeras et al. 2018).

Totes aquestes evidències obren la possibilitat de que els transportadors estiguin regulats per diverses proteïnes, que permetin una regulació molt més acurada i ràpida de la seva activitat en front al seu substrat i provoqui que tinguin un rol farmacològic i en la biologia cel·lular molt important.

OBJECTIUS



Els transportadors de nucleòsids no només són de gran importància pel seu paper en la recuperació de nucleòsids extracel·lulars, sinó que recentment s'ha vist que poden tenir altres funcions involucrades en la regulació de la fisiologia cel·lular. El domini N-terminal de les proteïnes hCNTs adquirit en els organismes eucariotes no és necessari per la funció transportadora. Així, és lògic hipotetitzar/pensar que és el responsable de l'adquisició d'aquestes noves funcions, no necessàriament associades a la seva activitat com a transportador. Aquest nou rol adquirit dóna més importància a l'estudi dels hCNTs ja que aquests també poden transportar fàrmacs derivats de nucleòsids que són utilitzats pel tractament de malalties víriques, inflamatòries o processos oncològics. Per tant, és interessant conèixer les funcions de cadascun dels transportadors de nucleòsids dins la cèl·lula per tal de comprendre la biodisponibilitat i la farmacocinètica dels fàrmacs, i entendre d'aquesta manera les diverses respostes dels pacients enfront determinats tractaments.

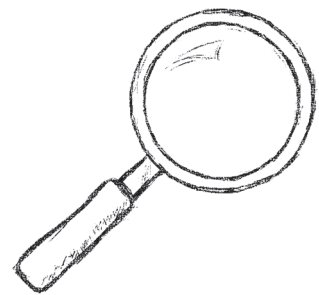
La present tesi es centra en l'estudi del transportador concentratiu de nucleòsids de tipus 3, el membre de la família de transportadors concentratius caracteritzat per una major capacitat concentrativa i una àmplia selectivitat de substrat. Recentment en el nostre laboratori s'ha demostrat que hCNT3 pot ser farmacològicament mobilitzat, potenciant-se el seu tràfic cap a membrana, contribuint així a una major bioassequibilitat pels fàrmacs emprats en la Leucèmia Limfàtica Crònica. A més, tenint en compte els antecedents comentats, el paper que poden jugar aquestes proteïnes en la biologia tumoral, per tant, pot anar més enllà del seu rol de per sí important en la citotoxicitat de fàrmacs anti-tumorals. I ens permet hipotetitzar que aquesta possibilitat derivi de la seva probable ubicació en xarxes reguladores que afectin a propietats cel·lulars essencials per diversos processos cel·lulars on fins ara encara no ha estat adscrit.

En base a tots aquests antecedents ens vam plantejar com a objectiu general del projecte caracteritzar l'interactoma de la proteïna hCNT3 amb el propòsit de validar noves xarxes proteïques susceptibles de ser utilitzades en l'àmbit del diagnòstic, el pronòstic o fins i tot la teràpia de diversos càncers.

Els objectius específics del projecte són:

- 1. Identificar i validar bioquímicament i funcionalment noves proteïnes d'interacció amb el transportador hCNT3.**
- 2. Analitzar els mecanismes d'interacció del fàrmac anàleg de nucleòsid acadesina amb els transportadors de la família hCNTs i de la resposta cel·lular induïda pel seu transport.**

RESULTATS i DISCUSSIÓ



BLOC 1

**Interactoma del
transportador de nucleòsids**

hCNT3

Interactoma del transportador de nucleòsids hCNT3

El nostre laboratori sempre ha estat interessat en intentar entendre la biologia i la farmacologia dels transportadors de nucleòsids i nucleobases. És per això que existeixen diversos projectes centrats en determinar quin és l'interactoma de les proteïnes hCNT, les proteïnes de membrana responsables del transport de nucleòsids dins les cèl·lules.

Per abordar aquest estudi, el nostre grup ha utilitzat diverses aproximacions per tal d'identificar proteïnes candidates d'unió als transportadors. La tècnica que s'ha realitzat en la present tesi ha sigut un assaig GST *pull-down* utilitzant la proteïna d'interès hCNT3 com a ham (*bait*). Les pròpies limitacions de la tècnica impedièren utilitzar la seqüència sencera del transportador i per aquest motiu es va utilitzar únicament la cua intracel·lular de l'extrem N-terminal ja que és la part del transportador més soluble. A més, tal i com s'ha exposat a la introducció, aquest extrem N-terminal utilitzat per la detecció de proteïnes d'interacció és un domini intracel·lular de 103 aminoàcids que han adquirit els eucariotes i que no està present als organismes procariotes. Aquesta regió s'ha postulat com un possible lloc d'unió a altres proteïnes, conferint-li així noves funcions al transportador. És per això que, estudiar tots els mecanismes i proteïnes d'unió que regulen la inserció i retenció d'hCNT3 a la membrana cel·lular amb aquest únic domini i no tota la proteïna sencera es va considerar una aproximació òptima per la identificació de proteïnes candidates.

Un cop teníem controlat quin seria el nostre ham, era de gran importància decidir d'on provindrien les possibles proteïnes d'interacció (*preys*) d'aquest ham. És per això que, com a font de proteïnes candidates es van escollir dos extractes cel·lulars d'origen molt diferent: cèl·lules humanes de còlon i cèl·lules primàries de Leucèmia Limfàtica Crònica (LLC). El primer extracte es va considerar interessant ja que és un epitelí absortiu on s'expressa el transportador hCNT3 i per tant, sembla interessant com a model d'estudi de la condició fisiològica absortiva d'aquest transportador. El segon extracte, en canvi, ens permetria aprofundir en el paper d'hCNT3 en relació a l'entrada i sortida de fàrmacs derivats de nucleòsids ja que alguns dels tractaments d'aquesta malaltia són derivats de nucleòsids que s'interioritzen a la cèl·lula mitjançant aquest transportador.

A continuació es presenten dos capítols on s'explica detalladament el perquè d'aquesta elecció, així com tot el procés d'identificació i validació de les proteïnes estudiades.

CAPÍTOL 1

GALECTINA-4

1 Introducció

Els àcids nucleics es poden obtenir de la dieta a través de la digestió de les nucleoproteïnes mitjançant l'acció proteolítica de diverses proteases així com de les nucleases pancreàtiques i fosfodiesterases secretades per les glàndules intestinals. Com a resultat d'aquesta digestió, aquestes macromolècules i els seus productes intermediaris (per exemple, di-, tri- i polinucleòtids) es converteixen en nucleòtids (Sauer et al. 2011 i Gil et al. 2007). És poc probable que els nucleòtids siguin absorbits com a tal, ja que a l'intestí també s'expressen diferents tipus d'ectoenzims amb activitat nucleotidasa que catalitzen la conversió extracel·lular dels nucleòtids a nucleòsids. En resum, el producte de la digestió de les nucleoproteïnes són els nucleòsids, i fins a cert punt, les nucleobases. Per tant, l'expressió a l'intestí dels transportadors de nucleòsids (i nucleobases) és crucial per l'absorció dels nucleòsids i nucleobases.

S'ha analitzat l'expressió dels mRNA dels transportadors de nucleòsids al llarg de tot el sistema digestiu en base a la informació disponible a diverses bases de dades públiques. En línies generals es podria dir que hCNT3 es troba àmpliament distribuït al llarg de tot el sistema digestiu de forma bastant constant, tot i que amb menor expressió en comparació a hCNT1 i hCNT2 (Pastor-Anglada 2018), mentre que, aquests dos últims transportadors s'expressen majoritàriament a l'intestí prim i al duodè. Per tant, els transportadors al sistema digestiu tenen un rol absorbiu de nucleòsids. La localització apical d'hCNT3 en epitelis d'absorció facilita aquesta funció d'internalitzar nucleòsids i a més és crucial per crear un flux vectorial de fàrmacs derivats de nucleòsids amb un efecte antiviral i anticancerós (Errasti-Murugarren et al. 2007), de manera que hCNT3 esdevé un bon candidat per modular la farmacocinètica d'alguns fàrmacs.

Un d'aquests fàrmacs que pot tenir un impacte important al sistema digestiu és la 6-mercaptapurina (6-MP), un anàleg de purines de la família de les tiopurines que interfereix en la síntesi del DNA provocant un efecte citotòxic sobre les cèl·lules. Aquest s'utilitza per tractar malalties inflamatòries intestinals (IBD, de l'anglès *Inflammatory Bowel Disease*) com ara la malaltia de Crohn (Axelrad et al. 2016). No obstant, aproximadament una tercera part de pacients responen molt poc a aquesta teràpia, fet que es podria explicar per les possibles diferències en el transport de la 6-MP. S'ha demostrat que la 6-MP és transportada per sistemes de transport actiu, i no per difusió passiva, als limfòcits humans. Addicionalment, part d'aquest transport actiu és dependent de sodi, suggerint d'aquesta manera que els transportadors

concentratius estarien involucrats en el transport d'aquest fàrmac (Conklin et al. 2012). Altres estudis han utilitzat la línia cel·lular T-limfoblàstica (MOLT-4), una línia resistent a la 6-MP degut a l'elevada exposició a aquest fàrmac al llarg del temps. Aquesta línia presenta una elevada expressió d'hENT2 i hCNT3. El silenciament parcial d'hCNT3 i hENT2 a la línia cel·lular MOLT-4 provoca una disminució del 47% i 21% transport de la 6-MP, respectivament. Resultats que indicarien que hCNT3 seria un transportador de tiopurines (Fotoohi et al. 2006).

En aquesta tesi es va plantejar quin era el rol del domini N-terminal d'hCNT3 en la regulació de la funció d'hCNT3 i es va voler determinar si hCNT3 era un transportador de tiopurines en les cèl·lules epitelials del còlon i d'aquesta manera estudiar si el transportador podia tenir un rol important en la biodisponibilitat de les tiopurines en els segments més distals del tracte digestiu (còlon i recte). A més, ens vam preguntar si l'expressió del transportador hCNT3 es trobava alterat en el teixit de còlon inflammat dels pacients amb la malaltia de Crohn.

Per aquest propòsit, es va utilitzar l'extrem N-terminal del transportador amb un extracte de cèl·lules humanes de còlon utilitzat com a font de proteïnes per tal d'identificar aquelles que podien estar unides a hCNT3. Un cop obtingudes totes les proteïnes candidates, es van identificar aquelles que podien ser més rellevants fins que finalment es va escollir una per seguir amb l'estudi i validar tant bioquímicament com funcionalment la unió entre el transportador i la proteïna candidata.

2 Identificació de proteïnes candidates

2.1 Assaig *pull-down*

El fragment que codifica pel domini citosòlic N-terminal de 103 aminoàcids d'hCNT3 es va fusionar amb la glutatió S-transferasa (GST), mentre que el control negatiu només presentava la seqüència del GST i no la del transportador. Per altra banda, els homogenats de còlon es van obtenir de mostres de teixits sans adjacents a carcinomes colorectals provinents de pacients de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron, les quals havien estat facilitades amb el consentiment dels seus pacients. Amb la proteïna d'interès clonada a GST i les proteïnes de l'homogenat de còlon es realitza el *pull-down* per detectar possibles proteïnes candidates. Seguidament es realitzà una electroforesi 2D i s'analitzaren els resultats mitjançant un anàlisi per espectrofotometria de masses MALDI-TOF. A partir d'aquests resultats es van identificar algunes proteïnes que podien interaccionar amb el transportador hCNT3, de les quals les més rellevants van ser: Galectina-4 (Gal-4), mimecan, la proteïna ribosomal 60S L7 i la triptasa α/β -1 (**Figura 22**).

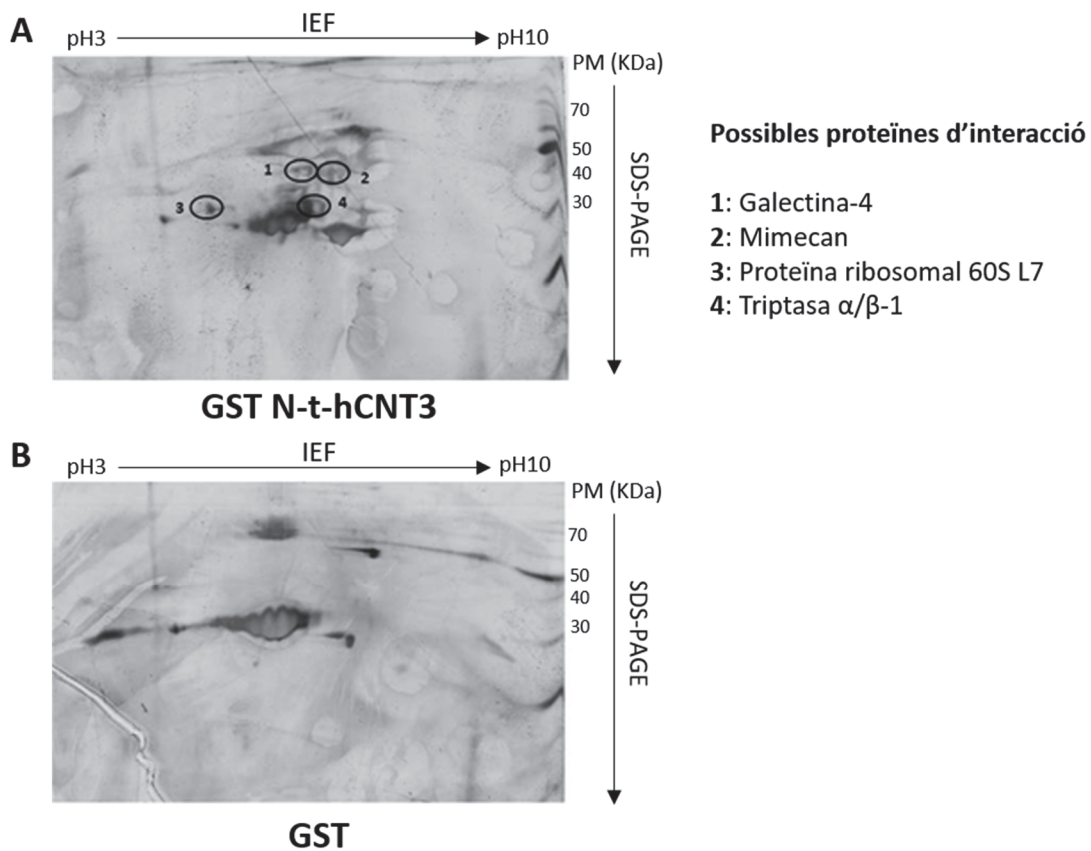


Figura 22. Electroforesi bidimensional de proteïnes provinents de cèl·lules de còlon sa amb tinció de plata. Tira IPG 24cm gradient (pH) 3-10. (A) GST *pull-down* utilitzant l'extrem N-terminal d'hCNT3. Cada *spot* va ser numerat i analitzat per MALDI-TOF. (B) Control negatiu del GST *pull-down* utilitzant GST sense unir-hi covalentment la cua N-terminal d'hCNT3.

2.2 Proteïnes candidates

Es van estudiar totes les proteïnes candidates que es van identificar (**Figura 22**) amb l'objectiu de detectar aquella que tingués un sentit biològic dins del model en el qual ens trobàvem, és a dir, al còlon i relacionada amb la funció del transportador de nucleòsids hCNT3. De totes les proteïnes identificades, es van seleccionar les que ens van semblar més interessants i es van estudiar individualment. Aquestes van ser la proteïna mimecan, la proteïna ribosomal RPL7, la triptasa i galectina-4.

Mimecan, també anomenada osteoglicina (OGN), és una proteïna de la família de proteoglicans SLRP (*small leucine-rich proteoglycan*) codificada per un únic gen, tot i que, s'han identificat diversos processos transcripcionals i traduccional que donen lloc a múltiples variants de la proteïna. Això fa que tingui una gran diversitat estructural i funcional ja que cada variant transcripcional presenta una funció específica (proliferació de col·lagen, senyalització immunològica o desenvolupament de fibroblasts, per exemple). També s'ha vist que juga un paper en algunes malalties, fet que la fa una candidata interessant pel desenvolupament de noves estratègies terapèutiques. És una proteïna ubiqua, s'ha descrit que s'expressa a diversos teixits com ara pell, cartílags, pulmó, fetge, dents, testicles, ovaris, entre d'altres (Deckx et al. 2016).

La **proteïna ribosomal RPL7** és una proteïna majoritària del ribosoma involucrada en la regulació de la traducció gènica. Els ribosomes són els orgànuls que catalitzen la síntesi proteica i estan composts estructuralment per dues subunitats: la subunitat petita (40S) i la subunitat gran (60S). Aquestes subunitats estan formades per diferents tipus de RNA i diverses proteïnes. La proteïna RPL7 es troba a la superfície de la subunitat gran (60S) on interacciona amb el RNA i es troba involucrada en el procés de la biogènesis del ribosoma, així com, de la regulació de la traducció del mRNA (Ben-Shem et al. 2010) (Robledo et al. 2008).

La **triptasa** és l'enzim derivat de les serines proteases més abundant de les vesícules secretores contingudes als mastòcits. Les proteases serines trenquen enllaços peptídics en proteïnes, en els quals la serina actua com un aminoàcid nucleofílic en el lloc actiu de l'enzim. Les triptases són actives únicament quan formen tetràmers i s'ha vist que estan implicades com a enzims mediadors en l'asma i altres malalties al·lèrgiques i inflamatòries (Atiakshin et al. 2018).

Galectina-4 és una proteïna citosòlica que conté dos dominis d'unió a carbohidrats (CRD) implicada en la maduració i el tràfic a la membrana plasmàtica de diverses

glicoproteïnes (Delacour et al. 2005 i Stechly et al. 2009). A més, diversos estudis suggereixen que les N- i O- glicosilacions dels ectodomins de proteïnes transmembrana constitueixen una senyal per aquesta maduració (Castillon et al. 2013, Naim et al. 1999, Huet et al. 2003 i Delacour et al. 2003). Ambdós tipus de glicosilacions són crucials pel correcte tràfic d'algunes glicoproteïnes de membrana cap a la part apical dels enteròcits, que és sabut que estan regulades per Gal-4 (Delacour et al. 2005, Stechly et al. 2009 i Delacour et al. 2009).

Un cop analitzades totes les proteïnes candidates, Gal-4, una proteïna d'unió a carbohidrats pertanyent a la família de les lectines, va ser l'escollida per estudiar la possible relació amb el transportador de nucleòsids hCNT3. Ja que per la funció en el tràfic de proteïnes de membrana que hem comentat que té Gal-4 i totes les evidències anteriorment descrites, fan plausible el fet que hCNT3 necessiti Gal-4 per madurar i dirigir-se a la membrana plasmàtica per realitzar la seva funció. Aquesta interacció podria ser clínicament important ja que, com ja hem comentat, hCNT3 és el responsable del transport de les tiopurines, com la 6-MP, anàlegs de nucleòsids utilitzats pel tractament de malalties inflamatòries intestinals.

3 Validació bioquímica

3.1 Assaig *pull-down* dirigit

Per tal de comprovar que Gal-4 era un positiu en l'experiment anterior, es va realitzar el mateix *pull-down*, però ara dirigit específicament contra Gal-4. De manera que es va arrossegar el domini N-terminal d'hCNT3 fusionat amb la proteïna GST i seguidament es va detectar directament Gal-4 en un *Western blot* (**Figura 23**), verificant d'aquesta manera la interacció del domini N-terminal d'hCNT3 amb Gal-4.

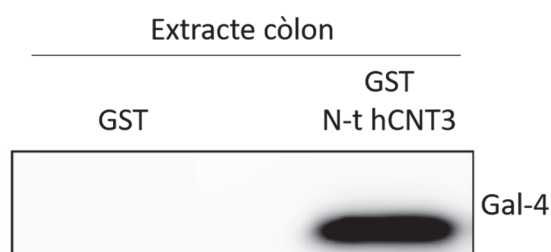


Figura 23. Validació de la interacció d'hCNT3 amb Gal-4 per *pull-down* dirigit. La proteïna recombinant GST-N-t-hCNT3 es va incubar amb lisats de còlon humà i com a control negatiu, la proteïna GST sense unir-la covalentment a N-t-hCNT3, que també es va incubar amb el lisat de còlon. Les proteïnes que van quedar unides es van eluir, separar per electroforesi SDS-PAGE i es va revelar Gal-4 en un *Western blot*. Es mostra un experiment representatiu.

Considerant que Gal-4 s'havia identificat com una proteïna d'unió a hCNT3 mitjançant un GST *pull-down* realitzat amb el domini intracel·lular N-terminal del transportador, és probable que Gal-4 interactuï amb l'extrem N-terminal d'hCNT3 d'una manera independent de carbohidrat, com s'ha demostrat per altres galectines (Camby et al. 2006). Existeixen diversos articles que descriuen noves evidències sobre la unió de les galectines a altres proteïnes d'una manera independent de carbohidrat (Camby et al. 2006, Park et al. 2001, Elad-Sfadia et al. 2002 i Paz et al. 2001). De fet, tots aquests estudis suporten el fet que Gal-4 s'uneixi a l'extrem N-terminal d'hCNT3, que és la part del transportador citoplasmàtica no glicosilada.

3.2 Model cel·lular

Amb l'objectiu de trobar un model cel·lular amb el qual seguir validant la interacció d'hCNT3 amb Gal-4, es va analitzar l'expressió d'ambdues proteïnes en dues línies cel·lulars d'adenocarcinoma de còlon: HT-29 i Caco-2, dos models cel·lulars que s'ajustarien als extractes

cel·lulars de còlon on es va trobar Gal-4 com a proteïna d'unió. Tal i com es mostra a la **Figura 24**, els dos models cel·lulars expressaven el transportador hCNT3.

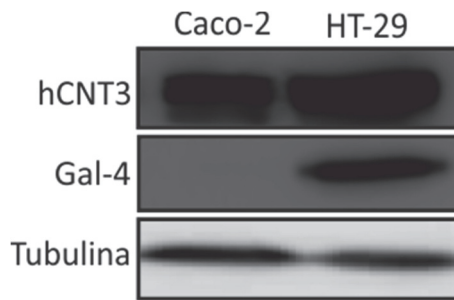


Figura 24. Expressió endògena d'hCNT3 i Gal-4 en dues línies cel·lulars de còlon: Caco-2 i HT-29. Es van analitzar els nivells proteics d'hCNT3 i Gal-4 per *Western blot*. Com a control de càrrega s'utilitza la tubulina. Es mostra un experiment representatiu.

No obstant, la línia cel·lular Caco2 no expressava la proteïna Gal-4, contràriament a la línia cel·lular HT-29 que sí que ho feia. Aquests resultats ens van obligar a treballar amb les HT-29 ja que era la línia que expressava ambdues proteïnes d'estudi. Això, però, no va excloure que també s'estudiés més profundament la línia cel·lular Caco-2 i quin efecte podia tenir el fet que no expressés Gal-4. Aquest estudi es detallen més endavant en aquest capítol de resultats, concretament a l'apartat 4.4.

3.3 Co-immunoprecipitació i co-localització

Un cop definit el model on poder estudiar la interacció entre Gal-4 i hCNT3 vam començar a validar bioquímicament aquesta interacció. Les dues aproximacions que vam utilitzar van ser la co-immunoprecipitació i la co-localització. Si bé és cert, que la co-localització no és una tècnica que estrictament permeti validar si dues proteïnes estan interaccionant, sí que permet confirmar que aquelles dues proteïnes que estan interaccionant comparteixen el mateix espai, per tant, co-localitzen.

Primerament es va realitzar la co-immunoprecipitació. Aquesta aproximació ens va permetre observar que el transportador co-immunoprecipitava quan s'immunoprecipitava Gal-4 amb un anticòs específic per aquesta proteïna (**Figura 25**). Per assegurar-nos que no hi havia unions inespecífiques amb l'anticòs, es va afegir un control negatiu on s'incubaven els extractes cel·lulars amb IgG de la mateixa espècie que l'anticòs anti-Gal-4 utilitzat per la immunoprecipitació.

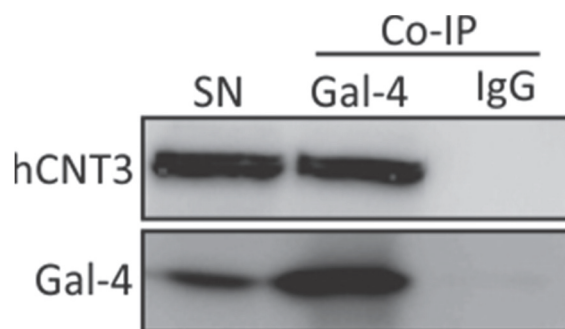


Figura 25. Validació bioquímica de la interacció entre el transportador hCNT3 i Gal-4. Immunoprecipitació de Gal-4 amb un anticòs α Gal-4 en HT-29, en la qual també co-immunoprecipita hCNT3 un cop es detecten ambdues proteïnes per *Western blot*. Com a control negatiu s'utilitzen IgG de la mateixa espècie que l'anticòs α Gal-4 per descartar possibles unions inespecífiques. Es mostra un *blot* representatiu de 3 experiments independents.

Com ja hem comentat, si dues proteïnes estan interaccionant, vol dir que si les detectem mitjançant immunofluorescència, el senyal de cadascuna ha de coincidir a la mateixa localització subcel·lular. Vam realitzar una immunocitoquímica on detectàvem el transportador hCNT3 i Gal-4 amb anticossos específics per cadascuna d'aquestes proteïnes. Posteriorment es van incubar les cèl·lules amb un anticòs secundari que portava un fluoròfor i mitjançant un microscopi de fluorescència es van obtenir les imatges. Amb aquesta aproximació vam poder confirmar que el transportador hCNT3 i Gal-4 co-localitzaven a la membrana plasmàtica i, a més, també co-localitzaven a la regió que queda just per sota de la membrana (**Figura 26**).

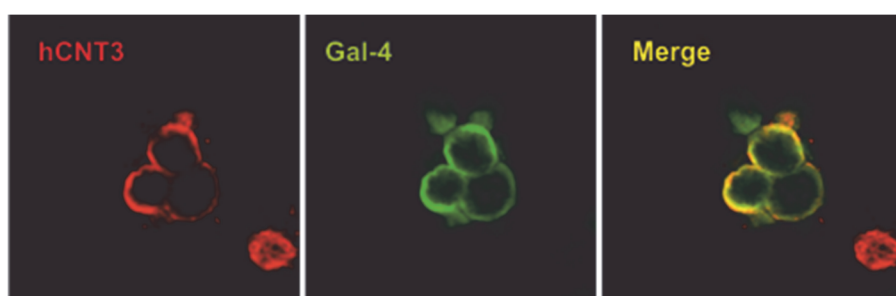


Figura 26. Confirmació de la interacció entre el transportador hCNT3 i Gal-4. Les cèl·lules HT-29 es van fixar, permeabilitzar i es van detectar Gal-4 i hCNT3 endògenes amb anticossos α Gal-4 i Alexa Fluor 488 (verd) i α hCNT3 i Alexa Fluor 555 (vermell). Les imatges sobreposades mostren com hi ha regions de verd i vermell que coincideixen després d'analitzar-les amb el software Image J.

S'ha vist que la família de galectines realitzen multitud de funcions que tenen una importància en la senyalització i el tràfic a membrana (Fred Brewer 2002). Una propietat sorprenent de les galectines és que aquestes proteïnes no tenen cap senyal peptídic ni utilitzen cap via de secreció mitjançant l'aparell de Golgi per arribar a la membrana cel·lular (Hughes 1999 i Nickel 2003). En

canvi, les galectines s'acumulen al citosol i són externalitzades per un mecanisme desconegut. L'estudi de Delacour et al. 2005 va demostrar que Gal-4 es localitzava al citosol i s'acumulava a la regió subapical de les cèl·lules HT-29. Totes aquestes evidències ens coincideixen amb els nostres resultats on també veiem aquesta acumulació de Gal-4 en vesícules de reciclatge, a la regió subapical de les cèl·lules HT-29.

4 Validació funcional

4.1 Efecte de Galectina-4 en l'activitat del transportador hCNT3

Un cop demostrada la interacció bioquímica entre el transportador i Gal-4, es va començar a estudiar quines eren les possibles implicacions funcionals que podien sorgir d'aquesta unió. L'estudi de l'efecte de Gal-4 sobre el tràfic del transportador hCNT3 cap a la membrana plasmàtica es va realitzar a la línia cel·lular HT-29, model cel·lular utilitzat fins al moment ja que es va demostrar que expressava les dues proteïnes d'estudi i perquè a més, era la línia cel·lular on s'havia descrit que Gal-4 estava implicada en l'ordenament de moltes glicoproteïnes a la membrana (Delacour et al. 2005 i Stechly et al. 2009).

Primerament es va determinar el perfil dels diferents transportadors que presentaven activitat a la línia cel·lular HT-29. El transport dels diferents nucleòsids no es pot mesurar de forma directa ja que les cèl·lules co-expressen la majoria dels transportadors solapant-se d'aquesta manera la selectivitat de substrat. És per això que per determinar el perfil d'activitat dels diferents transportadors concentratius de nucleòsids en les cèl·lules HT-29 es va mesurar el transport en presència de sodi i sense presència de sodi, per poder determinar la fracció del transport que provenia dels transportadors concentratius. Posteriorment, per distingir l'aportació dels diferents tipus d'hCNTs, es van realitzar una sèrie d'inhibicions creuades amb elevades concentracions de nucleòsids per crear un assaig de competència, tal i com s'ha descrit als materials i mètodes.

La línia cel·lular HT-29 va mostrar un transport sodi dependent (33 ± 4.9 i 35 ± 2.6 pmol/mg proteïna/minut per [3 H]-guanosina i [3 H]-citidina, respectivament) el qual un 60% era mediat per hCNT3 i un 40% per hCNT2. De fet, el transport de citidina (associat a hCNT1 i hCNT3) es va bloquejar totalment en presència de citidina i guanosina fredes (**Figura 27A**), demostrant que hCNT1 no es trobava expressat a les HT-29. Mentre que, el transport de guanosina (associat a hCNT2 i hCNT3) va ser parcialment bloquejat només amb concentracions elevades de citidina fredes, confirmant l'expressió d'hCNT2 i hCNT3 en aquesta línia cel·lular (**Figura 27B**). Per tant, en HT-29 el transport de citidina era mediat exclusivament per hCNT3. Conseqüentment, aquest nucleòsid va ser l'escollit per determinar l'activitat d'hCNT3 en futurs experiments.

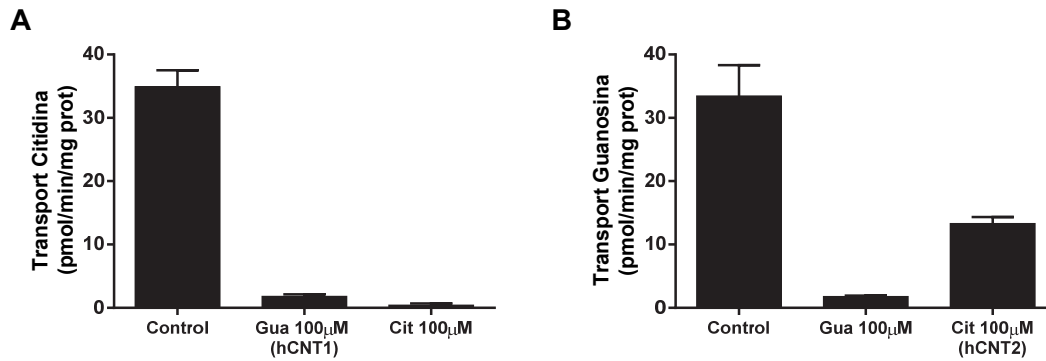


Figura 27. Caracterització del perfil de transportadors presents a la línia cel·lular HT-29. Transport sodi dependent en HT-29 de [3 H]-citidina (1 μ M, 1min) (A) i de [3 H]-guanosina (1 μ M, 1min) (B), a més, es van realitzar inhibicions creuades afegint al medi de transport guanosina freda o citidina freda (100 μ M), respectivament. Resultats expressats com la mitjana \pm SEM de mesures triplicades de 3 experiments independents.

El rol que podia tenir l'expressió de Gal-4 sobre l'activitat d'hCNT3 va ser estudiat amb un silenciament transitori de Gal-4. Primerament, calia doncs, validar el silenciament de Gal-4 a la línia cel·lular HT-29. Es va utilitzar un siRNA específic que s'unia al mRNA de la Gal-4 i la lipofectamina com a mètode químic de transfecció. Els nivells de silenciament a nivell de mRNA d'aquesta proteïna que es van aconseguir, van ser d'un 74% \pm 1% (**Figura 28A**). No obstant, tot i que a nivell proteic també s'observa una disminució, aquesta no és una disminució tant marcada (**Figura 28B**).

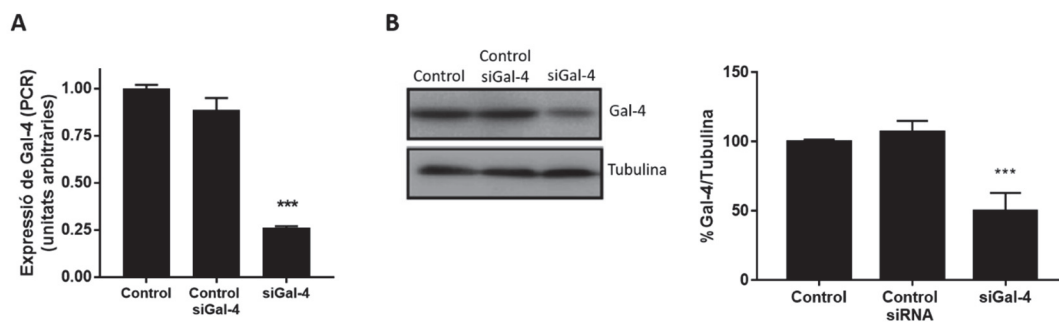


Figura 28. Comprovació de l'eficiència del silenciament de Gal-4. Les cèl·lules HT-29 van ser transfectades transitòriament amb siRNA específics de Gal-4 (S8155 i S8154 a 200nM cada un) (siGal-4) o un siRNA aleatori com a control negatiu a 400nM (Control siGal-4) respecte les cèl·lules no tractades (Control). Després de 48h, s'extreu el mRNA i la proteïna i s'analitzen mitjançant una RT-PCR quantitativa (C) o per *Western blot* (D). Mitjana de 3 experiments independents \pm SEM ***P<0.001

Arribats a aquest punt, un cop teníem les condicions que ens permetien silenciar Gal-4, es va estudiar quin efecte tenia aquesta situació sobre la capacitat transportadora d'hCNT3. Es va

poder observar que l'activitat del transportador hCNT3 disminuïa significativament, mentre que el control transfectat amb el siRNA aleatori no canviava la funció basal d'hCNT3 (**Figura 29**).

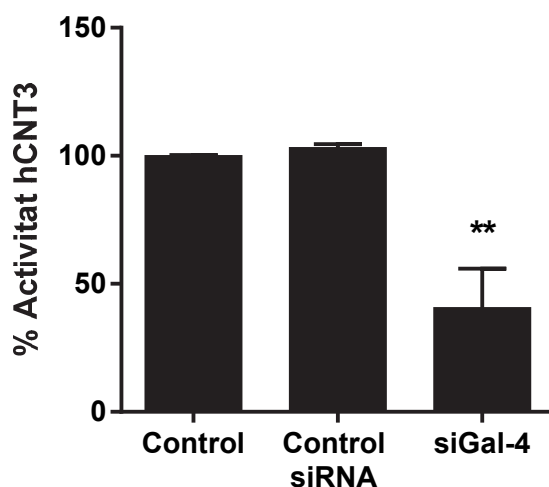


Figura 29. Activitat d'hCNT3 en condicions on Gal-4 es troba silenciada. Transport sodi dependent de citidina- ^3H] ($1\mu\text{M}$, 1min). Resultats basats en mesures de quadruplicats de 3 experiments independents. Resultats (mitjana \pm SEM) es mostren com el percentatge de l'activitat d'hCNT3 en condicions de Gal-4 silenciada amb siRNA específics de Gal-4 (S8155 i S8154 a 200nM cada un) (siGal-4) respecte les cèl·lules no tractades (Control) i les cèl·lules tractades amb un siRNA aleatori com a control negatiu a 400nM (Control siGal-4). ** $P < 0.01$

Seguidament, es va verificar que el fet d'inhibir l'expressió de Gal-4 no afectés l'expressió del transportador hCNT3 i conseqüentment hi hagués la disminució d'activitat d'hCNT3 observada a la (**Figura 29**). Si això fos així, els resultats anteriors s'explicarien sense involucrar necessàriament la proteïna Gal-4. Es van mesurar els nivells de mRNA i de proteïna mitjançant *Western blot* i una PCR de les dues proteïnes d'interès en la condició on el model cel·lular no expressava Gal-4 respecte aquelles cèl·lules control que no rebien cap tractament o aquelles que es transfectaven amb un siRNA aleatori com a control negatiu de la transfecció. Es va poder observar que hCNT3 no es veia alterat davant d'aquestes condicions (**Figura 30**). Paral·lelament vam confirmar per *Western blot* que Gal-4 mostrava una disminució de la seva expressió 48h després de ser silenciada (**Figura 30B**).

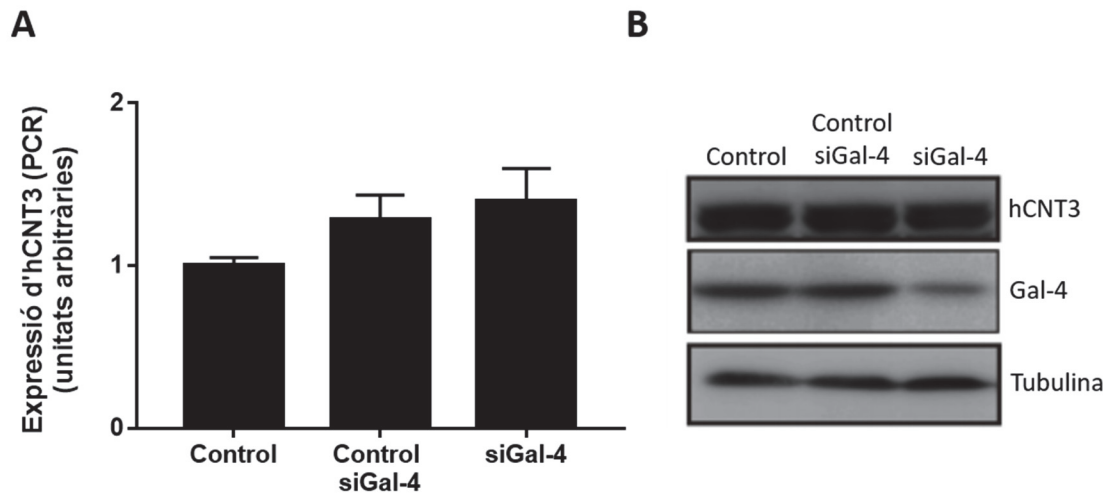


Figura 30. Expressió del transportador hCNT3 en condicions on Gal-4 es troba silenciada. Les cèl·lules HT-29 van ser transfectades transitòriament amb siRNA específics de Gal-4 (S8155 i S8154 a 200nM cada un) (siGal-4) o un siRNA aleatori com a control negatiu a 400nM (Control siGal-4) respecte les cèl·lules no tractades (Control). Després de 48h, s'extreu el mRNA i la proteïna i s'analitzen mitjançant una RT-PCR quantitativa (A) o per *Western blot*. Mitjana de 2 experiments independents \pm SEM. Es mostra un *Western blot* representatiu.

D'aquesta manera vam poder concloure que Gal-4 no regulava l'expressió del transportador i que, per tant, l'efecte de Gal-4 sobre hCNT3 en la seva funció era provocat per altres motius com, podria ser, la regulació del tràfic mitjançant Gal-4 d'hCNT3 a la membrana apical.

Aquests resultats eren esperançadors ja que apuntaven a la nostra hipòtesi inicial, la qual defensava la idea de que el transportador requeriria de Gal-4 per madurar i anar cap a membrana plasmàtica. Calia doncs, acabar de confirmar si aquesta hipòtesi es complia i el mecanisme a través del qual actuava Gal-4.

4.1.2 Mecanisme d'acció de Gal-4 per modificar l'activitat d'hCNT3

Un cop es va determinar que Gal-4 influïa en la capacitat transportadora d'hCNT3, es va voler entendre específicament quin era el procediment pel qual es produïa aquest efecte. Diverses observacions suggerien que les *N*- i *O*-glicosilacions a l'ectodomini de les proteïnes de membrana constituïen un senyal pel tràfic a la membrana apical d'aquestes proteïnes (Castillon et al. 2013, Naim et al. 1999, Huet et al. 2003 i Delacour et al. 2003). Ambdós tipus de glicosilacions serien crucials pel correcte tràfic d'algunes proteïnes transmembrana a la membrana apical dels enteròcits, procés que s'ha vist que estaria dirigit per Gal-4 (Delacour et al. 2005, Stechly et al. 2009 i Delacour et al. 2009). Per analitzar el paper de la glicosilació sobre l'activitat dels transportadors hCNT3, les cèl·lules HT-29 van ser tractades amb castanospermina, un alcaloide que bloqueja les *N*-glicosilacions durant les modificacions post-traduccionals

d'algunes proteïnes o amb 1-benzil-2-acetamido-2-deoxi-b-D-galactopiranosid (GalNac(α)-O-bn), que és un inhibidor de les *O*-glicosilacions. Segons s'observava la **Figura 31A**, els dos tipus de glicosilacions eren essencials per l'activitat d'hCNT3 ja que la inhibició d'aquests processos provocava una disminució significativa de la seva activitat transportadora. Addicionalment, es va voler demostrar si aquesta disminució de la funció d'hCNT3 es correlacionava amb una disminució de l'expressió de les dues proteïnes a la membrana plasmàtica. Tal i com es demostra a la **Figura 31B i C**, tant si s'inhibeix l'expressió de Gal-4, com si s'inhibeixen els dos tipus de glicosilacions d'hCNT3, s'observava una disminució significativa de la presència del transportador en la membrana plasmàtica.

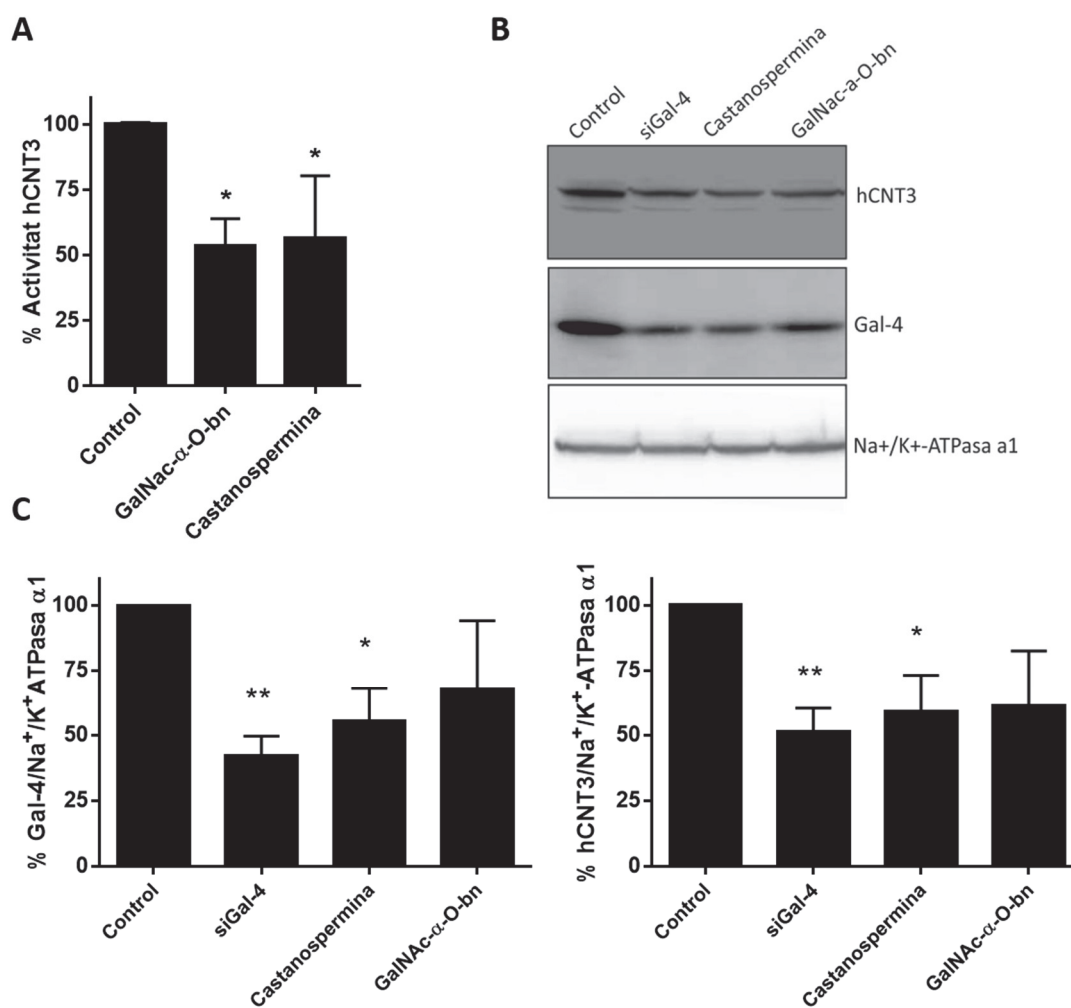


Figura 31. Rol de Gal-4 i de la glicosilació sobre la localització d' hCNT3 a la membrana plasmàtica. (A) Les cèl·lules HT-29 van ser tractades amb els inhibidors de la glicosilació: castanospermina (125nM) o GalNac(α)-O-bn (2mM) durant 24h. Es mesura el transport de sodi depenent de citidina-^{[3]H} (1 μ M, 1min) per triplicat. Mitjana de 3 experminets independents. (B) S'extreuen les proteïnes de membrana de les HT-29 sense cap tractament (Control), amb Gal-4 silenciada Gal-4 silenciada (siGal-4) o tractades amb castanospermina (125nM) o GalNac(α)-O-bn (2mM) per analitzar-les mitjançant un *Western blot* per detectar hCNT3, Gal-4 i Na⁺/K⁺-ATPasa α 1. Es mostra un *Western blot* representatiu de 3 experiments independents. (C) Densitometria dels 3 experiments independents, dades normalitzades al control (100%). Es mostra la mitjana \pm SEM per cada condició. *P<0.05; **P<0.01

Aquests resultats demostraven que la N-glicosilació era essencial per tal que Gal-4 pogués interaccionar amb glicoproteïnes. D'aquesta manera s'assegurava la seva endocitosi, per finalment realitzar el seu ordenament a la membrana apical juntament amb hCNT3. Les galectines són una família de proteïnes d'unió a carbohidrats amb una especificitat per aquelles glicoproteïnes que contenen senyals de reconeixement N-acetil-lactosamina. Els N-glicans, més que els O-glicans, contenen aquests senyals de reconeixement N-acetil-lactosamina, fet que seria consistent amb l'efecte menys clar que provoca la inhibició de les O-glicosilacions observat en aquest estudi (**Figura 31C**). S'ha demostrat que el paper dels N-glicans en l'ordenament dependent de Gal-4 de glicoproteïnes cap a la membrana apical a la línia cel·lular HT-29 és crucial (Morelle et al. 2009), resultats que corroborarien els resultats obtinguts.

4.2 Efecte de Galectina-4 en la localització d'hCNT3

És sabut que, en la línia cel·lular HT-29, Gal-4 és sintetitzada i alliberada majoritàriament per la part apical de la cèl·lula, per tant, és necessària una via endocítica de reciclatge a través de la membrana apical pel correcte manteniment d'aquelles proteïnes transmembrana que requereixin de Gal-4 per ser glicosilades (Stechly et al. 2009). Per determinar si l'efecte de Gal-4 sobre el transportador hCNT3 depèn del *pool* de Gal-4 que és secretada i posteriorment endocitada o depèn d'un altre *pool* citosòlic, es va mesurar l'activitat d'hCNT3 en HT-29 després de tractar aquestes amb o sense lactosa durant 4h a 37°C, un lligant conegut de les galectines que competeix amb Gal-4. La **Figura 32** mostra com la lactosa feia disminuir significativament l'activitat d'hCNT3 i l'addició de Gal-4 extracel·lular podia revertir la disminució d'activitat provocada per la lactosa i fins i tot augmentar el transport respecte la condició control. Quan s'estudiava l'activitat d'hCNT3 en una situació en la qual hi havia lactosa i Gal-4 extracel·lular, la part de l'activitat del transportador corresponent a la maduració per Gal-4 es veia bloquejat per la presència de lactosa.

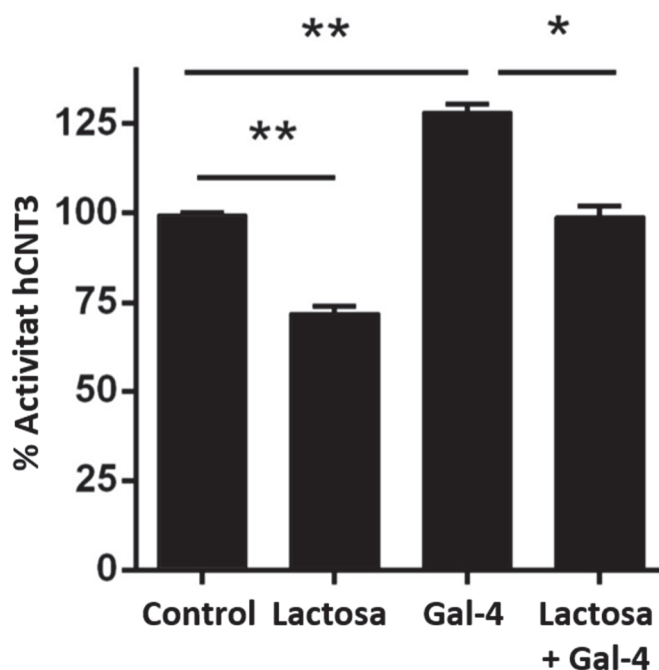


Figura 32. Rol de Gal-4 en l'ordenament i retenció d'hCNT3 a la membrana plasmàtica. Es van sembrar cèl·lules HT-29 i després de 24h es van tractar amb lactosa (30mM), en presència o absència de Gal-4 (5µg/mL) durant 4h i finalment es va mesurar el transport sodi depenent de citidina-[³H] (1µM, 1min) per triplicat. Mitjana de 3 experiments independents ±SEM. *p<0.05, **p<0.01

Com a control negatiu es va utilitzar la sacarosa ja que aquesta no interacciona amb les galectines, i es va poder observar que aquesta no tenia cap efecte sobre l'activitat d'hCNT3 (resultats no mostrats). Aquest resultat suggeria que la proteïna Gal-4 extracel·lular induïa significativament la funció del transportador, recolzant la idea que el procés d'endocitosi de Gal-4 té un paper principal sobre la regulació d'hCNT3.

Tots aquests resultats suggereixen que la proteïna hCNT3 depèn, almenys, de dos *pools* de Gal-4, un que un cop és sintetitzat es localitza intracel·lularment al citosol i a la membrana plasmàtica i un altre que pot ser exocitat i posteriorment endocitat per tal de tornar a la membrana. Ambdós podrien regular l'activitat d'hCNT3, tal i com ja s'ha descrit per altres glicoproteïnes en les quals Gal-4 és la responsable del tràfic cap a membrana (Stechly et al. 2009).

Com ja hem comentat i hem pogut observar a la **Figura 26**, les galectines són proteïnes citosòliques que manquen de senyals que les dirigeixin cap al reticle endoplasmàtic i tampoc són glicosilades, indicant que no maduren a través del sistema reticle endoplasmàtic-aparell de Golgi. No obstant aquestes proteïnes es troben al medi extracel·lular (Barondes et al. 1994) (Hughes 1999). És sabut que les cèl·lules del colon, particularment la línia cel·lular HT-29, pot secretar Gal-4 (Stechly et al. 2009). Els resultats obtinguts en aquest estudi són consistents amb

el concepte que la Gal-4 secretada pot ser, en part, la responsable de l'efecte observat sobre hCNT3 en el seu ordenament cap a membrana. Ja que aquest tràfic es veu bloquejat per la lactosa, un conegut lligant de les galectines, a més, el tràfic a membrana augmenta amb l'addició de Gal-4 al medi extracel·lular. Sota l'última condició, l'augment de l'activitat d'hCNT3 es veu reduïda a nivells basals quan es co-incuben les cèl·lules amb lactosa.

Adicionalment, com ja s'havia demostrat prèviament, la Gal-4 citosòlica també tenia un paper important en el tràfic d'hCNT3 a la membrana. Ja que, en aquest sentit, quan es silenciava l'expressió de Gal-4 s'observava una disminució de l'expressió del transportador a la membrana cel·lular (**Figura 31B**). A més, en les condicions de silenciament de Gal-4 es produïa una disminució del transport d'hCNT3 d'un 70% aproximadament. No obstant, quan es tractaven les cèl·lules amb GalNAc α -O-bn o lactosa (inhibint la via de reciclatge de la Gal-4) no s'observava aquesta disminució tant marcada de l'activitat hCNT3. Aquest resultat suggeria que la proporció de Gal-4 citosòlica jugava un paper important en l'activitat d'hCNT3 a la membrana plasmàtica. En aquest sentit, s'ha descrit un altre cas el qual la interacció de Gal-9 amb el transportador de glucosa GLUT2 augmenta la retenció del transportador a la membrana plasmàtica (Ohtsubo et al. 2005). De manera similar, els resultats obtinguts fins al moment mostrarien que la interacció de Gal-4 amb l'extrem N-terminal podria afectar a la vida mitja del transportador a la membrana plasmàtica.

Amb l'objectiu de seguir validant el paper de Gal-4 sobre el transportador, es van analitzar els nivells proteics d'hCNT3 a la membrana plasmàtica 24h després d'inhibir la síntesi de proteïnes amb cicloheximida en condicions basals i silenciant l'expressió de Gal-4 (**Figura 33**). Després d'aquest tractament s'observava que els nivells d'hCNT3 endogen en la membrana plasmàtica disminuïen molt lentament, anticipant una vida llarga d'aquesta proteïna, resultats que coincideixen amb altres estudis del grup realitzats amb models cel·lulars que eren transfectats amb hCNT3 (Errasti-Murugarren et al. 2009).

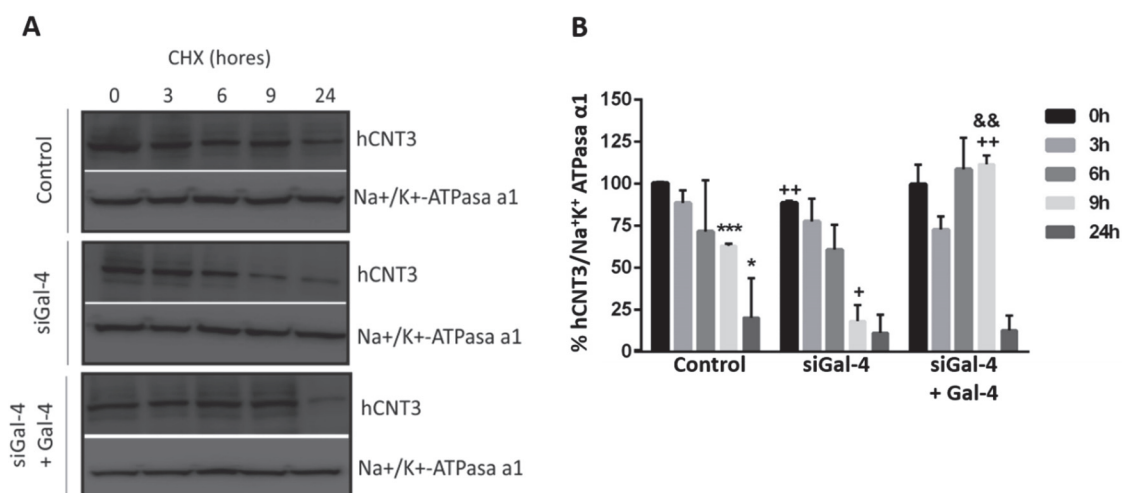


Figura 33. Rol de Gal-4 en l'ordenament i retenció d'hCNT3 a la membrana plasmàtica. (A) Les cèl·lules HT-29 van ser transfectades transitòriament amb siRNA específics de Gal-4 (S8155 i S8154 a 200nM cada un) o un siRNA aleatori com a control negatiu a 200nM. Després de 48h, les cèl·lules van ser tractades amb cicloheximida (10µg/mL) i es va afegir Gal-4 (5µg/mL). Les proteïnes de membrana es van extreure en punts diferents desde 0 a 24h i es va analitzar l'expressió d'hCNT3 per *Western blot*. Es mostra un experiment representatiu de 3 experiments independents. (B) Densitometria de 3 experiments independents. Valors normalitzats al control (100%) i es mostren les mitjanes ± SEM de cada condició. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 respecte l'expressió d'hCNT3 al punt inicial (sense cicloheximida). +P<0.05; ++P<0.01 respecte l'expressió d'hCNT3 a la membrana al mateix punt de temps en condicions control. φφ P<0.01 expressió d'hCNT3 a la membrana cel·lular respecte el mateix punt de temps en condicions de silenciament de Gal-4.

El silenciament de Gal-4 provocava una acceleració de la disminució de la quantitat de proteïna expressada a la membrana, mentre que l'addició de Gal-4 al medi revertia aquesta tendència (**Figura 33**). La quantitat de la subunitat α1 de la proteïna Na⁺/K⁺-ATPasa es va utilitzar com a control endogen, el qual no es va veure alterat en les diferents condicions durant l'experiment, resultat consistent amb la vida mitja que se li atribueix per aquesta proteïna (Rajasekaran et al. 2004).

4.3 Efecte de Galectina-4 sobre l'activitat d'hCNT3 en cèl·lules polaritzades

Per avaluar si l'efecte de Gal-4 sobre l'activitat d'hCNT3 era, d'alguna manera, dependent de la polaritat de la cèl·lula, es va estudiar la localització de les dues proteïnes a les HT-29 després de que aquestes haguessin crescut en filtres *transwell* fins arribar a una confluència, la qual hagués generat una barrera epitelial. Ambdues proteïnes colocalitzaven a la membrana apical (**Figura 34A**) i no es va observar immunofluorescència d'hCNT3 a la membrana basal. Conseqüentment, l'activitat del transportador hCNT3 es va veure que estava associada majoritàriament a la membrana apical (**Figura 34B**), localització esperada per la funció fisiològica que té aquesta

proteïna. A més, tal i com mostra la **Figura 34C**, el silenciament de Gal-4 inhibeix específicament el transport apical d'hCNT3. Aquests resultats suggeririen que Gal-4 seria la responsable de que hCNT3 arribi correctament a la membrana apical d'una cèl·lula polaritzada per poder dur a terme la seva funció.

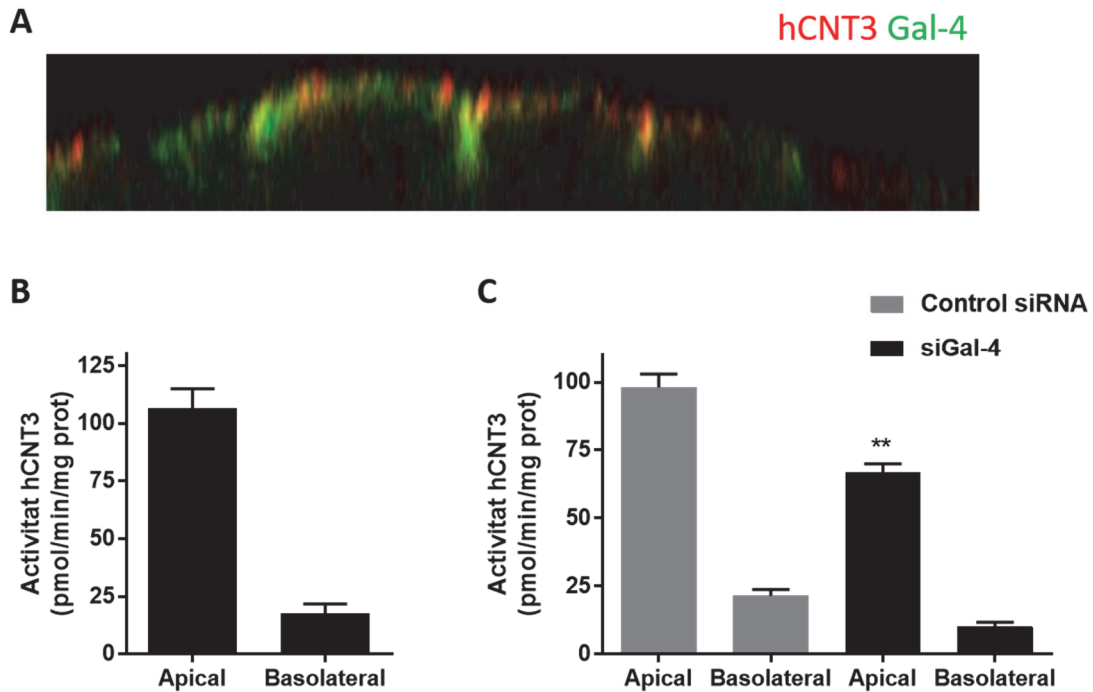


Figura 34. Rol de Gal-4 sobre hCNT3 en cèl·lules HT-29 polaritzades. A) Imatges x-z de cèl·lules HT-29 polaritzades cultivades en filtres *transwell* durant 10 dies. Les cèl·lules van ser fixades, permeabilitzades i es va immunodetectar Gal-4 i hCNT3 amb anticossos α Gal-4 i Alexa Fluor 488 (verd) i α hCNT3 i Alexa Fluor 488 (vermell). La imatge presentada és representativa del solapament de regions de verd i de vermell a la després de l'anàlisi amb el software *Image J*. Es mesura el transport sodi dependent mediat per hCNT3 de citidina- 3 H] (1μ M, 1min) en els compartiments apical i basolateral de cèl·lules HT-29 polaritzades control (sense tractament) (B) o en condicions de silenciament de Gal-4 (C). Es mostra la mitjana \pm SEM de 3 experiments independents mesurats per triplicat. ** $P < 0.01$

Altres estudis del nostre grup recolzen la idea que l'extrem N-terminal de les proteïnes hCNTs contenen dominis essencials pel correcte ordenament i la inserció apical en epitelis polaritzats. (Errasti-Murugarren et al. 2009, Pinilla-Macua et al. 2012 i Errasti-Murugarren et al. 2010a). No obstant, els mecanismes concrets que regulen aquests processos segueixen sent desconeguts. En aquest estudi s'ha pogut identificar Gal-4 com a proteïna d'unió a hCNT3 i s'ha demostrat que Gal-4 promou l'ordenament del transportador a la membrana plasmàtica. A més, aquesta és la primera demostració directa que una lectina té un paper en tràfic d'un transportador cap a la membrana plasmàtica apical.

4.4 Altres models cel·lulars

Fins al moment, s'ha estat treballant amb un únic model cel·lular, les HT-29, però es va voler donar més solidesa a totes aquestes observacions i es va estudiar el cas de l'altra línia cel·lular de còlon, les Caco2. Com ja vam poder observar anteriorment, aquesta línia cel·lular no expressava endogenament Gal-4 (**Figura 24**). Resultat que coincidia amb les dades obtingudes a l'estudi de Satelli et al. 2011, on confirmaven que detectaven nivells de mRNA de Gal-4 molt baixos, però tampoc la podien detectar a nivell proteic.

Amb aquests resultats ens vam plantejar on es localitzava el transportador hCNT3 si les cèl·lules Caco-2 no presentaven Gal-4 que permetés la maduració i el tràfic d'hCNT3 cap a membrana on realitzar la seva funció. Per tal de localitzar el transportador es va utilitzar la tècnica de la immunofluorescència amb dos anticossos, un monoclonal generat al nostre laboratori (Fernández-Calotti et al. 2012) i un anticòs comercial (Sigma-HPA024729). Les imatges que en deriven d'aquesta tècnica no mostraven un senyal clar a la membrana plasmàtica (**Figura 35**), dada que coincidia amb la manca d'activitat d'hCNTs detectada en aquesta línia cel·lular. En línies generals, la majoria de línies cel·lulars no retenen activitat hCNT ja que la seva expressió és molt dependent de la diferenciació cel·lular (Pastor-Anglada and Pérez-Torras 2018).

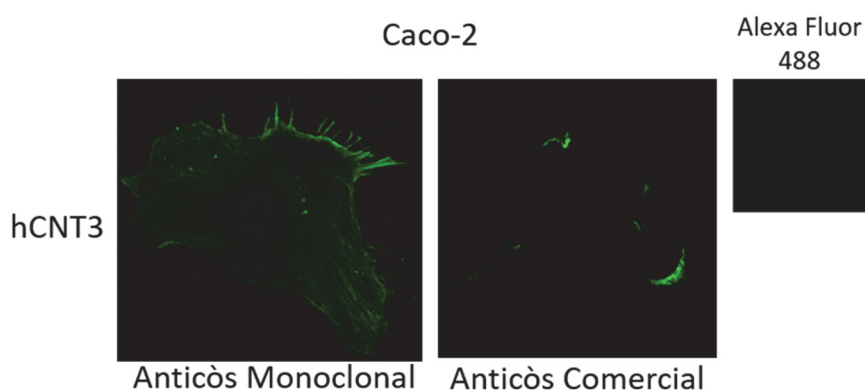


Figura 35. Immunocitoquímica d'hCNT3 a la línia cel·lulars de còlon Caco2. Cèl·lules de la línia Caco-2 va ser fixada i permeabilitzada per la posterior detecció de la proteïna hCNT3 endògena amb dos anticossos específics per hCNT3: un anticòs monoclonal general al nostre laboratori i un anticòs comercial (Sigma-HPA024729). En ambdós casos es va utilitzar l'anticòs secundari Alexa Fluor 488 (verd). Es mostra la imatge del control de l'anticòs secundari en petit.

La línia cel·lular Caco-2 mancava, doncs, de Gal-4 però a més, tampoc tenia una localització a membrana del transportador. Sabent que l'activitat d'hCNT3 quan les cèl·lules formaven una monocapa en el cultiu cel·lular era pràcticament nul·la, es va intentar detectar algun tipus d'activitat relacionada amb els transportadors concentratius de nucleòsids realitzant un creixement polaritzat de les cèl·lules Caco-2. Ja que es va pensar que si el transportador hCNT3

no era capaç d'arribar a la membrana plasmàtica quan les cèl·lules creixen en monocapa, fer-les créixer en *transwell* era una opció per redirigir el tràfic dels transportadors cap a membrana ja que la seva activitat depèn d'epitelis diferenciats i mostren una relació amb la polarització de la cèl·lula generant un flux vectorial del transport de substrats. Però tampoc es va poder detectar una activitat dels transportadors concentratius de nucleòsids en aquestes condicions (resultats no mostrats).

En general, els models cel·lulars que retenguin l'expressió dels transportadors de nucleòsids i, més important, que retenguin la seva funció són molt limitats, limitació constant que ens trobem alhora de treballar amb aquest tipus de proteïnes, ja que l'expressió d'hCNT, com ja hem comentat, és altament dependent de l'estat de diferenciació de la línia cel·lular utilitzada. En principi, si no es detecta una activitat a la membrana plasmàtica (ni apical, ni basolateral) implicaria que el transportador no es trobaria situat a la membrana i que per tant, es localitzaria al citosol. Aquest fenomen semblaria ocórrer a la línia cel·lular Caco-2, així com també li passa a les cèl·lules primàries de LLC, les quals expressen hCNT3 majoritàriament al citosol (Mackey et al. 2005 i Fernández-Calotti et al. 2012).

Per últim, basant-nos en els resultats obtinguts amb la línia cel·lular HT-29, els quals demostrarien que Gal-4 està implicada en el tràfic d'hCNT3 cap a membrana, es va estudiar si l'activitat d'hCNT3 podia emergir en les Caco-2 després de l'addició de Gal-4. Per aquest propòsit, s'incubaren les cèl·lules durant 4h amb Gal-4 humana recombinant (5µg/mL) 24h hores després de sembrar les cèl·lules. Els resultats obtinguts mostraren que no existia cap activitat relacionada amb els transportadors concentratius de nucleòsids.

D'aquesta manera es podria anticipar que existiria algun defecte en el tràfic del transportador cap a membrana, tal i com s'ha suggerit prèviament per les cèl·lules de LLC (Mackey et al. 2005 i Fernández-Calotti et al. 2012).

5 Implicació en la clínica

5.1 Transport de 6-MP per hCNT3 en HT-29

Com ja s'ha comentat prèviament, hCNT3 és el transportador amb més capacitat concentrativa i amb una àmplia selectivitat de substrat. És per això que pot ser el responsable del transport de molts fàrmacs derivats de nucleòsids com les tiopurines, utilitzades pel tractament de malalties inflamatòries intestinals (en el cas que ens correspon en aquest treball, la malaltia de Crohn). Per demostrar que el transportador hCNT3 era capaç de transportar 6-MP en les cèl·lules HT-29, inicialment es va monitoritzar l'habilitat d'aquesta tiopurina per inhibir el transport de citidina mediat per hCNT3 (**Figura 36A**), el qual se sap que és mediat exclusivament per hCNT3 en la línia cel·lular HT-29 (**Figura 27**). La IC_{50} de la inhibició d'hCNT3 per 6-MP que es va trobar, en les cèl·lules HT-29, va ser de $124 \pm 5\mu\text{M}$.

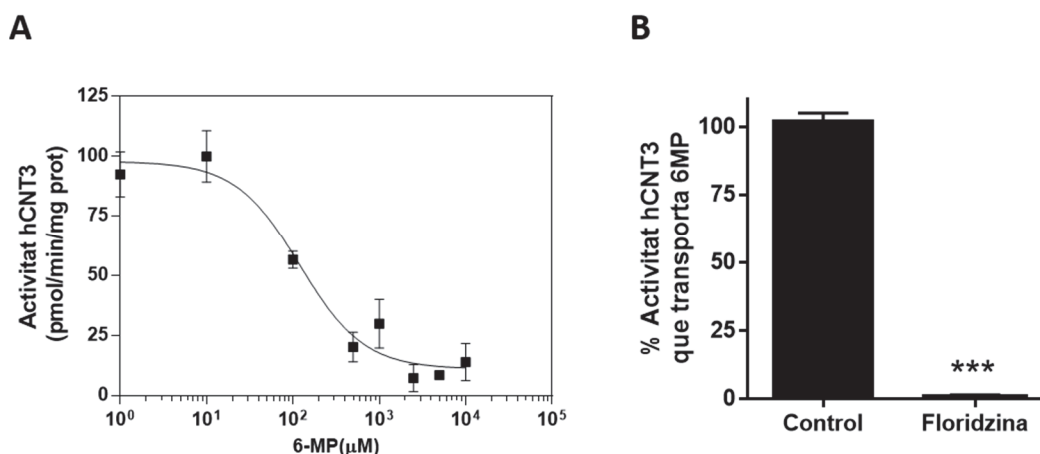


Figura 36. Rol d'hCNT3 en el transport de 6-MP. (A) Es mesura el transport de citidina- ^3H ($1\mu\text{M}$, 1min) en les HT-29 en presència de diferents concentracions de 6-MP, en un medi amb clorur de sodi o clorur de colina. El transport de mediat per hCNT3 es calcula com la diferència de transport obtingut en ambdós tipus de medi. Valors normalitzats respecte el transport en absència de 6-MP i expressats com la mitjana de quadruplicats \pm SEM de 3 experiments independents. (B) Transport directe de 6-MP- ^{14}C ($1\mu\text{M}$, 1min) en les HT-29 en absència (control) i presència de flordidzina ($200\mu\text{M}$). Resultats normalitzats en percentatge. Mitjana \pm SEM de 5 experiments independents, cada un realitzat en quadruplicat. *** $P < 0.001$

Seguidament, es va voler comprovar si aquest valor per la IC_{50} obtingut es veia alterat quan es silenciava l'expressió de Gal-4. Però ens vam trobar que l'activitat residual obtinguda era massa baixa per permetre el càlcul del valor IC_{50} (resultats no mostrats). Això era degut, probablement, al fet que al no tenir Gal-4 el transportador no podia madurar, arribar a membrana i realitzar la

seva funció. A més, s'ha de tenir en compte la dificultat que representa mesurar l'activitat específica dels transportadors concentratius de nucleòsids. Ja que aquesta mesura de transport dels hCNTs no es pot fer directament, sinó que requereix de dues mesures de transport independents de les quals s'ha de restar un valor de l'altre: el que prové del medi amb colina (activitat ENTs) del obtingut amb el medi que conté sodi (activitat ENTs i CNTs).

Posteriorment, es va analitzar el transport de la tiopurina marcada radioactivament amb triti i es va comprovar que aquest quedava totalment inhibit per flordizina, un fàrmac que bloqueja l'activitat d'hCNT3 (Errasti-Murugarren et al. 2007) (**Figura 36B**). Tot i que la flordizina no inhibeix específicament hCNT3, aquesta era la isoforma que presentava més activitat a les HT-29 i per tant, la interacció amb les altres dues isoformes (hCNT1 i hCNT2) era poc probable que succeís o si succeïa seria un transport pràcticament negligible. En aquest cas, també es va provar el transport de 6-MP sota condicions on Gal-4 es trobava inhibida i, consistent amb el que em comentat anteriorment, després de silenciar l'expressió de Gal-4, no es va observar un transport de 6-MP mediat per hCNTs (resultats no mostrats), segurament per les mateixes causes mencionades prèviament.

Aquests resultats suggerien doncs, que l'entrada de 6-MP a la línia cel·lular HT-29 es produïa majoritàriament pel transportador hCNT3.

S'ha descrit que Gal-4 té un paper en la patogènesis de les IBD. Concretament s'ha vist que Gal-4 estimula la diferenciació de les cèl·lules T CD4⁺ de ratolins amb colitis per produir IL-6, una citocina inflamatòria que contribueix a la progressió de la malaltia. A més, l'administració d'un anticòs contra Gal-4 a ratolins, els quals han desenvolupat una malaltia intestinal inflamatòria, reprimeix el desenvolupament de la malaltia (Hokama et al. 2004). No obstant, la informació sobre el paper que juga Gal-4 en les malalties inflamatòries intestinals presenta controvèrsia, ja que l'estudi de Paclik et al. 2008 mostra que Gal-4 redueix la secreció de citocines pro inflamatòries, com ara la IL-7. A més, s'ha vist que Gal-4 millora la inflamació de la mucosa, indueix l'apoptosi de cèl·lules T de la mucosa i disminueix la secreció de citocines pro inflamatòries en un model experimental de colitis. Conseqüentment Gal-4 modula la inflamació intestinal. De fet, Gal-4 s'ha proposat com un nou agent anti-inflamatori que pot ser terapèuticament efectiu en malalties on es trobi alterada la proliferació i apoptosi de les cèl·lules T, com ocorre a les IBD (Paclik et al. 2008).

L'adenosina, que és una peça clau en la regulació de les respostes inflamatòries, és un substrat preferent del transportador hCNT3 i, paradoxalment, 6-MP s'ha vist que exerceix el seu efecte terapèutic en malalties inflamatòries, almenys en part disminuint la concentració intracel·lular

d'ATP i augmentant els nivells d'adenosina extracel·lulars (Cronstein et al. 1999). El fet que aquest efecte sigui el resultat del bloqueig d'hCNT3 i la seva dependència en l'expressió de Gal-4 és una hipòtesi que necessitaria més estudis.

Va ser precisament en aquest context, que per últim, vam estudiar si aquesta interacció entre Gal-4 i el transportador hCNT3 podia tenir alguna relació en la clínica. Considerant que s'ha vist que la mucosa inflamada altera l'expressió gènica en les malalties inflamatòries intestinals (Wojtal et al. 2009, Jahnel et al. 2014, Gerich and McGovern 2014, Llopis et al. 2009 i Pérez-Torras et al. 2016), ens vam preguntar si els nivells de Gal-4 i hCNT3 podien estar alterats en un teixit inflamat de còlon en pacients de Crohn. Per dur a terme aquest estudi, es va analitzar l'expressió proteica d'hCNT3 i Gal-4 de 6 mostres de còlon inflamat obtingudes de pacients amb la malaltia de Crohn i de 10 mostres de teixits sans obtinguts d'una secció de còlon no afectada en pacients que tenien càncer colorectal. Tot i que la variabilitat de l'expressió d'hCNT3 era molt elevada en les mostres de còlon inflamat, Gal-4 mostrava una expressió més homogènia i fins i tot significativament més elevada que l'observada en les mostres de teixit de còlon sa (**Figura 37**).

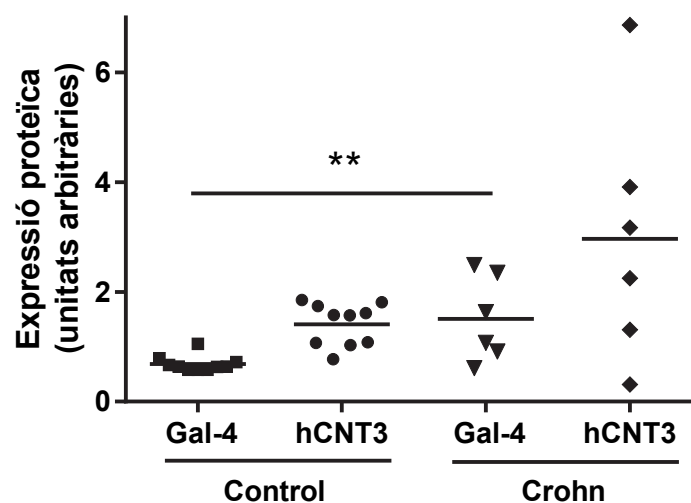


Figura 37. Expressió de Gal-4 i hCNT3 en mostres de còlon humà aïllades de 6 pacients amb la malaltia de Crohn i 10 mostres de còlon sa. L'expressió de proteïnes va ser analitzada mitjançant *Western blot* i quantificada per densitometria. Es mostren els punts individuals de les mostres procedents de teixit sa i de Crohn. **P<0.01

En termes generals, es podria concloure que, tot i haver una inflamació, l'expressió de Gal-4 i hCNT3 no es troba alterada en pacients amb la malaltia de Crohn, de manera que el tractament

mitjançant tiopurines no es veuria afectat ja que el sistema per captar el fàrmac es trobaria intacte (Fernández-Calotti et al. 2012).

En resum, el nostre treball en relació aquest capítol de la tesi suggereix que l'expressió de Gal-4 en cèl·lules de còlon pot modular la localització i la retenció del transportador de nucleòsids hCNT3 a la membrana apical. El transportador hCNT3 pot ser un transportador de nucleobases rellevants en farmacologia com la 6-MP, tot i que la interacció entre les mercaptopurines amb les proteïnes hCNTs necessita més estudis. Consistent amb els nostres resultats, el silenciament específic d' hCNT3 en la línia cel·lular MOLT4 resultava en una disminució significativa de l'entrada de la 6-MP (Fotoohi et al. 2006). D'aquesta manera, Gal-4, a través de la seva interacció amb hCNT3, no només podria controlar el flux de nucleòsids a través de l'epiteli, sinó que també regularia l'entrada d'anàlegs derivats de nucleòsids anti-inflamatoris, com la 6-MP, actualment utilitzat pel tractament de les IBD. Conseqüentment, sembla que la interacció entre Gal-4 i hCNT3 semblaria crucial per la correcta inserció i retenció del transportador a la membrana apical dels colonòcits, i podria, eventualment, determinar la biodisponibilitat i la farmacodinàmica d'aquest fàrmac.

L'expressió del mRNA de transportadors de nucleòsids farmacològicament rellevants s'ha vist alterada en el colon de pacients amb la malaltia de Crohn o colitis ulcerativa (Wojtal et al. 2009), tot i que no s'han realitzat anàlisis a nivell proteic. Això és clínicament important per determinar si l'expressió d'hCNT3 i Gal-4 és, almenys, retinguda en una mucosa inflamada. Els resultats de la present tesi mostren que, a part d'haver una elevada heterogeneïtat pel que fa a l'expressió de proteïnes entre diversos pacients amb la malaltia de Crohn, l'expressió de Gal-4 i hCNT3 no es veu disminuïda significativament. Aquests resultats anticiparien la relació funcional i la integritat d'aquest sistema en mucoses inflamades, convertint aquestes proteïnes possibles dianes terapèutiques.

CAPÍTOL 2

ADENOSINA

QUINASA

1 Introducció

Amb la identificació de Gal-4 a la línia cel·lular HT-29 com a proteïna d'interacció d'hCNT3 vam poder demostrar que el transportador hCNT3 requeria d'una maduració post-traduccional que li permetia arribar a la membrana plasmàtica on realitzar la seva funció. No obstant, la interacció amb Gal-4 no permetia anticipar cap nova funció pel transportador. És per això que es va voler estudiar si el transportador hCNT3 no només internalitzava nucleòsids, sinó si podia, a més, regular l'entrada d'aquests provocant a la cèl·lula un efecte biològic diferent. Amb altres paraules, el fet de trobar una proteïna que interaccionés amb hCNT3 ens va permetre hipotetitzar que darrera del transportador hi hagués un interactoma, és a dir, altres proteïnes d'unió amb aquest aportant a la cèl·lula nous mecanismes de regulació.

Estudis previs del grup havien demostrat que l'àcid trans-retinoic (ATRA) incrementava l'activitat del transportador hCNT3 augmentant el seu tràfic cap a la membrana plasmàtica en un model de leucèmia limfàtica crònica (LLC), la línia cel·lular MEC1. Aquest mecanisme era mediat per l'acció de TGF- β 1, el gen del qual era transcripcionalment activat per ATRA d'una manera dependent de p38. TGF- β 1 actuava a través de l'activació d'ERK1/2 i de la GTPasa RhoA per tal de promoure el tràfic del transportador a la membrana (Fernández-Calotti and Pastor-Anglada 2010). La Fludarabina, un anàleg de nucleòsids, ha sigut durant molt de temps el tractament utilitzat pel tractament de la LLC (Keating et al. 1989 i Elter et al. 2006). Resultats previs del grup demostren que les cèl·lules primàries de LLC co-expressaven hENT1, hENT2, hCNT2 i hCNT3, tot i que l'acumulació de Fludarabina es produïa majoritàriament, però no exclusivament, pels transportadors de tipus ENTs (Molina-Arcas et al. 2003). Pel que fa els transportadors concentratius, només hCNT3 podia transportar Fludarabina (Pastor-Anglada et al. 2004). A més es va demostrar que el tractament de la població de pacients resistents a la Fludarabina amb ATRA promovia el tràfic d'hCNT3 a la membrana cel·lular, incrementant així el transport del fàrmac, i com a conseqüència augmentava el seu efecte citotòxic (Fernández-Calotti and Pastor-Anglada 2010 i Fernández-Calotti et al. 2012).

Per totes aquestes evidències es va considerar que les cèl·lules primàries de LLC podien ser una bona opció com a font de proteïnes candidates d'interacció amb el transportador hCNT3.

2 Identificació de proteïnes candidates

2.1 Assaig *pull-down*

Es va seguir el mateix procediment que el realitzat al capítol 1, és a dir, un *pull-down* amb l'extrem N-terminal del transportador hCNT3 fusionat a la proteïna GST, però en aquest cas, la font de proteïnes provenia d'un homogenat de cèl·lules primàries de LLC. En aquest cas, les mostres provenen de pacients amb LLC de l'Hospital Clínic de Barcelona, les quals havien estat facilitades amb el consentiment dels seus pacients.

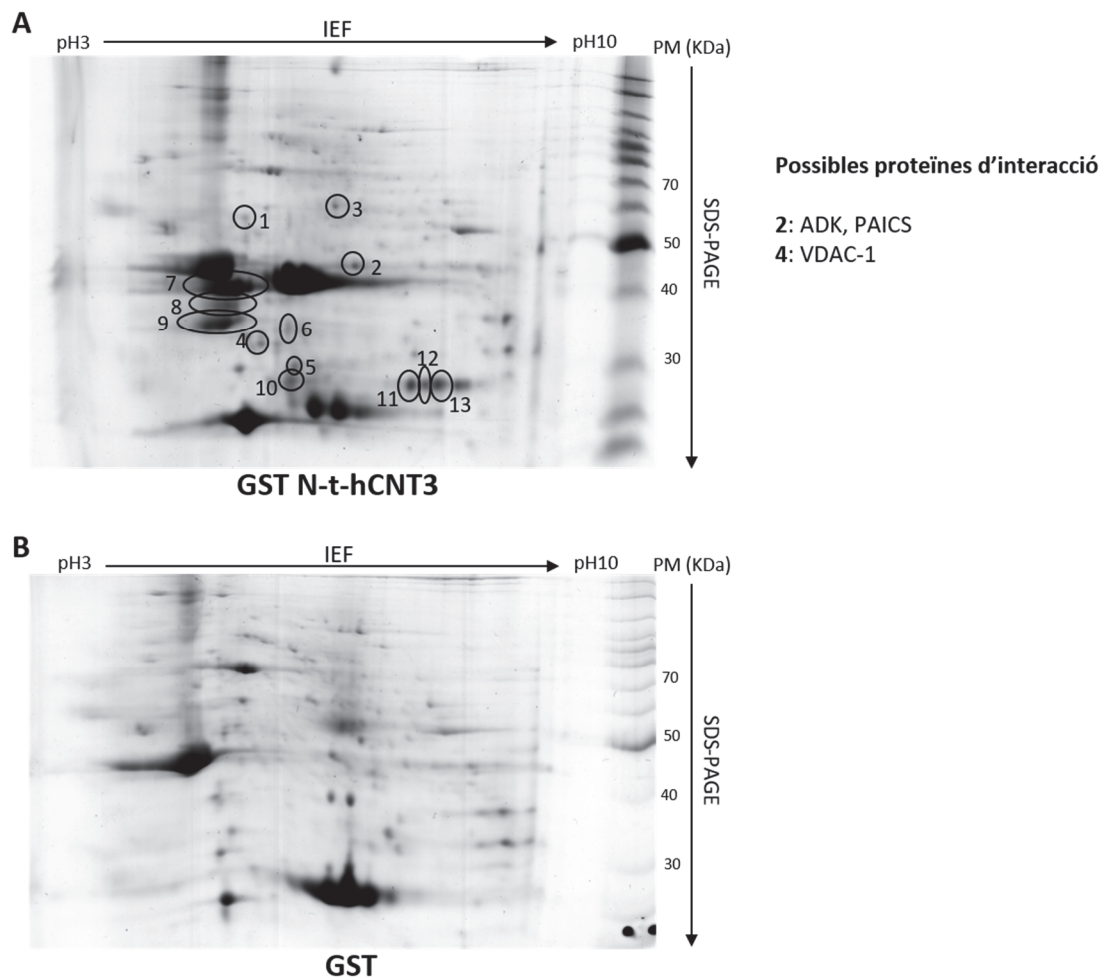


Figura 38. Electroforesi bidimensional de proteïnes provinents de cèl·lules primàries de LLC amb tinció de plata. Tira IPG 24cm gradient (pH) 3-10. (A) GST *pull-down* utilitzant l'extrem N-terminal d'hCNT3. Cada *spot* va ser numerat i analitzat per MALDI-TOF. En aquesta figura es destaquen les proteïnes candidates obtingudes més rellevants. (B) Control negatiu del GST *pull-down* utilitzant GST sense unir-hi covalentment la cua N-terminal d'hCNT3.

Tal i com s'observa a **Figura 38**, es van separar les proteïnes per punt isoelèctric i pes molecular per tal d'identificar cadascuna d'elles. Els resultats obtinguts van ser analitzats per proteòmica mitjançant un anàlisi per espectrofotometria de masses MALDI-TOF.

2.2 Proteïnes candidates

D'aquests resultats van sorgir multitud de possibles proteïnes candidates les quals es van estudiar fins a trobar les tres que semblaven tenir més relació amb el transportador. Aquestes proteïnes van ser: l'Adenosina Quinasa (ADK), la Fosforibosil Aminoimidazol Succinocarboxamida Sintetasa (PAICS o ADE2) i el Canal d'Anions dependent de Voltatge (VDAC-1).

PAICS és una proteïna bifuncional que catalitza el sisè i setè pas de la síntesi *de novo* de purines (**Figura 3**), generant SAICAR com a producte de la reacció el qual és metabolitzat per l'enzim Adenilsuccinat Liasa (ADSL) formant AICAR. L'ADSL és un enzim que s'inhibeix per AMP, que és el producte natural de la reacció enzimàtica catalitzada per l'ADK (Pedley and Benkovic 2017). Com ja s'ha comentat a la introducció, PAICS forma un complex multiproteïc amb d'altres proteïnes, anomenat purinosoma, per tal de fer més eficient la via metabòlica que catalitza (An et al. 2008). El purinosoma, doncs, actuaria com un metaboló, la formació del qual es produiria quan hi hagués baixes concentracions de purines al medi extracel·lular o durant la progressió del cicle cel·lular per tal de suplir les necessitats de nucleòsids purínics (An et al. 2008 i Chan et al. 2014). Per tant, PAICS i la seva possible interacció amb un transportador de nucleòsids podria tenir un sentit biològic per la cèl·lula ja que hCNT3 podria actuar com un sensor per PAICS de manera que aquest enzim pogués conèixer l'accessibilitat de nucleòsids purínics, activant-se en el cas d'una demanda de nucleòsids.

Els **canals d'anions dependents de voltatge** (VDAC) són una classe de canals iònics situats a la membrana mitocondrial externa, una membrana que actua com un filtre molecular per soluts hidrofílics ja que és molt permeable tot i que no permet el pas de molècules amb un pes molecular elevat. Aquesta permeabilitat està causada per la presència d'aquestes proteïnes anomenades VDAC, de l'anglès *Voltage-Dependent Anion-selective Channel* (Schein et al. 1976 i Benz 1994). Considerem la possibilitat que una proteïna mitocondrial pugui estar interaccionant amb un transportador de nucleòsids, que s'expressa a la membrana plasmàtica, ja que existeix un debat sobre si aquests canals també es podrien trobar a la membrana plasmàtica (De Pinto et al. 2010 i Sabirov and

Merzlyak 2012). Està ben establert que VDAC actua com un canal aniònic i com una proteïna *scaffold* a la membrana mitocondrial, per tant, és seductor pensar que VDAC també pugui tenir aquesta funció d' *scaffold* a la membrana plasmàtica. Aquests efectes podrien venir donats per la pròpia proteïna o per la seva associació amb altres proteïnes. Com ocorre al mitocondri, VDAC a la membrana plasmàtica podria tenir el potencial per unir-se a un ampli ventall d'altres proteïnes de membrana i depenent dels complexos formats podrien realitzar funcions diferents (De Pinto et al. 2010).

L'**adenosina quinasa** (ADK) és una fosfotransferasa activa en forma de monòmer que catalitza la fosforilació d'adenosina a adenosina monofosfat (AMP) utilitzant l'ATP com a donador del fosfat inorgànic, encara que altres nucleòsids purínics trifosfat també poden actuar com a donadors, com ara el GTP (Park and Gupta 2008 i Rotllan and Miras 1985). L'ADK, que té una K_M baixa (40nM), és l'enzim majoritari que metabolitza l'adenosina en condicions basals, amb l'objectiu de mantenir els nivells d'adenosina baixos (Boison et al. 2010). D'aquesta manera, l'expressió d'ADK és més elevada en aquells òrgans, en particular fetge i placenta (Andres and Fox 1979), que tenen unes necessitats majors d'eliminació metabòlica de l'adenosina (Finkelstein and Martin 1986). D'altra banda l'Adenosina Deaminasa (ADA), l'altre enzim capaç de metabolitzar l'adenosina, té una K_M tres ordres de magnitud més elevada (70 μ M) que l'ADK. Per tant, aquesta ruta metabòlica només s'activa quan els nivells d'adenosina són molt elevats com per exemple, en una situació patològica on l'activitat d'ADK es trobi saturada (Boison et al. 2010). En definitiva, l'ADK és l'enzim principal encarregat de regular homeostàticament les concentracions d'adenosina extracel·lular. Concentracions que han d'estar molt ben regulades ja que s'ha demostrat que en models animals d'epilèpsia i isquèmia l'ADK és un element clau per mantenir les concentracions d'adenosina i per tant, és un enzim que emergeix com una diana terapèutica per afavorir la neuroprotecció (Pignataro et al. 2007 i Pignataro et al. 2008). Tot i així, és sabut que l'ADK té altres funcions com la de facilitar les reaccions de metilació. L'adenosina és un producte final obligatori de les reaccions de transmetilació, que impliquen la transferència d'un grup metil provinent de S-adenosilmetionina (SAM) a un grup metil acceptor (per exemple etanolamina o DNA) resultant amb la formació de SAH, que alhora pot ser hidrolitzat en adenosina i homocisteïna. De manera important, les reaccions de transmetilació només es poden mantenir quan l'adenosina és constantment eliminada per l'ADK (Mato et al. 2008). En canvi, si l'adenosina no s'elimina constantment a través d'ADK, l'equilibri termodinàmic recau favorablement a

la formació de SAH, que és un potent inhibidor de les reaccions de transmetilació. La deficiència d'ADK en ratolins causa una esteatosi hepàtica neonatal i una mortalitat postnatal temprana (Boison et al. 2002).

El principal substrat de l'ADK, l'adenosina, és hidrofílic i per tant requereix de sistemes de transport específics per permetre el seu trànsit a través de la membrana plasmàtica. S'ha descrit que tant les proteïnes hENT com hCNT2 i hCNT3 realitzen aquest transport (Thorn and Jarvis 1996, Podgorska et al. 2005 i Pastor-Anglada et al. 2018). A més, s'ha vist que en colangiòcits existeix una comunicació entre els transportadors i receptors d'adenosina i l'ATP, el seu precursor extracel·lular natural. Aquesta comunicació influeix en la distribució i regulació dels transportadors en aquest tipus cel·lular i provoca una modulació en la fisiologia del colangiòcit (Godoy et al.2014).

En conjunt, totes aquestes dades ens van portar a escollir l'ADK com la primera proteïna d'interacció amb el transportador hCNT3 a ser estudiada. Aquesta unió podria tenir un efecte biològic en la cèl·lula afectant d'alguna manera l'eficiència d'entrada d'adenosina, així com la seva fosforilació, per tal de regular els nivells extracel·lulars d'aquest nucleòsid. És important destacar que, la proteïna PAICS també va ser considerada una bona candidata per interaccionar amb el transportador hCNT3. Per aquest motiu, es va desenvolupar tot un projecte paral·lel amb aquesta proteïna dins del marc d'una altra tesi doctoral del grup (Tesi Doctoral Liska Caviedes).

3 Validació bioquímica

3.1 Assaig *pull-down* dirigit

Amb l'objectiu de comprovar que l'ADK estigués interaccionant amb el transportador hCNT3 es va realitzar un GST *pull-down* dirigit. S'incubà el mateix homogenat proteic de cèl·lules primàries de LLC amb la proteïna recombinant GST-N-t-hCNT3 i com a control negatiu es va incubar la proteïna GST sense unió al N-t-hCNT3. Després es va realitzar un *Western blot* per, posteriorment revelar-lo específicament i directament contra l'ADK, ja que gràcies a l'anàlisi proteòmic, sabíem que hCNT3 hauria d'arrossegar ADK durant el *pull-down*. Tal i com es mostra a la **Figura 39** vam poder confirmar la unió d'ADK amb el domini N-terminal del transportador.

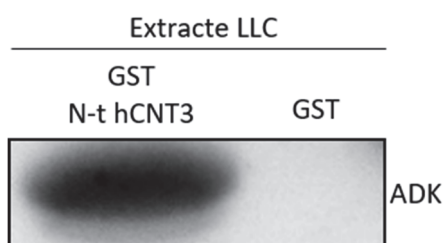


Figura 39. Validació de la interacció d'hCNT3 amb ADK per *pull-down* dirigit. La proteïna recombinant GST-N-t-hCNT3 es va incubar amb un homogenat de cèl·lules primàries de LLC i com a control negatiu, la proteïna GST sense unir-la covalentment a N-t-hCNT3, que també es va incubar amb el lisat de LLC. Les proteïnes que van quedar unides es van eluir, separar per electroforesi SDS-PAGE i es va revelar ADK en un *Western blot*. Es mostra un *blot* representatiu (n=2).

3.2 Model cel·lular

Per escollir un model cel·lular amb el qual continuar els nostres estudis es van analitzar els nivells endògens d'ADK que presentaven cadascuna de les línies cel·lulars. Es van estudiar tots aquells models cel·lulars que, segons estudis previs del laboratori, van mostrar tenir activitat d'hCNT3. Com s'observa a la **Figura 40**, l'expressió d'ADK era depenent de la línia cel·lular en qüestió. Es va poder observar que totes les línies cel·lulars presentaven un doblet a excepció de la línia cel·lular HT-29 que pràcticament no expressava ADK, fet que també vam poder comprovar per PCR a temps real (resultats no mostrats).

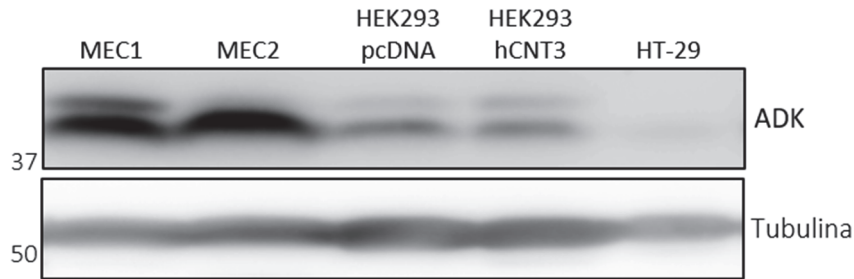


Figura 40. Expressió endògena d'ADK en diferents línies cel·lulars. S'analitzen els nivells proteics de diferents línies cel·lulars mitjançant un *Western blot*. MEC1 i MEC2: Línies derivades de LLC / HEK293pcDNA i HEK293hCNT3: Cèl·lules embrionàries de ronyó humà, la segona expressa establement hCNT3 / HT-29: Adenocarcinoma de còlon. S'utilitza la tubulina com a control de càrrega. (n=2)

Les línies cel·lulars MEC1 i MEC2 es van obtenir d'un mateix pacient amb leucèmia limfàtica crònica en dues ocasions diferents al llarg de la malaltia. Després de ser caracteritzades, es van definir com a un bon model per investigar la biologia de la LLC (Stacchini et al. 1999). Són dues línies fenotípicament diferents i reflecteixen la progressió clínica de la malaltia. Mentre que MEC1 s'obté abans del període més agressiu, MEC2 s'origina un any després (Rasul et al. 2014). Al comprovar que ambdues línies cel·lulars expressaven ADK i presentaven activitat d'hCNT3, les vam considerar un bon model per seguir el projecte amb elles. En concret vam utilitzar MEC1 ja que era la línia que fenotípicament compartia diverses característiques amb les cèl·lules de LLC *ex vivo* (Rasul et al. 2014). HEK293 també va ser un model utilitzat en aquest capítol ja que prèviament el nostre grup havia creat una línia de HEK293 que expressava establement el transportador hCNT3. Una eina molt preuada degut a la dificultat de detectar l'activitat dels transportadors de nucleòsids en molts dels models cel·lulars. Per últim, les HT-29 es van analitzar ja que és una línia cel·lular d'adenocarcinoma de còlon, la qual va ser utilitzada per l'estudi de la interacció entre Gal-4 i hCNT3. Però tal i com es veu a la **Figura 40** aquesta línia no expressava pràcticament ADK i per aquest motiu no es va considerar un bon model.

Aquest doblet de l'ADK del qual parlem a l'hora de caracteritzar les diferents línies cel·lulars (**Figura 40**) demostra el que ja està descrit a la bibliografia, que aquest enzim presenta dues isoformes: ADK-curta o ADK-S (38.7kDa) i ADK-llarga o ADK-L (40.5kDa) en cèl·lules de mamífer (McNally et al. 1997). Les dues isoformes són idèntiques a excepció dels aminoàcids codificats pels primers exons on l'splicing d'aquests primers exons amb la resta d'exons del gen d'ADK dona lloc a les dues isoformes (Cui et al. 2011). Les dues isoformes són funcionalment actives i no presenten diferències significatives pel que fa les seves propietats cinètiques (Sakowicz et al 2001 i Sahin et al. 2004). Inicialment estudis basats en algorismes que predeien la localització subcel·lular de les proteïnes segons les similituds en les seves seqüències, especulaven que les dues isoformes d'ADK es trobaven al citoplasma (Nakai and Horton 1999 i Sakowicz et al 2001).

No obstant, un estudi recent va identificar una localització subcel·lular específica d'ambdues isoformes d'ADK. Mitjançant un anàlisi d'immunofluorescència, les cèl·lules de mamífers que només expressaven la isoforma ADK-L mostraven un marcatge nuclear. Mentre que les cèl·lules que expressaven les dues isoformes tenien una tinció tant nuclear com citoplasmàtica. La seqüència N-terminal de la isoforma llarga contenia un grup d'aminoàcids conservats (PKPKKLVKVE) i quan el parell d'aminoàcids KK d'aquesta seqüència era substituït per AA o AD, es perdia la localització nuclear. Aquests resultats suggerien que ADK-L contenia una nova seqüència d'aminoàcids que actuaria com una senyal de localització cap a nucli (Cui et al. 2009). S'ha vist que les dues isoformes d'ADK s'expressen de manera diferent en diversos teixits de mamífers. Mentre que les dues isoformes estan presents a ronyó, fetge, pulmó i pàncrees, hi ha una predominança de l'ADK-L al cervell i l'ADK-S es troba majoritàriament a la glàndula adrenal, melsa i tim. Al teixit cardíac i muscular només s'expressaria l'ADK-S (Cui et al. 2011). El significat funcional d'aquest patró d'expressió de les dues isoformes als diferents òrgans no s'ha determinat i requereix de més estudis.

Per comprovar si aquestes dues bandes observades al *Western blot* de la **Figura 40** eren efectivament les dues isoformes d'ADK, es va silenciar transitòriament ADK mitjançant un siRNA específic d'una zona comuna de les dues isoformes de la seqüència d'ADK. Es transfectà la línia cel·lular HEK293-hCNT3 i a les 48h i 72h es mesuraren els nivells de silenciament per mitjà d'una *Western blot* (**Figura 41A**). A més, es va estudiar si aquesta disminució a nivell proteic també es traduïa en el RNA missatger. Com es pot veure a la **Figura 41B**, a 48h des de la transfecció amb el siRNA d'ADK es va aconseguir la disminució del mRNA. Amb totes aquestes dades, es va poder confirmar que l'anticòs estava reconeixent específicament ADK i a més, érem capaços de detectar les dues isoformes de la proteïna ADK tal i com està descrit a la bibliografia ja que al inhibir la seva expressió es veia com disminuïen els nivells de proteïna.

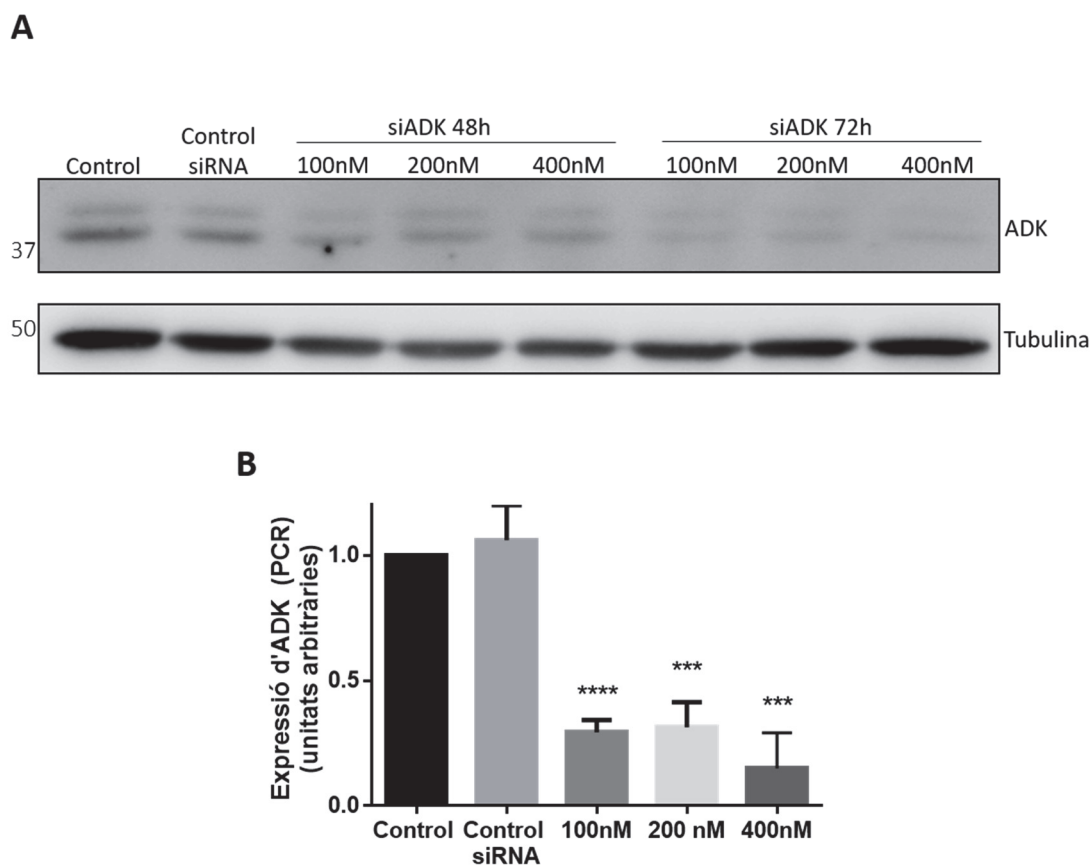


Figura 41. Comprovació de l'eficiència del silenciament d'ADK a la línia cel·lular HEK293. (A) *Western blot* d'ADK després de silenciar ADK amb un siRNA específic (siADK) a diferents concentracions (100nM, 200nM i 400nM) a 48h o 72h després de la transfecció. *Western blot* representatiu de 2 experiments independents. Es compara amb cèl·lules sense tractament (Control) i amb cèl·lules transfectades amb un siRNA aleatori a 200nM (Control siRNA). (B) RT-PCR dels nivells d'expressió del mRNA d'ADK a 48h després de la transfecció amb el siRNA específic d'ADK a concentracions de 100nM, 200nM i 400nM. Dos controls són utilitzats: cèl·lules incubades sense cap tractament (Control) i cèl·lules incubades amb un siRNA aleatori a 200nM (Control siRNA). Mitjana dels experiments (n=5 Control negatiu i 100nM, n=3 200nM i n=2 400nM) \pm SEM ***P<0.05 i ****P<0.001.

Cal remarcar, que el fet de tenir aquestes eines ens serviran per poder validar l'impacte funcional de la interacció entre ADK i hCNT3 ja que tot i no silenciar la totalitat de la proteïna, s'arriba a silenciar un 80% de la quinasa.

3.3 Co-immunoprecipitació i co-localització

3.3.1 Co-immunoprecipitació

Posteriorment es va decidir continuar amb la validació bioquímica de la interacció entre ADK i el transportador hCNT3. Per no allunyar-nos massa del model on es va detectar l'ADK, es va decidir utilitzar la línia cel·lular MEC1, derivada d'un pacient amb LLC, per realitzar una co-immunoprecipitació amb els nivells endògens de les dues proteïnes d'interès.

Resultats i discussió

La immunoprecipitació de les proteïnes endògenes en MEC1 no sortia prou neta i, per intentar millorar els resultats, es van anar modificant diversos punts del protocol com ara el tipus i concentració de detergent utilitzat, el tipus i volum de les microesferes de sefarosa o l'anticòs utilitzat per la immunoprecipitació d'ADK.

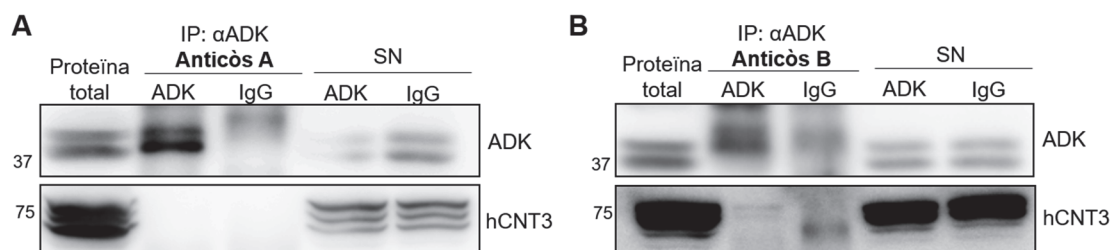


Figura 42. Co-immunoprecipitació dels nivells endògens d'hCNT3 i ADK a la línia cel·lular MEC1. Extractes proteics de MEC1 van ser immunoprecipitats amb dos anticossos diferents per ADK: Anticòs A (A) i Anticòs B (B). Seguidament es realitzà un *Western blot* contra ADK i hCNT3. Com a control negatiu (IgG) es van incubar els homogenats de MEC1 amb anticossos IgG. Es mostren els sobrenedant (SN) de totes les condicions. (n=1)

Fins que al final, les millors condicions obtingudes es poden observar a la **Figura 42A**. Es pot veure que amb l'anticòs "A" s'immunoprecipitava ADK però no podíem detectar el transportador. En canvi a la **Figura 42B** es pot veure com l'anticòs "B" era capaç de precipitar ADK i a més, podíem detectar el transportador de forma tènue. Tot i així, els controls negatius de la **Figura 42** no sortien nets i, per tant, encara s'havia de millorar la co-immunoprecipitació.

Tot i ser uns resultats molt preliminars, a l'analitzar les seqüències dels epítops que reconeixien cadascun dels dos anticossos, podem veure que cada anticòs és específic d'una regió de la proteïna. Concretament l'anticòs A reconeix l'extrem C-terminal, en canvi, l'anticòs B reconeix el N-terminal. Aquesta diferència d'especificitat dels anticossos podria explicar el fet que en unes condicions som capaços de co-immunoprecipitar hCNT3 (**Figura 42B**) i en l'altra no (**Figura 42A**). És més, es podria postular que la regió d'ADK que interacciona amb el transportador es troba entre els 100 primers aminoàcids de la proteïna ja que és l'epítop que reconeix l'anticòs B. No obstant, no van ser uns resultats conclouents ja que els controls negatius realitzats amb les IgG van sortir positius, per tant, podríem estar veient inespecificitats.

Cal dir que els anticossos disponibles limiten molt aquesta aproximació, especialment pel que fa a la idoneïtat dels anticossos contra proteïnes de membrana, ja que aquestes es troben en un ambient lipídic de forma natural i al solubilitzar-les per poder detectar-les mitjançant anticossos, pot ocórrer que l'epítop no quedi igual de disponible per l'anticòs, o que siguin epítops estructurals i al solubilitzar-les es perdin.

Per aquest motiu es va decidir canviar d'estratègia, de manera que, enlloc de detectar el transportador directament, es va generar una proteïna de fusió d'hCNT3 unit a un *tag* que utilitzaríem posteriorment per la seva detecció mitjançant un anticòs específic pel *tag*. Per fer-ho, però, es va haver de canviar el model cel·lular per una línia cel·lular que tingués un creixement en monocapa per tal de facilitar la transfecció de les cèl·lules (cal recordar que les MEC1 tenen un creixement en suspensió). Es van escollir diferents models cel·lulars dels quals es troben les HEK293 per la seva elevada eficiència en la transfecció i per la seva baixa expressió del transportador hCNT3, la línia cel·lular HT-29 ja que va ser el model d'estudi per validar la interacció amb Gal-4 i vam creure que podia ser que en aquest model també es produís la interacció amb ADK. I finalment les NP-9, una línia cel·lular derivada de pàncrees que havia estat caracteritzada i utilitzada per altres projectes relacionats amb el transportador hCNT1. A més, sabíem que no expressava hCNT3, per tant, al no presentar nivells endògens, no interferiria en les transfeccions que poguéssim fer.

Primerament, per posar a punt el protocol es va realitzar una transfecció amb el gen *GFP* (*Green Fluorescent Protein*) amb diverses concentracions de lipofectamina (mètode químic escollit per la transfecció) i els diferents models cel·lulars per tal d'obtenir les millors condicions de transfecció per cada una de les línies. Tal i com es demostra a la **Figura 43A**, la línia cel·lular que responia més eficientment a la transfecció era la línia HEK293, seguit de les HT-29 i essent les NP-9 les menys eficients. Un cop escollides les condicions òptimes es va transfectar el vector pcDNA3.1 (+) que contenia la proteïna de fusió hCNT3-HA a les línies cel·lulars: HEK293, NP-9 i HT-29 seguint les condicions obtingudes anteriorment per cadascuna de les línies. Seguidament, es va immunoprecipitar la construcció hCNT3-HA amb un anticòs anti-HA i es va poder veure per *Western blot* que recuperàvem el transportador hCNT3 (**Figura 43B**). En les HT-29 es va haver de saturar més la imatge per poder veure que realment havíem immunoprecipitat el transportador (**Figura 43C**). Per tant, fins aquest punt érem capaços d'arrosegat el transportador mitjançant un anticòs específic pel *tag* que portava la proteïna. La dificultat va venir quan intentàvem veure si en aquesta immunoprecipitació havia co-immunoprecipitat ADK. Al revelar el *Western blot* contra ADK, que té un pes molecular d'uns 40kDa, ens vam trobar que les cadenes pesades de les immunoglobulines utilitzades per immunoprecipitar hCNT3 emmascaraven la zona on havíem de detectar ADK. Fet que queda demostrat quan al carril del control negatiu (IgG), consistent en una immunoprecipitació realitzada amb IgG de conill (no específiques d'hCNT3) també apareixia aquesta banda entre 40-50kDa (**Figura 43B**).

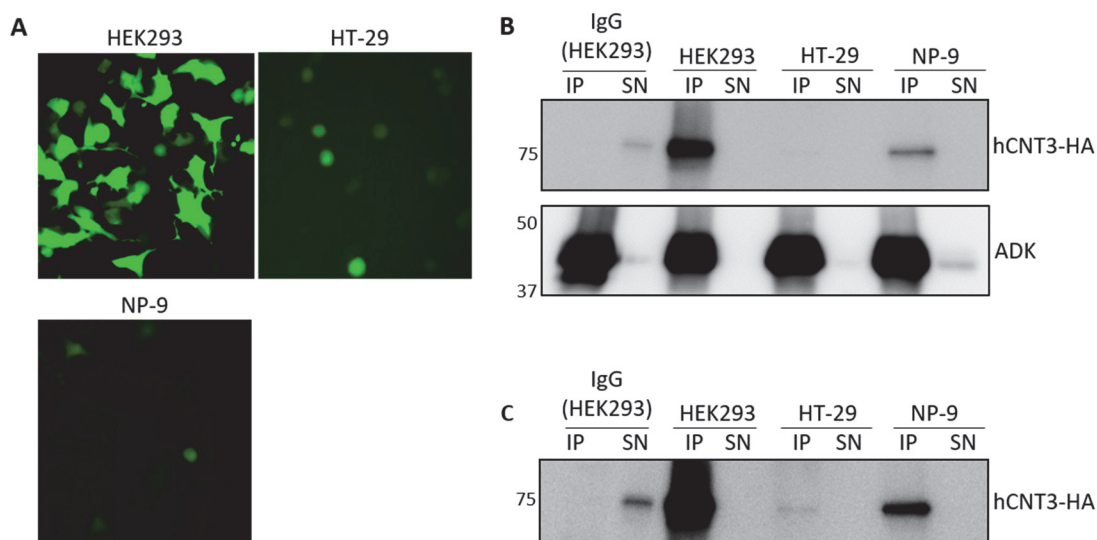


Figura 43. Co-immunoprecipitació d'hCNT3-HA i ADK endògena en les línies cel·lulars HEK293, HT-29 i NP-9. (A) Imatges corresponents als controls de transfecció amb GFP de les línies cel·lulars HEK293, HT-29 i NP-9. Condicions òptimes de transfecció per les HEK293 i NP-9 2µL de lipofectamina i per les HT-29 3µL de lipofectamina a 48h. (n=1) (B) Immunoprecipitació d'hCNT3-HA amb un anticòs α-HA amb la detecció posterior d'hCNT3 i ADK. Com a control negatiu (IgG HEK293) es transfecta la línia cel·lular HEK293 amb les IgG de l'espècie on es va generar l'anticòs anti-HA (conill). (n=4) (C) *Ídem* que al panell B amb la diferència d'obtenir una imatge més exposada.

En veure que ni amb els nivells endògens de les proteïnes d'interès a la línia cel·lular MEC1, ni sobreexpressant el transportador per detectar-lo mitjançant un *tag*, havien resultat amb una validació bioquímica de la interacció satisfactòria, vam decidir desenvolupar una tercera estratègia. Es va decidir sobreexpressar les dues proteïnes que es volien estudiar en un model cel·lular que es pogués transfectar fàcilment, com és la línia cel·lular HEK293. De tal manera que es va clonar ADK amb el *tag* myc al vector pcDNA3.1(+) i va ser transfectat, juntament amb hCNT3-HA, a la línia cel·lular HEK293.

Així com la proteïna de fusió hCNT3-HA ja estava disponible al laboratori, ADK-myc es va haver de crear de nou. La seqüència del gen *ADK* es va obtenir de l'empresa DNASU, un dipòsit de plasmidis. A la seqüència d'ADK se li va fusionar el *tag* myc, dissenyant un parell de *primers*, un dels quals portava la seqüència del *tag* myc, tal i com es mostra a la **Figura 44**. Finalment, l'addició de dues dianes de restricció permetrien clonar el gen d'ADK al vector d'expressió pcDNA3.1(+).



Figura 44. Seqüència del gen ADK amb el tag myc. Esquema representatiu de la seqüència de nucleòtids corresponent a la proteïna de fusió ADK-myc. Subratllat es mostren les dianes de restricció utilitzades (BamHI i XbaI), en *cursiva* la seqüència d'ADK, en **negreta** els primers forward i reverse i destacat amb gris la seqüència del tag myc.

Un cop es va comprovar per seqüenciació que la proteïna de fusió ADK-myc s'havia creat correctament i no hi havia cap mutació, es va procedir a la transfecció d'aquesta proteïna, juntament amb l' hCNT3-HA, a la línia HEK293. Les condicions escollides per dur a terme aquest protocol en aquest model cel·lular van ser les determinades a la **Figura 43**. D'aquesta manera, realitzant una immunoprecipitació amb l'anticòs específic contra HA, el tag del transportador, es va poder demostrar que hCNT3 s'immunoprecipitava i que a més, podíem detectar ADK com a resultat d'aquesta immunoprecipitació. A la **Figura 45** es pot comprovar com interaccionen ambdues proteïnes, ja que al carril de la immunoprecipitació (IP) s'observa la proteïna hCNT3, proteïna contra la qual s'ha fet la IP i l'ADK, que apareix com a proteïna co-immunoprecipitada. Podem dir que no és una unió inespecífica ja que s'utilitzen les IgG com a control negatiu i no apareixen cap de les dues proteïnes d'estudi.

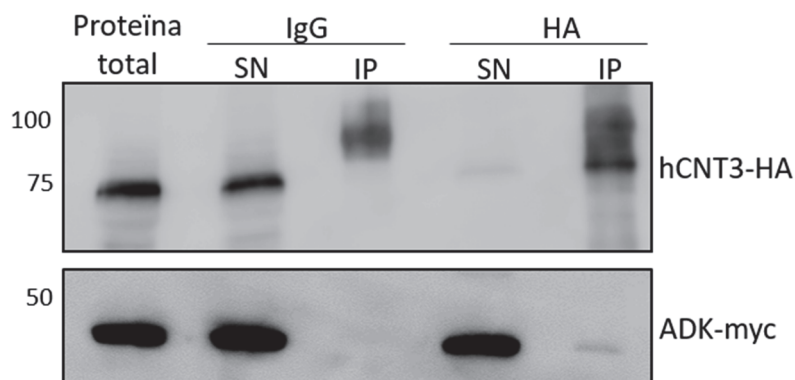


Figura 45. Co-immunoprecipitació de les proteïnes de fusió ADK-myc i hCNT3-HA en HEK293. Extractes proteics de HEK293 immunoprecipitats amb anticòs contra el tag HA, seguit d'un *Western blot* revelat contra myc (ADK) i HA (hCNT3). Les IgG són utilitzades com a control negatiu (IgG) de la immunoprecipitació. Experiment representatiu de n=5.

Per seguir demostrant aquesta interacció es va realitzar la co-immunoprecipitació inversa, és a dir, arrossegar ADK amb el tag myc i observar si hCNT3 co-immunoprecipitava. A més, com que no podíem descartar el fet que els tags poguessin interferir en la unió entre ambdues proteïnes,

vam utilitzar la línia cel·lular HEK293 que expressava establenent el transportador hCNT3 (HEK293-hCNT3), de manera que així eliminàvem un dels *tags*. Tal i com es pot veure a la **Figura 46A**, immunoprecipitant myc (ADK) s'aconseguí veure una banda corresponent a hCNT3. Per descartar que fos una interacció inespecífica es va utilitzar una proteïna (RNF41-myc), que és sabut pel nostre grup de recerca que interacciona amb el transportador hCNT1 però no hauria de fer-ho amb el transportador de tipus 3 (resultats obtinguts en el marc d'una altra tesi doctoral del grup (Tesi Doctoral Albert Viel). A la **Figura 46B** s'observa que hCNT3 no va ser arrossegat quan es va immunoprecipitar RNF41 amb el *tag* myc.

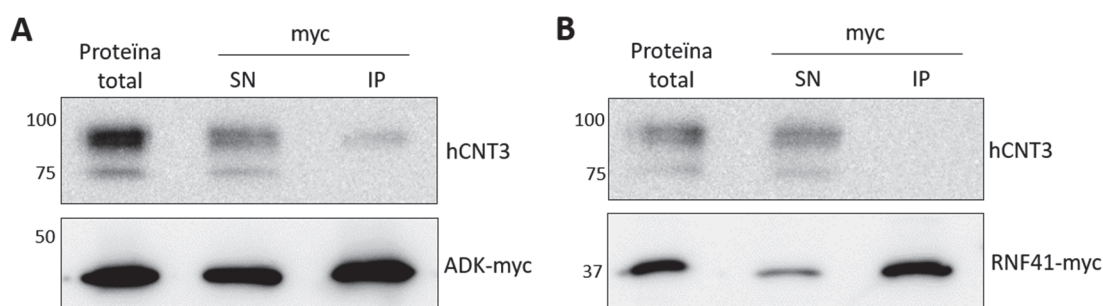


Figura 46. Co-immunoprecipitació d'ADK-myc i hCNT3 en HEK293-hCNT3. Cèl·lules de la línia HEK293-hCNT3 van ser transfectades amb la proteïna de fusió ADK-myc (A) o RNF41-myc (B). Seguidament, s'obtenen els extractes proteics provinents de cadascuna de les transfeccions i s'immunoprecipiten amb l'anticòs anti-myc, seguit d'un *Western blot* revelat contra myc (ADK (A) o RNF41 (B)) i hCNT3 (A i B). n=1.

Paral·lelament es va considerar interessant estudiar si aquesta interacció entre ADK i hCNT3, també es podia donar amb un altre tipus de transportador ja que quatre dels cinc transportadors de nucleòsids coneguts que s'expressen a la membrana plasmàtica poden translocar adenosina amb diferent especificitat (**Taula 1**). Els transportadors hENT3 i hENT4 també poden transportar adenosina però ho fan amb una menor afinitat, valors de K_M aparents de 2mM i 0.8mM, respectivament (**Taula 2**). En principi, sembla lògic, doncs, assumir que només aquells transportadors que presentin uns valors de K_M per l'adenosina dins del rang micromolar baix podrien tenir un rol important en la modulació dels nivells extracel·lulars de l'adenosina en condicions fisiològiques. Tot i que els valors de les K_M aparents pels transportadors equilibratius siguin més elevats que els dels transportadors concentratius, hi ha evidències experimentals de que hENT1 tindria un paper important en la modulació dels nivells d'adenosina ja que diversos treballs demostren que hENT1 és un transportador equilibratiu de nucleòsids capaç de transportar adenosina (Kretschmar et al. 2016). En concret s'ha vist que ENT1 té un paper clau en la senyalització purinèrgica mediada per adenosina en diferents tipus cel·lulars i òrgans, com ara les cèl·lules HUVEC (de l'anglès *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) (Fariás et al. 2006), fetge (Zimmerman et al. 2014), cor (Rose et al. 2011) i cervell (Nam et al. 2013).

És per aquest motiu que es va decidir estudiar si hENT1 interaccionava amb ADK, de la mateixa manera que ho feia hCNT3. El model cel·lular utilitzat va ser la línia HEK293 la qual vam transfectar amb ADK-myc o RNF41-myc utilitzat com a control negatiu ja que és una proteïna que s'uneix únicament a hCNT1. El transportador hENT1 detectat, en aquest cas, va ser l'endogen. Tal i com s'observa a la **Figura 47** no vam obtenir resultats positius pel que fa la interacció entre hENT1 i ADK-myc.

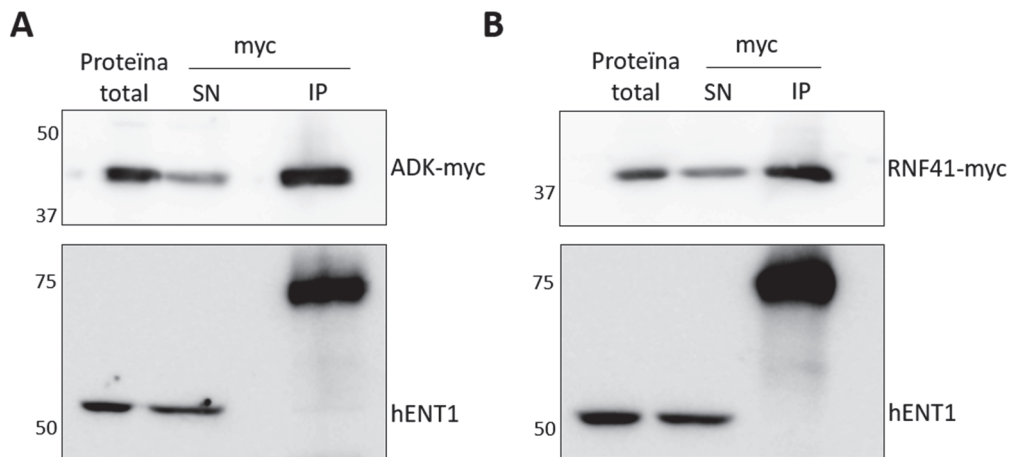


Figura 47. Co-immunoprecipitació d'ADK-myc i hENT1 en HEK293. (A) i de RNF41-myc i hENT1 com a control negatiu (B). Extractes proteics de HEK293 immunoprecipitats amb anticòs contra el *tag myc*, seguit d'un *Western blot* revelat contra *myc* (ADK o RNF41) i ENT1. Western Blot representatiu de 2 experiments.

Aquests resultats apuntarien que la unió d'ADK i hCNT3 seria específica d'hCNT3 i no per altres transportadors que també tinguin com a substrat l'adenosina, com el transportador hENT1. Com hem comentat, hENT1 i hCNT3 poden transportar adenosina, el que els diferencia és que hCNT3 és un transportador concentratiu i d'alta afinitat i hENT1, en canvi, és un transportador equilibratiu amb menor afinitat per l'adenosina. Per tant, és fàcil pensar que per la naturalesa d'aquest transportador, que actua de forma passiva i a favor de gradient de concentracions, hENT1 tindria un paper d'entrada i sortida d'adenosina equilibrant la concentració d'aquest nucleòsid dels dos medis, l'extracel·lular i l'intracel·lular. En canvi, hCNT3 al ser un sistema de transport concentratiu i, per tant, tenir la capacitat de concentrar nucleòsids a l'interior cel·lular, podria tenir una regulació més fina i pot ser, fins i tot, un paper en la senyalització. Això podria explicar el fet que ADK interaccionés específicament amb hCNT3 i no amb hENT1, per tal d'aconseguir aquesta regulació cel·lular comentada anteriorment. No obstant, no podem descartar del tot que no es pugui donar aquesta interacció ja que pot ser que sigui una unió transitòria o que la tècnica utilitzada no sigui prou sensible com perquè es puguin detectar les proteïnes. Es necessitarien més estudis per acabar de confirmar aquests resultats.

3.3.2 Co-localització

Paral·lelament es va realitzar una immunocitoquímica per tal de comprovar si, tant ADK com hCNT3, tenien la mateixa localització cel·lular. Una interacció entre dues proteïnes no es pot validar únicament mitjançant aquest tipus d'assaig però sí que és una aproximació més per demostrar bioquímicament la unió de dues proteïnes, ja que esperaríem que les dues proteïnes que estan interaccionant compartissin la mateixa localització cel·lular.

Es va transfectar la línia cel·lular HEK293 amb les proteïnes de fusió HEK293-HA i ADK-myc i es va realitzar una immunocitoquímica amb els anticossos específics de cadascun dels *tags* que porten les proteïnes d'interès. A la **Figura 48** es pot veure com hCNT3 es trobava majoritàriament a la regió peri-nuclear i ADK tenia una localització ubiqua tant al citoplasma com al nucli. La localització d'hCNT3 podria sorprendre ja que esperaríem trobar-la a la membrana plasmàtica que és on realitza la seva funció. Però el fet de transfectar el transportador es tradueix a que hi hagi una acumulació d'hCNT3 molt elevada a l'interior cel·lular i això no implica que hi hagi un major tràfic de la proteïna cap a la membrana. Per tant, tot i que probablement sí que hi hagi més proporció del transportador respecte quan no transfectes la cèl·lula, tampoc podem esperar que hi hagi un gran augment de marcatge a la membrana cel·lular.

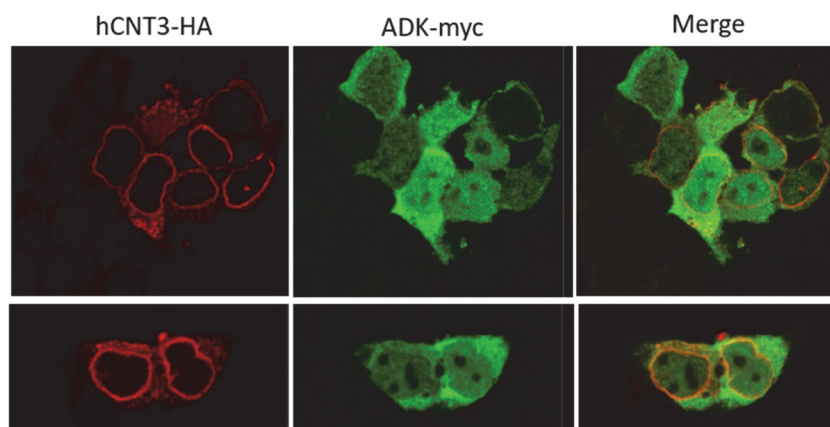


Figura 48. Co-localització d'hCNT3-HA i ADK-myc. La presència d'hCNT3-HA i ADK-myc s'analitza a la línia cel·lular HEK293 utilitzant anticossos contra HA i myc. Vermell (Alexa Fluor 594): hCNT3-HA; Verd (Alexa Fluor 488): ADK-myc i Groc superposició del vermell i del verd mostrant una co-localització de les dues proteïnes.

Al fer l'anàlisi de les imatges de la immunocitoquímica, vam poder observar que hi havia regions on les dues proteïnes podrien estar co-localitzant (**Figura 48**), encara que, l'elevada

sobreexpressió d'ambdues proteïnes dificulta extreure conclusions. És per això que vam creure convenient poder demostrar la co-localització amb els nivells endògens de les proteïnes. El següent pas va ser buscar un anticòs que, per immunocitoquímica, detectés específicament l'ADK. A la **Figura 49A** podem observar que al inhibir l'expressió d'ADK amb un siRNA específic (siADK) no disminuïa la senyal en comparació a les cèl·lules sense tractar (Control) o a les cèl·lules tractades amb un siRNA aleatori (siRNA). A més, es va afegir una condició (lipofectamina) per comprovar que la lipofectamina, el mètode químic utilitzat per transfectar els siRNA, no influïa en els resultats. Per demostrar que la inhibició de la proteïna es produïa correctament, es va realitzar un *Western blot* on es podia observar que els nivells d'ADK es veien significativament disminuïts quan les cèl·lules es tractaven amb un siRNA específic (**Figura 49B**). Per tant, no vam poder avançar en aquesta aproximació per seguir validant bioquímicament la interacció entre hCNT3 i ADK.

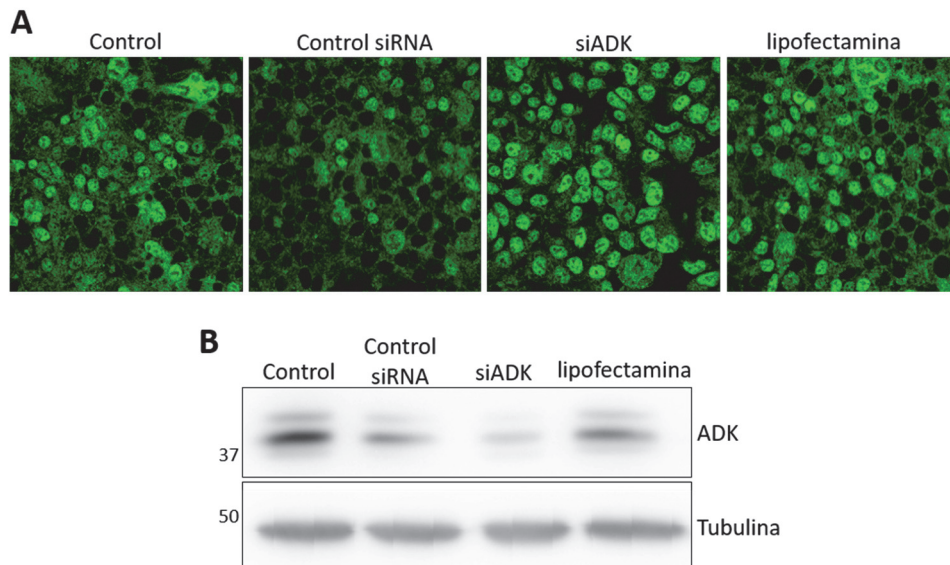


Figura 49. Validació de l'anticòs d'ADK per immunocitoquímica. (A) Immunocitoquímica de la línia cel·lular HEK293 utilitzant anticòs contra ADK acoblat a un secundari Alexa Fluor 488 (verd). **(B)** La línia cel·lular HEK293 va ser transfectada transitòriament amb el siRNA s1081 d'ADK a 100nM 72h (siRNA) o amb un siRNA aleatori com a control negatiu (Control siRNA). Experiment representatiu de 3 experiments independents. Control: cèl·lules sense tractament; Control siRNA: cèl·lules tractades amb un siRNA aleatori; siADK: cèl·lules tractades amb el siRNA específic d'ADK; lipofectamina: cèl·lules tractades amb lipofectamina sense cap siRNA.

Al veure que l'anticòs utilitzat no era específic per ADK en els estudis d'immunocitoquímica, es va decidir provar un altre anticòs, tot i que el resultat que es va obtenir va ser el mateix (dades no mostrades).

4 VALIDACIÓ FUNCIONAL

Per seguir treballant en base a la hipòtesi de la interacció entre hCNT3 i ADK, també es va intentar validar aquesta unió a nivell funcional. En aquest apartat s'han utilitzat diferents estratègies, totes elles amb un únic objectiu: poder determinar si la unió d'ADK afectava la funció del transportador. Concretament, la validació funcional es va abordar abolint cadascuna de les funcions de les dues proteïnes implicades per tal d'establir quin efecte podia observar-se en alterar la seva interacció. De manera que, es va silenciar i inhibir ADK i també es va delectonar en diferents fragments l'extrem N-terminal del transportador hCNT3. A més, es va poder comptar amb la col·laboració del Dr. David Bartolomé de la *Universidad Autónoma* de Madrid amb el que vam poder fer estudis d'electrofisiologia, que més endavant es detallaran.

4.1 Efecte del silenciament d'ADK en el transport d'hCNT3

4.1.1 Transport de citidina i uridina

Primerament es va silenciar l'expressió de la proteïna ADK i es va mesurar l'activitat dels transportadors hCNT2 i hCNT3 en els models cel·lulars de HEK293 que expressen establenent els transportadors, HEK293-hCNT2 i HEK293-hCNT3, respectivament. La primera línia cel·lular va ser utilitzada com a control per demostrar que la unió d'ADK era específica per a hCNT3 però no per a hCNT2.

Per estudiar l'activitat d'hCNT3 i hCNT2 es van realitzar assajos de transport d'uridina (substrat tant d'hCNT2 com d'hCNT3) i de citidina (substrat d'hCNT3). Es va mesurar l'entrada del nucleòsid marcat radioactivament amb triti en cèl·lules en presència de sodi (NaCl), on actuaven tant els transportadors equilibratius (hENTs) com els concentratius (hCNTs) i en un medi sense sodi (clorur de colina) on només actuaven els equilibratius. Així la diferència entre les dues taxes de transport corresponia a l'activitat dels transportadors de tipus concentratiu. Tots aquests assajos de transport es van realitzar en condicions de silenciament d'ADK.

El primer que podíem destacar d'aquests resultats era que el transportador hCNT3 tenia una taxa de transport d'uridina més elevada en comparació al transportador hCNT2 (**Figura 50A i B**). Aquest resultat es pot explicar per les K_M que presenten ambdós transportadors per la uridina, sent per hCNT2 de $116\mu\text{mol/L}$ i per hCNT3 de $5.3\mu\text{mol/L}$ (**Taula 1**). Per tant, vam poder

corroborar que hCNT3 és molt més eficient pel transport d'aquest nucleòsid en comparació al transportador hCNT2.

Pel que fa al silenciament d'ADK, es va aconseguir silenciar l'expressió proteica d'aquesta proteïna tal i com queda demostrat a la **Figura 50D**. A nivell funcional, però, no es van obtenir uns resultats concloents. No es van observar diferències significatives del transport d'uridina ni de citidina per part d'hCNT3 (**Figura 50A-C**) en les dues condicions assajades, és a dir en presència o absència d'ADK. A més, per assegurar que aquesta interacció es produïa específicament entre el transportador de tipus 3 i ADK, es va voler afegir un control on s'avaluava el transport d'hCNT2 sota les mateixes condicions de silenciament d'ADK. Al esperar una unió específica entre hCNT3 i ADK, no esperàvem canvis del transportador hCNT2 i així ho demostrava la (**Figura 50B**). Per tant, aquests resultats ens indicaven que el fet de silenciar ADK no condicionava l'activitat transportadora de la citidina ni de la uridina d'hCNT2, però tampoc vèiem cap efecte sobre l'activitat d'hCNT3.

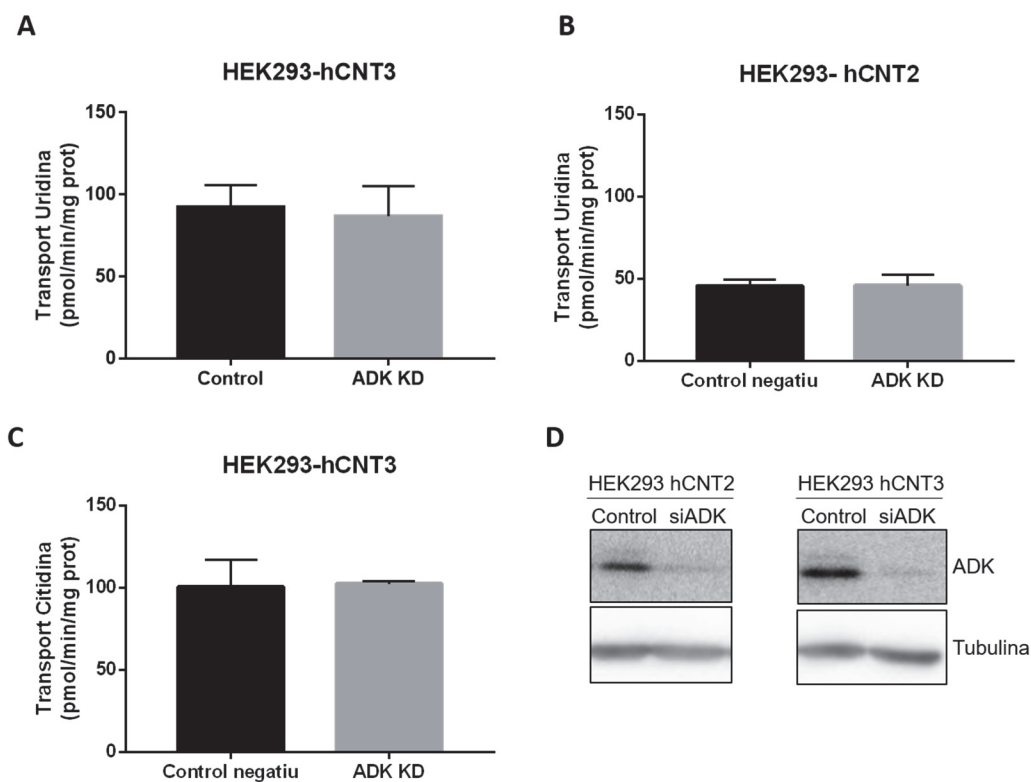


Figura 50. Transport d'uridina i citidina mediat pels transportadors hCNT3 i hCNT2 en les línies cel·lulars HEK293 que expressen establement hCNT2 i hCNT3. (A) Transport sodi dependent d'uridina [^3H] d'hCNT3 (A) i d'hCNT2 (B) o citidina [^3H] d'hCNT3 (C) en HEK293- hCNT3 i HEK293-hCNT2 amb el siRNA específic d'ADK a 100nM 72h (siADK) o amb un siRNA aleatori com a control negatiu (Control). Mitjana de 3 experiments cadascun realitzat per quadruplicat \pm SEM (n=3). (D) Silenciament d'ADK en HEK293- hCNT3 i HEK293-hCNT2 amb el siRNA específic d'ADK a 100nM 72h (siADK) o amb un siRNA aleatori com a control negatiu (Control). *Western blot* representatiu de 5 experiments independents.

Aquestes mesures de transport es van fer a 1 minut ja que, en base a estudis previs en altres models cel·lulars, semblava que en aquest període de temps ens trobaríem en velocitat inicial. Tanmateix, en ser aquest un model de sobreexpressió dels transportadors podríem no trobar-nos en aquestes condicions i, per tant, enlloc de mesurar taxes inicials de transport, estaríem davant de mesures d'acumulació de substrat, fruit probablement tant del transport com de les seves primeres etapes de metabolització. Per aquest motiu, en els posteriors assaigs de transport ens vam plantejar canviar el temps de transport, reduint-lo de manera que ens asseguréssim estar treballant en velocitat inicial.

4.1.2 Transport d'adenosina

Davant la possibilitat que qualsevol efecte sobre la funció d'hCNT3 lligada al silenciament d'ADK fos dependent de substrat, posteriorment es va decidir treballar directament amb adenosina ja que era el substrat tant del transportador com de la quinasa. A més, es va seguir treballant amb la citidina com a control per estudiar l'especificitat de la interacció d'ADK amb hCNT3, de manera que esperaríem que qualsevol canvi en el transport d'adenosina per part d'hCNT3 no s'observés en el transport de citidina ja que aquest nucleòsid no és un substrat d'ADK.

Com ja s'ha descrit, no només els transportadors concentratius hCNT3 i hCNT2 són capaços d'internalitzar l'adenosina, sinó que la família dels equilibratius també ho poden fer (**Taula 2**). A més, aquesta família pot extreure també l'adenosina al medi extracel·lular degut a la seva bidireccionalitat en el transport. És per això que, si volíem estudiar només l'efecte del transportador hCNT3 en el transport d'adenosina havíem d'utilitzar un model que només expressés aquest tipus de transportador ja que l'adenosina pot ser transportada per hCNT3, hCNT2, hENT1 i hENT2. Tanmateix no es disposa d'aquesta eina de treball. De tal manera que es va decidir treballar amb les HEK293 que expressaven establement hCNT3 (HEK293-hCNT3). Pel que fa al transportador concentratiu hCNT2 que pogués haver al model escollit a nivell de mRNA era insignificant en comparació a la quantitat d'hCNT3 que expressava aquest model cel·lular. A més la línia cel·lular HEK293-hCNT3 no presenta activitat d'hCNT2 endògena, fet que ens assegurava que el transport dependent de sodi que poguéssim observar vindria mediat per hCNT3. En referència als transportadors equilibratius, pel seu tipus de transport bidireccional, el rol que podien tenir a la cèl·lula era el d'entrada i/o sortida de nucleòsids. L'única fórmula per eliminar la seva activitat endògena dins del model era inhibir-los amb un inhibidor específic com és el dipiridamol.

És per això, que es va analitzar el transport de citidina, guanosina i uridina d'hCNT3 en presència de dipiridamol. Es va realitzar un seguiment temporal (*time course*) de la quantitat de radioactivitat associada a cadascun dels nucleòsids utilitzats que era interioritzada per la cèl·lula a diferents temps: 15 i 30 segons, temps pròxims a velocitat inicial i 5 minuts com a temps d'acumulació. Tal i com es pot veure a la **Figura 51** tots els nucleòsids presenten la mateixa tendència d'acumulació al llarg del temps, i a més, es produeix una acumulació més elevada en presència de dipiridamol.

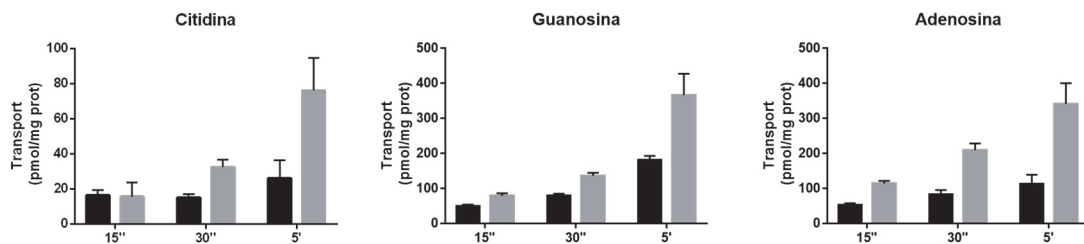


Figura 51. Transport de citidina, guanosina i adenosina amb presència o absència del inhibidor dels transportadors equilibratius a la línia cel·lular HEK293-hCNT3. Transport de citidina- ^{3}H , guanosina- ^{3}H i adenosina- ^{3}H a diferents punts (15"-5') en absència (barres negres) o en presència (barres grises) de dipiridamol $10\mu\text{M}$ en la línia cel·lular HEK293-hCNT3. Mitjana de quadruplicats \pm SEM.

Aquesta demostració confirma que, en el model cel·lular que estem treballant (HEK293-hCNT3), el paper dels transportadors equilibratius és bàsicament el de sortida. Tenint en compte que aquest model presenta una sobreexpressió d'un transportador capaç d'internalitzar tant purines com pirimidines (hCNT3) en contra de gradient, el paper dels transportadors equilibratius, prenent en compte que tinguin un rol majoritàriament de sortida. Ja que aquest tipus de transportadors només poden realitzar la seva activitat a favor de gradient, cal pensar que hCNT3 concentra a l'interior cel·lular i els hENTs expulsen els nucleòsids no fosforilats cap al medi extracel·lular.

Per tant, considerant que el rol que adquirien els transportadors equilibratius de nucleòsids en el nostre model era majoritàriament el de sortida, tots els assaigs d'aquí en endavant s'havien de plantejar amb la presència de dipiridamol per tal d'identificar la seva contribució en cadascun dels experiments dissenyats.

Primerament es va silenciar ADK en un model HEK-293 que sobreexpressava el transportador hCNT3. Per descartar la possibilitat que aquest silenciament pogués afectar l'expressió del transportador i com a conseqüència, s'alterés la seva funció, es van estudiar per *Western blot* els nivells de proteïna d'hCNT3 (**Figura 52C**) en condicions d'ADK silenciada. Vam poder concloure que els nivells del transportador no es veien alterats significativament amb la inhibició d'ADK. Per tant, ADK no afectava negativament a hCNT3.

A nivell funcional no es va poder veure una tendència clara sobre l'activitat dels transportador hCNT3, ni un augment ni una disminució de la seva activitat quan ADK es trobava silenciada. Ja que els resultats obtinguts mostraven que cèl·lules incubades amb un siRNA comercial com a control negatiu (Control) no presentaven diferències significatives en comparació amb aquelles cèl·lules tractades amb el siRNA específic d'ADK (Figura 52A i B).

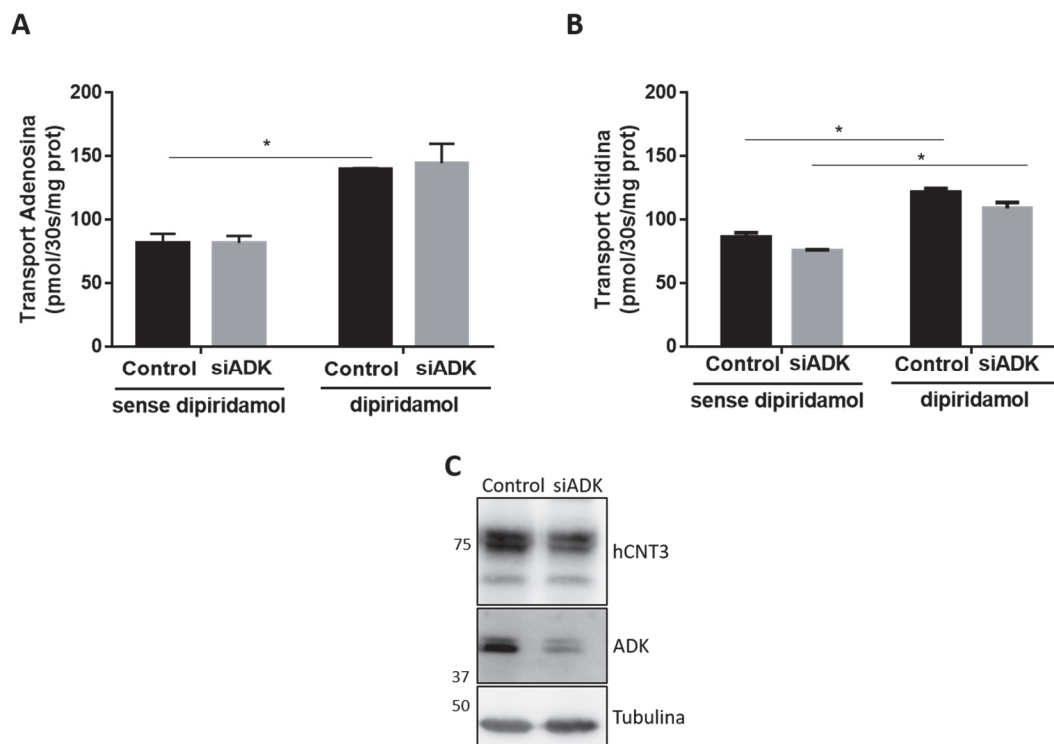


Figura 52. Activitat del transportador hCNT3 en condicions de silenciament d'ADK a la línia cel·lular HEK293 que expressa establement hCNT3. Transport d'adenosina (A) i citidina (B) en la línia cel·lular HEK293-hCNT3. Es mostra la diferència del transport d'adenosina- ^3H o citidina- ^3H en medi ric en NaCl (hCNTs+hENTs) o medi colina (hENTs), que correspon a l'activitat d'hCNTs. Mitjana de quadruplicats de 3 experiments independents \pm SEM. (C) *Western blot* del silenciament d'ADK 200nM 72h. Barres negres (Control): cèl·lules tractades amb 100nM d'un siRNA negatiu comercial / Barres grises (siADK): cèl·lules amb tractades amb 100nM d'un siRNA específic d'ADK (n=3).

Podia passar que no veiéssim cap canvi significatiu degut a que en aquestes condicions tinguéssim l'ADK molt saturada. Cal tenir en compte que per realitzar aquests experiments de transport es va utilitzar una concentració d'adenosina d' $1\mu\text{M}$. Tenint en compte que la K_M d'ADK és de 40nM , era més que probable que ens trobéssim davant d'un sistema saturat. Això podia provocar que perdéssim sensibilitat per detectar les possibles diferències en l'eficiència del transportador per realitzar la seva activitat en funció de si se silenciava o no l'ADK. També es podia pensar que l'enzim responsable de fosforilar a la citidina pogués tenir un paper important en el nostre sistema. Cal dir, però, que la K_M de dCK per la citidina s'ha vist que és de $0.16\mu\text{M}$ i per l'adenosina de $480\mu\text{M}$ en humans (Johansson and Karlsson 1995). Eficiències molt

allunyades en comparació a la que té l'ADK per l'adenosina. Per tant, podríem assumir que tota l'adenosina que sigui transportada per hCNT3 serà fosforilada quasi exclusivament per l'ADK. A més, aquestes dades explicarien perquè a la **Figura 52A** es pot veure com en la situació control hi ha una major acumulació d'adenosina en presència de dipiridamol i a la **Figura 52B** la citidina no té una taxa d'acumulació tant elevada en presència de l'inhibidor.

4.2 Efecte de la inhibició d'ADK en el transport d'hCNT3

Paral·lelament, per seguir demostrant que la capacitat transportadora d'hCNT3 podia veure's afectada en funció de la presència o absència d'ADK, es va procedir a realitzar el mateix assaig de transport però en aquest cas utilitzant un inhibidor de l'enzim, la 5-iodotubercidina (5-ITU). Aquest inhibidor té una estructura química molt similar a la de l'adenosina, fet que ens va fer pensar que tant l'inhibidor com l'adenosina podrien competir pels transportadors de nucleòsids. És per això que prèviament a l'assaig de transport es van incubar les cèl·lules durant 15 minuts amb 5-ITU 200nM, ja que s'ha vist que a aquesta concentració l'ADK es troba inhibida (Aymerich et al. 2006), i en el moment de realitzar el transport la 5-ITU s'eliminava del medi per tal que l'inhibidor no competís amb l'adenosina. La segona variable que havíem de controlar, com ja hem comentat prèviament, era la presència dels hENTs en el nostre model cel·lular. Vam tornar a afegir la condició amb 5-ITU i dipiridamol i vam tornar a veure (**Figura 53**) que els hENTs tenien un rol important en la sortida de nucleòsids ja que l'efecte del dipiridamol en el model utilitzat, la línia cel·lular HEK293-hCNT3, resultava en una major acumulació tant d'adenosina com de citidina dins la cèl·lula degut al bloqueig dels transportadors equilibratius produït per aquest inhibidor.

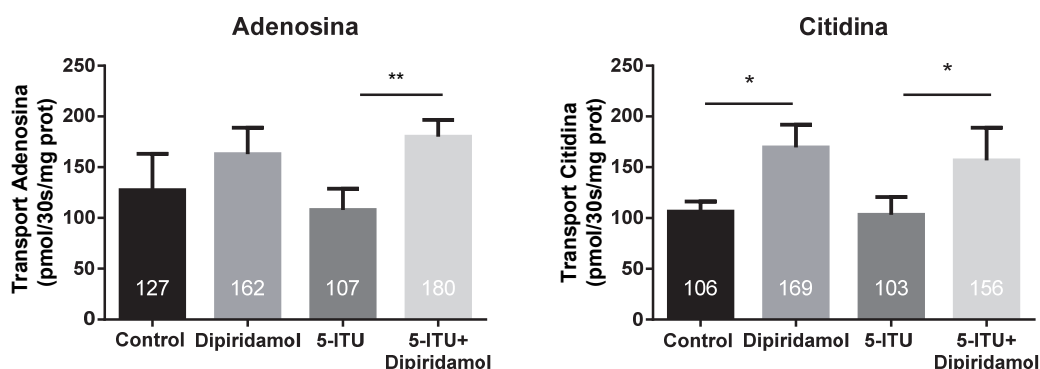


Figura 53. Transport d'adenosina i citidina en presència de l'inhibidor d'ADK, 5-ITU, a la línia cel·lular HEK293-hCNT3. Transport d'adenosina (A) i citidina (B) mediat per hCNT3 en cèl·lules HEK293 que expressen establement aquest transportador. Cèl·lules tractades amb 5-ITU 200nM 15 minuts previs al transport per inhibir l'ADK i amb dipiridamol 10µM en el mateix moment de realitzar el transport per inhibir els transportadors equilibratius. Mitjana de quadruplicats de 5 experiments independents ± SEM. $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$

A la **Figura 53**, en la situació control, on ADK estava activa i per tant podia acoblar-se a hCNT3 i on els hENTs podien exercir el seu rol de sortida, obteníem un transport d'adenosina de 127pmol/30s/mg proteïna. Podíem assumir, doncs, que tota aquesta adenosina es trobava fosforilada ja que quedava atrapada a la cèl·lula pel fet d'haver estat fosforilada. De no haver-ho estat, al tenir els hENTs sense bloquejar podria haver sortit i no ser detectada. Quan en aquest sistema només inhibíem els hENTs i ADK seguia activa (i segons la nostra hipòtesi unida a hCNT3), obteníem un transport total de 162pmol/30s/mg proteïna. Si assumim que d'aquests 162pmol/30s/mg proteïna, podríem considerar que gran part dels 127pmol/30s/mg proteïna són els que fosforilarà ADK, la resta, és a dir, 35pmol/30s/mg proteïna no es trobaran fosforilats i per tant podrien sortir per hENTs però, en aquest cas, com que hENTs estan bloquejats, es queden a l'interior de la cèl·lula i observem aquest augment al gràfic de la **Figura 53**.

En la situació on ADK estava inhibida per 5-ITU però els hENTs no, el transportador hCNT3 (sense tenir acoblada l'activitat d'ADK) era capaç de transportar 107pmol/30s/mg proteïna. Per tant, si ho comparem quan hCNT3 està acoblat a ADK, veiem que hCNT3 esdevé més eficient ja que en aquesta situació pot transportar 127pmol/30s/mg proteïna (19pmol/30s/mg proteïna més). Quan a més a més de bloquejar ADK, bloquejàvem també la sortida dels hENTs, el transport que obteníem era de 180pmol/30s/mg proteïna, assumim que 107pmol/30s/mg proteïna d'aquests són els que ha fosforilat el transportador amb l'eficiència que li correspon quan no està unit a ADK i la resta, 72pmol/30s/mg proteïna és la part d'adenosina que queda sense fosforilar i podria marxar de la cèl·lula però no ho pot fer perquè els hENTs estan bloquejats.

Amb aquestes dades es podria deduir que quan el transportador hCNT3 està unit a una ADK funcional és més eficient per transportar adenosina.

No obstant, podríem pensar que aquest canvi en l'eficiència del transportador no fos específic per hCNT3 i adenosina i que també passés amb altres nucleòsids. Per demostrar-ho, es va fer el mateix assaig utilitzant la citidina com a nucleòsid ja que és substrat del transportador hCNT3 però no d'ADK. A la **Figura 53** el que vam poder observar és que el transport de citidina per hCNT3 a la situació control era pràcticament el mateix transport en comparació amb la situació on s'inhibia ADK. Indicant-nos que el fet que ADK estigués inhibida no afectava la metabolització de la citidina. Quan s'inhibien els hENTs, també es va observar que la citidina quedava més atrapada a la cèl·lula. En aquest cas, a més, l'increment que es produïa degut a la proporció de citidina que no era fosforilada però no podia sortir de la cèl·lula ja que els hENTs estaven bloquejats era el mateix tant si la 5-ITU inhibia l'ADK com si no hi havia inhibidor. Aquestes dades demostrarien que no hi havia una diferència tant evident en l'eficiència de fosforilació de la

citidina en funció si el transportador estava o no associat a l'activitat d'ADK. Es podria dir que, per al cas de la citidina, l'acoblament funcional amb la seva quinasa natural, la desoxicitidina kinasa (dCK), és probablement menor en condicions basals i, com era d'esperar, la inhibició d'ADK en cap cas afectaria l'activitat de dCK del nostre sistema.

En conjunt, tots aquests resultats ens ajuden a concloure que l'eficiència del transportador augmenta quan aquest es troba acoblat a ADK i que per tant, la unió entre aquestes dues proteïnes podria tenir un sentit funcional per la cèl·lula. A més, aquesta unió respon específicament a un nucleòsid, l'adenosina, i no semblaria que altres nucleòsids que no fossin substrat per l'ADK responguessin a aquest augment en l'eficiència del transportador. També cal tenir en compte que aquest transport estava mesurat a 30 segons, un temps molt curt que potser no permetria a la cèl·lula eliminar tota aquella adenosina que no fos fosforilada per ADK quan aquesta es trobés inhibida. Fenomen que podria explicar perquè la disminució del transport d'adenosina sota un bloqueig d'ADK fos tant lleu i que amb la presència de dipiridamol no s'observés una baixada de la captació d'adenosina més acusada. Aquestes observacions suggerien un acoblament funcional entre hCNT3 i ADK però no necessàriament demostraria que aquest acoblament impliqués una interacció proteïna-proteïna directa.

És important destacar que el fet de no trobar diferències en l'activitat d'hCNT3 quan silenciàvem ADK amb un siRNA però trobar-les quan inhibíem ADK amb 5-ITU podria explicar-se pel fet que el silenciament de l'expressió d'ADK no és del 100% i que per tant, la poca ADK que se segueixi sintetitzant continui fent la seva funció sobre el transportador i així no es pugui detectar cap diferència. Per altra banda, el fet de treballar amb un model que sobreexpressi hCNT3 pot fer que l'ADK endògena no garanteixi que pugui unir-se a tots els transportadors sobreexpressats (al punt 4.4.1 d'aquest apartat es realitzen experiments en relació aquest aspecte). A més, s'ha de tenir en compte que el que estem detectant són diferències molt subtils. Hem d'assumir que quan utilitzem l'inhibidor 5-ITU, estem inhibint tota l'ADK, inclosa la que es pogués trobar unida al transportador, abans d'incubar les cèl·lules amb l'inhibidor. I per això, com que detectem canvis molt subtils, l'inhibidor ens assegura una inhibició més completa (del 100%) i podem acabar detectant petites diferències en funció de si l'ADK està o no inhibida en el sistema.

4.3 identificació dels residus del transportador hCNT3 implicats en la interacció amb ADK

Com a primera aproximació, i donat que no sabem quin residu de l'extrem N-terminal estaria interaccionant amb ADK, vàrem decidir generar diverses proteïnes hCNT3 delecionades en aquest extrem. Per fer-ho ens vam basar en un treball previ del grup en el qual es va demostrar

Resultats i discussió

els residus implicats en l'ordenament del transportador cap a membrana, en el qual s'utilitzaven proteïnes hCNT3 delecionades per l'extrem N-terminal (Errasti-Murugarren et al. 2010a).

Es van generar diversos mutants d'hCNT3 delecionant 25, 35, 49, 58 i 62 aminoàcids de la regió N-terminal (**Figura 54**). Mitjançant tècniques convencionals de biologia molecular, es van dissenyar *primers* específics per cada delecció que permetessin la incorporació de cadascuna de les delecions a més de portar la seqüència de les dianes de restricció HindIII i SmaI per la posterior clonació en un nou vector.



Figura 54. Resum de les diferents mutacions truncades realitzades a l'extrem N-terminal del transportador hCNT3. Esquema representatiu dels truncats de l'extrem N-terminal d'hCNT3 (residus 1-102), sent hCNT3 la proteïna completa i hCNT3-Δ25, 35, 49, 58 i 62 els truncats.

El vector utilitzat per expressar les diferents proteïnes truncades va ser el vector pEYFP que incorporava la seqüència del gen *YFP* (de l'anglès *Yellow Fluorescent Protein*) a l'extrem C-terminal de la proteïna. De tal manera que es generava una proteïna de fusió amb el *tag* YFP, etiqueta que ens facilitava la posterior detecció de la proteïna. El fet d'introduir-la a l'extrem C-terminal no hauria d'alterar la interacció que es produeix amb ADK a l'extrem N-terminal del transportador. L'estratègia que volíem seguir era trobar un mutant que mantingués la seva capacitat transportadora i així analitzar si la seqüència delecionada provocava la pèrdua del lloc d'unió amb ADK i per tant, una alteració de la capacitat transportadora d'hCNT3 pel fet que ADK no estigués interaccionant. Per aquest motiu es van transfectar tots els mutants transitòriament a la línia cel·lular HEK293 i es van analitzar tant la capacitat transportadora com la localització cel·lular de cadascun d'ells.

Tal i com es pot veure a la **Figura 55** la localització d'hCNT3, Δ25, Δ35 i Δ49 era majoritàriament de membrana, mentre que els mutants Δ58 i Δ62 semblava que tinguessin una major localització citoplasmàtica en comparació a la resta de mutants, tot i que també s'observava una senyalització de membrana.

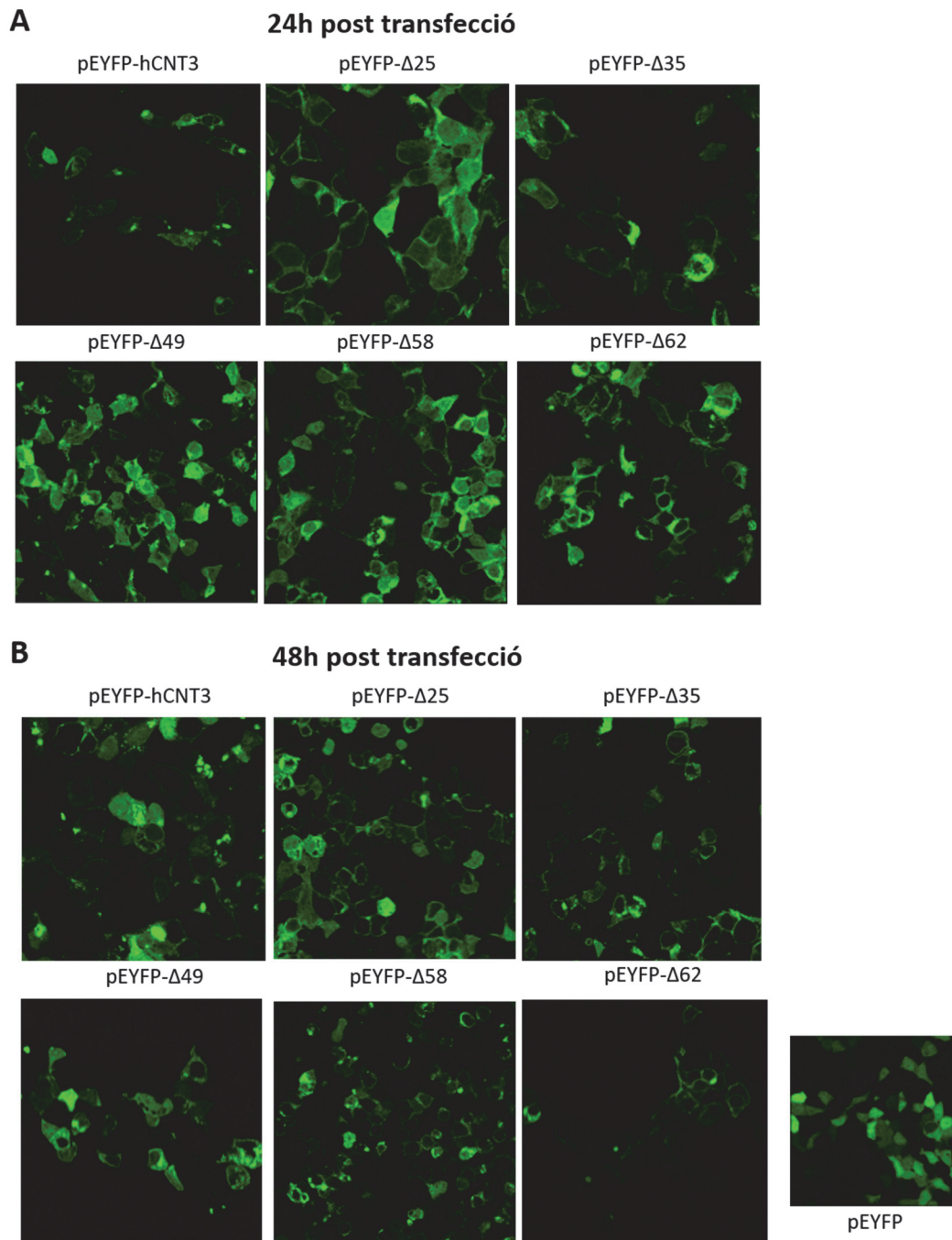


Figura 55. Localització del transportador hCNT3 i els seus truncats en la línia cel·lular HEK293. HEK293 van ser transfectades transitòriament amb les construccions d' hCNT3 complet i els diferents mutats (Δ 25,35,49,58,62) amb YFP. Passades 24 o 48h després de la transfecció es van obtenir les imatges de fluorescència.

Paral·lelament es va analitzar la capacitat transportadora de cadascun dels truncats. Per fer-ho es va analitzar el transport d'adenosina, substrat específic d'ADK i hCNT3 i el de citidina, substrat únicament d'hCNT3, 24 i 48 hores després de la transfecció dels diferents truncats. La **Figura 56** demostrava que els mutants que tenien una delecció més gran eren els que presentaven una disminució estadísticament significativa del transport d'adenosina i citidina.

Resultats i discussió

El primer que es podia veure és que cap proteïna truncada perdia la capacitat total de transportar nucleòsids. Com ja s'havia descrit anteriorment, l'extrem N-terminal del transportador no està implicat en la unió del substrat (Loewen et al. 1999i Hamilton et al. 2001), per tant, per molt que generem un truncat molt gran de l'extrem N-terminal, podem seguir detectant activitat d'hCNT3. Aquests resultats reafirmen la idea que aquest extrem, que només ha sigut adquirit pels eucariotes, pot aportar noves funcions reguladores al transportador sense alterar la seva capacitat transportadora.

No obstant, les proteïnes que tenen una deleció més gran ($\Delta 58$ i $\Delta 62$) presenten una disminució del transport de citidina i d'adenosina (**Figura 56**).

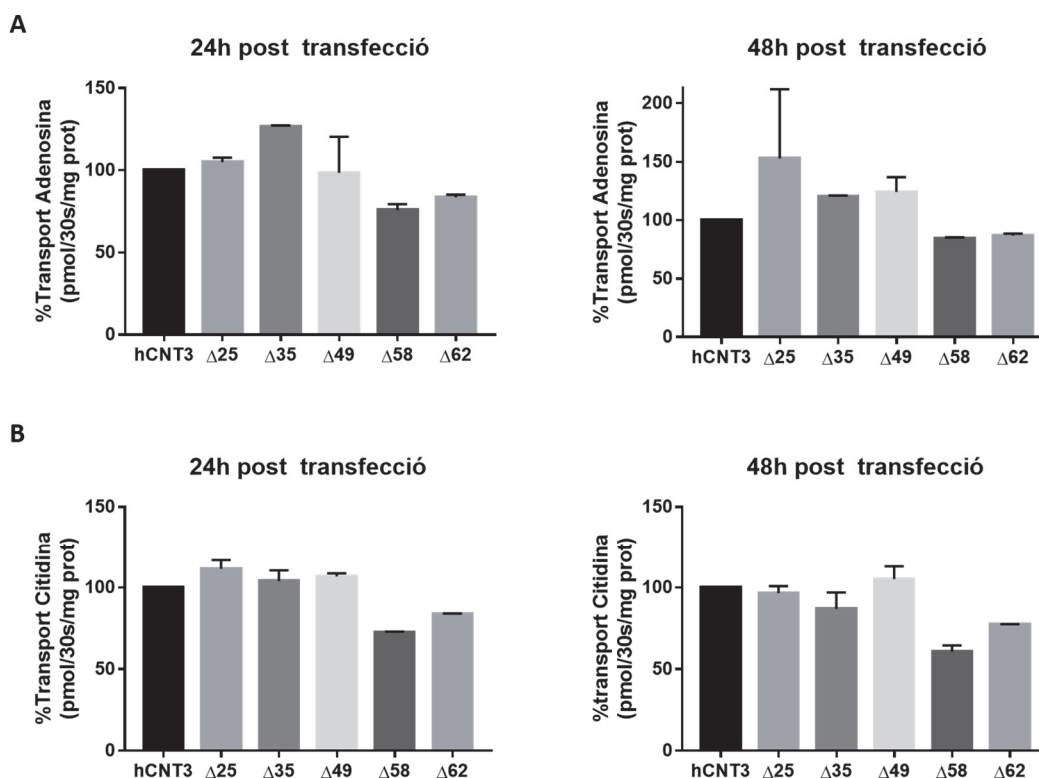


Figura 56. Capacitat transportadora dels truncats d'hCNT3 en comparació a la proteïna completa en la línia cel·lular HEK293. Transport d'adenosina^[3H] o citidina^[3H] en medi ric en NaCl (CNTs+ENTs) o medi colina (ENTs). La diferència entre les dues taxes de transport correspon a l'activitat de CNTs. Transport mesurat 24 o 48h després de la transfecció amb les construccions pEYFP-hCNT3 i hCNT3- $\Delta 25,35,49,58,62$. Valors expressats com a la mitjana dels quadruplicats de 2 experiments independents \pm SEM.

Segons els resultats obtinguts en la immunocitoquímica (**Figura 55**) i basant-nos amb els estudis esmentats anteriorment, aquesta disminució del transport no ve donada per una incapacitat del propi transportador sinó perquè no hi ha una localització majoritària dels truncats $\Delta 58$ i $\Delta 62$ a la membrana plasmàtica. A més, aquests resultats coincideixen en gran mesura amb els obtinguts en el treball del grup esmentat anteriorment (Errasti-Murugarren et al. 2010a). Segons aquest treball, els truncats $\Delta 58$ i $\Delta 62$ estan mancats de la seqüència que dirigiria el transportador

cap a membrana ja que es va veure que ambdós truncats tenien una taxa de transport molt menor en comparació a la proteïna completa. Concretament, el truncat $\Delta 58$ es trobava a la membrana però també hi havia part del transportador que quedava retingut al citoplasma i això es traduïa en una menor activitat d'hCNT3 i per últim, $\Delta 62$ que no es localitzava a membrana i, per tant, no s'observava activitat.

La caiguda d'activitat dels truncats més grans en aquest estudi és més gran que la que vam observar amb els resultats de la present tesi. Aquestes diferències poden venir donades perquè el model cel·lular utilitzat va ser diferent, sent les HeLa la línia utilitzada en l'estudi i les HEK293, el model d'aquest treball.

En tot cas, el fet destacat d'aquest assaig va ser que vam poder observar una diferència que es produïa en el transport d'adenosina però no pel de citidina (**Figura 56**). Aquesta feia referència al truncat d'hCNT3- $\Delta 35$ en el qual observàvem un augment de la seva capacitat per transportar adenosina, però no per transportar citidina. Aquests resultats ens porten a pensar que el fet d'eliminar la primera part de la seqüència de l'extrem N-terminal del transportador podria provocar un canvi conformacional de la proteïna fent que ADK quedés millor acoblada a hCNT3. Això faria que la unió entre ambdues proteïnes fos més eficient i, que per tant, es produís un major transport d'adenosina. No obstant, caldria realitzar anàlisis estructurals més sensibles per poder arribar a alguna conclusió més sòlida.

Tot i que la proteïna de fusió es va dissenyar per tal que el tag YFP es trobés a l'extrem N-terminal, extrem on es produeix la unió amb ADK, s'ha de tenir en compte que la seva seqüència podria afectar d'alguna manera al correcte funcionament del transportador. La seqüència aminoacídica del YFP és de 238 aminoàcids, una proteïna molt gran que pot alterar el correcte plegament del transportador i/o que dificulti o impossibiliti la interacció amb ADK. Com a conseqüència hem de ser conscients que, tot i haver detectat diferències significatives entre els diferents truncats, potser no s'han pogut copsar totes o no s'ha pogut detectar la magnitud real d'aquestes diferències degut a la presència de la proteïna YFP.

4.4 Anàlisi de la interacció entre ADK i hCNT3 en condicions de velocitat inicial

Cal tenir en compte que qualsevol línia cel·lular humana té el seu equilibri dins d'un context lipídic de membrana que li permet funcionar correctament. Quan alterem aquest sistema forçant la cèl·lula amb elevades concentracions de determinats substrats o sotmetem la cèl·lula a diferents tractaments a temps més o menys prolongats podem perdre sensibilitat si el que volem veure són canvis molt subtils produïts en conseqüència d'aquests tractaments. En el

nostre cas, al treballar amb concentracions elevades dels nucleòsids o mesurar l'activitat dels transportadors a temps massa llargs que no estiguin dins de la velocitat inicial fa que perdem sensibilitat en la mesura de l'eficiència del transport d'adenosina quan hCNT3 es troba o no acoblat a ADK. En el cas de treballar amb concentracions elevades, probablement, fa que ADK es trobi saturada i perdem sensibilitat ja que la gran quantitat d'adenosina que entra no pot ser tota fosforilada ja que l'ADK té tots els seus llocs catalítics ocupats. I en referència al temps de transport massa prolongat, aleshores no podem diferenciar si els canvis que podem evidenciar són deguts a canvis en l'activitat del transportador o ja són conseqüència de la metabolització cel·lular.

Tots els resultats obtinguts fins al moment apuntaven cap a una interacció entre el transportador hCNT3 i ADK provocant un augment en l'eficiència del seu transport quan aquest es trobava acoblat a l'ADK activa. Tot i així, tots els canvis observats eren molt subtils i ens suggerien, doncs, que aquesta regulació que provocava ADK sobre el transportador era molt fina. Per aquest motiu es va decidir afinar més el model d'estudi, és a dir, es va decidir passar de treballar a altes concentracions de nucleòsids i a temps llargs de transport, a unes concentracions més baixes i a temps més curts. Com ja hem comentat, d'aquesta manera intentaríem evitar la saturació d'ADK i no deixariem temps a la cèl·lula perquè pogués metabolitzar el substrat captat.

4.4.1 Model HEK293

Es va utilitzar el model cel·lular HEK293 el qual no sobreexpressava el transportador hCNT3, de manera que vam transfectar aquestes cèl·lules amb hCNT3, ADK o la combinació d'ambdós (ADK+hCNT3) amb l'objectiu de treballar amb les mateixes condicions per les dues proteïnes. Com a control es van transfectar les cèl·lules amb el vector pcDNA3.1(+) buit, ja que era el vector d'expressió on es trobaven clonats els gens hCNT3 i ADK. Seguint aquesta estratègia assumíem que solucionaríem el problema de tenir només una de les dues proteïnes sobreexpressades (hCNT3, en el model cel·lular HEK293 que expressava establement hCNT3) i que no poguéssim veure cap efecte significatiu perquè l'ADK endogen no pogués unir-se a tot el transportador present a la cèl·lula.

Sobre aquest nou model experimental, vam decidir treballar dos aspectes que crèiem importants: un era el temps i l'altre, la concentració dels nucleòsids durant el transport. Pel que fa el primer, vam reduir el temps de transport de 30 segons a 10 segons ja que esperariem que els efectes observats fossin més clars. En referència al segon aspecte, vam disminuir la

concentració d'adenosina ja que creiem que, d'aquesta manera, l'enzim ADK no es trobaria saturat.

Amb totes aquestes noves condicions es va analitzar la capacitat transportadora d'hCNT3 en aquelles cèl·lules que només expressaven hCNT3 o també coexpressaven ADK. Aquest transport es va obtenir a través de la diferència de la taxa de transport obtinguda en un medi amb sodi i un medi sense sodi, assumint que tot el transport depenent d'aquest catió provenia d'hCNT3. Vam poder veure com hi havia una tendència d'augment del transport d'adenosina en aquelles cèl·lules que expressaven les dues proteïnes (**Figura 57A**). Mentre que amb citidina no s'observava aquest augment (**Figura 57B**). Dades que recolzen la idea que ja havíem observat amb la inhibició d'ADK per 5-ITU, que hCNT3 augmenta la seva eficiència pel seu substrat, l'adenosina, en presència d'ADK.

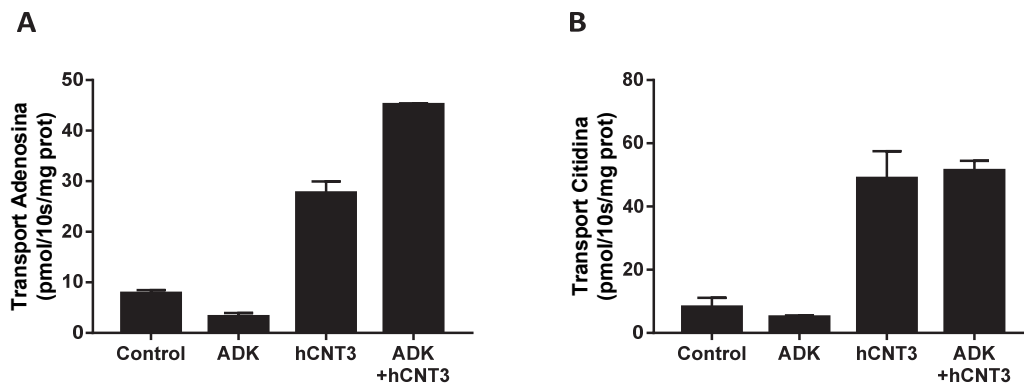


Figura 57. Transport d'adenosina en cèl·lules HEK293 transfectades amb hCNT3 i hCNT3+ADK. Transport d'adenosina als 10 segons en cèl·lules HEK293 transfectades transitòriament amb ADK, hCNT3, la combinació dels dos o amb el vector pcDNA3.1(+) buit (Control). Mitjana de triplicats de 2 experiments independents \pm SEM

Es podria dir doncs que, acostant-nos a unes condicions en les que semblaria que estiguéssim treballant a velocitat inicial, podíem copsar més fàcilment diferències en l'activitat del transportador hCNT3. És per aquest motiu que es va decidir seguir treballant per aquest camí, és a dir, amb unes condicions que ens permetessin detectar d'una forma més fina l'efecte fisiològic de la interacció.

4.4.2 Electrofisiologia

Una de les particularitats dels transportadors de la família gènica *SLC28* és que són electrogènics, ja que l'entrada de substrat és depenent de l'ió sodi i aquest provoca una despolarització de la membrana quan es realitza el transport. Per tant, l'activitat dels transportadors concentratius

de nucleòsids es pot mesurar també a través de l'electrofisiologia. La tècnica, anomenada *Two-electrode voltage clamp*, mesura la quantitat de corrent que s'injecta en les cèl·lules per mantenir sempre el potencial de membrana que l'experimentador determini. De manera que, si el transportador és actiu, provocarà una despolarització de la membrana degut a la internalització de Na^+ i per tant, s'haurà d'injectar corrent per poder recuperar el potencial de membrana desitjat. Aquest corrent serà proporcional a l'activitat del transportador. Aquesta tècnica permet realitzar registres continus dels transportadors a temps reals i a més, és molt sensible. El fet que els transportadors hCNTs siguin electrogènics ha permès que el grup pugui caracteritzar-los transfentant-los en oòcits de *Xenopus laevis* (Lostao et al. 2000, Larráyoiz et al. 2004 i Gorraitz et al. 2010).

Degut a que les dades obtingudes amb les línies cel·lulars humanes no van ser del tot conclouents, tot i que sí mostraven una tendència, es van decidir continuar els estudis amb la col·laboració del Dr. David Bartolomé de la *Universidad Autónoma* de Madrid, per a poder realitzar estudis d'electrofisiologia en oòcits de *Xenopus laevis*. Per dur a terme aquests experiments es van haver de subclonar les proteïnes d'estudi hCNT3 i ADK en un nou vector d'expressió, pBlueScript SKII(+). Per estudis anteriors, el grup ja disposava del transportador hCNT3 clonat al vector, però s'havia de sintetitzar de nou la construcció amb ADK. Per assaigs anteriorment descrits, es disposava d'ADK clonada al vector pcDNA3.1(+) amb les dianes BamHI i XbaI (**Figura 44**). El que vam fer va ser utilitzar aquestes dianes per digerir pBlueScript SKII(+) i pcDNA3.1(+)-ADK, alliberar el gen d'interès i lligar-lo al nou vector. Aquest vector permet la transcripció *in vitro* del gen de la proteïna d'estudi, el nostre cas hCNT3 i ADK, per tal d'aconseguir el corresponent cRNA que posteriorment s'injecta als oòcits. Per estudis previs on havíem estudiat l'electrofisiologia d'aquests transportadors sabem que aquestes proteïnes s'expressen funcionalment bé a la membrana de l'oòcit a partir de les 48h post-injecció (Gorraitz et al. 2010 i Larráyoiz et al. 2004). Amb aquest tipus d'aproximació es mesuren corrents de sodi induïdes pel substrat, essent determinacions a temps real de la velocitat inicial de transport. Així, es van realitzar una sèrie d'experiments per determinar si l'activitat del transportador es veia afectada d'alguna manera quan la cèl·lula també expressava ADK.

Es va poder observar que a major concentració d'adenosina o de citidina es traduïa en una major intensitat del corrent, per tant l'activitat del transportador era dosi-dependent. En el transport d'adenosina, quan es coexpressaven tant hCNT3 com ADK la taxa de transport era major que quan s'expressava únicament el transportador (**Figura 58**). En canvi, al analitzar el transport de citidina, s'observava que l'activitat d'hCNT3 era la mateixa estigués coexpressat amb ADK o no

(Figura 58). Suggestint doncs, que la presència d'ADK activa convertia a hCNT3 a esdevenir un transportador molt més eficient pel transport d'adenosina. Concretament la K_M aparent d'hCNT3 per adenosina era de $12\mu\text{M}$ i en presència d'ADK baixava a $7.4\mu\text{M}$. Mentre que la K_M aparent d'hCNT3 per la citidina es mantenia a $5.3\mu\text{M}$ i $5.9\mu\text{M}$ tant en absència com en presència d'ADK, respectivament.

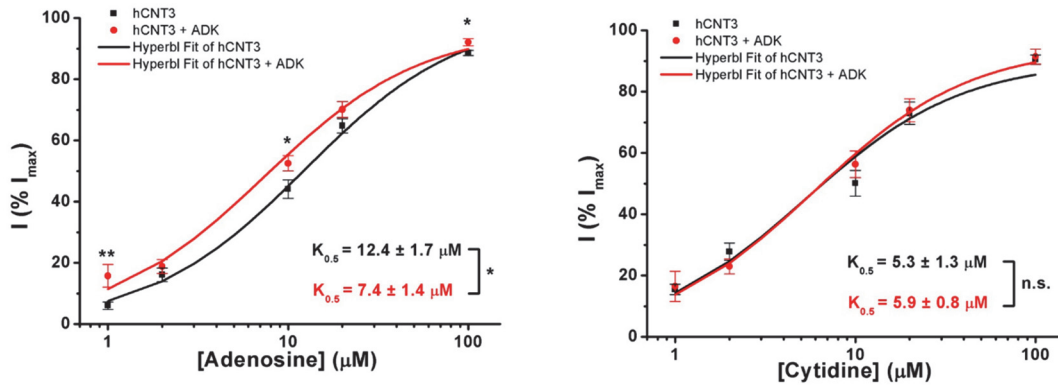


Figura 58. Influència del potencial de membrana en la $I_{\text{màx}}$ en corrents induïts per adenosina o citidina en cèl·lules de *Xenopus* que expressen hCNT3 o hCNT3+ADK. Corrents d'adenosina (A) i citidina (B) de les condicions hCNT3 ($n=14$) Mitjana \pm SD i hCNT3 + ADK Mitjana \pm SD ($n=13$) en oòcits de *Xenopus laevis*. $p < 0.05$ *

Amb aquests resultats podíem demostrar que aquesta interacció entre les dues proteïnes tenia una rellevància fisiològica. En el cas de l'adenosina, s'observava que la K_M aparent disminuïa en aquells oòcits que co-expressen hCNT3 i ADK, fet que no succeïa quan el substrat incorporat era la citidina. Per tant, podríem dir que la presència d'ADK, en un sistema on predomina el transport d'adenosina mediat per hCNT3, fa que l'afinitat del transportador per translocar l'adenosina sigui aproximadament dos cops més gran que si no hi és aquest enzim. Mentre que pel transport de citidina, la K_M aparent d'hCNT3 es mantenia tant en presència com en absència d'ADK. Resultats que indicarien que aquesta és una interacció específica que afecta a un únic nucleòsid: l'adenosina, substrat d'ADK i hCNT3.

A més, es va poder veure que la constant d'afinitat aparent ($K_{0.5}$) per l'adenosina en els oòcits que només expressaven hCNT3 es mantenia independent del voltatge entre -90 i -150mV i augmentava a $26\mu\text{M}$ aproximadament a -10mV . Aquesta tendència independent del voltatge entre -90 i -150mV era la mateixa que seguien els oòcits que expressaven hCNT3 i ADK, però sempre amb valors inferiors i la $K_{0.5}$ només augmentava fins a $20\mu\text{M}$ aproximadament a -10mV (Figura 59A). Aquests resultats seguirien en la mateixa línia que els anteriors, és a dir, que la interacció entre les dues proteïnes faria que el transportador fos més eficient a l'hora de

Resultats i discussió

translocar l'adenosina quan aquest es troba acoblat a l'ADK. En canvi, la $K_{0.5}$ per la citidina era la mateixa en ambdós casos tant si els oòcits només expressaven hCNT3, com si co-expressaven ADK i hCNT3 (**Figura 59A**). Confirmant un altre cop que aquesta afinitat per l'adenosina és un fet específic per aquest nucleòsid, substrat de l'ADK, i no per d'altres, com la citidina.

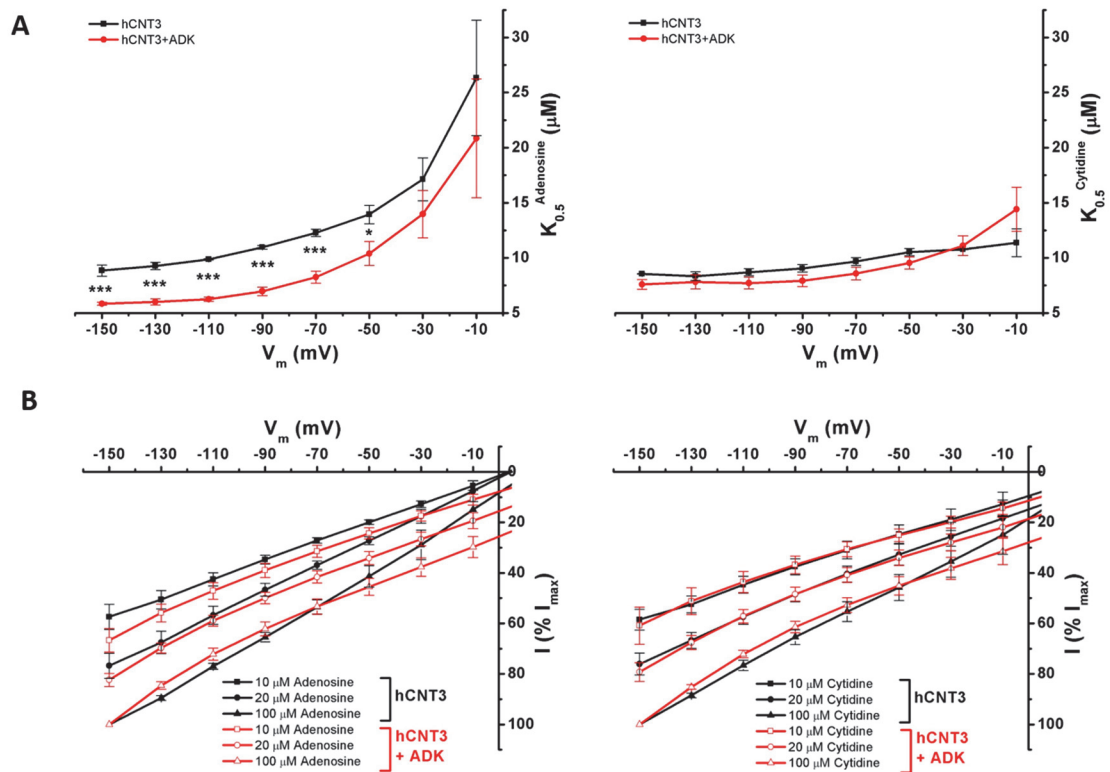


Figura 59. Influència del potencial de membrana en la $K_{0.5}$ en corrents induïts per adenosina o citidina en cèl·lules de *Xenopus* que expressen hCNT3 o hCNT3+ADK. Dependència de voltatge en la $K_{0.5}$ de l'adenosina (A) i la citidina (B) en oòcits que expressen hCNT3 (línia negra) o hCNT3 + ADK (línia vermella). $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$

Dit d'una altra manera, una forta hiperpolarització de la membrana plasmàtica la $K_{0.5}$ disminuïa el transport d'adenosina i no el de citidina. Per tant, la sensibilitat per la citidina era més baixa que la de l'adenosina. A més, si comparem aquesta disminució de la $K_{0.5}$ en el transport d'adenosina on es coexpressava hCNT3 i ADK respecte quan només s'expressava hCNT3 es podia observar que la primera condició és molt més sensible ja que la disminució de la $K_{0.5}$ és significativament més baixa (**Figura 59A**). Demostrant, un altre cop que l'afinitat del transportador per adenosina en presència d'ADK és major.

Aquests resultats es tornen a repetir utilitzant una altra aproximació. A més despolarització de la membrana, s'obtenia més intensitat de corrent, i si ens fixàvem amb els oòcits que co-expressaven les dues proteïnes, hCNT3 era capaç de generar més corrent, per tant, l'activitat

del transport era major que en els oòcits que només expressaven hCNT3. En canvi, pel que fa el transport de citidina, no s'observaven diferències entre les condicions (**Figura 59B**).

En conjunt, els resultats d'electrofisiologia permeten concloure que hi ha un canvi en l'eficiència del transportador per translocar específicament adenosina segons la presència o absència d'ADK. Però això no implica que puguem detectar diferències significatives en els resultats obtinguts mesurant el transport directe d'hCNT3 (en condicions de silenciament d'ADK) (**Figura 52**), ja que, pot passar, per exemple, que aquesta interacció afecti l'eficiència de senyalització promoguda per ADK i no al transport intrínsec d'hCNT3. Un exemple clar de que més afinitat no implica més activitat del transportador, seria el cas que es va descriure pel transport d'hCNT3 d'uridina en presència de Na^+ o H^+ . És sabut que hCNT3 pot utilitzar ambdós tipus de cations per realitzar la seva funció (Pastor-Anglada et al. 2008 i Young et al. 2013) i per electrofisiologia es va veure que el corrent generat per uridina en presència de H^+ era major que el de Na^+ , no obstant, l'eficiència del transport era més baixa amb H^+ (Gorraitz et al. 2010). Això podria explicar perquè els resultats basats en el transport d'hCNT3 no són tant concloents com si ho són els d'electrofisiologia. A més, s'ha vist que el transportador hCNT3 forma un homotrímer creant un porus que reduiria la distància de translocació amb el substrat, tot i que és necessària més investigació per determinar les conseqüències funcionals d'aquest fet (Stecula et al. 2017). Això també podria explicar perquè amb els assaigs de transport se'ns fa difícil detectar aquest canvi en l'eficiència del transportador per l'adenosina. Ja que el fet, per exemple, que hCNT3 porti un *tag* com per exemple, el YFP o el fet de deleccionar part del transportador pugui afectar al plegament correcte de la proteïna i això comporti que no es puguin detectar diferències en la seva activitat. Tot i que, finalment, disminuint la concentració del substrat i el temps de transport, sí que vam poder detectar aquest canvi d'afinitat del transportador envers l'adenosina tal i com demostren també els assaig d'electrofisiologia.

Tots aquests resultats, ens porten a pensar que la interacció entre el transportador d'adenosina i l'enzim que la fosforila i fa que l'adenosina quedi atrapada dins la cèl·lula, seria un sistema més de regulació de l'adenosina. Fet important per la cèl·lula ja que l'adenosina és un precursor de diversos metabòlits implicats en molts processos cel·lulars altament regulats per diversos senyals intra- i extracel·lulars (Borea et al. 2016).

L'evidència que en presència d'ADK, el transportador hCNT3 guanyi afinitat envers el seu substrat suggereix algun canvi conformacional per part del transportador que de manera selectiva afectaria l'acumulació d'adenosina i que fóra compatible amb una interacció directa entre les dues proteïnes. Tanmateix, caldria aprofundir en l'estudi d'aquesta interacció per exemple, induint mutacions/deleccions, especialment en l'extrem N-terminal de hCNT3 que,

Resultats i discussió

sense afectar la funció del transportador, poguessin alterar l'impacte cinètic de la presència d'ADK sobre la funció hCNT3.

En la present tesi s'han generat les primeres evidències bioquímiques i funcionals de que aquesta interacció es produeix i que té un efecte biològic en la cèl·lula. Tot i que és un treball que finalitza aquí, queda un camp obert per seguir estudiant els transportadors de nucleòsids, les possibles interaccions amb altres proteïnes i les noves funcions adquirides, així com la implicació que poden tenir en el tractament de diverses malalties com ara el càncer, malalties inflamatòries i/o infeccioses.

BLOC 2

Modelatge d'hCNTs i la interacció amb acadesina

Modelatge d'hCNTs i la interacció amb acadesina

La leucèmia és un càncer dels òrgans productors de la sang, que es caracteritza per la proliferació excessiva o el dèficit de l'apoptòsi de les cèl·lules blanques (leucòcits) a la circulació, a la medul·la òssia o altres teixits. Les diferents leucèmies es classifiquen en funció de l'evolució de la malaltia (**agudes o cròniques**) i el tipus predominant de la cèl·lula blanca implicada ("**mieloides o mielogènica**": les cèl·lules de la línia mieloide que originen els glòbuls vermells, plaquetes i els leucòcits granulars són les afectades o "**limfoide o limfàtica**": quan està implicada la línia cel·lular limfoide, que dóna lloc als limfòcits. Aquestes característiques s'utilitzen per designar la majoria de casos de leucèmia com un dels quatre tipus següents: leucèmia limfoide aguda o crònica i leucèmia mieloide aguda o crònica.

La leucèmia crònica de tipus B (B-LLC, de l'anglès *B-cell Chronic Lymphocytic leukemia*) es caracteritza per la acumulació de limfòcits B de vida llarga (Kipps 1998 i Keating 1999). La majoria de cèl·lules circulants no es divideixen i l'excés de cèl·lules B està provocat, principalment, per defectes que provenen de la mort cel·lular programada, enlloc d'alteracions de la regulació del cicle cel·lular (Reed 1998). Els glucocorticoides i altres agents quimioterapèutics utilitzats en la clínica, inclosos els anàlegs de nucleòsids cladribina (2-cloro-2'-desoxiadenosina) i fludarabina (9- β -D-arabino-2-fluoroadenina) utilitzada en la forma 5'-monofosfat, indueixen l'apoptosi de les cèl·lules B en pacients amb B-LLC (McConkey et al. 1991, Carrera et al. 1991, Carson et al. 1992, Robertson et al. 1993 i Bellosillo et al. 1997), el que suggereix que l'apoptosi és el mecanisme de la seva acció terapèutica. D'aquesta manera, la fludarabina i altres anàlegs són molt efectius en el tractament de la leucèmia limfàtica de tipus B, sols o en combinació amb altres agents. No obstant, aquests agents indueixen també l'apoptosi de cèl·lules T. Això representa un important efecte secundari advers en els pacients perquè dóna lloc a la immunosupressió, fet que il·lustra la necessitat de nous agents pel tractament de les malalties limfoproliferatives de tipus B, en particular la LLC-B.

Estudis prèvis han demostrat que la 5-amino-1- β -D-ribofuranosil-1 H-imidazol-4-carboxamida, acadesina, ribòsid de 5-aminoimidazol-4-carboxamida, AICA-ribòsid o AICAR, indueix l'apoptosi de les cèl·lules B de pacients B-LLC (Campàs et al. 2003). Aquests resultats foren antagònics amb altres estudis que havien descrit diversos casos on l'acadesina produeix l'efecte contrari, és a dir, inhibeix l'apoptosi induïda per glucocorticoides en timòcits quiescents (Stefanelli et al. 1998), inhibeix l'apoptosi provocada per la falta de sèrum en fibroblasts que sobreexpressen la fructosa 2,6-bisfosfat (Durante et al. 1999) i que a més, inhibeix l'apoptosi induïda per la

ceramida en astròcits primaris (Blázquez et al. 2001). Aquests resultats indicarien que l'acadesina podria induir o inhibir l'apoptosi en funció del tipus cel·lular on estigués actuant.

El primer pas del metabolisme de l'acadesina és la seva conversió a AICA ribòsid (ZMP) (Hardie et al. 1998) a través d'una quinasa de nucleòsids, probablement ADK (Sabina et al. 1985). La fosforilació d'AICAR a ZMP sembla ser un pas essencial per induir l'apoptosi ja que la inhibició d'ADK amb 5-ITU protegeix a la cèl·lula de l'efecte citotòxic. Si la causa d'aquesta apoptosi és l'acumulació de ZMP o un altre metabòlit secundari encara no és sabut (Campàs et al. 2003). Un cop l'acadesina es fosforila a ZMP, aquest metabòlit pot actuar com un mimètic de la 5'-adenosina monofosfat (AMP) i activa l'AMPK (AMP-activated protein kinase (Corton et al. 1995) a una concentració suficient per induir l'apoptosi de les cèl·lules B en pacients de LLC-B (**Figura 60**). Tot i així, estudis recents conclouen que l'efecte d'AICAR en el metabolisme cel·lular abarca vies i metabòlits molt diferents que no sempre estan totalment relacionats amb la via de senyalització d'AMPK (Vicent et al. 2015). Recentment, s'ha vist que AICAR indueix l'apoptosi per un mecanisme independent del gen supressor de tumors p53, del gen Ataxia Telangiectasia Mutat (ATM) i d'AMPK i que ho fa mitjançant la sobreexpressió del mRNA de proteïnes proapoptòtiques de la família BCL-2 (BIM i NOXA) (Santidrián et al. 2010). Aquest és un fet important ja que alteracions en ambdós gens (p53 o ATM) estan relacionades amb la resistència a la quimioteràpia en LLC (Zenz et al. 2010) (Sturm et al. 2003).

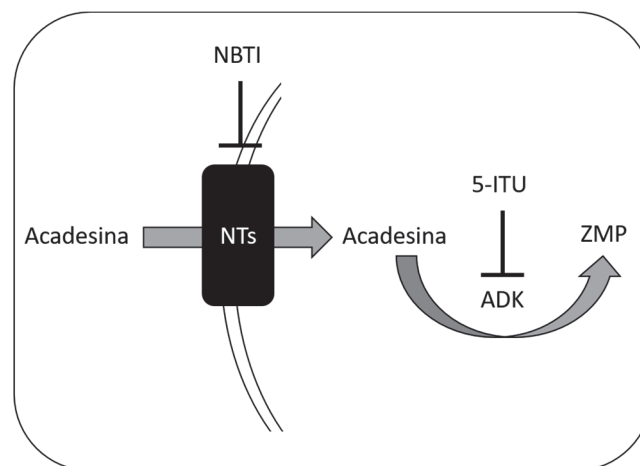


Figura 60. Esquema de la via metabòlica d'acadesina. NTS: transportadors de nucleòsids / 5-ITU: 5-iodotubercidina / ADK: Adenosina quinasa / ZMP: AICA ribòsid.

Adicionalment, s'ha demostrat que les cèl·lules T dels pacients amb B-LLC són resistents a l'apoptosi induïda per acadesina. Els nivells de ZMP en cèl·lules T tractades amb acadesina són

tres cops menors que els nivells obtinguts en cèl·lules B, i no són suficients per activar l'AMPK, fet que podria explicar la resistència de les cèl·lules T a l'acadesina (Campàs et al. 2003).

Aquests resultats inesperats fan de l'acadesina i dels seus bioprecursors uns agents terapèutics potencialment útils pel tractament d'aquest tipus de malalties. Tot i que la fludarabina i altres nucleòsids són altament eficients pel tractament de la LLC-B (Keating et al. 1999), són fàrmacs que també indueixen l'apoptosi de les cèl·lules T portant al pacient a un estat d'immunodepressió. L'efecte diferencial de l'acadesina sobre els limfòtics B i T és un avantatge important respecte l'ús d'altres anàlegs de nucleòsids ja que l'efecte secundari advers de la immunosupressió es veu reduït quan s'usa l'acadesina com a agent terapèutic.

De l'interès d'utilitzar l'acadesina com un nou agent terapèutic, neix la necessitat de conèixer els transportadors que necessita la cèl·lula per tal d'internalitzar el nou fàrmac. Aquest interès incrementa ja que si hCNT3 és un dels possibles transportadors capaços d'internalitzar acadesina, el fet que ADK pugui modificar l'eficiència del transportador podria tenir un efecte sobre la metabolització d'AICAR per part d'ADK. A més, cal recordar que aquest primer pas d'activació d'AICAR per part d'ADK és un pas essencial perquè pugui tenir un efecte dins la cèl·lula. En un estudi inicial s'ha vist que l'inhibidor dels transportadors de nucleòsids, NBTI, bloqueja l'apoptosi induïda per acadesina, demostrant d'aquesta manera que l'entrada d'acadesina a través dels transportadors sensibles a NBTI és un pas necessari pel seu efecte apoptòtic. De tots els sistemes de transport de nucleòsids, els únics sensibles a concentracions nanomolars de NBTI són dos: un equilibratiu (es o ENT1) i un concentratiu (N5) (Pastor-Anglada et al. 1998). De manera interessant, aquest sistema de transport concentratiu està expressat en cèl·lules leucèmiques NB4 (Flanagan and Meckling 1997) i línies cel·lulars humanes B-LLC (Soler et al. 1998 i Molina-Arcas et al. 2003). Nous estudis són necessaris per tal de caracteritzar els transportadors d'acadesina en les cèl·lules B i T. Això pot ser rellevant terapèuticament perquè contra més transport de nucleòsids a les cèl·lules B respecte les cèl·lules T podria explicar la diferència de sensibilitat a l'acadesina (Campàs et al. 2003).

1 Transport d'acadesina

Amb tot el que s'ha exposat prèviament, es va voler estudiar quins eren els transportadors responsables de la internalització d'AICAR. D'aquesta manera es volia veure si AICAR tenia un efecte diana que podria explicar la diferència de sensibilitat davant d'aquest fàrmac en diferents tipus cel·lulars i que a més, podrien convertir en AICAR en un tractament més segur que el de la fludarabina. Tal com s'havia vist, els transportadors equilibratius de nucleòsids podien ser bons candidats ja que al inhibir amb NBTI es bloquejava l'apoptosi induïda per AICAR, demostrant d'aquesta manera que el transport d'acadesina a través dels transportadors sensibles a l'inhibidor NBTI era un pas necessari perquè es produís l'efecte apoptòtic d'aquest fàrmac (Campàs et al. 2003). Aleshores, si era possible que AICAR fos introduït a la cèl·lula pels hENTs, era molt probable que algun membre de la família dels transportadors concentratius també pogués tenir aquest rol. Per aquest motiu també es va decidir estudiar quin efecte tenien els hCNTs en la biodisponibilitat d'AICAR. Tanmateix, no podíem obviar la importància que tenen els transportadors de la família gènica *SLC22*, que codifica pels transportadors de cations orgànics (OCTs). Aquests són uns transportadors que, tot i no semblar molt bons transportadors dels nucleòsids naturals (Ciarimboli 2008 i Srimaroeng et al. 2008), sí que es troben implicats en el transport de derivats de nucleòsids i nucleobases que no poden ser transportats pels transportadors de nucleòsids i que actualment s'utilitzen en el tractament de malalties anti-virals i processos oncològics (Stocker et al. 2013).

1.1 Caracterització de les vies d'internalització d'AICAR

Com a primera aproximació per determinar quins eren els transportadors responsables de la interiorització d'AICAR es va mesurar de forma indirecta l'activitat de cadascun dels transportadors pel seu nucleòsid natural en presència d'AICAR. De manera que, es va mesurar la captació de nucleòsids naturals marcats radioactivament (guanosina per hCNT2 i citidina per hCNT1 i hCNT3) i es va inhibir aquest transport amb una elevada concentració d'AICAR. D'aquesta manera, el transportador que fos capaç d'internalitzar AICAR, al trobar-se en major concentració, transportaria AICAR i no podria transportar el seu nucleòsid natural, per tant, el senyal del transport pel seu nucleòsid natural disminuiria.

El model utilitzat va ser la línia cel·lular HEK293 transfectada transitòriament amb els transportadors concentratius de tipus 1, 2 i 3 mitjançant el mètode de fosfat càlcic, tal i com

està descrit a l'apartat de materials i mètodes. Per aquests assajos es va utilitzar el nucleòsid tritiat citidina per avaluar l'activitat d'hCNT1 i hCNT3 o guanosina per hCNT2, en tots casos en presència o en absència d'AICAR 500 μ M i es va determinar el transport a 1 minut. Els resultats obtinguts, mostrats a la **Figura 61**, demostren com AICAR pot interaccionar amb els tres transportadors concentratius, ja que el transport del nucleòsid natural es troba inhibït.

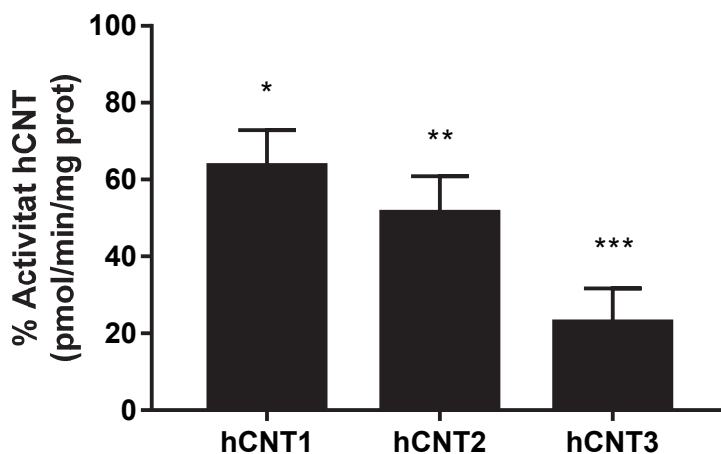


Figura 61. Inhibició del transport dels nucleòsids naturals dels transportadors hCNTs en presència d'AICAR. Cis-inhibició per AICAR (500 μ M) del transport dels nucleòsids naturals (citidina 1 μ M per hCNT1 i hCNT3 i guanosina 1 μ M per hCNT2) a la línia cel·lular HEK293 transfectada transitòriament amb hCNT1, 2 o 3. Mitjana de triplicats de 4 experiments \pm SEM. (hCNT1 i 2 n=3, hCNT3 n=4). $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$

Aproximadament es va observar una inhibició del 35% pel transportador hCNT1, del 48% per hCNT2 i del 75% per hCNT3. La inhibició més gran observada corresponia, doncs, a l'activitat d'hCNT3, resultats que suggeririen que existia una major interacció d'AICAR amb aquest transportador respecte a hCNT1 i hCNT2.

De la mateixa manera, es van realitzar experiments d'inhibició de l'activitat dels transportadors equilibratius. Per a la realització d'aquest assaig, i degut a que les cèl·lules expressen endògenament hENT1, no va ser necessària la transfecció i es va mesurar l'activitat dels transportadors equilibratius en presència d'AICAR. No obstant, els resultats obtinguts en aquests experiments no eren conclouents ja que presentaven una gran variabilitat entre ells. Aquest fet ens va portar a canviar d'estratègia per tal de poder determinar si AICAR, a part d'interaccionar amb els transportadors de tipus concentratiu, també ho podia fer amb els de tipus equilibratiu. Amb aquesta finalitat, es van realitzar experiments de captació directa amb AICAR marcat radioactivament, tant per hCNTs com per hENTs. El fet de disposar d'AICAR marcat radioactivament amb triti ens va permetre realitzar la mesura del transport directe d'aquest anàleg de nucleòsid. Per aquest estudi es va seguir treballant amb la línia cel·lular HEK293

transfectada transitòriament amb els transportadors concentratius hCNT1, hCNT2 i hCNT3. Pel que fa als transportadors equilibratius, es van realitzar assaigs de transport utilitzant l'inhibidor NBTI a una concentració d'1 μ M la qual només inhibeix hENT1 i dipiridamol a 10 μ M, el qual inhibeix els transportadors hENT1 i hENT2. D'aquesta manera es podia estimar l'activitat de cadascun dels transportadors. En tots els casos es va utilitzar l'AICAR marcat amb triti per mesurar l'activitat de cadascun dels transportadors. En relació als transportadors de tipus concentratiu, vam poder observar que AICAR interaccionava principalment amb hCNT3 i existia una petita proporció que era captat per hCNT1 i amb menys mesura per hCNT2. Tot i que, existís aquesta petita participació d'hCNT1 i hCNT2, el que semblava ser el major responsable del transport d'AICAR mediat pels transportadors de tipus concentratiu era hCNT3.

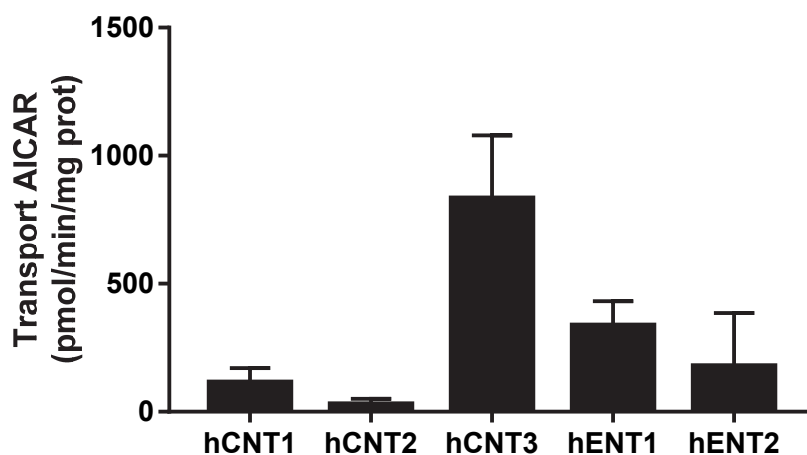


Figura 62. Transport directe d'AICAR mitjançat pels transportadors hCNTs i hENTs. Transport directe d'AICAR (1min, 100 μ M, 1 μ Ci) en HEK293 transitòriament transfectat amb hCNT1, hCNT2 o hCNT3. L'activitat d'hENT1 i hENT2 es mesura inhibint amb NBTI 1 μ M i dipiridamol 10 μ M. Mitjana dels triplicats de 2 experiments independents \pm SEM.

En referència als transportadors equilibratius, s'observava que hENT1 també tenia capacitat per transportar AICAR tot i que en menor mesura que hCNT3 (**Figura 62**). Aproximadament la implicació del transportador concentratiu era el doble que la de l'equilibratiu. Sabent que la línia cel·lular HEK293 no presenta pràcticament activitat d'hENT2 endògena, ens vam trobar que sí que podíem detectar cert transport d'AICAR (**Figura 62**). Cal dir que l'error obtingut per aquest transportador era bastant elevat, fet que succeeix quan les taxes de transport mesurades són relativament baixes. Per aquest motiu, sabent que la línia cel·lular no té una activitat hENT2 endògena, no sorprenia aquest error elevat i per tant, assumíem que pràcticament la intervenció dels hENTs per la captació d'AICAR venia donada per hENT1 i no per hENT2. A més, treballs

previs havien demostrat que el transport d'AICAR a les cèl·lules LLC es trobava mediat per proteïnes sensibles a l'inhibidor NBTI (hENT1) (Campàs et al. 2003).

Per tal de confirmar que els transportadors responsables d'internalitzar AICAR eren hENT1 i hCNT3 com havíem vist anteriorment, es van realitzar diversos experiments de captació directa d'AICAR en cèl·lules NP-9 infectades amb l'adenovirus d'hENT1 o hCNT3, ambdós generats al nostre laboratori. Per tal de confirmar que s'havia produït la infecció correctament, es va mesurar el transport de citidina com a control (**Figura 63**). Un cop demostrat que les cèl·lules expressaven i presentaven activitat dels dos transportadors transfectats, es va avaluar la taxa de transport que presentaven per AICAR. Es va poder observar que tant hCNT3 com hENT1 presentaven un augment de la captació d'AICAR (**Figura 63**). D'aquesta manera es tornava a confirmar que aquesta molècula era substrat per aquests dos transportadors.

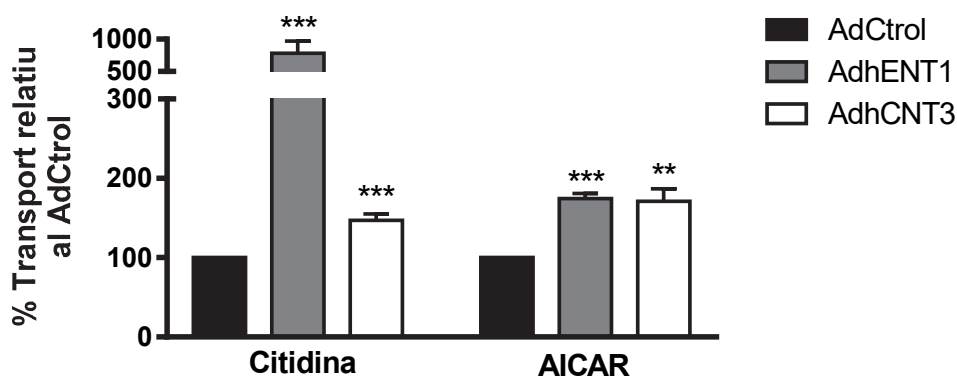


Figura 63. Transport directe d'AICAR en la línia cel·lular NP9 infectada amb l'adenovirus d'hENT1 i hCNT3. Transport directe d'AICAR (1min, 1 μ Ci, 100 μ M) en la línia cel·lular NP9 infectada per AdenohENT1 i AdenohCNT3. El transport de citidina (1min, 1 μ Ci, 1 μ M) s'utilitza com a control. Mitjana dels quadruplicats de 4 experiments \pm SEM. $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$

En conjunt, tots els resultats obtinguts en relació a la interiorització d'AICAR ens permetien concloure que els transportadors implicats eren hENT1 i hCNT3. Mentre que la resta de membres tant de la família de transportadors concentratius, com la dels equilibratius no eren capaços d'estimular el transport d'AICAR o era poc probable que aquests transportadors tinguessin un rol principal en la captació d'AICAR.

Un treball realitzat per un altre grup en paral·lel amb els nostres estudis van identificar hENT1, hENT2 i hCNT3 com a transportadors d'AICAR en cèl·lules de llevat. Una gran diferència que van observar va ser que el transport d'AICAR en llevat era molt menys eficient en comparació al transport de les cèl·lules de mamífer. Concretament, es necessitava una concentració extracel·lular d'AICAR 10 cops major en les cèl·lules de llevat (5mM) respecte els models

cel·lulars humans i de ratolí (0.5mM) per aconseguir nivells intracel·lulars d'AICAR comparables entre els dos sistemes (Ceschin et al. 2014). Els sistemes de transport d'AICAR de llevat i humans semblaven, doncs, clarament diferents. A més, no s'havia identificat cap ortolog en cèl·lules humanes del transportador de llevat que interioritzava AICAR, Nrt1 (Belenky et al. 2008). No obstant, tot i aquestes diferències, l'entrada d'AICAR es produïa mitjançant sistemes de transport d'adenosina en ambdós sistemes, en llevat i en cèl·lules humanes. Aquests resultats coincidien en gran mesura amb els que vam obtenir nosaltres. Ja que nosaltres també vam concloure que AICAR era interioritzat per hCNT3 i hENT1, dos transportadors que també interaccionen amb adenosina. La única diferència entre aquest estudi (Ceschin et al. 2014) i els resultats de la present tesi eren les dades obtingudes en referència a hENT2. Ja que nosaltres vam considerar que la taxa de transport d'hENT2 observada no era significativament important respecte a l'activitat d'hENT1, ja que aquesta era major. Aquest estudi, també conclouia que hENT1 tenia major taxa de transport que hENT2 però, en aquest cas, l'activitat observada d'hENT2 sí que era significativa i, per tant, tindria un rol important en la captació d'AICAR. Es podria pensar doncs, que el sistema que vam utilitzar nosaltres no va ser prou sensible per poder detectar la participació real del transportador equilibratiu hENT2.

Com s'ha comentat anteriorment, també es va creure interessant incloure l'estudi de l'efecte del transportador hOCT1 en l'anàlisi de la internalització d'AICAR. Aquest es va determinar mitjançant la utilització de la línia cel·lular HEK293 transfectada establenent amb hOCT1 i com a control la mateixa línia cel·lular transfectada amb el vector buit pcDNA5, generades al nostre laboratori.

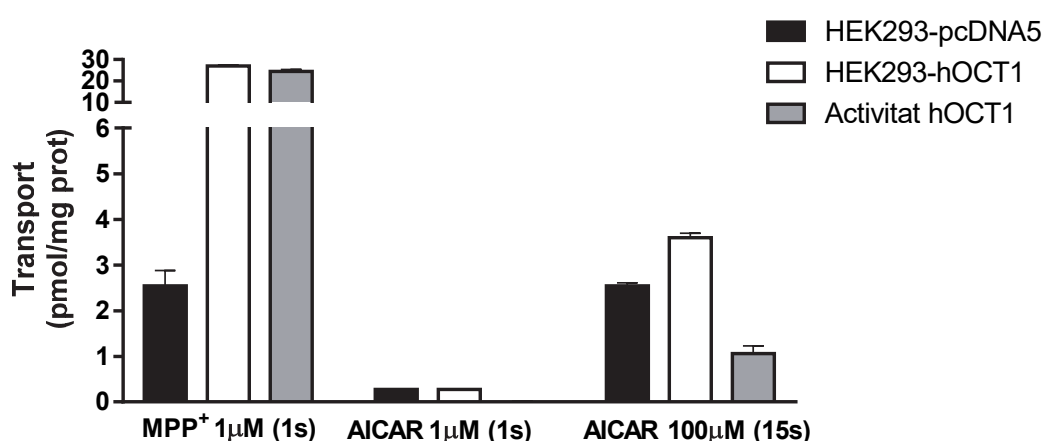


Figura 64. Transport d'AICAR a través del transportador hOCT1. Transport de MPP⁺ (1µM, 1µCi/mL 1 segon) i AICAR (1µM, 1µCi/mL 1 segon) i (100µM, 2µCi/mL 15 segons) en la línia cel·lular HEK293 pcDNA5 (barres negres) i la línia HEK293 que expressa establenent hOCT1 (barres blanques). La diferència de transport entre ambdues línies cel·lulars correspon a l'activitat del transportador hOCT1 (barres grises). Mitjana dels triplicats de 3 experiments representatius ± SEM.

En aquests assaigs es va utilitzar com a substrat model d'hOCT1 el compost MPP⁺ (1-metil-4-fenilpiridina). En un primer moment, es va mesurar el transport a un segon d'AICAR tritiat a una concentració d'1µM. Els resultats obtinguts en aquesta primera aproximació van mostrar que hOCT1 no internalitzava AICAR en les condicions assajades (**Figura 64**).

En aquestes condicions es va observar tant sols activitat residual d'hOCT1, per aquets motiu es va realitzar un nou assaig augmentant la concentració d'AICAR tritiat a 100µM i mesurant el transport a 15 segons. Tot i observar que el senyal de radioactivitat augmentava una mica amb aquestes noves condicions, la conclusió que se n'extreia era similar a l'obtinguda en el primer experiment (**Figura 64**). En conjunt, tots aquests resultats suggerien que hOCT1 no era un transportador eficaç d'AICAR.

Resultats previs del grup mostraven que l'expressió dels transportadors hOCTs en cèl·lules immunològiques era bastant heterogènia i presentaven una taxa d'activitat menor en comparació als transportadors de nucleòsids humans (hNTs), tot i que una regulació positiva sobre els hOCTs es produïa quan hi havia una activació dels limfòcits (Minuesa et al. 2008). El paper fisiològic que poden tenir els hOCTs en les cèl·lules immunològiques segueix sense estar ben definit, però es creu que aquests transportadors poden ser importants per la regulació dels processos inflamatoris i, com és conegut per hOCT3, la resposta immunològica relacionada a la citocina pro-Th2 i la histamina (Schneider et al. 2005). A més, els hOCTs podrien estar relacionats amb el potencial de membrana, fet important en alguns tractaments basats en molècules que tenen càrregues, com la cortisona, la qual és captada pels hOCTs (Koepsell et al. 2007).

Basant-nos amb els resultats obtinguts sobre el transport d'AICAR amb hOCT1 podem afirmar que la captació d'AICAR no venia facilitada per hOCT1, malgrat tenir evidències que les cèl·lules immunològiques expressen els transportadors hOCTs.

Paral·lelament es va determinar la citotoxicitat d'AICAR en cèl·lules control i en cèl·lules que expressaven estabament hOCT1 per acabar de confirmar si realment no hi havia una entrada d'AICAR per hOCT1 o si el fet de no observar transport era degut a que la tècnica no era prou sensible per detectar-lo. El que vam poder observar va ser que ambdues línies cel·lulars presentaven citotoxicitats similars (**Figura 65**), la qual cosa suggeriria també que hOCT1 no és un bon transportador d'AICAR.

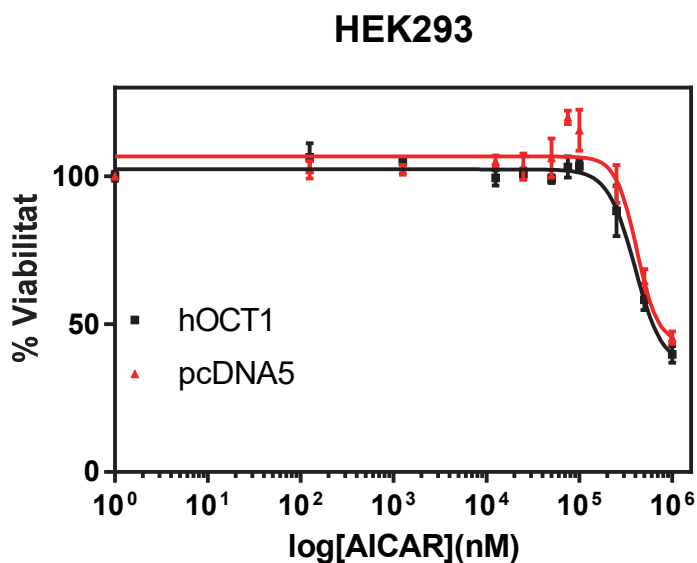


Figura 65. Viabilitat de la línia cel·lular HEK293 quan sobreexpressa el transportador hOCT1. Percentatge de la viabilitat cel·lular de la línia HEK293 que expressa establement el transportador hOCT1 (negre) i de la línia cel·lular HEK293-pcDNA5 com a control (vermell) a diferents concentracions d'acadesina. (n=1) ± SEM.

Agrupant tots els resultats obtinguts en relació al transportador hOCT1, finalment, es va poder concloure que AICAR no era un substrat de la proteïna transportadora hOCT1. Per tant, AICAR no seria un substrat que es pogués afegir a la llista de components específics que sí que seria capaç de transportar hOCT1, com ara algunes prostaglandines (Stocker et al. 2013).

1.2 Cinètiques d'acadesina amb els transportadors

Un cop identificats els transportadors responsables de la captació d'AICAR es va establir un nou objectiu: determinar l'afinitat de cada transportador per AICAR. Per fer-ho, es va utilitzar la línia cel·lular HEK293 tant pels estudis d'hCNT3 com per hENT1. En el cas de les cinètiques amb el transportador concentratiu de tipus 3, es va utilitzar el model cel·lular de HEK293 que expressa establement aquest transportador (HEK293-hCNT3). Els resultats obtinguts ens proporcionaven una K_M aparent de $2.7 \pm 0.6 \mu\text{M}$ pel transportador hCNT3 i AICAR (**Figura 66A i B**). Pel que fa a la cinètica amb el transportador equilibratiu hENT1, el model cel·lular que es va utilitzar va ser la línia HEK293 la qual va ser inhibida amb NBTI, un inhibidor que bloqueja l'activitat endògena d'hENT1. D'aquesta manera es podia discriminar quina activitat provenia dels transportadors equilibratius i quina dels concentratius. En aquest cas, es va obtenir una K_M aparent de $2.9 \pm 0.7 \mu\text{M}$ del transportador hENT1 i AICAR (**Figura 66C i D**).

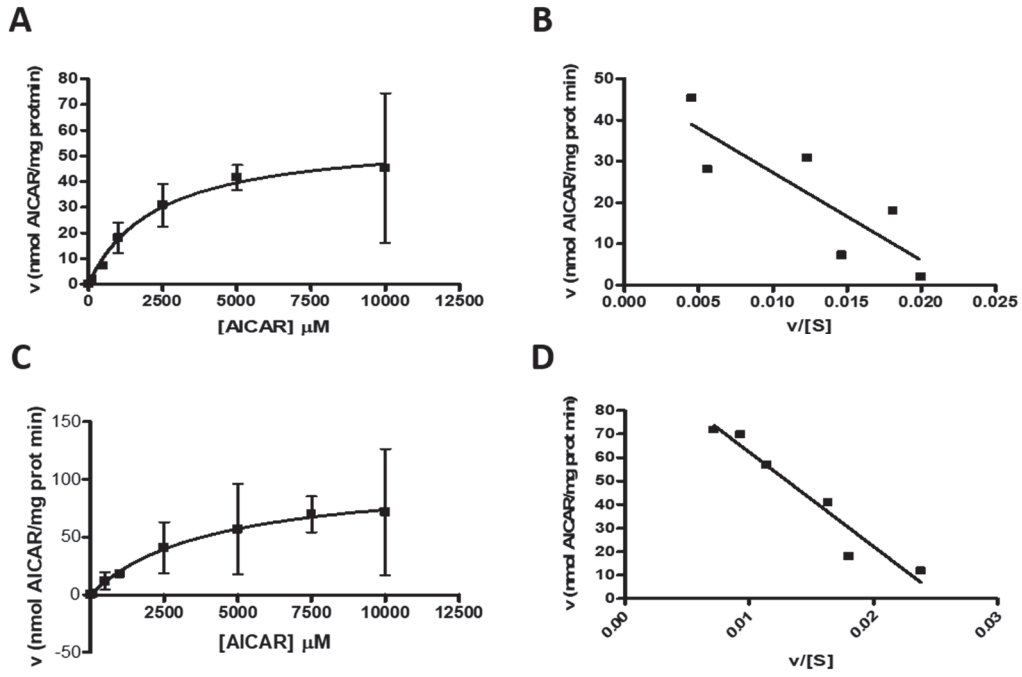


Figura 66. Cinètiques dels transportadors hENT1 i hCNT3 i AICAR. (A i B) Transport d'AICAR (1min i $1\mu\text{Ci}$) en la línia cel·lular establiment transfectada amb hCNT3. (C i D) Transport d'AICAR (1min i $1\mu\text{Ci}$) en la línia cel·lular HEK293 en presència de NBTI per poder descartar l'activitat dels transportadors concentratius. Mitjana de tres experiments independents \pm SEM.

2 Identificació dels residus responsables de la interacció amb hCNT3

Recentment s'ha generat un model tridimensional del transportador concentratiu de nucleòsids hCNT3 basat en el seu ortoleg en procarïotes. El model generat explica clarament els residus implicats en la selectivitat de substrat d'aquest transportador, a més d'aportar informació clau sobre els llocs d'unió del sodi. Considerant que el transportador hCNT3 s'expressa a la majoria de barreres epitelials i presenta una àmplia selectivitat de substrat pels fàrmacs derivats de nucleòsids, aquest model esdevé una eina molt útil que representa el primer pas per entendre com alguns dels fàrmacs disponibles i d'altres que s'estan desenvolupant poden utilitzar aquest transportador de la membrana plasmàtica per ser transportats a l'interior cel·lular (Arimany-Nardi et al. 2017).

Gràcies a la generació d'aquest model i basant-nos amb els resultats del bloc anterior, els quals demostren que hCNT3 és l'únic transportador de nucleòsids de tipus concentratiu capaç d'internalitzar acadesina a l'interior cel·lular, es va voler estudiar específicament quins eren els residus implicats en la selectivitat d'acadesina d'aquest transportador.

Per fer-ho, es va comparar la interacció d'acadesina i el nucleòsid natural uridina amb el transportador hCNT3 utilitzant la representació tridimensional del lloc d'unió d'hCNT3. En aquesta es va poder observar que tot i que la interacció amb el residu Glu343 existent amb la uridina es conserva també a la interacció amb l'acadesina, l'oxigen de l'amida i el grup amino queden orientats cap a una zona polar, fet que debilitaria el mode d'unió.

Per tal de poder determinar quines característiques estructurals són les determinants per a que l'acadesina interaccioni únicament amb hCNT3 i no amb la resta de transportadors concentratius (hCNT1 i hCNT2), es van representar models moleculars en tres dimensions dels llocs d'unió dels tres transportadors.

En el cas d'hCNT1 es va comprovar que el canvi d'una Gly (hCNT3) a Ser (hCNT1) podria modular la unió d'acadesina provocant que la ribosa estigués mal orientada respecte a la unió que es produeix amb el substrat natural, la uridina. Al mateix temps, aquest residu de serina podria debilitar la unió ja que competiria amb un residu glutàmic per formar una interacció amb el grup amino de l'amida. Pel que fa a hCNT2, el canvi de Gln341 (hCNT3) a Met (hCNT2) disminuiria la polaritat i impediria la formació de ponts d'hidrogen debilitant la unió respecte a hCNT3. Tant en la interacció amb hCNT1 com en la interacció amb hCNT2 es conserva la interacció amb el

residu Glu343. Tot i que en ambdós casos, l'oxigen de l'amida i el grup amino queden orientats a una zona apolar que debilitaria la unió. A la **Figura 67** es representa la superposició de la unió predita per la uridina i acadesina per cadascun dels transportadors: hCNT3, hCNT2 i hCNT1.

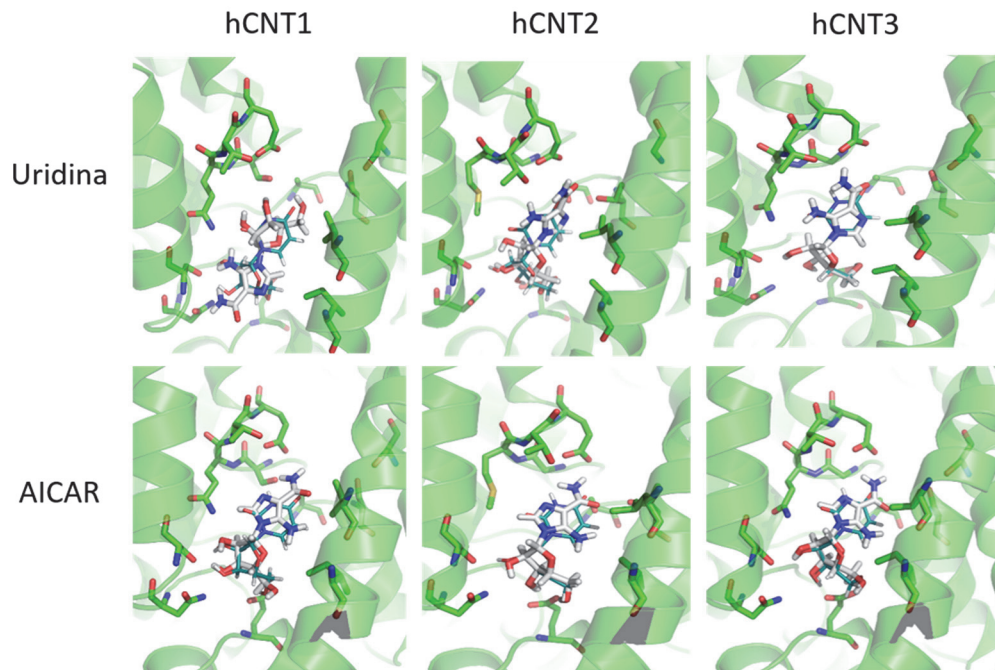


Figura 67. Model molecular 3D d'AICAR, Uridina i hCNTs. Representació tridimensional de la interacció entre els transportadors hCNT1, hCNT2 i hCNT3 amb Uridina i AICAR.

Es podria concloure doncs, que hCNT3 és l'únic transportador concentratiu capaç d'internalitzar AICAR degut a que aquest anàleg de nucleòsid i el residu Gln341 del transportador podrien formar un pont d'hidrogen.

3 Implicació funcional

El fet que observéssim que AICAR podia ser interioritzat per hCNT3 i hENT1 ens va fer plantejar si l'entrada d'AICAR per cadascun d'aquests transportadors tenia un paper diferencial sobre la cèl·lula. Es va utilitzar un model cel·lular que permetés observar si es produïen efectes biològics significativament diferents segons si AICAR era interioritzat per un transportador o un altre. La línia cel·lular MEC1 era un model que expressava endògenament ambdós tipus de transportadors. Per tant, es va convertir en el nostre model d'estudi d'aquest apartat.

3.1 Caracterització del model cel·lular MEC1

En primer lloc es va realitzar una caracterització funcional de les diferents activitats transportadores d'aquesta línia cel·lular mitjançant assaigs de transport de substrats (nucleòsids) radioactius. Per fer-ho, es va mesurar l'entrada d'uridina tritiada en cèl·lules en presència de sodi (ClNa), on actuaven tant els transportadors equilibratius (hENTs) com els concentratius (hCNTs), i en un medi sense sodi (ClCho) on només foren funcionals els equilibratius. Així la diferència de transport entre els dos medis corresponia a l'activitat dels transportadors de tipus concentratiu. S'observà que l'activitat dels hCNTs semblava ser lineal fins als 2 minuts d'incubació. Als 5 i 10 minuts ja s'arribava a una fase *plateau*, considerant-se que el que s'observava era majoritàriament acumulació i no transport (**Figura 68**).

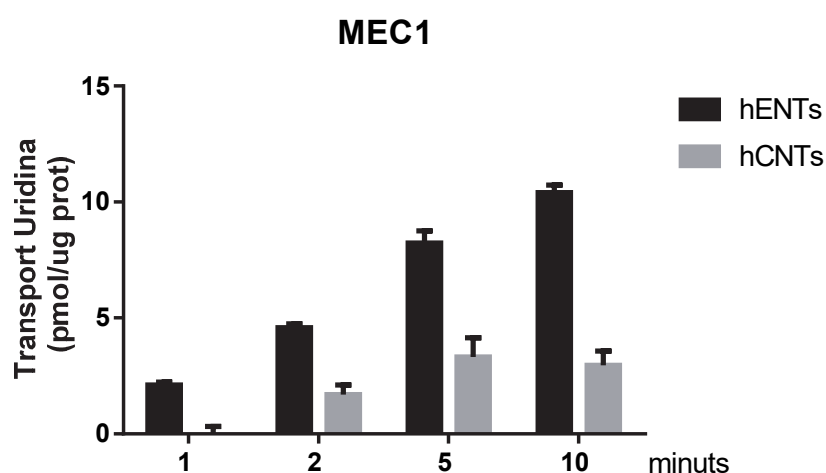


Figura 68. Activitat dels hENTs i hCNTs al llarg del temps a la línia cel·lular MEC1. Transport d'uridina- ^3H , substrat d'hENTs i hCNTs, en MEC1 en medi ric en NaCl o medi colina a 1, 2, 5 i 10 minuts. Mitjana dels quadruplicats de 2 experiments independents \pm SEM.

Aquests resultats van permetre concloure que la línia cel·lular MEC1 presentava activitat biològica de tipus hENT i hCNT. L'activitat dels hENTs podia venir donada pels dos tipus de transportadors de nucleòsids equilibratius presents a la membrana plasmàtica: hENT1 i hENT2. Estudis previs havien identificat els dos tipus de transportadors tant en línies cel·lulars derivades de limfòcits, com en cèl·lules primàries de pacients de LLC (Molina-Arcas et al. 2003 i Molina-Arcas et al. 2005). Per tant, segons aquest estudi i els nostres resultats podíem dir que el model d'estudi, MEC1, presentava l'activitat d'ambdós tipus de transportadors equilibratius de nucleòsids.

Pel que fa als transportadors concentratius de nucleòsids, sabent que les MEC1 presentaven aquest tipus d'activitat hCNT, el següent objectiu va ser determinar l'aportació de cada un dels transportadors concentratius hCNT1, hCNT2 i hCNT3 en el transport sodi-dependent observat. Per fer-ho es va mesurar el transport d'uridina (captada per tots els transportadors concentratius) en presència d'una concentració saturant de citidina (transportada per hCNT1 i hCNT3) o de guanosina (transportada per hCNT2 i hCNT3). Així amb la citidina es va aconseguir inhibir els transportadors hCNT1 i hCNT3 de manera que l'activitat residual observada corresponia a hCNT2. Amb la guanosina a concentracions saturants es va poder veure l'activitat d'hCNT1 ja que s'inhibien hCNT2 i hCNT3. La diferència entre les dues activitats i la total (transport d'uridina tritiada en absència de nucleòsids a altes concentracions) va correspondre a l'activitat d'hCNT3. El problema d'aquests experiments és que ens vam trobar amb una variabilitat de resultats massa elevada entre les diferents proves (resultats no mostrats). Això podria ser degut a la poca estabilitat del nucleòsid marcat radioactivament, que és un problema que ens hem anat trobant al llarg del desenvolupament d'aquest projecte.

És per això que vam canviar d'estratègia utilitzant la guanosina per caracteritzar la línia cel·lular MEC1 ja que no ens interessava tant saber l'activitat d'hCNT1 o hCNT2, sinó que volíem saber si aquest model cel·lular presentava activitat hCNT3. Els resultats obtinguts prèviament, indicaven que hCNT3 era l'únic transportador concentratiu capaç de captar AICAR.

Per fer-ho es va estudiar el transport de guanosina, substrat d'hCNT2 i hCNT3 en presència d'una concentració saturant de citidina (transportada només per hCNT1 i hCNT3). Per tant, el transport de guanosina en presència d'altres concentracions de citidina només podia correspondre a l'activitat d'hCNT2 ja que l'elevada presència de citidina bloquejava hCNT3. La condició control, la qual només tenia guanosina tritiada com a substrat, permetia conèixer l'activitat total dels dos transportadors implicats en la interiorització de la guanosina, és a dir, hCNT2 i hCNT3. D'aquesta manera la diferència entre l'activitat del control i l'obtinguda a altes concentracions

de citidina corresponia amb l'activitat de tipus hCNT3. Tal i com es mostra a la **Figura 69** els transportadors que més activitat presentaven va ser hCNT2 i hCNT3 era el transportador menys actiu.

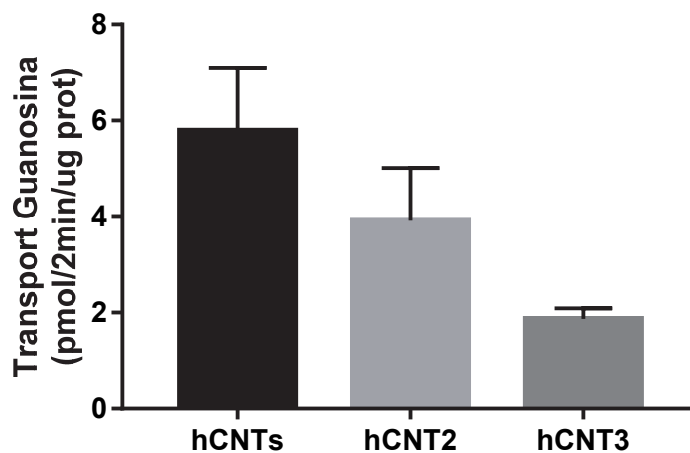


Figura 69. Activitat de cadascun dels transportadors de nucleòsids de tipus concentratiu en la línia cel·lular MEC1. Transport de guanosina-^[3H], substrat d'hCNTs i hCNT2 i hCNT3, en MEC1 en medi ric en NaCl o medi colina a 2 minuts en presència de Citidina 100µM (hCNT2) o sense (hCNTs). La diferència d'ambdós transports estima l'activitat d'hCNT3 (hCNT3). Mitjana dels quadruplicats de 2 experiments independents ± SEM.

Amb tots aquests resultats vam poder concloure que, tot i observar activitat del transportador hCNT3, l'activitat global associada a les proteïnes hCNTs en la línia cel·lular MEC1 era molt baixa. Aquests resultats coincidien amb els que prèviament havien descrit en el treball Minuesa et al. 2008, on el transportador hCNT2 era l'únic transportador concentratiu que presentava uns nivells d'expressió de mRNA notablement elevats en comparació a hCNT1 i hCNT3 en línies cel·lulars de cèl·lules T i limfòcits primaris. A més, també s'havia analitzat l'expressió dels transportadors hCNTs i hCNTs en cèl·lules primaries de pacients de LLC, on es va veure que expressaven els mRNAs d'hCNT1, hCNT2, hCNT2 i hCNT3. No obstant, existia una heterogeneïtat significativa entre els pacients pel que fa l'expressió d'aquests transportadors, sent la major variabilitat pel transportador hCNT3 i la menor per hCNT2 (Molina-Arcas et al. 2003). Era lògic, doncs, que els nostres resultats basats en l'activitat d'aquests transportadors en una línia cel·lular de limfòcits (MEC1) es traduïssin en una major activitat per hCNT2 i menor per hCNT3. A més, en aquest estudi també es va trobar que no hi havia expressió del mRNA d'hCNT1. Com hem comentat prèviament, els nostres estudis per analitzar l'activitat d'hCNT1 en la línia cel·lular MEC1 resultaven en una variabilitat massa elevada, probablement degut als baixos nivells d'expressió d'aquests transportadors (Molina-Arcas et al. 2003).

3.2 Fosforilació d'AMPK induïda per acadesina

Per intentar dilucidar si l'efecte que induïa AICAR depenia de la seva entrada per hCNT3 o hENT1 i un cop sabent que les MEC1 presentaven activitat d'hCNT3, es va voler estudiar els nivells de fosforilació que presentava AMPK quan AICAR s'interioritzava per un o per un altre transportador. Les cèl·lules es tractaren amb AICAR i amb diversos inhibidors selectius dels transportadors: NBTI 10 μ M que inhibia hENT1 i hENT2 i flordizina 250 μ M que inhibia hCNT3. Es va observar que AICAR 500 μ M fosforilava l'AMPK d'una forma dependent del temps (**Figura 70**). Aquesta activació d'AMPK disminuïa quan s'inhibien els hENTs amb NBTI 10 μ M i quan s'inhibia hCNT3 també s'observava una disminució de la fosforilació d'AMPK, encara que no tant evident (**Figura 70**). Per tant, el transport d'AICAR a les cèl·lules tant per hENT1 com per hCNT3 semblaria estar implicat en la fosforilació d'AMPK que promou AICAR.

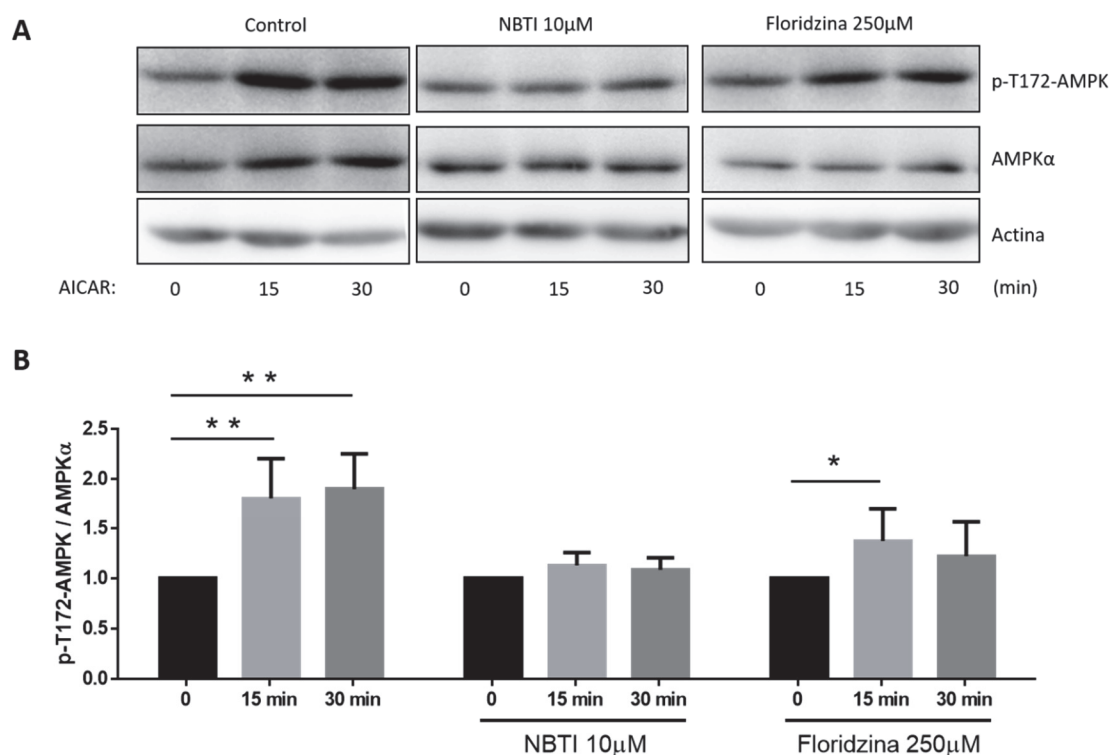


Figura 70. Activació d'AMPK en funció del transportador que interioritza AICAR en la línia cel·lular MEC1. (A) Les MEC1 són pretractades durant 20min amb NBTI 10 μ M o flordizina 250 μ M i posteriorment incubades 15 o 30min amb AICAR 500 μ M. S'analitzen els nivells de fosforilació d'AMPK α (p-T172-AMPK) i s'utilitza AMPK α i tubulina com a controls. Western blot representatiu de 3 experiments independents. (B) Densitometria de la p-T172-AMPK respecte l'AMPK total (n=4-6)

Recopilant les dades obtingudes en aquest apartat podem concloure que la internalització d'AICAR vindria donada pels transportadors de nucleòsids purínics, concretament pel transportador concentratiu hCNT3 i el transportador equilibratiu hENT1. L'estructura química d'AICAR és molt similar a l'adenosina (**Figura 71**). No és d'estranyar doncs, que els sistemes de

transport que hem identificat com a responsables de la captació d'AICAR siguin els específics per adenosina, i que aquells transportadors que no interioritzin adenosina, com ara hCNT1, tampoc puguin translocar AICAR.

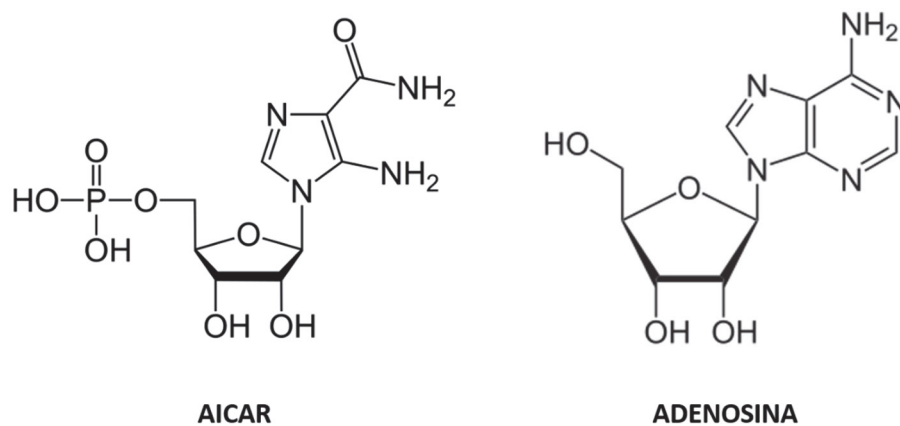


Figura 71. Estructura química de l'AICAR i l'adenosina. AICAR és un anàleg de l'adenosina monofosfat (AMP). Font: Adaptació del *Open Chemistry Database* (PubMed).

A més, el model estructural obtingut pel transportador concentratiu de nucleòsids explicaria el fet de perquè existeix aquesta selectivitat de substrat de determinats transportadors a l'hora de captar adenosina, com hem descrit a l'apartat 2 d'aquest bloc.

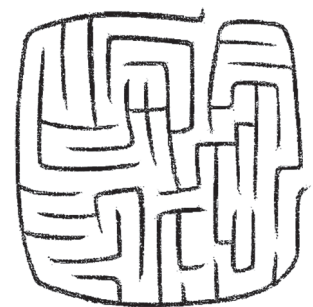
Un cop AICAR és internalitzat a l'interior cel·lular, aquest es fosforila a *AICA ribotide* (ZMP), l'intermediari endogen natural de la via de síntesi *de novo* de les purines, el qual pot funcionar com un mimètic de l'AMP i activar l'AMPK, una proteïna que regula les respostes de la cèl·lula davant de canvis energètics (Drew and Kingwell 2008). Molts estudis mostren que AICAR pot inhibir la proliferació i induir apoptosi en mielomes múltiples (Baumann et al. 2007), neuroblastoma (Garcia-Gil et al. 2006), glioblastoma (Guo et al. 2009), leucèmia limfoide aguda en nens (ALL) (Sengupta et al. 2007), cancer de còlon (Su et al. 2007) i en línies cel·lulars de càncer de pit i de prostata (Swinnen et al. 2005). Concretament, AICAR té un paper pro-apoptòtic en una gran varietat de neoplasies limfoides de cèl·lules B (Campàs et al. 2005), sent les cèl·lules provinents de la LLC les més sensibles a aquest agent (Santidrián et al. 2010, Baumann et al. 2007, Garcia-Gil et al. 2006, Guo et al. 2009, Sengupta et al. 2007, Su et al. 2007, Swinnen et al. 2005, Campàs et al. 2005 i Campàs et al. 2003).

Tot i que AICAR s'utilitza comunament com un activador d'AMPK, existeixen fortes evidències que l'efecte d'AICAR en el metabolisme cel·lular abarca vies i metabòlits molt diferents que no sempre estan totalment relacionats amb la via de senyalització d'AMPK (Vincent et al. 2015 i

López et al. 2003). Actualment, la naturalesa exacta dels efectes independents d'AMPK en cèl·lules leucèmiques no està clarament definida. S'ha vist que els efectes anti-tumorals provocats per AICAR, poden estar mitjançats, almenys en part, independentment de la via d'AMPK (Jacobs et al. 2007, Kuo et al. 2008, Guigas et al. 2006 i Santidrián et al. 2010).

A nivell funcional, no hem pogut detectar diferències significatives respecte la captació d'AICAR per la cèl·lula a través del transportador concentratiu o es feia pel transportador equilibratiu. Hem pogut veure que el fet de bloquejar ambdós vies d'entrades es tradueix en una disminució de la fosforilació d'AMPK. Resulta difícil concloure l'efecte de cadascuna de les vies d'entrada sobre AMPK ja que la línia cel·lular MEC1 no expressa ambdós tipus de transportadors de forma equitativa. Per tant, no es pot dir que el fet que AICAR entri per hCNT3 provoqui un efecte menor sobre la fosforilació d'AMPK, ja que hem pogut observar que l'activitat d'hCNT3 en aquesta línia cel·lular també és menor. Com hem comentat, s'ha demostrat que AICAR, tot i tenir efectes dependents d'AMPK, hi ha molts casos en els que aquests efectes són independents d'AMPK, suggerint que existeixen dianes addicionals per AICAR. Una d'aquestes podria ser els transportadors que capten AICAR. Caldrien més estudis per veure si el fet que AICAR entri a la cèl·lula per hCNT3 o hENT1 influeix d'alguna manera en l'activació d'AMPK o en la inducció de l'apoptosi.

DISCUSSIÓ GENERAL



Conèixer la topologia i els patrons de connectivitat entre proteïnes aporta una visió essencial per comprendre la biologia sistèmica dels éssers vius. Els transportadors de nucleòsids, hCNTs i hCNTs, tot i que amb diferències pel que fa a la seva afinitat, es caracteritzen per una aparent redundància en la selectivitat pels seus substrats i fins i tot en la seva localització. Així, identificar el seu interactoma permetria entendre perquè la cèl·lula co-expressa diversos transportadors, així com descobrir noves funcions de cadascun dels membres. L'interactoma dels transportadors, pot condicionar aspectes molt diversos que poden acabar incidint en l'activitat d'aquestes proteïnes. Poden haver proteïnes que interaccionin amb els hCNTs i que tinguin un paper clau en la localització dels transportadors a diferents teixits i/o a la membrana plasmàtica o proteïnes que modifiquin la seva activitat. Les primeres proteïnes d'unió als hCNTs van ser descrites per hCNT2 i van ser la GRP58 i l'aldolasa B que ajudaven a obtenir un millor acoblament del metabolisme de la glucosa (Huber-Ruano et al. 2010). Així com la proteïna RS1, que tot i no interaccionar físicament amb els hCNTs, és capaç de modular la localització i l'activitat dels tres membres de la família hCNT (Errasti-Murugarren et al. 2012).

Amb l'objectiu de desxifrar l'interactoma de les proteïnes hCNTs, en aquest treball s'han identificat per primera vegada dues proteïnes d'interacció amb el transportador hCNT3 amb dues funcions clarament diferenciades. Mentre una contribueix a localitzar el transportador cap a la membrana plasmàtica, l'altra modifica la seva eficiència en el transport de forma específica de substrat.

La primera proteïna identificada, és una proteïna de la família de les lectines que quan es troba N-glicosilada és capaç d'interaccionar amb altres glicoproteïnes promovent així la direccionalització d'aquestes, entre d'altres hCNT3, a la membrana apical. Cal recordar que bona part de la informació que permet regular el tràfic d'hCNT3 sembla trobar-se en el seu extrem N-terminal citosòlic (Errasti-Murugarren et al. 2010a). En concret s'hi han descrit residus implicats tant en el tràfic polaritzat com en la seva pròpia dinàmica d'inserció, per la qual cosa semblaria probable que alguns d'aquests dominis estructurals poguessin estar implicats en la interacció amb Gal-4. A més, la integritat de la interacció hCNT3-Gal-4 podria ser clínicament important ja que aquest transportador sembla ser el responsable de la captació de tiopurines, com la 6-mercaptopurina, un anàleg de nucleòsid utilitzat en el tractament de malalties intestinals inflamatòries. En aquest treball s'ha pogut comprovar que els nivells de Gal-4 i hCNT3 no es troben disminuïts en pacients de Crohn, fet que podria anticipar una certa integritat en aquest mecanisme regulador de la funció hCNT3 i, conseqüentment, un manteniment de la funció del sistema de transport mitjançant el qual s'incorporen aquests fàrmacs dins de la cèl·lula. Aquesta

seria, doncs, la primera demostració directa que una lectina estaria implicada en la localització i modulació del recanvi maduració d'un transportador de nucleòsids.

Tots els resultats que fan referència a Gal-4 es van publicar durant el desenvolupament de la tesi en el següent article: Fernández-Calotti P, Casulleras O, Antolin M, Guarner F and Pastor-Anglada M (2015). Galectin-4 interacts with the drug transporter human concentrative nucleoside transporter 3 to regulate its function. *The FASEB journal*, 30 (2): 544-554 doi: 10.1096/fj.15-272773.

La segona proteïna identificada va ser ADK, un enzim relacionat amb el metabolisme de nucleòsids que té com a substrat l'adenosina. Aquest substrat també ho és pel transportador hCNT3, l'únic transportador concentratiu de nucleòsids amb una estequiometria de dos ions sodi per cada nucleòsid transportat, per tant, és el millor transportador candidat per transportar adenosina que pugui expressar la cèl·lula. El gen que codifica per ADK en amniotes, incloent els humans i ratolins, és molt gran (558kb) i el seu procés de transcripció pot trigar fins a 4 hores (Boison 2013). Aquest càlcul està basat en un estudi on calculaven el temps de transcripció del gen humà més llarg identificat, el de la distrofina (Tennyson et al. 1995). Aquest fet fa que sigui poc probable que l'ADK es trobi sotmesa a una regulació ràpida a nivell transcripcional, sinó que és més probable que l'expressió del gen d'ADK porti a un producte proteic estable a llarg termini que pugui ser regulat a través d'altres proteïnes (Boison 2013). Per tant, el fet d'identificar proteïnes d'interacció per ADK que puguin tenir un paper rellevant en la modulació de la seva funció no semblaria tan rar. En la present tesi, hem obtingut resultats que suggereixen que l'enzim ADK i el transportador d'adenosina hCNT3 estarien interaccionant físicament i que a més, aquesta unió tindria implicacions funcionals rellevants per a la cèl·lula.

L'adenosina pot ser internalitzada a la cèl·lula per hCNT2, hCNT3 o hENTs, i un cop dins la cèl·lula la ruta predominant del seu metabolisme a concentracions fisiològiques ($<1\mu\text{M}$) és la seva fosforilació, ja que ADA, l'altre enzim capaç de metabolitzar l'adenosina, té una Km tres ordres de magnitud més elevada ($70\mu\text{M}$) que l'ADK (40nM) (Spychala 2000) (Spychala et al. 1996). La regulació que exerceix l'ADK sobre el transportador és molt acurada, motiu pel qual hem hagut d'adaptar els assaigs de transport en cèl·lules humanes per tal d'apropar-nos a condicions cinètiques de velocitat inicial així com també utilitzar com a tècnica i model d'estudi el "Two Electrode Voltage Clamp" en oòcits de *Xenopus* tal i com s'havia fet per a les proteïnes hCNT en estudis anteriors del grup (Lostao et al. 2000, Larráyoz et al. 2004 i Gorraitz et al. 2010). Això ens ha permès observar com l'eficiència de transport per a l'adenosina augmentava quan el transportador es trobava en presència d'ADK, sempre en comparació amb la citidina, on no

observàvem canvis. El principal responsable de la fosforilació de la citidina és la dCK. No podem descartar que aquesta proteïna també es pugui unir a hCNT3 tot i augmentant d'aquesta manera l'eficiència del transport per citidina. No obstant, si realment es produís aquesta interacció, en un model de sobre-expressió d'hCNT3 i ADK, la unió hCNT3-ADK desplaçaria a dCK ja que hem pogut observar com hCNT3-ADK augmenta l'eficiència per l'adenosina, però no per a la citidina. Caldria realitzar els mateixos assaigs de sobre-expressió amb dCK per identificar si realment el transportador es pot arribar a unir o no a aquest enzim.

El fet d'identificar un complex que reguli d'una manera molt més precisa els nivells extracel·lulars d'adenosina pot ser molt important ja que aquest nucleòsid és agonista de receptors P1 alhora que també està implicat en molts processos cel·lulars altament regulats per diverses senyals intra- i extracel·lulars (Borea et al. 2016). S'ha vist que els nivells elevats d'adenosina extracel·lular actuen com una senyal de dany per a la cèl·lula. La senyalització mediada per aquesta purina té un paper important en l'epilèpsia, la hipòxia, la inflamació o el càncer (Antonioli et al. 2013 i Borea et al. 2016). Si ens centrem en el càncer, tant el transportador hCNT3 com l'adenosina hi tenen un paper important ja que poden actuar com a dianes en el seu tractament. Pel que fa el transportador hCNT3, com ja hem comentat, és capaç de transportar fàrmacs derivats de nucleòsids com és el cas de la Fludarabina pel tractament de la LLC (Fernández-Calotti and Pastor-Anglada 2010 i Fernández-Calotti et al. 2012). Per altra banda, estudis recents amb adenosina demostren que la inhibició de CD73 (enzim responsable de la catalització d'AMP a adenosina) o el bloqueig del receptor A2a provoca una disminució de la resposta d'adenosina provocant una immunitat anti-tumoral (Allard D. et al. 2016). En conseqüència, el bloqueig terapèutic de la síntesi i/o senyalització de l'adenosina ha emergit com una estratègia prometedora per la immunoteràpia del càncer (Allard B. et al. 2016).

En el context de la regulació de les funcions d'hCNT3 pel seu interactoma, també pren especial rellevància PAICS. PAICS, una proteïna bifuncional que catalitza dues etapes enzimàtiques en la via de síntesi de novo de nucleòtids de purines, també va ser identificada entre les proteïnes candidates d'interacció amb el domini N-terminal d'hCNT3. PAICS ha estat estudiada en un altre projecte del grup i dins del marc de la tesi doctoral de Liska Caviedes, en la qual el primer que es va veure va ser que PAICS no co-immunoprecipitava amb el transportador hCNT3. Aleshores, si PAICS es va obtenir amb el pull-down amb l'extrem N-terminal del transportador, ens vam plantejar si PAICS interaccionava amb ADK i aquesta última era la que s'unia directament al transportador. Una primera aproximació bioinformàtica, gràcies a la col·laboració del Dr. Juan Fernández-Recio (Barcelona Supercomputing Center & CSIC), va anticipar l'existència d'aquesta interacció a nivell de models teòrics i destacava alguns dels possibles residus implicats en la

interacció d'ambdues proteïnes. Per tant, en base a aquests models i als resultats del pull-down s'elaborà una hipòtesi la qual suggeriria que el complex ADK-PAICS funcionaria com un sensor per a la cèl·lula d'accessibilitat a nucleòsids i nucleobases. Degut a aquesta unió, ADK, podria inhibir PAICS i per tant, la via de síntesi de novo de nucleòtids de purines, quedant la via de reciclatge com a via principal de síntesi, basant-nos amb aquesta hipòtesi. Resultats de la tesi de Liska Caviedes demostrarien que PAICS pot immunoprecipitar ADK. Aquestes evidències preliminars ens porten a pensar que PAICS interacciona amb ADK i és l'ADK la que interacciona amb el transportador hCNT3. Interaccions que tenen sentit ja que, com s'ha esmentat prèviament, hCNT3 és un transportador de tipus concentratiu amb una àmplia selectivitat de substrat, capaç de translocar tant purines com pirimidines, com per exemple l'adenosina (Park and Gupta 2008). Per tant, la unió hCNT3-ADK podria formar part d'un hipotètic sensor de la disponibilitat de nucleòsids al medi extracel·lular. D'aquesta manera i en funció dels nivells disponibles, ADK s'uniria a PAICS tot i inhibint la seva funció, és a dir, la via de síntesi de novo de purines.

Un altre aspecte pel qual és important conèixer l'interactoma dels NTs és perquè totes les interaccions que afectin als transportadors de nucleòsids, no només influiran en el metabolisme dels nucleòsids naturals, sinó que també ho podran fer sobre els anàlegs de nucleòsids, els quals s'utilitzen com a fàrmacs per tractar diverses patologies. Els anàlegs de nucleòsids, poden ser transportats per diferents membres dels NTs i la majoria de cops han de ser fosforilats per ser actius. Per tant, el fet que un transportador interaccioni de forma específica i diferenciada amb una proteïna, pot contribuir a explicar l'aparent redundància funcional dels transportadors i per tant, acabar influint en la biodisponibilitat dels fàrmacs. AICAR, un fàrmac assajat pel tractament de la LLC, és sabut que s'internalitza per hENT1 però en aquest treball s'ha vist que també hCNT3 pot ser el responsable de la seva captació. Aquest és un cas força únic perquè AICAR seria l'únic substrat específic per hCNT3. El model tridimensional dels transportadors concentratius demostraria el perquè ni hCNT1 ni hCNT2 no internalitzen eficientment AICAR. Un cop dins la cèl·lula es fosforila a AICA ribotide (ZMP) a través d'ADK (Hürlimann et al. 2011) (Sabina et al. 1985). Els efectes d'AICAR en les cèl·lules de mamífer es bloquegen a través de la inhibició de l'ADK per 5-ITU, establint que, l'AICAR s'ha de metabolitzar a ZMP o AICAr monofosfat per ser actiu (mimètic d'AMP) a través de l'ADK. Al haver descrit que la unió hCNT3-ADK augmentava l'eficiència del transportador per adenosina, esperàvem que la fosforilació provocada per l'AICAR captat per hCNT3 fos major que el que provenia d'hENT1 ja que AICAR també era substrat tant pel transportador com per l'enzim. No obstant, per les dades obtingudes, semblaria que la via principal de fosforilació d'AMPK seria per hENT1.

AICAR, té un paper dual inhibint o induint l'apoptosi depenent del tipus cel·lular, la concentració o l'estímul apoptòtic utilitzat. Pot induir l'apoptosi en diferents tipus de tumors, com ara en neuroblastomes (Garcia-Gil et al. 2003 i Pesi et al. 2000), tumors pancreàtics (Kefas et al. 2003), hepatoma (Meisse et al. 2002) i leucèmies, com la LLC (Campàs et al. 2003, Campàs et al. 2005 i López 2003). Paradoxalment, altres estudis han demostrat un efecte protector d'AICAR contra l'apoptosi induït per un altre estímul (Stefanelli et al. 1998). Les raons per les quals existeixen aquest efectes oposats d'AICAR en cèl·lules normals i cèl·lules canceroses encara no s'han pogut explicar, però no podem descartar que el canvi del perfil d'expressió dels transportadors associat als processos carcinogènics hi pugui tenir un paper. Es suggereix que la inhibició de processos que consumeixen ATP com a resultat de l'activació d'AMPK podria ser més perjudicial per les cèl·lules canceroses que tenen una taxa de divisió major, respecte les cèl·lules normals davant d'un estímul d'estrès, les quals s'ha demostrat un efecte protector d'AICAR (Xiang et al. 2004, Swinnen et al. 2005 i Rattan et al. 2005). A més, el mecanisme pel qual AICAR inhibeix el creixement cel·lular i indueix l'apoptosi no està del tot definit. Està ben establert que AICAR entra les cèl·lules mitjançant els transportadors de nucleòsids i que al inhibir ADK amb la 5-ITU no es produeix l'apoptosi induïda per AICAR, indicant que la fosforilació del fàrmac és essencial per activar AMPK. Algunes excepcions que s'han trobat han estat per exemple, l'apoptosi que causa AICAR en la línia cel·lular Jurkat, la qual no és dependent de l'activació d'AMPK (López et al. 2003), o recentment també s'ha demostrat que AICAR indueix l'apoptosi d'una manera independent de p53 i d'AMPK en cèl·lules de LLC (Santidrian et al. 2010).

Totes les evidències del paper dual d'AICAR dins la cèl·lula ens porten a pensar que han d'existir mecanismes per actuar d'una forma o una altra en resposta al mateix fàrmac. Podria ser una possibilitat, el fet que l'entrada d'AICAR sigui clau per la funció posterior dins la cèl·lula. Per aquest motiu, la interacció entre hCNT3 i ADK podria tenir importància per la resposta a AICAR. Els nostres resultats obtinguts no ens permeten concloure cap efecte diferencial sobre la cèl·lula en funció de la via d'entrada i caldrien més estudis per aprofundir en aquesta qüestió ara que s'ha pogut demostrar un major eficiència del transportador en presència d'ADK.

En resum, durant el desenvolupament d'aquesta tesi s'ha descrit el rol del transportador hCNT3 pel que fa a noves funcions adquirides a través del domini N-terminal incorporat al llarg de l'evolució. Concretament, s'ha descrit la primera proteïna d'interacció amb hCNT3, Gal-4, la qual permet el correcte ordenament del transportador cap a la membrana cel·lular. A més, s'ha pogut identificar i validar una altra proteïna, ADK, que també interacciona amb hCNT3. En el present treball es generen les primeres evidències bioquímiques i funcionals de que aquesta interacció es produeix i que té un efecte biològic en la cèl·lula.

CONCLUSIONS



- El transportador concentratiu de nucleòsids hCNT3 interacciona amb la proteïna Galectina-4, contribuint així a modular el recanvi d'hCNT3 a la membrana plasmàtica.
- La interacció entre hCNT3 i Galectina-4 podria tenir també rellevància farmacològica en patologies humanes com la malaltia inflamatòria de Crohn, on s'ha vist que ambdues proteïnes es co-expressen, contribuint d'aquesta manera a l'eficàcia del fàrmac 6-mercaptopurina.
- S'ha identificat per primera vegada la interacció entre un enzim del metabolisme de nucleòsids, l'adenosina quinasa (ADK) i un transportador de nucleòsids, hCNT3.
- La interacció hCNT3-ADK té impacte funcional ja que modula de forma selectiva l'afinitat del transportador hCNT3 per a l'adenosina.
- El fàrmac AICAR assajat pel tractament de la LLC s'internalitza per hENT1 i hCNT3, essent hENT1 el principal responsable de la fosforilació d'AMPK provocada per AICAR.
- Tal i com es podia anticipar pel model estructural generat per a les proteïnes de la família hCNT, AICAR és substrat exclusiu d'hCNT3 però no dels altres subtipus de transportadors hCNT1 i hCNT2.

MATERIALS I MÈTODES



1 Cultius cel·lulars

1.1 Introducció

El cultiu cel·lular consisteix en el manteniment de cèl·lules eucariotes *ex vivo* sota unes condicions controlades (*in vitro*) que permeten preservar les condicions fisiològiques, bioquímiques i genètiques originals. La finalitat d'aquesta tècnica és aconseguir un model en el qual treballar tant en el camp de la investigació bàsica, com en l'àmbit de diagnòstic, estudis farmacològics i de toxicitat o en la teràpia gènica. El principal avantatge que ofereix és la facilitat per modificar l'entorn fisicoquímic (CO_2 , O_2 , pH, temperatura) i fisiològic (nutrients, hormones, fàrmacs...) adequat per l'estudi d'aquestes cèl·lules i alhora, la reproductibilitat dels resultats que es puguin obtenir. A més, permet limitar l'ús d'animals d'experimentació, que generalment té un cost ètic i econòmic més elevat. Per contra, al ser un sistema fora de l'organisme, es perd la naturalesa d'aquest entorn, l'estructura tridimensional de les cèl·lules i una sèrie de factors i estímuls circulants presents a l'organisme viu.

Els cultius cel·lulars procedents de cèl·lules disgregades a partir d'un teixit original d'un animal recentment sacrificat reben el nom de **cultiu primari**, aquestes cèl·lules tenen una capacitat de multiplicació limitada ja que entren en senescència un cop superen el límit de Hayflick. En canvi, les **línies cel·lulars** són cultius que han estat sotmesos a processos de transformació espontanis, químics o induïts mitjançant virus que li confereixen la capacitat il·limitada de proliferació. Les línies cel·lulars, doncs, permeten la realització d'experiments a llarg termini, així com la seva crioconservació. Però, al haver perdut el control de la proliferació pateixen una desregulació en l'expressió gènica, fet que s'ha de tenir en compte quan s'utilitzen els línies cel·lulars com a model de treball.

Segons la seva capacitat d'adhesió als suports utilitzats en el seu cultiu, les cèl·lules poden créixer formant una monocapa, com és el cas de la majoria de cèl·lules que provenen d'òrgans, o al contrari, poden créixer en suspensió, com les cèl·lules del sistema immunitari.

1.2 Àrea i material de treball

La manipulació de cultius cel·lulars implica l'adopció d'una sèrie de mesures per poder garantir al màxim les condicions d'esterilitat necessàries per així evitar possibles contaminacions de microorganismes o de contaminacions entre diferents línies cel·lulars. Per aconseguir aquest

Materials i mètodes

ambient de treball és necessari que tant el material que entra en contacte amb les cèl·lules com la superfície de treball siguin estèrils i que el treballador porti bata i guants. Per manipular els cultius cel·lulars és necessari treballar en una cabina de flux laminar vertical prèviament esterilitzada amb radiació ultraviolada. A més, tots els materials i reactius que s'introduiran a la cabina seran desinfectats amb etanol al 70% a l'iniciar la tasca. Tanmateix, tot el material haurà de ser estèril, autoclavat o, si és un reactiu sensible a la temperatura, filtrat amb un filtre de 0.22µm de diàmetre de porus.

El material necessari per treballar amb cultius cel·lulars inclou:

- Campana de flux laminar vertical: filtre HEPA, llum UV i aspiració de líquid a través del buit
- Incubador amb atmosfera controlada: 37°C, 5% CO₂, 95% O₂ i humitat relativa al 95%
- Microscopi òptic invertit
- Bany amb termòstat
- Centrífuga
- *CountessTM automated cell counter* (Invitrogen) o càmera de *Neubauer*
- Nevera (4°C) i congeladors (-20°C i -80°C)
- Equipament criogènic: contenidor amb isopropanol i tancs de nitrogen líquid
- Material de plàstic fungible estèril o autoclavat
- Material de vidre autoclavat: pipetes Pasteur
- Plaques de poliestirè i falcons estèrils

1.3 Manteniment dels cultius cel·lulars

Quan les cèl·lules creixen en cultiu s'estableix una nova selecció on augmenten en nombre aquelles cèl·lules que tenen una major taxa de creixement, així doncs, s'ha de considerar el cultiu com un ens dinàmic. En general, quan s'arriba a la confluència màxima, és a dir, el cultiu cel·lular ha ocupat tota la superfície on està adherit, les cèl·lules aturen el seu creixement. Quan s'assoleix aquesta confluència és quan moltes línies cel·lulars expressen els seus aspectes més característics i és en aquest estat quan la seva morfologia i fisiologia són més semblants al seu estat original. Però és també, com hem comentat, el moment en el qual s'atura el seu creixement i es fa necessari dividir, replaquejar o passar les cèl·lules.

1.3.1 Tripsinització i passatge

El passatge de cèl·lules consisteix en transferir un petit nombre de cèl·lules a una nova placa o flascó quan aquestes es troben el seu punt de confluència màxim. Si les cèl·lules es van passant regularment, poden cultivar-se més temps, ja que així s'evita la senescència associada a situacions prolongades d'alta densitat cel·lular.

1.3.1.1 Línies cel·lulars en monocapa

Les cèl·lules han de ser desadherides mitjançant un mètode enzimàtic. S'utilitza una solució que conté EDTA i tripsina. L'EDTA és un quelant de calci, ió responsable de les unions cel·lulars i la tripsina és un enzim proteolític que hidrolitza els enllaços peptídics. S'ha de minimitzar al màxim el temps d'incubació amb la tripsina per evitar una degradació de proteïnes essencials.

Materials i Reactius

- Tripsina: 200mg/L d'EDTA i 500mg/L de tripsina
- PBS: 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 1.4mM KH₂PO₄, 4.3mM Na₂HPO₄ ajustat a un pH de 7.4
- Medi de cultiu suplementat amb Sèrum Fetal Boví (FBS), antibiòtic i glutamina

Procediment

Les cèl·lules es mantenen a 37°C fins que assoleixen la confluència desitjada. Un cop en aquest punt, s'extreu el medi i s'afegeixen 10mL de PBS a temperatura ambient per evitar que el sèrum del medi interfereixi amb la tripsina. S'aspira el PBS i s'afegeixen 1-2mL de tripsina deixant-la actuar a 37°C entre 1-10 minuts (depenent del tipus cel·lular i la seva capacitat d'adhesió) fins que s'observa que la monocapa s'ha separat de la superfície de la placa o flascó. Aleshores s'afegeixen 10mL de medi suplementat per tal d'inhibir qualsevol posterior reacció enzimàtica i les cèl·lules es disgreguen amb una pipeta fins obtenir una suspensió homogènia. Si es vol mantenir la línia cel·lular, es subcultiven realitzant dilucions entre 1:3 - 1:10 afegint medi fresc.

1.3.1.2 Línies cel·lulars en suspensió

Al ser un tipus cel·lular que no creix adherit a una superfície s'agafa una petita part del cultiu i es dilueix en un volum major de medi fresc.

Materials i Reactius

- Medi de cultiu suplementat amb Sèrum Fetal Boví (FBS), antibiòtic i glutamina

Procediment

Es centrifuguen les cèl·lules a 900rpm durant 6 minuts i es resuspenen amb medi fresc. En funció del tipus cel·lular i de la seva taxa de creixement s'haurà de fer una dilució adequada tenint en compte que la confluència màxima per aquest tipus de cultiu és de $1 \cdot 10^6$ cèl·lules per mil·lilitre.

1.3.2 Recompte cel·lular

Es fa una dilució amb blau de tripa i es procedeix al comptatge cel·lular a través del *Countess™ automated cell counter* (Invitrogen) o a través de la càmera de *Neubauer*. La tinció del blau de tripa permet diferenciar les cèl·lules vives de les mortes, ja que aquestes últimes tenen la membrana permeable permetent el pas de la molècula, adquirint una tonalitat blava. Per tal de

Materials i mètodes

conèixer la concentració cel·lular per mL en la suspensió original, cal desfer la dilució feta al preparar la mostra i les dimensions de la càmera de *Neubauer*.

Un cop es coneix la concentració cel·lular, es sembren a plaques de diferents mides segons el tipus d'assaig que es vulgui realitzar. Normalment, pels assaigs de transport s'utilitzen plaques de 24 pous els quals se sembren amb un volum final d'1mL. O si es necessita un número més elevat de cèl·lules per obtenir RNA o extractes proteics, se sembren en plaques de 60 o 100mm que s'omplen amb un volum de 4 y 10mL, respectivament.

1.3.3 Congelació i descongelació

Degut al fet que després d'un temps en cultiu les cèl·lules poden acumular mutacions i, conseqüentment, canvis fenotípics que poden alterar els resultats experimentals, és necessari mantenir una alíquota de cada línia cel·lular amb les seves característiques d'origen congelada amb nitrogen líquid.

Congelació

Materials i Reactius

- Medi de congelació: FBS (Sèrum Fetal Boví) + 10% DMSO (dimetilsulfòxid) estèril
- Contenedor amb isopropanol
- Criotubs de 2mL

Procediment

En el cultius en monocapa es tripsinitzen les cèl·lules d'una placa de 100mm quasi confluent tal i com s'ha descrit anteriorment i es centrifuguen 4 minuts a 1200rpm. En un cultiu en suspensió, es centrifuguen durant 6 minuts a 900rpm entre 3 i 5 milions de cèl·lules. A partir d'aquest punt, es procedeix igual en els dos tipus de cultius, s'aspira el medi i s'aliquoten les cèl·lules amb 1.5mL de medi de congelació en criovials. El DMSO impedeix que es formin cristalls d'aigua que trencarien estructures intracel·lulars reduint la viabilitat cel·lular. Aquest agent a temperatura ambient i a una concentració superior al 2% és tòxic per la cèl·lula, per tant, han d'estar el mínim temps en contacte. Aquests criovials s'han de congelar gradualment, per fer-ho, es col·loquen en un contenidor que conté isopropanol que permet disminuir la temperatura a 1°C per minut. El contenidor s'ha de guardar al congelador de -80°C entre 4 dies i un mes, passat aquest temps s'han de traslladar a un tanc ple de nitrogen líquid.

Descongelació

Procediment

A diferència de la congelació, la descongelació ha de ser un procés ràpid ja que el contacte amb el DMSO a temperatura ambient és tòxic. Es descongela el criotub ràpidament al bany a 37°C i es traspasa el seu contingut a un tub de tipus Corning de 15mL, on prèviament hi haurem afegit 10mL de medi de cultiu corresponent a la línia cel·lular que estiguem descongelant suplementat amb un 20% de FBS, el doble del que normalment s'utilitza per tal d'afavorir la viabilitat i creixement cel·lular. Es centrifuga a 1200rpm durant 4 minuts o a 900rpm durant 6 minuts, segons si és un cultiu de monocapa o suspensió, respectivament. S'aspira el sobrenedant, eliminant així el DMSO, i finalment s'afegeix medi fresc per sembrar les cèl·lules en una placa de 100mm, en el cas del creixement en monocapa o un flascó de 75mL en les de suspensió.

1.4 Línies cel·lulars utilitzades

1.4.1 MEC1

És una línia cel·lular derivada de limfòcits B de Leucèmia Limfàtica Crònica (B-LLC). Aquesta línia va ser establerta al 1993 a partir de sang perifèrica d'un home d'origen Caucàsic amb B-LLC. Existeix una línia cel·lular germana a MEC1, MEC2, que es va obtenir a partir de sang perifèrica d'aquest mateix pacient però amb un any de diferència. Al ser línies cel·lulars d'origen sanguini, el seu creixement és en suspensió.

Condicions de cultiu: El medi de cultiu utilitzat per MEC1, línia cel·lular utilitzada en aquesta tesi, és RPMI suplementat amb FBS inactivat al 10%, penicil·lina i estreptomicina a l'1% i glutamina al'1%. El FBS s'inactiva fent un tractament de 30 minuts a 56°C ja que d'aquesta manera s'inactiva la resposta immune del sistema del complement. La confluència màxima en aquest cultiu és de $1 \cdot 10^6$ cèl·lules per mil·lilitre.

1.4.2 HEK293

Són cèl·lules de ronyó embrionari humà (*Human Embryonic Kidney*, HEK) que es van obtenir a partir d'un fetus sa avortat legalment sota la llei alemanya. Es va generar el 1973 a través de la transformació d'aquestes cèl·lules amb DNA de l'adenovirus 5, concretament, 4,5kb d'aquest adenovirus es van inserir al cromosoma 19 de les cèl·lules humanes.

Les HEK293 són molt fàcils de cultivar i es transfecten fàcilment, motiu pel qual s'han utilitzat àmpliament durant molts anys per la investigació en la biologia cel·lular, a més a més, han estat

Materials i mètodes

el model cel·lular principal amb el que s'ha treballat en aquesta tesi. Un dels factors limitants per l'estudi de les proteïnes hCNT és trobar un model cel·lular que expressi aquestes proteïnes endogenament. És per això que el nostre grup ha generat línies cel·lulars que expressen establement les diferents proteïnes hCNT: HEK293-hCNT1, HEK293-hCNT2 i HEK293-hCNT3, així com el model cel·lular que expressa hOCT1 (HEK293-hOCT1). Aquestes línies es van generar en aquest laboratori mitjançant el sistema Flp-InTM el qual permet la integració i expressió d'un gen d'interès en cèl·lules de mamífer en un lloc específic dins del genoma, per tant, totes les línies cel·lulars han incorporat el vector al mateix lloc. Com a control negatiu s'utilitza la línia expressada amb el vector pcDNA5, vector que va ser utilitzat per la generació d'aquests models cel·lulars.

Condicions de cultiu: El medi utilitzat és DMEM suplementat amb FBS al 10%, penicil·lina i estreptomicina a l'1% i glutamina a l'1%. Degut a la seva elevada capacitat proliferativa s'han de subcultivar abans que arribin a la confluència del 90-100% fent una dilució 1:10-1:12.

1.4.3 HT-29

És una línia cel·lular provinent d'adenocarcinoma colorectal humà amb morfologia epitelial obtinguda a partir d'una dona que patia aquest càncer. Aquestes cèl·lules són sensibles als fàrmacs utilitzats en la quimioteràpia pel tractament estàndard del càncer colorectal: 5-fluorouracil i oxaliplatí. En el teixit tumoral *in vivo* existeix una heterogeneïtat cel·lular que fa que la línia cel·lular establerta a partir d'aquest tumor no sigui homogènia.

Condicions de cultiu: El medi utilitzat és DMEM suplementat amb FBS al 10%, penicil·lina i estreptomicina a l'1% i glutamina a l'1%. Pel seu correcte manteniment s'han de subcultivar abans que arribin a la confluència màxima (90-100%) en una dilució 1:8-1:10.

1.4.4 CaCo2

La línia cel·lular CaCo2 és una altra línia que s'utilitza com a model d'adenocarcinoma colorectal humà establerta a partir d'un home gran que patia aquest tipus de càncer. Així com en les HT29, les CaCo2 presenten una heterogeneïtat en el seu cultiu cel·lular.

Condicions de cultiu: El medi utilitzat és EMEM suplementat amb FBS al 20%, penicil·lina i estreptomicina a l'1% i glutamina a l'1%. Pel seu correcte manteniment s'han de subcultivar abans que arribin a la confluència màxima (90-100%) en una dilució 1:8-1:10.

1.5 Test de micoplasma

La contaminació per micoplasma és un dels principals problemes dels cultius cel·lulars ja que aquest microorganisme pot provocar una varietat il·limitada d'efectes ens els cultius als quals infecta, provocant així una alteració dels nostres resultats. El micoplasma és un bacteri que li manca la paret cel·lular, fet que fa que aquest bacteri sigui resistent a antibiòtics que s'utilitzen comunament al laboratori, com la penicil·lina o l'estreptomicina. Degut a la seva petita grandària (menys d'un micròmetre) és molt difícil detectar-lo a ull nu o fins i tot mitjançant el microscopi òptic i sovint no s'observen signes visibles d'infecció. En els cultius cel·lulars pot persistir un creixement lent de micoplasma sense causar la mort cel·lular però alterar el comportament i el metabolisme de les cèl·lules. Infeccions cròniques amb aquest bacteri es poden manifestar amb una taxa de proliferació cel·lular disminuïda o una aglutinació de les cèl·lules en el cas del cultiu en suspensió. No obstant, l'única manera d'assegurar-se la detecció de la contaminació per micoplasma és testant periòdicament els cultius.

El control de micoplasma s'ha realitzat dos cops al mes mitjançant un test qualitatiu per PCR. S'amplifica el genoma del micoplasma per PCR i es detecta el DNA del bacteri per gel d'agarosa.

1.5.1 Tractament amb Plasmocin™

Abans de llançar una línia cel·lular infectada per micoplasma, se'ls aplica un tractament per eliminar la contaminació bacteriana. Durant un període de 15 dies, les cèl·lules no s'utilitzen per fer experiments i són tractades amb Plasmocin™ a una concentració de 25mg/mL. Es realitza un nou test de PCR per comprovar que el cultiu cel·lular ha quedat lliure de micoplasma.

2 Obtenció de mostres clíniques

Durant el desenvolupament d'aquesta tesi, s'ha pogut treballar amb mostres clíniques per tal d'aprofundir en un dels objectius del treball. Concretament, per l'anàlisi de l'expressió d'hCNT3 i Gal-4 en el còlon, es va poder disposar de mostres de teixit de còlon inflammat en pacients amb la malaltia de Crohn. De cada participant involucrat a l'estudi es va obtenir el consentiment informat. Aquest estudi va ser aprovat pel comitè ètic de recerca de l'hospital [Comitè Ètic de Recerca Clínica, Hospital Universitari Vall d'Hebron, PR (AG) 56/2010]. Els teixits inflamats de còlon es van obtenir durant les intervencions de pacients amb la malaltia de Crohn que se sotmetien a una extirpació de còlon. Paral·lelament també es va poder accedir a cèl·lules primàries de LLC provinents de la Unitat d'Hematologia de l'Hospital Clínic, les quals també sota el consentiment informat de cadascun dels pacients.

Totes les mostres de còlon es van mantenir en salí i es van rentar dos cops en una solució salina estèril. El teixit es va homogeneïtzar en presència de nitrogen líquid i es va extreure la proteïna amb un tampó de lisi (10nM tris-HCl, 0.5% Tritó X-100 i inhibidors de proteases). Els lisats de còlon, així com de les cèl·lules primàries de LLC es van centrifugar per separar restes cel·lulars de les proteïnes. Es va quantificar el sobrenedant, que era la fracció que contenia les proteïnes, i es va quantificar mitjançant una determinació per Bradford (veure apartat 8.2 de materials i mètodes). Aquestes mostres es van utilitzar per detectar proteïnes a través de la tècnica del *Western blot*, que apareix detallada en l'apartat 8.4 d'aquest mateix capítol.

3 Tècniques de manipulació de l'expressió proteica

Algunes de les estratègies que són comunament utilitzades per estudiar la funció d'una proteïna són, per exemple, la seva expressió transitòria, o el silenciament transitori d'aquesta. Manipulant l'expressió de la proteïna d'interès, es pot estudiar quin efecte biològic provoca.

3.1 Expressió heteròloga de proteïnes

La tècnica de transfecció consisteix en introduir material genètic (plasmidis amb el cDNA del gen que codifica la proteïna a estudiar) en cèl·lules eucariotes en cultiu. En el nostre laboratori s'utilitzen mètodes químics basats en la formació de complexos que les cèl·lules siguin capaces d'incorporar, bé sigui per via endocítica (mètode del fosfat càlcic) o per afinitat amb la membrana cel·lular (mètode de lipofecció).

3.1.1 Transfecció amb fosfat càlcic

És un mètode barat on es barreja el DNA amb clorur de calci i afegir una barreja d'un tampó que conté fosfats. Al deixar reposar la barreja a temperatura ambient es genera un precipitat format pel complex calci/DNA per unions electrostàtiques en una solució salina de diferents formes de fosfats sòdics. A més, el calci protegeix l'àcid nucleic de la degradació via nucleases cel·lulars o nucleases presents al sèrum del medi de cultiu. Aquests precipitats són internalitzats per la cèl·lula mitjançant processos d'endocitosi/fagocitosi i és aleshores quan el DNA queda a la disposició de la maquinaria cel·lular de transcripció i traducció. El DNA que s'internalitza ha d'estar en forma plasmídica i queda en forma epicromosòmica, és a dir, no entra a nucli. És per això que és un tipus de transfecció transitòria i amb les posteriors divisions cel·lulars es perdrà la informació genètica. La mida, quantitat i qualitat del precipitat que es forma depèn de les quantitats de DNA i fosfat càlcic, a més, el seu excés pot arribar a ser tòxic. El pH és un factor que s'ha de considerar per obtenir bones eficiències de transfecció.

Materials i Reactius

- Cèl·lules sembrades a un 60-80% de confluència
- Medi de cultiu complementat específicament per la línia cel·lular a transfectar
- Tampó fosfat: NaCl 280mM, Na₂HPO₄ 0.75mM, NaH₂PO₄ 0.75mM i Àcid N,N-Bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfonic (BES) 50mM
- Tampó de calci: CaCl₂ 500mM i BES 100mM a pH 6.95
- Aigua bidestil·lada estèril

Procediment

Per tal de preparar les solucions de fosfat i de calci s'ha d'utilitzar aigua Mili-Q i s'ha d'ajustar el pH amb NaOH. En el cas del tampó de fosfat s'ha de determinar el pH òptim segons el tipus cel·lular de treball, per exemple, en la línia cel·lular HEK293 el pH s'ha de mantenir a 6.4.

Les cèl·lules són sembrades a una confluència entre 60-80% en el moment de la transfecció, densitat que varia segons el tipus i la durada de l'assaig. Seguint aquest ordre es mescla el DNA, l'aigua, el tampó de calci i el tampó fosfat (**Taula 6**). La mescla es bombolleja amb aire amb l'ajut d'una pipeta i es deixa reposar 15 minuts a temperatura ambient abans d'afegir la mescla gota a gota sobre les cèl·lules. El medi de transfecció es deixa durant 16h i es canvia per medi de cultiu. Per garantir l'expressió de la proteïna transfectada, es recomana realitzar l'experiment entre les 24 i 72 hores posteriors a la transfecció.

	Placa de 96 pous	Placa de 24 pous	Placa 60mm	Placa 100mm
DNA	0.1µg	0.7µg	7µg	20µg
Aigua estèril	2.5µL	12.5µL	125µL	250µL
Tampó de Calci	2.5µL	12.5µL	125µL	250µL
Tampó Fosfat	5µL	25µL	250µL	500µL
Volum final	10µL	50µL	500µL	1000µL

Taula 6. Volums de transfecció utilitzats per la línia cel·lular HEK293.

3.1.2 Transfecció amb lipofectamina

Aquest mètode es basa en la formació de complexos entre lípids catiónics i el DNA que tenen afinitat per la membrana i permeten la internalització del DNA a la cèl·lula. S'utilitza un reactiu anomenat lipofectamina el qual conté subunitats lipídiques que formen liposomes en medi aquós que atrapen el material genètic utilitzat a la transfecció. Els liposomes poden fusionar-se amb la membrana citoplasmàtica i alliberar d'aquesta manera el material genètic.

Materials i Reactius

- Cèl·lules sembrades a un 60-80% de confluència
- Lipofectamine 2000 (Invitrogen)
- Medi Opti-MEM sense sèrum

Procediment

Es dilueix la lipofectamina i el DNA amb el medi Opti-MEM per separat seguint les proporcions que es mostren a la **Taula 7**. Es barregen a parts iguals ambdues mescles i es deixa reposar 5 minuts. Segons la mida de la placa, s'afegeix un determinat volum a les cèl·lules en cultiu gota a

gota i es deixa incubar entre 4 i 5 hores a 37°C. Passat aquest temps, es canvia el medi de transfecció pel medi de cultiu complementat que correspongui per aquella línia cel·lular.

	Placa de 96 pous	Placa de 24 pous	Placa 60mm	Placa 100mm
DNA	0.1µg	0.5µg	5.5-11µg	14-28µg
Lipofectamina	0.2-0.5µL	1-2.5µL	11-28µL	29-73µL
Opti-MEM	2x5µL	2x25µL	2x250µL	2x500µL
Volum final	100µL	500µL	5mL	10mL

Taula 7. Volums de transfecció pel mètode químic amb lipofectamina.

3.2 Silenciament proteic

Hi ha varis mecanismes per silenciar l'expressió d'una proteïna, en aquest treball s'han utilitzat petites molècules de RNA d'interferència o siRNA (*small interference RNA*). Els siRNA s'uneixen al mRNA del gen i es crea una doble cadena de RNA que és degradada pel complex RISC, reduint així l'expressió de la proteïna. S'ha utilitzat la lipofectamina com a reactiu que permet l'entrada dels siRNA a la cèl·lula, procés semblant a la transfecció de DNA per mètodes químics.

Materials i Reactius

- Cèl·lules sembrades a un 60-80% de confluència
- Lipofectamine 2000 (Invitrogen)
- Medi Opti-MEM sense sèrum

Procediment

Es dilueix la lipofectamina i el siRNA amb el medi Opti-MEM per separat amb les proporcions de la **Taula 8**. Es barregen les dues mescules en una relació 1:1 i es deixa reposar 5 minuts. S'afegeix la mescla a les cèl·lules en cultiu gota a gota i es deixa durant 4-5 hores. Es canvia el medi de transfecció per medi de cultiu ja que la lipofectamina és molt tòxica. El temps d'incubació posterior pot variar entre les 24-96 hores, és necessari fer un assaig per determinar el temps d'incubació òptim per aconseguir el màxim silenciament de la proteïna.

	Placa de 96 pous	Placa de 24 pous	Placa 60mm	Placa 100mm
siRNA	3pmols	15pmols	166pmols	434pmols
Lipofectamina	0.3µL	1.5µL	17µL	43µL
Opti-MEM	2x5µL	2x25µL	2x250µL	2x500µL
Volum final	100µL	500µL	5mL	10mL

Taula 8. Volums de transfecció pel silenciament d'un gen mitjançant lipofectamina.

4 Detecció de proteïnes mitjançant fluorescència

4.1 Immunofluorescència

La immunofluorescència és una tècnica que permet la visualització subcel·lular d'antígens o proteïnes a partir de cèl·lules (immunocitoquímica) o seccions de teixit (immunohistoquímica) mitjançant la utilització d'anticossos específics. Aquests es troben conjugats únicament a un fluoròfor i posteriorment s'analitzen per microscòpia de fluorescència o confocal. La tinció per immunofluorescència consisteix en 4 etapes: preparació de cèl·lules, fixació i permeabilització, incubació dels anticossos i anàlisi microscòpic.

Materials i Reactius

- Cobreobjectes i portaobjectes
- PBS
- Solució de fixació: paraformaldehid al 4% en PBS
- Solució de permeabilització: Saponina 0.05% en PBS
- Solució de bloqueig: BSA 1% en PBS
- Solució d'incubació: BSA 1% i Saponina 0.025% en PBS
- Solució de muntatge (Prolong® Gold antifade reagent)
- Microscopi confocal

Procediment

Es disposen els cobreobjectes en una placa de 24 i s'esterilitzen durant 10-15 minuts amb raigs UV. Es sembren les cèl·lules, generalment interessen cèl·lules aïllades per estudiar la localització de les proteïnes. Es fan dos rentats amb PBS de 5 minuts. S'incuben les cèl·lules amb la solució de fixació durant 15 minuts. Es realitzen dos rentats de 10 minuts amb PBS que eliminen l'excés de paraformaldehid. En aquest punt es podria parar el protocol i guardar els cobreobjectes a 4°C en un màxim de 7 dies. A continuació es permeabilitza la membrana durant 10 minuts i al acabar es fan dos rentats de 5 minuts amb PBS. Seguidament s'incuben amb la solució de bloqueig durant 20 minuts. Es dilueix l'anticòs primari (1:50-1:300) en la solució d'incubació i es s'incuben 1h a temperatura ambient. Es realitzen 2 rentats de 5 minuts amb PBS 1x i s'incuben amb l'anticòs secundari (1:300). És important que durant l'hora d'incubació l'anticòs quedi protegit de la llum ja que aquest pot perdre activitat si s'excita. Es realitzen dos rentats de 5 minuts amb PBS protegits de la llum. Finalment es munta el cobreobjectes amb medi de muntatge que segella la mostra. Finalment es deixa assecar 24 hores a temperatura ambient i es conserven les mostres a 4°C. Totes les imatges s'han obtingut mitjançant el microscopi confocal LEICA SPE del servei de microscòpia de la Facultat de Biologia. El posterior anàlisi digital s'ha realitzat amb el software *Image J*.

Proteïna	Casa comercial	Reactivitat	Dilució	Espècie	Tipus
ADK	Abcam	Humà, hàmster	1:1000	Conill	primari
ADK	Bethyl	Humà	1:500	Conill	primari
hCNT3	Sigma	Humà	-	Conill	primari
Gal-4	St Cruz	Humà	1:1000	Ratolí	primari
Alexa Fluor 488	Life Tech	Humà, ratolí, rata	1:300	Conill i ratolí	secundari
Alexa Fluor 555	Life Tech	Humà, rata ratolí	1:300	Conill i ratolí	secundari

Taula 9. Anticossos utilitzats en la immunocitoquímica. La concentració utilitzada dels anticossos ADK i hCNT3 varia segons l'experiment.

4.2 Localització subcel·lular de proteïnes fluorescentes

Una altra modalitat de detecció de proteïnes mitjançant fluorescència i que no requereix d'anticossos específics és aquella que utilitza la proteïna de fluorescència verda o GFP (de l'anglès *Green Fluorescent Protein*). Existeixen mutants genètics com ara la YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) que varien en el seu espectre d'excitació i emissió. El gen que codifica la proteïna d'interès es clona dins d'un vector que conté el gen que emet bioluminescència i sota el mateix promotor del vector es genera una proteïna de fusió consistent en la proteïna d'interès amb aquesta etiqueta fluorescent. Això permet la seva detecció sense necessitat d'utilitzar anticossos, fet que simplifica i abarateix costos de la tècnica.

Materials i Reactius

- Cobreobjectes i portaobjectes
- PBS
- Solució de fixació: paraformaldehid al 4% en PBS
- Solució de muntatge (Prolong® Gold antifade reagent)
- Microscopi confocal

Procediment

És un protocol molt similar al descrit a l'apartat 4.1 però difereix en dos punts. Primer les cèl·lules s'han transfectat seguint el procés descrit a l'apartat 3.1 amb el vector que conté la proteïna d'interès fusionada amb la GFP o YFP. En segon lloc, al no precisar d'anticossos, un cop estan fixades amb paraformaldehid al cobreobjectes, ja es pot procedir al muntatge amb la solució de muntatge i posteriorment ser analitzades per microscòpia confocal.

5 Tècniques de validació d'interaccions proteiques

Existeix una gran varietat de tècniques per identificar interaccions entre proteïnes, cadascuna té els seus pros i contres, especialment en quan a la sensibilitat i especificitat del mètode. En aquesta tesi ens hem centrat en dues tècniques: el *pull-down* i la immunoprecipitació.

5.1 *Pull-down* i *pull-down* dirigit

Aquest tipus d'assaig és útil tant per confirmar l'existència d'una interacció proteica descrita per altres tècniques, com per realitzar un cribratge inicial per identificar possibles interaccions desconegudes prèviament. El *pull-down* es basa en clonar la proteïna que actuarà d'ham (*bait*) amb el glutatí S-transferasa (GST). Aquesta s'incubarà amb un extracte cel·lular i totes les proteïnes que estiguin interaccionant amb ella (*preys*) les podrem detectar en una electroforesi 2D, la qual separa per massa i punt isoelèctric. Posteriorment, s'analitzen per proteòmica les possibles proteïnes que estan interaccionant amb la proteïna *bait*. Un cop realitzat aquest cribratge i s'identifiquen possibles proteïnes d'interacció, es pot realitzar un *pull-down* dirigit, el mecanisme del qual és el mateix que el *pull-down* però la resolució de la tècnica és diferent. Enlloc de realitzar una electroforesi 2D, s'analitza mitjançant un *Western blot* l'expressió de la proteïna específica detectada prèviament amb el *pull-down*.

Materials i Reactius

- GST
- GST fusionades a l'extrem amino terminal d'hCNT3
- Tampó NP-40: Tris-HCl 50mM, NaCl 250mM, NP-40 1%, pirofosfat sòdic 5mM, NaF 50mM a pH 7.4
- PBS: 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 1.4mM KH₂PO₄, 4.3mM Na₂HPO₄ ajustat a un pH de 7.4
- Centrifuga
- Orbital

Procediment

Es comença amb una fase de neteja en la qual s'incuben 20mg de l'extracte proteic cel·lular amb 50µL de GST sense estar fusionat a la proteïna a estudiar durant 16h a 4°C en un orbital. Posteriorment, es centrifuga a 13000rpm durant 3 minuts a 4°C i recuperem el sobrenedant. D'aquesta manera reduïm el soroll de fons ja que eliminarem totes les proteïnes que s'hagin unit inespecíficament al GST. Un cop tenim el sobrenedant net, el separem en dos tubs *ependorf*, en un hi afegim els 10mg de l'extracte proteic i 50µg de GST (control negatiu) i en l'altre, 10mg de l'extracte proteic i 50µg de GST fusionat a la proteïna d'interès (*bait*), en el

nostre cas l'extrem amino terminal d'hCNT3. Ho deixem incubar tota la nit a 4°C en un orbital i passat aquest temps es centrifuguen les mostres 3min a 8000rpm. Es fan dos rentats del *pellet*, el primer amb el tampó NP-40 fred i invertint suaument dos cops els tubs i el segon amb PBS 1x durant 5-10min en l'orbital a 4°C. Entre rentat i rentat es centrifuguen les mostres 3min a 8000rpm a 4°C. Les mostres s'envien a analitzar per electroforesi 2D als serveis de proteòmica de la Universitat de Barcelona (*pull-down*) o es realitza un *Western blot* per detectar la proteïna específica (*pull-down* dirigit), tal i com s'ha descrit als apartats 8.3 i 8.4.

5.2 Co-Immunoprecipitació

La co-immunoprecipitació és la immunoprecipitació de complexos intactes de proteïnes. Es selecciona un anticòs que té com a diana una proteïna coneguda que se sospita que pertany a un gran complex de proteïnes. Per poder purificar el complex anticòs-proteïna s'utilitza proteïna A o G, depenent de l'espècie on s'hagi generat l'anticòs, unida a boles d'agarosa. D'aquesta manera amb una centrifugació podrem separar les proteïnes unides a la proteïna d'interès de les que no ho estan. Finalment, s'haurà de desfer tot aquest complex i analitzar les mostres per SDS-PAGE i *Western blot* tal i com s'ha descrit als apartats 8.3 i 8.4. Els anticossos utilitzats per immunoprecipitar a les proteïnes es presenten a la taula següent (**Taula 10**):

Proteïna	Casa comercial	Reactivitat	Dilució	Espècie	Pes molecular
ADK	Abcam	Humà, hámster	1:1000	Conill	41kDa
ADK	Bethyl	Humà	1:500	Conill	41kDa
Gal-4	St Cruz Biotechnology	Humà	1:1000	Ratolí	35kDa
HA	Roche	Humà, rat ratolí	1:2000	Rata	Tag+proteïna

Taula 10. Característiques dels anticossos utilitzats per la immunoprecipitació.

Materials i Reactius

- PBS: 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 1.4mM KH₂PO₄, 4.3mM Na₂HPO₄ ajustat a un pH de 7.4
- Tampó NP-40: Tris-HCl 50mM, NaCl 250mM, NP-40 1%, pirofosfat sòdic 5mM, NaF 50mM a pH 7.4
- Inhibidor de proteases *Complete TM Protease inhibitor cocktail tablets* (Roche)
- Ortovanadat de sodi (Na₃VO₄)
- Proteïnes A unides a boles d'agarosa (Sigma)
- Tampó de càrrega 5x: Per cada 20mL s'ha d'afegir 6.4mL de Tris-HCl 1M a pH 8, 2g de SDS, 10mL de glicerol i 0.2% de blau de bromofenol. Al moment de la seva utilització s'afegeix β-mercaptoetanol al 5% ja que sinó aquest reactiu es degrada.
- Tampó de càrrega 2x: Per cada 20mL s'ha d'afegir 6.4mL de Tris-HCl 1M a pH 8, 2g de SDS, 10mL de glicerol i 0.2% de blau de bromofenol. Al moment de la seva utilització s'afegeix β-mercaptoetanol al 5% ja que sinó aquest reactiu es degrada.

Procediment

Es realitzen 2 rentats amb PBS 1x de totes les plaques, aquestes s'hauran de transfectar en el cas de voler sobreexpressar alguna de les proteïnes d'estudi. Per cada placa de 60mm utilitzar 60µL de tampó NP-40 suplementat amb l'inhibidor de proteases i l'ortovanadat de sodi i fer l'extracció i la quantificació proteica tal i com s'ha explicat als apartats 8.1 i 8.2. Barrejar 250µg de proteïna amb 2.5-5µg d'anticòs en un volum final de 300µL del tampó NP-40 i incubar-ho tota la nit a 4°C en un orbital. S'ha de tenir en compte de realitzar un control negatiu amb l'extracte proteic i les IgG de l'espècie de l'anticòs específic per la proteïna d'estudi que s'estigui analitzant. En una segona etapa, s'han de fer 3 rentats de les boles d'agarosa unides a la proteïna A amb el mateix tampó NP-40. Fer tres rentats centrifugant les boles durant 3min a 4800, 4600 i 4200rpm, progressivament. S'utilitzen 15µL de boles per cada mostra, per tant, al final dels rentats es resuspenen les boles en el mateix volum amb el qual hem començat. A cada mostra, que conté l'extracte proteic i l'anticòs, s'afegeixen 30µL de boles i s'incuba entre 4-5 hores a l'orbital a 4°C. Passat aquest temps, es centrifuguen les mostres 3min a 4800rpm, es guarda el sobrenedant i es segueix amb 5 rentats de les boles amb NP-40 suplementat i centrifugues de 3min a 4800, 4600, 4400, 4200 i 4000rpm. Finalment, les boles es resuspenen en 25µL de tampó de càrrega 2x i es preparen 15µg de proteïna de sobrenedant i 15µg de proteïna total. S'escalfen 30min a 37°C i només les mostres que tenen les boles, es centrifuguen 3min a 4000rpm per eliminar-les. Totes les mostres són analitzades per *Western blot* tal i com s'ha descrit a l'apartat 8.4.

5.3 Immunocol·localització

La immunocol·localització és una aplicació de la immunocitoquímica (descrita a l'apartat 4.1) que permet determinar si dues proteïnes estan pròximes dins la cèl·lula. S'ha de remarcar que no és una tècnica que permeti demostrar que dues proteïnes estan interaccionant, simplement permet confirmar que estan molt properes a l'espai i que per tant, podrien estar interaccionant. El mecanisme bàsic de la immunocol·localització consistiria en marcar amb dos fluorocroms diferents les dues proteïnes a estudiar i analitzar si el senyal d'ambdós marcadors són pròxims o no entre ells dins la cèl·lula.

6 Transport de nucleòsids i derivats de nucleòsids

L'activitat dels transportadors de nucleòsids es realitza a través d'una aproximació la qual utilitza els substrats marcats radioactivament. Depenent de la naturalesa del cultiu cel·lular es procedirà d'una manera o una altra per realitzar aquest assaig. Encara que la metodologia és específica segons el tipus cel·lular, la base de la tècnica és la mateixa, una incubació de les cèl·lules en presència del substrat fred (no radioactiu) i del substrat marcat radioactivament (triti o carboni 14) a unes concentracions conegudes durant un temps determinat. Passat aquest temps s'atura la incubació i es procedeix al llistat de les cèl·lules per poder determinar la quantitat de substrat radioactiu que ha sigut incorporat per les cèl·lules. La quantitat de radioactivitat incorporada serà, doncs, el valor indicatiu de la capacitat funcional dels diversos transportadors.

Es mesura l'entrada dels nucleòsids o els seus derivats marcats radioactivament en cèl·lules en presència de sodi (NaCl), on actuen tant els transportadors equilibratius (hENTs) com els concentratius (hCNTs), i en un medi sense sodi (ChoCl) on només actuen els hENTs. Així, la diferència entre els dos medis correspon a l'activitat dels transportadors hCNTs. Si l'objectiu és determinar l'aportació d'hENT1 o hENT2, s'han de complementar els assaigs anteriors amb els inhibidors dipiridamol o NitroBenzilTiInosina (NBTI). El primer inhibeix ambdós transportadors, mentre que el segon inhibeix hENT1 a una concentració de $1\mu\text{M}$ i els dos a $10\mu\text{M}$. En el cas dels hCNTs és més complex ja que no existeixen inhibidors específics, sinó que s'han de realitzar inhibicions creuades amb purines i pirimidines. De tal manera que, tant en el medi que conté sodi com en el que no en conté s'afegeix una concentració saturant ($100\mu\text{M}$) de citidina (transportada per hCNT1 i hCNT3) o de guanosina (transportada per hCNT2 i hCNT3) sense marcar i uridina marcada (captada pels tres transportadors). Així amb la citidina s'aconsegueix inhibir els transportadors hCNT1 i hCNT3 i l'activitat observada correspon a hCNT2. Amb la guanosina a concentracions saturants es va pot veure l'activitat d'hCNT1 ja que s'inhibeixen hCNT2 i hCNT3. La diferència entre les dues activitats i la total (transport d'uridina marcada en absència d'inhibidors) es correspon a l'activitat hCNT3.

Per dissenyar aquest tipus d'experiment s'han de tenir en compte una sèrie de factors:

- La concentració del substrat (marcat i fred) ha de ser pròxim a la K_M del transportador.
- L'assaig s'ha de realitzar en condicions de velocitat inicial, és a dir, on la quantitat de substrat incorporat és proporcional al temps d'incubació. En el cas que es vulguin

estudiar fenòmens d'acumulació del substrat, s'haurà de treballar a temps més llargs. Es recomana realitzar un assaig de temps per conèixer l'interval de temps on es treballa en condicions de velocitat inicial ja que depèn de cada transportador i del substrat.

- La quantitat de substrat radioactiu ha de ser suficient per permetre la seva detecció, factor que depèn de l'activitat específica (dpm/mol) i de l'activitat del transportador.

6.1 Medis de transport, reactius i materials

Els medis de transport necessaris estan detallats a continuació:

- Medi Sodi: NaCl 137mM, KCl 5.4mM, CaCl₂·2H₂O 1.8mM, MgSO₄ 1.2mM, Hepes 10mM, roig de fenol 100µL/L. S'ajusta el pH a 7.4 amb Tris-Base 1M.
- Medi Colina: ChoCl 137mM, KCl 5.4mM, CaCl₂·2H₂O 1.8mM, MgSO₄ 1.2mM, Hepes 10mM, roig de fenol 400µL/L. S'ajusta el pH a 7.4 amb Tris-Base 1M.
- Medi d'Aturada: NaCl 137mM, Hepes 10mM, roig de fenol 200µL/L. S'ajusta el pH a 7.4 amb Tris-Base 1M.

Altres reactius i materials necessaris són els següents:

- Nucleòsids freds: uridina, citidina, guanosina, adenosina (tots ells comercialitzats per Sigma).
- Nucleòsids i derivats marcats radioactivament: [5,6-³H]uridina, [5-³H(N)]citidina, [8-³H]guanosina, [2,8-³H]adenosina, [8-¹⁴C]6-mercaptapurina, [³H]-AICAR (MoravekBiotech i Hartmann Analytic).
- Tampó de lisi: Tritó X-100 0.5%, NaOH 100mM per assaigs en cèl·lules en monocapa i en suspensió i SDS 0.1%, NaOH 100mM per assaigs en *transwell*.
- Líquid d'escintil·lació (National Diagnostics).

6.2 Transport en monocapa

6.2.1 Preparació dels medis de transport

Es complementen paral·lelament medis sodi i colina amb el substrat fred i el radioactiu a una concentració final de 1µM i 1µCi/mL respectivament. En el cas de treballar amb cèl·lules polaritzades, cultivades en filtres *transwell*, s'afegeixen 2µCi/mL i la concentració del substrat fred es manté a 1µM. S'utilitzen 250µL per pou de medi de transport atemperat a 37°C d'un placa de 24 pous o 500µL per cada filtre de la placa de *transwell*.

6.2.2 Assaig de transport en placa

S'aspira el medi de cultiu i es fan dos rentats amb 1mL de medi sodi o colina segons correspongui. El transport s'inicia en el moment en el qual es substitueix el medi dels rentats pel medi de transport, el temps d'incubació s'ha de determinar prèviament per assegurar que es treballa en condicions de velocitat inicial o d'acumulació, segons el que es vulgui estudiar. Passat

aquest temps, s'atura mitjançant l'abocament del medi de transport, dos rentats amb 1mL de medi d'aturada mantingut en gel durant tot l'experiment i posteriorment s'aspiren els restes de medi. A continuació es poden congelar les plaques o procedir amb elles, en aquest segon cas s'afegeixen 100-200µL de tampó de lisi (segons la confluència cel·lular) per promoure la lisi de les cèl·lules i que s'alliberi el contingut intracel·lular. Aquest pas es facilita mitjançant una agitació vigorosa en un agitador horitzontal durant 1 hora. La mescla s'homogeneïtza amb l'ajuda d'una micropipeta multicanal i es recullen 10µL que s'utilitzaran posteriorment per determinar la concentració proteica. Els 90µL restants es traspassen als vials de centelleig que contenen 3mL de líquid d'escintil·lació. Per altra banda cal preparar per triplicat vials que continguin 3mL del líquid d'escintil·lació i 5µL del medi de transport utilitzat per tal d'obtenir l'activitat específica, necessari pels càlculs. La mesura de la radioactivitat es realitza mitjançant un comptador beta que proporciona les desintegracions per minut (dpm) de l'isòtop radioactiu.

6.2.3 Assaig de transport en *transwell*

Un creixement cel·lular en *transwell* crea un epiteli polaritzat i permet distingir l'activitat que hi ha en la membrana basolateral o en l'apical. S'aspira primer el medi basolateral i després l'apical i es fan dos rentats amb medi sodi o colina, segons correspongui, posant primer 1mL a la part apical i després 1mL a la part basolateral. L'ordre d'aspirar i afegir el medi és important ja que seguint aquest ordre s'evita una desestructuració de l'epiteli format. Seguidament s'afegeix el medi de transport al compartiment que toqui (basolateral o apical) i s'omple el compartiment oposat amb 1mL de medi sodi o colina. S'aspira el medi i s'introdueix el filtre en un vas de precipitats que conté medi d'aturada fred. Un cop en aquest punt es poden congelar els filtres o es pot procedir amb el lisat cel·lular. Cada un dels filtres es separa del suport de la placa de *transwell* amb l'ajuda d'un bisturí i es col·loca en un tub *ependorf* que conté 200µL de tampó de lisi i s'incuba 2 hores en agitació a 37°C. Un cop les cèl·lules estan lisades s'homogeneïtzen amb una micropipeta i es reserven 10µL per la determinació de proteïna (per duplicat). Per altra banda es recullen 100µL de cada vial i es dipositen a vials de centelleig que contenen 3mL de líquid d'escintil·lació.

6.2.4 Valoració de la concentració de proteïna

Es realitza mitjançant el mètode de l'àcid bicinconínic (BCA) que combina la reducció de Cu^{+2} a Cu^{+} en un medi alcalí i la reacció colorimètrica del catió Cu^{+} amb l'àcid bicinconínic. Els pèptids redueixen els ions cúprics a través dels enllaços peptídics quan es troben en medi bàsic i en presència de tartrat potàssic. Aquest Cu^{+} reduït reacciona amb el BCA i genera el color porpra que adquireix una intensitat de color que és proporcional al nombre d'enllaços peptídics

presentes. Aquest complex presenta una absorptència a 562nm, encara que pot ser mesurada a una longitud d'ona entre 550-570nm sense que es produeixi un error significatiu important.

Les dissolucions comercials del *kit* utilitzat (*BCA™ Protein assay kit*, Pierce) es barregen amb una proporció de 1:50 i es dispensen 200µL a cada pou d'una placa de 96 pous on prèviament hem afegit els 10µL de proteïna. En paral·lel es prepara una recta patró amb albúmina sèrica bovina a concentracions conegudes (0,125,250,500,1000 i 2000µg/mL) per poder extrapolar els valors de les absorptències de cada mostra. La placa s'incuba 30min a 37°C i 10min a temperatura ambient. Finalment es llegeix l'absorptència a 550nm de longitud d'ona a l'aparell Infinity 2000.

6.2.5 Càlculs

Els vials que contenen les mostres radioactives i els estàndards es mesuren en un comptador beta amb un programa de desintegracions per minut (dpm) de triti. En primer lloc és necessari calcular l'activitat específica (AE) del medi de transport radioactiu considerant el comptatge de cada estàndard i el volum utilitzat segons s'indica a la fórmula següent:

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

Amb aquest resultat i considerant el temps del transport es pot obtenir el valor de l'activitat del transport tenint en compte la concentració de proteïna determinada segons la següent fórmula:

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

6.3 Transport en suspensió

6.3.1 Preparació dels medis de transport

La diferència principal rau en la concentració a la qual s'han de preparar els substrats (fred i marcat radioactivament). La concentració final del substrat radioactiu ha de ser la mateixa que en el transport realitzat en cèl·lules en monocapa, és a dir, 1µCi del substrat marcat radioactivament i 1µM del substrat fred. Per aconseguir-ho, el medi de transport s'ha de preparar 10 vegades més concentrat. D'aquesta manera, a les alíquotes de 90µL de cèl·lules se li afegixen 10µL del medi de transport radioactiu 10x, així el medi de transport queda a 1x.

6.3.2 Assaig de transport en suspensió

Aquest tipus de transport també es realitza a 37°C per tant els medis sodi i colina s'han de temperar prèviament. Es centrifuga la quantitat necessària de cèl·lules durant 6 minuts a

900rpm tenint en compte que per cada mesura de transport es necessiten entre $3\cdot 10^6$ cèl·lules. Es fan dos rentats amb el medi sodi o colina, seguidament es resuspenen amb el medi que correspongui i s'aliquoten 90µL d'aquest medi en tubs *ependorf* i es mantenen dins del bany a 37°C amb una gradeta fins al moment d'iniciar el transport. S'afegeixen 10µL del medi de transport i es deixa el temps necessari perquè es produeixi el transport (generalment es realitza a 1 minut). S'atura la reacció afegint 900µL de medi d'aturada fred i es centrifuga 1 minut i mig a 9500rpm. S'aspira el medi i s'afegeixen 900µL de nou de medi d'aturada, es torna a centrifugar i s'aspira el medi. En aquest punt es poden congelar les mostres o seguir amb el protocol. S'afegeixen 300µL de tampó de lisi i es deixa que es produeixi la lisi durant 1h a l'agitador horitzontal a temperatura ambient. Amb l'ajuda d'una micropipeta s'homogeneïtza la mescla i es posa tot el contingut als vials de centelleig que prèviament s'han omplert amb 3mL de líquid d'escintil·lació. Es preparen els estàndards per triplicat, vials amb 3mL de líquid d'escintil·lació i 5µL de medi radioactiu, ja que ens donaran el valor de l'activitat específica.

6.3.3 Valoració de la concentració de proteïna

En aquest cas s'agafa un punt de referència per tots els punts que s'han fet amb cadascun dels medis. Per tant, quan s'aliquoten les cèl·lules a tubs *ependorf* per fer el transport, s'afegeix un tub més amb els 90µL de cèl·lules per cada tipus de medi. Aquestes cèl·lules directament es centrifuguen a 9500rpm durant 3 minuts i s'afegeix 300µL de tampó de lisi 1h a temperatura ambient. S'homogeneïtza bé la mostra amb l'ajuda d'una xeringa i es centrifuga a 10000rpm 15min a 4°C. Finalment s'analitza la concentració mitjançant el mètode Bradford (apartat 8.2).

6.3.4 Càlculs

Els càlculs són els mateixos que els descrits a l'apartat 6.2.5 però el valor calculat de l'activitat específica s'ha de dividir entre 10 ja que el medi radioactiu inicialment s'ha preparat 10 cops més concentrat per tal que a la solució final quedes 1x.

En aquests assajos es comprova la incorporació del derivat nucleosídic a la cèl·lula mesurant el canvi de potencial que es genera a la membrana citoplasmàtica degut al cotransport del nucleòsid i cations sodi per part dels transportadors CNTs. Els experiments d'electrofisiologia es van dur a terme al laboratori pel Dr. David Bartolomé de la *Universidad Autónoma* de Madrid.

7.1 Metodologia

Per tal de mesurar el diferencial del potencial membrana citoplasmàtica cel·lular es treballa amb cèl·lules de dimensions grans com ara els oòcits, ja que al tenir unes dimensions d'aproximadament 1mm facilita la seva manipulació. És important controlar l'accés a aquestes cèl·lules germinals i la clonació dels gens de les proteïnes que es vulguin estudiar a un vector d'expressió a oòcits dels cDNAs de les proteïnes d'estudi.

7.1.1 Part molecular

Per poder transcriure el cDNA de les nostres proteïnes d'interès (ADK i hCNT3) a cRNA es van clonar en un vector específic. En el nostre grup, s'havia utilitzat el vector pBlueScript II SK per clonar el transportador hCNT3 i fer estudis d'electrofisiologia, per tant havíem de clonar el gen d'ADK al vector pBlueScript. Per fer-ho, es van digerir els dos vectors: pBlueScript II SK i pcDNA 3.1(+) que contenia la seqüència d'ADK amb els enzims de restricció BamHI i XbaI. Així, s'obria el primer vector i s'alliberava l'insert d'ADK. Seguidament es va realitzar la lligació, i un cop comprovat que el nou vector portava el gen, es va procedir a transformar bacteris *E. coli* per tal de produir grans quantitats de vector. Procediments descrits als apartats 11.2 i 11.4. L'obtenció del cARN de les dues proteïnes a partir del cDNA i tots els procediments posteriors van ser realitzats a la *Universidad Autónoma* de Madrid per part del Dr. David Bartolomé.

7.1.2 Part d'electrofisiologia

Els oòcits s'aïllen mitjançant una incisió abdominal de les femelles de l'espècie de gripau *Xenopus laevis*. Es renten per tal d'eliminar restes d'oòcits trencats i es tracten amb col·lagenasa, que elimina el teixit conjuntiu ovàric que manté units els oòcits i la capa fol·licular que els envolta. Finalment, es dipositen els oòcits en vials per tal que s'adaptin a l'osmolaritat de la nova solució fisiològica. Es microinjecta el cARN que codifica per les proteïnes (ADK i hCNT3). Després d'un període entre 2 i 7 dies de la microinjecció, les cèl·lules expressen la proteïna.

Un cop els oòcits expressen les proteïnes d'interès, es realitzen els estudis funcionals de captació dels nucleòsids. Com a medi d'incubació s'han usat les següents solucions: NaCl (medi Na^+) o clorur de colina (medi colina), composició descrita a l'apartat 6.1. Es col·loca un oòcit en una cambra d'uns 500 μL on es fa passar contínuament una solució de perfusió amb medi sodi. S'introdueix l'elèctrode de voltatge de l'oòcit i s'observa que el potencial de membrana és estable i almenys de -20mV respecte l'elèctrode de referència. Un cop és estable, s'introdueix l'elèctrode de corrent. Amb l'elèctrode de voltatge es mesura el potencial de membrana i amb l'elèctrode de corrent es registra el corrent proporcionat pel sistema per tal de mantenir el potencial de membrana en el valor desitjat (**Figura 72**). Al produir-se el transport, es produeix un flux de càrregues resultat del cotransport de catió/nucleòsid, corrent proporcional a la quantitat de nucleòsid transportat. Quan es registra el corrent de manera continua, després d'introduir els dos elèctrodes a l'oòcit, es fixa el potencial de membrana a -50mV i es registra el corrent necessari per mantenir aquest potencial. Quan s'obté una línia estable en medi sodi, corresponent a l'escapament de l'ió sodi a través del transportador, es perfondeix el nucleòsid o anàleg de nucleòsid i es mesura el corrent necessari per tal de mantenir l'oòcit a -50mV que es correspon al corrent produït pel compost. La cambra es renta amb medi lliure de substrat i catió sodi i l'oòcit es torna a estabilitzar amb medi sodi per a la següent exposició. El corrent es mesura una vegada per segon i el senyal és filtrat a 1Hz, recollint les dades pel seu anàlisi.

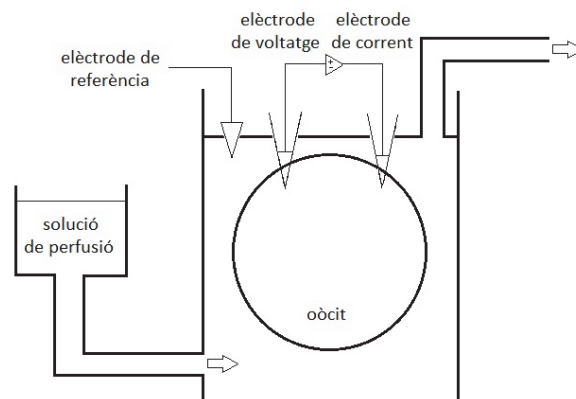


Figura 72. Dispositiu amb el que es realitza la tècnica de fixació del voltatge amb dos elèctrodes.

La constant d'afinitat aparent ($K_{0.5}$) i el corrent màxim de transport (I_{\max}) per a concentracions saturants de nucleòsid o catió s'obtenen ajustant els corrents de l'estat estacionari a cada potencial de membrana (I) a la equació de Hill: $I = I_{\max} ([S]_o)^n / \{ (K_{0.5})^n + ([S]_o)^n \}$ on $[S]_o$ és la concentració extracel·lular de substrat (nucleòsid), I_{\max} és el corrent màxim obtingut amb concentracions saturants de substrat, $K_{0.5}$ és la concentració de substrat per la qual el corrent és la meitat de la I_{\max} i n és el coeficient de Hill, que per les cinètiques de nucleòsids és 1.

8 Anàlisi de l'expressió de proteïnes

8.1 Obtenció d'extractes proteics

Es realitza a partir de la lisi de cèl·lules que han estat sembrades en plaques de 60mm o 100mm. A més, per aquesta tesi s'han utilitzat plaques de 24 pous en alguns experiments concrets. Decidir quin tampó de lisi és l'adequat per l'extracció de proteïnes és una factor clau per optimitzar aquest procés. És important saber quina és la naturalesa de la proteïna d'interès, és a dir, si és una proteïna de membrana o citosòlica o si volem estudiar-ne el seu estat de fosforilació ja que aquestes característiques determinaran quin tampó de lisi és més adient.

Materials i Reactius

- Tampó PBS: NaCl 140mM, KH_2PO_4 2.7mM, Na_2PO_4 8.1mM a pH 7.4
- Tampó de lisi:
 - **NP-40:** Tris-HCl 50mM, NaCl 250mM, NP-40 1%, pirofosfat sòdic 5mM, NaF 50mM a pH 7.4
 - **Fosforilats:** Tris-HCl 20mM, NaCl 150mM, Na_2EDTA 1mM, EGTA 1mM, Tritó X-100 1%, pirofosfat sòdic 2.5mM, β -glicerofosfat 1mM, leupeptina $1\mu\text{g}/\text{mL}$ a pH 7.5
- Inhibidor de proteases *Complete TM Protease inhibitor cocktail tablets* (Roche)
- Inhibidor de fosfatases *PhosSTOP Phosphatase inhibitor cocktail tablets* (Roche)
- Ortovanadat de sodi (Na_3VO_4)
- *Scrapers* (Costar)

Procediment

Les cèl·lules, que, prèviament poden haver estat tractades o no, s'han de rentar dos cops amb 5-10mL de PBS 1x fred assegurant-nos que no quedin restes de medi i congelades amb nitrogen líquid perquè l'estat de la cèl·lula no es vegi alterat. En aquest punt, les plaques es poden congelar a -20°C o bé procedir a l'obtenció de la proteïna. Tot el procés sempre es duu a terme en gel per evitar la degradació de les proteïnes. S'afegeix un volum variable del tampó de lisi en funció del diàmetre de la placa i la densitat cel·lular, aquest s'ha de suplementar amb Na_3VO_4 i inhibidor de proteases a l'1%, i en el cas de proteïnes fosforilades amb inhibidor de fosfatases a l'1%. Les cèl·lules s'han d'aixecar rasant amb un *scraper*, la solució resultant es recull en tubs eppendorf i s'acaba d'homogeneïtzar amb l'ajuda d'una xeringa. Els lisats obtinguts es deixen 15min en gel i es centrifuguen a 10000rpm durant 10-15 minuts a 4°C , per tal de sedimentar totes les restes de material no disgregat i conservar el sobrenedant a -20° .

8.2 Valoració de la concentració proteica

S'utilitza el mètode anomenat Bradford, és un mètode colorimètric basat en el canvi de color del reactiu Coomassie al unir-se als residus bàsics de les proteïnes. S'ha utilitzat la dissolució comercial Bio-Rad *proteinassay* (Bio-Rad) diluïda 1:4 en aigua destil·lada. Es dispensa 1mL d'aquesta dilució en cubetes semimicro de plàstic i s'afegeix 1-2µL de la mostra. Es prepara una recta patró amb concentracions d'albumina sèrica bovina conegudes: 0, 5, 10 i 20µg/µL i així poder extrapolar els resultats de les absorbàncies de cada mostra a 595nm de longitud d'ona.

8.3 Electroforesi en SDS-PAGE

Un cop obtingut l'extracte proteic s'ha de recórrer a mètodes de separació de la mostra. El mètode utilitzat és el que separa la barreja de proteïnes en funció del seu pes molecular, l'electroforesi SDS-PAGE (*SodiumDodecylSulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*). Sistema que es basa en tractar la mostra amb un tampó que conté el detergent iònic SDS, de manera que li confereix càrregues negatives a les proteïnes sense afectar el pes molecular. Aquesta càrrega permetrà que les proteïnes corrin per acció d'un camp elèctric entremig d'una xarxa formada per un polímer d'acrilamida i bisacrilamida separant els components de la mescla.

Materials i Reactius

- Tampó de càrrega: Es prepara 5 cops concentrat. Per cada 20mL s'afegixen 6.4mL de Tris-HCl 1M a pH 8, 2g de SDS, 10mL de glicerol i 0.2% de blau de bromofenol. Al moment de la seva utilització s'afegeix β-mercaptoetanol al 5%. El SDS confereix la càrrega negativa, el glicerol dóna densitat a la mostra i permet que s'introdueixi dins del pou, el blau de bromofenol és un indicador visual per saber on es troba el front i el β-mercaptoetanol reduirà els ponts disulfur de les cisteïnes.
- Tampó d'electroforesi: Tris-Base 25mM, glicina 1.91M i SDS al 1%. Es prepara a 10x.
- Marcador de pes molecular: *Precision Plus Protein TM Standards Dual Color* (Bio-Rad) que conté marcadors entre 10 i 250kDa.
- Gel concentrador: 2.7mL d'aigua destil·lada, 0.67mL d'acrilamida comercial, 0.5mL Tris 1M pH 6.8, 40µL de SDS al 10%, 40µL d'APS (perosulfat d'amoni) al 10% i 4µL de TEMED (tetrametiletildiamina).
- Gel resolutiu: 4mL d'aigua destil·lada, 3.3mL d'acrilamida comercial, 2.5mL Tris-Base 1.5M a pH 8.8, 100µL de SDS, 100µL d'APS 10% i 4µL de TEMED.
- Aparells de PAGE: Sistema *Mini Protean 3* (Bio-Rad) i una font d'alimentació

Procediment

Preparació de les mostres

Generalment es carreguen entre 10 i 50µg de proteïna total, no obstant, la quantitat necessària per cada experiment ha de ser determinada específicament segons les condicions de cada cas. La mostra es barreja amb 5µL del tampó de càrrega al 5% i es porta a un volum final de 25µL amb aigua destil·lada. Posteriorment, per tal de desnaturalitzar les proteïnes, de forma general les mostres s'escalfen 5min a 95-100°C. Però en aquest treball, l'estudi està basat en proteïnes de membrana i s'ha vist que aquest tipus de proteïna es pot detectar millor si les mostres són escalfades durant 30min a 37°C.

Preparació dels gels

Es prepara el gel resolutiu que és on es produirà la separació de proteïnes segons el seu pes molecular. El TEMED i APS són els responsables de la polimerització, per aquest motiu s'afegiran al final. Aquesta barreja s'introdueix entre dos vidres amb l'ajuda d'una pipeta *Pasteur* de plàstic. Un cop ha polimeritzat el gel, s'afegeix el gel concentrador, el qual permetrà que totes les mostres quedin retingudes per poder entrar alhora dins del gel concentrador. Finalment, s'introdueix una pinta de 10 o 15 pous i s'espera a que polimeritzi.

Electroforesi

Com a sistema d'electroforesi s'utilitza el *Mini Protean 3* amb el qual es prepara el muntatge del gel amb el seu suport i els elèctrodes dins la cubeta seguint les instruccions d'ús del fabricant. La cubeta s'omple del tampó d'electroforesi i es carreguen els pous del gel amb les mostres preparades. Finalment es tanca el circuit elèctric aplicant un corrent de 40mA (1gel) o 80mA (2 o més gels) fins que la proteïna d'interès, quedi suficientment separada en el gel.

8.4 Western Blot

La tècnica de *western blotting* o *immunoblot*, consisteix en la transferència electroforètica de proteïnes des de gels SDS-PAGE a membranes de nitrocel·lulosa o PVDF per, poder fer una detecció auto-radiogràfica d'una determinada proteïna mitjançant anticossos específics.

8.4.1 Electrotransferència de proteïnes

Materials i Reactius

- Tampó de transferència: Tris-Base 25mM, glicina 192mM i metanol al 20% (v/v). Es prepara 10 cops més concentrat i es conserva a temperatura ambient.
- Metanol
- Paper de filtre Whatman 3mm

- Membrana de PVDF *Immobilon-P TransferMembrane* (Millipore)
- Aparell de transferència de gels a membranes: Sistema *Mini Protean* (Bio-Rad)

Procediment

S'activa la membrana PVDF amb metanol durant 15" i s'elimina l'excés de metanol amb aigua Milli-Q durant 1 minut i mig i es deixa amb tampó de transferència. Un cop acaba l'electroforesi, es fa el muntatge per realitzar l'electrotransferència amb l'ajuda d'esponges i paper Whatman. Aquest sistema es col·loca en una cubeta d'electroforesi plena del tampó d'electroforesi a la qual, a més a més, hi afegirem un bloc de gel i un nucli magnètic per tal de mantenir tot el sistema refrigerat. Finalment es tanca el circuit aplicant un voltatge de 100V durant 90min, el temps pot variar en funció del pes molecular de la proteïna estudiada. Seguidament, es realitza una tinció inespecífica amb el colorant *Ponceau* per comprovar que la transferència de les proteïnes del gel a la membrana de PVDF s'ha produït correctament. Aquesta tinció és reversible, per tant, la tinció vermella de les proteïnes s'elimina amb aigua destil·lada.

8.4.2 Immunodetecció

La immunodetecció s'utilitza per identificar antígens específics reconeguts per dos anticossos monoclonals o policlonals. El primer anticòs (anticòs primari) s'uneix específicament a l'antigen de la proteïna, i el segon anticòs (anticòs secundari) s'uneix al primari detectant la cadena pesada de l'anticòs amplificant el senyal i permetent la seva detecció mitjançant la peroxidasa de rave que porta unit a la seva estructura.

Materials i Reactius

- Tampó TBS-Tween: Tris-Base 20mM, NaCl 150mM, Tween-20 0.1% a pH 7.6
- Solució de bloqueig: 50mL tampó TBS-Tween, 10% (p/v) de llet en pols (*Nestle Sveltesse*)
- Plàstic per preparar les bosses
- Segelladora
- Agitador orbital

Procediment

La membrana s'incuba amb 10mL de solució de bloqueig durant 1h a temperatura ambient per tal evitar unions inespecífiques amb els anticossos. Seguidament s'incuba la membrana amb l'anticòs primari diluït en la solució de bloqueig al 5% (p/v) de llet en pols durant tota la nit a 4°C en un agitador orbital. Hi ha anticossos que es poden incubar 1h a temperatura ambient, com per exemple els anticossos d'actina o tubulina, ja que són molt eficients. Un cop acabada la incubació, es fan tres rentats de 5 minuts cadascun amb el tampó TBS-Tween. Seguidament, s'incuba la membrana amb l'anticòs secundari, aquest variarà en funció de l'espècie (conill, ratolí, rata...) on s'hagi obtingut el primari. Es prepara una dilució 1:2000 de l'anticòs secundari

en la solució de bloqueig al 5% (p/v) de llet en pols. Aquesta incubació generalment dura entre 1 i 2 hores i es realitza a temperatura ambient i la membrana es renta tres cops amb TBS-Tween.

Proteïna	Casa comercial	Reactivitat	Dilució	Espècie	Pes molecular
ADK	Abcam	Humà, hámster	1:500	Conill	41kDa
hCNT3	Sigma	Humà	1:1000	Conill	75-100kDa
ENT1	St John's Lab	Humà, ratolí, rata	1:1000	Conill	55kDa
HA	Roche	Humà, rat ratolí	1:2000	Rata	tag
c-MYC	Santa Cruz	Humà	1:500	Ratolí	50kDa
AMPK α	Cell Signaling	Humà, rat ratolí, mono	1:1000	Conill	62kDa
Fosfo AMPK α (Thr172)	Cell Signaling	Humà, rat ratolí, mono	1:1000	Conill	62kDa
Gal-4	R&D Systems	Humà, rat ratolí	1:500	Cabra	35kDa
Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa α 1	The Developmental Studies Hybridoma Bank				
Vilina-1	Cell Signaling	Humà, mono	1:1000	Conill	95kDa
Actina	Sigma Aldrich	Humà	1:2000	Conill	42kDa
Tubulina	Sigma Aldrich	Humà	1:10000	Ratolí	50kDa

Taula 11. Característiques dels anticossos primaris utilitzats.

Reactivitat	Casa comercial	Dilució
Conill	Bio-Rad	1:2000
Ratolí	Bio-Rad	1:2000
Rata	Bio-Rad	1:2000

Taula 12. Característiques dels anticossos secundaris utilitzats.

8.4.3 Revelat amb el mètode ECL

Per aquest procés s'utilitza el reactiu ECL que és un substrat altament sensible que permet detectar l'activitat peroxidasa. Com a producte de la reacció es produeix llum que és detectada per una càmera fotogràfica d'elevada sensibilitat (Fujifilm) que genera una imatge digital mitjançant el software LAS-3000.

Materials i Reactius

- ECL (*Enhanced ChemoLuminescent Method*, Biological Industries)
- Càmera fotogràfica Fujifilm
- Software LAS-3000

Procediment

El reactiu ECL consta de dos components independents, en el moment del revelat s'han de barrejar ambdós compostos amb una proporció 1:1, el volum final dependrà de la mida de la membrana. S'introdueix la membrana dins d'una bossa de plàstic i se la cobreix amb el reactiu ECL preparat prèviament. S'espera 1 minut aproximadament perquè es produeixi la reacció i s'introdueix la membrana dins la màquina per tal de poder realitzar les fotografies. Depenent de la sensibilitat de l'anticòs, el temps d'exposició serà més o menys llarg. L'anàlisi de les imatges obtingudes s'han realitzat amb diversos software: *AdobePhotoshop CS* o *Image J*. En aquest treball també s'han fet revelats amb l'ECL però enlloc d'utilitzar una càmera per captar la imatge, s'han usat *cassettes* per revelar sobre films d'alta sensibilitat.

9 Reacció en cadena de la polimerasa (PCR) i tècniques afins

La reacció en cadena de la polimerasa o PCR (*Polymerase Chain Reaction*) és un mètode *in vitro* que permet l'amplificació enzimàtica del DNA. L'objectiu d'aquesta tècnica és obtenir un gran nombre de còpies d'un fragment de DNA a partir d'una única còpia d'aquest fragment original o motlle. Els productes d'extensió dels *primers* sintetitzats en cada cicle poden servir com a motlle a la següent reacció, per tant, 20 cicles de PCR representen aproximadament un milió de còpies del motlle original, aquest creixement exponencial fa que la tècnica sigui molt sensible.

Cada cicle de PCR consta de tres fases: desnaturalització del DNA motlle, unió del *primer* al motlle i finalment l'extensió del *primer*. Durant la primera fase es desnaturalitza el DNA motlle incrementant la temperatura a 94° entre 15s-2min. Seguidament, la temperatura es redueix a 40-60°C (segons la composició dels *primers*) entre 16-60s per permetre la unió del *primer* amb el DNA desnaturalitzat, fase que s'anomena d'anellament. És la fase més crítica ja que segons la temperatura escollida els encebadors s'uniran específicament, inespecífica o no s'uniran. Finalment, la síntesi del nou DNA comença quan s'assoleix la temperatura òptima per la DNA polimerasa, que majoritàriament és d'entre 70-74°C. La duració de la fase d'extensió depèn de la mida del fragment a amplificar, generalment es calcula que la polimerasa necessita 30s per cada kilobase a amplificar. Aquestes tres fases es converteixen en un cicle que es repeteix entre 20 i 40 cops per tal d'aconseguir amplificar el DNA. Un cop acabats tots els cicles, es realitza una extensió de 7 minuts per assegurar-nos que totes les amplificacions estan acabades.

9.1 Obtenció inserts

En aquest treball s'han seguit dues estratègies per tal d'obtenir els inserts dels cDNA dels gens que codifiquen per les proteïna d'estudi. Una és la clonació (apartat 11.4), que un cop amplificat el cDNA per PCR s'introdueix a un vector d'expressió. L'altra estratègia és la compra del vector que contingui l'insert el qual es subclonarà a un vector d'expressió. La metodologia d'amplificació del gen mitjançant la PCR es detalla tot seguit.

9.1.1 Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

Materials i Reactius

- Taq polimerasa (Promega)
- Tampó de reacció 10x
- Aigua Mili-Q

- Barreja de dNTPs 10Mm (2.5Mm de cadascun: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Promega)
- *Primers* 20µM
- Termociclador

Procediment

S'afegeixen 5µL de tampó 10x, 1µL de dNTPs, 1µL de cada un dels *primers* (a una concentració de 20µM), 2.5-2µL de cDNA i s'ajusta a un volum final de 50µL amb aigua Mili-Q.

9.1.2 Clonació i subclonació

El procés de clonació parteix d'una reacció de PCR mitjançant *primers* específics del gen d'estudi i posteriorment s'introdueix a un vector d'expressió, en canvi la subclonació mou un gen des d'un vector d'origen a un vector de destí.

En la present tesi, el cDNA que codifica per la proteïna ADK estava clonat al vector pDNR-DUAL de la casa comercial DNASU i es va subclonar al vector d'expressió pcDNA 3.1 (+). Es va alliberar el cDNA de l'ADK amb els enzims Sall i HindIII i per PCR es van introduir dues dianes de restricció noves, BamHI i XbaI, ja que les anteriors no estaven presents al vector de destí. Paral·lelament el vector de destí pcDNA 3.1 (+) també va ser digerit amb els mateixos enzims BamHI i XbaI per tal de poder lligar-los després seguint el protocol de l'apartat 11.4.6.

9.2 Modificació dels inserts

9.2.1 Introducció de dianes de restricció mitjançant PCR

Els enzims de restricció s'han d'escollir de manera que l'insert d'interès no contingui la seqüència diana per l'enzim escollit, de ser així, l'enzim tallaria l'insert per la meitat. A més, s'ha de comprovar la compatibilitat dels tampons entre els enzims per tal de poder digerir l'insert amb els dos enzims de restricció alhora utilitzant un mateix tampó.

En el cas que s'hagin d'afegir les dianes de restricció al gen d'interès cal fer una PCR amb *primers* que continguin les dianes de restricció desitjades. Tots els *primers* que vam necessitar per dur a terme aquest treball es resumeixen a la **Taula 13**. Per fer aquest disseny de *primers* s'han de tenir en compte que:

- La diana de restricció s'afegeix a l'extrem 5' del *primer* precedida d'un nombre de nucleòtids i a 3' seguida d'un nombre de nucleòsids perquè l'enzim pugui tallar la seqüència.
- El *primer* complementari a la seqüència ha de ser de 12 nucleòsids com a mínim.

Primer	Diana inserida	Seqüència (5'-3')
ADK (Fw)	BamHI	TCGGGATCC ATG ACGTCAGTCAGAGAAAA
ADK (Rv)	XbaI	AGTTCTAGACTAGTGGAAGTCTGGCTTCTCAGG
hCNT3 Δ10 (Fw)	HindIII	CCCAAGCTT GCA TGGCTGAGGGCTACAGCAAC
hCNT3 Δ25 (Fw)	HindIII	CCCAAGCTT GCA TGCTTGAGAACGAGAACAC
hCNT3 Δ35 (Fw)	HindIII	CCCAAGCTT GCA TGTCAATAAGAAGCAGAG
hCNT3 Δ49 (Fw)	HindIII	CCCAAGCTT GCA TGACCAAACAGGATGAAG
hCNT3 (Rv)	SmaI	TCCCCGGGTCAAAATGTATTAGAGATC

Taula 13. Primers utilitzats per la inserció de dianes de restricció durant la subclonació d'ADK al vector d'expressió pcDNA3.1(+) i per la generació de construccions derivades del transportador hCNT3. Les dianes de restricció es mostren subratllades i el codó d'inici (ATG) introduït per generar aquelles construccions delecionades es mostra en negreta. Fw (*forward*) i Rv (*reverse*).

9.2.2 Introducció d'etiquetes myc

L'etiqueta myc és un polipèptid derivat del gen *C-MYC* que té una seqüència de 10 aminoàcids (EQKLISEEDL), és àmpliament utilitzada per ser petita, tenir poca interferència sobre l'activitat biològica de les proteïnes que la porten fusionada i per l'eficient reconeixement mitjançant anticossos comercials (**Taula 11**). S'han dissenyat els primers que es mostren a la **Taula 14** per tal d'introduir la seqüència *MYC* i els enzims de restricció utilitzats per clonar aquesta proteïna de fusió al vector d'expressió pcDNA 3.1 (+).

Primer	Diana inserida	Seqüència (5'-3')
ADK-myc (Fw)	BamHI	TCGGGATCC ATG GGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCT GATGACGTCAGTCAGAGAAAA
ADK (Rv)	XbaI	AGTTCTAGACTAGTGGAAGTCTGGCTTCTCAGG

Taula 14. Primers utilitzats per la inserció de l'etiqueta *MYC* en la seqüència del gen ADK, així com la incorporació de les dianes de restricció BamHI i XbaI.

9.3 Comprovació dels inserts

9.3.1 Seqüenciació

S'utilitza el mètode de la seqüenciació de Sanger, mètode que es basa en l'ús de dideoxinucleòtids marcats amb fluoròfors que els manca el grup 3' hidroxil, grup responsable d'acabar el procés d'elongació de la cadena durant la reacció de PCR. Es generen diversos fragments de mides diferents de DNA que es separa per electroforesi capil·lar i amb un làser s'excita el fluoròfor que porta el dideoxinucleòtid. Cada dideoxinucleòtid està marcat amb diferent color que genera un electrofluorograma que ens determinarà la seqüència.

Materials i Reactius

- ABIPRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Kit Version 3.1 (Applied Biosystems)
- Termociclador
- Oligonucleòtids

Primers utilitzats

Primer	Seqüència (5'-3')
ADK (Fw)	CAACAGGTCCTCATAGCTAATC
ADK (Rv)	CTTTAATACTGACTCTGGGGAAAC
hCNT3 (Fw)	ACAGGTCACAGTTGAGCAGG
hCNT3 (Rv)	GTATGCACCTAGCACGCTC

Taula 15. Primers utilitzats per la seqüenciació dels gens ADK i hCNT3.

Procediment

S'afegeix el DNA que es vol analitzar, aproximadament 100ng/Kb, 1µL de *primer* 5'-3' o 3'-5' 10µM (**Taula 15**), 3µL del tampó de seqüenciació (5x), 1µL de la Taq polimerasa i fins a 15µL d'aigua estèril. El programa consta de 25 cicles de: 96°C 10s, 50°C 5s i 60°C 4min. Les mostres s'envien al Servei de Seqüenciació dels Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona. Els resultats després són analitzats utilitzant programes com ara el EMBOS o CLUSTAL.

9.3.2 Gel d'agarosa no desnaturalitzant

L'electroforesi en un gel d'agarosa és un mètode simple, ràpid i eficient per separar i identificar fragments de DNA. Generalment es treballa amb agarosa a l'1% però si volem separar fragments petits de DNA (<300pb) és recomanable incrementar la concentració.

Materials i Reactius

- Agarosa
- Tampó TBE 10x: Tris-Base 0.1M, Àcid bòric 0.09M i EDTA 1mM a pH 8
- *Loading Dye*: Sacarosa 4g, Cianol de xilè 25mg i Blau de bromofenol 25g en 20mL d'H₂O
- *SYBR Safe*[®] (Invitrogen)
- Marcador de pes molecular: 100pb i/o 1kb (Promega)

Procediment

Es dissol l'agarosa en el tampó TBE 1x, es deixa temperar i s'afegeix el *SYBR Safe*[®]. Aquest és un intercalant del DNA i mitjançant l'excitació per llum UV, permetrà detectar el DNA. La barreja s'afegeix a la cubeta, es col·loca la pinta i es deixa polimeritzar. Les mostres es barregen amb el *loading dye* i es carreguen al gel juntament amb el marcador de pes molecular. Durant l'electroforesi es poden utilitzar voltatges de fins a 150V, ja que són gels no desnaturalitzants. El gel s'excita amb llum UV i mitjançant una càmera s'obtenen les imatges.

10 Anàlisi de l'expressió del RNA

L'extrema fragilitat del RNA i la presència de ribonucleases (RNases) endògenes i exògenes fan que sigui necessari prendre mesures abans i durant la seva manipulació amb l'objectiu d'evitar la contaminació i la degradació de la mostra. És molt important treballar amb material lliure de RNases, autoclavats, treballar en gel per evitar degradacions i que les dissolucions siguin preparades amb aigua tractada amb DEPC, un inhibidor de les RNases.

10.1 Extracció del RNA total

Per purificar el RNA s'utilitza el kit "SV Total RNA Isolation System" (Promega). Sistema que es basa en les propietats disruptives i protectores dels tiocianats de guanidina (GTC) i el β -mercaptoetanol per inactivar les ribonucleases presents als extractes cel·lulars. Juntament amb el SDS, el GCT disgrega els complexos multiproteïcs i així es pot aïllar el RNA lliure de proteïnes.

Generalment s'utilitzen plaques de 60 o 100mm que estiguin confluents. Després de dos rentats amb PBS s'afegeix el tampó de lisi i un cop s'ha centrifugat el lisat cel·lular, el RNA es precipita i purifica en una columna de sílice. Després d'uns quants rentats, el RNA s'elueix amb aigua lliure de nucleases que el puguin degradar. Un cop aïllat, es pot utilitzar immediatament o conservar-lo a -80°C per mantenir la seva integritat. A més, s'elimina el DNA residual mitjançant un tractament amb la DNasa I per evitar falsos positius en els posteriors anàlisis.

Per determinar la quantitat i la qualitat del RNA, es mesura l'absorbància del RNA a 260 i 280nm. Els àcids nucleics tenen un màxim d'absorbància a 260nm, per tant, podem calcular la concentració del RNA. En canvi, a 280nm les proteïnes presenten un màxim d'absorbància. La relació $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ hauria d'estar entre 1.8 i 2.0 per assegurar la puresa de les mostres.

10.2 Síntesi de cDNA per retrotranscripció

Com que el RNA no serveix com a motlle per la PCR, es necessita sintetitzar DNA a partir de RNA mitjançant la retrotranscripció per, finalment, generar el DNA complementari o cDNA. Per a la síntesi de cDNA es pot utilitzar tant el RNA total com el mRNA obtinguts com s'ha explicat en apartats anteriors. L'ús de mRNA augmenta l'amplificació de mRNA poc abundants, ja que la seva proporció en la preparació del RNA total és, aproximadament, de l'1%. La reacció de síntesi del cDNA requereix d'una retrotranscriptasa i un determinat tipus de *primers*. Pel que fa la

retrotranscriptasa s'ha utilitzat la M-MLV, que prové del virus de la leucèmia murina de Moloney. Existeixen diferents tipus d'encebadors que poden ser utilitzats, en aquest treball s'han escollit els hexanucleotids aleatoris, que s'uneixen a diversos llocs del DNA generant cDNA curts i són ideals per evitar estructures secundàries del motlle.

Materials i Reactius

- RNA
- Encebadors (hexanucleòtids) (Invitrogen)
- M-MLVRT (Invitrogen)
- RNAsin (Promega)
- Aigua ultrapura
- Tampó 5x *first strand* (Invitrogen)
- DTT (Invitrogen)
- dNTPs (Promega)

Procediment

Preparar el que anomenem *cDNA mix* que està compost per: tampó 5x *first strand* a una concentració final de 1x, DTT a 1 μ M, dNTPs a 625 μ M i 25ng d'encebadors. Es fan alíquotes d'aquesta mescla i es conserven a -20°C. En el moment de realitzar la retrotranscripció, es suplementa el *cDNA mix* amb els enzims, per cada 200 μ L afegir 12 μ L de M-MLVRT i 8 μ L de RNAsin. Paral·lelament s'agafa 1 μ g de RNA i es dilueix en un volum final de 20 μ L, que es complementarà amb aigua ultrapura (s'han de preparar les mostres en gel). Posar les mostres al termociclador durant 5 minuts a 65°C per desnaturalitzar el RNA i immediatament col·locar-les en gel. A cada mostra del RNA diluït afegir 20 μ L del *cDNA mix* al qual ja se li ha afegit els enzims. Incubar les mostres a un termociclador durant 2 hores a 37°C i 10 minuts a 65°C per inactivar l'enzim. Les mostres es poden guardar a -20°C o utilitzar-les seguidament.

10.3 PCR a temps real (RT-PCR)

A diferència de la PCR convencional, la PCR a temps real (RT-PCR) permet la detecció del producte de PCR a mesura que s'acumula i per tant, és un mètode suficientment sensible com per quantificar el nombre de còpies d'una mostra o comparar els nivells d'expressió entre diferents mostres. La tecnologia que s'utilitza en aquesta tesi per detectar els productes de PCR és la que es basa en sondes fluorogèniques (sondes Taqman). La tecnologia Taqman utilitza una sonda, és a dir, un oligonucleòtid específic pel gen a estudiar i presenta dos tipus de molècules a la seva estructura: un marcador fluorescent (*reporter*) a 5' o un reductor de l'emissió (o *quencher*) a 3'. Quan la sonda es troba intacta, la proximitat entre el *reporter* i *quencher*, redueix la fluorescència degut al fenomen FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*). En canvi, quan la seqüència diana es troba a la mostra analitzada, la sonda s'uneix específicament a la regió del

Materials i mètodes

DNA que és complementari i la DNA polimerasa, degut a l'activitat exonucleasa 5'-3', alliberarà la molècula fluorescent i es podrà detectar. A cada cicle, s'alliberen progressivament més molècules de *reporter*, produint-se un increment de la fluorescència proporcional a la quantitat de producte generat. Aquesta tècnica aporta especificitat ja que és necessari que la sonda i la diana hibridin perquè es generi un senyal.

Per tal de fer una quantificació relativa es comparen les Ct amb un altre gen endogen que no es vegi modificat per les condicions experimentals. Aquests gens s'anomenen *housekeeping genes*, en aquest treball s'ha utilitzat el gliceraldehid-3-fosfat-deshidrogenasa (hGAPDH).

Materials i Reactius

- cDNA
- Aigua estèril
- Taqman *Universal PCR master mix 2x*
- *Primers 20x* / (Life Technologies)
- Sondes Taqman (ADK: Hs00417073_m1 i hGAPDH: 4310884E)

Procediment

La RT-PCR es realitza a partir del cDNA obtingut a partir de la retrotranscripció, la *master mix* conté el DNA polimerasa i els dNTPs per tal que es pugui dur a terme la reacció i les sondes específiques dels gens a analitzar. En cada pou de la placa de 96 pous es carreguen tots els reactius. Per descartar qualsevol tipus de contaminació, es realitza un control negatiu que contingui aigua enlloc de cDNA.

Anàlisi

Els resultats de la RT-PCR ens donen el valor de la C_t . Aquest valor és el nombre de cicles necessari per tal d'obtenir un senyal fluorescent que superi els nivells basals, per tant, el valor de C_t és inversament proporcional a la quantitat de DNA de la mostra. Per a analitzar les dades, es fixa un llindar en el qual totes les mostres superin aquest nivell basal i es realitzen els següents càlculs:

- 1) Fer la mitjana de les C_t de cada mostra i del control endogen.
- 2) Calcular el valor ΔC_t com la diferència de la C_t de la mostra i de la C_t del control endogen.
- 3) L'error estàndard de ΔC_t es calcula com $\sqrt{(SE_{\text{mostra}})^2 + (SE_{\text{control endogen}})^2}$.
- 4) Calcular $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{mostra}) - \Delta C_t(\text{mostra control})$.
- 5) Per determinar l'expressió de la mostra relativitzada a la mostra control s'ha de calcular $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (unitats arbitràries).

11 Biologia molecular

La biologia molecular és la disciplina científica que té com a objectiu l'estudi dels processos que es produeixen en els éssers vius a nivell molecular. En el seu sentit més modern, la biologia molecular pretén explicar els fenòmens de la vida a partir de les seves propietats macromoleculares, per tant es basa en l'estudi de macromolècules com el DNA, el RNA i les proteïnes. En l'argot de laboratori, no obstant, la biologia molecular es centra amb totes les tècniques relacionades amb el DNA. Tots els processos que requereixin condicions d'esterilitat es duran a terme sota la flama d'un encenedor tipus Bunsen i utilitzant material prèviament autoclavat.

11.1 Creixement bacterià i obtenció de bacteris competents

Els bacteris competents són bacteris que estan adaptats per introduir un plasmidi al seu interior. Per aconseguir aquest estat fisiològic, els bacteris han de patir una sèrie d'alteracions a la seva membrana provocant així una major permeabilitat cel·lular. Els bacteris competents utilitzats en aquesta tesi han estat generats a partir d'*Escherichia coli* X-Blue.

Materials i Reactius

- Bacteris *E. coli* congelades amb glicerol al 20% a -80°C
- Medi líquid Luria-Broth (LB) estèril: triptona 1% (p/v); extracte de llevats 0,5% (p/v), NaCl 1% (p/v) i Na OH 2mM pH=7
- Tampó TfBI: 30mM KOAc, 50mM MnCl₂, 100mM RbCl, 10mM CaCl₂ a pH=5,8 i 15% de glicerol
- Tampó TfBII: 10mM Mops a pH=7, 75mM CaCl₂, 10mM RbCl i 15% glicerol
- Tubs propilè

Procediment

S'inoculen bacteris *E. coli* de la soca XL1-Blue a 3mL de medi líquid LB i s'incuben en agitació (180rpm) a 37°C tota la nit. Al dia següent s'inoculen 2mL d'aquest creixement en 100mL de LB i es deixa créixer a 37°C en agitació (180rpm) fins que la densitat òptica a 550nm sigui 0.4, densitat on els bacteris es troben a la fase de creixement exponencial. Es traspasa el creixement bacterià a tubs de polipropilè estèrils i es deixen en gel durant 15 minuts. Es centrifuguen a 3000rpm (Sorvall SA600) 15 minuts a 4°C, es descarta el sobrenedant i es resuspèn el pellet de cèl·lules suaument amb el vòrtex amb 30mL de tampó TfBI. S'incuben els tubs 20 min en gel i es centrifuguen a 3000rpm, 15 min a 4°C, es descarta el sobrenedant i es resuspen el pellet amb 4mL de tampó TfBII. S'incuben finalment 15 min en gel i es congelen o es transformen.

11.2 Transformació de bacteris competents

És el procés pel qual es pot introduir un plasmidi d'interès dins d'un bacteri competent. El protocol de transformació es basa amb el xoc tèrmic, concretament, es barreja el DNA i els bacteris en fred, posteriorment es sotmeten a un xoc ràpid de calor i finalment s'incuben amb gel. Aquest protocol permet la incorporació del DNA a l'interior del bacteri.

Materials i Reactius

- Bacteris competents: *Escherichia coli* X-Blue
- Plasmidi o producte de lligació
- Medi líquid Luria-Broth (LB) estèril
- Plaques Agar-LB suplementades amb l'antibiòtic ampil·lina (30µg/mL) o kanamicina (100µg/mL). Al medi LB líquid se li afegeix un 1.5% d'agar bacterià americà, s'autoclava i un cop la temperatura disminueix a 60°C, s'afegeix l'antibiòtic. El medi obtingut es reparteix entre les plaques i es deixa solidificar. Es conserva a 4°C fins la seva utilització.

Procediment

Es descongelen els bacteris competents en gel i es mesclen manualment entre 50-100µL de bacteris i 50-200ng de DNA provinent d'una mini o midi o 10µL si prové de la lligació i es deixa incubar 30 minuts en gel. Es realitza el xoc tèrmic a 42°C durant 1 minut i 42 segons i immediatament es recupera la temperatura en gel durant 2 minuts. S'afegeix 1mL de LB temperat a 37°C i s'incuba a 37°C en agitació durant 1 hora. Es centrifuguen a 3500rpm 5 minuts i es plaqueja el volum restant en una placa d'Agar-LB que contingui l'antibiòtic que correspongui segons la resistència que porti el vector per tal d'evitar el creixement d'aquelles colònies que no hagin incorporat el vector i s'incuba tota la nit a l'estufa a 37°C. L'endemà (amb un màxim d'un mes) es guarden les plaques a 4°C fins que es vulgui fer el creixement d'una colònia.

11.3 Aïllament de DNA plasmídic

Els protocols d'aïllament de DNA plasmídic poden classificar-se en relació a la quantitat i a la puresa del plasmidi que s'obté. Quan el protocol és ràpid però s'obté una quantitat petita i amb menor puresa del plasmidi, es denomina mini-prep. En canvi, quan s'obté una major quantitat i major puresa s'anomena midi o maxi-prep. El mètode es basa en lisi alcalina i una neutralització on s'eliminen totes les restes cel·lulars. El DNA s'uneix a una resina d'intercanvi iònic sota unes condicions òptimes i es realitzen diversos rentats per eliminar RNA, proteïnes i altres impureses per finalment eluir el DNA plasmídic.

Per obtenir una mini-prep es preparen 3mL de medi LB estèril suplementat amb l'antibiòtic (1:1000) adequat segons la resistència que porti el plasmidi que vulguem aïllar i una colònia de

bacteris i es deixa créixer en agitació tota la nit a 37°C. Al dia següent es realitza la purificació del DNA a partir d'un kit comercial *Wizard Plus SV Minipreps Purification Systems*® (Promega) seguint les indicacions del fabricant. En el cas de voler obtenir una midi-prep es necessita un major volum de cultiu bacterià, concretament es preparen 50µL de medi LB suplementat amb l'antibiòtic adient a una dilució 1:1000 i 150µL del cultiu bacterià provinent de l'inòcul per preparar la mini. En aquest cas s'utilitza el kit *NucleoBond midi-maxi-prep* (Cultek) seguint les indicacions del fabricant.

11.4 Preparació i aïllament dels inserts i vectors necessaris

11.4.1 Elecció de les dianes de restricció

És molt important fer una correcta elecció de les dianes de restricció amb les quals es subclonará l'insert d'interès, per fer-ho s'han de tenir presents una sèrie de consideracions. En primer lloc, s'han d'escollir dos enzims diferents, un per cada extrem de l'insert i el tipus de tall que facin ha de generar extrems cohesius entre el plasmidi i l'insert de manera que es redueixi la possibilitat de recircularització. S'escull una de les dianes incloses en el *multicloning site* del vector però s'ha de tenir en compte que els enzims de restricció escollits no tinguin una diana al mig de la seqüència de l'insert, ja que al ser així la seqüència d'interès quedaria tallada. Per trobar els enzims adequats per digerir els vectors i els inserts s'ha utilitzat un programa informàtic anomenat *NEBcutter V2*, de la casa comercial *New England Biolabs*, el qual permet fer simulacions de les digestions del vector i insert d'interès. Els vectors utilitzats en aquesta tesi així com els enzims de restricció utilitzats per subclonar els plasmidis d'interès han estat els següents:

- **pcDNA3.1(+)**: 5.4Kb i resistència a ampil·lina.
- **pcDNA 3.1 (+) C-HA** de GenScript: 5.5Kb, dianes escollides NheI i XhoI, resistència a ampil·lina i conté el *tag* HA incorporat al vector situat a l'extrem C-terminal.
- **pEYFP-N1 i C1** de Clontech: 4.7Kb, resistència a kanamicina i conté el *tag Yellow Fluorescent Protein* (YFP) incorporat al vector a l'extrem C o N-terminal de la proteïna, pEYFP-N1 o C1.
- **pBlueScript SK II**: 3kb i resistència a ampil·lina.

11.4.2 Digestió dels fragments de DNA amb endonucleases

La digestió del DNA es realitza amb endonucleases, uns enzims sintetitzats per bacteris com a defensa per degradar material genètic estrany que entri en aquests microorganismes. La biologia molecular utilitza aquestes eines que ens permeten realitzar modificacions a la molècula de DNA.

Materials i mètodes

Materials i Reactius

- Enzims de restricció (2-12U/ μ L) de Promega o Roche
- Tampó de reacció 10x
- Incubador a 37°C
- DNA

Procediment

Hi ha molts factors que s'han de tenir en compte quan es vol aconseguir una digestió per endonucleases òptima. A continuació es detallen alguns consells per aconseguir un màxim rendiment d'aquestes digestions.

- Enzim: es troba en una solució que conté glicerol i es conserva a -20°C. És important mantenir els enzims a aquesta temperatura. En general, es recomana entre 5-10 unitats d'enzim per 1 μ g de DNA. La fosfatasa alcalina, que s'afegeix només en les reaccions de digestió del vector per evitar l'autolligació d'aquest, una unitat d'aquest enzim defosforila 1 μ g de vector. Així només es podrà lligar el vector amb l'insert que tindrà el grup fosfat.
- DNA: és necessari que sigui de doble cadena i lliure de contaminants com: fenol, cloroform, alcohol, EDTA, detergents o sals. La quantitat dependrà de la finalitat de l'experiment, 5-10 μ g (lligació) o 200ng (per comprovar el patró de bandes), per exemple. S'ha de tenir en compte l'estat de metilació del DNA ja que pot impedir la digestió amb determinats enzims.
- Tampó: la casa comercial indica l'eficiència de cada enzim amb els tampons. En les doble digestions, s'ha d'escollir el tampó adequat que maximitzi l'activitat de cadascun d'ells. Si no es pot, es fa una digestió seqüencial. La concentració del tampó sempre ha d'estar al 1x.
- Volum de reacció: s'ha d'intentar minimitzar al màxim, una reacció de 50 μ L és la recomanada per digerir 1 μ g de DNA. El volum de l'enzim no pot superar el 10% del volum total de reacció per evitar la seva inhibició per un excés de glicerol.
- Temps d'incubació: és d'una hora, però es pot augmentar o disminuir depenent de la quantitat d'enzim i/o de DNA. Pel que fa la temperatura és depenent de cada endonucleasa, típicament la seva temperatura òptima és a 37°C, però hi ha algunes que s'han d'incubar a 25°C.

11.4.3 Purificació del DNA

Després de la reacció de PCR o de la digestió és necessari separar els fragments de DNA en un gel d'agarosa no desnaturalitzant tal i com s'ha descrit a l'apartat 9.3.2, amb l'objectiu d'identificar-los i poder-los purificar. La purificació es pot realitzar de dues maneres, directament des de el producte de PCR obtingut o amb un gel d'agarosa. Els dos mètodes són vàlids, però si en el producte de PCR apareix alguna banda inespecífica, l'única opció per purificar

el DNA és mitjançant un gel d'agarosa ja que el protocol per purificar per columna requereix que el producte obtingut contingui només la banda esperada.

Purificació per columna

Es pot purificar aquest producte utilitzant el kit *DNA Clean and Concentrator* (ZymoResearch). aquest kit permet purificar fragments entre 50pb i 23kb.

Purificació per gel d'agarosa

Es realitza un gel d'agarosa, amb tampó TAE al 1x ja que l'eficiència de recuperació del DNA és més elevada. Es carrega al gel tot el volum que tinguem del producte d'amplificació de la PCR o de la digestió i s'inicia l'electroforesi a 75mV durant el temps necessari perquè se separin bé les bandes. Mitjançant un transil·luminador de llum UV es localitza la banda i es retalla amb un bisturí. Finalment es purifica la banda tallada amb el kit comercial *Qiaquick Gel Extraction Kit* (Qiagen), que permet purificar fragments entre 70pb i 10kb.

11.4.6 Lligació de fragments de DNA

Tant l'insert de DNA com el vector han d'haver estat digerits prèviament per tal de generar uns extrems compatibles al DNA i d'aquesta manera poder-los lligar mitjançant la DNA lligasa T4, enzim que catalitza la formació dels enllaços fosfodièster covalents entre els grups 5'-fosfat i 3'-hidroxil dels nucleòtids adjacents. És recomanable provar diferents relacions molars entre el vector i l'insert per tal de trobar la relació la qual és més eficient perquè es produeixi la lligació. Normalment es lliga un vector amb un insert, i s'utilitzen 50ng de vector de referència i s'afegeix la quantitat d'insert seguint la següent relació: $\text{ng insert} = \text{ng vector} * (\text{kb insert}/\text{kbvector})$.

Materials i Reactius

- Vector
- Insert
- 0.5µL de T4 DNA lligasa (Promega) Ekaitz:3U/µL
- 1µL de tampó 10x (Promega)
- Volum final 10µL amb aigua estèril
- Termociclador

Procediment

És recomanable reduir al màxim el volum final (màxim 10µL). La quantitat de vector s'ha fixat a 50ng, segons el vector això pot variar. A partir d'aquesta quantitat de vector i amb la relació anterior es calcula la quantitat d'insert de DNA necessari per cada condició. S'afegeix el volum del tampó de lligació 10x corresponent i finalment 0.5µL de la T4 DNA lligasa. Segons el tipus d'extrems que cal lligar, s'incuben 2h a temperatura ambient o tota la nit a 4°C.

12 Estadística i representació de dades

Els càlculs necessaris a l'hora d'interpretar els resultats obtinguts al llarg d'aquesta tesi s'han realitzat mitjançant l'ús del full de càlcul del programa informàtic Microsoft Excel 2013. Mentre que, la representació de dades gràfica i els tests estadístics utilitzats en el posterior anàlisi es van efectuar amb el suport tècnic del programa Graph Pad Prism 4.0®.

Rutinàriament, dins de cada experiment s'ha treballat amb duplicats o triplicats a excepció de les mesures de transport en les que cada condició és el resultat de quatre mesures independents. El nombre de rèpliques experimentals s'indica en cada cas.

Els resultats presents ens aquesta memòria estan expressats com a la mitjana i l'error estàndard associat de n experiments. Les diferències estadístiques s'han mesurat utilitzant el test de la t de Student, mitjançant el qual es pot calcular el valor de la probabilitat p d'error que existeix quan s'afirma que dos grups experimentals són diferents [$p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***)]

BIBLIOGRAFIA



A

Abdulla P and Coe IR (2007). Characterization and functional analysis of the promoter for the human equilibrative nucleoside transporter gene, hENT1. *Nucleosides, nucleotides and nucleic acids*, 26 (1): 99-110.

Allard B, Beavis PA, Darcy PK and Stagg J (2016). Immunosuppressive activities of adenosine in cancer. *Current opinion in pharmacology*, 29: 7-16 doi: 10.1016/j.coph.2016.04.001.

Allard D, Allard B, Gaudreau PO, Chrobak P and Stagg J (2016). CD73-adenosine: a next-generation target in immuno-oncology. *Immunotherapy*, 8 (2): 145-163 doi: 10.2217/imt.15.106.

An S, Kumar R, Sheets ED and Benkovic SJ (2008). Reversible compartmentalization of de novo purine biosynthetic complexes in living cells. *Science*, 320: 103-106.

Andres CM and Fox IH (1979). Purification and properties of human placental adenosine kinase. *The journal of biological chemistry*, 254 (22): 11388-11393.

Antonioli L, Blandizzi C, Pacher P and Haskó G (2013). Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nature reviews. Cancer*, 13 (12): 842-857 doi: 10.1038/nrc3613.

Arastu-Kapur S, Arendt CS, Purnat T, Carter NS and Ullman B (2005). Second-site suppression of a non-functional mutation within the *Leishmania donovani* inosine-guanosine transporter. *The journal of biological chemistry*, 280 (3): 2213-2219.

Arimany-Nardi C, Errasti-Murugarren E, Minuesa G, Martinez-Picado J, Gorboulev V, Koepsell H and Pastor-Anglada M (2014). Nucleoside transporters and human organic cation transporter 1 determine the cellular handling of DNA-methyltransferase inhibitors. *British journal of pharmacology*, 171 (16): 3868-3880.

Arimany-Nardi C, Minuesa G, Keller T, Erkizia I, Koepsell H, Martinez-Picado J and Pastor-Anglada M (2016). Role of human organic cation transporter 1 (hOCT1) polymorphisms in lamivudine (3TC) uptake and drug-drug interactions. *Frontiers in pharmacology*, 7: 175 doi: 10.3389/fphar.2016.00175.

Arimany-Nardi C, Claudio-Montero A, Viel-Oliva A, Schmidtke P, Estarellas C, Barril X, Bidon-Chanal A and Pastor-Anglada P (2017). Identification and characterization of a secondary sodium-binding site and the main selectivity determinants in the human concentrative nucleoside transporter 3. *Molecular pharmaceutics*, 14: 1980-1987.

Arnér ES and Eriksson S (1995). Mammalian deoxyribonucleoside kinases. *Pharmacology and therapeutics*, 67 (2): 155-186.

Atiakshin D, Buchwalow I, SamoiloVA V and Tiemann M (2018). Tryptase as a polyfunctional component of mast cell. *Histochemistry and cell biology*, 149 (5): 461-477 doi: 10.1007/s00418-018-1659-8.

Austin WR, Armijo AL, Campbell DO, Singh AS, Hsieh T, Nathanson D, Herschman HR, Phelps ME, Witte ON, Czernin J and Radu CG (2012). Nucleoside salvage pathway kinases regulate

Bibliografia

hematopoiesis by linking nucleotide metabolism with replication stress. *The journal of experimental medicine*, 209 (12): 2215-2228.

Axelrad JE, Lichtiger S and Yajnik (2016). Inflammatory bowel disease and cancer: The role of inflammation, immunosuppression, and cancer treatment. *World journal of gastroenterology*, 22 (20): 4794-4801 doi: 10.3748/wjg.v22.i20.4794.

Aymerich I, Pastor-Anglada M and Casado FJ (2004). Long term endocrine regulation of nucleoside transporters in rat intestinal epithelial cells. *The journal of general physiology*, 124 (5): 505-512.

Aymerich I, Foufelle F, Farré P, Casado FJ and Pastor-Anglada M (2006). Extracellular adenosine activates AMP-dependent protein kinase (AMPK). *Journal of cell science*, 119 (8): 1612-1621.

B

Badagnani I, Chan W, Castro RA, Brett CM, Huang CC, Stryke D, Kawamoto M, Johns SJ, Ferrin TE, Carlson EJ, Burchard EG and Giacomini KM (2005). Functional analysis of genetic variants in the human concentrative nucleoside transporter 3 (CNT3, SLC28A3). *The pharmacogenomics journal*, 5 (3): 157-165.

Baldwin SA, Beal PR, Yao SY, King AE, Cass CE and Young JD (2004). The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *European journal of biochemistry*, 447: 735-743.

Baldwin SA, Yao SY, Hyde RJ, Ng AM, Foppolo KB, Ritzel MW, Cass CE and Young JD (2005). Functional characterization of novel human and mouse equilibrative nucleoside transporters (hENT3 and mENT3) located in intracellular membranes. *The journal of biological chemistry*, 280 (16): 15880-15887.

Bär F, Sina C and Fellermann K (2013). Thiopurines in inflammatory bowel disease revisited. *World journal of gastroenterology*, 19 (11): 1699-1706.

Bardeleben C, Sharma S, Reeve JR, Bassilian S, Frost P, Hoang B, Shi Y and Lichtenstein A (2013). Metabolomics identifies pyrimidine starvation as the mechanism of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -ribose-induced apoptosis in multiple myeloma cells. *Molecular cancer therapeutics*, 12 (7): 1310-1321 doi: 10.1158/1535-7163.

Barfeld SJ, Fazli L, Persson M, Marjavaara L, Urbanucci A, Kaukoniemi KM, Rennie PS, Ceder Y, Chabes A, Visakorpi T and Mills IG (2015). Myc-dependent purine biosynthesis affects nucleolar stress and therapy response in prostate cancer. *Oncotarget*, 6 (14): 12587- 12602.

Barnes K, Dobrzynski H, Foppolo S, Beal PR, Ismat F, Scullion ER, Sun L, Tellez J, Ritzel MW, Claycomb WC, Cass CE, Young JD, Billeter-Clark R, Boyett MR and Baldwin SA (2006). Distribution and functional characterization of equilibrative nucleoside transporter-4, a novel cardiac adenosine transporter activated at acidic pH. *Circulation research*, 99: 510-519

Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, Gitt MA, Hirabayashi J, Hughes C, Kasai K, Leffler H, Liu FT, Lotan R, Mercurio M, Monsigny M, Poirer SP, Raz A, Rigby PW, Rini JM and Wang JL (1994). Galectins: a family of animal β -galactoside-binding lectins. *Cell*, 76 (4): 597-598.

- Baumann P, Mandl-Weber S, Emmerich B, Straka C and Schmidmaier R (2007). Activation of adenosine monophosphate activated protein kinase inhibits growth of multiple myeloma cells. *Experimental cell research*, 313 (16): 3592-3603.
- Belenky PA, Moga TG and Brenner C (2008). *Saccharomyces cerevisiae* YOR071C encodes the high affinity nicotinamide riboside transporter Nrt1. *The journal of biological chemistry*, 283 (13): 8075-8079 doi: 10.1074/jbc.C800021200.
- Bellosillo B, Dalmau M, Colomer D and Gil J (1997). Involvement of CED-3/ICE proteases in the apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, 89 (9): 3378-3384.
- Ben-Shem A, Jenner L, Yusupova G and Yusupov M (2010). Crystal structure of the eukaryotic ribosome. *Science*, 330 (6008): 1203-1209 doi: 10.1126/science.1194294.
- Benz R (1994). Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins. *Biochimica et biophysica acta*, 1197 (2): 167-196.
- Bester AC, Roniger M, Oren YS, Im MM, Sarni D, Chaoat M, Bensimon A, Zamir G, Shewach DS and Kerem B (2011). Nucleotide deficiency promotes genomic instability in early stages of cancer development. *Cell*, 145: 435-446.
- Bhutia YD, Hung SW, Patel B, Lovin D and Govindarajan R (2011). CNT1 expression influences proliferation and chemosensitivity in drug-resistant pancreatic cancer cells. *Cancer research*, 71 (5): 1825-1835 doi: 10.1158/0008-5472.
- Bicket A and Coe IR (2016). N-linked glycosylation of N48 is required for equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) function. *Bioscience reports*, 36 (4): e00376.
- Bicket A, Mehrabi P, Naydenova Z, Wong V, Donaldson L, Stagljar I and Coe IR (2016). Novel regulation of equilibrative nucleoside transporter (ENT1) by receptor-stimulated Ca²⁺-dependent calmodulin binding. *American journal of physiology. Cell physiology*, 310 (10): C808-820 doi: 10.1152/ajpcell.00243.2015.
- Blázquez C, Geelen MJ, Velasco G and Guzmán M (2001). The AMP-activated protein kinase prevents ceramide synthesis de novo and apoptosis in astrocytes. *FEBS letters*, 489 (2-3): 149-153.
- Blom N, Sicheritz-Pontén T, Gupta R, Gammeltoft S and Brunak S (2004). Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*, 4 (6): 1633-1649.
- Boison D, Scheurer L, Zumsteg V, Rüllicke T, Litynski P, Fowler B, Brandner S and Mohler H (2002). Neonatal hepatic steatosis by disruption of the adenosine kinase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 99 (10): 6985-6990.
- Boison D (2010). Inhibitory RNA in epilepsy: Research tool and therapeutic perspectives. *Epilepsia*, 51 (9): 1659–1668 doi:10.1111/j.1528-1167.2010.02672.x.
- Boison D (2013). Adenosine kinase: exploitation for therapeutic gain. *Pharmacological reviews*, 65 (3): 906-943 doi: 10.1124/pr.112.006361.

Bibliografia

Bone DB, Robillard KR, Stolk M and Hammond JR (2007). Differential regulation of mouse equilibrative nucleoside transporter 1 (mENT1) splice variants by protein kinase CK2. *Molecular membrane biology*, 24 (4): 294-303.

Borea PA, Gessi S, Merighi S and Varani K (2016). Adenosine as a multi- signalling guardian angel in human diseases: When, where and how does it exert its protective effects?. *Trends in pharmacological sciences*, 37 (6): 419-434 doi: 10.1016/j.tips.2016.02.006.

Bulter T and Elling L (1999). Enzymatic synthesis of nucleotide sugars. *Glycoconjugate journal*, 16: 147-159.

Burnstock G (1997). The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. *Neuropharmacology*, 36 (9): 1127-1139.

C

Camby I, Le Mercier M, Lefranc F and Kiss R (2006). Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology*, 16 (11): 137R-157R.

Campàs C, Lopez JM, Santidrián AF, Barragán M, Bellosillo B, Colomer D and Gil J (2003). Acadesine activates AMPK and induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells but not in T lymphocytes. *Blood*, 101 (9): 3674-3680.

Campàs C, Santidrián AF, Domingo A and Gil J (2005). Acadesine induces apoptosis in B cells from mantle cell lymphoma and splenic marginal zone lymphoma. *Leukemia*, 19 (2): 292-294.

Cansev M (2006). Uridine and cytidine in the brain: their transport and utilization. *Brain research reviews*, 52 (2): 389-397.

Cantor JR and Sabatini DM (2012). Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. *American association for cancer research*, 2 (10): 881-898 doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0345.

Carnrot, Cecilia (2006). Molecular characterization of thymidine kinase and thymidylate kinase in *Ureaplasma urealyticum* and *Bacillus anthracis*; implications for antibacterial therapy. Tesi Doctoral, Swedish University of Agricultural Sciences.

Carrera CJ, Piro LD, Saven A, Beutler E, Terai C and Carson DA (1991). 2-Chlorodeoxyadenosine chemotherapy triggers programmed cell death in normal and malignant lymphocytes. *Advances in experimental medicine and biology*, 309A: 15-18.

Carson DA, Wasson DB, Esparza LM, Carrera CJ, Kipps TJ and Cottam HB (1992). Oral antilymphocyte activity and induction of apoptosis by 2-chloro-2'-arabino-fluoro-2'-deoxyadenosine. *Proceedings of the national academy of sciences of the USA*, 89 (7): 2970-2974.

Castillon GA, Michon L and Watanabe R (2013). Apical sorting of lysoGPI-anchored proteins occurs independent of association with detergent-resistant membranes but dependent on their N-glycosylation. *Molecular biology of the cell*, 24 (12): 2021-2033 doi: 10.1091/mbc.E13-03-0160.

Caviedes Cárdenas, Liska (2018). Proteína multifuncional ADE2 como nexo entre vías de recuperación y síntesis *de novo* de nucleótidos. Tesi Doctoral, Universitat de Barcelona.

Ceschin J, Saint-Marc C, Laporte J, Labriet A, Philippe C, Moenner M, Daignan-Fornier B and Pinson B (2014). Identification of yeast and human 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAr) transporters. *The Journal of biological chemistry*, 289 (24): 16844-16854 doi: 10.1074/jbc.M114.551192.

Chakravarthi B, Goswami MT, Pathi SS, Dodson M, Chandrashekar DS, Agarwal S, Nepal S, Balasubramanya AH, Siddiqui J, Lonigro RJ, Chinnaiyan AM, Kunju LP, Palanisamy N and Varambally S (2016). Expression and role of PAICS, a *de novo* purine biosynthetic gene in prostate cancer. *The prostate*, 1-12.

Chan CY, Zhao H, Pugh RJ, Pedley AM, French J, Jones SA, Zhuang X, Jinnah H, Huang TJ and Benkovic SJ (2014). Purinosome formation as a function of the cell cycle. *PNAS*, 112 (5): 1368-1373.

Chaudary N, Naydenova Z, Shuralyova I and Coe IR (2004a). The adenosine transporter, mENT1, is a target for adenosine receptor signalling and protein kinase C ϵ in hypoxic and pharmacological preconditioning in the mouse cardiomyocyte cell line, HL-1. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 310 (3): 1190-1198.

Chaudary N, Naydenova Z, Shuralyova I and Coe IR (2004b). Hypoxia regulates the adenosine transporter, mENT1, in the murine cardiomyocyte cell line, HL-1. *Cardiovascular research*, 61 (4): 780-788.

Che M, Ortiz DF and Arias IM (1995). Primary structure and functional expression of a cDNA encoding bile canalicular, purine-specific Na⁺-nucleoside cotransporter. *The journal of biological chemistry*, 270 (23): 13596-13599.

Chen KC, Vannais DB, Jones C, Patterson D and Davidson JN (1989). Mapping of the gene encoding the multifunctional protein carrying out the first three steps of pyrimidine biosynthesis to human chromosome 2. *Human genetics*, 82: 40-44.

Choi DS, Handa M, Young H, Gordon AS, Diamond I and Messing RO (2000). Genomic organization and expression of the mouse equilibrative, nitrobenzylthioinosine-sensitive nucleoside transporter 1 (ENT1) gene. *Biochemical and biophysical research communications*, 277 (1): 200-208.

Choi DS, Cascini MG, Mailliard W, Young H, Paredes P, McMahon T, Diamond I, Bonci A and Messing RO (2004). The type 1 equilibrative nucleoside transporter regulates ethanol intoxication and preference. *Nature neuroscience*, 7 (8): 855-861.

Chu S, Xiong W, Zhang D, Soylyu H, Sun C, Albensi BC and Parkinson FE (2013). Regulation of adenosine levels during cerebral ischemia. *Acta pharmacologica Sinica*, 34 (1): 60-66.

Ciarimboli G (2008). Organic cation transporters. *Xenobiotica*, 38 (7-8): 936-971 doi: 10.1080/00498250701882482.

Clarke ML, Damaraju VL, Zhang J, Mowles D, Tackaberry T, Lang T, Smith KM, Young JD, Tomkinson B and Cass CE (2006). The role of human nucleoside transporters in cellular uptake of 4'-thio- β -D-arabinofuranosylcytosine and β -D-arabinosylcytosine. *Molecular pharmacology*, 70 (1): 303-310.

Bibliografia

Conklin LS, Cuffari C, Okazaki T, Miao Y, Saatian B, Chen TE, Tse M, Brant SR and LiX (2012). 6-Mercaptopurine transport in human lymphocytes: correlation with drug-induced cytotoxicity. *Journal of digestive diseases*, 13 (2): 82-93.

Conrad M, Schothorst J, Kankipati HN, Van Zeebroeck G, Rubio-Teixeira M and Thevelein JM (2014). Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology reviews*, 38 (2): 254-299 doi: 10.1111/1574-6976.12065.

Coothankandaswamy V, Elangovan S, Singh N, Prasad PD, Thangaraju M and Ganapathy V (2013). The plasma membrane transporter SLC5A8 suppresses tumour progression through depletion of surviving without involving its transport function. *The biochemical journal*, 450 (1): 169-178 doi: 10.1042/BJ20121248.

Corton JM, Gillespie JG, Hawley SA and Hardie DG (1995). 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells?. *European journal of biochemistry*, 229 (2): 558-565.

Craig JE, Zhang Y and Gallagher MP (1994). Cloning of the nupC gene of *Escherichia coli* encoding a nucleoside transport system, and identification of an adjacent insertion element, IS 186. *Molecular microbiology*, 11 (6): 1159-1168.

Crawford CR, Patel DH, Naeve C and Belt JA (1998). Cloning of the human equilibrative, nitrobenzylmercaptapurine riboside (NBMPR)-insensitive nucleoside transporter ei by functional expression in a transport-deficient cell line. *The journal of biological chemistry*, 273 (9): 5288-5293.

Cronstein BN, Montesinos MC and Weissmann G (1999). Sites of action for future therapy: an adenosine-dependent mechanism by which aspirin retains its antiinflammatory activity in cyclooxygenase-2 and NFκB knockout mice. *Osteoarthritis and cartilage*, 7 (4): 361-363.

Cui L, Rajasekariah GR and Martin SK (2001). A nonspecific nucleoside hydrolase from *Leishmania donovani*: implications for purine salvage by the parasite. *Gene. An international journal on genes and genomes*, 280: 153-162.

Cui XA, Singh B, Park J and Gupta RS (2009). Subcellular localization of adenosine kinase in mammalian cells: The long isoform of ADK is localized in the nucleus. *Biochemical and biophysical research communications*, 388 (1): 46-50 doi: 10.1016/j.bbrc.2009.07.106.

Cui XA, Agarwal T, Singh B and Gupta RS (2011). Molecular characterization of Chinese hamster cells mutants affected in adenosine kinase and showing novel genetic and biochemical characteristics. *BMC biochemistry*, 12: 22 doi: 10.1186/1471-2091-12-22.

D

Damaraju S, Zhang J, Visser F, Tackaberry T, Dufour J, Smith KM, Slugoski M, Ritzel MW, Baldwin SA, Young JD and Cass CE (2005). Identification and functional characterization of variants in human concentrative nucleoside transporter 3, hCNT3 (SLC28A3), arising from single nucleotide polymorphisms in coding regions of the hCNT3 gene. *Pharmacogenetics and genomics*, 15 (3): 173-182.

De Clercq E and Holý A (2005). Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs. *Nature reviews. Drug discovery*, 4 (11): 928-940.

De Pinto V, Messina A, Lane DJ and Lawen A (2010). Voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) in the plasma membrane. *FEBS letters*, 584 (9): 1793-9 doi: 10.1016/j.febslet.2010.02.049.

Deckx S, Heymans S and Papageorgiou AP (2016). The diverse functions of osteoglycin: a deceitful dwarf, or a master regulator of disease?. *FASEB journal*, 30 (8): 2651-2661 doi: 10.1096/fj.201500096R.

Del Santo B, Valdés R, Mata J, Felipe A, Casado FJ and Pastor-Anglada M (1998). Differential expression and regulation of nucleoside transport systems in rat liver parenchymal and hepatoma cells. *Hepatology*, 28 (6): 1504-1511.

Del Santo B, Tarafa G, Felipe A, Casado FJ and Pastor-Anglada M (2001). Developmental regulation of the concentrative nucleoside transporter CNT1 and CNT2 in rat liver. *Journal of hepatology*, 34 (6): 873-880.

Delacour D, Gouyer V, Leteurtre E, Ait-Slimane T, Drobecq H, Lenoir C, Moreau-Hannedouche O, Trugnan G and Huet G (2003). 1-benzyl-2-acetamido-2-deoxy-alpha-D-galactopyranoside blocks the apical biosynthetic pathway in polarized HT-29 cells. *The journal of biological chemistry*, 278 (39): 37799-37809.

Delacour D, Gouyer V, Zanetta JP, Drobecq H, Leteurtre E, Grard G, Moreau-Hannedouche O, Maes E, Pons A, André S, Le Bivic A, Gabius HJ, Manninen A, Simons K and Huet G (2005). Galectin-4 and sulfatides in apical membrane trafficking in enterocyte-like cells. *The journal of cell biology*, 169 (3): 491-501.

Delacour D, Koch A and Jacob R (2009). The role of galectins in protein trafficking. *Traffic*, 10 (10): 1405-1413 doi: 10.1111/j.1600-0854.2009.00960.x.

Diallinas G (2017). Transceptors as a functional link of transporters and receptors. *Microbial cell*, 4 (3): 69-73 doi: 10.15698/mic2017.03.560.

Didion T, Regenber B, Jorgensen MU, Kielland-Brandt MC and Andersen HA (1998). The permease homologue Ssy1p controls the expression of amino acid and peptide transporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology*, 27 (3): 643-650.

Diez-Sampedro A, Hirayama BA, Osswald C, Gorboulev V, Baumgarten K, Volk C, Wright EM and Koepsell H (2003). A glucose sensor hiding in a family of transporters. *Proceedings of the national academy of sciences of the USA*, 100 (20): 11753-11758.

Doehring A, Hofmann WP, Schlecker C, Zeuzem S, Sarrazin C, Berg T, Müller T, Hermann E, Geisslinger G and Lötsch J (2011). Role of nucleoside transporters SLC28A2/3 and SLC29A1/2 genetics in ribavirin therapy: protection against anemia in patients with chronic hepatitis C. *Pharmacogenetics and genomics*, 21 (5): 289-296.

Donaton MC, Holsbeeks I, Lagatie O, Van Zeebroeck G, Crauwels M, Winderickx J and Thevelein JM (2003). The Gap1 general amino acid permease acts as an amino acid sensor for activation of protein kinase A targets in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology*, 50 (3): 911-929.

Bibliografia

Dos Santos-Rodrigues A, Grañé-Boladeras N, Bicket A and Coe IR (2014). Nucleoside transporters in the purinome. *Neurochemistry international*, 73 (1): 229-237.

Dragan Y, Valdés R, Gomez-Angelats M, Felipe A, Casado FJ, Pitot H and Pastor-Anglada M (2000). Selective loss of nucleoside carrier expression in rat hepatocarcinomas. *Hepatology*, 32 (2): 239-246.

Drew BG and Kingwell BA (2008). Acadesine, an adenosine-regulating agent with the potential for widespread indications. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 9 (12): 2137-2144 doi: 10.1517/14656566.9.12.2137.

Duflot S, Calvo M, Casado FJ, Enrich C and Pastor-Anglada M (2002). Concentrative nucleoside transporter (rCNT1) is targeted to the apical membrane through the hepatic transcytotic pathway. *Experimental cell research*, 281 (1): 77-85.

Duflot S, Riera B, Fernández-Veledo S, Casadó V, Norman RI, Casado FJ, Lluís C, Franco R and Pastor-Anglada M (2004). ATP-sensitive K(+) channels regulate the concentrative adenosine transporter CNT2 following activation by A(1) adenosine receptors. *Molecular and cellular biology*, 24 (7): 2710-2719 doi: 10.1128/MCB.24.7.2710-2719.2004.

Durante P, Gueuning MA, Darville MI, Hue L and Rousseau GG (1999). Apoptosis induced by growth factor withdrawal in fibroblasts overproducing fructose 2,6-bisphosphate. *FEBS letters*, 448 (2-3): 239-243.

E

Elad-Sfadia G, Haklai R, Ballan E, Gabius HJ and Kloog Y (2002). Galectin-1 augments Ras activation and diverts Ras signals to Raf-1 at the expense of phosphoinositide 3-kinase. *The journal of biological chemistry*, 277 (40): 37169-37175.

Elter T, Hallek M and Engert A (2006). Fludarabine in chronic lymphocytic leukaemia. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 7 (12): 1641-1651.

Eltzschig HK, Abdulla P, Hoffman E, Hamilton KE, Daniels D, Schönfeld C, Löffler M, Reyes G, Duszenko M, Karhausen J, Robinson A, Westerman KA, Coe IR and Colgan SP (2005). HIF-1-dependent repression of equilibrative nucleoside transporter (ENT) in hypoxia. *The Journal of experimental medicine*, 202 (11): 1493-1505.

Elwi AN, Damaraju VL, Baldwin SA, Young JD, Sawyer MB and Cass CE (2006). Renal nucleoside transporters: physiological and clinical implications. *Biochemistry and cell biology*, 84 (6): 844-858.

Endo Y, Obata T, Murata D, Iti M, Sakamoto K, Fukushima M, Yamasaki Y, Yamada Y, Natsume N and Sasaki T (2007). Cellular localization and functional characterization of the equilibrative nucleoside transporters of antitumor nucleosides. *Cancer science*, 98 (10): 1633-1637.

Endres CJ, SenGupta DJ and Unadkat JD (2004). Mutation of leucine-92 selectively reduces the apparent affinity of inosine, guanosine, NBMPR [⁵S⁶-(4-nitrobenzyl)-mercaptapurine riboside] and dilazep for the human equilibrative nucleoside transporter, hENT1. *The biochemical journal*, 380 (1): 131-137.

Endres CJ and Unadkat JD (2005). Residues Met89 and Ser160 in the human equilibrative nucleoside transporter 1 affect its affinity for adenosine, guanosine, S⁶-(4-nitrobenzyl)-mercaptapurine riboside, and dipyridamole. *Molecular pharmacology*, 67 (3): 837-844.

Engel K, Zhou M and Wang J (2004). Identification and characterization of a novel monoamine transporter in the human brain. *The journal of biological chemistry*, 279 (48): 50042-50049.

Engel K and Wang J (2005). Interaction of organic cations with a newly identified plasma membrane monoamine transporter. *Molecular pharmacology*, 68 (5): 1397-1407.

Erpapazoglou Z, Froissard M, Nondier I, Lesuisse E, Haguenaer-Tsapis R and Belgareh-Touzé N (2008). Substrate- and ubiquitin-dependent trafficking of the yeast siderophore transporter Sit1. *Traffic*, 9 (8): 1372-1391 doi: 10.1111/j.1600-0854.2008.00766.x.

Errasti-Murugarren E, Pastor-Anglada M and Casado FJ (2007). Role of hCNT3 in the transepithelial flux of nucleosides and nucleosides-derived drugs. *The journal of physiology*, 582 (3): 1249-1260.

Errasti-Murugarren E, Cano-Soldado P, Pastor-Anglada M and Casado FJ (2008). Functional characterization of a nucleoside-derived drug transporter variant (hCNT3_{C602R}) showing altered sodium-binding capacity. *Molecular pharmacology*, 73 (2): 379-386.

Errasti-Murugarren E, Molina-Arcas M, Casado FJ and Pastor-Anglada (2009). A splice variant of the SLC28A3 gene encodes a novel human concentrative nucleoside transporter-3 (hCNT3) protein localized in the endoplasmic reticulum. *The faseb journal*, 23 (1): 172-182.

Errasti-Murugarren E and Pastor-Anglada M (2010). Drug transporter pharmacogenetics in nucleoside-based therapies. *Pharmacogenomics*, 11 (6): 809-841.

Errasti-Murugarren E, Casado FJ and Pastor-Anglada M (2010a). Different N-terminal motifs determine plasma membrane targeting of the human concentrative nucleoside transporter 3 in polarized and nonpolarized cells. *Molecular pharmacology*, 78: 795-803.

Errasti-Murugarren E, Molina-Arcas M, Casado FJ and Pastor-Anglada M (2010b). The human concentrative nucleoside transporter-3 C602R variant shows impaired sorting to lipid rafts and altered specificity for nucleoside-derived drugs. *Molecular pharmacology*, 78 (2): 157-165.

Errasti-Murugarren E, Díaz P, Godoy V, Riquelme G and Pastor-Anglada (2011). Expression and distribution of nucleoside transporter proteins in the human syncytiotrophoblast. *Molecular pharmacology*, 80 (5): 809-817.

Errasti-Murugarren E, Fernández-Calotti P, Veyhl-Wichmann M, Diepold M, Pinilla-Macua I, Pérez-Torras S, Kipp H, Koepsell H and Pastor-Anglada M (2012). Role of the transporter regulator protein (RS1) in the modulation of concentrative nucleoside transporters (CNTs) in epithelia. *Molecular pharmacology*, 82 (1): 59-67.

F

Farías M, San Martín R, Puebla C, Pearson JD, Casado JF, Pastor-Anglada M, Casanello P and Sobrevia L (2006). Nitric oxide reduces adenosine transporter ENT1 gene (SLC29A1) promoter

Bibliografía

activity in human fetal endothelium from gestational diabetes. *Journal cellular of physiology*, 208 (2): 451-460

Farré X, Guillén-Gómez E, Sánchez L, Hardisson D, Plaza Y, Lloberas J, Casado FJ, Palacios J and Pastor-Anglada M (2004). Expression of the nucleoside-derived drug transporters hCNT1, hENT1 and hENT2 in gynecologic tumors. *International journal of cancer*, 112 (6): 959-966.

Felice MR, De Domenico I, Li L, Ward DM, Bartok B, Musi G and Kaplan J (2005). Post-transcriptional regulation of the yeast high affinity iron transport system. *The journal of biological chemistry*, 280 (23): 22181-22190.

Felipe A, Valdés R, del Santo B, Lloberas J, Casado FJ and Pastor-Anglada M (1998). Na⁺-dependent nucleoside transport in liver: two different isoforms from the same gene family are expressed in liver cells. *The biochemical journal*, 330: 997-1001.

Fernández-Calotti P and Pastor-Anglada M (2010). All-*trans*-retinoic acid promotes trafficking of human concentrative nucleoside transporter-3 (hCNT3) to the plasma membrane by a TGF- β 1-mediated mechanism. *The journal of biological chemistry*, 285 (18): 13589-13598.

Fernández-Calotti P, Lopez-Guerra M, Colomer D and Pastor-Anglada M (2012). Enhancement of fludarabine sensitivity by all-*trans*-retinoic acid in chronic lymphocytic leukemia cells. *Hematologica*, 97 (6): 943-951.

Fernández-Veledo S, Valdés R, Wallenius V, Casado FJ and Pastor-Anglada M (2004). Up-regulation of the high-affinity pyrimidine-preferring nucleoside transporter concentrative nucleoside transporter 1 by tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in liver parenchymal cells. *Journal of hepatology*, 41 (4): 538-544.

Fernández-Veledo S, Jover R, Casado FJ, Gómez-Lechón MJ and Pastor-Anglada M (2007). Transcription factors involved in the expression of SLC28 genes in human liver parenchymal cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 353 (2): 381-388.

Finkelstein JD and Martin JJ (1986). Methionine metabolism in mammals. *The journal of biological chemistry*, 261 (4): 1585-1587.

Flanagan SA and Meckling-Gill KA (1997). Characterization of a novel Na⁺-dependent, guanosine-specific, nitrobenzylthioinosine-sensitive transporter in acute promyelocytic leukemia cells. *The journal of biological chemistry*, 272 (29): 18026-18032.

Floyd EE and Jones ME (1985). Isolation and characterization of the orotidine 5'-monophosphate decarboxylase domain of the multifunctional protein uridine 5'-monophosphate synthase. *The journal of biological chemistry*, 260 (16): 9443-9451.

Forrest LR (2015). Structural symmetry in membrane proteins. *Annual review of biophysics*, 44: 311-337.

Forsberg H and Ljungdahl PO (2001). Sensors of extracellular nutrients in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics*, 40 (2): 91-109.

Fotoohi AK, Lindqvist M, Peterson C and Albertioni F (2006). Involvement of the concentrative nucleoside transporter 3 and equilibrative nucleoside transporter 2 in the resistance of T-

lymphoblastic cell lines to thiopurines. *Biochemical and biophysical research communications*, 343 (1): 208-215.

Fred Brewer C (2002). Binding and cross-linking properties of galectins. *Biochimica et biophysica acta*, 1572 (2-3): 255-262.

Frei P, Biedermann L, Nielsen OH and Rogler G (2013). Use of thiopurines in inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology*, 19 (7): 1040-1048.

Friedman AB, Sparrow MP and Gibson PR (2014). The role of thiopurine metabolites in inflammatory bowel disease and rheumatological disorders. *International journal of rheumatic diseases*, 17 (2): 132-141.

G

Galan JM, Moreau V, Andre B, Volland C and Haguenaer-Tsapis R (1996). Ubiquitination mediated by the Npi1p/Rsp5p ubiquitin-protein ligase is required for endocytosis of the yeast uracil permease. *The journal of biological chemistry*, 271 (18): 10946-10952.

Galmarini CM, Mackey JR and Dumontet C (2001). Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies. *Leukemia*, 15 (6): 875-890.

Gil A, Gómez-León C and Rueda R (2007). Exogenous nucleic acids and nucleotides are efficiently hydrolysed and taken up as nucleosides by intestinal explants from suckling piglets. *The British journal of nutrition*, 98 (2): 285-291.

Garcia-Gil M, Pesi R, Perna S, Allegrini S, Giannecchini M, Camici M and Tozzi MG (2003). 5'-aminoimidazole-4-carboxamide riboside induces apoptosis in human neuroblastoma cells. *Neuroscience*, 117(4): 811-820.

Garcia-Gil M, Bertini F, Pesi R, Voccoli V, Tozzi MG and Camici M (2006). 5'-Amino-4-imidazolecarboxamide riboside induces apoptosis in human neuroblastoma cells via the mitochondrial pathway. *Nucleosides, nucleotides and nucleic acids*, 25 (9-11): 1265-1270.

Gerich ME and McGovern DP (2014). Towards personalized care in IBD. *Nature reviews. Gastroenterology and hepatology*, 11 (5): 287-299 doi: 10.1038/nrgastro.2013.242.

Giovannetti E, Del Tacca M, Mey V, Funel N, Nannizzi S, Ricci S, Orlandini C, Boggi U, Campani D, Del Chiaro M, Lannopollo M, Bevilacqua G, Mosca F and Danesi R (2006). Transcription analysis of human equilibrative nucleoside transporter-1 predicts survival in pancreas cancer patients treated with gemcitabine. *Cancer research*, 66 (7): 3928-3935.

Gloeckner-Hofmann K, Guillén-Gómez E, Schmidtgen C, Porstmann R, Ziegler R, Stoss O, Casado FJ, Rüschoff J and Pastor-Anglada M (2006). Expression of the high-affinity fluoropyrimidine-preferring nucleoside transporter hCNT1 correlates with decreased disease-free survival in breast cancer. *Oncology*, 70 (3): 238-244.

Goberdan DC, Meredith D, Boyd CA and Wilson C (2005). PAT-related amino acid transporters regulate growth via a novel mechanism that does not require bulk transport of amino acids. *Development*, 132 (10): 2365-2375.

Bibliografia

Godoy V, Banales JM, Medina JF and Pastor-Anglada M (2014). Functional crosstalk between the adenosine transporter CNT3 and purinergic receptors in the biliary epithelia. *Journal of hepatology*, 61 (6): 1337-1343 doi: 10.1016/j.jhep.2014.06.036.

Gorraitz E, Pastor-Anglada M and Lostao MP (2010). Effects of Na⁺ and H⁺ on steady-state and presteady-state currents of the human concentrative nucleoside transporter 3 (hCNT3). *Pflügers Archiv: European journal of physiology*, 460 (3): 617-632 doi: 10.1007/s00424-010-0846-9.

Goswami MT, Chen G, Chakravarthi B, Pathi SS, Anand SK, Carskadon SL, Giordano TJ, Chinnaiyan AM, Thomas DG, Palanisamy N, Beer DG and Varambally S (2015). Role and regulation of coordinately expressed *de novo* purine biosynthetic enzymes PPAT and PAICS in lung cancer. *Oncotarget*, 6 (27): 23445-23461.

Govindarajan R, Bakken AH, Hudkins KL, Lai Y, Casado FJ, Pastor-Anglada M, Tse CM, Hayashi J and Unadkat JD (2007). In situ hybridization and immunolocalization of concentrative and equilibrative nucleoside transporters in the human intestine, liver, kidneys and placenta. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 293 (5): R1809-1822.

Govindarajan R, Endres CJ, Whittington D, LeCluyse E, Pastor-Anglada M, Tse CM and Unadkat JD (2008). Expression and hepatobiliary transport characteristics of the concentrative and equilibrative transporters in sandwich-cultured human hepatocytes. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 295 (3): G570-580.

Govindarajan R, Leung GP, Zhou M, Tse CM, Wang J and Unadkat JD (2009). Facilitated mitochondrial import of antiviral and anticancer nucleoside drugs by human equilibrative nucleoside transporter-3. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 296: G910-922.

Grañé-Boladeras, Natàlia (2012). Novel approaches to understanding hENT2 and hENT2-related proteins: from novel nuclear variants to global networks. Tesi doctoral, Universitat de Barcelona.

Grañé-Boladeras N, Spring CM, Hanna WJ, Pastor-Anglada M and Coe IR (2016). Novel nuclear hENT2 isoforms regulate cell cycle progression via controlling nucleoside transport and nuclear reservoir. *Cellular and molecular life sciences*, 73 (23): 4559-4575.

Grañé-Boladeras N, Williams D, Tarmakova K, Stevanovic K, Villani L, Mehrabi P, Siu KW, Pastor-Anglada M and Coe IR (2018). Oligomerization of equilibrative nucleoside transporters: a novel regulatory and functional mechanism involving PKC and PP1. *The FASEB journal*.

Gray JH, Owen RP and Giacomini KM (2004a). The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *European journal of physiology*, 447: 728-734.

Gray JH, Mangravite LM, Owen RP, Urban TJ, Chan W, Carlson EJ, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ, Stryke D, Ferrin TE and Giacomini KM (2004b). Functional and genetic diversity in the concentrative nucleoside transporter, CNT1, in human populations. *Molecular pharmacology*, 65 (3): 512-519.

Grayson DR and Evans DR (1983). The isolation and characterization of the aspartate transcarbamylase domain of the multifunctional protein, CAD. *The journal of biological chemistry*, 258 (7): 4123-4129.

Griffith DA and Jarvis SM (1996). Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1286: 153-181.

Griffiths M, Yao SM, Abidi F, Phillips SE, Cass CE, Young JD and Baldwin SA (1997). Molecular cloning and characterization of a nitrobenzylthioinosine-insensitive (ei) equilibrative nucleoside transporter from human placenta. *The biochemical journal*, 15 (328): 739-743.

Guigas B, Bertrand L, Taleux N, Foretz M, Wiernsperger N, Vertommen D, Andreelli F, Viollet B and Hue L (2006). 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside and metformin inhibit hepatic glucose phosphorylation by an AMP-activated protein kinase-independent effect on glucokinase translocation. *Diabetes*, 55 (4): 865-874.

Guillén-Gómez E, Calbet M, Casado J, de Lecea L, Soriano E, Pastor-Anglada M and Burgaya F (2004). Distribution of CNT2 and ENT1 transcripts in rat brain: selective decrease of CNT2 mRNA in the cerebral cortex of sleep-deprived rats. *Journal of neurochemistry*, 90 (4): 883-893.

Guillén-Gómez E, Pinilla-Macua I, Pérez-Torras S, Choi DS, Arce Y, Ballarín JA, Pastor-Anglada M and Díaz-Encarnación MM (2012). New role of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) in epithelial-to-mesenchymal transition in renal tubular cells. *Journal of cellular physiology*, 227 (4): 1521-1528 doi: 10.1002/jcp.22869.

Guitart X, Bonaventura J, Rea W, Orrú M, Cellai L, Dettori I, Pedata F, Brugarolas M, Cortés A, Casadó V, Chang CP, Narayanan M, Chern Y and Ferré S (2016). Equilibrative nucleoside transporter ENT1 as a biomarker of Huntington disease. *Neurobiology of disease*, 96: 47-53 doi: 10.1016/j.nbs.2016.08.013.

Guo D, Hildebrandt IJ, Prins RM, Soto H, Mazzotta MM, Dang J, Czernin J, Shyy JY, Watson AD, Phelps M, Radu CG, Cloughesy TF and Mischel PS (2009). The AMPK agonist AICAR inhibits the growth of EGFRvIII-expressing glioblastomas by inhibiting lipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 106 (31): 12932-12937 doi: 10.1073/pnas.0906606106.

Gutierrez MM, Brett CM, Ott RJ, Hui AC and Giacomini KM (1992). Nucleoside transport in brush border membrane vesicles from human kidney. *Biochimica et biophysica acta*, 1105 (1):1-9.

Gutierrez MM and Giacomini KM (1993). Substrate selectivity, potential sensitivity and stoichiometry of Na(+)-nucleoside transport in brush border membrane vesicles from human kidney. *Biochimica et biophysica acta*, 1149 (2): 202-208.

H

Hamilton SR, Yao SY, Ingram JC, Hadden DA, Ritzel MW, Gallagher MP, Henderson PJ, Cass CE, Young JD and Baldwin SA (2001). Subcellular distribution and membrane topology of the mammalian concentrative Na⁺-nucleoside cotransporter rCNT1. *The journal of biological chemistry*, 276 (30): 27981-27988.

Hammond JR (2000). Interaction of a series of draflazine analogues with equilibrative nucleoside transporters: species differences and transporter subtype selectivity. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 361: 373-382.

Bibliografia

Hanahan D and Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144: 646-674.

Hardie DG, Carling D and Carlson M (1998). The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell?. *Annual review of biochemistry*, 67: 821-855.

Hasko G, Linden J, Cronstein B and Pacher P (2008). Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 7 (9): 759-770.

Hediger MA, Clémenton B, Burrier RE and Bruford EA (2013). The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): Introduction. *Molecular aspects of medicine*, 34: 95-107.

Hines V, Keys LD and Johnston M (1986). Purification and properties of the bovine liver mitochondrial dihydroorotate dehydrogenase. *The journal of biological chemistry*, 261 (24): 11386-11392.

Hirimburegama K, Durnez P, Keleman J, Oris E, Vergauwen R, Mergelsberg H and Thevelein JM (1992). Nutrient-induced activation of trehalase in nutrient-starved cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: cAMP is not involved as second messenger. *Journal of general microbiology*, 138 (10): 2035-2043.

Hokama A, Mizoguchi E, Sugimoto K, Shimomura Y, Tanaka Y, Yoshida M, Rietdijk ST, de Jong YP, Snapper SB, Terhorst C, Blumberg RS and Mizoguchi A (2004). Induced reactivity of intestinal CD4(+) T cells with an epithelial cell lectin, Galectin-4, contributes to exacerbation of intestinal inflammation. *Immunity*, 20 (6): 681-693.

Holsbeeks I, Lagatie O, Van Nuland A, Van de Velde S and Thevelein JM (2004). The eukaryotic plasma membrane as a nutrient-sensing device. *Trends in biochemical sciences*, 29 (10): 556-564.

Hu H, Endres CJ, Chang C, Umapathy NS, Lee EW, Fei YJ, Itagaki S, Swaan PW, Ganapathy V and Unadkat JD (2006). Electrophysiological characterization and modeling of the structure activity relationship of the human concentrative nucleoside transporter 3 (hCNT3). *Molecular pharmacology*, 69 (5): 1542-1553.

Huang QQ, Yao SY, Ritzel MW, Paterson AR, Cass CE and Young JD (1994). Cloning and functional expression of a complementary DNA encoding a mammalian nucleoside transport protein. *The journal of biological chemistry*, 269 (27): 17757-17760.

Huang M and Graves LM (2002). *De novo* synthesis of pyrimidine nucleotides; emerging interfaces with signal transduction pathways. *Cellular and molecular life sciences*, 60: 321-336.

Huber-Ruano I, Pinilla-Macua I, Torres G, Casado FJ and Pastor-Anglada (2010). Link between high affinity adenosine concentrative nucleoside transporter-2 (CNT2) and energy metabolism in intestinal and liver parenchymal cells. *Journal of cellular physiology*, 225 (2): 620-630 doi: 10.1002/jcp.22254.

Huber-Ruano I, Errasti-Murugarren E, Godoy V, Vera A, Andreu AL, Garcia-Arumi E, Martí R and Pastor-Anglada M (2012). Functional outcome of a novel *SLC29A3* mutation identified in a patient with H syndrome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 428: 532-537.

Huet G, Gouyer V, Delacour D, Richet C, Zanetta JP, Delannoy P and Degand P (2003). Involvement of glycosylation in the intracellular trafficking of glycoproteins in polarized epithelial cells. *Biochimie*, 85 (3-4): 323-330.

Hughes RC (1999). Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochimica et biophysica acta*, 1473 (1): 172-185.

Hürlimann HC, Laloo B, Simon-Kayser B, Saint-Marc C, Couplier F, Lemoine S, Daignan-Fornier B and Pinson B (2011). Physiological and toxic effects of purine intermediate 5-amino-4-imidazolecarboxamide ribonucleotide (AICAR) in yeast. *The Journal of biological chemistry*, 286 (35): 30994-31002 doi: 10.1074/jbc.M111.262659.

Hyde R, Cwiklinski EL, MacAulay K, Taylor PM and Hundal HS (2007). Distinct sensor pathways in the hierarchical control of SNAT2, a putative amino acid transceptor, by amino acid availability. *The journal of biological chemistry*, 282 (27): 19788-19798.

Hyde RJ, Cass CE, Young JD and Baldwin SA (2001). The ENT family of eukaryote nucleoside and nucleobase transporters: recent advances in the investigation of structure/function relationships and the identification of novel isoforms. *Molecular membrane biology*, 18 (1): 53-63.

I

Iraqui I, Vissers S, Bernard F, De Craene JO, Boles E, Urrestarazu A and André B (1999). Amino acid signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: a permease-like sensor of external amino acids and F-Box protein Grr1p are required for transcriptional induction of the AGP1 gene, which encodes a broad-specificity amino acid permease. *Molecular and cellular biology*, 19 (2): 989-1001.

J

Jacobs RL, Lingrell S, Dyck JR and Vance DE (2007). Inhibition of hepatic phosphatidylcholine synthesis by 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside is independent of AMP-activated protein kinase activation. *The Journal of biological chemistry*, 282 (7): 4516-4523.

Jahnel J, Fickert P, Hauer AC, Högenauer C, Avian A and Trauner M (2014). Inflammatory bowel disease alters intestinal bile acid transporter expression. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 42 (9): 1423-1431 doi: 10.1124/dmd.114.058065

Jain M, Nilsson R, Sharma S, Madhusudhan N, Kitami T, Souza AL, Kafri R, Kirschner MW, Clish CB and Mootha VK (2012). Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation. *Science*, 336 (6084): 1040-1044.

Jennings LL, Hao C, Cabrita MA, Vickers MF, Baldwin SA, Young JD and Cass CE (2001). Distinct regional distribution of human equilibrative nucleoside transporter proteins 1 and 2 (hENT1 and hENT2) in the central nervous system. *Neuropharmacology*, 40: 722-731.

Johansson M and Karlsson A (1995). Differences in kinetic properties of pure recombinant human and mouse deoxycytidine kinase. *Biochemical pharmacology*, 50 (2): 163-168.

Bibliografia

Johnsson N and Varshavsky A (1994). Split ubiquitin as a sensor of protein interactions *in vivo*. *Proceedings of the national academy of sciences of the USA*, 91 (22): 10340-10344.

Johnson ZL, Cheong CG and Lee SY (2012). Crystal structure of a concentrative nucleoside transporter from *Vibrio cholera* at 2.4 Å. *Nature*, 483 (7390): 489-493 doi: 10.1038/nature10882.

Jordheim LP, Durantel D, Zoulim F and Dumontet C (2013). Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nature reviews. Drug discovery*, 12 (6): 447-464 doi: 10.1038/nrd4010.

Jurecka A (2009). Inborn errors of purine and pyrimidine metabolism. *Journal of inherited metabolic disease*, 32: 247-263.

K

Kalckar HM (1950). The biological incorporation of purines and pyrimidines into nucleosides and nucleic acid. *Biochimica et biophysica acta*, 4.

Keating MJ, Kantarjian H, Talpaz M, Redman J, Koller C, Barlogie B, Velasquez W, Plunkett W, Freireich EJ and McCredie KB (1989). Fludarabine: a new agent with major activity against chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 74 (1): 19-25.

Keating MJ (1999). Chronic lymphocytic leukemia. *Seminars in oncology*, 26: 107-114.

Kefas BA, Heimberg H, Vaulont S, Meisse D, Hue L, Pipeleers D and Van de Casteele M (2003). AICA-riboside induces apoptosis of pancreatic beta cells through stimulation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia*, 46 (2): 250-254.

Kim JH, Lee C, Cheong HS, Koh Y, Ahn KS, Kim HL, Shin HD and Yoon SS (2016). SLC29A1 (ENT1) polymorphisms and outcome of complete remission in acute myeloid leukemia. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 78 (3): 533-540.

Kim SR, Saito Y, Maekawa K, Sugiyama E, Kaniwa N, Ueno H, Okusaka T, Morizane C, Yamamoto N, Ikeda M, Yoshida T, Minami H, Furuse J, Ishii H, Saijo N, Kamatani N, Ozawa S and Sawada L (2006). Thirty novel genetic variations in the SLC29A1 gene encoding human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1). *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 21 (3): 248-256.

Kim Y, Yun CW and Philpott CC (2002). Ferrichrome induces endosome to plasma membrane cycling of the ferrichrome transporter, Arn1p, in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal*, 21 (14): 3632-3642.

King AE, Ackley MA, Cass CE, Young JD and Baldwin SA (2006). Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets. *Pharmacological sciences*, 27 (8): 416-425.

King KM, Damaraju VL, Vickers MF, Yao SY, Lang T, Tackaberry TE, Mowles DA, Ng AM, Young JD and Cass CE (2006). A comparison of the transportability, and its role in cytotoxicity, of clofarabine, cladribine, and fludarabine by recombinant human nucleoside transporters produced in three model expression systems. *Molecular pharmacology*, 69 (1): 346-353.

Kipps TJ (1998). Chronic lymphocytic leukemia. *Current Opinion Hematology*, 5 (4): 244-253.

Klasson H, Fink GR and Ljungdahl PO (1999). Ssy1p and Ptr3p are plasma membrane components of a yeast system that senses extracellular amino acids. *Molecular and cellular biology*, 19 (9): 5405-5416.

Klein K, Kullak-Ublick GA, Wagner M, Trauner M and Eloranta JJ (2009). Hepatocyte nuclear factor-4 α and bile acids regulate human concentrative nucleoside transporter-1 gene expression. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 296 (4): G936-947.

Koepsell H, Lips K and Volk C (2007). Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharmaceutical research*, 24 (7): 1227-1251.

Kong W, Engel K and Wang J (2004). Mammalian nucleoside transporters. *Current drug metabolism*, 5 (1): 63-84.

Kozomra A and Griffiths-Jones S (2011). miRBase: interacting microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic acids research*, 39: D152-157.

Kretschmar C, Oyarzún C, Villablanca C, Jaramillo C, Alarcón S, Perez G, Díaz-Encarnación MM, Pastor-Anglada M, Garrido W, Quezada C and San Martín R (2016). Reduced adenosine uptake and its contribution to signaling that mediates profibrotic activation in renal tubular epithelial cells: implication in diabetic nephropathy. *PLoS One*, 11 (1): e0147430 doi: 10.1371/journal.pone.0147430.

Kriel J, Haesendonckx S, Rubio-Teixeira M, Van Zeebroeck G and Thevelein JM (2011). From transporter to transceptor: signaling from transporters provokes re-evaluation of complex trafficking and regulatory controls: endocytic internalization and intracellular trafficking of nutrient transceptors may, at least in part, be governed by their signaling function. *Bioessays*, 33 (11): 870-879 doi: 10.1002/bies.201100100.

Kuo CL, Ho FM, Chang MY, Prakash E and Lin WW (2008). Inhibition of lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expression by 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside is independent of AMP-activated protein kinase. *Journal of cellular biochemistry*, 103 (3): 931-940.

Kyoung M, Russell SJ, Kohnhorst CL, Esemoto NN and An S (2014). *American chemical society*, 54: 870-880.

L

Lacoste C, Hervé J, Bou Nader M, Dos Santos A, Moniaux N, Valogne Y, Montjean R, Dorseuil O, Samuel D, Cassio D, Portulano C, Carrasco N, Bréchet C and Faivre J (2012). Iodide transporter NIS regulates cancer cell motility and invasiveness by interacting with the Rho guanine nucleotide exchange factor LARG. *Cancer research*, 72 (21): 5505-5515 doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0516.

Lagerström MC and Schiöth HB (2008). Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery*, 7 (4): 339-357 doi: 10.1038/nrd2518.

Bibliografia

- Lai Y, Bakken AH and Unadkat JD (2002). Simultaneous expression of hCNT1-CFP and hENT1-YFP in madin-drabey canine kidney cells. *The journal of biological chemistry*, 277 (40): 37711-37717.
- Lai Y, Lee EW, Ton CC, Vijay S, Zhang H and Unadkat JD (2004a). Conserved residues F316 and G476 in the concentrative nucleoside transporter 1 (hCNT1) affect guanosine sensitivity and membrane expression, respectively. *Cell physiology*, 288 (1): C39-45.
- Lai Y, Tse CM and Unadkat JD (2004b). Mitochondrial expression of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) results in enhanced mitochondrial toxicity of antiviral drugs. *The journal of biological chemistry*, 279 (6): 4490-4497.
- Lane AN and Fan TW (2015). Regulation of mammalian nucleotide metabolism and biosynthesis. *Nucleic acids research*, 43 (4): 2466-2485.
- Lane J, Martin TA, McGuigan C, Mason MD and Jiang WG (2010). The differential expression of hCNT1 and hENT1 in breast cancer and the possible impact on breast cancer therapy. *Journal of experimental therapeutics and oncology*, 8 (3): 203-210.
- Lang TT, Selner M, Young JD and Cass CE (2001). Acquisition of human concentrative nucleoside transporter 2 (hCNT2) activity by gene transfer confers sensitivity to fluoropyrimidine nucleosides in drug-resistant leukemia cells. *Molecular pharmacology*, 60 (5): 1143-1152.
- Larráyoz IM, Casado FJ, Pastor-Anglada M and Lostao MP (2004). Electrophysiological characterization of the human Na⁺/nucleoside cotransporter (hCNT1) and role of adenosine on hCNT1 function. *The journal of biological chemistry*, 279 (10): 8999-9007.
- Leisewitz AV, Zimmerman EI, Huang M, Jones SZ, Yang J and Graves LM (2011). Regulation of ENT1 expression and ENT1-dependent nucleoside transport by c-Jun N-terminal kinase. *Biochemical and biophysical research communications*, 404 (1): 370-375.
- Leung GP, Ward JL, Wong PY and Tse CM (2001). Characterization of nucleoside transport systems in cultured rat epididymal epithelium. *American journal of physiology. Cell physiology*, 280 (5): 1076-1082.
- Li JY, Boado RJ and Pardridge WM (2001). Cloned blood-brain barrier adenosine transporter is identical to the rat concentrative Na⁺ nucleoside cotransporter CNT2. *Journal of cerebral blood flow and metabolism*, 21 (8): 929-936.
- Li L, Tan CM, Koo SH, Chong KT and Lee EJ (2007). Identification and functional analysis of variants in the human concentrative nucleoside transporter 2, hCNT2 (SLC28A2) in Chinese, Malays and Indians. *Pharmacogenetics and genomics*, 17 (9): 783-786.
- Li L, Koo SH, Hong IH and Lee EJ (2009). Identification of functional promoter haplotypes of human concentrative nucleoside transporter 2, hCNT2 (SLC28A2). *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 24 (2): 161-166.
- Liu YC, Li F, Handler J, Huang CR, Xiang Y, Neretti N, Sedivy JM, Zeller KI and Dang CV (2008). Global regulation of nucleotide biosynthetic genes by c-Myc. *Plos one*, 3 (7): e2722.
- Llopis M, Antolin M, Carol M, Borrueal N, Casellas F, Martinez C, Espín-Basany E, Guarner F and Malagelada JR (2009). *Lactobacillus casei* downregulates commensals' inflammatory signals in Crohn's disease mucosa. *Inflammatory bowel diseases*, 5(2):275-283 doi: 10.1002/ibd.20736.

Loewen SK, Ng AM, Yao SY, Cass CE, Baldwin SA and Young JD (1999). Identification of amino acid residues responsible for the pyrimidine and purine nucleoside specificities of human concentrative Na⁺ nucleoside cotransporters hCNT1 and hCNT2. *The journal of biological chemistry*, 274 (35): 24475-24484.

Löffler M, Morote-Garcia JC, Eltzschig SA, Coe IR and Eltzschig HK (2007). Physiological roles of vascular nucleoside transporters. *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology*, 27 (5): 1004-1013.

Löffler M, Carrey EA and Zameitat E (2015). Orotic acid, more than just an intermediate of pyrimidine *de novo* synthesis. *Journal of genetics and genomics*, 42 (5): 207-219.

López JM, Santidrián AF, Campàs C and Gil J (2003). 5-Aminoimidazole-4-carboxamide riboside induces apoptosis in Jurkat cells, but the AMP-activated protein kinase is not involved. *The biochemical journal*, 370 (Pt 3): 1027-1032.

Lostao MP, Mata JF, Larrayoz IM, Inzillo SM, Casado FJ and Pastor-Anglada M (2000). Electrogenic uptake of nucleosides and nucleoside-derived drugs by the human nucleoside transporter 1 (hCNT1) expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *FEBS letters*, 481 (2): 137-140.

Lu H, Chen C and Klaassen C (2004). Tissue distribution of concentrative and equilibrative nucleoside transporters in male and female rats and mice. *Drug metabolism and disposition*, 32 (12): 1455-1461.

M

Mackey JR, Yao SY, Smith KM, Karpinski E, Baldwin SA, Cass CE and Young JD (1999). Gemcitabine transport in *Xenopus* oocytes expressing recombinant plasma membrane mammalian nucleoside transporters. *Journal of the national cancer institute*, 91 (21): 1876-1881.

Mackey JR, Galmarini CM, Graham KA, Joy AA, Delmer A, Dabbagh L, Glubrecht D, Jewell LD, Lai R, Lang T, Hanson J, Young JD, Merle-Béral H, Binet JL, Cass CE and Dumontet C (2005). Quantitative analysis of nucleoside transporter and metabolism gene expression in chronic lymphocytic leukemia (CLL): identification of fludarabine-sensitive and -insensitive populations. *Blood*, 105 (2): 767-774.

Mani RJ, Hammond JR, Marjan JM, Graham KA, Young JD, Baldwin SA and Cass CE (1998). Demonstration of equilibrative nucleoside transporters (hENT1 and hENT2) in nuclear envelopes of cultured human choriocarcinoma (BeWo) cells by functional reconstitution in proteoliposomes. *The journal of biological chemistry*, 273 (46): 30818-30825.

Mangravite LM, Lipschutz JH, Mostov KE and Giacomini KM (2001). Localization of GFP-tagged concentrative nucleoside transporters in a renal polarized epithelial cell line. *American journal of physiology. Renal physiology*, 280 (5): F879-885.

Mangravite LM, Badagnani I and Giacomini KM (2003). Nucleoside transporters in the disposition and targeting of nucleoside analogs in the kidney. *European journal of pharmacology*, 479 (1-3): 269-281.

Mato JM, Martínez-Chantar ML and Lu SC (2008). Methionine metabolism and liver disease. *Annual review of nutrition*, 28: 273-293 doi: 10.1146/annurev.nutr.28.061807.155438.

Bibliografía

McConkey DJ, Aguilar-Santelises M, Hartzell P, Eriksson I, Mellstedt H, Orrenius S, Jondal M (1991). Induction of DNA fragmentation in chronic B-lymphocytic leukemia cells. *Journal of immunology*, 146 (3): 1072-1076.

McNally T, Helfrich RJ, Cowart M, Dorwin SA, Meuth JL, Idler KB, Klute KA, Simmer RL, Kowaluk EA and Halbert DN (1997). Cloning and expression of the adenosine kinase gene from rat and human tissues. *Biochemical and biophysical research communications*, 31 (3): 645-650.

Medina-Pulido L, Molina-Arcas M, Justicia C, Soriano E, Burgaya F, Planas AM and Pastor-Anglada (2013). Hypoxia and P1 receptor activation regulate the high-affinity concentrative adenosine transporter CNT2 in differentiated neuronal PC12 cells. *The biochemical journal*, 454 (3): 437-445

Meisse D, Van de Casteele M, Beauloye C, Hainault I, Kefas BA, Rider MH, Fougelle F and Hue L (2002). Sustained activation of AMP-activated protein kinase induces c-Jun N-terminal kinase activation and apoptosis in liver cells. *FEBS letter*, 526 (1-3): 38-42.

Mey V, Giovannetti E, De Braud F, Nannizzi S, Curigliano G, Verweij F, De Cobelli O, Pece S, Del Tacca M and Danesi R (2006). In vitro synergistic cytotoxicity of gemcitabine and pemetrexed and pharmacogenetic evaluation of response to gemcitabine in bladder cancer patients. *British journal of cancer*, 95 (3): 289-297.

Minuesa G, Purcet S, Erkizia I, Molina-Arcas M, Bofill M, Izquierdo-Useros N, Casado FJ, Clotet B, Pastor-Anglada M and Martinez-Picado J (2008). Expression and functionality of anti-human immunodeficiency virus and anticancer drug uptake transporters in immune cells. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 324 (2): 558-567.

Minuesa G, Albert C, Pastor-Anglada M, Martinez-Picado J and Koepsell H (2017). Response to "Tenofovir disoproxil fumarate is not an inhibitor of human organic cation transporter 1". *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 360 (2): 343-345 doi: 10.1124/jpet.116.239004.

Mohelnikova-Duchonova B, Brynychova V, Hlavac V, Kocik M, Oliverius M, Hlavsa J, Honsova E, Mazanec J, Kala Z, Melichar B and Soucek P (2013). The association between the expression of solute carrier transporters and the prognosis of pancreatic cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 72 (3): 669-682 doi: 10.1007/s00280-013-2246-2.

Molina-Arcas M, Bellosillo B, Casado FJ, Montserrat E, Gil J, Colomer D and Pastor-Anglada M (2003). Fludarabine uptake mechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *The American society of hematology*, 101 (6): 2328-2334.

Molina-Arcas M, Marcé S, Villamor N, Huber-Ruano I, Casado FJ, Bellosillo B, Montserrat E, Gil J, Colomer D and Pastor-Anglada M (2005). Equilibrative nucleoside transporter-2 (hENT2) protein expression correlates with *ex vivo* sensitivity to fludarabine in chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Leukemia*, 19 (1): 64-68.

Molina-Arcas M, Trigueros-Motos L, Casado FJ and Pastor-Anglada M (2008). Physiological and pharmacological roles of nucleoside transporter proteins. *Nucleoside, nucleotide and nucleic acids*, 27 (6): 769-778.

Molina-Arcas M, Casado FJ and Pastor-Anglada M (2009). Nucleoside transporter proteins. *Current vascular pharmacology*, 7 (4): 426-434.

Molina-Arcas M and Pastor-Anglada M (2013). Nucleoside transporters (SLC28 and SLC29) family, in *Pharmacogenomics of Human Drug Transporters* (Ishikawa T, Kim R and König J eds), John Wiley Et Sons, New Jersey.

Montero TD, Racordon D, Bravo L, Owen GI, Bronfman ML and Leisewitz AV (2012). PPAR α and PPAR γ regulate the nucleoside transporter hENT1. *Biochemical and biophysical research communications*, 419 (2): 405-411.

Morelle W, Stechly L, André S, Van Seuninghen I, Porchet N, Gabius HJ, Michalski JC and Huet G (2009). Glycosylation pattern of brush border-associated glycoproteins in enterocyte-like cells: involvement of complex-type N-glycans in apical trafficking. *Biological chemistry*, 390 (7): 529-577 doi: 10.1515/BC.2009.075.

Mori R, Ishikawa T, Ichikawa Y, Taniguchi K, Matsuyama R, Ueda M, Fujii Y, Endo I, Togo S, Danenberg PV and Shimada H (2007). Human equilibrative nucleoside transporter 1 is associated with the chemosensitivity of gemcitabine in human pancreatic adenocarcinoma and biliary tract carcinoma cells. *Oncology reports*, 17 (5): 1201-1205.

Morote-Garcia JC, Rosenberger P, Nivillac NM, Coe IR and Eltzschig HK (2009). Hypoxia-inducible factor-dependent repression of equilibrative nucleoside transporter 2 attenuates mucosal inflammation during intestinal hypoxia. *Gastroenterology*, 136 (2): 607-618.

Murray AW (1971). The biological significance of purine salvage. *Annual reviews*, 773.

Murray RK and Rodwell VW. Harpers Illustrated Biochemistry, 29th Edition.

Myers SN, Goyal RK, Roy JD, Fairfull LD, Wilson JW and Ferrell RE (2006). Functional single nucleotide polymorphism haplotypes in the human equilibrative nucleoside transporter 1. *Pharmacogenetics and genomics*, 16 (5): 315-320.

N

Naim HY, Joberty G, Alfalah M and Jacob R (1999). Temporal association of the N- and O-linked glycosylation events and their implication in the polarized sorting of intestinal brush border sucrose-isomaltase, aminopeptidase N, and dipeptidyl peptidase IV. *The journal of biological chemistry*, 274 (25): 17961-17967.

Naito T, Tokashiki S, Mino Y, Otsuka A, Ozono S, Kagawa Y and Kawakami J (2009). Impact of concentrative nucleoside transporter 1 gene polymorphism on oral bioavailability of mizoribine in stable kidney transplant recipients. *Basic and clinical pharmacology and toxicology*, 106 (4): 310-316.

Nakai K and Horton P (1999). PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends in biochemical sciences*, 24 (1): 34-36.

Nam HW, Hinton DJ, Kang NY, Kim T, Lee MR, Oliveros A, Adams C, Ruby CL and Choi DS (2013). Adenosine transporter ENT1 regulates the acquisition of goal- directed behavior and ethanol drinking through A2A receptor in the dorsomedial striatum. *The Journal of neuroscience*, 33 (10): 4329-4338 doi: 10.1523/JNEUROSCI.3094-12.2013.

Bibliografía

Naydenova Z, Rose JB and Coe IR (2008). Inosine and equilibrative nucleoside transporter 2 contribute to hypoxic preconditioning in the murine cardiomyocyte HL-1 cell line. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 294: H2687-2692.

Nelson DL, Cox MM and Lehninger AL (2015). *Principios de bioquímica Lehninger*. Retrieved from http://catalog.ub.edu/record=b2130489~S1*cat.

Ngo LY, Patil SD and Unadkat JD (2000). Ontogenic and longitudinal activity of Na⁺-nucleoside transporters in the human intestine. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 280 (3): G475-481.

Nies AT, Koepsell H, Winter S, Burk O, Klein K, Kerb R, Zanger UM, Keppler D, Schwab M and Schaeffeler E (2009). Expression of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) is affected by genetic factors and cholestasis in human liver. *Hepatology*, 50 (4): 1227-1240 doi: 10.1002/hep.23103.

Nickel W (2003). The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export rules. *European journal of biochemistry*, 270 (10): 2109-2119.

Nyhan WL (2014). Nucleotide synthesis via salvage pathway. *Published online*. doi: 10.1002/9780470015902.a0001399.pub3.

Nyquist MD, Prasad B and Mostaghel EA (2007). Harnessing solute carrier transporters for precision oncology. *Molecular diversity preservation international*, 22 (4): e539 doi: 10.3390.

O

Ohtsubo K, Takamatsu S, Minowa MT, Yoshida A, Takeuchi M and Marth JD (2005). Dietary and genetic control of glucose transporter 2 glycosylation promotes insulin secretion in suppressing diabetes. *Cell*, 123 (7): 1307-1321.

Osato DH, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ, Stryke D, Wang J, Ferrin TE, Herskowitz I and Giacomini KM (2003). Functional characterization in yeast of genetic variants in the human equilibrative nucleoside transporter, ENT1. *Pharmacogenetics*, 13 (5): 297-301.

Owen RP, Gray JH, Taylor TR, Carlson EJ, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ, Stryke D, Ferrin TE and Giacomini KM (2005). Genetic analysis and functional characterization of polymorphisms in the human concentrative nucleoside transporter, CNT2. *Pharmacogenetics and genomics*, 15 (2): 83-90.

Owen RP, Lagpacan LL, Taylor TR, De la Cruz M, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ, Stryke D, Ferrin TE and Giacomini KM (2006). Functional characterization and haplotype analysis of polymorphisms in the human equilibrative nucleoside transporter, ENT2. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 34 (1): 12-15.

Özcan S, Dover J and Johnston M (1998). Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal*, 17 (9): 2566-2573.

P

Paclik D, Danese S, Berndt U, Wiedenmann B, Dignass A and Sturm A (2008). Galectin-4 controls intestinal inflammation by selective regulation of peripheral and mucosal T cell apoptosis and cell cycle. *PLoS One*, 3 (7): e2629 doi: 10.1371/journal.pone.0002629.

Park J and Gupta RS (2008). Adenosine kinase and ribokinase – the RK family of proteins. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 65 (18): 2875-2896. doi: 10.1007/s00018-008-8123-1.

Park JW, Voss PG, Grabski S, Wang JL and Patterson RJ (2001). Association of galectin-1 and galectin-3 with Gemin4 in complexes containing the SMN protein. *Oxford university press*, 27 (17): 3595-3602.

Parker WB (2009). Enzymology of purine and pyrimidine antimetabolites used in the treatment of cancer. *Chemical reviews*, 109 (7): 2880-2893.

Parkinson FE, Damaraju VJ, Graham K, Yao SY, Baldwin SA, Cass CE and Young JD (2011). Molecular biology of nucleoside transporters and their distributions and functions in the brain. *Current topics in medicinal chemistry*, 11 (8): 948-972.

Pastor-Anglada M, Felipe A and Casado FJ (1998). Transport and mode of action of nucleoside derivatives used in chemical and antiviral therapies. *Trends in pharmacological sciences*, 19 (10): 424-430.

Pastor-Anglada M, Molina-Arcas M, Casado FJ, Bellosillo B, Colomer D and Gil J (2004). Nucleoside transporters in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*, 18 (3): 385-393.

Pastor-Anglada M, Errasti-Murugarren E, Aymerich I and Casado FJ (2007). Concentrative nucleoside transporters (CNTs) in epithelia: from absorption to cell signalling. *Journal of physiology and biochemistry*, 63 (1): 97-110.

Pastor-Anglada M, Cano-Soldado P, Errasti-Murugarren E and Casado FJ (2008). SLC28 genes and concentrative nucleoside transporter (CNT) proteins. *Xenobiotica*, 38 (7-8): 972-994 doi: 10.1080/00498250802069096.

Pastor-Anglada M and Pérez-Torras S (2015). Nucleoside transporter proteins as biomarkers of drug responsiveness and drug targets. *Frontiers in pharmacology*, 6 (13): 1-14.

Pastor-Anglada M and Pérez-Torras S (2018). Who is who in adenosine transport. *Frontiers in pharmacology*, 9: 627 doi: 10.3389/fphar.2018.00627.

Pastor-Anglada M, Urtasun M and Pérez-Torras S (2018). Intestinal nucleoside transporters: function, expression, and regulation. *Comprehensive physiology*, 8: 1003-1017.

Paz A, Haklai R, Elad-Sfadia G, Ballan E and Kloog Y (2001). Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. *Oncogene*, 20 (51): 7486-7493.

Pedley AM and Benkovic SJ (2107). A new view into the regulation of purine metabolism: the purinosome. *Cell Press*, 42 (2): 1-14.

Pennycooke M, Chaudary N, Shuralyova I, Zhang Y and Coe IR (2001). Differential expression of human nucleoside transporters in normal and tumor tissue. *Biochemical and biophysical research communications*, 280: 951-959.

Bibliografía

Pérez-Torras S, García-Manteiga J, Mercadé E, Casado FJ, Carbó N, Pastor-Anglada M and Mazo A (2008). Adenoviral-mediated overexpression of human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) enhances gemcitabine response in human pancreatic cancer. *Biochemical pharmacology*, 76 (3): 322-329 doi: 10.1016/j.bcp.2008.05.011.

Pérez-Torras S, Vidal-Pla A, Cano-Soldado P, Huber-Ruano I, Mazo A and Pastor-Anglada M (2013). Concentrative nucleoside transporter 1 (hCNT1) promotes phenotypic changes relevant to tumor biology in a translocation-independent manner. *Cell death and disease*, 30 (4): e648 doi: 10.1038/cddis.2013.173.

Pérez-Torras S, Iglesias I, Llopis M, Lozano JJ, Antolín M, Guarner F and Pastor-Anglada M (2016). Transportome profiling identifies profound alterations in Crohn's disease partially restored by commensal bacteria. *Journal of Crohn's and colitis*, 10 (7): 850-859. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjw042.

Pérez-Torras S, Mata-Ventosa A, Drögemöller B, Tarailo-Graovac M, Meijer J, Meinsma R, van Cruchten AG, Kulik W, Viel-Oliva A, Bidon-Chanal A, Ros CJ, Wassermann WW, van Karnebeek CD, Pastor-Anglada M and van Kuilenburg AB (2018). Deficiency of perforin and hCNT1, a novel inborn error of pyrimidine metabolism, associated with a rapidly developing lethal phenotype due to multi-organ failure. Submitted to *BBA-Molecular bases of disease*.

Pesi R, Micheli V, Jacomelli G, Peruzzi L, Camici M, Garcia-Gil M, Allegrini S and Tozzi MG (2000). Cytosolic 5'-nucleotidase hyperactivity in erythrocytes of Lesch-Nyhan syndrome patients. *Neuroreport*, 11 (9): 1827-1831.

Petersson J, Pattison J, Kruckeberg AL, Berden JA and Persson BL (1999). Intracellular localization of an active green fluorescent protein-tagged Pho84 phosphate permease in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letter*, 462 (1-2): 37-42.

Pignataro G, Simon RP and Boison D (2007). Transgenic overexpression of adenosine kinase aggravates cell death in ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism*, 27 (1): 1-5.

Pignataro G, Maysami S, Studer FE, Wilz A, Simon RP and Boison D (2008). Downregulation of hippocampal adenosine kinase after focal ischemia as potential endogenous neuroprotective mechanism. *Journal of cerebral blood flow and metabolism*, 28 (1): 17-23

Pinilla-Macua I, Casado FJ and Pastor-Anglada (2012). Structural determinants for rCNT2 sorting to the plasma membrane of polarized and non-polarized cells. *The biochemical journal*, 442: 517-525.

Podgorska M, Kocbuch K and Pawelczyk T (2005). Recent advances in studies on biochemical and structural properties of equilibrative and concentrative nucleoside transporters. *Acta biochimica Polonica*, 52 (4): 749-758.

Podgorska M, Kocbuch K, Grden M, Szulc A, Szutowicz A and Pawelczyk T (2007). Different signalling pathways utilized by insulin to regulate the expression of ENT2, CNT1, CNT2 nucleoside transporters in rat cardiac fibroblasts. *Archives of biochemistry and biophysics*, 464 (2): 344-349.

Prasad B, Evers R, Gupta A, Hop CE, Salphati L, Shukla S, Ambudkara SV and Unadkat JD (2014). Interindividual variability in hepatic organic anion-transporting polypeptides and P-glycoprotein (ABCB1) protein expression: quantification by liquid chromatography tandem mass

spectroscopy and influence of genotype, age, and sex. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 42 (1): 78-88 doi: 10.1124/dmd.113.053819.

Puebla C, Farías M, González M, Vecchiola A, Aguayo C, Krause B, Pastor-Anglada M, Casanello P and Sobrevia L (2008). High D-glucose reduces SLC29A1 promoter activity and adenosine transport involving specific protein 1 in human umbilical vein endothelium. *Journal of cellular physiology*, 215 (3): 645-656.

R

Rajasekaran SA, Gopal J, Willis D, Espineda C, Twiss JL and Rajasekaran AK (2004). Na, K-ATPase β 1-subunit increases the translation efficiency of the α 1-subunit in MSV-MDCK cells. *Molecular biology of the cell*, 15 (7): 3224-3232.

Rasul E, Salamon D, Nagy N, Leveau B, Banati F, Szenthe K, Koroknai A, Minarovits J, Klein G and Klein E (2014). The MEC1 and MEC2 lines represent two CLL subclones in different stages of progression towards prolymphocytic leukemia. *PLoS One*, 9 (8): e106008 doi: 10.1371/journal.pone.0106008.

Rattan R, Giri S, Singh AK and Singh I (2005). 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside inhibits cancer cell proliferation in vitro and in vivo via AMP-activated protein kinase. *The journal of biological chemistry*, 280 (47): 39582-395893.

Reed JC (1998). Molecular biology of chronic lymphocytic leukemia. *Seminars of oncology*, 25: 11-18.

Reichard P (1988). Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Annual review of biochemistry*, 57: 349-374.

Reyes G, Nivillac NM, Karim MZ, Desouza L, Siu KW and Coe IR (2011). The equilibrative nucleoside transporter (ENT1) can be phosphorylated at multiple sites by PKC and PKA. *Molecular membrane biology*, 28 (6): 412-426.

Ritzel MW, Yao SY, Huang MY, Elliott JF, Cass CE and Young JD (1997). Molecular cloning and functional expression of cDNAs encoding a human Na⁺-nucleoside cotransporter (hCNT1). *The American journal of physiology*, 272 (2): C707-714.

Ritzel MW, Yao SY, Ng AM, Mackey JR, Cass CE and Young JD (1998). Molecular cloning, functional expression and chromosomal localization of a cDNA encoding a human Na⁺-nucleoside cotransporter (hCNT2) selective for purine nucleosides and uridine. *Molecular membrane biology*, 15 (4): 203-211.

Ritzel MW, Ng AM, Yao SY, Graham K, Loewen SK, Smith KM, Ritzeli RG, Mowles DA, Carpenter P, Chen XZ, Karpinski E, Hyde RJ, Baldwin SA, Cass CE and Young JD (2001). Molecular identification and characterization of novel human and mouse concentrative Na⁺-nucleoside cotransporter proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system *cib*). *The journal of biological chemistry*, 276 (4): 2914-2927.

Robak T (2011). New nucleoside analogs for patients with haematological malignancies. *Expert opinion on investigational drugs*, 20 (3): 343-359.

Bibliografia

Robertson LE, Chubb S, Meyn RE, Story M, Ford R, Hittelman WN and Plunkett W (1993). Induction of apoptotic cell death in chronic lymphocytic leukemia by 2-chloro-2'-deoxyadenosine and 9- β -D-arabinosyl-2-fluoroadenine. *Blood*, 81 (1): 143-150.

Robledo S, Idol RA, Crimmins DL, Ladenson JH, Mason PJ and Bessler M (2008). The role of human ribosomal proteins in the maturation of rRNA and ribosome production. *RNA*, 14 (9): 1918-1929 doi: 10.1261/rna.1132008.

Rogato A, D'Apuzzo E and Chiurazzi M (2010). The multiple plant response to high ammonium conditions: the Lotus japonicus AMT1; 3 protein acts as a putative transceptor. *Plant signaling and behavior*, 5 (12): 1594-1596.

Rose JB and Coe IR (2008). Physiology of nucleoside transporters: Back to the future... *Physiology*, 23: 41-48.

Rose JB, Naydenova Z, Bang A, Ramadan A, Klawitter J, Schram K, Sweeney G, Grenz A, Eltzschig H, Hammond J, Choi DS and Coe IR (2011). Absence of equilibrative nucleoside transporter 1 in ENT1 knockout mice leads to altered nucleoside levels following hypoxic challenge. *Life science*, 89 (17-18): 621-630 doi: 10.1016/j.lfs.2011.08.007.

Rotllan P and Miras Portugal MT (1985). Adenosine kinase from bovine adrenal medulla. *European journal of biochemistry*, 151 (2): 365-371.

S

Sabina RL, Patterson D and Holmes EW (1985). 5-Amino-4-imidazolecarboxamide riboside (Z-ribose) metabolism in eukaryotic cells. *The journal of biological chemistry*, 260 (10): 6107-6114.

Sabini E, Hazra S, Ort S, Konrad M and Lavie A (2008). Structural basis for substrate promiscuity of dCK. *Journal of molecular biology*, 378: 607-621.

Sabirov RZ and Merzlyak PG (2012). Plasmalemmal VDAC controversies and maxi-anion channel puzzle. *Biochimica et biophysica acta*, 818 (6): 1570-1580 doi: 10.1016/j.bbamem.2011.09.024.

Sahasranaman S, Howard D and Roy S (2008). Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines. *European journal of clinical pharmacology*, 64 (8): 753-767 doi: 10.1007/s00228-008-0478-6.

Sahin B, Kansy JW, Nairn AC, Spychala J, Ealick SE, Fienberg AA, Greene RW and Bibb JA (2004). Molecular characterization of recombinant mouse adenosine kinase and evaluation as a target for protein phosphorylation. *European journal of biochemistry*, 271 (17): 3547-3555.

Sakamoto A, Matsumaru T, Yamamura N, Uchida Y, Tachikawa M, Ohtsuki S and Terasaki T (2013). Quantitative expression of human drug transporter proteins in lung tissues: analysis of regional, gender, and interindividual differences by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical sciences*, 102 (9): 3395-3406 doi: 10.1002/jps.23606.

Sakowicz M, Grdeń M and Pawełczyk T (2001). Expression level of adenosine kinase in rat tissues. Lack of phosphate effect on the enzyme activity. *Acta biochimica Polonica*, 48 (3): 745-754.

Sánchez C, Lachaize C, Janody F, Bellon B, Röder L, Euzenat J, Rechenmann F and Jacq B (1999). Grasping at molecular interactions and genetic networks in *Drosophila melanogaster* using FlyNets, an Internet database. *Oxford university press*, 27 (1): 89-94.

Santidrián AF, González-Gironès DM, Iglesias-Serret D, Coll-Mulet L, Cosialls AM, de Frias M, Campàs C, González-Barca E, Alonso E, Labi V, Viollet B, Benito A, Pons G, Villunger A and Gil J (2010). AICAR induces apoptosis independently of AMPK and p53 through up-regulation of the BH3-only proteins BIM and NOXA in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, 116 (16): 3023-3032 doi: 10.1182/blood-2010-05-283960.

Satelli A, Rao PS, Thirumala S and Rao US (2011). Galectin-4 functions as a tumor suppressor of human colorectal cancer. *International journal of cancer*, 129 (4): 799-809 doi: 10.1002/ijc.25750.

Sauer N, Mosenthin R and Bauer E (2011). The role of dietary nucleosides in single-stomached animals. *Nutrition research reviews*, 24 (1): 46-59 doi: 10.1017/S0954422410000326.

Schein SJ, Colombini M and Finkelstein A (1976). Reconstitution in planar lipid bilayers of a voltage-dependent anion-selective channel obtained from paramecium mitochondria. *The journal of membrane biology*, 30 (2): 99-120.

Schlessinger A, Matsson P, Shima JE, Pieper U, Yee SW, Kelly L, Apeltsin L, Stroud RM, Ferrin TE, Giacomini KM and Sali A (2010). Comparison of human solute carriers. *Protein science*, 19: 412-428.

Schneider E, Machavoine F, Pléau JM, Bertron AF, Thurmond RL, Ohtsu H, Watanabe T, Schinkel AH and Dy M (2005). Organic cation transporter 3 modulates murine basophil functions by controlling intracellular histamine levels. *The journal of experimental medicine*, 202 (3): 387-393.

Schwikowski B, Uetz P and Fields S (2000). A network of protein-protein interactions in yeast. *Nature biotechnology*, 18 (12): 1257-1261.

SenGupta DJ, Lum PY, Lai Y, Shubochkina E, Bakken AH, Schneider G and Unadkat JD (2002). A single glycine mutation in the equilibrative nucleoside transporter gene, hENT1, alters nucleoside transport activity and sensitivity to nitrobenzylthioinosine. *Biochemistry*, 41: 1512-1519.

Sengupta TK, Leclerc GM, Hsieh-Kinser TT, Leclerc GJ, Singh I and Barredo JC (2007). Cytotoxic effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR) on childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells: implication for targeted therapy. *Molecular cancer*, 6: 46.

Shin HC, Landowski CP, Sun D, Vig BS, Kim I, Mittal S, Lane M, Rosania G, Drach JC and Amidon GL (2003). Functional expression and characterization of a sodium-dependent nucleoside transporter hCNT2 cloned from human duodenum. *Biochemical and biophysical research communications*, 307 (3):696-703.

Shryock JC and Belardinelli L (1997). Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology. *The American journal of cardiology*, 79 (12A): 2-10.

Bibliografia

Simmer JP, Kelly RE, Rinker AG, Scully JL and Evans DR (1990). Mammalian carbamyl phosphate synthetase (CPS). cDNA sequence and evolution of the CPS domain of the Syrian hamster multifunctional protein CAD. *The journal of biological chemistry*, 265 (18): 10395-10402.

Smith KM, Ng AM, Yao SY, Labedz KA, Knaus EE, WiebelI, Cass CE, Baldwin SA, Chen XZ, Karpinski E and Young JD (2004). Electrophysiological characterization of a recombinant human Na⁺-coupled nucleoside transporter (hCNT1) produced in *Xenopus* oocytes. *Journal of physiology*, 558 (3): 807-823.

Smith KM, Slugoski MD, Loewen SK, Ng ML, Yao SY, Chen XZ, Karpinski E, Cass CE, Baldwin SA and Young JD (2005). The broadly selective human Na⁺/nucleoside cotransporter (hCNT3) exhibits novel cation-coupled nucleoside transport characteristics. *The journal of biological chemistry*, 280 (27): 25436-25449.

Smith KM, Slugoski MD, Cass CE, Baldwin SA, Karpinski E and Young JD (2007). Cation coupling properties of human concentrative nucleoside transporters hCNT1, hCNT2 and hCNT3. *Molecular membrane biology*, 24 (1): 53-64.

Snider J, Kotlyar M, Saraon P, Yao Z, Jurisica I and Stagljar I (2015). Fundamentals of protein interaction network mapping. *Molecular systems biology*, 11 (12): 848 doi: 10.15252/msb.20156351.

Sokolina K, Kittanakom S, Snider J, Kotlyar M, Maurice P, Gandía J, Benleulmi-Chaachoua A, Tadagaki K, Oishi A, Wong V, Maly RH, Deineko V, Aoki H, Amin S, Yao Z, Morató X, Otasek D, Kobayashi H, Menendez J, Auerbach D, Angers S, Przulj N, Bouvier M, Babu M, Ciruela F, Jockers R, Jurisica I and Stagljar I (2017). Systematic protein-protein interaction mapping for clinically relevant human GPCRs. *Molecular systems biology*, 13 (3): 918 doi: 10.15252/msb.20167430.

Soler C, Felipe A, Mata JF, Casado FJ, Celada A and Pastor-Anglada (1998). Regulation of nucleoside transport by lipopolysaccharide, phorbol esters, and tumor necrosis factor- α in human B-lymphocytes. *The journal of biological chemistry*, 273 (41): 26939-26945.

Soler C, García-Manteiga J, Valdés R, Xaus J, Comalda M, Casado FJ, Pastor-Anglada M, Celada A and Felipe A (2001a). Macrophages require different nucleoside transport systems for proliferation and activation. *The faseb journal*, 15 (11): 1979-1988.

Soler C, Valdés R, García-Manteiga J, Xaus J, Comalda M, Casada FJ, Modolell M, Nicholson B, MacLeod C, Felipe A, Celada A and Pastor-Anglada M (2001b). Lypopolysaccharide-induced apoptosis of macrophages determines the up-regulation of concentrative nucleoside transporters CNT1 and CNT2 through tumor necrosis factor- α -dependent and -independent mechanisms. *The journal of biological chemistry*, 276 (32): 30043-30049.

Soler C, Felipe A, García-Manteiga J, Serra M, Guillén-Gómez E, Casado FJ, MacLeod C, Modolell M, Pastor-Anglada M and Celada A (2003). Interferon- γ regulates nucleoside transport systems in macrophages through signal transduction and activator of transduction factor 1 (STAT1)-dependent and -independent signalling pathways. *The biochemical journal*, 375 (3): 777-783.

Song JH, Cho KM, Kim HJ, Kim YK, Kim NY, Kim HJ, Lee TH, Hwang SY and Kim TS (2015). Concentrative nucleoside transporter 3 as a prognostic indicator for favourable outcome of t(8;21)-positive acute myeloid leukemia patients after cytarabine-based chemotherapy. *Oncology reports*, 34 (1): 488-494 doi: 10.3892/or.2015.3959.

Soo RA, Wang LZ, Ng SS, Chong PY, Yong WP, Lee SC, Liu JJ, Choo TB, Tham LS, Lee HS, Goh BC and Soong R (2009). Distribution of gemcitabine pathway genotypes in ethnic Asians and their association with outcome in non-small cell lung cancer patients. *Lung cancer*, 63 (1): 121-127.

Spiegel R, Cliffe ST, Buckley MF, Crow YJ, Urquhart J, Horovitz Y, Tenenbaum-Rakover Y, Newman WG, Donnai D and Shalev SA (2010). Expanding the clinical spectrum of SLC29A3 gene defects. *European journal of medical genetics*, 53 (5): 309-313.

Spratlin J, Sangha R, Glubrecht D, Dabbagh L, Young JD, Dumontet C, Cass C, Lai R and Mackey JR (2004). The absence of human equilibrative nucleoside transporter 1 is associated with reduced survival in patients with gemcitabine-treated pancreas adenocarcinoma. *Clinical cancer research*, 10 (20): 6956-6961.

Spychala J, Datta NS, Takabayashi K, Datta M, Fox IH, Gribbin T and Mitchell BS (1996). Cloning of human adenosine kinase cDNA: sequence similarity to microbial ribokinases and fructokinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 93 (3): 1232-1237.

Spychala J (2000). Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacology and therapeutics*, 87 (2-3): 161-173.

Srimaroeng C, Perry JL and Pritchard JB (2008). Physiology, structure, and regulation of the cloned organic anion transporters. *Xenobiotica*, 38 (7-8): 889-935 doi: 10.1080/00498250801927435.

Stacchini A, Aragno M, Vallario A, Alfarano A, Circosta P, Gottardi D, Faldella A, Rege-Cambrin G, Thunberg U, Nilsson K and Caligaris-Cappio F (1999). MEC1 and MEC2: two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic leukaemia in prolymphocytoid transformation. *Leukemia research*, 23 (2): 127-136.

Staglar I (2016). The power of OMICs. *Biochemical and biophysical research communications*, 479 (4): 607-609 doi: 10.1016/j.bbrc.2016.09.095.

Stechly L, Morelle W, Dessein AF, André S, Grard G, Trinel D, Dejonghe MJ, Leteurtre E, Drobeq H, Trugnan G, Gabius HJ and Huet G (2009). Galectin-4-regulated delivery of glycoproteins to the brush border membrane of enterocyte-like cells. *Traffic*, 10 (4): 438-450 doi: 10.1111/j.1600-0854.2009.00882.x.

Stecula A, Schlessinger A, Giacomini KM and Sali A (2017). Human concentrative nucleoside transporter 3 (hCNT3, SLC28A3) forms a cyclic homotrimer. *Biochemistry*, 56: 3475-3483.

Stefanelli C, Stanic I, Bonavita F, Flamigni F, Pignatti C, Guarnieri C and Caldarera CM (1998). Inhibition of glucocorticoid-induced apoptosis with 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase. *Biochemical and biophysical research communications*, 243 (3): 821-826.

Stocker S, Riedmaier A, Schwab M and Giachini K (2013). OCT (SLC22A) and OCTN family, in *Pharmacogenomics of human drug transporters*, John Wiley Et Sons, New Jersey.

Sturm I, Bosanquet AG, Hermann S, Güner D, Dörken B and Daniel PT (2003). Mutation of p53 and consecutive selective drug resistance in B-CLL occurs as a consequence of prior DNA-damaging chemotherapy. *Cell death and differentiation*, 10 (4): 477-484.

Bibliografia

Su RY, Chao Y, Chen TY, Huang DY and Lin WW (2007). 5-Aminoimidazole-4-carboxamide riboside sensitizes TRAIL- and TNF α -induced cytotoxicity in colon cancer cells through AMP-activated protein kinase signaling. *Molecular cancer therapeutics*, 6 (5): 1562-1571.

Sundaram M, Yao SY, Ng AM, Griffiths M, Cass CE, Baldwin SA and Young JD (1998). Chimeric constructs between human and rat equilibrative nucleoside transporters (hENT1 and rENT1) reveal hENT1 structural domains interacting with coronary vasoactive drugs. *The journal of biological chemistry*, 273 (34): 21519-21525.

Sundaram M, Yao SY, Ingrams JC, Berry ZA, Abidi F, Cass CE, Baldwin SA and Young JD (2001a). Topology of a human equilibrative, nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-sensitive nucleoside transporter (hENT1) implicated in the cellular uptake of adenosine and anti-cancer drugs. *The journal of biological chemistry*, 276 (48): 45270-45275.

Sundaram M, Yao SY, Ng AM, Cass CE, Baldwin SE and Young JD (2001b). Equilibrative nucleoside transporters: mapping regions of interaction for the substrate analogue nitrobenzylthioinosine (NBMPR) using rat chimeric proteins. *Biochemistry*, 40: 8146-8151.

Suomalainen A and Isohanni P (2010). Mitochondrial DNA depletion syndromes- Many genes, common mechanisms. *Neuromuscular disorders*, 20: 429-437.

Suttle DP, Bugg BY, Winkler JK and Kanalas JJ (1988). Molecular cloning and nucleotide sequence for the complete coding region of human UMP synthase. *Biochemistry*, 85: 1754-1758.

Swinnen JV, Beckers A, Brusselmans K, Organe S, Segers J, Timmermans L, Vanderhoydonc F, Deboel L, Derua R, Waelkens E, De Schrijver E, Van de Sande T, Noël A, Foufelle F and Verhoeven G (2005). Mimicry of a cellular low energy status blocks tumor cell anabolism and suppresses the malignant phenotype. *Cancer research*, 65 (6): 2441-2448.

T

Tan AS, Baty JW, Dong LF, Bezawork-Gelelta A, Endaya B, Goodwin J, Bajzikova M, Kovarova J, Peterka M, Yan B, Pesdar EA, Sobol M, Filimonenko A, Stuart S, Vondrusova M, Kluckova K, Sachaphibulkij K, Rohlena J, Hozak P, Truksa J, Eccles D, Haupt LM, Griffiths LR, Neuzil J and Berridge MV (2015). Mitochondrial genome acquisition restores respiratory function and tumorigenic potential of cancer cells without mitochondrial DNA. *Cell metabolism*, 21: 81-94.

Tanaka T, Doe JM, Horstmann SA, Ahmad S, Ahmad A, Min SJ, Reynolds PR, Suram S, Gaydos J, Burnham EL and Vandivier RW (2014). Neuroendocrine signaling via the serotonin transporter regulates clearance of apoptotic cells. *The journal of biological chemistry*, 289 (15): 10466-10475.

Tennyson CN, Klamut HJ and Worton RG (1995). The human dystrophin gene requires 16 hours to be transcribed and is cotranscriptionally spliced. *Nature genetics*, 9 (2): 184-190.

Thevelein JM and Voordeckers K (2009). Functioning and evolutionary significance of nutrient transceptors. *Molecular biology and evolution*, 26 (11): 2407-2414 doi: 10.1093/msp168.

Thorn JA and Jarvis SM (1996). Adenosine transporters. *General pharmacology*, 27 (4): 613-620.

V

Valdés R, Ortega MA, Casado FJ, Felipe A, Gil A, Sánchez-Pozo A and Pastor-Anglada M (2000). Nutritional regulation of nucleoside transporter expression in rat small intestine. *Gastroenterology*, 119 (6): 1623-1630.

Valdés R, Casado FJ and Pastor-Anglada M (2002). Cell-cycle-dependent regulation of CNT1, a concentrative nucleoside transporter involved in the uptake of cell-cycle-dependent nucleoside-derived anticancer drugs. *Biochemical and biophysical research communications*, 296 (3): 575-579.

Valdés R, Fernández-Veledo S, Aymerich I, Casado FJ and Pastor-Anglada M (2006). TGF-beta transcriptionally activates the gene encoding the high-affinity adenosine transporter CNT2 in rat liver parenchymal cells. *Cellular and molecular life sciences*, 63 (21): 2527-2537.

Valdés R, Elferich J, Shinde U and Landfear SM (2014). Identification of the intracellular gate for a member of the equilibrative nucleoside transporter (ENT) family. *The journal of biological chemistry*, 289 (13): 8799-8809.

Vallon V, Muhlbauer B and Osswald H (2006). Adenosine and kidney function. *Physiological reviews*, 86 (3): 901-940.

Van Aubel RA, Masereeuw R and Russel FG (2000). Molecular pharmacology of renal organic anion transporters. *American journal of physiology. Renal physiology*, 279 (2): F216-232.

Van Den Neste E, Cazin B, Janssens A, González-Barca E, Terol MJ, Levy V, Pérez de Oteyza J, Zachee P, Saunders A, de Frias M and Campàs C (2013). Acadesine for patients with relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): a multicenter phase I/II study. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 71 (3): 581-591 doi: 10.1007/s00280-012-2033-5.

Vander Heiden MG, Cantley LC and Thompson CB (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324 (5930): 1029-1033.

Vernaleken A, Veyhl M, Gorboulev V, Kottra G, Palm D, Burckhardt BC, Burckhardt G, Pipkorn R, Beier N, Van Amsterdam C and Koepsell H (2007). Tripeptides of RS1 (RSC1A1) inhibit a monosaccharide-dependent exocytotic pathway of Na⁺-D-glucose cotransporter SGLT1 with high affinity. *The journal of biological chemistry*, 282 (39): 28501-28513.

Veyhl M, Keller T, Gorboulev V, Vernaleken A and Koepsell H (2006). RS1 (RSC1A1) regulates the exocytotic pathway of Na⁺-D-glucose cotransporter SGLT1. *American journal of physiology. Renal physiology*, 291 (6): F1213-1223.

Viel Oliva, Albert (2017). Determinants estructurals i implicacions funcionals de l'interactoma proteic d'hCNT1. Tesi Doctoral, Universitat de Barcelona.

Vincent EE, Coelho PP, Blagih J, Griss T, Viollet B and Jones RG (2015). Differential effects of AMPK agonists on cell growth and metabolism. *Oncogene*, 34 (28): 3627-3639 doi: 10.1038/onc.2014.301.

Visser F, Vickers MF, Ng AM, Baldwin SA, Young JD and Cass CE (2002). Mutation of residue 33 of human equilibrative nucleoside transporters 1 and 2 alters sensitivity to inhibition of transport by dilazep and dipyridamole. *The journal of biological chemistry*, 277 (1): 395-401.

Bibliografia

Vickers MF, Mani RS, Sundaram M, Hogues DL, Young JD, Baldwin SA and Cass CE (1999). Functional production and reconstitution of the human equilibrative nucleoside transporter (hENT1) in *Saccharomyces cerevisiae*. *The biochemical journal*, 339 (1): 21-32.

Voet D and Voet JG (2004). *Biochemistry*.

Volonté C and D'Ambrosi N (2009). Membrane compartments and purinergic signalling: the purinome, a complex interplay among ligands, degrading enzymes, receptors and transporters. *The FEBS journal*, 276 (2): 318-329 doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06793.

W

Wang J and Giacomini KM (1997). Molecular determinants of substrate selectivity in Na⁺-dependent nucleoside transporters. *The journal of biological chemistry*, 272 (46): 28845-28848.

Ward JL, Sherali A, Mo ZP and Tse CM (2000). 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. *The journal of biological chemistry*, 275: 8375-8381.

Ward JL, Leung GP, Toan SV and Tse CM (2003). Functional analysis of site-directed glycosylation mutants of the human equilibrative nucleoside transporter-2. *Archives of biochemistry and biophysics*, 411 (1): 19-26.

Wojtal KA, Eloranta JJ, Hruz P, Gutmann H, Drewe J, Staumann A, Beglinger C, Fried M, Kullak-Ublick GA and Vavricka SR (2009). Changes in mRNA expression levels of solute carrier transporters in inflammatory bowel disease patients. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 37 (9): 1871-1877 doi: 10.1124/dmd.109.027367.

X

Xiang X, Saha AK, Wen R, Ruderman NB and Luo Z (2004). AMP-activated protein kinase activators can inhibit the growth of prostate cancer cells by multiple mechanisms. *Biochemical and biophysical research communications*, 321 (1): 161-167.

Y

Yamaoka T, Kondo M, Honda S, Iwahana H, Moritani M, Ii S, Yoshimoto K and Itakura M (1997). Amidophosphoribosyltransferase limits the rate of cell growth-linked *de novo* purine biosynthesis in the presence of constant capacity of salvage purine biosynthesis. *The journal of biological chemistry*, 272 (28): 17719-17725.

Yamaoka T, Yano M, Kondo M, Sasaki H, Hino S, Katashima R, Moritani M and Itakura M (2001). Feedback inhibition of amidophosphoribosyltransferase regulates the rate of cell growth via purine nucleotide, DNA, and protein syntheses. *The journal of biological chemistry*, 276 (24): 21285-21291.

Yan Q (2005). Pharmacogenomics and systems biology of membrane transporters. *Molecular biotechnology*, 29: 75-85.

Yao SY, Ng AM, Muzyka WR, Griffiths M, Cass CE, Baldwin SA and Young JD (1997). Molecular cloning and functional characterization of nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-sensitive (es) and NBMPR-insensitive (ei) equilibrative nucleoside transporter proteins (rENT1 and rENT2) from rat tissues. *The journal of biological chemistry*, 272 (45): 28423-28430.

Yao SY, Ng AM, Sundaram M, Cass CE, Baldwin SA and Young JD (2001a). Transport of antiviral 3'-deoxy-nucleoside drugs by recombinant human and rat equilibrative, nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-insensitive (ENT2) nucleoside transporter proteins produced in *Xenopus* oocytes. *Molecular membrane biology*, 18 (2): 161-167.

Yao SY, Sundaram M, Chomey EG, Cass CE, Baldwin SA and Young JD (2001b). Identification of Cys¹⁴⁰ in helix 4 as an exofacial cysteine residue within the substrate-translocation channel of rat equilibrative nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-insensitive nucleoside transporter rENT2. *The biochemical journal*, 353 (2): 387-393.

Yao SY, Ng AM, Vickers MF, Sundaram M, Cass CE, Baldwin SA and Young JD (2002). Functional and molecular characterization of nucleobase transport by recombinant human and rat equilibrative nucleoside transporters 1 and 2. *The journal of biological chemistry*, 277 (28): 24938-24948.

Yao SY, Ng AM, Cass CE, Baldwin AS and Young JD (2011). Nucleobase transport by human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1). *The journal of biological chemistry*, 286 (37): 32552-32562.

Yee SW, Shima JE, Hesselson S, Nguyen L, De Val S, Lafond RJ, Kawamoto M, Johns SJ, Stryke D, Kwok PY, Ferrin TE, Black BL, Gurwitz D, Ahituv N and Giacomini KM (2009). Identification and characterization of proximal promoter polymorphisms in the human concentrative nucleoside transporter 2 (SLC28A2). *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 328 (3): 699-707.

Yegutkin GG (2008). Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochimica et biophysica acta*, 1783: 673-694.

Young JD, Yao SY, Baldwin JM, Cass CE and Baldwin SA (2013). The human concentrative and equilibrative nucleoside transporters families, SLC28 and SLC29. *Molecular aspects of medicine*, 34: 529-547.

Z

Zenz T, Vollmer D, Trbusek M, Smardova J, Benner A, Soussi T, Helfrich H, Heuberger M, Hoth P, Fuge M, Denzel T, Häbe S, Malcikova J, Kuglik P, Truong S, Patten N, Wu L, Oscier D, Ibbotson R, Gardiner A, Tracy I, Lin K, Pettitt A, Pospisilova S, Mayer J, Hallek M, Döhner H, Stilgenbauer S and European Research Initiative on CLL (ERIC) (2010). TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. *Leukemia*, 24 (12): 2072-2079 doi: 10.1038/leu.2010.208.

Zhang J, Visser F, King KM, Baldwin SA, Young JD and Cass CE (2007). The role of nucleoside transporters in cancer chemotherapy with nucleoside drugs. *Cancer metastasis reviews*, 26: 85-110.

Zhao A, Tsechansky M, Swaminathan J, Cook L, Ellington AD and Marcotte EM (2013). Transiently transfected purine biosynthetic enzymes form stress bodies. *Plos one*, 8 (2): e56203.

Bibliografia

Zhao A, Tsechansky M, Ellington AD and Marcotte EM (2014). Revisiting and revising the purinosome. *Molecular bioSystems*, 10: 369-374.

Zhao H, French JB, Fang Y and Benkovic SJ (2013). The purinosome, a multi-protein complex involved in the *de novo* biosynthesis of purines in humans. *Chemical communication*, 49: 4444-4452.

Zheng X, Carstens JL, Kim J, Scheible M, Kaye J, Sugimoto H, Wu CC, LeBleu VS and Kalluri R (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature*, 527 (7579): 525-530 doi: 10.1038/nature16064.

Zhou M, Duan H, Engel K, Xia L and Wang J (2010). Adenosine transport by plasma membrane monoamine transporter: reinvestigation and comparison with organic cations. *Drug metabolism and disposition*, 38 (10): 1798- 1805.

Zimmerman MA, Tak E, Ehrentraut SF, Kaplan M, Giebler A, Weng T, Choi DS, Blackburn MR, Kam I, Eltzschig HK and Grenz A (2013). Equilibrative nucleoside transporter (ENT)-1-dependent elevation of extracellular adenosine protects the liver during ischemia and reperfusion. *Hepatology*, 58 (5): 1766-1778 doi: 10.1002/hep.26505.

Zollner G, Wagner M, Fickert P, Silbert D, Fuchsbichler A, Zatloukal K, Denk H and Trauner M (2005). Hepatobiliary transporter expression in human hepatocellular carcinoma. *Liver international*, 25 (2): 367-379.

