



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Proteína multifuncional ADE2 como nexo entre vías de recuperación y síntesis *de novo* de nucleótidos

Liska Rayen Caviedes Cárdenas

**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](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://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

**Proteína multifuncional ADE2 como nexo entre vías  
de recuperación y síntesis *de novo* de nucleótidos**

**Liska Rayen Caviedes Cárdenas**

**Barcelona**

**2018**



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

PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOMEDICINA.

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOMEDICINA MOLECULAR.  
FACULTAT DE BIOLOGIA.

**“Proteína multifuncional ADE2 como nexo entre vías de  
recuperación y síntesis *de novo* de nucleótidos.”**

Memòria presentada per:

**Liska Rayen Caviedes Cárdenas**

L'interessat,

Vistiplau dels directors,

**Dr. MARÇAL PASTOR ANGLADA**

Catedràtic de Bioquímica i Biologia  
Molecular  
Departament de Bioquímica i  
Biomedicina Molecular  
Facultat de Biologia  
Universitat de Barcelona

**Dra. SANDRA PÉREZ TORRAS**

Investigadora CIBERehd  
Professora Associada  
Departament de Bioquímica i  
Biomedicina Molecular  
Facultat de Biologia  
Universitat de Barcelona

**Barcelona, 2018**



Este trabajo fue realizado en el Laboratorio *Molecular Pharmacology and Experimental Therapeutics* (MPET) en el departamento de Bioquímica y Biomedicina Molecular de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona, IBUB y Institut de Recerca Sant Joan de Déu. Barcelona, España. La investigación que ha conducido a esta tesis doctoral ha recibido financiamiento del por parte del Gobierno de Chile a través de su programa de becas de doctorado en el extranjero, Becas Chile, CONICYT, Ministerio de Educación. Fundación Ramón Areces (España) y a través del SAF2014-52067-R por el ministerio de economía y competitividad (MINECO, España)



“No te rindas, aún estas a tiempo  
De alcanzar y comenzar de nuevo,  
Aceptar tus sombras, enterrar tus miedos,  
Liberar el lastre, retomar el vuelo.

No te rindas que la vida es eso,  
Continuar el viaje,  
Perseguir tus sueños,  
Destruir el tiempo,  
Correr los escombros y destapar el cielo”.

Mario Benedetti





*A mi Padre,*

*A mi Madre,*

*A mis Hermanos,*

*Por su amor y apoyo incondicional.*



# Índice

|   |    |
|---|----|
| Introducción. ....  | 17 |
| Biología de los nucleótidos y nucleósidos. ....   | 17 |
| Síntesis de novo de nucleótidos de Pirimidinas. ....  | 18 |
| Síntesis de novo de nucleótidos de Purinas. ....  | 21 |
| “Metabolon” en el metabolismo de Purinas: El Purinosoma.....  | 23 |
| Vías metabólicas de recuperación.....   | 25 |
| Transportadores de nucleósidos. ....  | 27 |
| Transportadores Equilibrativos de Nucleósidos. ....   | 27 |
| Transportadores Concentrativos de Nucleósidos.....  | 29 |
| Distribución de los transportadores de nucleósidos. ....  | 31 |
| Otras funciones de los Transportadores Concentrativos de Nucleósidos.....   | 33 |
| Cambios metabólicos asociados a la biología tumoral que afectan la biosíntesis de nucleótidos.....  | 34 |
| Hipótesis y Objetivos .....   | 39 |
| Resultados y Discusión .....  | 43 |
| Identificación de ADE2 como parte del interactoma de hCNT3.....   | 43 |
| Validación de la Interacción ADE2/ADK.....  | 44 |
| Efecto de la biodisponibilidad de nucleósidos en la modulación de la expresión de ADE2.....   | 58 |
| Efecto del desbalance de nucleósidos de pirimidina sobre la expresión de PAICS. 58  |    |
| Efecto de la disponibilidad extracelular de nucleósidos sobre la expresión de PAICS y los transportadores de nucleósidos, elementos clave de la vía de recuperación de nucleósidos..... | 62 |
| Discusión general.....  | 81 |

|  |     |
|--|-----|
| Conclusiones.....  | 91  |
| Metodología. ....  | 95  |
| 1. Cultivo Celular.....  | 95  |
| 1.1. MEC-1.....  | 95  |
| 1.2. HEK-293 (ATCC CRL 1573) .....                                       | 95  |
| 1.3. HT-29 (ATCC HTB-38) .....   | 95  |
| 1.4. HeLa.....   | 96  |
| 1.5. HeLa PAICS KO.....  | 96  |
| 2. Tratamientos en cultivos celulares.....                               | 96  |
| 2.1. Obtención de Suero libre de nucleósidos .....                       | 96  |
| 3. Análisis de la expresión del mRNA .....                               | 97  |
| 3.1. Extracción de ARN y retrotranscripción.....                         | 97  |
| 3.2. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qRT-PCR). .....  | 97  |
| 4. Análisis de la expresión proteica .....                               | 98  |
| 4.1. Extracción de proteínas.....  | 98  |
| 4.2. Western blot.....   | 98  |
| 4.3. Co-Inmunoprecipitación de Mutantes.....                             | 99  |
| 4.4. Co-Inmunoprecipitación de Proteínas endógenas.....                  | 99  |
| 5. Análisis de la Actividad de la DHODH .....                            | 100 |
| 6. Métodos de expresión heteróloga transitoria. ....                     | 100 |
| 6.1. Transfección por Fosfato de calcio.....                             | 100 |
| 6.2. Lipofectamina.....  | 101 |
| 7. Biología Molecular y técnicas relacionadas.....                       | 101 |
| 7.1. Obtención del cDNA de PAICS.....                                    | 101 |
| 7.2. Subclonamiento de PAICS en el vector pCDNA3.1+.....                 | 101 |
| 7.3. Transformación de Bacterias competentes mediante Shock térmico..... | 102 |

|      |  |     |
|------|--|-----|
| 7.4. | Mutación sitio dirigida .....                        | 102 |
| 7.5. | Secuenciación de vectores .....                      | 103 |
| 7.6. | Digestión enzimática del DNA .....                   | 103 |
| 7.7. | Extracción de DNA plasmidial .....                   | 103 |
| 7.8. | Purificación de DNA a partir de gel de agarosa ..... | 104 |
| 8.   | CRISPR.....  | 104 |
| 8.1. | CRISPR CAS9 .....                                    | 104 |
| 8.2. | Doble Nickasa .....                                  | 104 |
| 9.   | Análisis estadísticos .....                          | 104 |
|      | Bibliografía.....                                    | 107 |
|      | Anexo.....   | 123 |



# Introducción



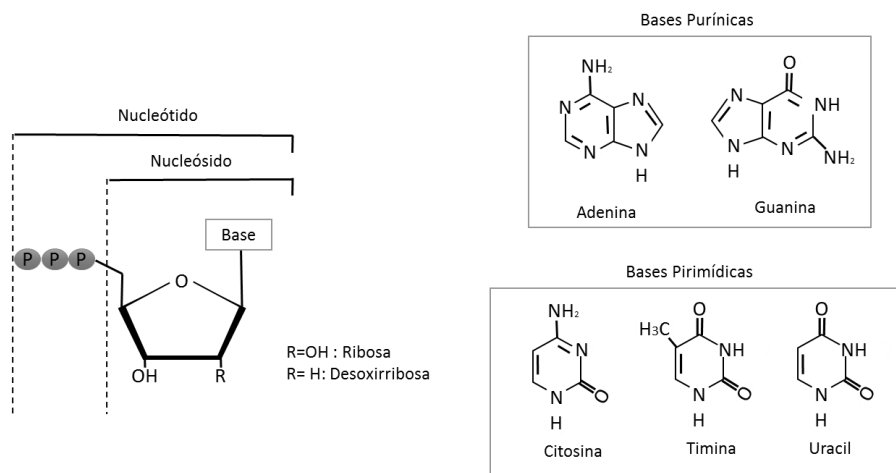


# Introducción.

## Biología de los nucleótidos y nucleósidos.

Los nucleósidos y nucleótidos son componentes vitales en todas las células de un organismo y se encuentran involucrados en diversos procesos biológicos. Estas moléculas no sólo forman parte de dos de las biomoléculas más importantes de un ser vivo, el DNA y el RNA, sino que también participan activamente en la señalización celular, regulación enzimática, formación de enzimas y regulación del ciclo celular.

La estructura de un nucleósido está compuesta por una base nitrogenada y una pentosa. Una vez el nucleósido es internalizado mediante los transportadores de nucleósidos, es fosforilado dando origen a los nucleótidos, los cuales pueden ser mono, di o tri fosforilados. Dependiendo de la base nitrogenada que los componga, podemos separarlos en dos grupos: purínicos y pirimídicos (figura 1).



**Figura 1. Estructura de nucleósidos y nucleótidos.**

A nivel metabólico el ATP es uno de los nucleótidos más importantes en la célula, ya que aporta los grupos fosfatos necesarios para la síntesis de otros nucleótidos y es el principal dador de fosfatos para otras reacciones metabólicas. Por otro lado, GTP está

involucrado en síntesis proteica y CTP en el metabolismo lipídico. También los nucleótidos pueden actuar como mediadores fisiológicos como es el caso de cAMP y cGMP que ejercen de segundo mensajero en variados procesos biológicos.

Por otro lado, los nucleósidos también median diversos procesos biológicos. Adenosina, a través de su interacción con sus receptores ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  y  $A_3$ ) participa en la neurotransmisión, vasodilatación y lipólisis entre otros procesos biológicos.

En la actualidad se han identificado 17 patologías relacionadas con las deficiencias en el metabolismo de los nucleótidos/nucleósidos. Casi todas estas patologías están relacionadas con mutaciones en las enzimas encargadas de la síntesis de estos mismos (Jurecka 2009) .

La obtención de estas moléculas se puede llevar a cabo mediante dos vías denominadas síntesis *de novo* y vías de recuperación.

En condiciones en que la célula necesita incrementar sus niveles de nucleótidos para llevar a cabo procesos biológicos tales como división celular, proliferación y crecimiento, la síntesis *de novo* de nucleótidos es esencial para mantener constantes estos pools intracelulares. Es así como, bajo estas determinadas condiciones la célula promueve la síntesis *de novo* de nucleótidos de pirimidinas y purinas. Este proceso, es de alto costo energético, altamente regulado y conservado, tanto para células eucariotas como procariontas.

Síntesis *de novo* de nucleótidos de Pirimidinas.

En el caso de la síntesis *de novo* de pirimidinas se necesitan tres moléculas precursoras: glutamina, ATP y bicarbonato (figura 2). Estas moléculas precursoras darán origen a los nucleótidos de pirimidinas por medio de 6 pasos los cuales están catalizados por tres proteínas diferentes. Las tres primeras reacciones las realiza la proteína citoplasmática CAD, la cual es un acrónimo de las tres actividades enzimáticas que realiza. Carbamoil fosfato sintetasa, Aspartato transcarbamilasa y Dihidroorotasa. CAD posee sus tres actividades enzimáticas en una única cadena proteica y su acción enzimática es realizada en el citoplasma, sin embargo, su producto (dihidroorotato)

difunde a la mitocondria donde es transformado a orotato por la dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH). La DHODH es la única enzima de las vías de síntesis *de novo* que se encuentra ubicada en la membrana mitocondrial. En paralelo a la oxidación de dihidroorotato a orotato, DHODH cataliza la reducción de la ubiquinona en la membrana mitocondrial. Estos dos procesos que ocurren de forma paralela son el nexo entre la síntesis *de novo* de pirimidinas y la cadena respiratoria. Los últimos dos pasos de la síntesis *de novo* de pirimidinas son citoplasmáticos y son catalizados por la enzima bifuncional de la vía, la orotato fosforibosiltransferasa/orotidilato descarboxilasa (también llamada uridina monofosfato sintetasa). Es también aquí cuando se une el anillo pirimidínico a la ribosa. A partir del producto final uridina monofosfato (UMP) se pueden sintetizar los tres nucleótidos de pirimidinas, UMP, CMP y dTDP.

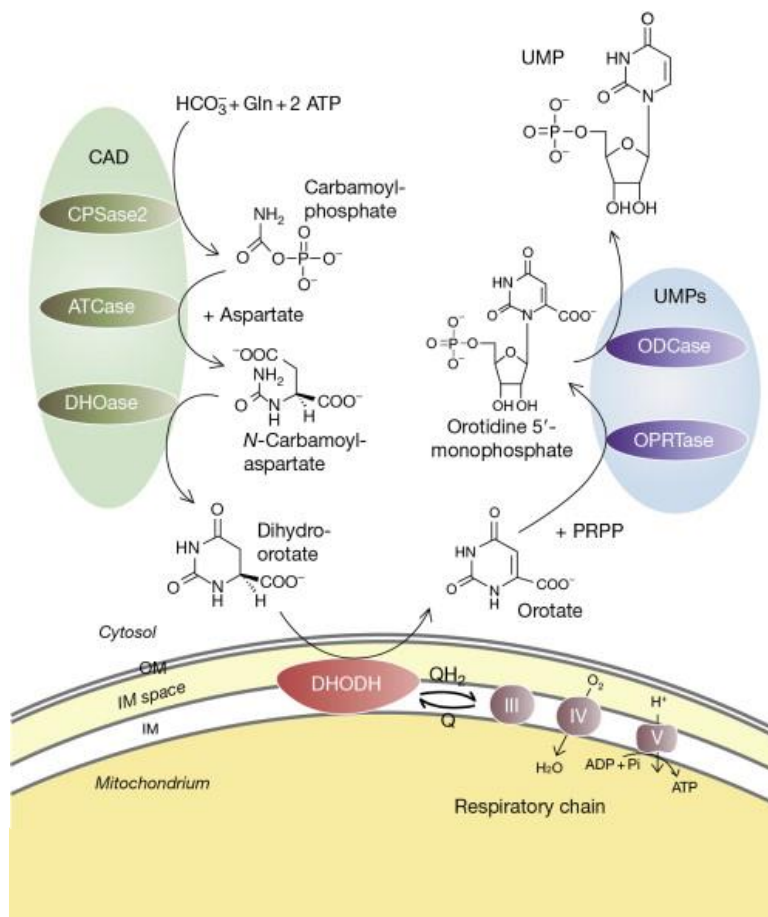


Figura 2. Síntesis *de novo* de pirimidinas.

El hecho que la regulación del pool de pirimidinas dependa en parte de la síntesis *de novo* de éstas y que este proceso sea esencial para la proliferación y crecimiento celular ha propiciado que durante los últimos 40 años se hayan desarrollado diferentes inhibidores, que actúan principalmente sobre dos proteínas, CAD y DHODH. CAD es inhibida por PALA (N-(phosphonacetyl)-L-aspartate)(Collins and Stark 1971), la cual actúa sobre la actividad Aspartato transcarbamilasa (ATCase) de la proteína. Se ha demostrado que PALA detiene *in vitro* la proliferación de células tumorales (Tsuboi, Edmunds, and Kwong 1977) lo cual sugiere que podría ser utilizada como fármaco anti-tumoral (Grem et al. 1988). La otra enzima de la vía que ha sido diana para diversos inhibidores es DHODH y dentro de los más utilizados están: Brequinar (Chen et al. 1992), Leflunomida y Teriflunomida (A771726) (Greene et al. 1995).

Brequinar es un inhibidor específico y potente de la DHODH. Su efecto ha sido evaluado en varios ensayos clínicos (fase I y fase II) en pacientes con tumores sólidos avanzados (Arteaga et al., 1989; Burris et al., 1998; Noe et al., 1990; Schwartzmann et al., 1990). Sin embargo, en estos estudios no fue efectivo y las dosis y tratamientos utilizados son cuestionables. Recientemente se ha visto que en Leucemia mieloide aguda Brequinar reduce la proliferación e induce diferenciación celular (Sykes et al. 2016). Además, hasta la fecha Brequinar no ha sido aprobada por la FDA (“food drug and administration”) para su uso en pacientes.

Durante los últimos 20 años el efecto de Leflunomida y de su forma activa, Teriflunomida, ha sido ampliamente estudiado, ya que no sólo han demostrado ser buenos inhibidores *in vitro*, sino que también han sido probados en diferentes ensayos clínicos lo que les ha permitido ser un fármaco que se utiliza actualmente en clínica. Ambos inhibidores han demostrado efectos antiinflamatorios, inmunosupresores y/o anti proliferativos, por lo que se utilizan no solo en desordenes proliferativos, sino también en enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide. *In vitro* en células tumorales ambos fármacos promueven arresto celular en diferentes fases del ciclo (G y S). Estos procesos son reversibles al añadir dosis de uridina extracelulares (100µM) (L. Liu et al. 2017). Sin embargo, leflunomida posee una serie de otras dianas lo que hace discutible su especificidad.

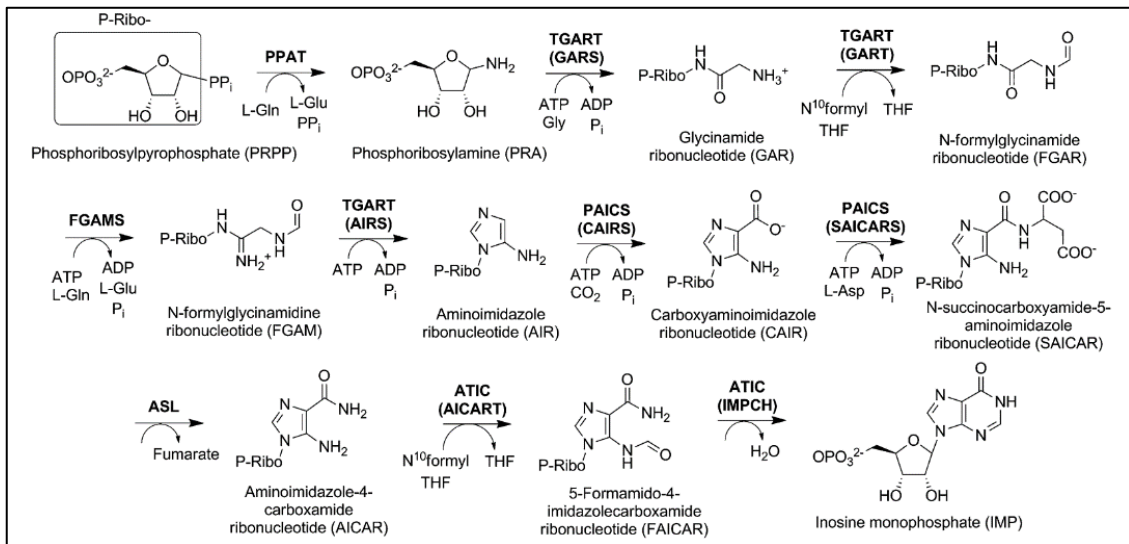
Hasta ahora no existen evidencias que en la síntesis *de novo* de nucleótidos de pirimidinas exista algún tipo de regulación estructural asociada a la formación de complejos multiproteicos. Sin embargo, existen otros tipos de regulaciones. Se ha visto que CAD puede oligomerizar en respuesta a factores de crecimiento y aminoácidos (Robitaille et al. 2013), lo cual concuerda con la capacidad de esta proteína de formar oligómeros, debido a que en su forma activa ya es un hexámero. *In vivo* estas oligomeraciones son potenciadas por mTORC1, ya que la fosforilación de CAD por S6K contribuye a la regulación por el eje mTORC1 y representa una integración de señales nutricionales y endocrinas susceptibles de promover la síntesis *de novo* de pirimidinas y la progresión del ciclo celular (Ben-Sahra et al. 2013; Robitaille et al. 2013).

Síntesis *de novo* de nucleótidos de Purinas.

Para que la síntesis *de novo* de purinas se realice correctamente, es imprescindible la fosforibosil pirofosfato (PRPP) además de Glutamina, Glicina, CO<sub>2</sub> y Formil-THF, estas últimas moléculas son donadoras de los átomos de carbono y grupos amino que construirán los anillos purínicos. En el caso de los eucariotas superiores la síntesis *de novo* de purinas se realiza mediante diez reacciones enzimáticas, las cuales son catalizadas por seis reacciones enzimáticas diferentes. De estas proteínas hay tres que son monofuncionales (PPAT, FGAMS, ASL), dos proteínas bifuncionales (PAICS y ATIC) y una proteína trifuncional (TGART) (Zhao et al. 2013) (Figura 3). El producto final de estas reacciones enzimáticas es la inosina mono fosfato (IMP) la cual puede ser metabolizada a Adenosina monofosfato (AMP) o a Guanosina monofosfato (GMP) dependiendo de los requerimientos celulares.

La primera reacción de esta vía es la conversión del fosforibosilpirofosfato (PRPP) a 5-fosforibosilamina (PRA) por la PRPP aminotransferasa (PPAT). Este paso es uno de los limitantes de la síntesis *de novo*. La transformación de PRA a ribonucleotido N-fomilglicinamida (FGAR) por la adición de un grupo formil y glicil es catalizada por la fosforibosilglicinamida sintetasa (GARS) y el dominio de GART (TrifGART) fosforibosilglicinamida formiltransferasa (GAR Tfase). La tercera función de GART es no secuencial, por lo que en el cuarto paso de la vía el intermediario FGAR es convertido en

el ribonucleótido N-formilglicinamida (FGAM) por la fosforibosil formilglicinamida sintetasa (FGAMS o PFAS). Posteriormente se forma el ribonucleótido aminoimidazol (AIR) por la acción de fosforibosilaminoimidazol sintetasa (AIRS), el cual se corresponde con el tercer dominio de GART. El paso seis y siete es catalizado por la proteína bifuncional fosforibosil aminoimidazole carboxilasa (CAIRS)/ fosforibosil aminoimidazol succinocaboxamida sintetasa (SAICARS) (PAICS) la cual utiliza AIR para generar el ribonucleótido N-succinocarboxiamida-5-aminoimidazol (SAICAR) en dos pasos secuenciales. SAICAR es procesado a ribonucleótido aminoimidazol-4-coboxiamida (AICAR) en una reacción reversible, catalizada por la adenosuccinato liasa (ADSL). Los dos últimos pasos de la vía convierten a AICAR en IMP por la acción de la proteína bifuncional 5-aminoimidazol-4-carboxiamida formiltransferasa (AICAR Tfase) / IMP ciclohidrolasa (IMPCH) (ATIC).



**Figura 3. Síntesis de novo de purinas. French et al. 2013.**

Para la acción enzimática de estas seis proteínas son necesarias una serie de moléculas y cofactores. Por cada molécula de IMP generada se necesitan cinco moléculas de ATP, dos de glutamina, dos moléculas de formato y una molécula de glicina, aspartato y dióxido de carbono. Glutamina y glutamato pueden venir de la dieta o pueden ser generados por intermedios del ciclo de ácidos tricarboxílicos y son necesarios para la acción enzimática de PPAT, FGAMS y PAICS. Glicina es un producto secundario del metabolismo 1-C de la serina en mitocondria y es necesaria como sustrato para la acción de GART. Formato es un metabolito que es exportado desde la

mitocondria y es necesario para la síntesis de 10-formiltetrahidrofolato el cual es necesario para la acción de GART y ATIC (Fan et al. 2014). Se ha visto que las estructuras cuaternarias de estas enzimas podrían estar regulando su actividad catalítica. Sin embargo, este dato aún no se ha confirmado para PPAT y FGAMS, las cuales se encuentran como tetrámero y monómero, respectivamente. GART es un dímero, PAICS un octómero y ADSL un tetrámero. ATIC se encuentra en un equilibrio mono-dímero, donde el dímero predomina cuando AICAR y 10-formiltetrahidrofolato están presentes.

“Metabolon” en el metabolismo de Purinas: El Purinosoma.

El término “Metabolon” fue definido por primera vez por Paul A. Srere en 1985 como un complejo supramolecular de enzimas metabólicas secuenciales y elementos estructurales celulares. El metabolon se ha observado en diferentes vías metabólicas como en la glicolisis y el ciclo de ácidos tricarboxílicos, en donde las enzimas de estas vías trabajan secuencial y conjuntamente para optimizar los procesos metabólicos (Srere 1985). Si pensamos que para el correcto funcionamiento metabólico y su regulación es necesaria la interacción eficaz de diferentes proteínas, distribuidas por el citoplasma y que estas funcionen como una red eficaz, tiene lógica pensar que algún tipo de estructura reguladora las esté rigiendo. Por supuesto, no estamos hablando de una estructura rígida, sino de algún tipo de regulación transitoria que permita optimizar el proceso.

En el caso de la síntesis *de novo* de purinas hace un par de décadas se hipotetizó que podría estarse rigiendo por algún tipo de estructura. Esta hipótesis nace a partir de ciertos parámetros cinéticos, específicamente si miramos la vida media del primer producto de la vía PRA. PRA posee una vida media tan corta que pasa rápidamente a ser metabolizada por GART, lo que sugiere la proximidad de ambas enzimas (Rudolph and Stubbe 1995; Schendel et al. 1988; Antle et al. 1999). De forma similar, GART cataliza pasos no secuenciales dentro de la misma vía y requiere la actividad de FGAMS para catalizar el cuarto paso de la vía. Este hecho hace que aumente la posibilidad de que GART y FGAMS estén interactuando. La primera evidencia que estas dos proteínas podrían estar interaccionando se realizó en células HeLa mediante microscopía confocal,

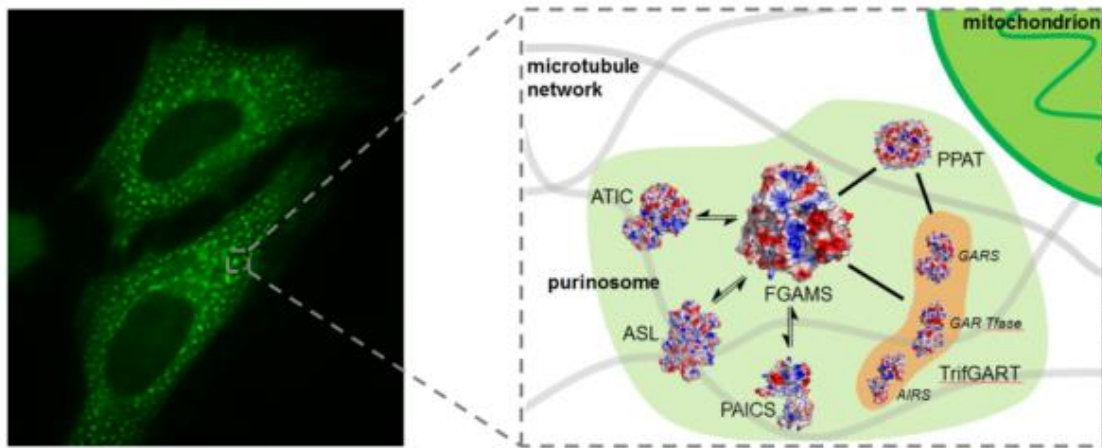


donde mediante la expresión heteróloga transitoria de ambas enzimas y en condiciones en las cuales se producía un aumento de la síntesis *de novo* de purinas se observó un agrupamiento de ambas proteínas (Songon An et al. 2008). Al observar lo que sucedía con las otras cuatro proteínas de la vía, estas mostraban un agrupamiento conjunto con FGAM. Esta estructura transitoria que se forma en condiciones en las cuales se favorece la síntesis *de novo* de purinas se conoce como “Purinosoma” (Songon An et al. 2008). Además, se vio que no existen cambios en la expresión de las proteínas de la vía cuando se utilizaron medio depletado de nucleósidos y medio rico en nucleósidos (Chan et al. 2015; Zhao et al. 2015) y que la formación del purinosoma es independiente de la expresión de G3BP, la cual se utilizó como marcador de estrés y se demostró que el purinosoma no colocaliza con ella (French et al. 2013). Estas observaciones definen el purinosoma como un cuerpo subcelular único (figura 4). Esta estructura puede desensamblarse cuando al medio de cultivo se le añaden purinas exógenas, lo cual sugiere que este complejo es reversible y que se forma con el único propósito de suplir las necesidades celulares de purinas y para optimizar el proceso de síntesis *de novo* de estas.

La formación del purinosoma no es una asociación de proteínas al azar, sino que se forma alrededor de tres de las proteínas de la vía PPAT, GART y FGAMS, las cuales están formando el corazón del purinosoma. Mientras que las otras tres proteínas PAICS, ADSL y ATIC se ubican en la parte periférica de la estructura (Deng et al. 2012; Havugimana et al. 2012; Kristensen, Gsponer, and Foster 2012; Wan et al. 2015).

En muestras de fibroblastos de pacientes con AICAR-ribosiduria y deficiencia de ADSL se ha visto que las mutaciones en ADSL y ATIC disminuyen la formación del purinosoma, sugiriendo que estas proteínas contribuyen a la estabilidad del complejo (Baresova et al. 2012). Además, este mismo grupo demostró que en células HeLa KO de las proteínas GART, ADSL y ATIC, la formación del purinosoma desaparecía completamente (Baresova et al. 2016). Sin embargo, la pérdida de expresión de las proteínas FGAMS o PAICS sólo muestra una disminución significativa de su formación comparado con células HeLa control (Baresova et al. 2012). Además, se ha visto que Adenilatosuccinato sintetasa (ADSS) e IMP dehidrogenasa (IMPDH) también estarían formando parte del purinosoma (Zhao et al. 2015).

La formación de la estructura del purinosoma sugiere que podría haber proteínas accesorias que contribuirían a su estabilidad y actividad como las proteínas Hsp70/Hsp90. Ambas proteínas fueron identificadas por medio de co-inmunoprecipitaciones de FGAMS bajo condiciones en las que se favorecía la formación del purinosoma. La inhibición de Hsp90 por medio de los inhibidores NVP-AUY922 o 17-AAG deriva en el desensamblaje de la estructura del purinosoma de la misma forma que cuando añadimos purinas de forma exógena (French et al. 2013).



**Figura 4. Formación del purinosoma. modificado de Pedley and Benkovic 2017.**

Vías metabólicas de recuperación.

Las vías de recuperación son una alternativa a la síntesis *de novo* de nucleótidos de purinas y pirimidinas. En este proceso se reciclan los nucleósidos y nucleobases de purinas y pirimidinas que se encuentran disponibles en la célula producto del recambio y/o degradación del material celular. También en este proceso se incluyen los nucleósidos, nucleótidos y nucleobases provenientes de la dieta. A diferencia de la síntesis *de novo* que es un proceso altamente conservado, las vías de recuperación muestran una amplia diversidad entre las diferentes especies.

Las bases de purina libres se pueden convertir en sus nucleótidos correspondientes por la acción de dos enzimas, la Hipoxantina-Guanosil fosforibosiltransferasa (HGPRT) que en presencia de fosforibosilpirofosfatasa (PRPP)

permite obtener inosina monofostato (IMP) y guanosa monofosfato (GMP) y por la acción de Adenina fosforibosiltransferasa (APRT) obtenemos del mismo modo adenosina. Como consecuencia de este proceso la síntesis *de novo* de purinas se ve disminuida cuando purinas exógenas como hipoxantina se encuentran disponibles (Becker and Kim 1987; Yamaoka et al. 2001).

Por otro lado, el proceso de recuperación de las pirimidinas es más eficiente que el de purinas. Los nucleósidos pueden ser metabolizados por kinasas. En humanos dentro de las desoxirribonucleosidos kinasas se encuentra la deoxicitidina kinas (dCK), dos timidilato kinasas (TK1 y TK2) y la desoxiguanosina kinas (dGK). Estas kinasas se encuentran distribuidas por el citosol (dCK y TK1) y en la mitocondria (TK2 y gCK).

Por otro lado, citidina y deoxicitidina pueden ser recuperadas por acción de la citidina deaminasa (CDA) produciendo uridina y deoxiuridina (Navaratnam and Sarwar 2006). Citidina también puede ser recuperada directamente por la acción de la Uridina-Citidina kinas produciendo CMP (Suzuki et al. 2004).

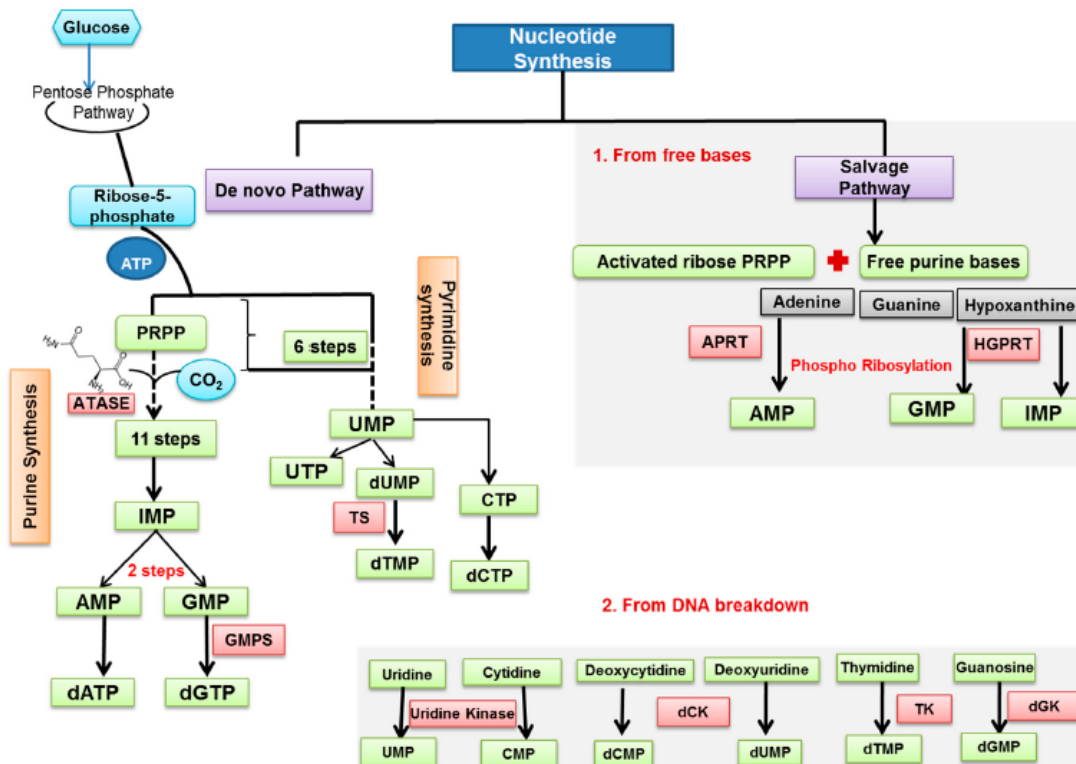


Figura 5. Vías de recuperación de nucleótidos y desoxinucleotidos. Modificado de Schmidt, Nagar, and Martinez 2017.

## Transportadores de nucleósidos.

El proceso de recuperación depende de la incorporación de (desoxi) nucleósidos y nucleobases para su posterior metabolización. Debido a su composición química estas moléculas no pueden difundir a través de la membrana plasmática, sino que necesitan ser recaptadas por medio de proteínas transportadoras. Estas proteínas no solo juegan un rol fundamental en la incorporación de estas moléculas, sino que contribuirán al correcto desarrollo celular y tisular. Dentro de nuestro genoma existen dos familias génicas que codifican los transportadores de nucleósidos; estas son *SLC28* y *SLC29*. La familia codificada por *SLC28* corresponde a los transportadores concentrativos de nucleósidos (hCNTs) la cual está compuesta por hCNT1, hCNT2 y hCNT3. Mientras que la *SLC29* corresponde a los transportadores equilibrativos de nucleósidos (hENTs) la cual está compuesta por hENT1, hENT2, hENT3 y hENT4.

## Transportadores Equilibrativos de Nucleósidos.

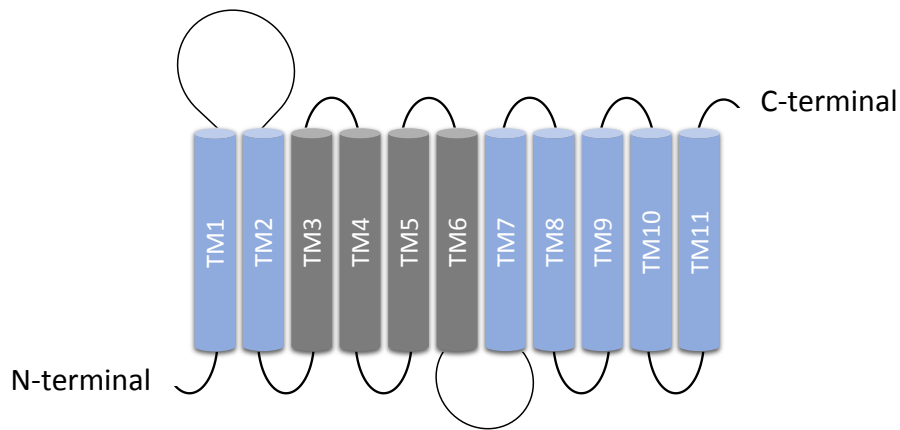
La familia de transportadores equilibrativos humanos (hENTs) está compuesta por cuatro transportadores hENT1, hENT2, hENT3 y hENT4 susceptibles de mediar el influjo o eflujo de nucleósidos dependiendo de los requerimientos de la célula. Estos sistemas son independientes de sodio y presentan una amplia especificidad, ya que pueden incorporar tanto nucleósidos de purinas como de pirimidinas y nucleobases. Tanto hENT1 como hENT2 pueden transportar nucleósidos y sus derivados con menor afinidad que los transportadores concentrativos de nucleósidos. hENT2 es considerado un transportador de nucleobases mientras que hENT1 ha sido descrito recientemente que transloca algunos fármacos derivados de las nucleobases (Yao et al. 2011). Además, estos transportadores difieren en su sensibilidad a S-(4-Nitrobencil)-6-tioinosina (NBTI) siendo hENT1 inhibido en concentraciones entre 1-10nM mientras que hENT2 es inhibido a concentraciones sobre 10µM (Pastor-Anglada and Pérez-Torras 2018). A su vez, ambos transportadores pueden ser inhibidos por fármacos con efecto protector cardiovascular como dipiridamol, dilazep y draflazina (Kong et al. 2004).

**Tabla 1. Características de los transportadores equilibrativos de nucleósidos (Pastor-Anglada, Urtasun, and Pérez-Torras 2018).**

| Transportador | Gen            | Sustrato (Km)   | Inhibidor (Ki)                                 |
|---------------|----------------|---|--|
| hENT1         | <i>SCL29A1</i> | Adenosina (40 $\mu$ M)<br>Guanosina (140 $\mu$ M)<br>Inosina (170 $\mu$ M)<br>Uridina (240 $\mu$ M)<br>Timidina (300 $\mu$ M)<br>Citidina (580 $\mu$ M) | NBTI (1 $\mu$ M)<br>Dipiridamol (10 $\mu$ M)   |
| hENT2         | <i>SCL29A2</i> | Guanosina (2.7 mM)<br>Inosina (50 $\mu$ M)<br>Adenosina (140 $\mu$ M)<br>Uridina (200 $\mu$ M)<br>Timidina (710 $\mu$ M)<br>Citidina (5.6 mM)           | NBTI (>10 $\mu$ M)<br>Dipiridamol (10 $\mu$ M) |

hENT3 fue descrito como un transportador intracelular dependiente de pH ya que se ubica en la membrana del lisosoma y también se ha encontrado en mitocondria, donde tendría un rol fundamental en la citotoxicidad mitocondrial mediada por fármacos derivados de nucleósidos (Govindarajan et al. 2009). El último miembro de la familia de los hENTs, hENT4 no se le considera un transportador de nucleósidos como tal, ya que también puede transportar neurotransmisores. Sin embargo, a pH bajo es capaz de transportar adenosina (Barnes et al. 2006).

Estructuralmente hENT1 y hENT2 poseen 456 aminoácidos con un 46% de homología. Su estructura ha sido predicha como 11 dominios transmembrana con un dominio N-terminal intracelular y un C-terminal extracelular. Además, posee dos loops uno intracelular y otro extracelular. hENT1 posee sólo un sitio de glicosilación mientras que hENT2 posee dos. Sin embargo, estas glicosilaciones no son necesarias para que el transportador esté activo. Recientemente se identificaron 2 nuevas variantes de hENT2 que se encuentran en la membrana nuclear, estas isoformas tendrían un rol importante durante la replicación, secuestrando a hENT2 de membrana hacia la membrana nuclear para la incorporación de nucleósidos en el núcleo (Natalia Grañé-Boladeras et al. 2016).



**Figura 6. Estructura de los transportadores equilibrativos de nucleósidos. modificado de dos Santos-Rodrigues et al. 2014.**

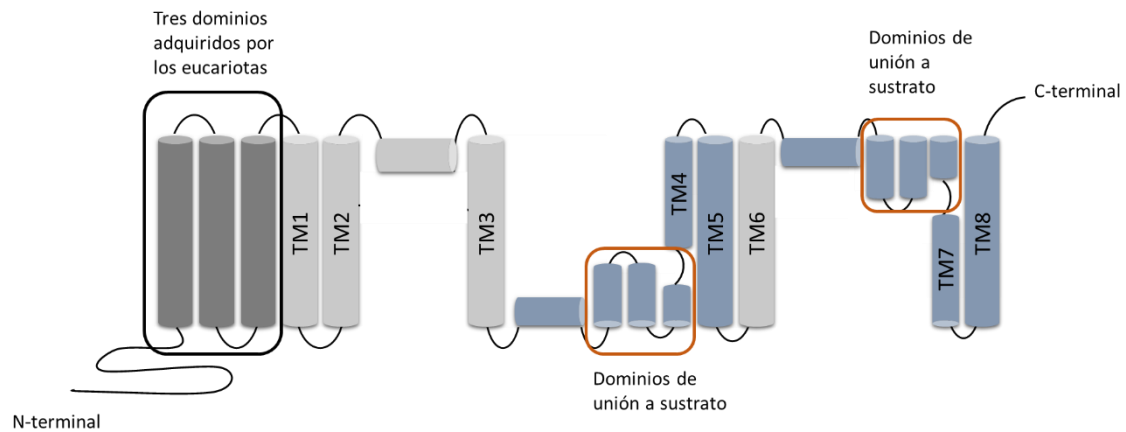
### Transportadores Concentrativos de Nucleósidos.

La familia de transportadores concentrativos de nucleósidos humana (hCNTs) está compuesta por tres transportadores hCNT1, hCNT2 y hCNT3. Estos transportadores median el flujo unidireccional de nucleósidos, son de tipo activo secundario y poseen alta afinidad por sus sustratos dado que sus  $K_m$  son del orden de  $\mu$ molar bajo. Estos transportadores se caracterizan por tener diferente afinidad de sustrato y diferente dependencia de sodio. hCNT1 transloca una molécula de sodio por cada nucleósido transportado y posee afinidad por nucleósidos pirimídicos y sus derivados farmacológicos como la gemcitabina y citarabina. Curiosamente adenosina es capaz de unirse a hCNT1, pero no es translocada (Larráyo et al. 2004). Al igual de hCNT1, hCNT2 transloca una molécula de sodio por cada nucleósido translocado. Este transportador es específico para nucleósidos de purinas, sin embargo, también puede translocar uridina. Desde el punto de vista farmacológico también puede transportar antivirales y fármacos quimioterapéuticos. El tercer miembro de la familia hCNT es hCNT3 el cual es un transportador con amplia selectividad de sustrato, ya que puede translocar tanto nucleósidos púricos como pirimidínicos. A su vez transporta dos moléculas de sodio por cada nucleósido, aunque también se ha descrito que puede transportar un protón por cada nucleósido transportado.

**Tabla 2 Características de los transportadores concentrativos de nucleósidos. modificado de Pastor-Anglada, Urtasun, and Pérez-Torras 2018.**

| Transportador | Gen            | Sustrato (Km)   | Estequiometria (Na <sup>+</sup> : Nucleótido) |
|---------------|----------------|---|---|
| hCNT1         | <i>SCL28A1</i> | Uridina (38 μM)<br>Timidina (27 μM)<br>Citidina (3.1 μM)<br>Adenosina (8μM)   | 1:1   |
| hCNT2         | <i>SCL28A2</i> | Inosina (13.7μM)<br>Adenosina (8μM)<br>Guanosina (8.5μM)<br>Uridina (116μM)   | 1:1   |
| hCNT3         | <i>SCL28A3</i> | Citidina (3.5μM)<br>Adenosina (2.4μM)<br>Timidina (10.6μM)<br>Uridina (5.3μM)<br>Guanosina (8.5μM)<br>Inosina (4.3μM) | 2:1   |

Estructuralmente hCNT1, hCNT2 y hCNT3 poseen 649, 658 y 691 aminoácidos. Tradicionalmente se creía que los CNTs en humanos poseían 13 dominios transmembrana (TMD) con un C-terminal extracelular y un N-terminal intracelular. Sin embargo, Jonhson *et al* en el año 2012 lograron cristalizar el transportador concentrativo (CNT) de *Vibrio cholerae* (Johnson et al. 2012). Los CNTs de procariotas mostraron 8 dominios transmembrana los cuales poseen un alto porcentaje de homología con los hCNTs. Sin embargo, los eucariotas hemos adquirido tres dominios transmembrana y una cola N-terminal, por lo que en la actualidad el modelo en eucariotas es de 11 TMD. Debido a que estos dominios no son indispensables para la actividad del transportador se sugiere que puede contener zonas reguladoras que aún no están del todo descritas.



**Figura 7. Estructura predicha de los transportadores concentrativos de nucleósidos.**

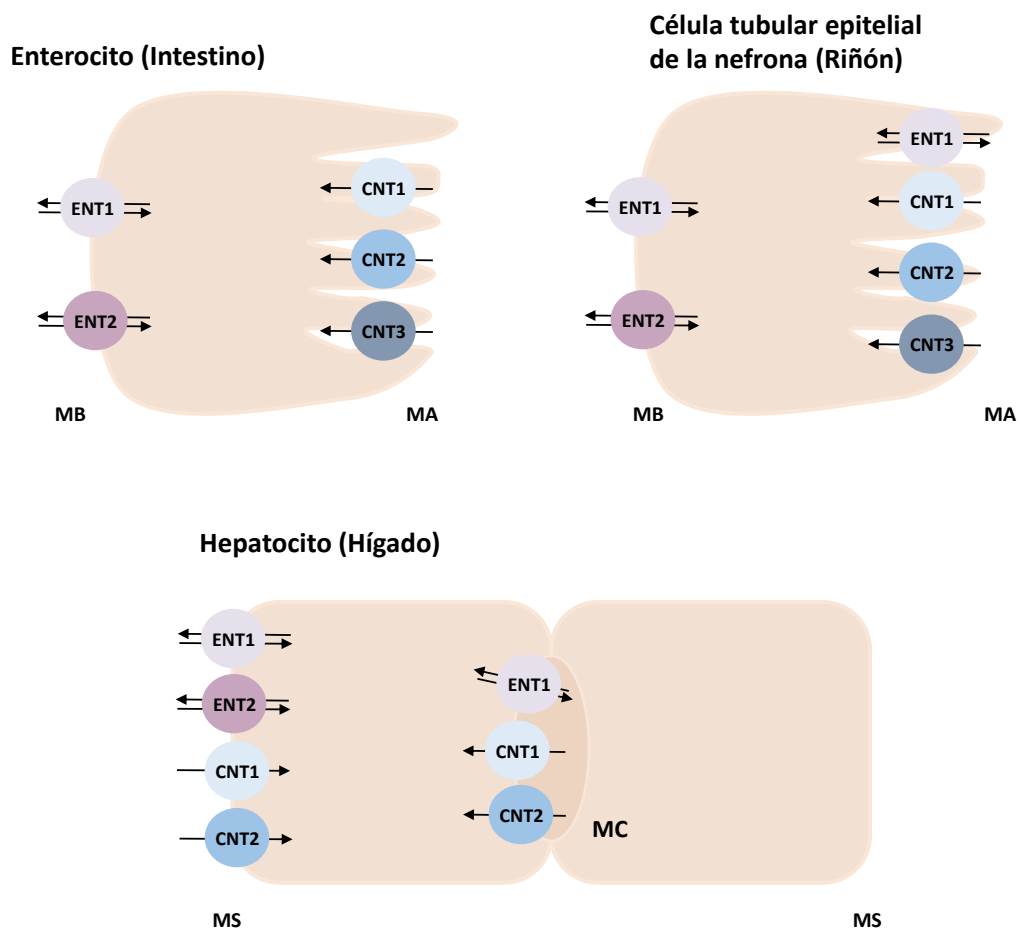
Distribución de los transportadores de nucleósidos.

Las proteínas hCNTs se expresan en bastantes tejidos, pero no son ubicuas. hCNT1 se expresa mayoritariamente en hígado, corazón, riñón, intestino y cerebro (Pennycooke et al. 2001). hCNT2 está más ampliamente expresado si lo comparamos con hCNT1 ya que se expresa en riñón, corazón, hígado, musculo esquelético, páncreas, placenta, cerebro, cérvix, próstata, intestino delgado, recto, colon y pulmón (Pennycooke et al. 2001; Gray, Owen, and Giacomini 2004). Generalmente hCNT3 se expresa en glándula mamaria, páncreas, médula ósea, intestino, hígado, pulmón, placenta, próstata, cerebro y tejido cardiaco (Gray, Owen, and Giacomini 2004). Los hCNTs se han encontrado en la mayoría de los epitelios polarizados y están localizados en la membrana apical, lo cual facilita el flujo de los nucleósidos entre barreras (Mangravite et al. 2001; Errasti-Murugarren, Casado, and Pastor-Anglada 2010).

Por otro lado, los hENTs se encuentran ampliamente distribuidos en diferentes tejidos y con diferente expresión (Baldwin et al. 2004). Estos transportadores están generalmente ubicados en la membrana basolateral de las células de epitelios absortivos (Mangravite et al. 2001; Lai, Bakken, and Unadkat 2002).



La distribución de los hCNTs y hENTs en algunos epitelios es asimétrica en las regiones apicales y basolaterales, lo cual favorece el flujo vectorial de nucleósidos para la correcta homeostasis celular (Errasti-Murugarren, Pastor-Anglada, and Casado 2007). Sin embargo, la distribución de los transportadores no es igual en todos los epitelios (figura 8). En intestino en la membrana apical se encuentran los transportadores concentrativos (hCNT1, hCNT2 y hCNT3) mientras que, en la membrana basal se encontrarían los hENT1 y hENT2 (M Pastor-Anglada et al. 2007; Young et al. 2013) . En riñón en la membrana apical se encuentran los hCNTs. hENT1 se expresa tanto en la membrana apical como basolateral mientras que, hENT2 se expresa solo en la basolateral. En hígado existe una distribución diferente mientras que hENT2 sólo se expresa en la membrana sinusoidal (basal), hCNT1, hCNT2, hENT1 se expresan tanto en la membrana sinusoidal como en la membrana canicular (apical)(Govindarajan et al. 2008; Dufлот et al. 2002).



**Figura 8. Distribución de los transportadores de nucleósidos en células de epitelios polarizados. Modificado de Molina-Arcas and Pastor-Anglada 2013.**

## Otras funciones de los Transportadores Concentrativos de Nucleósidos.

Como se comentó anteriormente los CNTs de eucariotas poseen un dominio N-terminal intracelular y tres dominios que no influyen en la selectividad de los sustratos ni en el transporte de nucleósidos. Los extremos citoplasmáticos de los transportadores de eucariotas están compuestos por 83 aminoácidos en el caso de hCNT1, 80 aminoácidos para hCNT2 y 103 aminoácidos para hCNT3. Debido a que esta adquisición evolutiva es innecesaria para el transporte nos permite sugerir que la región N-terminal podría contener zonas reguladoras (Pinilla-Macua et al. 2012; Errasti-Murugarren et al. 2010).

En el año 2013 nuestro grupo demostró que al restaurar la expresión de hCNT1 en un modelo de adenocarcinoma pancreático se observaba un aumento en la muerte celular, una disminución de la proliferación y migración celular. Estos efectos también se observaron al restituir un hCNT1 carente de su capacidad transportadora. Además, *in vivo* se observó una disminución del crecimiento tumoral (Pérez-Torras et al. 2013). Este trabajo es la primera evidencia que hCNT1 además de su función transportadora presenta una actividad “señalizadora” independiente por lo que puede ser clasificado como un transceptor. Hasta ahora, según nuestros resultados sólo hCNT1 puede atribuirse esta capacidad. Aunque, hemos identificado proteínas “partners” del interactoma de hCNT2 como Aldolasa B y GRP58 (Huber-Ruano et al. 2010) estas no anticipan una doble función del transportador, sino que participan como proteínas reguladoras. Por otro lado, hemos intentado identificar proteínas que interaccionen con las porciones N-t de hCNT3 ya que tanto por su papel en el transporte de un amplio abanico de fármacos antitumorales como por su posible rol en redes implicadas en mecanismos de reparación de ADN y de apoptosis (Natàlia Grañé-Boladeras et al. 2016), hCNT3 parece ser una proteína de alto interés en la biología tumoral. Por ello, la identificación de proteínas de interacción con su gran dominio N-t intracelular (103 aminoácidos) se plantea como un objetivo de alto interés.

Mediante una aproximación proteómica utilizando la totalidad del dominio intracelular de hCNT3 como cebo y en extractos proteicos de colon humano sano como

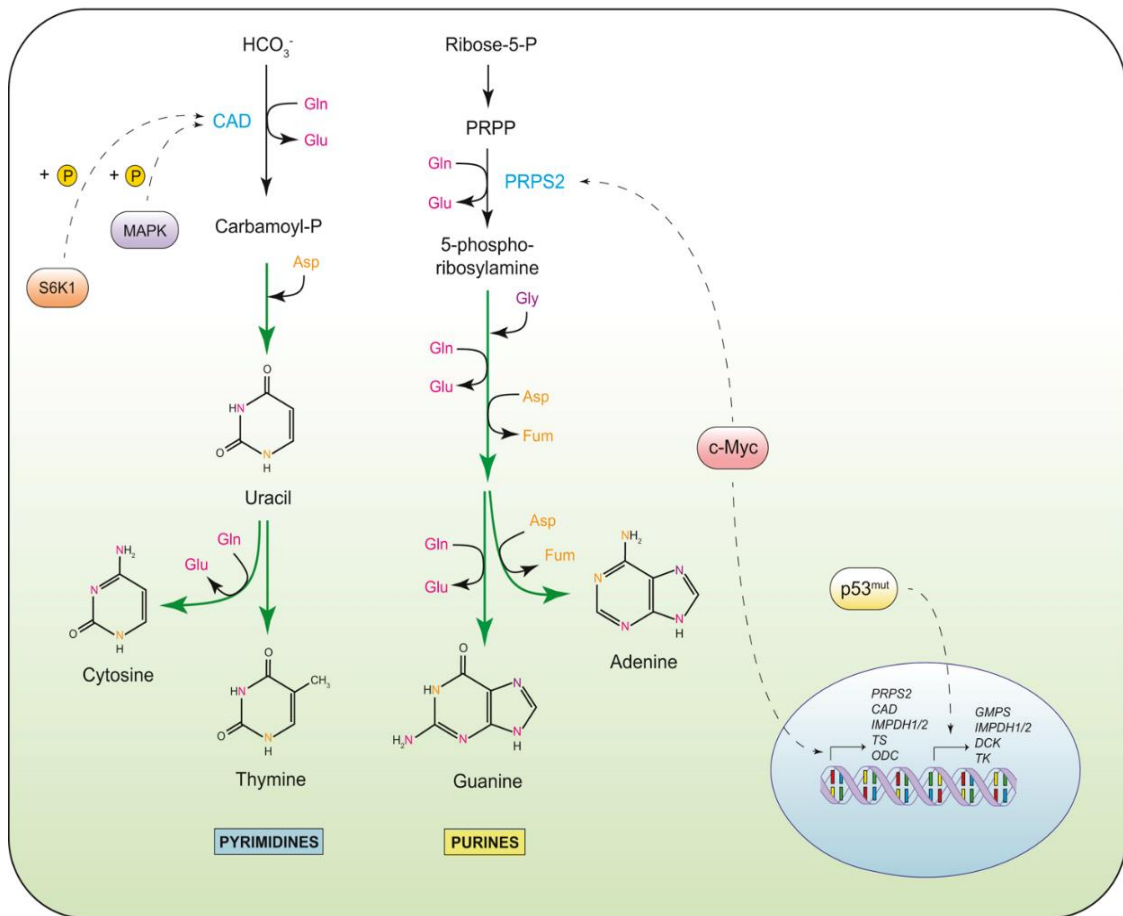
fuentes de probables proteínas de interacción hemos identificado la primera proteína de interacción de hCNT3, la Galectina 4 (Gal-4). La interacción hCNT3/ Gal-4 es necesaria para que el transportador llegue a membrana y pueda ejercer su función, aunque no anticipa funciones accesorias para hCNT3 (Fernández-Calotti et al. 2016).

Cambios metabólicos asociados a la biología tumoral que afectan la biosíntesis de nucleótidos.

El crecimiento y proliferación descontrolada es fundamental en un proceso neoplásico y para que ocurra es necesario que la célula realice ciertos cambios metabólicos. La reprogramación metabólica que se produce durante un proceso oncológico forma parte de los denominados “hallmark” del cáncer. Otto Warburg fue el primero en observar que la célula tumoral en presencia de oxígeno reprogramaba su metabolismo de glucosa. Las células tumorales a diferencia de las células normales realizan glicólisis aeróbica, lo que se traduce en aumento en el consumo de glucosa y el aumento del ácido láctico. El aumento de la glicólisis conlleva a un aumento de diversos intermediarios que son metabolitos necesarios para otros procesos, tales como la generación de nucleótidos. Estos metabolitos permiten que la célula pueda seguir proliferando ya que sus nutrientes fundamentales tienen garantizada su síntesis (Hanahan and Weinberg 2011; Pavlova and Thompson 2016).

Otro aspecto para tener en consideración es el aumento de la demanda de nitrógeno por parte de la célula tumoral. Las células en proliferación necesitan sintetizar *de novo* nucleótidos, aminoácidos no esenciales y poliaminas. Glutamina es imprescindible para que se lleven a cabo estos procesos ya que su grupo amida es el principal donante de nitrógeno para la síntesis *de novo* de purina y pirimidinas. Así, una sola molécula de glutamina es necesaria para la síntesis de uracil y timina, dos moléculas para la síntesis de citosina y adenina y tres para la síntesis de guanina. Además, para que tanto bases de purinas y pirimidinas se ensamblen es necesaria una molécula de aspartato, el cual es un catabolito de la glutamina. Por lo tanto, glutamina como donante

de grupo aminos es una de las moléculas pilares en la biosíntesis de nucleótidos (figura 9).



**Figura 9. Biosíntesis de nucleótidos regulada por oncogenes. modificado de Pavlova and Thompson 2016.**

El oncogén c-myc también está regulando la biosíntesis de nucleótidos ya que está promoviendo la expresión de varias enzimas de la vía. Dentro de las enzimas reguladas por c-myc están la fosforibosil pirofosfato sintetasa (PRPS) la cual cataliza el primer paso de la síntesis *de novo* de nucleótidos purinas, también regula la expresión de CAD una proteína disfuncional fundamental en la síntesis *de novo* de pirimidinas (Cunningham et al. 2014; Eberhardy and Farnham 2001; Mannava et al. 2008). Otras proteínas diana de c-myc involucradas en la biosíntesis de nucleótidos son: timidilato sintetasa (TS), inosina monofosfato deshidrogenasa 1 (IMPDH1), inosina monofosfato deshidrogenasa 2 (IMPDH2) (Y.-C. Liu et al. 2008; Mannava et al. 2008). Además, las proteínas de síntesis *de novo* purinas PPAT, GART, PFAS, PAICS ADSL también son reguladas por c-myc (Y.-C. Liu et al. 2008; Mannava et al. 2008).

Las mutaciones de p53 han demostrado tener efectos sobre los genes que regulan la biosíntesis de nucleótidos como IMPDH1, IMPDH2, GMP sintetasa (GMPS) y enzimas relacionadas con las vías de recuperación deoxicitidina kinasa (DCK) y timidina kinasa (TK1) (Kollareddy et al. 2015). Por otro lado, como se mencionó previamente CAD es regulada por MAPK y por mTORC1. (Ben-Sahra et al. 2013; Graves et al. 2000; Robitaille et al. 2013). La regulación mediada por mTORC1 permite a la célula activar CAD en respuesta a los niveles de glutamina intracelular contribuyendo a la activación de mTORC1 (Durán et al. 2012; Jewell et al. 2015). Además, la inhibición farmacológica de GART está inhibiendo la activación de mTORC1 vía disminución de los niveles RheB. Lo que se traduce en una disminución de la concentración de nucleótidos de guanina y no de adenina. Sugiriendo que mTORC1 estaría regulando los niveles de purinas intracelulares (Emmanuel et al. 2017).

# Hipótesis y Objetivos



## Hipótesis y Objetivos

Los mecanismos que determinan si la célula optará por realizar síntesis *de novo* de nucleótidos o potenciará las vías de recuperación cuando la asequibilidad extracelular de nucleósidos y nucleobases sea alta no son bien conocidos. A priori, el alto coste energético de la síntesis *de novo* nos induciría a pensar que las vías de recuperación son la mejor alternativa para facilitar el aporte de nucleótidos para la síntesis de ácidos nucleicos y la proliferación celular.

Tampoco está claro cuál es el sensor celular que permitiría detectar cambios en los niveles extracelulares de nucleósidos y nucleobases. No obstante, podríamos hipotetizar que uno de los posibles mecanismos sensores de estos cambios podría guardar relación con el transporte de nucleósidos a través de la membrana plasmática.

En este sentido, hasta cinco transportadores de nucleósidos naturales distintos han sido descritos hasta la fecha en membrana plasmática, lo cual podría sugerir cierta redundancia en su expresión y, eventualmente, un posible papel accesorio para alguno de estos subtipos de transportador más allá de su mera función como translocadores de nucleósidos.

Entre ellos, el transportado de alta afinidad hCNT3 es el único capaz de translocar de forma unidireccional y altamente concentrativa un amplio abanico de nucleósidos extracelulares, tanto purínicos como pirimidínicos. Al iniciarse este proyecto, en nuestro grupo de investigación se llevó a cabo una aproximación proteómica destinada a identificar posibles proteínas de interacción para hCNT3.

Fruto de esta primera aproximación proteómica se identificaron distintas proteínas candidatas a formar parte del interactoma de hCNT3, entre ellas, la proteína multifuncional ADE2 implicada en la síntesis *de novo* de purinas. ADE2 se conoce que se ensambla con toda la maquinaria enzimática responsable de la síntesis *de novo* de nucleótidos de purina mediante interacciones proteína-proteína, constituyendo una estructura supramolecular conocida como purinosoma.



Debido a todo lo expuesto anteriormente la hipótesis de nuestro trabajo es:

“ADE2 puede contribuir a regular las vías de recuperación y de síntesis *de novo* de nucleótidos mediante interacciones proteína-proteína”.

El objetivo general de este trabajo es:

Determinar el rol de la proteína multifuncional ADE2 en la regulación de las vías de síntesis y de recuperación de los precursores de los ácidos nucleicos.

Los objetivos específicos de este proyecto son:

- Establecer si la proteína ADE2 interacciona con el transportador concentrativo de alta afinidad hCNT3.
- Estudiar el efecto de la modulación de los niveles de nucleósidos y nucleótidos sobre la expresión de ADE2 y los transportadores de nucleósidos.

## Resultados y Discusión



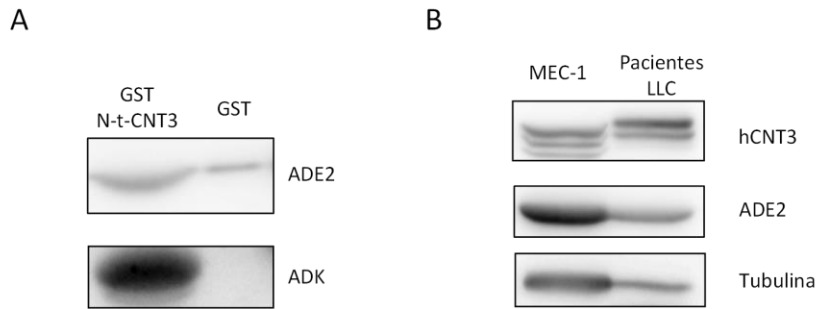
## Resultados y Discusión

### Identificación de ADE2 como parte del interactoma de hCNT3.

Mediante una aproximación proteómica utilizando el dominio N-terminal de hCNT3 como cebo, se identificaron una serie de posibles proteínas que podrían interactuar con hCNT3. Entre ellas se encontraron proteínas que sugerían un sentido fisiológico al estar involucradas en el metabolismo de nucleótidos y nucleósidos. Estas proteínas fueron: Adenosina kinasa (ADK), la proteína multifuncional ADE2 (también llamada PAICS) y SAMHD1. ADK es la principal enzima que cataliza la transferencia de fosfato para la formación de AMP, por lo que es una enzima que está involucrada en la regulación del tono de adenosina y en la formación de los nucleótidos de adenina. SAMHD1 es una trifosfohidrolasa que regula los niveles de dNTPs en las células. Además, su expresión ha sido asociada con efectos anti proliferativos y funciones supresoras en tumores (Kohnken, Kodigepalli, and Wu 2012). Estas posibles proteínas “partner” se han ido validando en el marco de otras tesis doctorales por diferentes miembros del grupo. Para llevar a cabo esta tesis doctoral hemos decidido trabajar con la proteína multifuncional ADE2 ya que nos pareció de interés no sólo por su papel biológico, al ser imprescindible para la síntesis *de novo* de nucleótidos de purina sino también por catalizar la síntesis de SAICAR, el cual recientemente ha sido descrito como regulador de PKM2 activando vías de proliferación celular mediadas por ERK 1/2 (K. Keller et al. 2014).

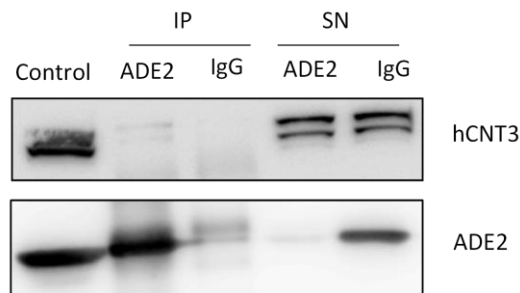
Con el objetivo de validar la interacción, el primer ensayo que realizamos fue un “GST- pull down” dirigido utilizando el dominio N-terminal de hCNT3 como cebo, y células de pacientes de leucemia linfoblástica crónica (LLC) como fuente de proteínas. Este ensayo lo realizamos en las mismas condiciones que se había realizado el experimento con el cual encontramos las posibles proteínas de interacción de hCNT3. Así comprobamos que al inmunoprecipitar con el N-terminal-hCNT3 se co-inmunoprecipitaba tanto ADE2 como ADK (figura 10A). Sin embargo, el resultado para ADE2 no fue del todo concluyente ya que en el control también se puede observar que se arrastró ADE2.

Posteriormente, para continuar el estudio de interacción se eligió en primer lugar una línea celular derivada de LLC, MEC-1, y se comprobó si expresaba las proteínas de interés. Como se puede observar en la figura 10B, MEC-1 expresa hCNT3 y ADE2 al igual que las muestras de pacientes de LLC usadas en el ensayo GST-pull down.



**Figura 10. Identificación de ADE2 y ADK como proteína partner de hCNT3. A, "GST-pull down" dirigido contra muestras de pacientes con LLC. B, Expresión proteica de hCNT3 y ADE2 en extractos de células de un "pool" de pacientes con LLC y en células MEC-1.**

Para la validación bioquímica de la interacción hCNT3 y ADE2 utilizamos ensayos de Co-IP en extractos proteicos de células MEC-1, en los cuales esperábamos que al inmunoprecipitar ADE2 arrastraríamos a hCNT3. Sin embargo, existe una baja inmunodetección de hCNT3 cuando se inmunoprecipita ADE2 (figura 11). Estos resultados sugieren que estas proteínas no estarían interaccionando entre sí o que la posible interacción sería muy débil como para detectarla mediante Co-IPs

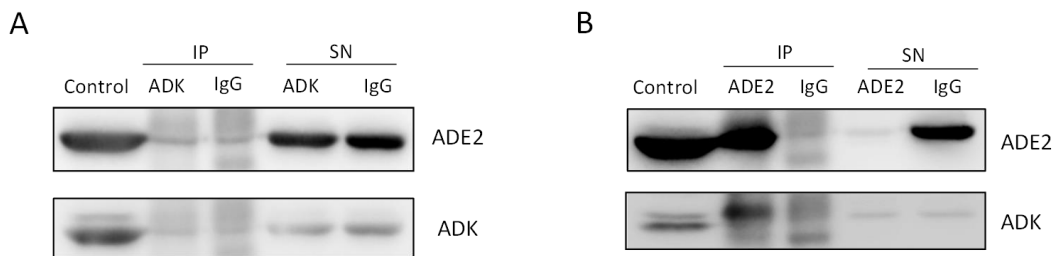


**Figura 11. Análisis de la interacción ADE2 hCNT3. Co-inmunoprecipitación de hCNT3 y ADE2 en células MEC-1. (n=5).**

#### Validación de la Interacción ADE2/ADK

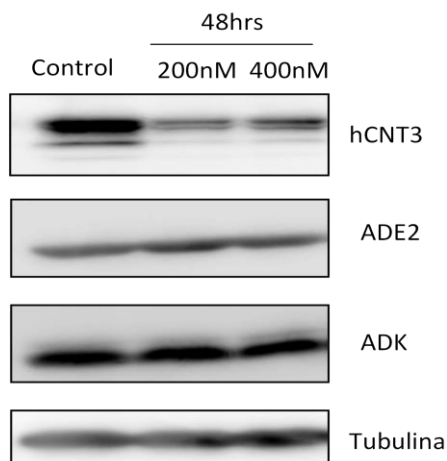
El hecho de no haber logrado Co-inmunoprecipitar hCNT3 cuando arrastrábamos a ADE2, nos llevó a revisar el listado de posibles proteínas de interacción obtenidas

mediante la aproximación proteómica. Esta vez teniendo en cuenta que podría ser que la interacción con hCNT3 no fuese directa, sino que hubiese alguna proteína intermedia, y aprovechando que la interacción ADK-hCNT3 fue validada en el marco de la tesis doctoral de Olga Casulleras, nos planteamos la hipótesis que ADE2 podría estar interaccionando con ADK. Para validar esta hipótesis realizamos una Co-IP en células MEC-1, ya que sabíamos que expresaban endógenamente las tres proteínas. Primeramente, inmunoprecipitamos ADK y luego detectamos ADE2. Como se observa en la Figura 12A no hubo Co-IP. Sin embargo, al realizar la IP contra ADE2 y luego inmunodetectar ADK, pudimos observar que si había detección (Figura 12B) sugiriendo que ambas proteínas están interaccionando.



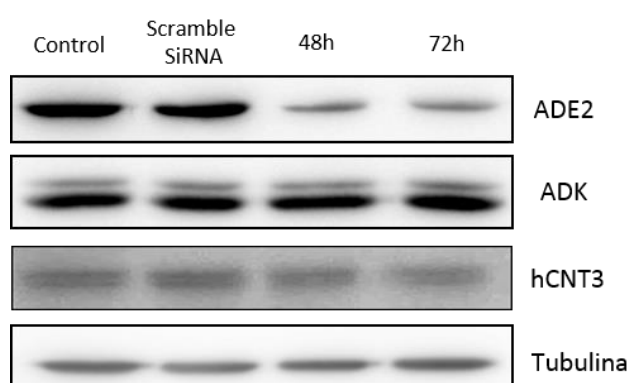
**Figura 12. Interacción entre ADE2 y ADK. Las Co-IPs se realizaron en extractos celulares de MEC-1, las cuales fueron incubadas con 5ug del anticuerpo y posterior análisis de ambas proteínas. A, muestra el resultado de co-inmunoprecipitar ADK. B, Co-IP para ADE2 en la cual se detectó ADK.**

Con el fin de determinar si hCNT3 podría tener algún efecto en la regulación de la expresión proteica de ADE2 y ADK, realizamos un silenciamiento transitorio de la proteína mediante un siRNA en células con expresión heteróloga estable del transportador (HEK293-CNT3), en las cuales previamente habíamos comprobado la expresión de ADK y ADE2. A 48h de silenciamiento transitorio de hCNT3 no se observan cambios en la expresión proteica de ADE2 ni de ADK tanto cuando utilizamos una concentración de siRNA de 200nM como cuando la incrementamos al doble (figura 13), lo cual sugiere que hCNT3 no regula la expresión de estas dos proteínas.



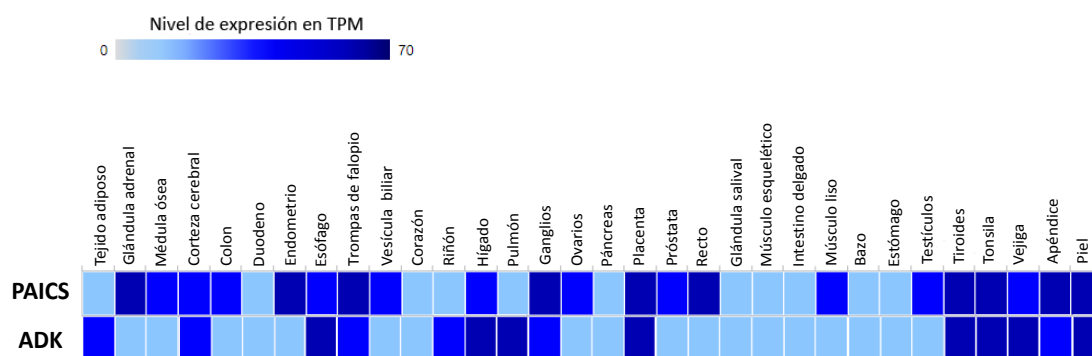
**Figura 13. Efecto del silenciamiento de hCNT3 en la expresión de ADE2.** Las células HEK293 CNT3 fueron sembradas y 24h después fueron tratadas con dos concentraciones diferentes de siRNA de CNT3 (n=3).

Posteriormente quisimos saber si existía algún tipo de regulación a nivel proteico entre ADE2 y las proteínas ADK y hCNT3. Para esto nuevamente utilizamos las células HEK293 CNT3. Las células fueron sembradas y luego de 24h se procedió mediante un siRNA a silenciar transitoriamente ADE2. Después de 48h y 72h del silenciamiento de ADE2 no se observó ningún tipo de regulación sobre ADK y hCNT3 a nivel de proteína (figura 14). Estos resultados nos permiten inferir que cuando rompemos la interacción ADE2/ADK por medio del silenciamiento transitorio de ADE2, no se observó efecto sobre la expresión proteica de ADK y hCNT3. Esto nos permite sugerir que las expresiones de estas proteínas no se regulan entre ellas.



**Figura 14. Efecto del silenciamiento de ADE2 en la expresión de ADK y hCNT3.** Las células HEK293 CNT3 fueron tratadas con 200nM de siRNA de ADE2 por 48 y 72h. Posteriormente se analizó su expresión mediante westernblot. La figura muestra una imagen representativa de n=3.

La importancia de la función biológica de ADE2 y ADK nos permite anticipar que la implicación de su posible interacción debería ir más allá de la LLC. Con el objetivo de determinar si la interacción de ADE2 y ADK es específica de esta enfermedad o puede darse en otros contextos, quisimos analizar la expresión de mRNA de ambas proteínas en tejido sano y para eso utilizamos la base de datos Reactome (figura 15). La expresión de ambas proteínas en tejido sano es diferente, siendo ADE2 mucho más ubicua que ADK. Otro aspecto interesante es que ADE2 se expresa menos en tejidos absortivos como duodeno, intestino delgado y riñón. Cabe destacar que en estos tejidos existe una alta recaptación de nucleósidos mediada por los transportadores de nucleósidos (Pastor-Anglada, Urtasun, and Pérez-Torras 2018). Sin embargo, en hígado podemos ver que existe una alta expresión tanto de ADE2 como de ADK, lo cual concuerda con el papel del hígado en el metabolismo de nucleótidos. Ya que el hígado es el órgano donde se produce una síntesis *de novo* activa y controla los niveles de nucleobases libres y nucleósidos para que otros tejidos las recuperen (Fustin et al. 2012).

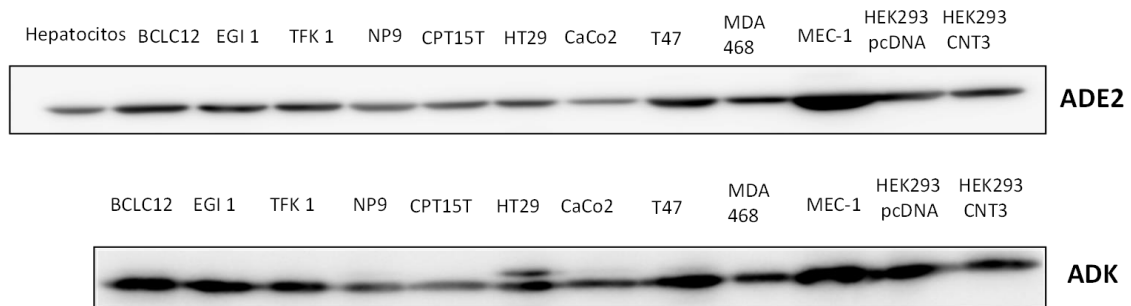


**Figura 15. Expresión del mRNA de PAICS y ADK en diferentes tejidos sanos.** Datos obtenidos desde la base de datos Reactome, correspondiente a 70 pacientes.

Por otro lado, analizamos la expresión de ADE2 y ADK en distintas líneas celulares con las que contamos en el laboratorio, la mayoría de las cuales provienen de cáncer humano. Concretamente se utilizaron líneas derivadas de colangiocarcinoma (BCLC12, EGI1, TKF1), adenocarcinoma pancreático (NP9 Y CP15T) cáncer colorectal (HT-29 y CaCo2), cáncer de mama (T47 y MDA468), leucemia linfática crónica tipo B (MEC-1), HEK293 CNT3 y su respectivo control HEK293 pcDNA5. En todas ellas se detectó



claramente la expresión de ADE2 y ADK (figura 16). Además, en hepatocitos primarios, los cuales utilizamos como control no tumoral, también se expresa ADE2.

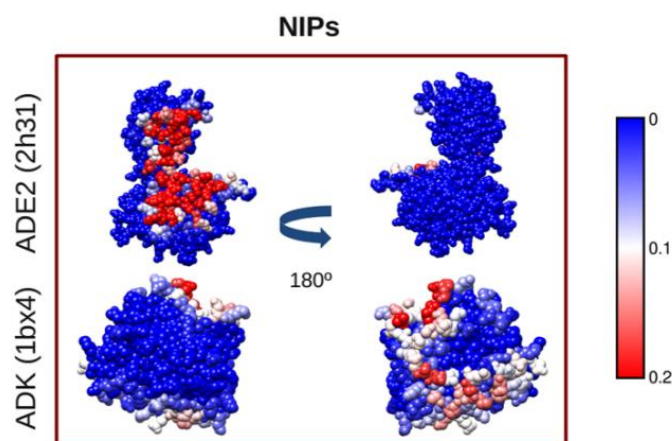


**Figura 16. ADE2 y ADK se expresan en diferentes líneas tumorales.** Para en análisis de la expresión proteica se utilizó 5µg los cuales fueron analizados por medio de westernblot.

Si comparamos los resultados obtenidos a partir de Interactome con los resultados obtenidos de expresión de proteínas, podemos observar que en las células tumorales existiría un cambio en la expresión de ambas proteínas. Ya que curiosamente en páncreas se observa una baja expresión de ambas proteínas en los resultados obtenidos de Interactome pero, al analizar las líneas celulares tumorales de origen pancreático podemos ver que ambas proteínas se expresan, lo cual concuerda con los cambios metabólicos que tiene una célula tumoral.

Al analizar las células que disponemos en nuestro grupo decidimos comenzar a trabajar con una línea celular de cáncer de colon, concretamente con HT-29 porque esta línea celular expresa las dos isoformas de ADK, una citoplasmática de menor peso molecular (también llamada corta) y otra nuclear de mayor peso (también llamada larga). Además a diferencia de MEC-1 esta línea presenta la ventaja que al crecer en monocapa es más fácil de manipular y de transfectar.

Aprovechando que ambas proteínas han sido cristalizadas (Li et al. 2007; Mathews et al. 1998) y por tanto son de estructura conocida, en colaboración con el Dr. Juan Fernández-Recio (Barcelona Supercomputing Center & CSIC) se generó un modelo de interacción de proteína-proteína. Mediante modelamiento bioinformático se comprobó que las diez posiciones de interacción de mayor energía convergían en un solo dominio de ADE2, que presumiblemente sería el que estaría interaccionando con ADK. El modelo generado fue suficiente para poder identificar los residuos que podrían participar directamente en esta interacción (figura 17). Como se observa en la tabla 1 sólo se identificaron dos posibles residuos para ADK, mientras que para ADE2 se identificaron 34 residuos. De los residuos identificados para ADE2, 30 de ellos poseen un índice NIP mayor a 0.2 y cuatro residuos poseen índice NIP mayor a 0.5.



**Figura 17.** Modelo de interacción ADE2-ADK en el que se muestran los residuos más propensos a participar de la interacción. 2H31 corresponde al cristal de ADE2 mientras que, 1BX4 corresponde al de ADK.

**Tabla 3.** Posibles residuos involucrados en la Interacción ADE2/ADK.

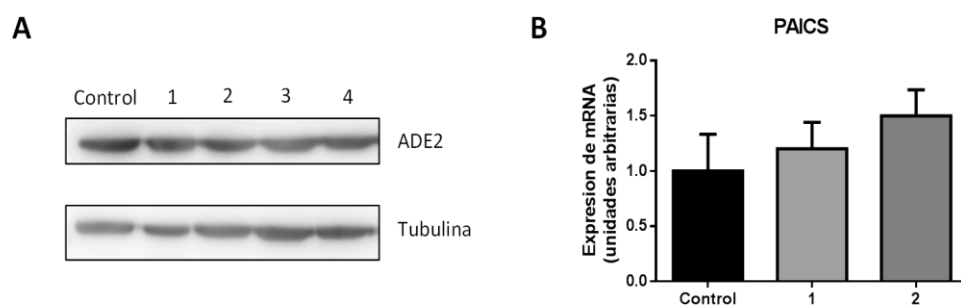
| Residuos de ADK | NIP | Residuos de ADE2   | NIP |
|-----------------|-----|--|-----|
| R321, D343      | 0.2 | K125, S166, F121, G373, V359, K414                                     | 0.2 |
| -               | -   | D417, Y119, D163, E174, L378, W399, C374                               | 0.3 |
| -               | -   | R403, W363, V362, V377, Q389, Q170, L413, S375, T376, H167, I406, Y122 | 0.4 |
| -               | -   | F386, L366, P123, W410   | 0.5 |

El índice NIP representa la frecuencia de un determinado residuo que se encuentra en la interfase de las dos proteínas entre las soluciones de menor energía. Mientras mayor sea el valor del NIP mayor es la probabilidad que el residuo se encuentre involucrado en interacciones con la proteína de interacción, que en este caso corresponde a ADK. De los cuatro residuos con índice NIP de 0.5 decidimos trabajar con los residuos F386 y W410. F386 se encontraría en el sitio de unión en todos los modelos bioinformáticos que se realizaron y estaría interaccionando con residuos aromáticos de ADK. Al igual que el residuo F386, W410 está interaccionando con otros aminoácidos aromáticos. El hecho de no haber escogido los otros residuos con NIP 0.5 obedece a que a nivel estructural la P123 podría ocasionar un cambio muy drástico en la conformación de la proteína lo cual podría inducir una pérdida de su función. Además, el residuo P123 se encuentra involucrado en la región en donde esta enzima realiza su primera función (SAICAR sintetasa) mientras que los otros residuos se encuentran en la región donde se realiza la segunda función (AIR carboxilasa). El hecho de no escoger la L366 es debido a que la mutación por alanina no produciría una ruptura de gran energía lo que no nos permitiría teóricamente romper la interacción. Por otro lado, debido al bajo índice NIP que poseían los posibles residuos involucrados en la interacción en ADK decidimos no trabajar con ellos.

La identificación de estos residuos también nos permitió explicar por qué al inmunoprecipitar ADK no estábamos detectando ADE2. Esto se debe a que la región que reconoce el anticuerpo es la que estaría hipotéticamente interaccionando con ADE2.

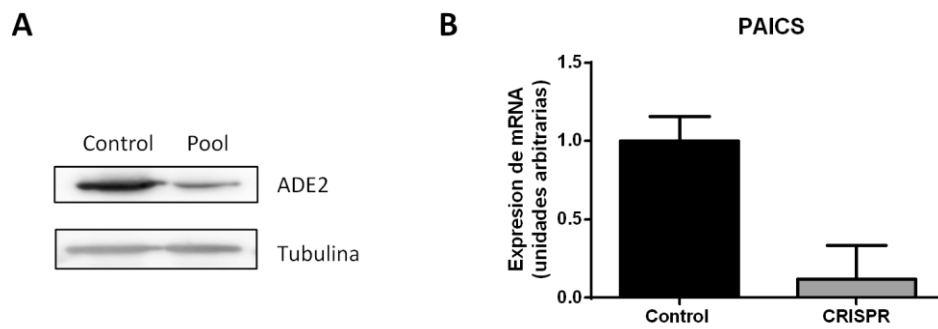
El hecho de que tanto ADE2 como ADK se expresan simultáneamente en todos los modelos analizados ya sean tumorales como no tumorales, nos planteó una limitación experimental importante para poder determinar la implicación de los residuos identificados en la interacción de ambas proteínas. A raíz de esto, nos vimos en la necesidad de disponer de un modelo celular libre de ADE2, por lo que decidimos generar una línea celular KO. Para esto utilizamos el sistema de ADE2 CRISPR CAS9 KO (Santa Cruz Technologies).

Para la obtención del KO primeramente trabajamos con células HT-29. Las células fueron co-transfectadas con el sistema de la compañía Santa Cruz el cual posee una mezcla que contiene vectores con tres diferentes gRNAs y con otro vector que le otorga resistencia a puromicina, expresión de RFP (*red fluorescent protein*) y que promueve la HDR (Homology Directed Repair). Una vez transfectadas, las células fueron mantenidas en DMEM (10% FBSI + glutamina) y puromicina 2µg/mL. Luego de cinco días de tratamiento se procedió a aislar colonias, las cuales fueron amplificadas hasta obtener las cantidades de células necesarias para analizar la expresión de ADE2 a nivel proteico y a nivel de mensajero. Lamentablemente, en las HT-29 no se logró obtener una disminución de la expresión a nivel de proteína ni a nivel de mRNA (figura 18). Este resultado nos llevó a pensar que seguramente al ser HT-29 una línea de origen tumoral e hipertriplode podría estar dificultando la correcta incorporación de la CAS9 en el genoma y que por este motivo no se logró obtener el KO.



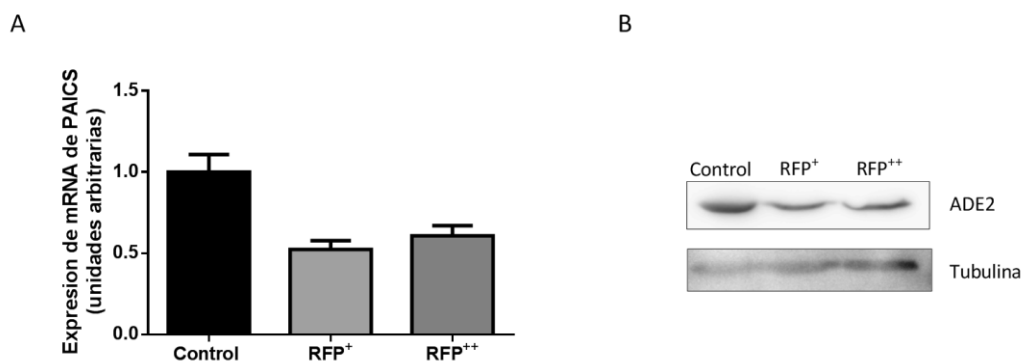
**Figura 18** Expresión de ADE2 en células HT-29 con CRISPR KO ADE2. **A**, Westernblot representativo de las colonias analizada. **B**, qRT-PCR de dos colonias aisladas comparadas con la expresión de las células sin el KO.

Posteriormente, decidimos buscar una línea no tumoral en la que se hubiese logrado realizar correctamente un CRISPR KO. De todas las líneas celulares que tenemos en el laboratorio las que han sido más comúnmente utilizadas por otros autores para realizar KO son HEK293 y HeLa. Nosotros optamos por trabajar con las HEK293 por ser un modelo ampliamente utilizado y caracterizado en nuestro grupo. Sin embargo, esta vez intentamos realizar una estrategia diferente ya que a las 72h post-transfección medimos en el pool de células transfectadas los niveles del mRNA y de proteína de ADE2. Tanto a nivel de mensajero como de proteína estas células expresaban menos ADE2 comparadas con las células HEK293 controles (figura 19).



**Figura 19. Expresión de ADE2 en el pool celular de HEK293.** A, Análisis por medio de westernblot de la expresión de la proteína ADE2 en HEK293. B, Expresión de ADE2 por medio de qRT-PCR (media  $\pm$  SEM).

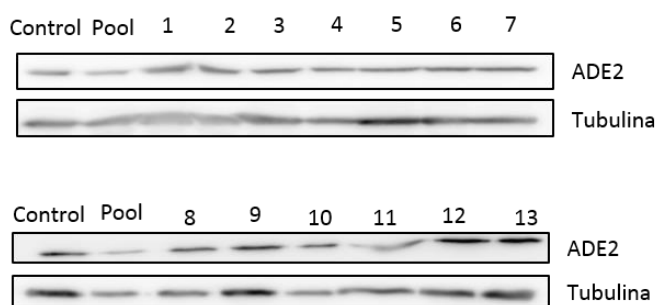
Luego de saber que efectivamente habíamos logrado disminuir los niveles de ADE2, y aprovechando que las células expresaban RFP, las seleccionamos por medio de FACS (“Fluorescent Activated Cell Sorting”). Al separar las poblaciones celulares encontramos células con mayor expresión de RFP y otras que también lo expresaban, pero con menos intensidad, por lo tanto, teníamos una población RFP<sup>+</sup> y otra RFP<sup>++</sup>. Al analizar los niveles de mRNA y proteína de ambas poblaciones no encontramos diferencia significativa en la expresión de ADE2 entre ellas (figura 20A y figura 20B).



**Figura 20. Análisis de expresión de ADE2 en dos poblaciones celulares.** A, Expresión mediante qRT-PCR de mRNA de PAICS (promedio  $\pm$  SEM). B, la expresión proteica de ADE2 fue analizada mediante westernblot.

En este punto nos planteamos la posibilidad de que solamente hubiésemos logrado realizar el CRISPR en uno de los alelos del gen por lo que decidimos volver a transfectar las células con el sistema CRISPR CAS9 para ver si lográbamos el KO definitivo. Debido a que en modelos celulares de cáncer de próstata y pulmón se observó que el silenciamiento de PAICS por medio de siRNA disminuía la proliferación

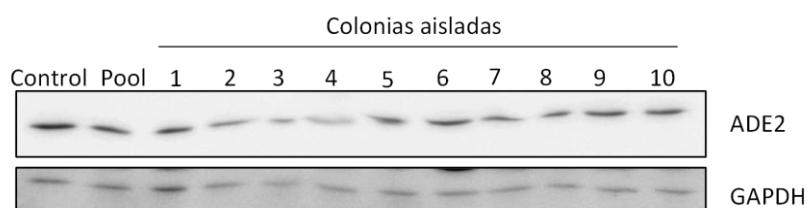
celular, la invasión y el crecimiento tumoral (Chakravarthi et al. 2017; Goswami et al. 2015), es que para favorecer las vías de recuperación en estas células añadimos al medio de cultivo nucleobases (adenina, guanosina y hipoxantina). Las nucleobases permitirían que los clones KO no tuviesen que depender de la síntesis *de novo* lo que creímos favorecería el crecimiento frente a las células que no poseían el KO. La dosis de puromicina también fue incrementada para favorecer la selección de colonias resistentes. Setenta y dos horas después de la transfección se procedió a realizar la dilución seriada de las células transfectadas. Luego de obtener los clones aislados esperamos su crecimiento hasta obtener la cantidad necesaria de células para analizar su expresión proteica. Lamentablemente, no se encontraron diferencias de expresión entre las 13 colonias aisladas y la expresión del control (figura 21).



**Figura 21. Análisis de la expresión de ADE2 en las distintas colonias aisladas.** Las células fueron aisladas mediante dilución seriada, posteriormente se les analizó la expresión de ADE2 mediante ensayos de westernblot.

Como nuestro sistema de generación de CRISPR fue comprado directamente a la compañía Santa Cruz Biotechnologies pedimos conocer las secuencias que se contenían en los gRNAs y una vez obtenidas las analizamos por medio del software “Breaking Cas” (Oliveros et al. 2016). El análisis nos mostró que las tres secuencias tenían una serie de genes “off-target” a los cuales se podría estar uniendo la CAS9 generando “deleciones” del DNA en zonas diferentes a las que queríamos. Por este motivo y dado que nuestros resultados no eran los esperados decidimos intentar con otro tipo de CRISPR, el “Double Nickase”. Este tipo de CRISPR posee una serie de diferencias con el CRISPR CAS9, primeramente, porque la CAS9 que utiliza posee una mutación que la hace más eficiente y la segunda, que en este sistema se utiliza un gRNA que se unirá en sentido 3’-5’ y el otro en sentido 5’-3’. Además, los gRNA están dirigidos a zonas próximas del gen lo que permite que la deleción sea más grande y más específica. A pesar de haber trabajado

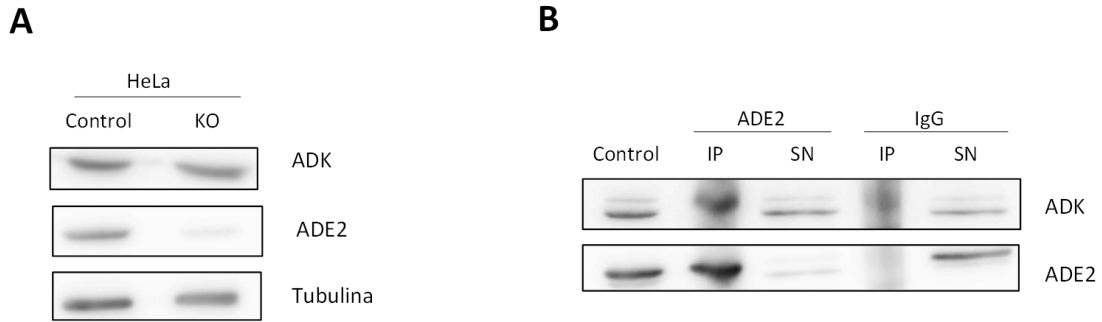
con una técnica más específica y suplementando el medio con nucleobases, nuestros resultados no mostraron una disminución de la expresión de ADE2 (figura 22).



**Figura 22. Análisis de la expresión de ADE2 en las distintas colonias aisladas a partir de las células transfectadas con el sistema double nickase.** Las células fueron aisladas mediante dilución seriada, posteriormente se les analizó la expresión de ADE2 mediante ensayos de westernblot.

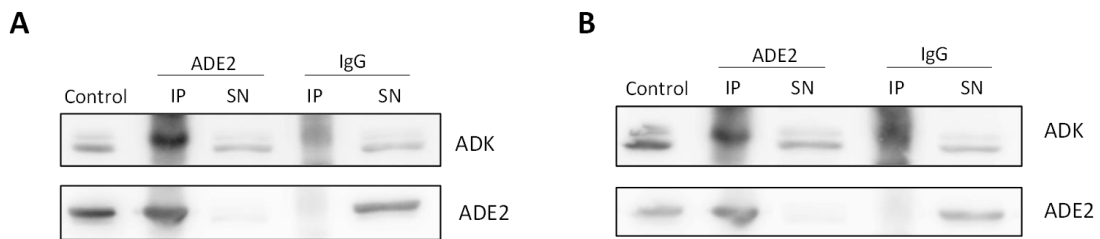
De forma paralela a nuestro trabajo, el grupo de Marie Zikánová (Baresova et al. 2016) logró generar los KO de las seis enzimas involucradas en la síntesis *de novo* de nucleótidos de purina. En noviembre de 2017 iniciamos una colaboración entre ambos laboratorios y producto de esto contamos con células HeLa ADE2 KO. Estas células se mantuvieron en DMEM-12, suplementado con Adenina 0.3 $\mu$ M (Baresova et al. 2016). Creemos que el hecho de haber generado y mantenido los KOs en este medio de cultivo aportó a las células los nutrientes necesarios para su crecimiento. De hecho, DMEM-F12 a diferencia del DMEM posee una concentración significativa de hipoxantina (11 $\mu$ M) y Timidina (1.5 $\mu$ M), lo cual, sin duda, ayudó al correcto crecimiento de los KO.

Al comenzar a trabajar con las HeLa ADE2 KO lo primero que analizamos fueron los niveles de proteína en esta línea celular. Es así como observamos que estas células expresaban niveles proteicos de ADE2 muy bajos, lo que podría sugerir que el KO con el que estamos trabajando sea de hecho una mezcla de clones. Por otro lado, cabe destacar que los niveles de proteína de ADK no están modificados (figura 23A). El hecho de tener buenos niveles de ADK endógenos nos permitió preguntarnos si éramos capaces de inmunoprecipitar esta ADK al restituir ADE2wt. Para esto las células fueron transfectadas con ADE2wt y 48h post-transfección realizamos las Co-IP. Al restituir la expresión de ADE2 logramos inmunoprecipitar la ADK que se expresa de manera endógena en la célula (figura 23B). Este resultado refuerza lo obtenido previamente mediante proteína endógena en las células MEC-1. Además, en ambas Co-IPs se observa que la banda de ADK que se inmunoprecipita es la isoforma nuclear o de mayor peso molecular



**Figura 23. HeLa KO como modelo de estudio para la interacción.** **A**, Análisis de la expresión de ADK y ADE2 en células KO por medio de westrnblot. **B**, Co-IP de ADE2wt y ADK, imagen representativa de tres experimentos independientes.

Para comprobar si los residuos F386 y W410 eran los que estaban participando en la interacción ADE2/ADK, a través de mutación sitio dirigida cambiamos estos aminoácidos por alanina. Un cambio tanto estructural como energético suficiente a priori para poder romper la interacción entre estas dos proteínas. Es así como, generamos las mutaciones F386A y W410A, las cuales procedimos a transfectar en las células HeLa. Nuestros resultados indican que ni F386A (figura 24A) ni W410A (figura 24B) por si solos lograron romper la interacción entre estas dos proteínas.



**Figura 24. Ensayos de Co-inmunoprecipitaciones en HeLa KO ADE2.** **A**, Luego de restituir ADE2 F386A en HeLa ADE2 KO se realizó la Co-IP contra ADE2. **B**, Co-IP contra ADE2 W410A. Imágenes representativas de 2 experimentos independientes.

Este resultado descarta la participación de ambos residuos de forma individual, pero aún queda por determinar cuál es el efecto de ambas mutaciones simultáneamente. Para esto estamos realizando el doble mutante, que contendrá la mutación F386A y W410A en la misma secuencia. Creemos que el doble mutante significará un cambio no sólo estructural sino un cambio energético mayor que el de las mutaciones por si solas. Este cambio debería ser lo suficientemente fuerte como para



romper la interacción si realmente estos residuos están en la zona de interacción perdida entre ADE2 y ADK.

En síntesis, en este bloque de resultados hemos demostrado por medio de Co-IPs que las proteínas ADE2 y hCNT3 no están interaccionando o que esta interacción es demasiado débil como para detectarla por ensayos de Co-IP. Una vez obtenido este resultado nos preguntamos si existía la posibilidad que hubiese alguna proteína intermediaria. Es así, como analizamos nuevamente el listado de posibles proteínas de interacción y nos pareció que ADK podría ser una buena candidata para estar interaccionando con hCNT3 y ADE2. También observamos que tanto el silenciamiento de ADE2 como el de hCNT3 no afectan la expresión de ADK. Por otro lado, los niveles de hCNT3 no se ven disminuidos al silenciar ADE2. Tampoco se observa ninguna regulación en ADE2 cuando hCNT3 está silenciado. Todo ello sujeto a que no existe una regulación cruzada entre estas proteínas, al menos a nivel de expresión proteica.

Posteriormente hemos demostrado por medio de Co-IP que ADE2 y ADK están interaccionando. Esta interacción parece ser lo suficientemente robusta como para que al mutar individualmente por alanina dos de los residuos identificados bioinformáticamente como los que estarían participando de la interacción no fuera posible romper la interacción de ambas proteínas.

Este resultado es tremendamente interesante debido a que sería la primera evidencia que una proteína de síntesis *de novo* de nucleótidos y otra proteína con un importante rol en la recuperación y activación de nucleósidos estarían interaccionando. Tal como se comentó previamente en la introducción, ADE2 forma parte del complejo llamado purinosoma el cual se forma cuando la célula necesita incrementar sus niveles intracelulares de purinas para proliferar o diferenciarse (Chan et al. 2015; Zhao et al. 2013, 2015; Pedley and Benkovic 2017; Songon An et al. 2008). El hecho que ADE2 esté participando del purinosoma nos permite anticipar que la interacción con ADK estaría ocurriendo mientras la célula está obteniendo los nucleótidos de purina por medio de las vías de recuperación.

El hecho que el sitio activo de ADK esté expuesto cuando estas dos proteínas están interaccionando permite que su función siga intacta mientras que, los residuos

cercanos a los sitios activos de ADE2 han sido identificados como involucrados en la interacción. Otro aspecto a tener en cuenta es que ADK ejerce su función biológica como un monómero mientras que ADE2 debe octomerizar. Lo que sugiere que cuando estas dos proteínas están interaccionando ADK sería biológicamente activa mientras que ADE2 no. Los resultados obtenidos por medio de Co-IP muestran que la isoforma de ADK que está reaccionando con ADE2 es la isoforma nuclear o también llamada larga, la cual está involucrada en la regulación de la proliferación celular, es independiente de receptores, regula la metilación del DNA y está regulado por vía de mTORC1 (Boison 2013).

Es así como postulamos que cuando la interacción está ocurriendo ADK tendría un rol imprescindible para la activación de la adenosina que es internalizada a la célula a través de los transportadores de nucleósidos (hENT1, hCNT2 y hCNT3) ya sea para la formación de RNA, DNA y otros nucleótidos con funciones biológicas importantes.

Recientemente en el marco de la tesis doctoral de Olga Casulleras se ha validado la interacción de hCNT3 con ADK. Esta interacción ha demostrado cambiar la afinidad del transportador favoreciendo la internalización de adenosina. Considerando todos los antecedentes expuestos creemos que podríamos estar en presencia de un mecanismo capaz de sensor los niveles intracelulares de purinas, el cual podría estar funcionando en condiciones fisiológicas condicionando la respuesta celular frente a las demandas de nucleótidos y que se vería modificado cuando la célula necesita sintetizar nucleótidos por medio de la síntesis *de novo*.

Efecto de la biodisponibilidad de nucleósidos en la modulación de la expresión de ADE2.

Los resultados obtenidos en el primer bloque de esta Tesis sobre la interacción ADE2-ADK nos permiten sugerir que estas dos proteínas podrían estar actuando como un sensor de purinas en condiciones fisiológicas

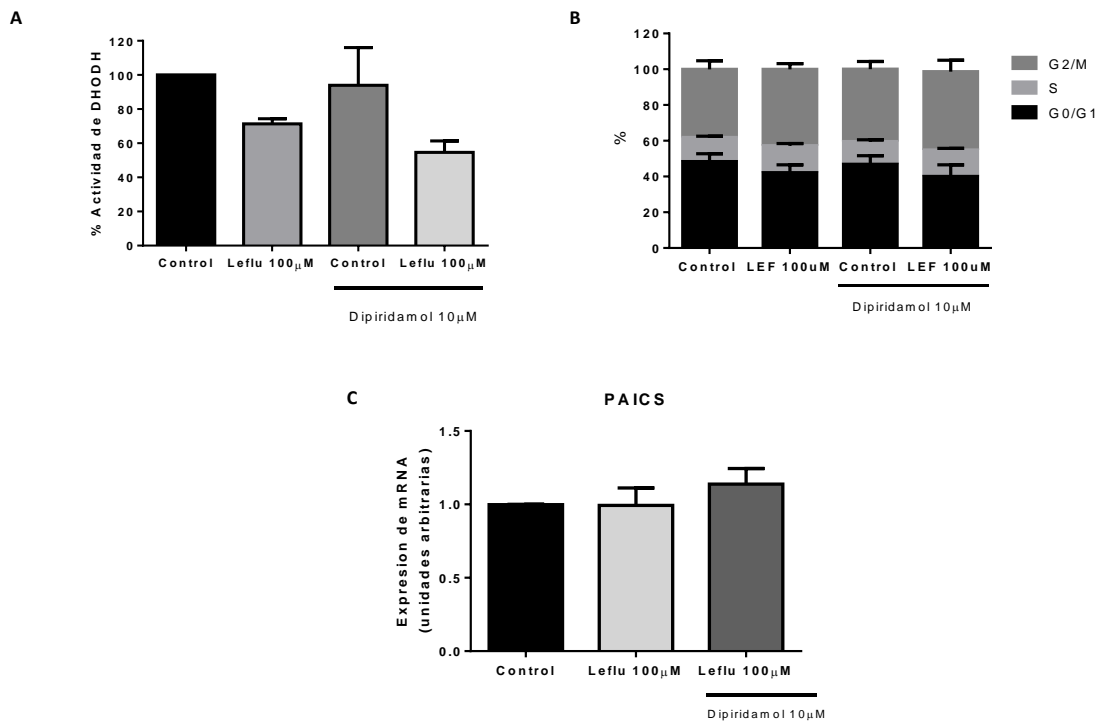
En este segundo bloque pretendimos estudiar la regulación de la expresión de PAICS (ADE2) en condiciones de estrés nutricional que afectase tanto la disponibilidad de nucleósidos como su equilibrio entre purinas y pirimidinas.

*Efecto del desbalance de nucleósidos de pirimidina sobre la expresión de PAICS.*

Debido a que ADE2 participa del purinosoma cuando la célula necesita incrementar sus niveles de nucleótidos de purina por medio de la síntesis *de novo*, nos propusimos inducir una disminución de las concentraciones de nucleótidos de pirimidinas mediante inhibición farmacológica de su síntesis *de novo*. Para este propósito las células fueron tratadas con dos inhibidores que actúan sobre la DHODH, leflunomida y brequinar. Las células también fueron tratadas con dipiridamol, un inhibidor de los transportadores hENT1 y hENT2, lo cual debería traducirse en una inhibición directa de las vías de recuperación, favoreciendo así la dependencia de la síntesis *de novo*.

Inicialmente, las células HT-29 fueron tratadas durante 6h con leflunomida 100 $\mu$ M en presencia o ausencia de dipiridamol 10 $\mu$ M. Leflunomida es un inhibidor que en la actualidad es empleado en clínica para tratar desórdenes mieloproliferativos y también se emplea en artritis reumatoide para regular el aumento de las concentraciones de pirimidinas. Una vez leflunomida es internalizada a la célula debe ser metabolizada a su forma activa, teriflunomida, la cual ejerce su función inhibitoria. Bajo estas condiciones de trabajo vimos que sólo existía un 30% de inhibición de la DHODH y que el hecho de inhibir las vías de recuperación por acción de dipiridamol no tendría efecto sobre la actividad de la DHODH. Sin embargo, al combinar ambos

inhibidores vimos una tendencia a disminuir la actividad de la DHODH (figura 25A). Al analizar el efecto de estos tratamientos sobre el ciclo celular no se observaron cambios significativos en las diferentes fases del ciclo (figura 25B) ni en la expresión de PAICS (figura 25C).

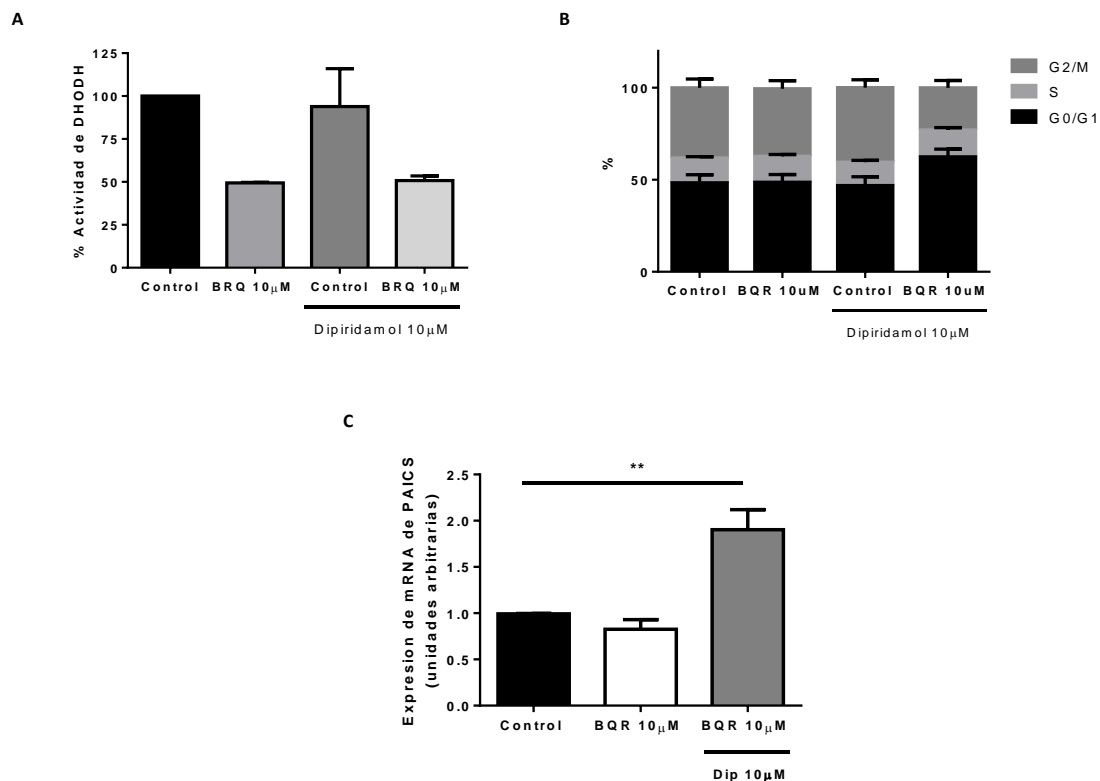


**Figura 25. Efecto de la inhibición de la dihidroorotato deshidrogenasa mediado por leflunomida.** Las células fueron tratadas por 6h en presencia de los diferentes tratamientos. A, actividad de la proteína DHODH n=2. B, Perfil del ciclo celular posteriormente al tratamiento de 6h las células fueron fijadas con etanol absoluto y almacenadas a -20°C. 24h después las muestras fueron marcadas con Ioduro de propidio y analizadas. n=3 (Media  $\pm$  SEM). C, el efecto sobre el mensajero de PAICS fue analizado mediante qRT-PCR n=3 (Media  $\pm$  SEM).

El hecho que después de 6h de tratamiento con este inhibidor se observara un porcentaje tan bajo de inhibición en la actividad de la DHODH podría deberse a que tal vez no fue totalmente metabolizado a su forma activa o que el tiempo de incubación no fue el suficiente para tener mayor efecto sobre ADE2. Por otro lado, leflunomida posee una serie de dianas inespecíficas y puede actuar sobre proteínas con actividad tirosina quinasa (PDGF, EGF, MAPK, ERK1/2) también inhibe proteínas con efectos inmunomodulatorios como TNF $\alpha$ , IL-3 y IL-4, entre otras (Zhang and Chu 2018). Por este motivo decidimos utilizar otro inhibidor más específico, brequinar.

Las células fueron tratadas con brequinar 10 $\mu$ M en las mismas condiciones de tratamiento de leflunomida. El tratamiento con brequinar por 6h mostró una inhibición

de un 50% de la actividad de la DHODH. Este mismo nivel de inhibición también se observó cuando las células estaban en presencia de la combinación de dipiridamol 10 $\mu$ M y brequinar (figura 26A), sugiriendo que dipiridamol no interfiere con el efecto del fármaco. Este aumento en la inhibición de DHODH puede deberse a que brequinar es un inhibidor más específico que leflunomida. Al analizar el efecto sobre el ciclo celular no se observaron cambios cuando las células eran tratadas con brequinar o dipiridamol. Solo se observó un aumento en G0/G1 cuando las células estuvieron en una situación de inhibición de la síntesis *de novo* de nucleótidos de pirimidina e inhibición de las vías de recuperación mediada por hENTs (figura 26B). Finalmente, al analizar el efecto de estas inhibiciones sobre el mRNA de PAICS se observó un aumento en la expresión de PAICS bajo las mismas condiciones en las cuales se inducía el aumento de fase G0/G1 del ciclo celular (figura 26C). Es decir, los niveles de mRNA de PAICS sólo se modularon, en este caso al alza, cuando se inhibía la síntesis *de novo* de nucleótidos de pirimidina y se bloqueaba la recuperación de nucleósidos y nucleobases mediada por hENTs.



**Figura 26. Efecto de la inhibición de la dihidroorotato deshidrogenasa.** **A**, las células fueron tratadas por 6h con brequinar (BQR) y posteriormente la actividad de la proteína fue medida  $n=2$ . **B**, para ciclo celular las células fueron tratadas por 6h y posteriormente fueron fijadas con etanol absoluto y almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . 24h después las muestras fueron marcadas con yoduro de propidio y analizadas.  $n=4$  (Media  $\pm$  SEM). **C**, El efecto de la inhibición con BQR sobre PAICS fue medido luego de 6h de tratamiento mediante qRT-PCT  $n=4$  (Media  $\pm$  SEM) (\*\* $p<0.01$ )

El hecho de obtener resultados diferentes con ambos inhibidores se podría explicar, al menos parcialmente, por el distinto nivel de inhibición de la DHODH. También, puede deberse por la especificidad de los inhibidores ya que sabemos que brequinar es más específico que leflunomida. El hecho de añadir una dosis 10 veces más alta con leflunomida nos permite inferir que podríamos estar tocando otras dianas, lo cual podría interferir en los resultados y dificultaría ver el mismo efecto que observamos con brequinar. Curiosamente de los dos inhibidores es leflunomida el que se utiliza en clínica para desbalancear los niveles de nucleótidos de pirimidina intracelulares en los casos de pacientes con artritis reumatoide y desórdenes mieloproliferativos. Por el contrario, brequinar siendo más específico, no ha logrado superar los ensayos clínicos para ser utilizado como fármaco.

*Efecto de la disponibilidad extracelular de nucleósidos sobre la expresión de PAICS y los transportadores de nucleósidos, elementos clave de la vía de recuperación de nucleósidos.*

La biodisponibilidad de nucleósidos en el medio celular puede ser un elemento crucial en la regulación de la síntesis *de novo* de nucleótidos de purina y de pirimidina. La asequibilidad de nucleósidos puede condicionar que la obtención de nucleótidos se lleve a cabo por las vías de recuperación o por la síntesis *de novo*. Dependiendo de las condiciones en el medio podemos asumir que la célula optará por una vía o la otra. La regulación post-traducciona de estas vías puede ser muy dependiente de la interacción proteína-proteína, tal y como hemos discutido en el primer bloque de esta tesis. No obstante, no puede descartarse que también existan cambios transcripcionales que modifiquen el nivel de mRNA, como hemos visto anteriormente para PAICS, por inhibición de las vías de recuperación e inhibición de la síntesis de nucleótidos de pirimidina.

En principio podemos hipotetizar que ADE2 será más activa en una situación en que la célula necesite inducir la síntesis *de novo* de nucleótidos de purinas, mientras que en un ambiente celular de altas concentraciones de nucleósidos las células optarían por las vías de recuperación mediadas por diversas proteínas, entre ellas ADK y los transportadores de nucleósidos de las familias *SLC28* (hCNT) y *SLC29* (hENT).

Recientemente, se ha visto que en la línea celular A549, en ausencia de FBS y glutamina, la actividad de ADE2 se ve incrementada (Goswami et al. 2015), lo que sería compatible con un incremento en la síntesis *de novo* de nucleótidos de purinas. En condiciones basales las células en cultivo están expuestas a medio enriquecido con glutamina y suero fetal bovino (FBS). La glutamina es un aminoácido necesario tanto para la síntesis *de novo* de nucleótidos como para la síntesis de poliaminas, mientras que el FBS contiene además de factores de crecimiento una considerable concentración de nucleósidos y nucleobases (Peter et al. 1987).

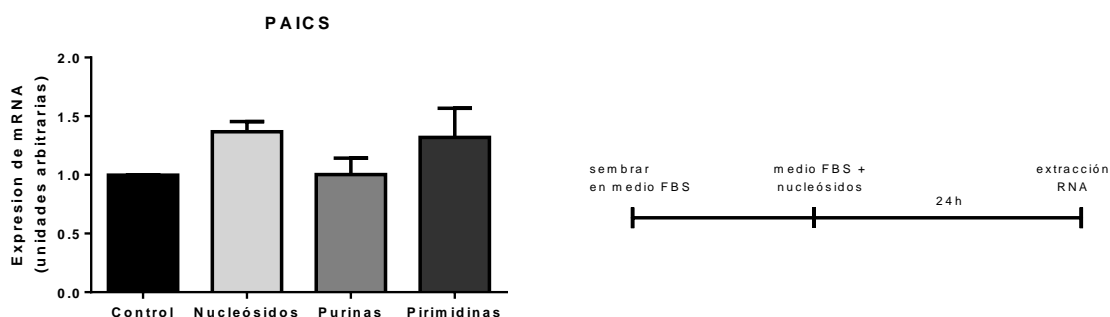
Con el fin de determinar si existe algún tipo de regulación en la expresión de los transportadores de nucleósidos (hCNT1, hCNT2, hCNT3, hENT1, hENT2), ADK y de ADE2, mediada por la biodisponibilidad de nucleósidos, diseñamos distintos protocolos

experimentales con diferentes tiempos, concentraciones y combinaciones de nucleósidos.

Las combinaciones de nucleósidos fueron añadidas en dos medios de cultivo diferentes: un medio normal o de mantenimiento con FBS y un medio depletado de nucleósidos al que se añadía FBS previamente dializado (dFBS). Con ellos se pretendía generar un estrés nutricional para poder determinar el efecto del desbalance extracelular de nucleósidos sobre la expresión de hCNT1, hCNT2, hCNT3, hENT1, hENT2, ADK y ADE2. Primeramente, trabajamos con dosis elevadas de nucleósidos (200 $\mu$ M cada uno), utilizándolos bien individualmente, como en combinaciones de purinas o pirimidinas o mezcla de nucleósidos totales.

Las células HT-29 fueron sembradas en medio con FBS normal para posteriormente seguir durante 24h en este mismo medio (FBS) o en medio dFBS (depletado de nucleósidos), en ambos casos suplementados o no con las diferentes combinaciones de nucleósidos detalladas a continuación.

Al añadir altas concentraciones de nucleósidos en medio normal de cultivo no se observaron cambios significativos en los niveles de RNA mensajero de PAICS (figura 27). Podríamos inferir que las altas concentraciones de nucleósidos estarían favoreciendo las vías de recuperación y de existir algún efecto sobre el mRNA de una proteína implicada en la síntesis *de novo* de nucleótidos de purina este debería ser inhibidor. En cualquier caso, las condiciones con las que estábamos trabajando son concentraciones que no son fisiológicas, ni tan solo fisiopatológicas, sino que estaríamos forzando el sistema al

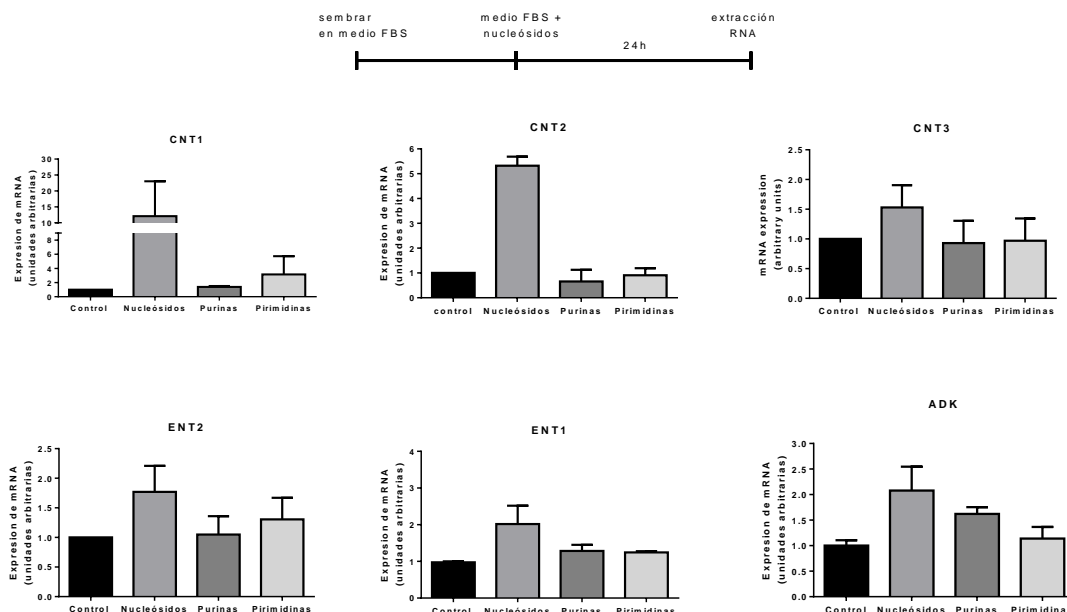


**Figura 27. Efecto del desbalance de nucleósidos en la expresión del mRNA de PAICS.** Las células fueron sembradas en medio normal. 24h después se les añadieron los mix de nucleósidos. La expresión del mRNA fue medida por qRT-PCR. La gráfica muestra el resultado de n=3 (media  $\pm$  SEM)



máximo en busca de una respuesta adaptativa generada por una situación de probable estrés metabólico y nutricional derivado de niveles extremos de asequibilidad de nucleósidos.

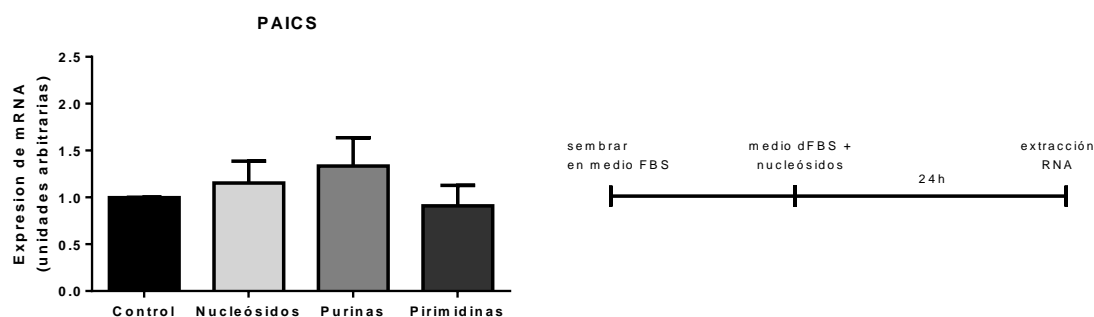
Dada la relevancia de los transportadores de nucleósidos (hENTs y hCNTs) en las vías de recuperación, nos preguntamos si el hecho de añadir altas concentraciones de nucleósidos al medio tendría algún efecto sobre su expresión a nivel de mRNA. También analizamos el posible efecto sobre ADK (figura 28). Utilizando el mismo protocolo con el cual medimos la expresión de PAICS analizamos la expresión de mRNA de estas proteínas. El efecto sobre la expresión del mRNA de los diferentes transportadores no fue el mismo. Se observó una inducción sobre hCNT1 y hCNT2 cuando se añadieron todos los nucleósidos simultáneamente, la cual no fue la misma que cuando añadimos los nucleósidos separados en purinas y pirimidinas. Sin embargo, este aumento no se observó en hCNT3. Por otro lado, aunque los niveles de mRNA de ambos hENTs y de ADK mostraban la misma tendencia a incrementar en condiciones de adición de nucleósidos totales, este aumento no fue comparable con el que se observó para hCNT1 y hCNT2. Si analizamos estos resultados en su conjunto, podemos ver que los cambios se estarían produciendo exclusivamente cuando se incrementa la concentración de



**Figura 28. Expresión de mRNA de hCNTs, hENTs y ADK en medio de cultivo con altas concentraciones de nucleósidos.** Las células fueron tratadas por 24h en presencia de las diferentes combinaciones de nucleósidos. La expresión del mRNA fue medida mediante qRT-PCR. n=2 (media ± SEM).

todos los nucleósidos en el medio. Por el contrario, cuando el aumento de las concentraciones extracelulares es debido, a purinas o a pirimidinas por separado no se observaron grandes cambios a nivel de mRNA.

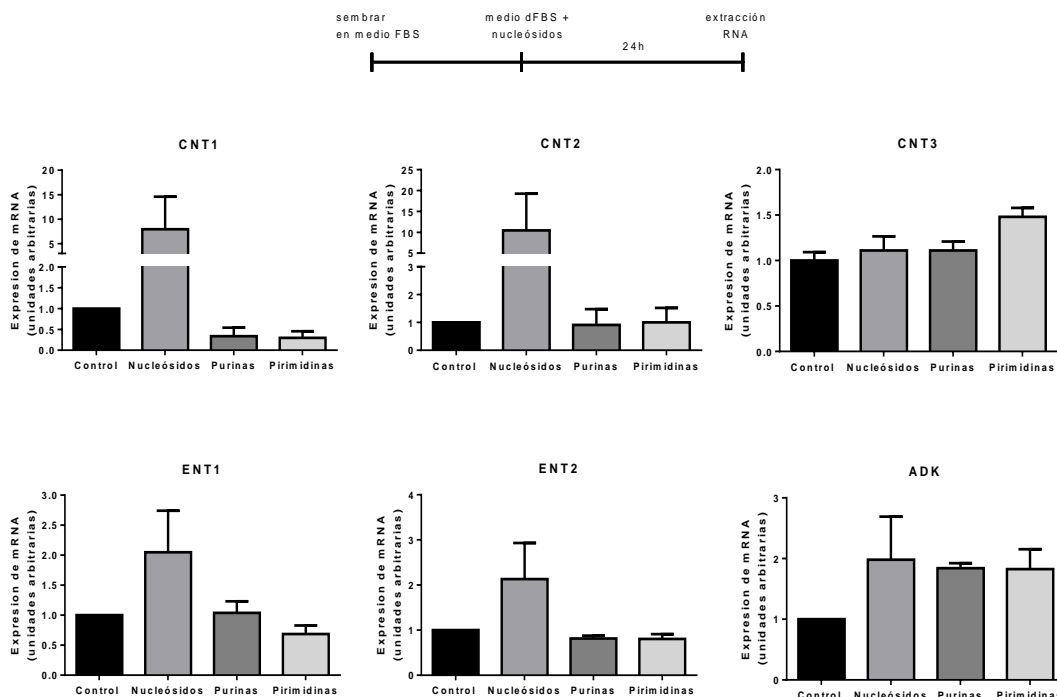
Este mismo protocolo también fue utilizado en un medio depletado de nucleósidos (dFBS) para conocer la concentración exacta de nucleósidos que tenemos en el medio y evitarán posibles interferencias de nucleósidos presentes en el FBS. Al menos al inicio del experimento, dado que cabe prever que su concentración caerá con relativa rapidez durante el periodo de cultivo. Al igual que los experimentos realizados en medio normal (FBS), lo primero que analizamos fue la expresión de PAICS (figura 29). Los resultados obtenidos mostraron que al tratar las células en un medio en ausencia de nucleósidos y añadir altas concentraciones de estos al igual que al usar medio completo, no se observaba ningún cambio significativo en la expresión de PAICS, lo cual sugiere



**Figura 29. Expresión del mRNA de PAICS post tratamiento de 24h en medio depletado de nucleósidos.** Los diferentes nucleósidos fueron añadidos en paralelo al medio depletado de nucleósidos. Luego de 24h se analizó la expresión de PAICS por medio de qRT-PCR.  $n=3$  (media  $\pm$  SEM)

que estas condiciones de cultivo no son capaces de modular la expresión del mRNA de esta proteína.

Del mismo modo, al analizar la expresión de los transportadores en suero dializado (figura 30), pudimos observar que, al igual que ocurría con medio normal (FBS), existía un aumento en la expresión de hCNT1 y hCNT2 cuando añadíamos todos los nucleósidos juntos mientras que, para hCNT3 no se observaron cambios. Tanto para hENT1 como para hENT2 y ADK existía igualmente un aumento de la expresión del mRNA cuando se le añadían todos los nucleósidos simultáneamente. Sin embargo, la magnitud de este aumento no era comparable al observado en los niveles de mRNA de hCNT1 y hCNT2. De manera totalmente distinta a lo visto para los transportadores, para el caso



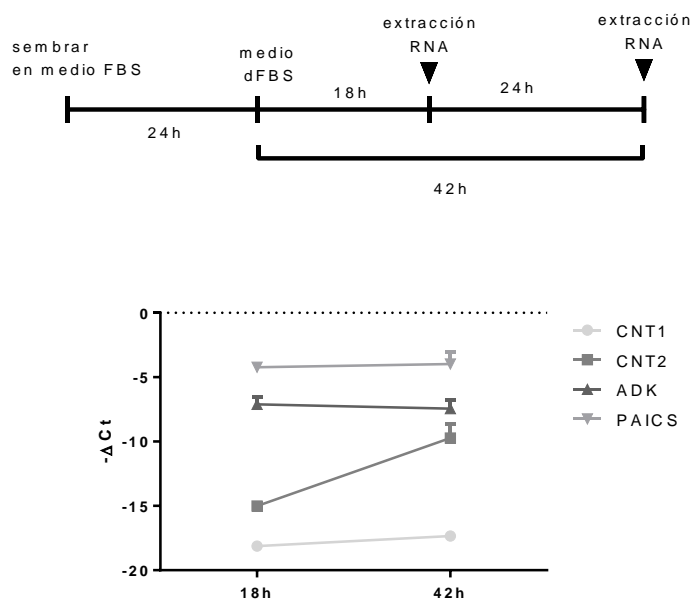
**Figura 30. Expresión de mRNA de hCNTs, hENTs y ADK.** Las células fueron tratadas por 24h en presencia medio depletado de nucleósidos y con las diferentes combinaciones de nucleósidos. La expresión del mRNA fue medida mediante qRT-PCR.  $n=2$  (media  $\pm$  SEM).

de ADK el incremento en sus niveles de mensajero también se observó cuando se suplementaba el medio con nucleósidos purínicos o pirimidínicos (figura 30).

Debido a que con el protocolo anterior se observó un aumento en los niveles de los mRNA de hCNT1 y hCNT2, pero no se detectaron cambios significativos en la expresión de PAICS, nos planteamos que el hecho de partir de unas células mantenidas en un medio rico en nucleósidos podría estar dificultando la observación e interpretación de los resultados. Por ello, nos planteamos un nuevo modelo experimental en el cual las células estuvieran previamente deplecionadas de nucleósidos y posteriormente añadir los diferentes tratamientos como estímulos y analizar el efecto de estos. Además, debido a que el medio libre de nucleósidos se obtiene por medio de la diálisis del suero y no solo se le están removiendo los nucleósidos, sino también otras moléculas pequeñas, usaremos como control el medio normal (medio de mantenimiento con FBS).

Las células fueron sembradas en DMEM normal (FBS) y luego de 24h el medio fue removido y se les añadió medio depletado de nucleósidos (dFBS) durante 18h para poder incubar 24h con los distintos tratamientos. También, nos planteamos si entre las

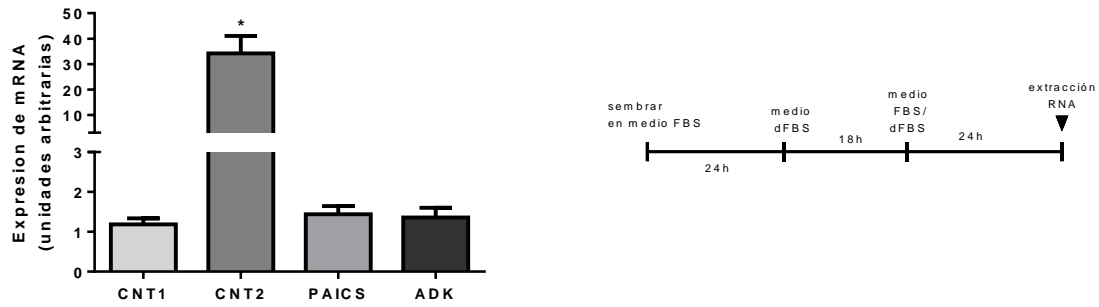
18h de depleción y las 24h de estímulo habría cambios de expresión en los niveles de mRNA de hCNT1, hCNT2, PAICS y ADK y si el hecho de mantener un tiempo más prolongado de depleción (18h + 24h) por si sólo podría estar influyendo en los niveles de expresión. La depleción de nucleósidos no se tradujo en cambios en los niveles de



**Figura 31. Efecto del medio depletado de nucleósidos sobre los niveles de mRNA de transportadores hCNT1 y hCNT2 y de las enzimas PAICS y ADK.** Las células HT-29 fueron sembradas y luego de 24h se les añadió medio depletado de nucleósidos. Luego de 18h y 42h se determinó la variación del  $\Delta Ct$  bajo estas condiciones.  $n=2$  (media  $\pm$  SEM)

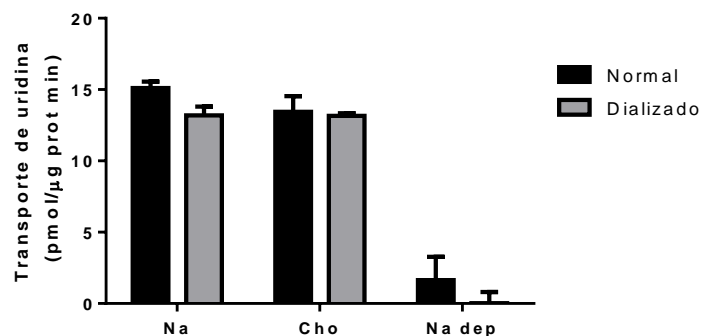
mRNA de los dos enzimas ni de hCNT1, aunque sí observamos un aumento de 5 veces en los niveles de mRNA de hCNT2 entre las 18h y 42h (figura 31).

Posteriormente cuantificamos los cambios en los niveles de mRNA de estos genes al final del tratamiento, utilizando como control células que habían estado solamente 18h en medio depletado de nucleósidos pero que luego fueron cultivadas durante 24h en medio normal. hCNT2 se vio incrementado 45 veces bajo estas condiciones (figura 32), mientras que, los otros mRNAs no modificaban sus niveles de expresión.



**Figura 32. Efecto de la depleción de nucleósidos luego de 42h de tratamiento.** Las células HT-29 fueron sembradas y luego de 24h se les añadió medio depletado de nucleósidos. Luego de 42h la expresión del mRNA de las diferentes proteínas comparados con el control se determinó por qRT-PCR (mantenidas en medio normal). La gráfica muestra el resultado de n=3 experimentos independientes. (media ± SEM) (\* p<0.05)

Dado el incremento en los niveles de mRNA de hCNT2 nos planteamos determinar si este cambio se traducía en un aumento en la actividad biológica del transportador. En este sentido cabe recordar que la expresión de hCNTs está altamente condicionada por el estado de diferenciación celular y no es fácil detectar su actividad biológica bien sea en líneas celulares derivadas de tumor o en células normales inmortalizadas. Tal y como se observa en la figura 33, el incremento en la expresión de hCNT2 no se vio reflejado en la actividad de la proteína. Si este tipo de regulación de hCNT2 es más ubicua, se debería comprobar si este mismo efecto se produce en otras líneas celulares ya que podría ser un problema de maduración o tráfico de hCNT2 a membrana en esta línea celular. En cualquier caso, la expresión funcional de hCNTs puede estar muy condicionada por la propia polarización celular, algo que no se ha aplicado en estudios en monocapa como los que aquí hemos realizado. Cabría también comprobar si la inducción de hCNT2 a nivel de proteína y de función biológica se observaría en células polarizadas cultivadas en sistemas de “transwell”.

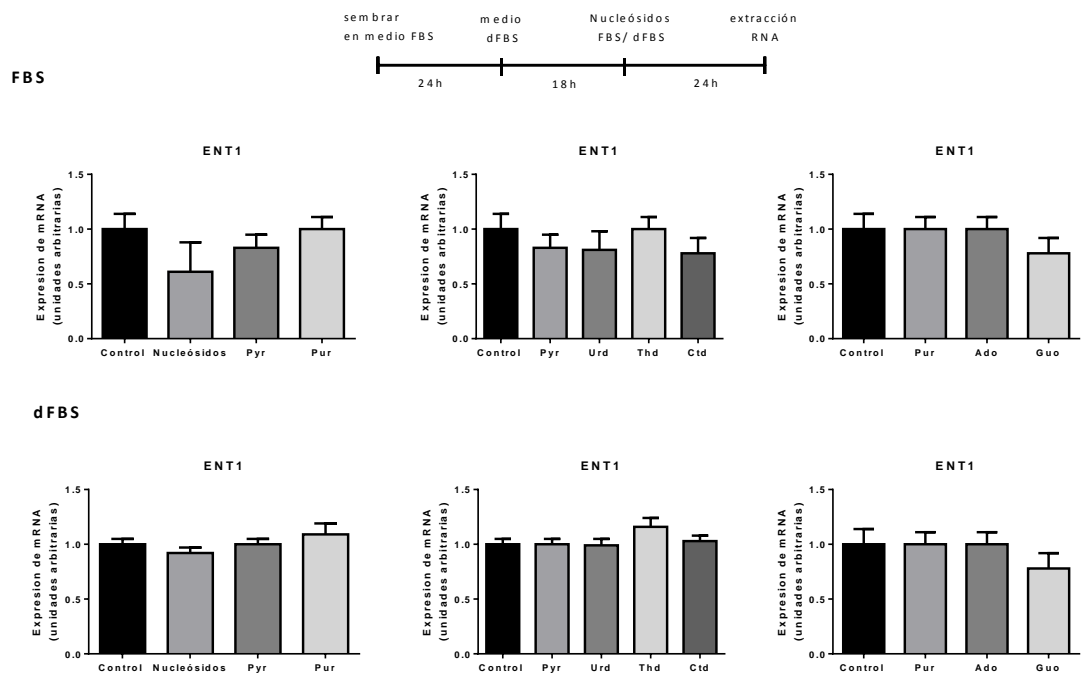


**Figura 33. Efecto del tratamiento de 42h en dFBS en la actividad de los transportadores de nucleósidos.** El ensayo fue realizado en células HT-29. La captación de [<sup>3</sup>H]-uridina fue realizada a 1 min. (media ± SEM)

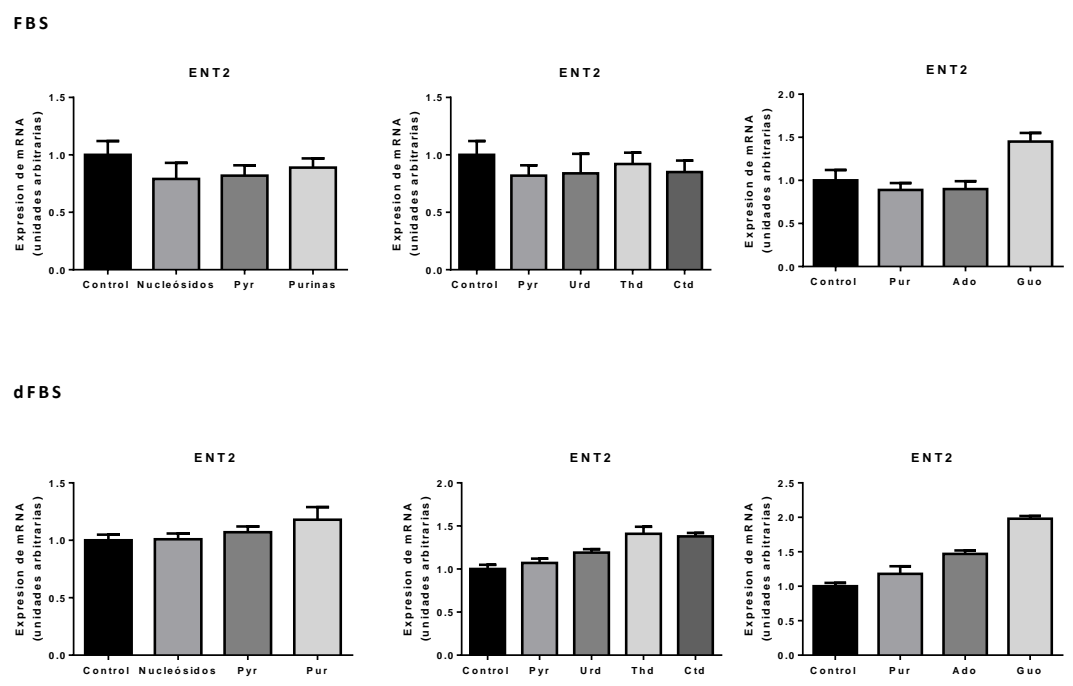
En base a los resultados obtenidos parecería que, en líneas generales, la regulación por disponibilidad de nucleósidos tiene más impacto sobre la expresión de los transportadores de la familia hCNT que sobre los transportadores hENT y las enzimas PAICS y ADK. En el siguiente bloque de resultados nos planteamos analizar el papel de los distintos nucleósidos sobre la expresión de estos genes. Para ello volvimos a cultivar las células durante 18h en condiciones de estrés nutricional producido por depleción de nucleósidos, para posteriormente mantener las células en presencia de nucleósidos en ambos medios (normal FBS y depletado dFBS) durante 24h más. Las células fueron tratadas nuevamente en condiciones de altas concentraciones de nucleósidos manteniendo siempre la condición de los nucleósidos individualmente. Así, la concentración final fue: 1mM cuando añadimos todos los nucleósidos, 600µM cuando añadimos pirimidinas, 400µM cuando añadimos las purinas y 200µM cuando añadimos cada nucleósido individualmente.

Según los resultados obtenidos previamente en este trabajo cuando se aumentaban las concentraciones de nucleósidos extracelulares sin depleción previa de nucleósidos (en medio normal FBS) se observó un aumento en los niveles de mRNA de hCNT1, hCNT2, mientras que su efecto sobre los niveles de mensajero de hENT1 y hENT2 resultó ser mucho menor, aunque también se detectaba la misma tendencia (figura 28 y 29).

Ase, con el tratamiento desglosado después de 18h de depleción, tal y como se muestra en las figuras 34 y 35, ni hENT1 ni hENT2 parecen modularse a nivel de sus mRNAs en presencia de nucleósidos cuando estos se administran bien como mezclas de purinas o pirimidinas o bien como nucleósidos individuales. La única excepción sería el caso de la guanosina donde se observó un leve aumento cuando se añadía guanosina (200µM) para hENT1 y hENT2 en medio depletado de nucleósidos y únicamente para hENT2 en medio normal (FBS).



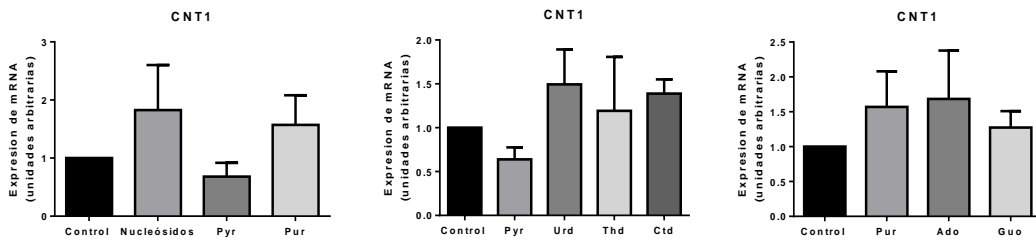
**Figura 34. Efecto de la biodisponibilidad de nucleósidos en la expresión del mensajero de ENT1.** Las células fueron tratadas en diferentes medios de cultivos y con una concentración de cada nucleósido de 200µM. 24h post tratamiento se analizó la expresión del mRNA. En la figura se muestran los resultados (media ± SEM).



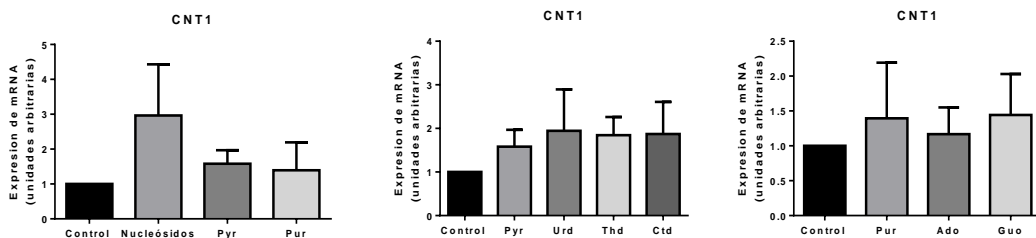
**Figura 35. Efecto de la biodisponibilidad de nucleósidos en la expresión del mensajero de ENT2.** Las células fueron tratadas en diferentes medios de cultivos y con una concentración de cada nucleósido de 200µM. 24h post tratamiento se analizó la expresión del mRNA. En la figura se muestran los resultados (media ± SEM).

En las mismas condiciones en las que se determinaron los niveles de mRNA de los transportadores hENT1 y hENT2 se cuantificaron las concentraciones de mensajero de hCNT1 y de hCNT2, previamente identificados como genes presumiblemente sensibles a la presencia de nucleósidos extracelulares. Al analizar la expresión de hCNT1 luego de ser mantenidas las células en medio dFBS, se observó que, en ambas condiciones, es decir en medio normal (FBS) y en medio depletado de nucleósidos (dFBS), la adición de nucleósidos totales (mezcla de purinas y pirimidinas, 1mM) también se traducía en un incremento de los niveles de mRNA de hCNT1 (figura 36). Este aumento no se produjo cuando se añadieron las purinas (400µM) ni pirimidinas (600µM) por separado ni cuando añadimos cada nucleósido individualmente (200µM). Esto sugiere que, aunque hCNT1 sea un transportador de nucleósidos de pirimidina, pero no de purinas, es el aumento en su conjunto de todos los nucleósidos el que modula la expresión de este transportador. Sin embargo, para poder sacar conclusiones sólidas de estos resultados, debemos incrementar el número de observaciones debido a la gran variabilidad que obtuvimos entre experimentos.

#### FBS



#### dFBS

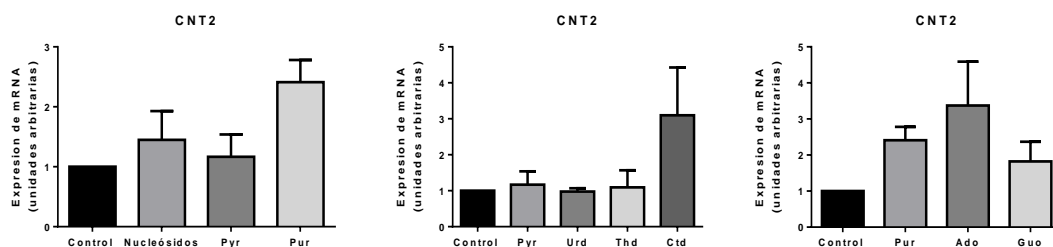


**Figura 36. Efecto de la biodisponibilidad de nucleósidos en la expresión del mensajero de CNT1.** Las células fueron tratadas en diferentes medios de cultivo y con una concentración de cada nucleósido de 200µM. 24h post tratamiento se analizó la expresión del mRNA. n=3 (media ± SEM).



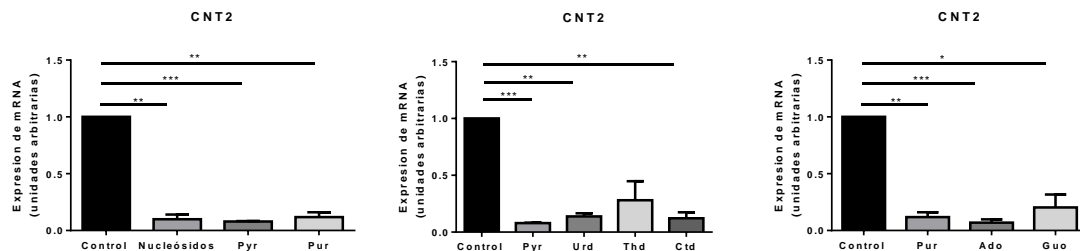
Cuando analizamos previamente el mRNA de hCNT2, se observó al igual que para hCNT1 un aumento del mensajero en condiciones de un exceso de nucleósidos sin depleción previa. Un resultado similar se obtuvo tanto en medio normal como en medio depletado de nucleósidos (figura 28 y figura 29). Además, se observó una inducción en la expresión de hCNT2 cuando las células fueron tratadas por 42h en medio depletado de nucleósidos (figura 31). Cuando comparamos la expresión de hCNT2 con las células que habían estado en medio normal se observó un aumento de 40 veces en los niveles de su mRNA (figura 32)

En esta oportunidad las células fueron sembradas y luego de 24h fueron mantenidas en medio depletado de nucleósidos por 18h. Posteriormente los niveles de nucleósidos fueron restituidos en medio de cultivo normal. El mRNA de hCNT2 se vio incrementado cuando se añadían ambas purinas de forma simultánea (figura 37). Al analizar la contribución individual de cada purina, podemos inferir que esta inducción es mediada quizás mayoritariamente por la concentración extracelular de adenosina (200 $\mu$ M). Por otro lado, también se observó un aumento en los niveles de mensajero de hCNT2 cuando se añadió citidina (200 $\mu$ M) aunque el efecto no fue evidente cuando se cultivaron las células con la combinación de los tres nucleósidos de pirimidina (600 $\mu$ M).



**Figura 37. Efecto de la biodisponibilidad de nucleósidos en la expresión del mensajero de CNT2.** Las células fueron tratadas en diferentes medios de cultivo y con una concentración de cada nucleósido de 200 $\mu$ M. 24h post tratamiento en medio normal de cultivo, se analizó la expresión del mRNA. En la figura se muestran los resultados de tres experimentos independientes (media  $\pm$  SEM).

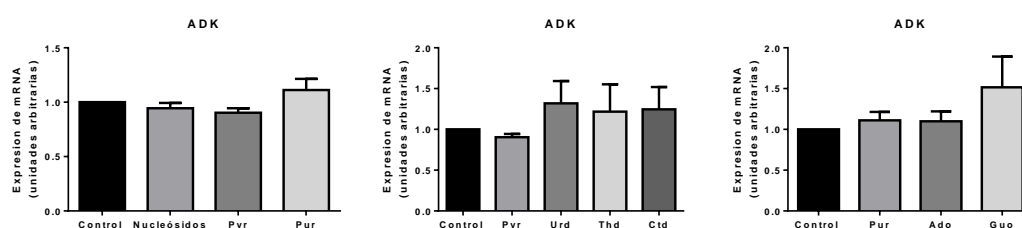
Por otro lado, cuando las células fueron tratadas en medio depletado de nucleósidos por 18h y luego se añadieron los diferentes tratamientos en dFBS, se observó una disminución significativa de la expresión de hCNT2 en todas las condiciones (figura 38). Este resultado debe ser analizado con atención ya que, si recordamos la figura 32, luego de 42h de tratamiento en suero depletado de nucleósidos existía una inducción en la expresión de hCNT2 de 40 veces. Al restaurar los nucleósidos con altas concentraciones, no observamos un aumento del mRNA de hCNT2 de porque la expresión del transportador vuelve a sus niveles basales, por lo que la inducción de hCNT2 sería específica del medio sin nucleósidos.



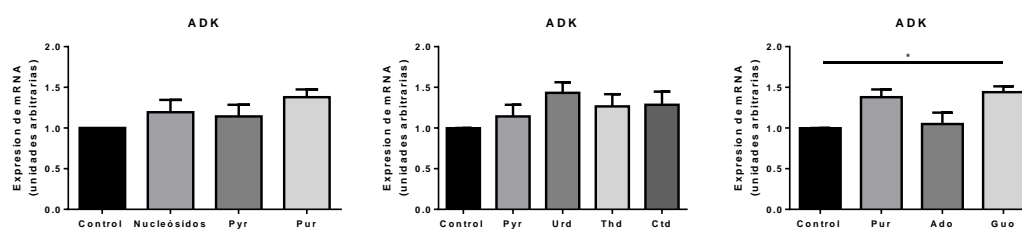
**Figura 38. Expresión de CNT2 en células tratadas en medio depletado de nucleósidos.** Las células fueron tratadas a una concentración de cada nucleósido de 200 $\mu$ M. 24h post tratamiento en medio normal de cultivo, se analizó la expresión del mRNA. En la figura se muestran los resultados de tres experimentos independientes (media  $\pm$  SEM). (\*\*\* $p$ <0.001, \*\* $p$ <0.01, \* $p$ <0.05).

Como ya hemos comentado, al margen de la regulación post-traduccional de ADE2 muy probablemente derivada de su interacción con ADK, hemos seguido analizando la posibilidad de regulación a nivel de mRNA de ambas proteínas en estas condiciones experimentales. La expresión de ADK se mantuvo constante en los diferentes tipos de suero (FBS o dFBS) bajo todas las condiciones ensayadas (figura 39). Tan sólo se observó un incremento significativo de su expresión en medio deplecionado (dFBS) suplementado con Guanosina 200 $\mu$ M.

## FBS

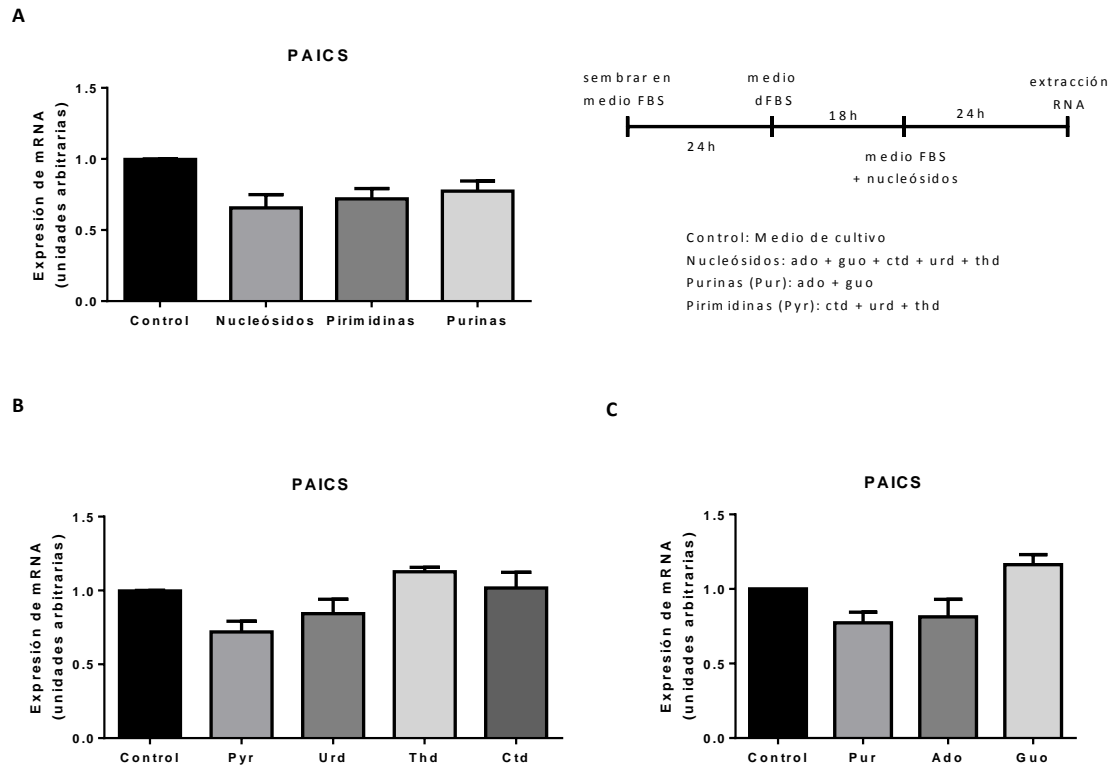


## dFBS

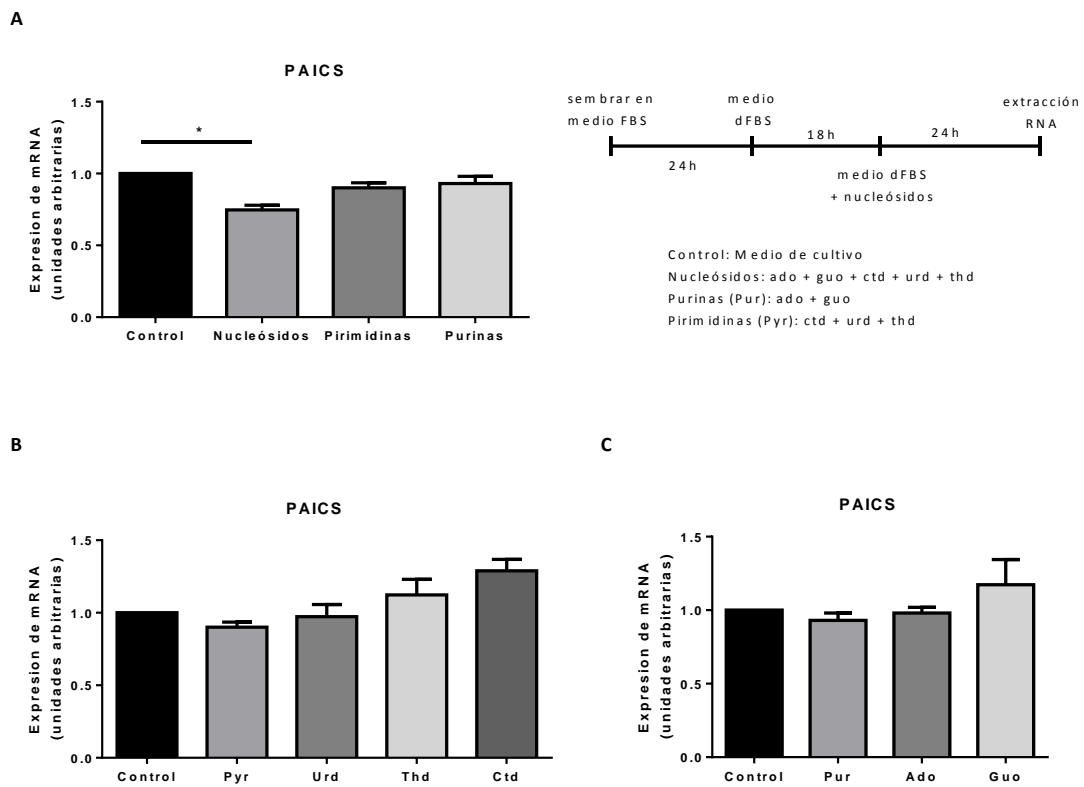


**Figura 39. Efecto de la biodisponibilidad de nucleósidos en la expresión del mensajero de ADK.** Las células fueron tratadas en diferentes medios de cultivos y con una concentración de cada nucleósido de  $200\mu\text{M}$ . 24h post tratamiento se analizó la expresión del mRNA. En la figura se muestran los resultados de tres experimentos independientes (media  $\pm$  SEM). (\* $p < 0.05$ )

En cuanto a la regulación de PAICS, hasta este punto no habíamos podido detectar cambios sensibles en los niveles de su mRNA en ninguno de los diferentes protocolos utilizados para modular la asequibilidad de nucleósidos. En esta ocasión, se intentó una vez más analizar la posibilidad de modular su expresión, luego de 18 horas de tratamiento en medio depletado de nucleósidos y posterior restitución de los nucleósidos por 24h en medio normal (FBS) (figura 40) o depletado (dFBS) (figura 41). En ambos casos se observó que la adición de nucleósidos disminuía la expresión de PAICS, aunque esta caída resultó ser sólo significativa cuando la adición de nucleósidos se realizaba en medio dFBS (figura 41A). Al analizar la contribución individual de cada nucleósido pudimos ver que tanto los nucleósidos de pirimidinas como de purinas no inducían cambios significativos en el mRNA de PAICS (figura 40C, 40B, 41B y 41C). Así, parecería que las altas concentraciones de nucleósidos son las que tendrían un efecto sobre el mensajero de PAICS.



**Figura 40. Efecto de la biodisponibilidad de nucleósidos en la expresión del mensajero de PAICS (ADE2).** Las células fueron tratadas con una concentración de 200 $\mu$ M de cada nucleósido.  $n=3$  (media  $\pm$  SEM).

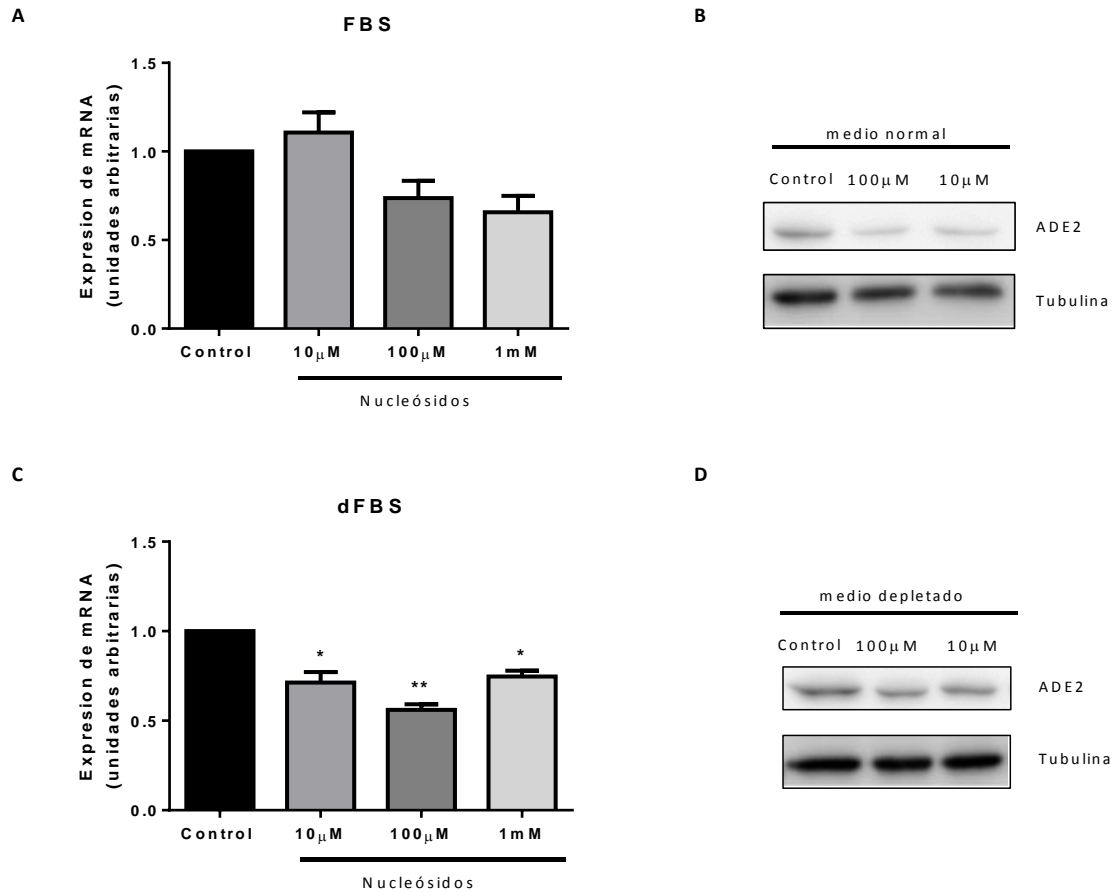


**Figura 41. Efecto de la biodisponibilidad de nucleósidos en la expresión del mensajero de PAICS (ADE2).** Las células fueron tratadas con una concentración de 200 $\mu$ M de cada nucleósido según el esquema indicado en la figura.  $n=3$  (media  $\pm$  SEM) (\* $p<0.05$ ).

Como ya hemos comentado, el efecto sobre la expresión del mRNA de PAICS en medio depletado de nucleósidos luego de que las células fueran mantenidas durante 18h en medio con dFBS y posterior recuperación de los niveles de nucleósidos (1mM) resulto ser significativo. La caída en los niveles de mRNA no era evidente cuando se añadían mezclas de purinas, pirimidinas o nucleósidos individuales. Todos los experimentos realizados hasta este momento se diseñaron utilizando, como ya se ha comentado, concentraciones no fisiológicas de nucleósidos. La lógica de este diseño se centraba en forzar las condiciones experimentales para poder evidenciar así respuestas adaptativas probablemente extremas. No obstante, cabe anticipar que la vida media de estas moléculas en cultivos celulares es también muy corta, por lo que el uso de concentraciones elevadas de nucleósidos también tenía como finalidad garantizar una exposición algo continuada a estos estímulos nutricionales.

Con el objetivo de acercarnos algo más al contexto fisiológico y fisiopatológico se repitieron los estudios con concentraciones más bajas de nucleósidos (2 $\mu$ M y 20 $\mu$ M, individualmente), lo que se traduciría en concentraciones finales de las mezclas de 10 $\mu$ M y 100 $\mu$ M. Los resultados obtenidos en medio normal (FBS) nos mostraron que a concentraciones de 10 $\mu$ M no se detectaban cambios a nivel mensajero, si bien sí existía una tendencia a la disminución a 100  $\mu$ M (figura 42A). Además, a nivel proteico pudimos ver que a concentraciones de nucleósidos totales de 10  $\mu$ M ya existía una disminución de la expresión de ADE2 a nivel de proteína (figura 42B)

Bajo estas mismas condiciones de trabajo en medio depletado de nucleósidos observamos que a nivel de mensajero se producía una disminución significativa del mRNA a todas las concentraciones de nucleósidos estudiadas, 10  $\mu$ M, 100 $\mu$ M y 1mM, es decir a concentraciones cercanas a las fisiológicas (figura 42C). Curiosamente a nivel de proteína no se observó ningún tipo de regulación bajo estas concentraciones (figura 42D). Por lo tanto, la disminución del mRNA respondería al hecho de añadir simultáneamente los nucleósidos independientemente de las concentraciones utilizadas.



**Figura 42. Expresión de PAICS post tratamiento diferentes concentraciones de nucleósidos. A,** Expresión del mRNA de PAICS en medio normal por qRT-PCR.  $n=3$  (media  $\pm$  SEM) **B,** western blot representativo de tres experimentos independientes en medio normal. **C,** Expresión del mRNA de PAICS en dFBS por qRT-PCR.  $n=3$  (media  $\pm$  SEM) (\*\* $p<0.01$ , \* $p<0.05$ ). **D,** western blot representativo de tres experimentos independientes en dFBS.

En resumen, los resultados expuestos permiten anticipar que el mayor control, presumiblemente transcripcional, inducido por los nucleósidos extracelulares se ejerce mayoritariamente sobre transportadores de membrana y, más específicamente, sobre los miembros de la familia hCNT. Así, se ha observado un incremento en los niveles de mRNA de hCNT1 y hCNT2 cuando tratamos las células con altas concentraciones de nucleósidos. Sin embargo, cuando las células fueron mantenidas 42h en medio depletado de nucleósidos se observó un aumento de expresión en hCNT2 que parece ser específico del subtipo de transportador. A pesar de que este incremento era realmente muy importante a nivel cuantitativo, no se tradujo en un aumento en la actividad del transportador. Esto podría explicarse bien por un problema intrínseco del propio modelo celular utilizado o a mecanismos que le impidan llegar a la membrana plasmática. De hecho, como ya se ha comentado, la falta de polarización celular al

haberse realizado estos estudios en un sistema convencional de monocapa y no en soportes de tipo transwell podrían en parte explicar la falta de función biológica de hCNT2. En este caso cabe hipotetizar que la proteína hCNT2 se expresaría, pero podría no estar insertada correctamente en la membrana plasmática. Por otro lado, al no existir buenos anticuerpos comerciales para detectar hCNT2 no hemos podido analizar los niveles de proteína del transportador.

La pérdida de expresión de los transportadores concentrativos de nucleósidos es una de las características de las células de origen tumoral. Por este motivo en estas la recuperación de los nucleósidos estaría mediada mayoritariamente por los transportadores equilibrativos de nucleósidos. Nuestros resultados muestran que los hENTs tienen poca sensibilidad a cambios en los niveles de nucleósidos. Por el contrario, al añadir altas concentraciones de nucleósidos se observó un aumento en la expresión del mRNA de hCNT1 y hCNT2. Esta evidencia iría a favor de un papel de los transportadores equilibrativos en proliferación y un papel de los transportadores concentrativos en diferenciación y como posible transceptor.

Al no haber detectado grandes cambios en los niveles de mRNA de ADE2 ni de ADK podríamos hipotetizar que ambos genes no están sometidos a un control potente a nivel transcripcional. No obstante, al menos para PAICS, sí que se han identificado dos situaciones concretas en las que su expresión se modularía, al menos en base a los cambios detectados en su mRNA. Una, ya comentada en el apartado anterior, es una situación de estrés celular derivado de la inhibición simultánea de las vías de recuperación con dipiridamol (inhibidor de los transportadores hENTs) y desbalance de nucleótidos de pirimidina inducido mediante el uso del inhibidor de la DHODH, brequinar. La otra situación de interés es la que acabamos de comentar, derivada de la suplementación de nucleósidos, donde se ha observado un descenso en los niveles de mRNA de PAICS. Dado que esta respuesta también se da cuando se utilizan nucleósidos en el rango micromolar bajo, es posible que tenga significado biológico en la regulación de PAICS, al margen del control bien descrito de la síntesis *de novo* de nucleótidos de purina mediante el ensamblaje o la desestructuración del purinosoma.

Discusión general.





## Discusión general.

Los nucleótidos son biomoléculas esenciales para la célula. Son la base para la construcción del RNA y DNA, actúan en procesos de transferencia de energía, como moléculas señalizadoras y juegan un rol fundamental en el metabolismo. Los nucleótidos pueden ser obtenidos de dos formas diferentes, por la vía de síntesis *de novo* o mediante el reciclaje de nucleósidos y nucleobases (vías de recuperación). Tal como se mencionó previamente la síntesis *de novo* se caracteriza por ser un proceso energéticamente costoso, mientras que la vía de recuperación es una alternativa que nos permite aumentar los niveles de nucleótidos rápidamente y con menos gasto energético asociado. En condiciones fisiológicas cabe asumir que la mayoría de las células utilizan la vía de reciclaje mientras que en cáncer la reprogramación metabólica podría alterar esta situación (Pavlova and Thompson 2016). Esto es debido a que las necesidades de proliferación celular deben ser cubiertas para que el tumor pueda desarrollarse, lo cual se traduce en un aumento de lípidos, aminoácidos, glucosa y nucleótidos (Vander Heiden and DeBerardinis 2017). En estas condiciones la síntesis *de novo* se presenta como la opción que permite cubrir este incremento en la demanda de nucleótidos. Además, se ha descrito que la regulación del metabolismo de nucleótidos por p53 mutado, se traduce en una ganancia de su actividad (Kollareddy et al. 2015). También, el factor de transcripción c-myc controla la síntesis *de novo* de nucleótidos de purinas (Y.-C. Liu et al. 2008). Ambas oncoproteínas estarían favoreciendo la síntesis *de novo* de nucleótidos por sobre las vías de recuperación.

En la actualidad, saber cuándo y cómo la célula prioriza la recuperación a la biosíntesis *de novo* es desconocido. Conocer estos mecanismos es sin duda muy relevante para la fisiología celular y podría ser crucial en la oncogénesis y en el tratamiento del cáncer. Tampoco se sabe cómo se establece la comunicación necesaria entre el metabolismo de los nucleótidos de purina y pirimidina, aunque se sabe que, el hecho de mantener un equilibrio de los niveles de nucleótidos de purina y pirimidina es imprescindible para la estabilidad y correcto funcionamiento del DNA. De hecho, el desbalance de sus niveles es la principal causa de inestabilidad genómica (Kohnken et

al. 2012; Mathews 2006). Para la síntesis *de novo* de nucleótidos de pirimidina no se ha descrito que esté regulada por ningún tipo de estructura formada por interacciones transitorias proteína-proteína. Por el contrario, para la síntesis *de novo* de nucleótidos de purinas es necesaria la formación de complejos macromoleculares. Estos complejos se denominan “purinosoma” (Songon An et al. 2008; Chan et al. 2015).

En los últimos 10 años se ha demostrado que bajo condiciones de cultivo deficientes en purinas las células tienen la capacidad de ensamblar los purinosomas (Songon An et al. 2008). El purinosoma está formado por las 6 proteínas que catalizan la formación de IMP a partir de fosforibosilpirofosfato (síntesis *de novo* de purinas) y por las proteínas ADHH y IMPDH. Estructuralmente se ubica cerca de las mitocondrias y los microtúbulos también participan de la formación de estos complejos (French et al. 2016; S. An et al. 2010). Estas estructuras son dinámicas y su formación es reversible.

La proteína multifuncional ADE2 participa en la estructura periférica del purinosoma (Deng et al. 2012; Kyoung et al. 2015). ADE2 es una proteína bifuncional que cataliza los pasos 6 y 7 de la síntesis *de novo* de nucleótidos de purina. Recientemente se ha visto que tanto en modelos de cáncer de pulmón como de próstata existe una disminución de la proliferación celular, invasión y diferenciación celular cuando ADE2 es silenciada (Chakravarthi et al. 2017; Goswami et al. 2015). Estos mismos resultados se observaron en modelos xenograft en los cuales se observó una disminución del volumen y peso del tumor (Chakravarthi et al. 2017; Goswami et al. 2015). Sin embargo, quizás lo más interesante es que el producto de la acción enzimática de ADE2, SAICAR está regulando a la PKM2 promoviendo vías de proliferación celular (Keller et al. 2014; Keller, Tan, and Lee 2012), lo que sugiere que esta proteína tiene un rol más allá de su mera participación en la síntesis *de novo* de purinas. PKM2 es una isoforma de la enzima glicolítica piruvato kinasa, la cual se expresa en diversos tipos de cáncer y es regulada por señales oncogénicas (Israelsen and Vander Heiden 2015). La expresión y actividad de PKM2 promueve la glucólisis aeróbica en las células tumorales y esencial para su proliferación (Israelsen and Vander Heiden 2015; Vander Heiden and DeBerardinis 2017).

El hecho de haber descubierto que las proteínas ADE2 y ADK están interaccionando representa la primera evidencia de que una proteína de la síntesis *de*

*de novo* de purinas y otra enzima involucrada en las vías de recuperación están relacionadas bioquímicamente. Además, contar con el modelo bioinformático con el cual logramos identificar los posibles residuos involucrados en la interacción de ambas proteínas nos permitirá profundizar en las implicaciones fisiológicas que tiene esta interacción. Para esto es imprescindible lograr la identificación de los residuos que participan de la interacción. Con la generación del doble mutante que nos permita disrumpir la interacción entre estas dos proteínas podríamos determinar la importancia de la interacción no solo a nivel fisiológico, sino también en la biología tumoral. El modelo generado anticipa que el sitio activo de ADK no está bloqueado por la interacción, por lo que esta proteína seguiría siendo activa cuando está unida a ADE2. Esto no ocurriría para ADE2 debido a que debe migrar para la conformación de purinosoma y porque su forma activa es un octámero (Li et al. 2007). Este hecho nos llevó a pensar el sentido que tendría esta interacción e hipotetizar que esta unión estaría actuando como un sensor de purinas y de acuerdo con las necesidades celulares actuaría ya sea favoreciendo la recuperación (ADK activa) o mediando la síntesis *de novo*, es decir, ADE2 activa incluida en el purinosoma.

Por otro lado, en el marco de la tesis doctoral de Olga Casulleras, se identificó que ADK y hCNT3 están interaccionando. Esta interacción no sólo fue validada bioquímicamente, sino también a nivel funcional. ADK aumentaría la afinidad del transportador por adenosina favoreciendo su recaptación. Considerando este antecedente no sólo podríamos estar frente a la interacción de ADE2 y ADK, sino que podríamos estar delante de un complejo mayor formado al menos por las tres proteínas ADE2/ADK/hCNT3. Este complejo podría estar regulando el balance entre síntesis *de novo* y vías de recuperación. El hecho que en nuestro modelo de interacción el sitio activo de ADK esté expuesto permitiría que la proteína fuera funcional. Es así como los niveles extracelulares de nucleósidos, específicamente adenosina, podrían estar siendo sensados por hCNT3 y una vez internalizados fosforilados por ADK. Cuando la demanda de nucleótidos de purina se viera incrementada, ADE2 debería desacoplarse de ADK y migrar al purinosoma para así participar en la síntesis *de novo*. Tampoco podemos descartar la participación de la proteína ADSL en este complejo presumiblemente sensor de nucleótidos de purina. ADSL cataliza el paso enzimático inmediatamente posterior a

la acción catalizada por ADE2 y se sabe que es inhibida por AMP producto a su vez de la acción enzimática de ADK que también estaría en el complejo multiproteico. Además, ADSL es otra de las proteínas que forma parte del purinosoma ubicándose de manera periférica como proteína estabilizadora. De hecho en los modelos que se han propuesto, se muestra a ADSL en conjunto con ADE2 (Pedley and Benkovic 2017). Por lo que tampoco podemos descartar que ADSL/ADE2 estén interaccionando. El principal problema de las técnicas convencionales utilizadas para identificar proteínas de interacción es la existencia de falsos positivos, pero también la posibilidad de no identificar proteínas de interacción que si lo son en realidad. En base a todo lo expuesto podríamos aventurar un modelo de regulación (figura 43), basado en la existencia de estos complejos proteicos.

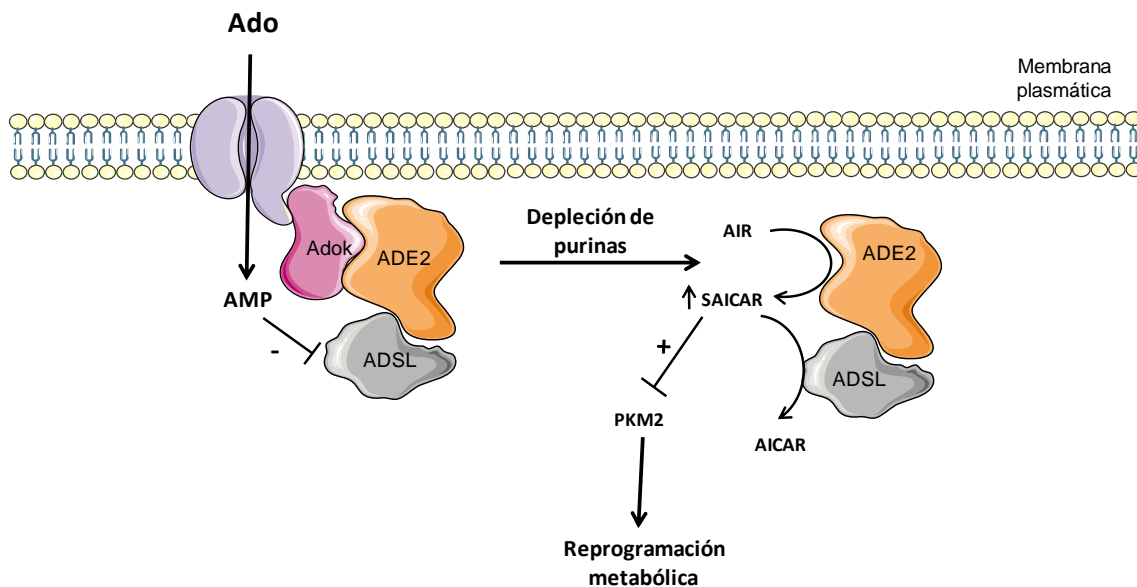


Figura 43 Modelo de interacción entre diferentes proteínas del metabolismo de nucleótidos y nucleósidos.

Como ya se ha indicado, las células tumorales dependen de la disponibilidad de nucleótidos para soportar la síntesis de ácidos nucleicos y proliferar. Las demandas metabólicas en el cáncer parecen cumplirse al desregular el metabolismo energético, promoviendo así la glucólisis aeróbica en el llamado "efecto Warburg". De hecho, la reprogramación metabólica ha sido identificada como una de las principales características del cáncer (Hanahan and Weinberg 2011; Cantor, Sabatini, and Liations 2012) La utilización de glucosa en células cancerosas a menudo se ha asociado con la necesidad de construir nucleótidos, aunque el estudio del perfil metabólico de células

tumorales ha revelado que algunos aminoácidos, como la glicina, también contribuyen a la proliferación rápida de células cancerosas, principalmente debido a su función metabólica como precursores de nucleótidos (Jain et al. 2012). Además, mantener el equilibrio de purinas y pirimidinas y la disponibilidad adecuada de nucleótidos también parece ser esencial para la proliferación (Lane and Fan 2015), siendo la deficiencia de nucleótidos una de las principales causas de inestabilidad genómica en etapas tempranas del desarrollo de cáncer (Bester et al. 2011). No obstante, las estrategias terapéuticas convencionales utilizadas hasta la fecha para tratar el cáncer se basan en el uso de fármacos (a menudo derivados de nucleósidos) cuyas dianas se ubican en las vías de recuperación nucleósidos y no en las vías de biosíntesis *de novo*. Sin embargo, en algunos trabajos recientes se ha demostrado que algunos genes que codifican enzimas de las rutas de síntesis *de novo* pueden ser biomarcadores adecuados de la progresión del cáncer (Mills et al. 2015; Goswami et al. 2015) y posibles dianas farmacológicas. También la fosforilación oxidativa ha demostrado ser esencial en la progresión del cáncer. A menudo se ha discutido la idea de que la glucólisis desregulada permite que la vía de las pentosas fosfato proporcione suficiente ribosa-5-fosfato y, a su vez, suficiente PRPP para cubrir la biosíntesis de nucleótidos de purina y pirimidina. Pero la biosíntesis de nucleótidos también puede requerir un rendimiento adecuado del sistema OXPHOS. En este sentido, DHODH es la enzima que cataliza el cuarto paso en la ruta de síntesis *de novo* de nucleótidos pirimidina. DHODH es una proteína que se encuentra en la membrana interna mitocondrial, cuya actividad oxidorreductasa está directamente acoplada a la maquinaria OXPHOS (Löffler, Carrey, and Zameitat 2015). De hecho, hasta donde sabemos, este es el único ejemplo en bioquímica de una enzima de biosíntesis que contribuye a la fosforilación oxidativa y a la síntesis de ATP.

En esta tesis también nos planteamos como cambios metabólicos asociados a la disponibilidad de nucleósidos podrían afectar la expresión de ADE2. Cuando las células fueron tratadas con los diferentes inhibidores de DHODH observamos porcentajes de inhibición diferentes sobre la enzima. Sin embargo, el efecto sobre el mRNA de ADE2 fue el mismo. Al combinar la inhibición de la DHODH con el bloqueo de los transportadores de nucleósidos equilibrativos y por lo tanto la inhibición de las vías de recuperación, observamos un aumento en el mensajero de PAICS. No podemos

descartar que en condiciones de inhibiciones farmacológicas de la vía de síntesis *de novo* de nucleótidos de pirimidina (especialmente cuando las vías de recuperación también están bloqueadas), las expresiones de las enzimas de la vía se encuentren moduladas. Este es un aspecto que merece ser estudiado y que podría evidenciar la existencia de co-regulación de la expresión de enzimas ubicadas en las vías de síntesis *de novo* tanto de nucleótidos de purina como de pirimidina. Por otro lado, bajo estas inhibiciones también se observó un aumento en el ciclo celular, específicamente en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Este aumento puede deberse a la falta de nucleósidos y nucleótidos en el medio, lo que se traduciría en que las células ciclen más lento produciéndose una acumulación en etapas del ciclo celular previa a la síntesis donde aumenta la demanda de nucleótidos.

Posteriormente modulando los niveles de nucleósidos en el medio no observamos cambios de expresión en el mRNA de ADE2, sólo observamos una disminución significativa cuando los nucleósidos en su conjunto fueron agregados simultáneamente en diferentes concentraciones en un medio libre de nucleósidos. El hecho que no exista regulación de la expresión de ADE2 cuando las células fueron mantenidas 42h con suero depletado de nucleósidos coincide con lo visto en células HeLa tratadas en medio depletado de nucleósidos por una semana en las cuales no se observaron cambios de expresión de ADE2 (Zhao et al. 2015).

Dado que los transportadores de nucleósidos y nucleobases son elementos clave de las vías de recuperación también estudiamos su expresión en estas condiciones. Bajo estos tratamientos no se observaron grandes cambios en la expresión de hENT1 y hENT2. En esta situación los niveles de mRNA de hCNT1 y hCNT2 se vieron aumentado en el tratamiento con altas concentraciones de nucleósidos. Este resultado puede parecer paradójico dado que los hENTs han sido relacionados con células en proliferación (Soler et al. 2001; Soler et al. 2003) mientras que, la expresión de hCNTs se ha asociado a diferenciación celular (Aymerich et al. 2005; Molina-Arcas, Casado, and Pastor-Anglada 2009; Molina-Arcas and Pastor-Anglada 2013).

Se ha descrito en diferentes tipos de cáncer la pérdida de expresión de los hCNTs se observa. Entender los mecanismos que regulan su expresión es de interés biológico. Por este motivo, parece relevante la inducción que se observó en el transportador hCNT2 luego de que las células fueran cultivadas 42h en medio depletado de

nucleósidos y aunque esta inducción no se observe en la actividad de los transportadores abriría una puerta para evaluar el rol de este transportador más allá de su función transportadora. Para hCNT2 sólo se le conocen proteínas partner, aldolasa B y GRP58 (Huber-Ruano et al. 2010), las cuales a priori no le confieren propiedades tipo transceptor, aunque podría anticiparlo relacionando hCNT2 con la regulación del metabolismo energético (Marçal Pastor-Anglada and Pérez-Torras 2018a). Frente a este resultado queda determinar si se produce el mismo efecto en otras líneas celulares y de ser así, que efectos tendría este aumento en la actividad de dichos transportadores. En cualquier caso, el hecho de no ver actividad podría servirnos para utilizar estas células como modelo de estudio de otro tipo de regulación mediada por hCNT2.

En síntesis, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral establecen las primeras evidencias de que podría existir un nexo entre las vías de recuperación y la síntesis *de novo* de purinas, el cual dependería de la interacción de las proteínas ADK y ADE2. También, hemos identificado un modelo de interacción el cual nos ayudará a determinar el rol de esta interacción tanto en condiciones fisiológicas como en oncogénesis.

A nivel de regulación hemos visto que el mRNA de esta proteína está regulado y que el medio depletado de nucleósidos no tiene ningún efecto sobre la expresión del mRNA de PAICS. Sin embargo, al combinar la inhibición de la síntesis *de novo* de purinas con la inhibición de las vías de recuperación mediadas por hENTs, se observó un aumento significativo de la expresión del mRNA de PAICS lo cual puede deberse a el aumento en la demanda de nucleótidos o a una co-regulación de la expresión de las proteínas de las síntesis *de novo* de nucleótidos de pirimidinas. Finalmente parece ser que son los cambios simultáneos en los niveles de todos nucleósidos extracelulares los que permiten una disminución de la expresión del mRNA de PAICS. Finalmente, hENT1 y hENT2 no son regulados por biodisponibilidad de nucleósidos mientras que hCNT1 y hCNT2 sí lo son, siendo la magnitud del aumento de expresión de hCNT2 mucho mayor sólo con la privación de nucleósidos.

Estos resultados sentarán las bases para descifrar los mecanismos celulares por los cuales la célula opta por recuperación o síntesis *de novo* de nucleótidos y nos permitirán saber cuál es el rol de los transportadores de nucleósidos en este proceso.





Conclusiones.



## Conclusiones.

- Las proteínas ADE2 y ADK interaccionan de modo que según el modelo estructural predicho ADK sería funcional debido a que el sitio activo estaría accesible, mientras que el de ADE2 no. El hecho que ADK también esté interaccionando con hCNT3 nos sugiere que ADE2 podría tener un papel relevante como nexo entre las vías de recuperación y síntesis *de novo* de nucleótidos.
- La activación transcripcional de ADE2 solo se evidencia en condiciones de inhibición de la recuperación de nucleósidos mediadas por hENTs e inhibición de la síntesis *de novo* de pirimidinas.
- La expresión de ADE2 se regula a la baja en situación de elevada disponibilidad de nucleósidos en el medio.
- Los transportadores concentrativos de alta afinidad, hCNT1 y hCNT2 son más sensibles que los transportadores equilibrativos a los cambios en la asequibilidad de los nucleósidos en el medio. Siendo, además, hCNT2 el único transportador que parece responder a la depleción de nucleósidos.



# Metodología



Metodología.

## 1. Cultivo Celular

Las especificidades de cada línea celular y los medios de cultivo utilizados en esta tesis se describen a continuación.

### 1.1. MEC-1

Línea celular proveniente de un paciente de 60 años con leucemia linfoblástica crónica tipo B. Al ser células en suspensión se cultivaron a  $1 \times 10^6$  células/mL en medio RPMI 10% FBSI, 2mM de L-glutamina y estreptomycin-penicilina al 1%.

### 1.2. HEK-293 (ATCC CRL 1573)

Esta línea celular proviene de células de riñón embrionario humano, las cuales fueron immortalizadas a partir de la transformación genética celular con la región E1 del adenovirus de tipo 5 (Graham et al. 1997). Estas células se cultivaron en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino inactivado al 10%, 2 mM de L- glutamina, y estreptomycin - penicilina al 1%.

### 1.3. HT-29 (ATCC HTB-38)

Línea celular immortalizada a partir del tumor aislado de una mujer caucásica con adenocarcinoma colorectal (Fogh et al. 1964). Esta línea celular expresa distintos oncogenes y posee una mutación en el codón 273 del gen de p53, lo cual deriva en una sustitución de Arg-> His. Estas células se cultivaron en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino inactivado al 10%, 2 mM de L- glutamina, y estreptomycin - penicilina al 1%.



#### 1.4. HeLa

Las células HeLa son la primera línea celular inmortalizada, son de origen epitelial y provienen de una paciente afroamericana con cáncer cervical. Posee una baja expresión de p53. Las HeLa fueron cultivadas en DMEM-F12 suplementado con suero fetal bovino inactivado al 10% y estreptomycin - penicilina al 1%.

#### 1.5. HeLa PAICS KO

Esta línea celular fue generada en el laboratorio de Marie Zikánová en el instituto de enfermedades metabólicas de la Universidad Carlos en Praga. Rep. Checa.(Baresova et al. 2016) Estas células fueron cultivadas en DMEM-F12 suplementado con suero fetal bovino inactivado al 10%, Adenina 0.3 $\mu$ M y estreptomycin - penicilina al 1%.

Todas las líneas celulares se cultivaron en soportes adecuados a 37°C, con una humedad relativa del 95% y un ambiente de 5% de CO<sub>2</sub>. Para el subcultivo de las células en mono capa fueron tripsinizadas y posteriormente sembradas en dilución 1/10, 1/8 y 1/6 respectivamente. Además, periódicamente a todas las líneas celulares se les analizó la presencia de mico plasma.

## 2. Tratamientos en cultivos celulares

### 2.1. Obtención de Suero libre de nucleósidos

El suero libre de nucleósidos se obtuvo mediante diálisis del suero fetal bovino. Este proceso realizó en membranas Spectrapor de 3,500 MWCO. La diálisis fue realizada por 24h contra agua de la llave. Posteriormente se añadió al suero 9 g/L de NaCl, se filtró y almacenó a -20°C para su posterior uso (Musmanno et al. 1992).

### 3. Análisis de la expresión del mRNA

#### 3.1. Extracción de ARN y retrotranscripción.

La extracción de ARN se realizó mediante la utilización del kit SV total RNA Isolation System (PROMEGA), siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente 1µg de RNA fue retro transcrito a cDNA utilizando 1.2µL de la retrotranscriptasa MMLV, 20µL de mix cDNA, 0.8µL RNAsin. El producto de PCR se almacenó a -20°C hasta su posterior utilización.

#### 3.2. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qRT-PCR).

La qRT-PCR se llevó a cabo para analizar la expresión de los genes señalados en la tabla 4 y tabla 5. Como control endógeno se utilizó GAPDH. Las muestras fueron analizadas en duplicado y en placas de 96 pocillos, las cuales contenían 9µL de muestra, 10µl de TAQMAN y 1µL de sonda. Con el valor de la media se calculó la expresión mediante el método del  $2^{\Delta\Delta CT}$  (Bustin et al. 2005; Bustin 2002).

**Tabla 4. Características de las sondas utilizadas**

| Gen            | Proteína | Primers   | Sonda                                       | Quencher |
|----------------|----------|---|---|----------|
| <i>SLC28A3</i> | CNT1     | Fw: TGATTCTTGAAGCCTGCA<br>RV: CTGCTCCTGATCTGCGG             | FAM:<br>AAGGCCAGCTCCCTA<br>GGAGTGACTTGAG    | TAMRA    |
| <i>SLC28A2</i> | CNT2     | FW:<br>AAGTAGAGCCTGAGGGAAGCAA<br>Rv: GCCCAGTCCATCCCC        | FAM:<br>AGGACTGACGCACAA<br>GGACACAGCC       | TAMRA    |
| <i>SLC29A1</i> | ENT1     | Fw:<br>GCAAAGGAGAGGAGCCAAGA<br>Rv:<br>TTCATTGGTGGGCTGAGAGTT | FAM:<br>CAGGCAAAGAGGAAT<br>CTGGAGTTTCAGTCTC | TAMRA    |
| <i>SLC29A2</i> | ENT2     | Fw:<br>CCCTGGATCTTGACCTGGGAAG<br>Rv: GGTTTTCTGGCTTCTGGG     | FAM:<br>AGGAGCCGGAATCAG<br>AGCCAGATGA       | TAMRA    |

**Tabla 5 Características de las sondas comerciales utilizadas**

| <b>Gen</b>   | <b>Assay ID</b> | <b>Especie</b> | <b>Sonda</b> | <b>Quencher</b> |
|--------------|-----------------|----------------|--------------|-----------------|
| <i>ADK</i>   | Hs00417073_m1   | Homo sapiens   | FAM          | NFQ             |
| <i>PAICS</i> | Hs00935017_gH   | Homo sapiens   | FAM          | NFQ             |
| <i>GAPDH</i> | 4310884E        | Homo sapiens   | VIC          | TAMRA           |

#### 4. Análisis de la expresión proteica

##### 4.1. Extracción de proteínas

Las células fueron lisadas utilizando el buffer NP-40 suplementado con inhibidores de proteasas, fosfatasa y ortonavato de sodio. Los extractos celulares se disgregaron y se incubaron en hielo por 10 minutos. Posteriormente los lisados celulares fueron centrifugados a 10000rpm por 10 minutos. Los sobrenadantes fueron almacenados a -20°C hasta su posterior análisis.

##### 4.2. Western blot

El análisis de la expresión de proteínas se realizó con 10µg de proteínas totales, las cuales fueron separadas en geles al 10% bis-acrilamida y a 40mA. La transferencia se realizó por 90min a 110V en membranas PDVF previamente activadas en metanol. Para eliminar los sitios de unión inespecífica de los anticuerpos (tabla 6), las membranas fueron bloqueadas en leche al 10% en TBS-Tween por 1h a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios se incubaron a 4°C toda la noche. La incubación de los anticuerpos secundarios se realizó por 1h a temperatura ambiente. Finalmente, para el revelado se utilizó el reactivo ECL y la señal fue capturada por la cámara del equipo LARS-3000 (Fujifilms).

**Tabla 6. Anticuerpos utilizados en esta tesis doctoral**

| <b>Anticuerpo</b> | <b>Casa comercial</b> | <b>Referencia</b> | <b>Reactividad</b> | <b>Dilución</b>              | <b>Peso molecular</b> |
|-------------------|-----------------------|-------------------|--------------------|------------------------------|-----------------------|
| <b>ADE2</b>       | Bethyl                | A304-546A         | Human              | 1:10000 (WB)<br>3.5-5µg (IP) | 47kDa                 |
| <b>ADK</b>        | Bethyl                | A304-280A         | Human              | 5µg (IP)                     | 41 kDa                |
| <b>ADK</b>        | Abcam                 | Ab88903           | Human              | 1:500 (WB)                   | 41 kDa                |
| <b>Tubulina</b>   | Sigma-Aldrich         | T6074             | Human              | 1:2000 (WB)                  | 50 kDa                |
| <b>Actina</b>     | Sigma-Aldrich         | A2066             | Human              | 1:2000 (WB)                  | 42 kDa                |
| <b>hCNT3</b>      | Sigma-Aldrich         | HPA024729         | Human              | 1:1500 (WB)                  | 75-100 kDa            |

#### 4.3. Co-Inmunoprecipitación de Mutantes

Los ensayos de Co-Inmunoprecipitación se realizaron con 250µg de proteínas totales a los cuales se les añadió 3.5µg de anticuerpo anti ADE2, los cuales incubaron durante toda la noche a 4°C. Luego de esta incubación, a las muestras se les añadió 15µL de beads de G-sepharosa. Nuevamente la mezcla se incubó a 4°C por 4h. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y las *beads* se lavaron 4 veces con buffer de extracción de proteínas. Finalmente, las *beads* fueron resuspendidas en el tampón Lammley al 2% para posteriormente ser analizadas por westernblot.

#### 4.4. Co-Inmunoprecipitación de Proteínas endógenas

Los ensayos de Co-Inmunoprecipitación se realizaron con 500µg de proteínas totales a los cuales se les realizó un preclearance con las G-Bead por 60min. Luego, se les añadió 5µg de anticuerpo anti ADE2 y se incubaron dos horas a 4°C. Luego, a las muestras se les añadió 30µL de beads de G-sepharosa. Nuevamente la mezcla se incubó a 4°C por 2h. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y las beads se lavaron 4 veces con buffer de extracción de proteínas. Finalmente, las beads fueron resuspendidas en el tampón Lammley al 2% para posteriormente ser analizadas por westernblot.

## 5. Análisis de la Actividad de la DHODH

Las células fueron sembradas en placas de seis pocillos. 24h después fueron tratadas con Brequinar 10 $\mu$ M y Leflunomida 100 $\mu$ M por 6h. La extracción de proteínas se realizó por sonicación en 200 $\mu$ L de agua a 4°C por 10 minutos. Las muestras fueron centrifugadas y posteriormente se mantuvo el sobrenadante a 4°C. El ensayo de actividad fue realizado inmediatamente. La actividad de la DHODH por fluorimetría según lo descrito por (Yin et al. 2017).

## 6. Métodos de expresión heteróloga transitoria.

### 6.1. Transfección por Fosfato de calcio

Las células fueron sembradas hasta obtener un 70% de confluencia, posteriormente se les añadió el mix de transfección (tabla 6). El mix de transfección fue previamente preparado y mezclado 15 minutos antes de ser añadido a las células sembradas. Luego de estar en contacto con el mix de transfección por toda la noche, este se cambió a la mañana siguiente por medio fresco. Todos los experimentos realizados con células transfectadas en estas condiciones fueron analizados 48h post-transfección.

**Tabla 7. Cantidades de reactivos utilizados para la transfección por fosfato de calcio**

|                | 24 pocillos  | Placas de 60mm | Placas de 100mm |
|----------------|--------------|----------------|-----------------|
| DNA            | 0.7 $\mu$ g  | 7 $\mu$ g      | 20 $\mu$ g      |
| Agua estéril   | 12.5 $\mu$ L | 125 $\mu$ L    | 250 $\mu$ L     |
| Tampón Calcio  | 12.5 $\mu$ L | 125 $\mu$ L    | 250 $\mu$ L     |
| Tampón Fosfato | 25 $\mu$ L   | 250 $\mu$ L    | 500 $\mu$ L     |
| Volumen final  | 50 $\mu$ L   | 500 $\mu$ L    | 1000 $\mu$ L    |

## 6.2. Lipofectamina

La lipofectamina es un reactivo de origen catiónico que tiene la capacidad de unirse al DNA, el cual está cargado negativamente formando un complejo lipofectamina-DNA. La formación de este complejo es lo que permite la entrada del DNA por la membrana plasmática facilitando su incorporación al interior de la célula. En esta tesis los experimentos realizados para el silenciamiento de hCNT3 y PAICS en células HEK293-CNT3 fueron realizados utilizando esta técnica.

Las células fueron sembradas 24h antes y en condiciones normales de cultivo. Previo a la transfección con lipofectamina el medio de cultivo fue removido y se les añadió OPTIMEM. De forma paralela se prepararon dos soluciones. La primera contiene el siRNA en 150µL de OPTIMEM y la segunda contiene 10µL de Lipfectamina en 150µL de OPTIMEM. La mezcla de ambas soluciones fue incubada por 20 minutos y posteriormente añadida a nuestras células. Luego de 5 horas el medio de transfección es removido y se reemplaza por medio de cultivo.

## 7. Biología Molecular y técnicas relacionadas

### 7.1. Obtención del cDNA de PAICS

El cDNA de PAICS fue obtenido a partir del Repositorio de Plásmidos de la Universidad de Arizona (DNASU). La secuencia está contenida en el vector pDNR-Dual y corresponde a la secuencia de la variante 1 la proteína. Este vector tiene un tamaño de 6172pb. La secuencia de PAICS está flanqueada por las enzimas Sall y HindIII.

### 7.2. Subclonamiento de PAICS en el vector pCDNA3.1+

La secuencia correspondiente a PAICS fue digerida del vector pDNR-dual con las endonucleasas Sall y HindIII y se insertó mediante ligación enzimática, en los sitios sensibles a corte con las endonucleasas XbaI y ApaI del sitio de multiclonamiento del vector pCDNA3.1+ (Invitrogen). La ligación se realizó por 2 horas a temperatura

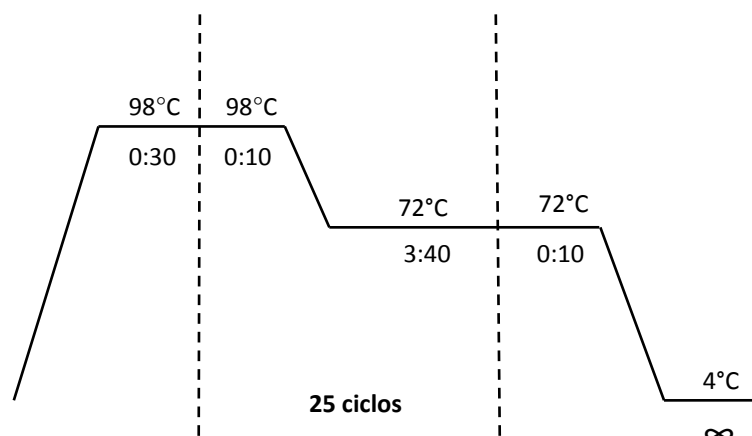
ambiente y posteriormente el producto de ligación fue inmediatamente transformado en Bacterias *E. coli* top Blue x-100.

### 7.3. Transformación de Bacterias competentes mediante Shock térmico

Para la transformación se utilizaron alícuotas de 100µL de bacterias top Blue x-100. Las cuales fueron mezcladas con el producto de ligación contenido en 10µL. La mezcla fue incubada 15 min en hielo y luego se procedió a realizar el shock térmico a 42°C por 90 segundos y nuevamente se dejaron a 4°C por 5 min y se les añadió 1mL de medio Luria-Bertani (LB). La recuperación se realizó en agitación a 37°C por 1 hora. Luego, las bacterias fueron centrifugadas 5 minutos y el pellet de bacterias se resuspendió en 200µL de medio LB. Finalmente, las bacterias se sembraron las placas de agar LB/ampicilina por 14-16h a 37°C.

### 7.4. Mutación sitio dirigida

Por medio de una PCR convencional se introdujeron mutaciones en la secuencia que codifica para PAICS. El diseño de los “primers” se realizó a partir de la secuencia de DNA de la proteína la cual fue obtenida de. La reacción se realizó con 1ng de DNA, 25nM de dNTPs, 10µL de Buffer HF, 10µL de primer forward, 10µL de primer reverse y 0.5µL de HF polimerasa. La PCR se realizó bajo las siguientes temperaturas:



Los primers utilizados y las mutaciones producidas se pueden observar en la tabla 8.

**Tabla 8. Secuencias utilizadas para realizar las mutaciones sitiodirigida.**

| <b>Aminoácido mutado</b> | <b>Secuencia (5' - 3')</b>           | <b>Mutación</b> |
|--------------------------|--------------------------------------|-----------------|
| <b>F386</b>              | Fw: CTCCAGAAGGATCAGCTCAAGCTGCTGCTCAG | A386            |
|                          | Rv: AAAGTACGGTTGAACAGCCAAGACCACTGG   |                 |
| <b>W410</b>              | Fw: GCAAGCATTTTGAACACAGCGATTTCTTGAA  | A410            |
|                          | Rv: TCGCAGTTTGCTCCATACCAAATGGTTGCT   |                 |

### 7.5. Secuenciación de vectores

Esta técnica se realizó para determinar que las mutaciones introducidas en los vectores se incorporaran en los sitios correctos, en esta tesis se utilizó la secuenciación de Sanger. Este tipo de secuenciación se basa en una PCR convencional previa y el posterior análisis se desarrolló en el servicio Genómica del Parc Científic de Barcelona.

### 7.6. Digestión enzimática del DNA

Para la liberación de la secuencia de PAICS y para abrir el vector pCDNA3.1+ se utilizó la digestión por enzimas de restricción. Para realizar esto se utilizaron 1µg de DNA plasmidial 1µL de cada enzima, buffer 10X y agua. Posteriormente la mezcla fue incubada a 37°C por 90-120 minutos, finalmente con el producto de la digestión se realizaron electroforesis en geles 1% de agarosa para comprobar la correcta digestión.

### 7.7. Extracción de DNA plasmidial

La extracción del DNA plasmidial se llevó a cabo a partir de cultivos de 3mL bacterias, las cuales fueron centrifugadas, se descartó el sobrenadante y con el pellet se procedió a la extracción del DNA por medio del kit "Wizard Plus SV minipreps DNA purification systems" (Promega) de acuerdo a las especificaciones realizadas por el fabricante.

Una vez obtenido el DNA este fue cuantificado en Nanodrop y almacenado a -20°C hasta su posterior utilización.



## 7.8. Purificación de DNA a partir de gel de agarosa

La purificación de DNA a partir de un gel de agarosa nos permite poder obtener diferentes fragmentos de interés y purificarlos para su posterior utilización. En esta tesis se emplearon geles al 1%, los cuales fueron corridos en tampón TAE 1x a 80V. Una vez obtenida la separación deseada se recortó la banda correspondiente a PAICS y/o al vector pCDNA3.1+ digerido. Luego, se procedió a purificar con el kit QIAquick (Qiagen) según las indicaciones del fabricante.

## 8. CRISPR

### 8.1. CRISPR CAS9

Las células (HT-29 y HEK293T) fueron sembradas y luego transfectadas con el sistema ADE2 KO CRISPR CAS9 (SC-418581) y el ADE2 HDR plasmid (SC-418581-HDR) (Santa Cruz biotechnologies) según las indicaciones del fabricante.

### 8.2. Doble Nickasa

Las células fueron transfectadas 24h después de ser sembradas con el vector ADE2 double nickase systems (SC-418581-NIC) (Santa Cruz Biothechnologies) se procedió de igual forma que con el sistema anterior.

## 9. Análisis estadísticos

En esta tesis los análisis estadísticos se realizaron mediante el software GraphPad Prism 6.0. Los resultados corresponden al promedio de experimentos independientes. La significancia entre dos grupos se ha calculado mediante el test t-Student. Se ha considerado significativo el  $p < 0.05$ . La significancia estadística ( $***p < 0.001$ ,  $**p < 0.01$ ,  $*p < 0.05$ ) indica diferencia entre dos tratamientos.

## Bibliografía



## Bibliografía

- An, S., Y. Deng, J. W. Tomsho, M. Kyoung, and S. J. Benkovic. 2010. "Microtubule-Assisted Mechanism for Functional Metabolic Macromolecular Complex Formation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (29): 12872–76. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008451107>.
- An, Songon, Ravindra Kumar, Erin D. Sheets, and Stephen J. Benkovic. 2008. "Reversible Compartmentalization of de Novo Purine Biosynthetic Complexes in Living Cells." *Science* 320 (5872): 103–6. <https://doi.org/10.1126/science.1152241>.
- Antle, V D, N Donat, M Hua, P L Liao, R Vince, and C A Carperelli. 1999. "Substrate Specificity of Human Glycinamide Ribonucleotide Transformylase." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 370 (2): 231–35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10577357>.
- Aymerich, I, S Duflot, S Fernández-Veledo, E Guillén-Gómez, I Huber-Ruano, F J Casado, and M Pastor-Anglada. 2005. "The Concentrative Nucleoside Transporter Family (SLC28): New Roles beyond Salvage?" *Biochemical Society Transactions* 33 (Pt 1). Portland Press Limited: 216–19. <https://doi.org/10.1042/BST0330216>.
- Baldwin, Stephen A, Paul R Beal, Sylvia Y M Yao, Anne E King, Carol E Cass, and James D Young. 2004. "The Equilibrative Nucleoside Transporter Family, SLC29." *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 447: 735–43. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1103-2>.
- Baresova, Veronika, Matyas Krijt, Vaclava Skopova, Olga Souckova, Stanislav Kmoch, and Marie Zikanova. 2016. "CRISPR-Cas9 Induced Mutations along de Novo Purine Synthesis in HeLa Cells Result in Accumulation of Individual Enzyme Substrates and Affect Purinosome Formation." *Molecular Genetics and Metabolism* 119 (3): 270–77. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.08.004>.
- Baresova, Veronika, Vaclava Skopova, Jakub Sikora, David Patterson, Jana Sovova, Marie Zikanova, and Stanislav Kmoch. 2012. "Mutations of ATIC and ADSL Affect Purinosome Assembly in Cultured Skin Fibroblasts from Patients with AICA-Ribosiduria and ADSL Deficiency." *Human Molecular Genetics* 21 (7): 1534–43.

<https://doi.org/10.1093/hmg/ddr591>.

Barnes, K., Halina Dobrzynski, Sophie Foppolo, Paul R Beal, Fouzia Ismat, Elspeth R Scullion, Lijie Sun, et al. 2006. "Distribution and Functional Characterization of Equilibrative Nucleoside Transporter-4, a Novel Cardiac Adenosine Transporter Activated at Acidic PH." *Circulation Research* 99 (5): 510–19. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000238359.18495.42>.

Becker, M A, and M Kim. 1987. "Regulation of Purine Synthesis de Novo in Human Fibroblasts by Purine Nucleotides and Phosphoribosylpyrophosphate." *The Journal of Biological Chemistry* 262 (30): 14531–37. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2444588>.

Ben-Sahra, I., J. J. Howell, J. M. Asara, and B. D. Manning. 2013. "Stimulation of de Novo Pyrimidine Synthesis by Growth Signaling Through MTOR and S6K1." *Science* 339 (6125): 1323–28. <https://doi.org/10.1126/science.1228792>.

Bester, Assaf C., Maayan Roniger, Yifat S. Oren, Michael M. Im, Dan Sarni, Malka Chaoat, Aaron Bensimon, Gideon Zamir, Donna S. Shewach, and Batsheva Kerem. 2011. "Nucleotide Deficiency Promotes Genomic Instability in Early Stages of Cancer Development." *Cell* 145 (3): 435–46. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.044>.

Boison, D. 2013. "Adenosine Kinase: Exploitation for Therapeutic Gain." *Pharmacological Reviews* 65 (3): 906–43. <https://doi.org/10.1124/pr.112.006361>.

Bustin, S A. 2002. "Quantification of mRNA Using Real-Time Reverse Transcription PCR (RT-PCR): Trends and Problems." *Journal of Molecular Endocrinology* 29 (1): 23–39. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12200227>.

Bustin, S A, V Benes, T Nolan, and M W Pfaffl. 2005. "Quantitative Real-Time RT-PCR - a Perspective." *Journal of Molecular Endocrinology* 34 (3): 597–601. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01755>.

Cantor, Jason R, David M Sabatini, and Affi Liations. 2012. "Cancer Cell Metabolism: One Hallmark, Many Faces." <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0345>.

Chakravarthi, Balabhadrapatruni V. S. K., Moloy T. Goswami, Satya S. Pathi, Matthew

- Dodson, Darshan S. Chandrashekar, Sumit Agarwal, Saroj Nepal, et al. 2017. "Expression and Role of PAICS, a De Novo Purine Biosynthetic Gene in Prostate Cancer." *The Prostate* 77 (1): 10–21. <https://doi.org/10.1002/pros.23243>.
- Chan, Chung Yu, Hong Zhao, Raymond J. Pugh, Anthony M. Pedley, Jarrod French, Sara A. Jones, Xiaowei Zhuang, Hyder Jinnah, Tony Jun Huang, and Stephen J. Benkovic. 2015. "Purinosome Formation as a Function of the Cell Cycle." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (5): 1368–73. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423009112>.
- Chen, S F, F W Perrella, D L Behrens, and L M Papp. 1992. "Inhibition of Dihydroorotate Dehydrogenase Activity by Brequinar Sodium." *Cancer Research* 52 (13): 3521–27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1617622>.
- Collins, Kim D, and George R Stark. 1971. "Aspartate Transcarbamylase Interaction with the Transition State Analogue N-(Phosphonacetyl)-L-Aspartate." *Txr: JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 246 (21): 6599–6605. <http://www.jbc.org/content/246/21/6599.full.pdf>.
- Cunningham, John T, Melissa V Moreno, Alessia Lodi, Sabrina M Ronen, and Davide Ruggero. 2014. "Protein and Nucleotide Biosynthesis Are Coupled by a Single Rate-Limiting Enzyme, PRPS2, to Drive Cancer." *Cell* 157 (5). Elsevier: 1088–1103. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.052>.
- Deng, Yijun, Jongsik Gam, Jarrod B. French, Hong Zhao, Songon An, and Stephen J. Benkovic. 2012. "Mapping Protein-Protein Proximity in the Purinosome." *Journal of Biological Chemistry* 287 (43): 36201–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.407056>.
- Duflot, Sylvie, Maria Calvo, F Javier Casado, Carlos Enrich, and Marçal Pastor-Anglada. 2002. "Concentrative Nucleoside Transporter (RCNT1) Is Targeted to the Apical Membrane through the Hepatic Transcytotic Pathway." *Experimental Cell Research* 281 (1): 77–85. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12441131>.
- Durán, Raúl V., Wolfgang Oppliger, Aaron M. Robitaille, Lisa Heiserich, Roswitha Skendaj, Eyal Gottlieb, and Michael N. Hall. 2012. "Glutaminolysis Activates Rag-

- MTORC1 Signaling." *Molecular Cell* 47 (3): 349–58.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.05.043>.
- Eberhardy, Scott R., and Peggy J. Farnham. 2001. "C-Myc Mediates Activation of the Cad Promoter via a Post-RNA Polymerase II Recruitment Mechanism." *Journal of Biological Chemistry* 276 (51): 48562–71.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109014200>.
- Emmanuel, Natasha, Shoba Ragunathan, Qin Shan, Fang Wang, Andreas Giannakou, Nanni Huser, Guixian Jin, Jeremy Myers, Robert T. Abraham, and Keziban Unsal-Kacmaz. 2017. "Purine Nucleotide Availability Regulates MTORC1 Activity through the Rheb GTPase." *Cell Reports* 19 (13). ElsevierCompany.: 2665–80.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.043>.
- Errasti-Murugarren, Ekaitz, F Javier Casado, and Marçal Pastor-Anglada. 2010. "Different N-Terminal Motifs Determine Plasma Membrane Targeting of the Human Concentrative Nucleoside Transporter 3 in Polarized and Nonpolarized Cells." *Molecular Pharmacology* 78 (5): 795–803.  
<https://doi.org/10.1124/mol.110.065920>.
- Errasti-Murugarren, Ekaitz, Marçal Pastor-Anglada, and F Javier Casado. 2007. "Role of CNT3 in the Transepithelial Flux of Nucleosides and Nucleoside-Derived Drugs." *The Journal of Physiology* 582 (Pt 3): 1249–60.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.130138>.
- Fan, Jing, Jiangbin Ye, Jurre J. Kamphorst, Tomer Shlomi, Craig B. Thompson, and Joshua D. Rabinowitz. 2014. "Quantitative Flux Analysis Reveals Folate-Dependent NADPH Production." *Nature* 510 (7504): 298–302. <https://doi.org/10.1038/nature13236>.
- Fernández-Calotti, Paula, Olga Casulleras, María Antolin, Francisco Guarner, and Marçal Pastor-Anglada. 2016. "Galectin-4 Interacts with the Drug Transporter Human Concentrative Nucleoside Transporter 3 to Regulate Its Function." *FASEB Journal* 30 (2): 544–54. <https://doi.org/10.1096/fj.15-272773>.
- French, Jarrod B., Sara A. Jones, Huayun Deng, Anthony M. Pedley, Doory Kim, Chung Yu Chan, Haibei Hu, et al. 2016. "Spatial Colocalization and Functional Link of

- Purinosomes with Mitochondria.” *Science* 351 (6274): 733–37.  
<https://doi.org/10.1126/science.aac6054>.
- French, Jarrod B, Hong Zhao, Songon An, Sherry Niessen, Yijun Deng, Benjamin F Cravatt, and Stephen J Benkovic. 2013. “Hsp70/Hsp90 Chaperone Machinery Is Involved in the Assembly of the Purinosome.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (7): 2528–33.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1300173110>.
- Fustin, Jean-Michel, Masao Doi, Hiroyuki Yamada, Rie Komatsu, Shigeki Shimba, and Hitoshi Okamura. 2012. “Cell Reports Report Rhythmic Nucleotide Synthesis in the Liver: Temporal Segregation of Metabolites.” *CellReports* 1: 341–49.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.03.001>.
- Goswami, Moloy T, Guoan Chen, Balabhadrapatruni V S K Chakravarthi, Satya S Pathi, Sharath K Anand, Shannon L Carskadon, Thomas J Giordano, et al. 2015. “Role and Regulation of Coordinately Expressed de Novo Purine Biosynthetic Enzymes PPAT and PAICS in Lung Cancer.” *Oncotarget* 6 (27): 23445–61.  
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.4352>.
- Govindarajan, Rajgopal, Christopher J. Endres, Dale Whittington, Edward LeCluyse, Marçal Pastor-Anglada, Chung-Ming Tse, and Jashvant D. Unadkat. 2008. “Expression and Hepatobiliary Transport Characteristics of the Concentrative and Equilibrative Nucleoside Transporters in Sandwich-Cultured Human Hepatocytes.” *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 295 (3): G570–80. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00542.2007>.
- Govindarajan, Rajgopal, George P. H. Leung, Mingyan Zhou, Chung-Ming Tse, Joanne Wang, and Jashvant D Unadkat. 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 (4): G910–22. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90672.2008>.
- Grañé-Boladeras, Natàlia, Sandra Pérez-Torras, Juan José Lozano, Marta R. Romero, Adela Mazo, José J.G. Marín, and Marçal Pastor-Anglada. 2016. “Pharmacogenomic Analyzis of the Responsiveness of Gastrointestinal Tumor Cell Lines to Drug



- Therapy: A Transportome Approach." *Pharmacological Research* 113 (Pt A): 364–75. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.09.007>.
- Grañé-Boladeras, Natalia, Christopher M. Spring, W. J. Brad Hanna, Marçal Pastor-Anglada, and Imogen R. Coe. 2016. "Novel Nuclear HENT2 Isoforms Regulate Cell Cycle Progression via Controlling Nucleoside Transport and Nuclear Reservoir." *Cellular and Molecular Life Sciences* 73 (23): 4559–75. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2288-9>.
- Graves, Lee M., Hedeel I. Guy, Piotr Kozlowski, Min Huang, Eduardo Lazarowski, R. Marshall Pope, Matthew A. Collins, Erik N. Dahlstrand, H. Shelton Earp, and David R. Evans. 2000. "Regulation of Carbamoyl Phosphate Synthetase by MAP Kinase." *Nature* 403 (6767): 328–32. <https://doi.org/10.1038/35002111>.
- Gray, Jennifer H., Ryan P. Owen, and Kathleen M. Giacomini. 2004. "The Concentrative Nucleoside Transporter Family, SLC28." *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 447 (5): 728–34. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1107-y>.
- Greene, S, K Watanabe, J Braatz-Trulson, and L Lou. 1995. "Inhibition of Dihydroorotate Dehydrogenase by the Immunosuppressive Agent Leflunomide." *Biochemical Pharmacology* 50 (6): 861–67. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7575649>.
- Grem, J L, S A King, P J O'Dwyer, and B Leyland-Jones. 1988. "Biochemistry and Clinical Activity of N-(Phosphonacetyl)-L-Aspartate: A Review." *Cancer Research* 48 (16): 4441–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3293772>.
- Hanahan, Douglas, and Robert A Weinberg. 2011. "Hallmarks of Cancer: The Next Generation." *Cell* 144: 646–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- Havugimana, Pierre C., G. Traver Hart, Tamás Nepusz, Haixuan Yang, Andrei L. Turinsky, Zhihua Li, Peggy I. Wang, et al. 2012. "A Census of Human Soluble Protein Complexes." *Cell* 150 (5): 1068–81. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.011>.
- Heiden, Matthew G. Vander, and Ralph J. DeBerardinis. 2017. "Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology." *Cell* 168 (4). Elsevier Inc.: 657–69. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.039>.

- Huber-Ruano, Isabel, Itziar Pinilla-Macua, Gonzalo Torres, F. Javier Casado, and Marçal 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). Wiley-Blackwell: 620–30. <https://doi.org/10.1002/jcp.22254>.
- Israelsen, William J, and Matthew G Vander Heiden. 2015. "Pyruvate Kinase: Function, Regulation and Role in Cancer." *Seminars in Cell and Developmental Biology* 43: 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.08.004>.
- Jain, Mohit, Roland Nilsson, Sonia Sharma, Nikhil Madhusudhan, Toshimori Kitami, Amanda L Souza, Ran Kafri, Marc W Kirschner, Clary B Clish, and Vamsi K Mootha. 2012. "Metabolite Profiling Identifies a Key Role for Glycine in Rapid Cancer Cell Proliferation." *Science (New York, N.Y.)* 336 (6084). American Association for the Advancement of Science: 1040–44. <https://doi.org/10.1126/science.1218595>.
- Jewell, J. L., Y. C. Kim, R. C. Russell, F.-X. Yu, H. W. Park, S. W. Plouffe, V. S. Tagliabracci, and K.-L. Guan. 2015. "Differential Regulation of MTORC1 by Leucine and Glutamine." *Science* 347 (6218): 194–98. <https://doi.org/10.1126/science.1259472>.
- Johnson, Zachary Lee, Cheom-Gil Cheong, and Seok-Yong Lee. 2012. "Crystal Structure of a Concentrative Nucleoside Transporter from *Vibrio Cholerae* at 2.4 Å." *Nature* 483 (7390): 489–93. <https://doi.org/10.1038/nature10882>.
- Jurecka, A. 2009. "Inborn Errors of Purine and Pyrimidine Metabolism." *Journal of Inherited Metabolic Disease* 32 (2): 247–63. <https://doi.org/10.1007/s10545-009-1094-z>.
- Keller, Kirstie E, Irene S Tan, and Young-Sam Lee. 2012. "SAICAR Stimulates Pyruvate Kinase Isoform M2 and Promotes Cancer Cell Survival in Glucose-Limited Conditions." *Science (New York, N.Y.)* 338 (6110). NIH Public Access: 1069–72. <https://doi.org/10.1126/science.1224409>.
- Keller, KirstieE, ZainabM Doctor, ZacharyW Dwyer, and Young Sam Lee. 2014. "SAICAR Induces Protein Kinase Activity of PKM2 That Is Necessary for Sustained

- Proliferative Signaling of Cancer Cells.” *Molecular Cell* 53 (5): 700–709.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.02.015>.
- Kohnken, Rebecca, Karthik M Kodigepalli, and Li Wu. 2012. “Regulation of Deoxynucleotide Metabolism in Cancer: Novel Mechanisms and Therapeutic Implications.” <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0446-6>.
- Kollareddy, Madhusudhan, Elizabeth Dimitrova, Krishna C. Vallabhaneni, Adriano Chan, Thuc Le, Krishna M. Chauhan, Zunamys I. Carrero, et al. 2015. “Regulation of Nucleotide Metabolism by Mutant P53 Contributes to Its Gain-of-Function Activities.” *Nature Communications* 6 (1): 7389.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms8389>.
- Kong, Wei, Karen Engel, and Joanne Wang. 2004. “Mammalian Nucleoside Transporters.” *Current Drug Metabolism* 5 (1): 63–84.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14965251>.
- Kristensen, Anders R, Joerg Gsponer, and Leonard J Foster. 2012. “A High-Throughput Approach for Measuring Temporal Changes in the Interactome.” *Nature Methods* 9 (9): 907–9. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2131>.
- Kyoung, Minjoung, Sarah J. Russell, Casey L. Kohnhorst, Nopondo N. Esemoto, and Songon An. 2015. “Dynamic Architecture of the Purinosome Involved in Human de Novo Purine Biosynthesis.” *Biochemistry* 54 (3): 870–80.  
<https://doi.org/10.1021/bi501480d>.
- Lai, Yurong, Aimee H. Bakken, and Jashvant D. Unadkat. 2002. “Simultaneous Expression of HCNT1-CFP and HENT1-YFP in Madin-Darby Canine Kidney Cells.” *Journal of Biological Chemistry* 277 (40): 37711–17.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M204986200>.
- Lane, Andrew N., and Teresa W.-M. Fan. 2015. “Regulation of Mammalian Nucleotide Metabolism and Biosynthesis.” *Nucleic Acids Research* 43 (4). Oxford University Press: 2466–85. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv047>.
- Larráyoiz, Ignacio M, Francisco Javier Casado, Marçal Pastor-Anglada, and M Pilar Lostao. 2004. “Electrophysiological Characterization of the Human Na(+)/Nucleoside

- Cotransporter 1 (HCNT1) and Role of Adenosine on HCNT1 Function." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (10): 8999–9007. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311940200>.
- Li, Shu Xing, Yong Ping Tong, Xiao Cong Xie, Qi Hai Wang, Hui Na Zhou, Yi Han, Zhan Yu Zhang, et al. 2007. "Octameric Structure of the Human Bifunctional Enzyme PAICS in Purine Biosynthesis." *Journal of Molecular Biology* 366 (5): 1603–14. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.12.027>.
- Liu, Lichao, Zhen Dong, Qian Lei, Jie Yang, Huanrong Hu, Qian Li, and Yacong Ji. 2017. "Inactivation / Deficiency of DHODH Induces Cell Cycle Arrest and Programed Cell Death in Melanoma" 8 (68): 112354–70.
- Liu, Yen-Chun, Feng Li, Jesse Handler, Cheng Ran Lisa Huang, Yan Xiang, Nicola Neretti, John M. Sedivy, Karen I. Zeller, and Chi V. Dang. 2008. "Global Regulation of Nucleotide Biosynthetic Genes by C-Myc." Edited by Dong-Yan Jin. *PLoS ONE* 3 (7): e2722. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002722>.
- Löffler, Monika, Elizabeth A. Carrey, and Elke Zameitat. 2015. "Orotic Acid, More Than Just an Intermediate of Pyrimidine de Novo Synthesis." *Journal of Genetics and Genomics* 42 (5): 207–19. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2015.04.001>.
- Mangravite, L M, J H Lipschutz, K E Mostov, and K M Giacomini. 2001. "Localization of GFP-Tagged Concentrative Nucleoside Transporters in a Renal Polarized Epithelial Cell Line." *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 280 (5): F879-85. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2001.280.5.F879>.
- Mannava, Sudha, Vladimir Grachtchouk, Linda J. Wheeler, Michael Im, Dazhong Zhuang, Elena G. Slavina, Christopher K. Mathews, Donna S. Shewach, and Mikhail A. Nikiforov. 2008. "Direct Role of Nucleotide Metabolism in C-MYC-Dependent Proliferation of Melanoma Cells." *Cell Cycle* 7 (15): 2392–2400. <https://doi.org/10.4161/cc.6390>.
- Mathews, Christopher K. 2006. "DNA Precursor Metabolism and Genomic Stability." *The FASEB Journal* 20 (9): 1300–1314. <https://doi.org/10.1096/fj.06-5730rev>.
- Mathews, Irimpan I., Mark D. Erion, and Steven E. Ealick. 1998. "Structure of Human

- Adenosine Kinase at 1.5 Å Resolution.” *Biochemistry* 37 (45): 15607–20. <https://doi.org/10.1021/bi9815445>.
- Mills, Ian G, Stefan J Barfeld, Ladan Fazli, Margareta Persson, Lisette Marjavaara, Alfonso Urbanucci, Kirsi M Kaukonieni, et al. 2015. “Myc-Dependent Purine Biosynthesis Affects Nucleolar Stress and Therapy Response in Prostate Cancer.” *Oncotarget* 6 (14): 12587–602. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3494>.
- Molina-Arcas, Míriam, F Javier Casado, and Marçal Pastor-Anglada. 2009. “Nucleoside Transporter Proteins.” *Current Vascular Pharmacology* 7 (4): 426–34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19485885>.
- Molina-Arcas, Míriam, and Marçal Pastor-Anglada. 2013. “Nucleoside Transporters (SLC28 and SLC29) Family.” In *Pharmacogenomics of Human Drug Transporters*, 243–70. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118353240.ch11>.
- Musmanno, L A, R S Jamison, R S Barnett, E Buford, and J N Davidson. 1992. “Complete Hamster CAD Protein and the Carbamylphosphate Synthetase Domain of CAD Complement Mammalian Cell Mutants Defective in de Novo Pyrimidine Biosynthesis.” *Somatic Cell and Molecular Genetics* 18 (4): 309–18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1359654>.
- Navaratnam, Naveenan, and Rizwan Sarwar. 2006. “An Overview of Cytidine Deaminases.” *International Journal of Hematology* 83 (3): 195–200. <https://doi.org/10.1532/IJH97.06032>.
- Oliveros, Juan C., Mònica Franch, Daniel Tabas-Madrid, David San-León, Lluís Montoliu, Pilar Cubas, and Florencio Pazos. 2016. “Breaking-Cas—interactive Design of Guide RNAs for CRISPR-Cas Experiments for ENSEMBL Genomes.” *Nucleic Acids Research* 44 (W1). Oxford University Press: W267–71. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw407>.
- Pastor-Anglada, M, E Errasti-Murugarren, I Aymerich, and F J Casado. 2007. “Concentrative Nucleoside Transporters (CNTs) in Epithelia: From Absorption to Cell Signaling.” *Journal of Physiology and Biochemistry* 63 (1): 97–110. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17722647>.

- Pastor-Anglada, Marçal, and Sandra Pérez-Torras. 2018a. "Emerging Roles of Nucleoside Transporters." *Frontiers in Pharmacology* 9 (June): 606. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00606>.
- . 2018b. "Who Is Who in Adenosine Transport." *Frontiers in Pharmacology* 9 (June). *Frontiers*: 627. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00627>.
- Pastor-Anglada, Marçal, Nerea Urtasun, and Sandra Pérez-Torras. 2018. "Intestinal Nucleoside Transporters: Function, Expression, and Regulation" 8. American Cancer Society: 1003–17. <https://doi.org/10.1002/CPHY.C170039>.
- Pavlova, Natalya N., and Craig B. Thompson. 2016. "The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism." *Cell Metabolism* 23 (1): 27–47. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>.
- Pedley, Anthony M, and Stephen J Benkovic. 2017. "A New View into the Regulation of Purine Metabolism: The Purinosome." <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.09.009>.
- Pennycooke, Micha, Naz Chaudary, Irina Shuralyova, Ying Zhang, and Imogen R. Coe. 2001. "Differential Expression of Human Nucleoside Transporters in Normal and Tumor Tissue." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 280 (3): 951–59. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.4205>.
- Pérez-Torras, S, A Vidal-Pla, P Cano-Soldado, I Huber-Ruano, A Mazo, and M Pastor-Anglada. 2013. "Concentrative Nucleoside Transporter 1 (HCNT1) Promotes Phenotypic Changes Relevant to Tumor Biology in a Translocation-Independent Manner." *Cell Death & Disease* 4 (5): e648–e648. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.173>.
- Pinilla-Macua, Itziar, F Javier Casado, and Marçal Pastor-Anglada. 2012. "Structural Determinants for RCNT2 Sorting to the Plasma Membrane of Polarized and Non-Polarized Cells." *The Biochemical Journal* 442 (3): 517–25. <https://doi.org/10.1042/BJ20110605>.
- Robitaille, A. M., S. Christen, M. Shimobayashi, M. Cornu, L. L. Fava, S. Moes, C. Prescianotto-Baschong, U. Sauer, P. Jenoe, and M. N. Hall. 2013. "Quantitative Phosphoproteomics Reveal MTORC1 Activates de Novo Pyrimidine Synthesis."

- Science* 339 (6125): 1320–23. <https://doi.org/10.1126/science.1228771>.
- Rudolph, J., and J. Stubbe. 1995. "Investigation of the Mechanism of Phosphoribosylamine Transfer from Glutamine Phosphoribosylpyrophosphate Amidotransferase to Glycinamide Ribonucleotide Synthetase." *Biochemistry* 34 (7). American Chemical Society: 2241–50. <https://doi.org/10.1021/bi00007a019>.
- Santos-Rodrigues, Alexandre dos, Natalia Grañé-Boladeras, Alex Bicket, and Imogen R. Coe. 2014. "Nucleoside Transporters in the Purinome." *Neurochemistry International* 73 (July): 229–37. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2014.03.014>.
- Schendel, F J, Y S Cheng, J D Otvos, S Wehrli, and J Stubbe. 1988. "Characterization and Chemical Properties of Phosphoribosylamine, an Unstable Intermediate in the de Novo Purine Biosynthetic Pathway." *Biochemistry* 27 (7): 2614–23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2454658>.
- Schmidt, Valentina, Rachana Nagar, and Luis A Martinez. 2017. "Control of Nucleotide Metabolism Enables Mutant P53's Oncogenic Gain-of-Function Activity." *International Journal of Molecular Sciences* 18 (12). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms18122759>.
- Soler, C, R Valdés, J Garcia-Manteiga, J Xaus, M Comalada, F J Casado, M Modolell, et al. 2001. "Lipopolysaccharide-Induced Apoptosis of Macrophages Determines the up-Regulation of Concentrative Nucleoside Transporters Cnt1 and Cnt2 through Tumor Necrosis Factor-Alpha-Dependent and -Independent Mechanisms." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (32): 30043–49. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101807200>.
- Soler, Concepció, Antonio Felipe, José García-Manteiga, Maria Serra, Elena Guillén-Gómez, F Javier Casado, Carol MacLeod, Manuel Modolell, Marçal Pastor-Anglada, and Antonio Celada. 2003. "Interferon-Gamma 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 (Pt 3): 777–83. <https://doi.org/10.1042/BJ20030260>.
- Srere, Paul A. 1985. "The Metabolon." *Trends in Biochemical Sciences* 10 (3). Elsevier:

109–10. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(85\)90266-X](https://doi.org/10.1016/0968-0004(85)90266-X).

Suzuki, Nobuo N, Katsuhisa Koizumi, Masanori Fukushima, Akira Matsuda, and Fuyuhiko Inagaki. 2004. "Structural Basis for the Specificity, Catalysis, and Regulation of Human Uridine-Cytidine Kinase." *Structure* 12 (5): 751–64. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.02.038>.

Sykes, David B, Youmna S Kfoury, François E Mercier, Mathias J Wawer, Jason M Law, Mark K Haynes, Timothy A Lewis, et al. 2016. "Inhibition of Dihydroorotate Dehydrogenase Overcomes Differentiation Blockade in Acute Myeloid Leukemia." *Cell* 167 (1). Elsevier: 171–186.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.057>.

Tsuboi, K K, N H Edmunds, and L K Kwong. 1977. "Selective Inhibition of Pyrimidine Biosynthesis and Effect on Proliferative Growth of Colonic Cancer Cells." *Cancer Research* 37 (9). American Association for Cancer Research: 3080–87. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/884665>.

Wan, Cuihong, Blake Borgeson, Sadhna Phanse, Fan Tu, Kevin Drew, Greg Clark, Xuejian Xiong, et al. 2015. "Panorama of Ancient Metazoan Macromolecular Complexes." *Nature* 525 (7569): 339–44. <https://doi.org/10.1038/nature14877>.

Yamaoka, Takashi, Makiko Yano, Maki Kondo, Hidemi Sasaki, Satoshi Hino, Rumi Katashima, Maki Moritani, and Mitsuo Itakura. 2001. "Feedback Inhibition of Amidophosphoribosyltransferase Regulates the Rate of Cell Growth via Purine Nucleotide, DNA, and Protein Syntheses." *Journal of Biological Chemistry* 276 (24): 21285–91. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011103200>.

Yao, Sylvia Y. M., Amy M. L. Ng, Carol E. Cass, Stephen A. Baldwin, and James D. Young. 2011. "Nucleobase Transport by Human Equilibrative Nucleoside Transporter 1 (HENT1)." *Journal of Biological Chemistry* 286 (37): 32552–62. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.236117>.

Yin, Sheng, Tsutomu Kabashima, Qinchang Zhu, Takayuki Shibata, and Masaaki Kai. 2017. "Fluorescence Assay of Dihydroorotate Dehydrogenase That May Become a Cancer Biomarker." *Scientific Reports* 7 (January): 40670. <https://doi.org/10.1038/srep40670>.



- Young, James D., Sylvia Y.M. Yao, Jocelyn M. Baldwin, Carol E. Cass, and Stephen A. Baldwin. 2013. "The Human Concentrative and Equilibrative Nucleoside Transporter Families, SLC28 and SLC29." *Molecular Aspects of Medicine* 34 (2–3): 529–47. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.05.007>.
- Zhang, Chunying, and Maolin Chu. 2018. "Leflunomide: A Promising Drug with Good Antitumor Potential." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 496 (2). Academic Press: 726–30. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2018.01.107>.
- Zhao, Hong, Christopher R. Chiaro, Limin Zhang, Philip B. Smith, Chung Yu Chan, Anthony M. Pedley, Raymond J. Pugh, Jarrod B. French, Andrew D. Patterson, and Stephen J. Benkovic. 2015. "Quantitative Analysis of Purine Nucleotides Indicates That Purinosomes Increase de Novo Purine Biosynthesis." *Journal of Biological Chemistry* 290 (11): 6705–13. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.628701>.
- Zhao, Hong, Jarrod B. French, Ye Fang, and Stephen J. Benkovic. 2013. "The Purinosome, a Multi-Protein Complex Involved in the de Novo Biosynthesis of Purines in Humans." *Chemical Communications* 49 (40): 4444. <https://doi.org/10.1039/c3cc41437j>.

Anexo



P18-39

## **Role of nucleoside availability on the regulation of the key enzyme of *de novo* purine nucleotide biosynthesis PAICS.**

Liska Caviedes Cárdenas<sup>1</sup>, Sandra Pérez-Torras<sup>2</sup>, Marçal Pastor-Anglada<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Molecular Pharmacology and Experimental Therapeutics, Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine, Institute of Biomedicine, University of Barcelona. Barcelona. Institut de Recerca Hospital Sant Joan de Déu (IR-HSJD), Esplugues de Llobregat., Barcelona, ES, <sup>2</sup>Molecular Pharmacology and Experimental Therapeutics, Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine, Institute of Biomedicine, University of Barcelona. Barcelona. Institut de Recerca Hospital Sant Joan de Déu (IR-HSJD), Esplugues de Llobregat. Oncology Program, CIBER ehd, National Biomedical Research Institute on Liver and Gastrointestinal Diseases, Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, ES

Nucleosides and nucleotides have a key role in cell physiology being implicated in crucial processes such as DNA and RNA synthesis, cell signaling and metabolic regulation. Purine and pyrimidine nucleotide balance is required for cell homeostasis, being imbalance and nucleotide depletion associated with metabolic dysregulation and cancer development. Understanding the molecular mechanisms behind these events appears to be a suitable approach to uncover novel drug anticancer targets and, eventually, improve therapy. *De novo* nucleotide biosynthesis is a highly energetic expensive process tightly regulated at different levels. *PAICS* (phosphoribosylaminoimidazole carboxylase / phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase) gene encodes the bifunctional enzyme ADE2, which catalyzes steps 6 and 7 of *de novo* purine nucleotide biosynthesis. This enzyme has been reported to have an important role in carcinogenesis. Here we have analyzed how PAICS is regulated when nucleoside availability disturbances are induced using HT-29 cell lines. PAICS expression appears to be modulated in a challenging situation when the inhibitions of *de novo* pyrimidine nucleotide biosynthesis and salvage pathways were combined. Moreover, when cells were cultured in a nucleoside depleted medium we observed a regulation of human Concentrative Nucleoside Transporters (hCNTs) expression. This type of modulation suggests that extracellular nucleoside availability and *de novo* nucleotide biosynthesis are metabolically interconnected.

---





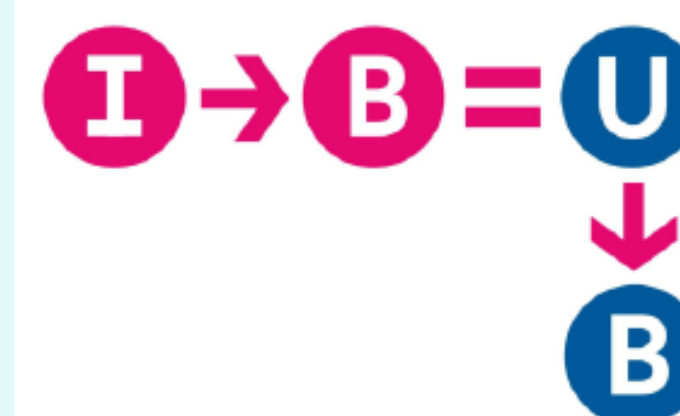
# Role of nucleoside availability on the regulation of the key enzyme of *de novo* purine nucleotide biosynthesis PAICS.

Liska Caviedes-Cárdenas<sup>1,2</sup>, Sandra Pérez-Torras<sup>1,2,3</sup>, Marçal Pastor-Anglada<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Molecular Pharmacology and Experimental Therapeutics, Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine, Institute of Biomedicine, University of Barcelona. Barcelona

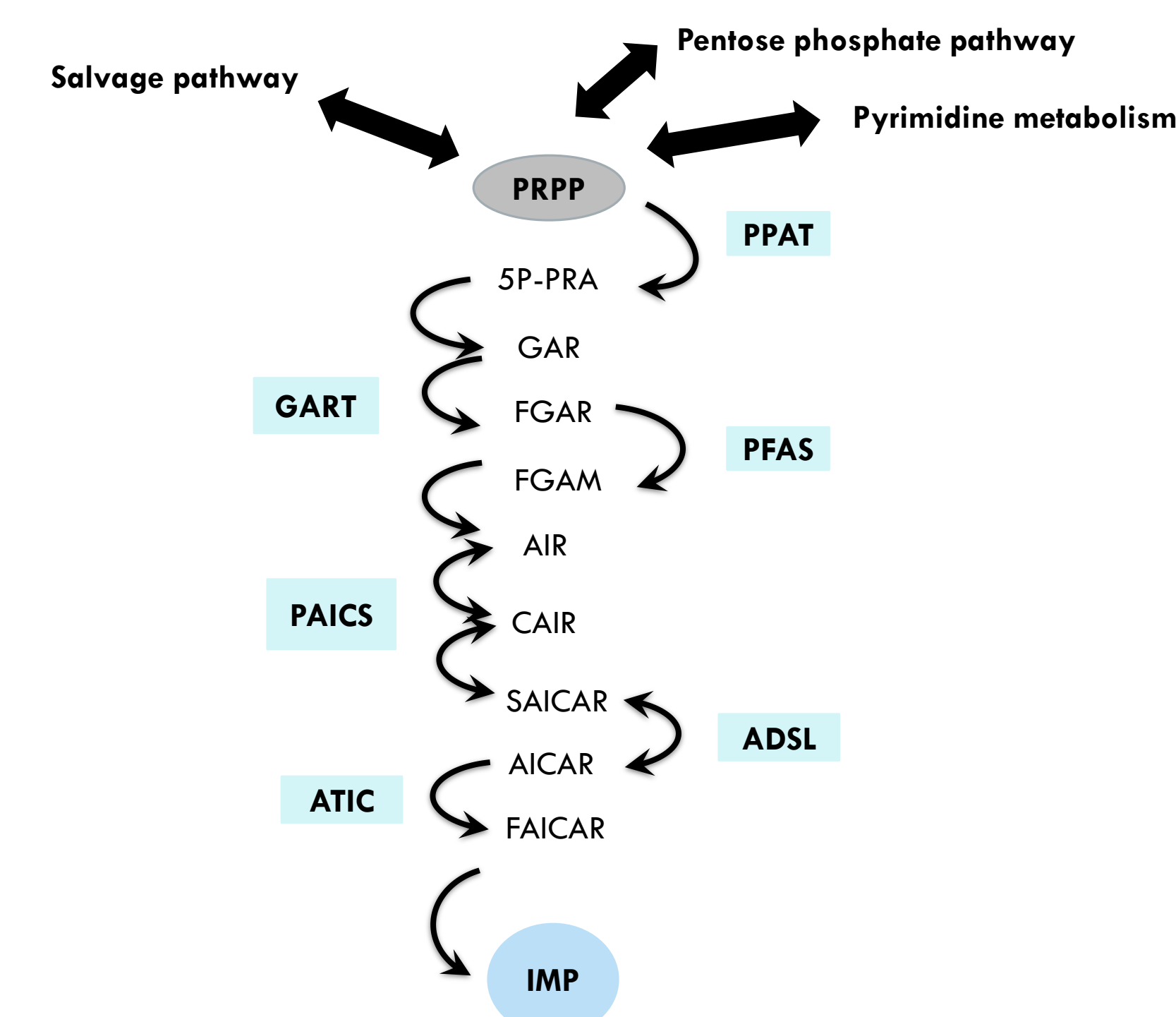
<sup>2</sup> Institut de Recerca Hospital Sant Joan de Déu (IR-HSJD), Esplugues de Llobregat. Barcelona.

<sup>3</sup> Oncology Program, CIBER ehb, National Biomedical Research Institute on Liver and Gastrointestinal Diseases, Instituto de Salud Carlos III. Barcelona.



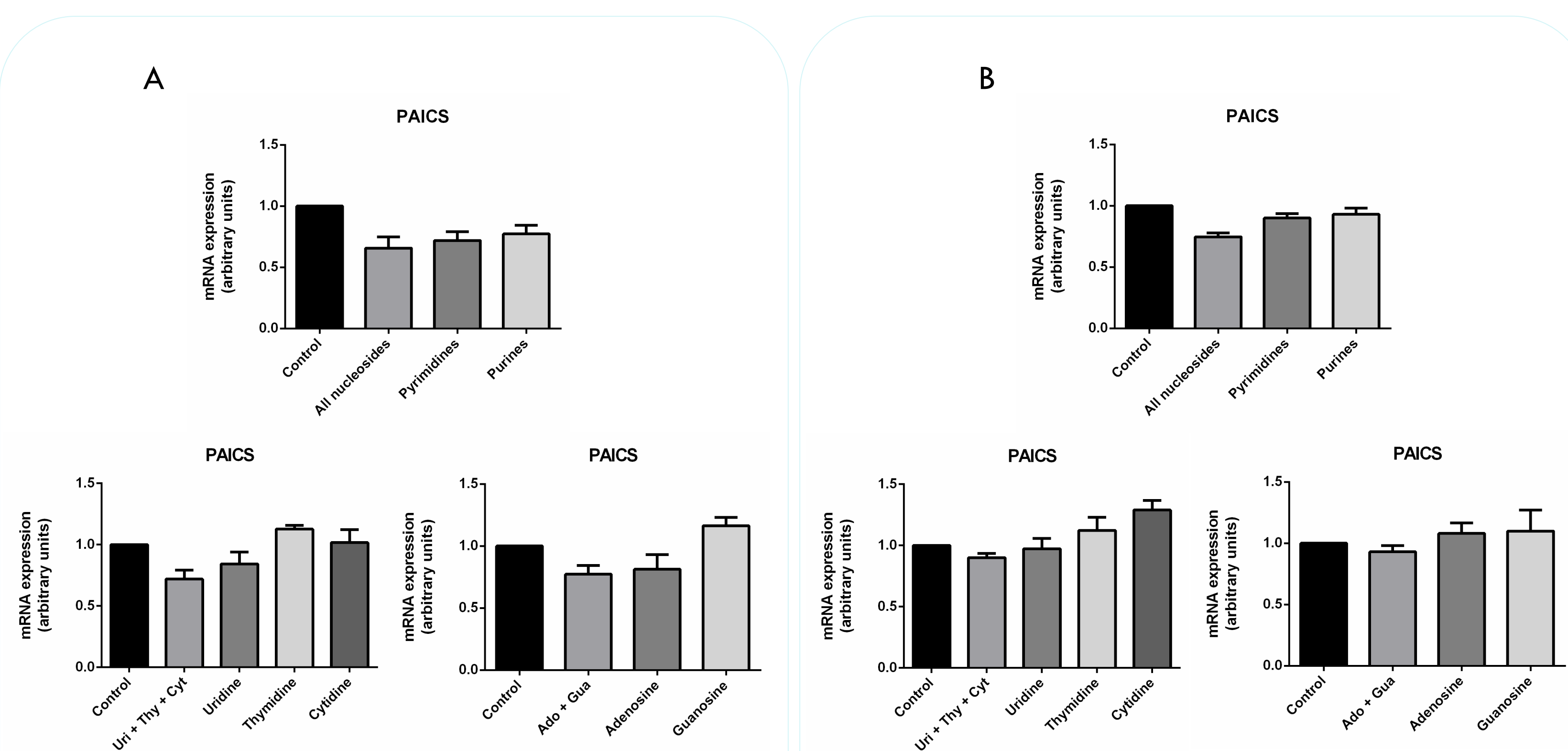
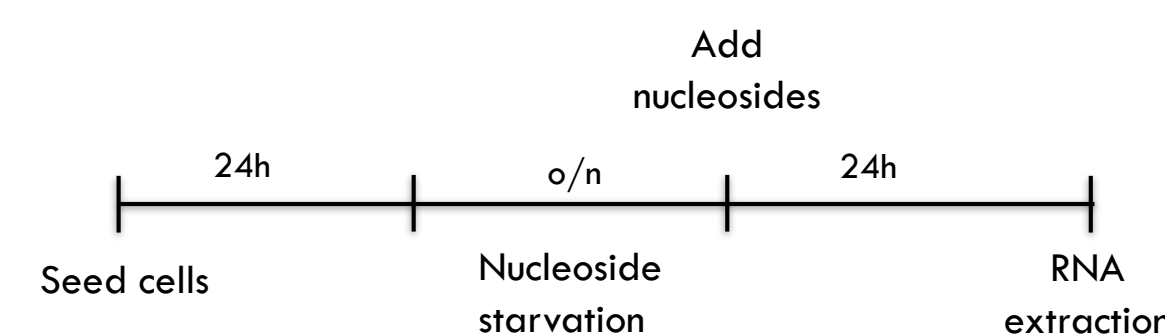
## Introduction

Nucleosides and nucleotides have a key role in cell physiology, being implicated in crucial processes such as DNA and RNA synthesis, cell signaling and metabolic regulation. Purine and pyrimidine nucleotide balance is required for cell homeostasis. Nucleotide imbalance and depletion is associated with metabolic dysregulation and cancer development. Understanding the molecular mechanisms behind these events appears to be a suitable approach to uncover novel drug anticancer targets and, eventually, improve therapy. *De novo* nucleotide biosynthesis is a highly energetically expensive process tightly regulated at different levels. PAICS (phosphoribosylaminoimidazole carboxylase / phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase) gene encodes the bifunctional enzyme ADE2, which catalyzes steps 6 and 7 of *de novo* purine nucleotide biosynthesis. This enzyme has been reported to have an important role in carcinogenesis. Here we analyze how PAICS and Nucleoside Transporters (NT's) are regulated when nucleoside availability disturbances are induced. Furthermore, we investigated PAICS expression in a challenging situation when inhibition of *de novo* pyrimidine nucleotide biosynthesis and salvage pathways were combined.



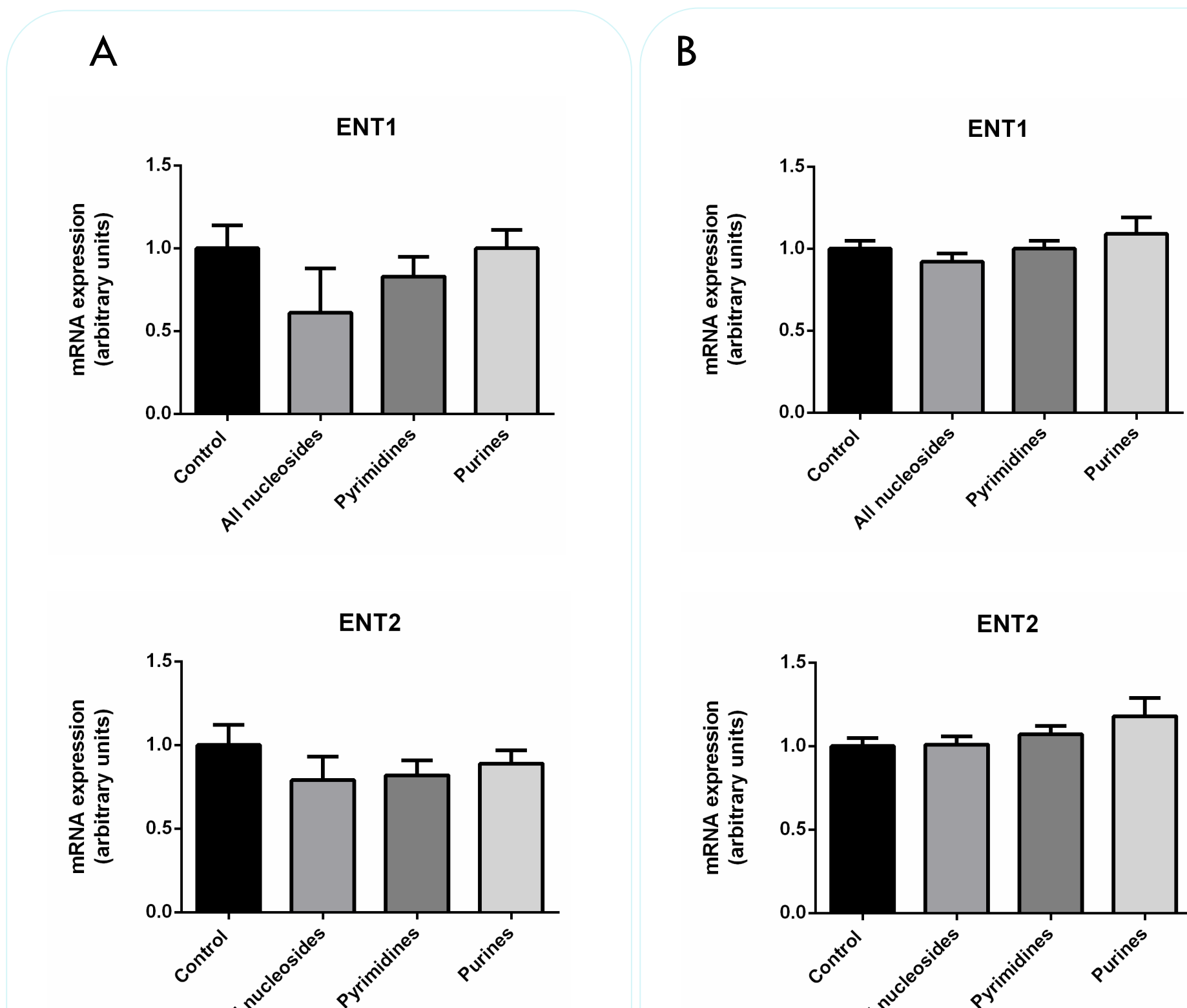
## Results

### 1. Nucleoside availability does not affect PAICS mRNA expression



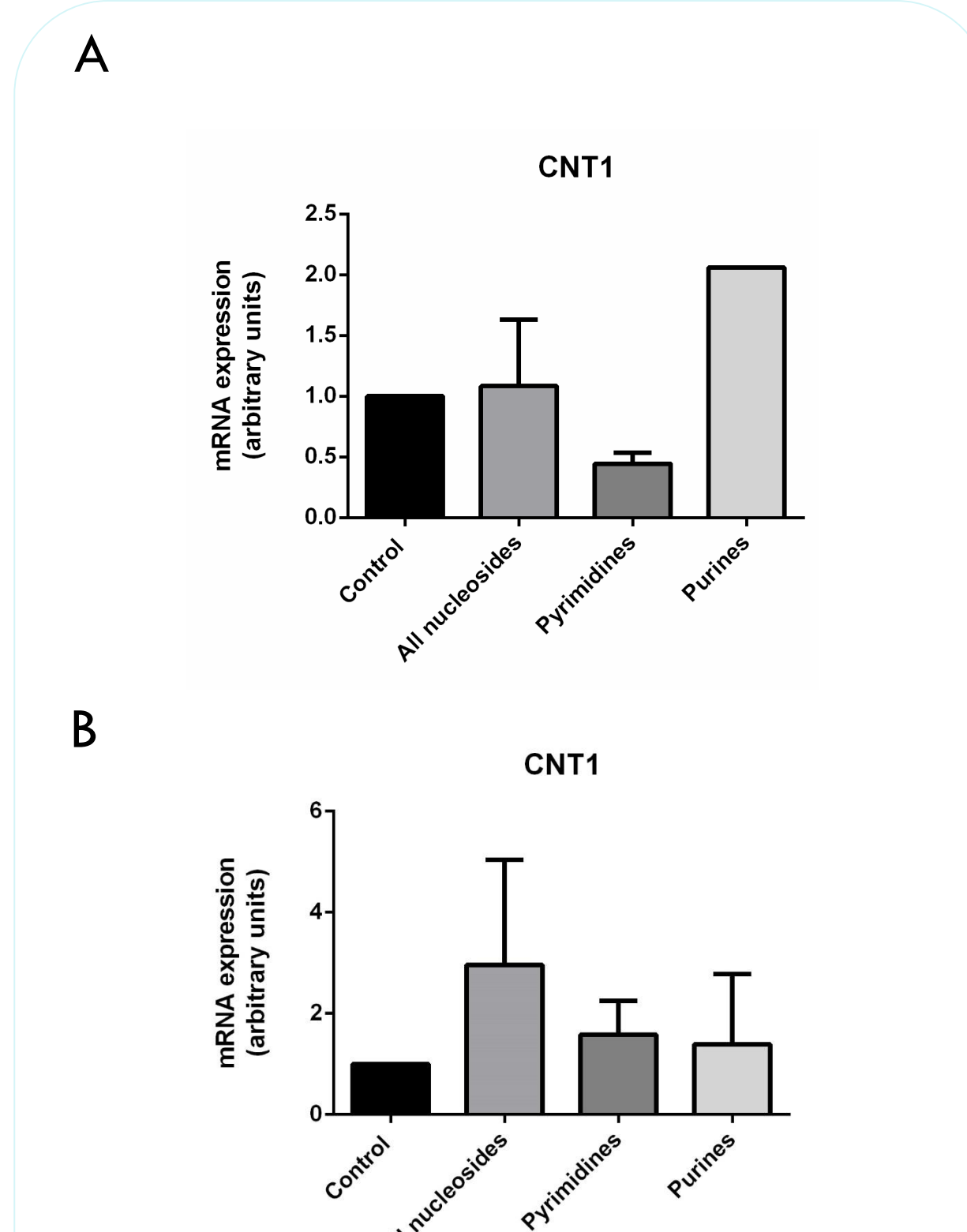
**Figure 1.** PAICS expression was analyzed by qPCR. Following overnight nucleoside starvation, cells were treated with 200 $\mu$ M of each nucleoside. **A;** Normal media treatment. **B;** Nucleoside depleted media treatment. Bars denote the mean  $\pm$  S.E.M. of three independent experiments.

### 2. Expression of equilibrative nucleoside transporters are not affected by nucleoside availability



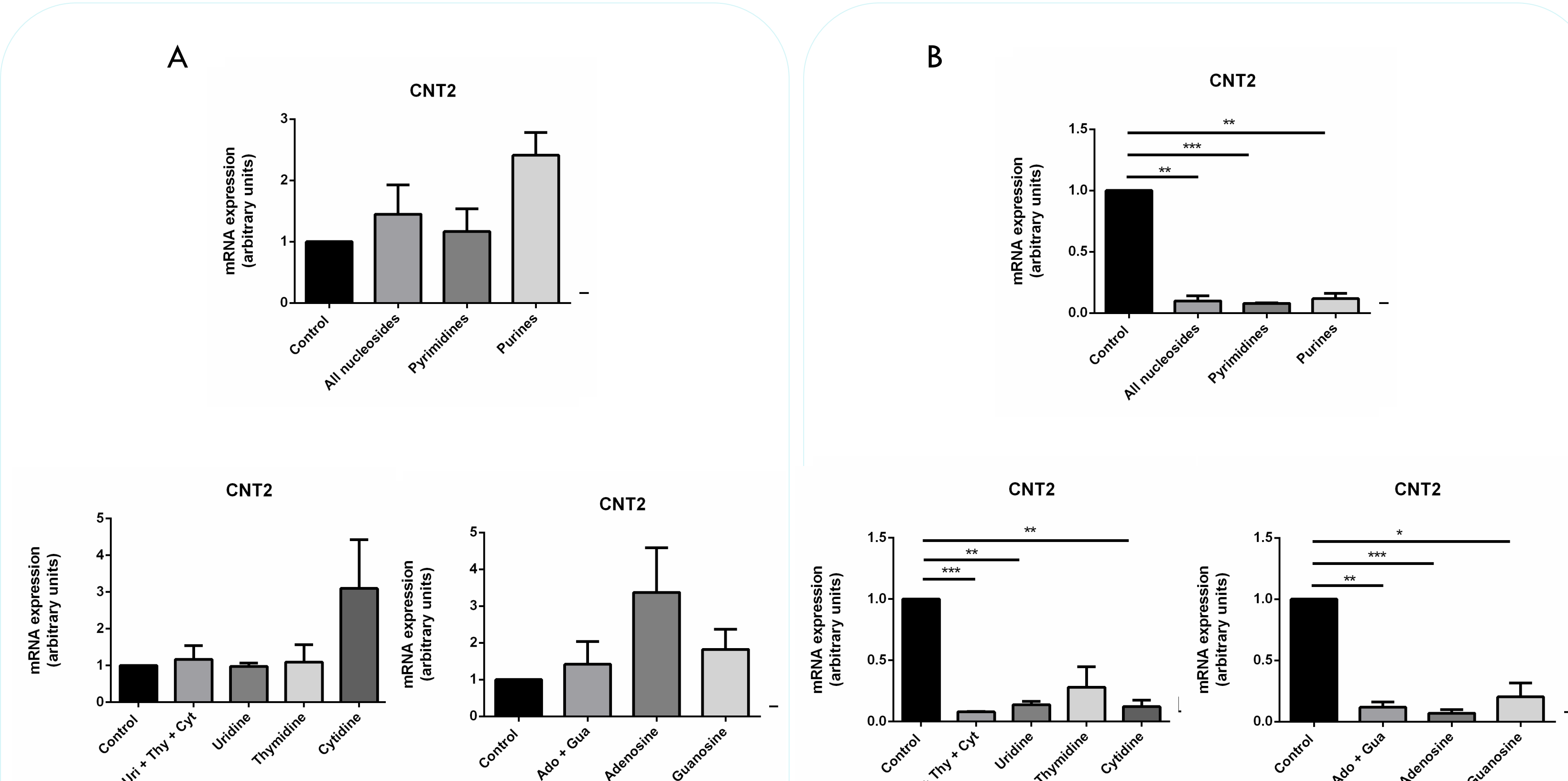
**Figure 2.** The gene expression of ENTs was analyzed by qPCR. Following overnight nucleoside starvation, cells were treated with 200 $\mu$ M of each nucleoside. **A;** Normal media treatment. **B;** Nucleoside depleted media treatment. Bars denote the mean  $\pm$  S.E.M. of three independent experiments.

### 3. CNT1 is apparently regulated by nucleoside concentrations



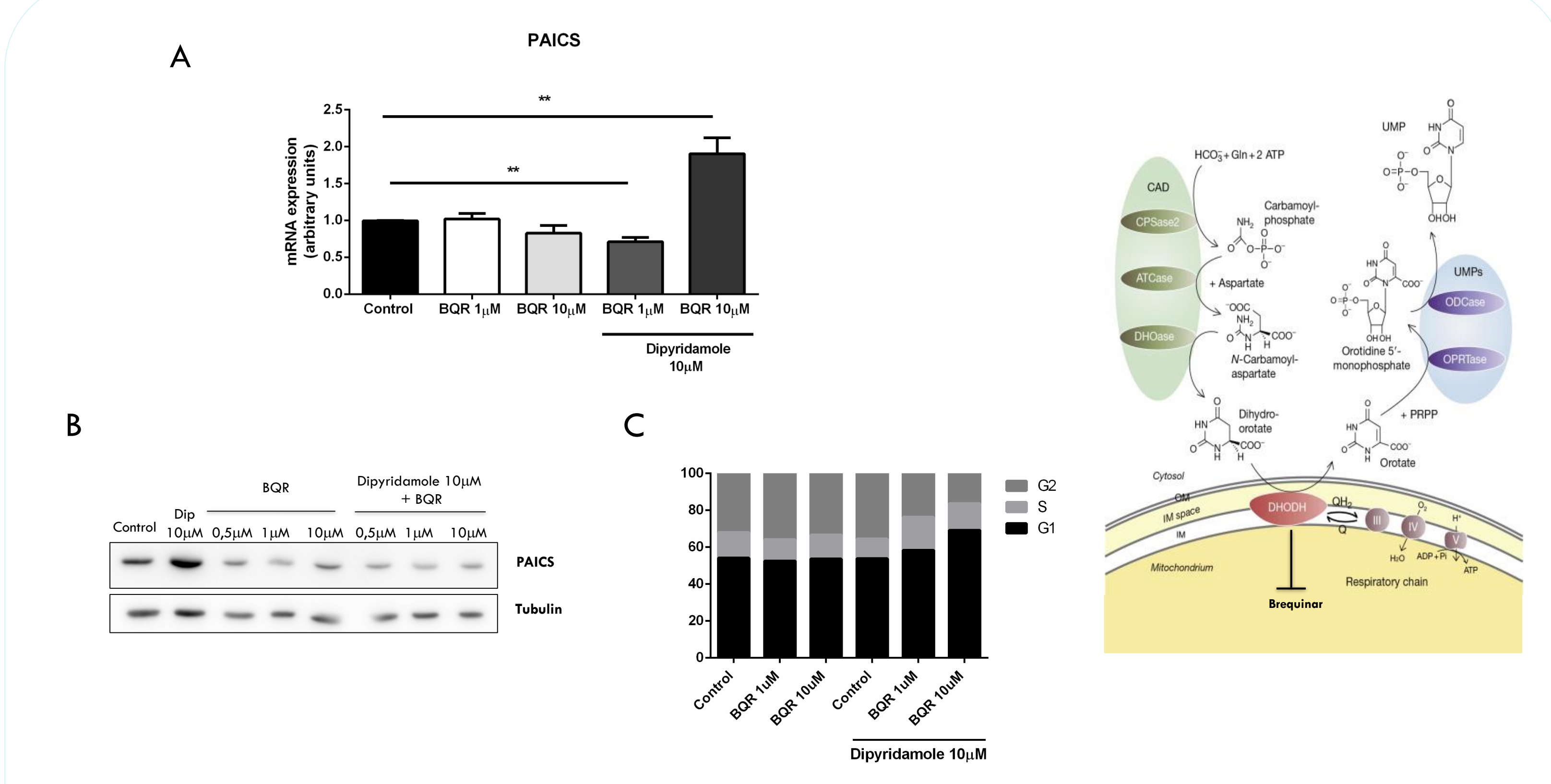
**Figure 3.** Following overnight nucleoside starvation, cells were treated with 200 $\mu$ M of each nucleoside. **A;** Normal media treatment. **B;** Nucleoside depleted media treatment. Bars denote the mean  $\pm$  S.E.M. of three independent experiments.

### 4. Nucleoside availability is essential for CNT2 regulation



**Figure 4.** CNT2 expression was analyzed by qPCR. Following overnight nucleoside starvation, cells were treated with 200 $\mu$ M of each nucleoside. **A;** Normal media treatment. **B;** Nucleoside depleted media treatment. Bars denote the mean  $\pm$  S.E.M. of three independent experiments.

### 5. Inhibition of *de novo* pyrimidine nucleotide biosynthesis and salvage pathways regulate PAICS expression.



**Figure 5.** Effect of Brequinar treatment in PAICS expression. **A;** Cells were treated by 6h with different concentration of Brequinar and Dipyridamole. Bars denote the mean  $\pm$  S.E.M. of three independent experiments. **B;** Western blot assays was performed with 10 $\mu$ g of total proteins. **C;** Cells cycle analysis G1 (black), S (grey) and G2 (dark grey) phases were quantified by flow cytometric analysis of propidium iodide-stained cells 48h after treatment (n=2).

## Conclusion

- PAICS expression is regulated by pyrimidines and salvage pathways inhibitors.
- CNT2 mRNA expression is upregulated by nucleoside starvation.





## FLT3 is implicated in cytarabine transport by human equilibrative nucleoside transporter 1 in pediatric acute leukemia

Albert Català<sup>1,2,6</sup>, Marçal Pastor-Anglada<sup>3,4,6</sup>, Liska Caviedes-Cárdenas<sup>3</sup>, Roberta Malatesta<sup>5</sup>, Susana Rives<sup>1,2,6</sup>, Nerea Vega-García<sup>5</sup>, Mireia Camós<sup>2,5,6\*</sup>, Paula Fernández-Calotti<sup>3,4,6\*</sup>

<sup>1</sup>Pediatric Hematology and Oncology Department, Hospital Sant Joan de Déu, University of Barcelona, Esplugues de Llobregat, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>National Biomedical Research Institute on Rare Diseases (CIBER ER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

<sup>3</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, Institute of Biomedicine (IBUB), Barcelona, Spain

<sup>4</sup>Oncology Program, National Biomedical Research Institute of Liver and Gastrointestinal Diseases (CIBER EHD), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

<sup>5</sup>Hematology Laboratory, Hospital Sant Joan de Déu, University of Barcelona, Esplugues de Llobregat, Barcelona, Spain

<sup>6</sup>Institut de Recerca Pediàtrica Hospital Sant Joan de Déu (IRP-HSJD), Esplugues de Llobregat, Barcelona, Spain

\* Co-senior authors

**Correspondence to:** Albert Català, email: acatala@hsjdbcn.org  
Marçal Pastor-Anglada, email: mpastor@ub.edu

**Keywords:** *FLT3, Cytarabine, hENT1, nucleoside transporters, pediatric acute leukemia*

**Received:** November 04, 2015

**Accepted:** June 26, 2016

**Published:** July 06, 2016

### ABSTRACT

**FLT3 abnormalities are negative prognostic markers in acute leukemia. Infant leukemias are a subgroup with frequent *MLL (KMT2A)* rearrangements, *FLT3* overexpression and high sensitivity to cytarabine, but dismal prognosis. Cytarabine is transported into cells by Human Equilibrative Nucleoside Transporter-1 (*hENT1*, *SLC29A1*), but the mechanisms that regulate *hENT1* in acute leukemia have been scarcely studied.**

**We explored the expression and functional link between *FLT3* and main cytarabine transporters in 50 pediatric patients diagnosed with acute lymphoblastic leukemia and *MLL* rearrangement (*ALL-MLL+*) and other subtypes of leukemia, and in leukemia cell lines.**

**A significant positive correlation was found between *FLT3* and *hENT1* expression in patients. Cytarabine uptake into cells was mediated mainly by *hENT1*, *hENT2* and *hCNT1*. *hENT1*-mediated uptake of cytarabine was transiently abolished by the *FLT3* inhibitor *PKC412*, and this effect was associated with decreased *hENT1* mRNA and protein levels. Noticeably, the cytotoxicity of cytarabine was lower when cells were first exposed to *FLT3* inhibitors (*PKC412* or *AC220*), probably due to decreased *hENT1* activity, but we observed a higher cytotoxic effect if *FLT3* inhibitors were administered after cytarabine.**

***FLT3* regulates *hENT1* activity and thereby affects cytarabine cytotoxicity. The sequence of administration of cytarabine and *FLT3* inhibitors is important to maintain their efficacy.**

### INTRODUCTION

Acute leukemia is the most frequent cancer in children. Although a remarkable improvement in survival of children with acute leukemia has been achieved, some

patients still have a poor outcome. For these high-risk patients it is still necessary to find new biomarkers that may guide therapy or serve themselves as a target for new therapies. Among high-risk cases, infant leukemias (those diagnosed at age < 1 year) are a special subgroup



with distinctive clinical and biological features, including frequent *MLL* (*Mixed Lineage Leukemia*, also known as *KMT2A*) rearrangements, high *FLT3* (*FMS-like tyrosine kinase 3*) expression and high sensitivity to the nucleoside analogue cytarabine (Ara-C), but a dismal prognosis [1–6].

*FLT3* is a tyrosine-kinase receptor with a key role in hematopoiesis. *FLT3* mutations and overexpression have emerged as negative prognostic biomarkers in acute lymphoblastic leukemia (ALL) and acute myeloblastic leukemia (AML) [3, 7–10]. *FLT3* is expressed in the majority of ALL and AML cases, but the highest levels have been observed in ALL with *MLL* gene rearrangements (ALL-*MLL*+) and hyperdiploid ALL (51–67 chromosomes, HeH) [6, 10]. *FLT3* overexpression correlates with unfavorable prognosis in adult AML cases as well as in infant leukemias [8]. The overexpression of *FLT3*, even in the absence of activating mutations, causes phosphorylation of the receptor, resulting in a constitutively active form of *FLT3* in a ligand-independent manner [3, 5, 8, 9, 11]. Internal tandem duplication of the *FLT3* gene (*FLT3*-ITD) constitutively activates the receptor and confers a negative prognostic impact in both adult and pediatric AML cases, especially when a high mutant to wild-type allelic ratio is observed [3, 8, 12, 13].

Ara-C is a nucleoside analog that requires membrane transport proteins of the human nucleoside transporters (hNT) gene families *SLC28* and *SLC29* to be internalized into target cells. *SLC28* encode human Concentrative Nucleoside Transporters (hCNT) whereas *SLC29* encode human Equilibrative Nucleoside Transporter (hENT) proteins. Despite important advances in the knowledge of the tissue distribution and pharmacology of hNT proteins, there is still a limited understanding of the mechanisms that regulate their expression and activity [14]. Ara-C is known to be transported across the cell membrane mainly by Human Equilibrative Nucleoside Transporter 1 (hENT1, *SLC29A1*) [14, 15]. Once inside the cell, Ara-C undergoes metabolic activation, and the first and rate-limiting step in this process is its phosphorylation by deoxycytidine kinase (*DCK*), necessary to finally exert its cytotoxic action [16].

Uptake into cells is a key step in the bioavailability and pharmacological action of nucleoside analogues [16] and, accordingly, several studies have established a correlation between high *hENT1* expression levels, drug sensitivity and outcome [14]. In this regard, elevated *hENT1* expression has been reported to facilitate the high Ara-C sensitivity of infant ALL-*MLL*+, and a strong correlation between *hENT1* levels and Ara-C sensitivity has been reported in those cases, as well as in adult AML patients [17–19]. On the contrary, low *hENT1* expression levels have been related to Ara-C resistance in childhood AML. Overall, these data are in line with the evidence that *in vitro* Ara-C sensitivity in childhood and adult AML is dependent upon *hENT1* [19].

In this setting, given that ALL-*MLL*+ cases present both high levels of *FLT3* and high sensitivity to Ara-C, we

hypothesized that *FLT3* is a suitable candidate to modulate hNT expression and activity, thereby contributing to cell chemosensitivity. To address this issue, we analyzed the relationship between *FLT3* expression levels and mutations and the expression and activity of different hNT and Ara-C metabolizing enzymes in different cell lines and in a series of ALL and AML pediatric patients.

## RESULTS

### ***FLT3* is highly expressed in pediatric ALL-*MLL*+ patients**

*FLT3* mRNA expression was quantified by RQ-PCR in 50 patients and 3 cell lines (MV4-11, SEM, K562) and normalized against mRNA from commercial bone marrow CD34+ cells. The expression of *FLT3* was heterogeneous, with a median (arbitrary units) of 4.35 (0.09–4470). Among the different cytogenetic subgroups, the highest *FLT3* levels were observed in ALL-*MLL*+ patients; none of them had *FLT3*-ITD (data not shown). We found no significant differences between *FLT3* levels and gender, CNS status or white blood cell count.

### **Positive correlation between hENT1 and *FLT3* mRNA expression in pediatric leukemia samples**

The mRNA amounts of the main nucleoside transporters (NT) and intracellular metabolizing enzymes (ME), *hENT1*, *hENT2* (*SLC29A2*), *hCNT1* (*SLC28A1*), *hCNT2* (*SLC28A2*), *hCNT3* (*SLC28A3*), *DCK* and *cN-II* (*NT5C2*), were measured in 50 pediatric leukemia cases by RQ-PCR. When correlating *FLT3* mRNA levels with all these genes, noticeably, despite the high interpatient variability, a positive correlation was found between *FLT3* and *hENT1* mRNA levels (Figure 1). Based upon these observations we could hypothesize that samples with high *FLT3* mRNA levels would show high Ara-C uptake and probably, a better response to therapy. On the other hand, no significant differences were found between *hENT1*, *hENT2*, *hCNT1*, *hCNT2*, and *hCNT3*, *DCK* and *cN-II* mRNA expression levels and age, gender, CNS status and WBC count. Nevertheless, a positive correlation between *FLT3* and *DCK* was also observed (Supplementary Figure S1).

Although our study was not designed to analyze NT or ME expression patterns in acute leukemia molecular subgroups, we also found significantly higher *hENT1* levels in AML-*MLL*+ and lower *DCK* and *cN-II* levels in AML cases and T-ALL samples.

### **Characterization of the mRNA expression and associated biological function of nucleoside transporters in leukemic cell lines**

As nucleoside transporter expression in pediatric leukemic cells is not well known we analyzed the mRNA

expression levels of the most relevant NT that could potentially be implicated in Ara-C uptake, *hENT1*, *hENT2*, *hCNT1* and *hCNT3*, in MV4-11, SEM and K562 leukemic cell lines. The former two cell lines originated from childhood leukemia. We observed that *hENT1*, *hENT2* and *hCNT1* expression is retained in the three cell lines, whereas barely detectable *hCNT3* mRNA was found in SEM and K562 cell lines (Supplementary Table S1).

Knowing that all cell lines expressed almost all NT mRNAs, we then aimed at determining the transportability profiles for each cell line. For this purpose, we performed radiolabeled cytidine uptake measurements. We chose cytidine because it is a pyrimidine that it is known to be a good substrate for hENTs, hCNT1 and hCNT3, all the putative Ara-C transporters. All cell lines showed hENT1-related function (Figure 2A) which was found to be the predominant nucleoside transporter activity in the three cell lines. We also detected, albeit to a lesser extent, hENT2 and hCNT1-related activities in all of them. MV4-11 also retained some hCNT3-related function, being this activity undetectable in K562 and SEM cells.

### Nucleoside transporters implicated in Ara-C uptake

Direct transport of Ara-C by each of the previously identified NTs was determined. Given that the only cell line that retained all the NT-related activities was MV4-11, we decided to focus on this cell line to study Ara-C transport. We observed that Ara-C was translocated inside cells by hENT1, hENT2 and hCNT1 (Figure 2B).

### FLT3 effect on hENT1 expression and activity

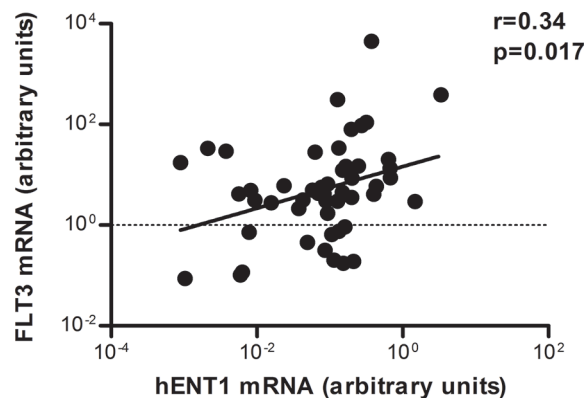
As we previously detected a positive correlation between *FLT3* and *hENT1* expression in the cohort of primary samples from pediatric patients we decided to evaluate the role FLT3 plays in modulating hENT1 expression. For this purpose we initially analyzed the effects of the FLT3 inhibitor, PKC412, on MV4-11

and SEM cell lines. All NTs and ME mRNA levels were determined in MV4-11 and SEM cells either in the presence or in the absence of PKC412 used at a concentration based upon previous literature [20]. Acute treatment with PKC412 resulted in a significant down-regulation of *hENT1*-related mRNA levels at the first studied time-point (8 h) without any further change at 24 h after treatment (Figure 3A). No changes in *hENT2*-related mRNA levels were found under the same conditions (Figure 3B). The down-regulation of the hENT1-related mRNA levels resulted in decreased hENT1 protein amounts (Figure 3C). Overall these data suggest that down-regulation of hENT1 is somehow specific and occurs immediately after PKC412 treatment no matter whether activated FLT3 is the result of its overexpression (SEM cells) or the consequence of mutations resulting in the constitutive activation of this kinase (MV4-11). Under the experimental conditions described above, it was also demonstrated that PKC412 inhibited FLT3 phosphorylation, without affecting total FLT3 expression (Figure 3D) proving that the inhibitor was acting as expected. To further assess the involvement of FLT3 in hENT1 regulation, another FLT3 inhibitor likely to be more specific than PKC412, AC220, was also used. AC220 could also inhibit FLT3 phosphorylation, thereby inducing a significant down-regulation of hENT1 protein expression (Supplementary Figure S2).

The functional impact of hENT1 down-regulation following FLT3 inhibition was demonstrated by monitoring hENT1-mediated cytidine uptake in MV4-11 cells. hENT1 function was significantly decreased reaching its maximum inhibition at 16 h incubation with PKC412 inhibitor (Supplementary Figure S3).

### Effect of FLT3 inhibition on Ara-C uptake and cytotoxicity

Considering that FLT3 inhibition induced the down-regulation of *hENT1* mRNA expression and related activity, without significantly affecting other NTs, we



**Figure 1: Correlation between *hENT1* and *FLT3* mRNA expression in pediatric leukemia samples.** Relative *hENT1* mRNA levels of cells from 50 pediatric patients with acute leukemia were plotted against the levels of *FLT3* mRNA in the same samples. Correlation coefficient is shown in the figure.

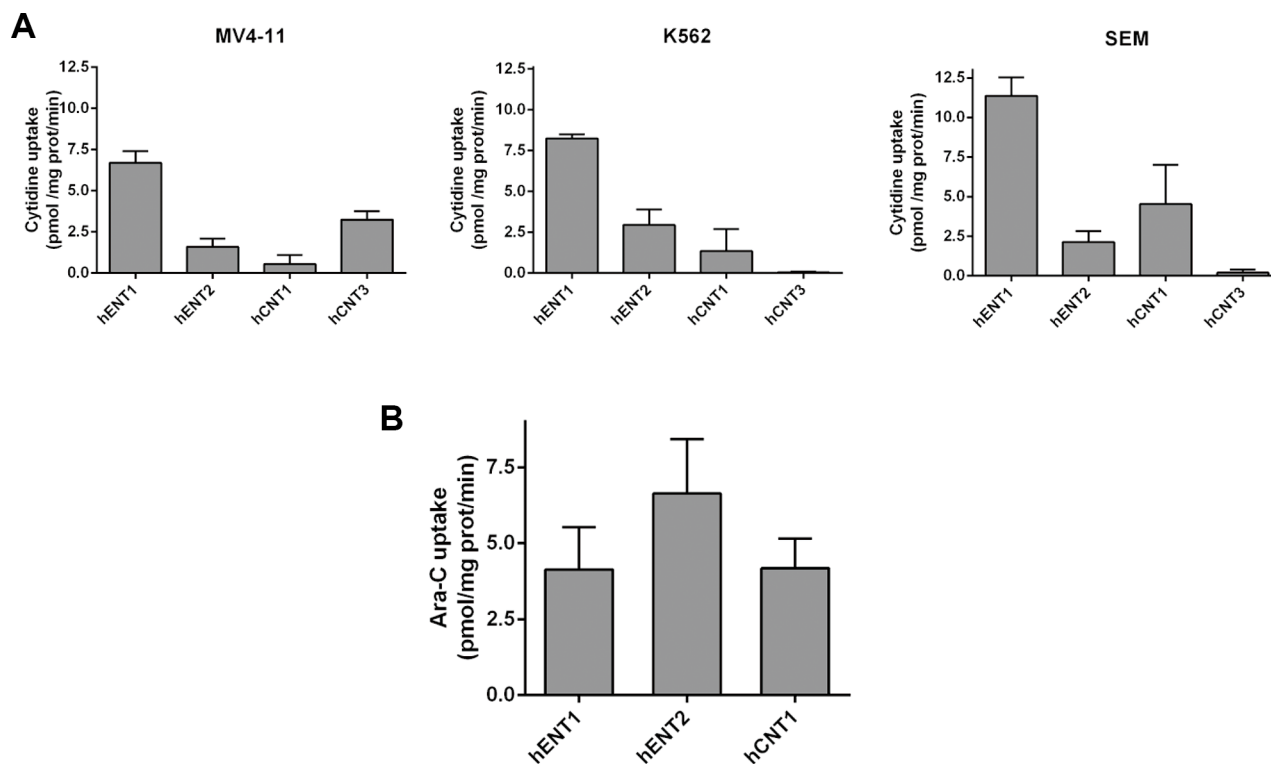
then aimed at determining the effect of FLT3 inhibition on Ara-C transport. For this purpose, we cultured MV4-11 cells with PKC412 for 16 h and evaluated direct Ara-C uptake mediated by the previously demonstrated entities that were responsible for the transport of the drug, hENT1, hENT2 and hCNT1. Under conditions of maximal FLT3 inhibition, hENT1-mediated Ara-C uptake was dramatically decreased (Figure 4), without significantly affecting hENT2 and hCNT1 related activities. However, the residual hENT1 activity was still significant, representing nearly a 25% of that of untreated cells. In any case, no compensatory up-regulation associated with the other Ara-C transporters was observed.

To address the question of whether Ara-C cytotoxicity could be affected by hENT1 down-regulation under FLT3 inhibition conditions, cytotoxicity assays were performed. Ara-C was used at  $IC_{50}$  concentrations in SEM and MV4-11 cells (not shown). Under conditions of hENT1 activity inhibition (using 1  $\mu$ M NBTI) Ara-C induced cytotoxicity was significantly blocked, whereas addition of phloridzin (an hCNT inhibitor) did not significantly alter Ara-C action (Figure 5A). Thus, in basal conditions (no PKC412 present), Ara-C induced cytotoxicity was mostly related to hENT1 function. When MV4-11 cells were treated with the FLT3 inhibitor PKC412 for 16 h, followed by a 6 h exposure to Ara-C, impact on cell survival was not significantly greater than when treating the cells with PKC412 alone (Figure 5B);

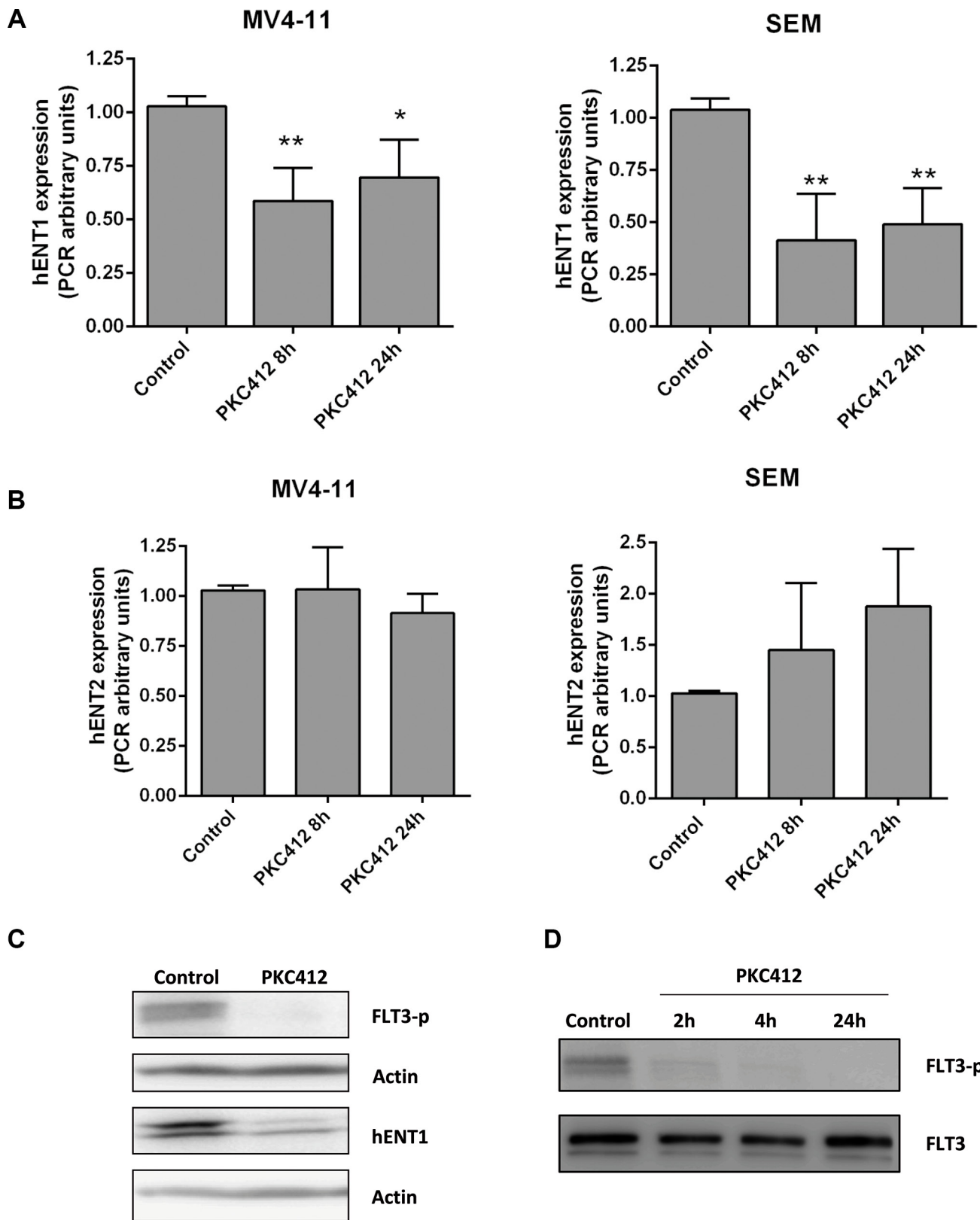
however, if the exposure to the drugs was the opposite (6 h Ara-C treatment, followed by a 16 h exposure to PKC412), this combined treatment resulted in a significantly greater cell death than when treating the cells with PKC412 alone (Figure 5C). Thus, a lower cytotoxicity was observed if PKC412 was given previous to Ara-C exposure, probably due to a reduction in hENT1 activity. In contrast, once Ara-C had been administered, the subsequent addition of PKC412 resulted in greater cytotoxicity. In the former experimental design, the calculation of the coefficient of drug interaction (CDI) revealed the occurrence of drug antagonism (CDI: 1.20), whereas in the latter design, the effect of both drugs turned out to be additive (CDI: 1.05). Interestingly, when these experiments were performed using the FLT3 inhibitor AC220, similar results were obtained (Supplementary Figure S4), thereby reinforcing the key role of FLT3 in hENT1 modulation and cytarabine-associated cytotoxicity.

## DISCUSSION

*FLT3* mutations have emerged in the last years as key prognostic biomarkers in AML. *FLT3*-ITD mutation is a recognized adverse prognostic factor for outcome in adult and pediatric AML patients [2, 3, 5, 7, 8, 21–23]. Accordingly, patients harboring *FLT3*-ITD mutations are considered as high-risk patients, and benefit from hematopoietic stem cell transplant (HSCT)



**Figure 2: Characterization of nucleoside transporter activity implicated in Ara-C uptake.** (A)  $[^3H]$ -cytidine uptake (1  $\mu$ M, 1 min) by MV4-11, K562 and SEM cells and (B)  $[^3H]$ -Ara-C transport (1  $\mu$ M, 1min) in MV4-11 cell line were assayed. Cross-inhibitions were performed by adding to the transport medium cold guanosine (100  $\mu$ M) and inhibition of hENT1 was achieved adding NBTI (1  $\mu$ M) to the transport medium. Data are expressed as means  $\pm$  SEM of triplicate measurements from three independent cultures.



**Figure 3: Involvement of FLT3 in *hENT1* expression.** mRNA expression of (A) *hENT1* and (B) *hENT2* were assayed by quantitative RQ-PCR in MV4-11 and SEM cells treated for 8 or 24 h with FLT3 inhibitor PKC412 (0.045  $\mu$ M). Results are based on duplicate measurements from three independent experiments. Western blot for *hENT1* (C), FLT3 and phospho-FLT3 (Tyr591) (D) were performed in cell extracts from MV4-11 cells incubated in the presence of PKC412 (0.045  $\mu$ M) for different periods of time. A representative Western blot of three independent experiments is shown in each panel. Statistical significance denotes significant difference relative to control cells (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).



in first complete remission (CR1) [2, 21, 24]. *FLT3* overexpression is associated with *FLT3* phosphorylation, thereby resulting in constitutive activation of the receptor, similarly to *FLT3* mutants [3, 5, 8, 12]. Some authors have correlated *FLT3* overexpression, in absence of *FLT3* mutation, with poor outcome in both ALL and AML [4, 5, 8]. Beyond these clinical observations, little is known about the exact biological mechanism that confers high risk in such patients. Armstrong and co-authors [25] revealed that *FLT3* gene overexpression is the most distinctive feature of *MLL* rearranged acute leukemia. Moreover, a significantly higher *FLT3* expression level was observed in infant ALL-*MLL*<sup>+</sup> patients. Interestingly, infant patients are highly sensitive to Ara-C, but show *in vitro* resistance to prednisone and asparaginase [1]. All these data have been taken into account to design the chemotherapeutic schemes in the International Cooperative Treatment Protocol for Infants with ALL, INTERFANT (99 & 06) [26].

Ara-C is mainly, but not exclusively, transported by hENT1, being this plasma membrane transporter a major contributor to Ara-C bioavailability and, likely, action. In fact, high *hENT1*-related mRNA levels have been reported in ALL-*MLL*<sup>+</sup> patients, and this evidence may explain, at least partially, their Ara-C sensitivity [17]. The same group demonstrated that *MLL* rearrangements were not directly involved in Ara-C sensitivity in infant ALL and childhood AML-*MLL*<sup>+</sup> [30], pointing out that other mechanisms are involved in Ara-C sensitivity in these patients.

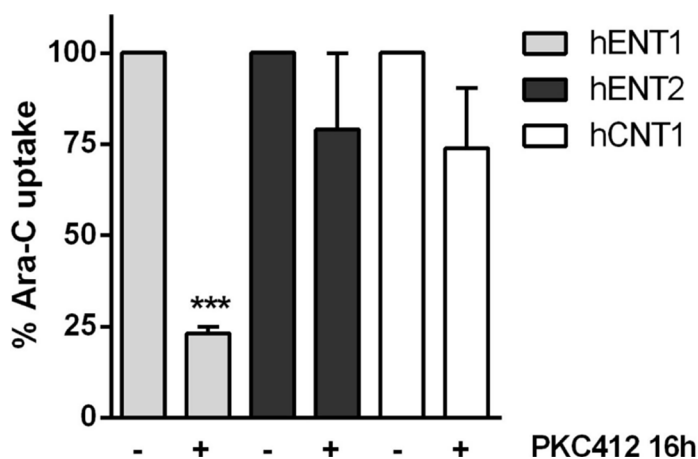
In our study, the analysis of a cohort of 50 pediatric leukemia patients revealed a positive correlation between the expression (mRNA levels) of *FLT3* and *hENT1*. These results would be consistent with previous observations showing that subgroups of patients with high sensitivity to cytarabine frequently overexpress *FLT3* [3, 10, 27]. Our results showing high *hENT1* and *FLT3* expression and

a positive correlation between both parameters suggest that *FLT3* might play a relevant role on Ara-C sensitivity, likely to involve hENT1 up-regulation.

We could not find any significant association between *FLT3* expression levels and other clinical or biological features, although this analysis was far out of the scope of our study. Moreover, a bias related to the selection of determined molecular subtypes in our cohort of patients was also introduced during the design of our study.

mRNA levels of other putative Ara-C transporters (*hENT2*, *hCNT1*, *hCNT3*) and those of the intracellular metabolizing enzymes *DCK* and *cN-II* were also determined in the same cohort of patients, although no correlations among NT and ME and clinical and biological parameters were observed. Previous studies have suggested a correlation between specific NT expression profiles and outcome in solid tumors and hematological malignancies [15, 19, 28, 29], being this issue recently reviewed by ourselves [14]. However, the limited number of patients within the present cohort did not allow us to establish prognostic correlations.

We also found a positive correlation between *FLT3* and *DCK* expression (Supplementary Figure S1), the kinase involved in the first phosphorylation step of nucleoside analogs once they have entered the cells via NTs. Low levels of *DCK* tend to correlate with Ara-C resistance in childhood ALL and AML and adult AML [18, 30, 31]. Our observations suggest that *DCK* would not be a limiting step in Ara-CTP formation in patients with high *FLT3* expression and thus, would support intracellular activation (i.e. phosphorylation) of Ara-C. These results would be in agreement with other studies [19] showing an *in vitro* correlation between hENT1 and *DCK* expression and nucleoside analogs sensitivity in pediatric and adult AML [18]. Recently, a collaborative EORTC-GIMEMA trial has demonstrated a better response rate and survival with high



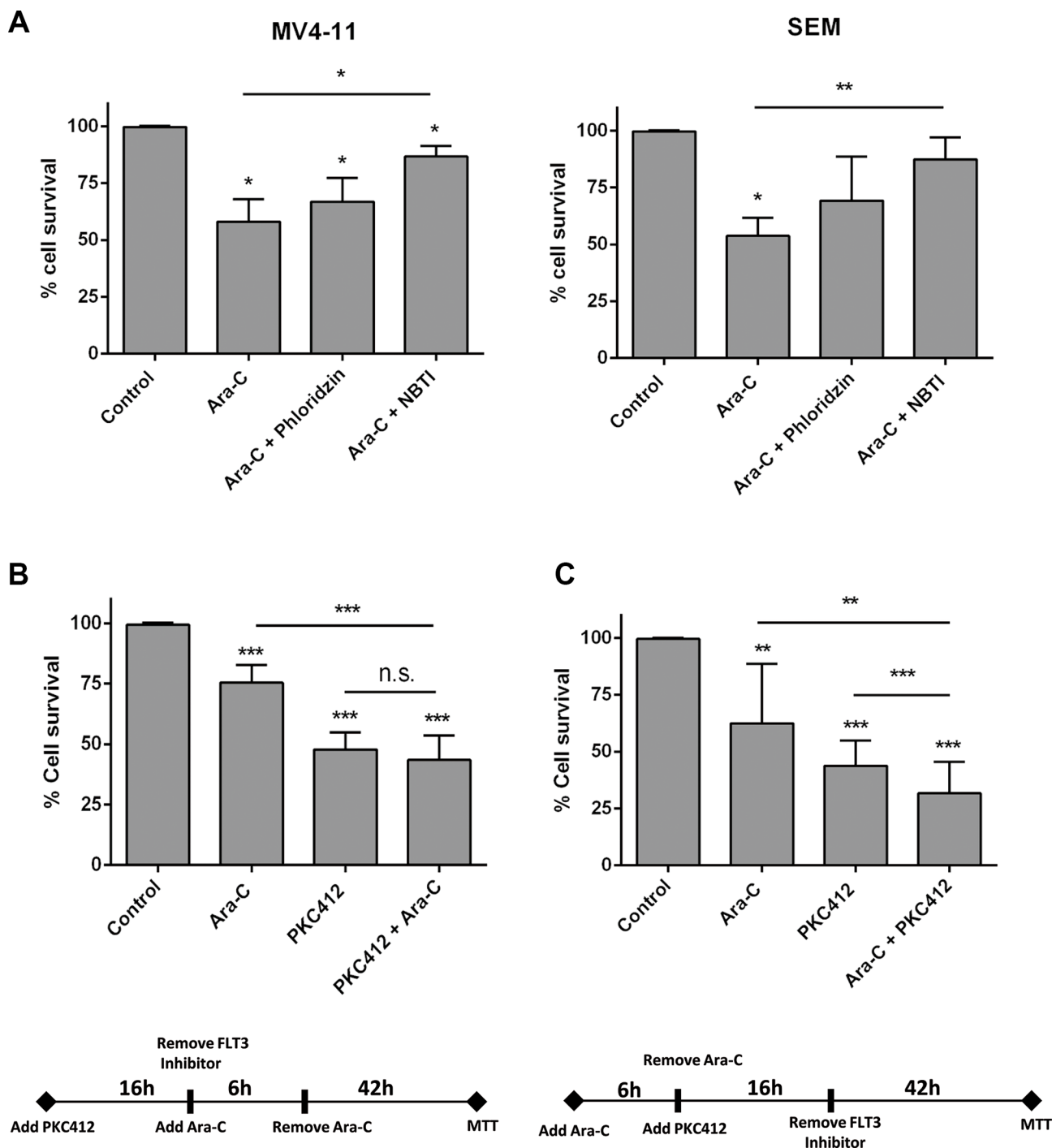
**Figure 4: Effect of *FLT3* inhibition in the uptake of Ara-C.** Direct uptake of [<sup>3</sup>H]Ara-C (1 μM, 1 min) was measured in MV4-11 cells in the presence of PKC412 for 16 h either in medium containing NaCl or choline chloride. Sodium-dependent transport was calculated as uptake in NaCl medium minus uptake in choline chloride medium. Data are normalized to uptake measured in the absence of PKC412 and expressed as percentage ± SEM from 3 independent experiments, each conducted in quadruplicate. Statistical significance denotes significant difference relative to control cells (\*\**p* < 0.001).

dose Ara-C in very high risk setting patients, including AML FLT3-ITD cases [22], that presumably would show high hENT1 expression according to our results.

Nucleoside analogues are the mainstay treatment in AML and are broadly used in relapsed-refractory ALL salvage schedules with diverse success rate [32–36].

As we here demonstrate a significant correlation between FLT3 and Ara-C transporter hENT1, we propose that FLT3 expression could be used as a nucleoside analogue sensitivity surrogate.

Not surprisingly, several FLT3 inhibitors have been developed in the last few years, and some of



**Figure 5: Effect of FLT3 inhibition in the cytotoxicity induced by Ara-C.** Cell viability was determined by MTT assays when (A) MV4-11 and SEM cells were cultured with Ara-C (3  $\mu$ M and 1  $\mu$ M for MV4-11 and SEM cells respectively) either in the presence or not of NBTI (1  $\mu$ M) or phloridzin (250  $\mu$ M) for 48 h; (B) MV4-11 cells were treated with the FLT3 inhibitor PCK412 (16 h), followed by a 6 h exposure to Ara-C (10  $\mu$ M), and (C) MV4-11 cells were cultured with Ara-C (10  $\mu$ M) for 6 h, followed by a 16 h exposure to PKC412. Data are expressed as percentage of survival  $\pm$  SEM of triplicate measurements from six-nine independent experiments. Statistical significance denotes significant difference relative to control cells (\* $p$  < 0.1; \*\* $p$  < 0.01; \*\*\* $p$  < 0.001) or to Ara-C or PKC412 treated cells as indicated.

them are currently used in advanced-phases clinical trials with variable success rate (<https://clinicaltrials.gov/>). FLT3 inhibitors are basically expected to inhibit cellular proliferation through the down-regulation of this kinase, thus resulting in a withdrawal of antiapoptotic signals [37–39]. Some FLT3 inhibitors revealed higher efficacy when combined with chemotherapy [38, 40–42]. However, the best schedule combination with conventional chemotherapy has not been identified yet and research using different approaches to overcome inhibitors resistance is still needed. Given that a significant correlation was found in our study between *FLT3* expression and *hENT1* expression, we also wanted to explore how FLT3 inhibitors could modulate Ara-C uptake and related cytotoxicity. We verified that Ara-C is transported by hENT1 as it was previously reported, and we also found that Ara-C can also be transported into the cells by hENT2 and hCNT1. We next demonstrated that the FLT3 inhibitor PKC412 induced a significant reduction of *hENT1* mRNA expression in both MV4-11 and SEM cell lines, which results in functional down-regulation of hENT1-dependent drug uptake. Similar effects on hENT1 down-regulation were found with AC220, a more selective FLT3 inhibitor. This effect appears to be specific, as PKC412 does not modify other transporter functions (i.e. hENT2 and hCNT1). Taken together, our results suggest that Ara-C transporter hENT1 expression and activity are regulated by FLT3. Interestingly, Jin and colleagues [20], using heterologous transduction of FLT3-ITD in HF6 cells, had suggested that FLT3-ITD down-regulates hENT1 expression in a heterologous system using transduced FLT3-ITD in HF6 cells. Oppositely, our results achieved in endogenously expressing FLT3 cell lines (wild type FLT3 and FLT3-ITD) suggest that FLT3 is indeed up-regulating *hENT1* expression and related activity. Those results are fully consistent with the clinical data, showing a positive correlation between *FLT3* and *hENT1* mRNA expression levels in the cohort of 50 patients here analyzed.

Regarding the effect on cell survival of the combination of a FLT3 inhibitor and a chemotherapeutic drug, two studies [43, 44] have previously demonstrated *in vitro* that combined therapies involving FLT3 inhibitors and chemotherapeutic agents might yield variable efficacy depending upon the sequence of drug treatment. Thus, antagonistic cytotoxic effects were induced when they pretreated FLT3-ITD cell lines and primary patient samples with a FLT3 inhibitor followed by chemotherapy. Similar results were obtained in wild type FLT3 with high *FLT3* mRNA expression levels. This effect appears to be the result of the FLT3 inhibitor inducing cell cycle arrest at the G1-S phase, thereby perturbing the action of genotoxic drugs, such as Ara-C. The possibility of FLT3 modulating hENT1 as a result of cell cycle perturbation should not be ruled out, although it looks unlikely to us. hENT1 has been shown to provide extracellular

nucleosides for DNA synthesis in murine primary bone marrow macrophages [45], but hCNT1 is the transporter known to be cell cycle-dependent, showing up-regulation at the S phase [46]. Moreover, whereas FLT3 inhibition induces down-regulation of hENT1 it does not change at all either *hCNT1* mRNA expression levels or hCNT1-related activity. In summary, we think FLT3-related hENT1 modulation might not be the indirect result of cell cycle arrest induced by FLT3 inhibition. However, our data do further support the relevance of the sequence of drug treatment. In fact, under conditions of hENT1 down-regulation, the cytotoxic effect triggered by either PKC412 or AC220 was not further potentiated by Ara-C treatment, whereas this was not the case when cells were first treated with Ara-C, and basal hENT1 activity had not been yet down-regulated by FLT3 inhibition. Under these conditions the cytotoxic efficacy of the combined therapy was significantly much greater than when treating the cells with the FLT3 inhibitor alone. This finding highlights also the need for a better understanding of the basal regulatory properties of drug transporters, which may be targets of kinase inhibitors used in combined therapies.

In summary, we have demonstrated that Ara-C transport into cells is mediated by hENT1, hENT2 and hCNT1. More importantly, we also demonstrated that FLT3 significantly regulates hENT1 expression and activity and thereby Ara-C sensitivity. We have also proved that the sequence of the administration of FLT3 inhibitors and Ara-C is important, as the cytotoxic efficacy of the latter is greater when FLT3 inhibitors follow Ara-C administration. Overall, our data might contribute to better understand how FLT3 may influence drug sensitivity and to develop new therapeutic approaches in order to improve the overall outcome of patients with high risk subtypes of leukemia.

## MATERIALS AND METHODS

### Ethics statement

Investigation has been conducted in accordance with the ethical standards and according to the Declaration of Helsinki and according to national and international guidelines and has been approved by the authors' institutional review board.

### Patient samples and cell lines

Among 265 pediatric patients aged 0–18 years diagnosed with acute leukemia from 2003 to 2013 in Hospital Sant Joan de Déu, we selected 50 cases (B-cell precursor ALL: 44; T-ALL: 2; AML: 4) with available biological samples for the study. We selected cases with the main genetic abnormalities reported in ALL but, as we wanted to determine the possible influence of FLT3 over nucleoside transport activity, we conducted a bias towards

cases with expected high *FLT3* expression, that is, patients with ALL and hyperdiploidy (51-67 chromosomes, HeH) and *MLL* rearranged cases (ALL-*MLL*<sup>+</sup>). The main clinical and biological characteristics of patients are described in Table 1. Patients were all uniformly treated according to the Spanish Society of Pediatric Hematology and Oncology (SEHOP) consecutive protocols SHOP-LAL-99 & 05 (ALL cases) and SHOP-LAM-00 & 07 (AML cases). We used normal bone marrow CD34<sup>+</sup> cells as calibrator for *FLT3* and *hNT* expression. According to the Local Ethics Committee of our institution, all samples were stored in the legally competent Biobank of our Hospital and were used after informed consent was obtained either from the patients or their legal tutors.

We analyzed 3 different acute leukemia cell lines, SEM (childhood B-cell precursor ALL with translocation t(4;11) and *MLL* rearrangement with demonstrated high *FLT3* expression and no *FLT3* mutation; DSMZ ACC 546); MV4-11 (childhood AML with translocation t(4;11) and *MLL* rearrangement, harboring a *FLT3*-ITD mutation; DSMZ ACC 102) and K562 (lymphoid blast crisis of chronic myeloid leukemia with known low *FLT3* expression and no *FLT3* mutations; DSMZ ACC 10). K562 and MV4-11 cells were routinely cultured in RPMI-1640 medium (Lonza, Walkersville, MD) supplemented with 10% heat-inactivated Fetal Bovine Serum (FBS) (Life Technologies, Carlsbad, CA), 50 µg/ml penicillin-streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA), and 2 mM L-glutamine (Invitrogen, Carlsbad, CA). SEM cells were cultured in Iscove's Modified Dubecco's Medium (IMDM) (Gibco, Breda, Netherlands) similarly supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 50 µg/ml penicillin-streptomycin and 2 mM L-glutamine.

### DNA and RNA extraction and reverse transcription

Bone marrow or peripheral blood samples from diagnosis were used for the analysis. Separation of mononuclear cells was performed using density gradient with Ficoll-Hypaque (Sigma, St Louis MO, USA) and DNA was extracted with Qiaquick DNA extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany). Total RNA was extracted with TriPure (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) and cDNA synthesis was performed from 10 ng of total RNA, using the QuantiTect Whole Transcriptome Kit (Qiagen, Hilden, Germany).

### FLT3 mutational status

*FLT3*-ITD was studied by amplification of the juxtamembrane domain spanning exons 14 and 15, using fluorescently-labeled primers and subsequent analysis on a 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, CA, USA), as previously described [47]. To detect point mutations in codon

D835 or deletions within codon 1836, we amplified the exon 20 of *FLT3* and digested the product with Eco-RV enzyme, as reported [48]. All positive cases were directly sequenced to confirm the presence of mutations, using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.0 (Applied Biosystems, Life Technologies).

### Quantification of FLT3 mRNA and protein expression

The quantification of the *FLT3* gene-related mRNA was performed by real-time quantitative PCR (RQ-PCR) using the TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assay Hs00174690\_m1 (Applied Biosystems, Life Technologies) (see Supplementary Table S2), in a Light-Cycler 480 II (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN), according to the manufacturer's instructions. Relative quantification was calculated with the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method, using  $\beta$ -glucuronidase (*GUS*) (NM\_000181.2, ref. 4310888E) as endogenous gene and normal bone marrow CD34<sup>+</sup> cells as calibrator.

*FLT3* protein levels before and after treatment with the *FLT3* inhibitors PKC412 (Enzo Life Science, Plymouth Meeting, PA) and AC220 (Selleck Chemicals, Houston, TX) were quantified by Western blot. For this purpose, cells were treated with either PKC412 (0.045 µM) or AC220 (0.5 nM) and lysed in a buffer containing 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% triton X-100 supplemented with 1 mM sodium orthovanadate, protease inhibitor (Complete mini; Roche, Basel, Switzerland) and phosphatase inhibitor cocktails (PhosSTOP; Roche). Fifty µg of proteins were separated by SDS-PAGE on standard 10% gel and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore, Bedford, MA, USA). Membranes were incubated with *FLT3* (8F2) and phospho-*FLT3* (Tyr591) antibodies (Cell Signalling, MA, USA). After washing with TBS-Tween, membranes were incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies. Immunoreactive bands were detected by chemiluminescence (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA).

### Quantification of NT and metabolizing enzymes

Real-time quantitative PCR (RQ-PCR) amplification of hCNTs and hENTs were performed with primers and probes from Applied Biosystems, summarized in Supplementary Table S2, using the TaqMan Universal Master Mix, 700 nmol/L probe and 150 nmol/L of each primer in the ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems). The relative mRNA level of each gene was calculated with the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method and normalized to that of  $\beta$ -glucuronidase (*GUS*) expression level and normal bone marrow CD34<sup>+</sup> cells as calibrator. Absolute RQ-PCR results were obtained from interpolation of  $\Delta Ct$  of each sample in line regression standards for number of cDNA copies of each gene. hENT1 protein levels were



**Table 1: Clinical and biological characteristics of the 50 patients diagnosed with acute leukemia included in our study**

| <i>N</i> = 50                                  |                  |
|--|------------------|
| Age, years (range)                             | 4.3 (0–16)       |
| Gender, n (%)                                  |                  |
| Male   | 26 (52)          |
| Female   | 24 (48)          |
| CNS, n (%)                                     |                  |
| CNS1   | 46 (92)          |
| CNS2 <sup>a</sup>                              | 3 (6)            |
| CNS3   | 1 (2)            |
| WBC count, ×10 <sup>9</sup> /L, median (range) | 17.6 (1.1–331.2) |
| Hemoglobin, g/L, median (range)                | 7.7 (2.9–11.7)   |
| Platelets, ×10 <sup>9</sup> /L, median (range) | 52 (2–520)       |
| Blasts, median (range)                         |                  |
| Bone marrow                                    | 93 (58–100)      |
| Peripheral blood                               | 55 (0–99)        |
| Immunophenotype, n (%)                         |                  |
| Precursor B-ALL                                | 44 (88)          |
| T-ALL <sup>b</sup>                             | 2 (4)            |
| AML  | 4 (8)            |
| Genetics, n (%)                                |                  |
| ALL:   |                  |
| <i>HeH</i>                                     | 19 (38)          |
| Other <sup>c</sup>                             | 16 (32)          |
| <i>ETV6-RUNX1</i>                              | 4 (8)            |
| <i>MLL+</i>                                    | 3 (6)            |
| <i>TCF3-PBX1</i>                               | 2 (4)            |
| <i>BCR-ABL1</i>                                | 2 (4)            |
| AML:   |                  |
| <i>MLL+</i>                                    | 3 (6)            |
| Other <sup>d</sup>                             | 1 (2)            |

*a: CNS2t: traumatic lumbar puncture.*

*b: Two cases of Early T-cell Precursor T-ALL, one of them harboring a FLT3-ITD mutation, were included.*

*c: Other B-cell precursor ALL cases (n = 14) included patients with normal karyotype (n = 5), cases with < 20 assessable metaphases (n = 6), cases with abnormalities at chromosome 9p (n = 3).*

*The two T-cell ALL cases included had a normal karyotype.*

*d: Other AML cases: we included a patient with 47, XX, t(6;9)(p23;q34), + 13[6]/46, XX, t(6;9)(p23;q34)[6] harboring a FLT3-ITD mutation.*

*Note: CNS: central nervous system. WBC: white blood cell. PB: peripheral blood. ALL: acute lymphoblastic leukemia. AML: acute myeloblastic leukemia. HeH: high hyperdiploid ALL (51–67 chromosomes).*

semi-quantified by Western Blot, using a commercial anti-hENT1 polyclonal antibody (STJ96396) from Saint John's Laboratory Ltd. (London, UK).

### hNT activity assays

Nucleoside uptake was measured in MV4-11, SEM and K562 cells using a method adapted from a technique previously described by our laboratory [49]. Cells were washed twice and resuspended in either a 137 mM NaCl or 137 mM choline chloride buffer. Uptake assays were

started by mixing cell suspensions with a 10% of the final volume of the same buffer, supplemented with a radionucleoside - [<sup>3</sup>H]Ara-C or [<sup>3</sup>H]cytidine – at a final concentration of 1 μM (specific activity 1 μCi/nmol) at a specific activity of 4000 dpm/pmol. Incubation was stopped after 1min (linear initial velocity conditions) by washing the cells three times in 1 mL of a cold buffer composed of 137 mM NaCl and 10 mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane-HEPES (pH 7.4). Cells were then dissolved in 1 ml Triton-X-100 and aliquots were sampled for protein determination, according to

Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA), and for radioactivity measurements.

In the presence of Na<sup>+</sup>, hENTs and hCNTs are functional, although only hCNTs require this ion for substrate translocation. Thus, sodium dependent nucleoside transport activity (hCNT-related) was determined by subtracting uptake rates measured in the choline chloride medium (almost exclusively related to hENT1 and hENT2 activities) from measurements obtained in the sodium containing buffer (in which both ENT and CNT are active).

Cross-inhibition experiments were performed as described above, but adding saturating concentrations (100 μM) of a secondary non-radiolabeled nucleoside to the incubation media, which will compete for the transporter and block the transport of radiolabeled substrate. By adding extra guanosine to [<sup>3</sup>H]cytidine uptake media, hCNT3 but not hCNT1 activity will be blocked. hCNT1-mediated uptake was determined by subtracting the activity measured in [<sup>3</sup>H]cytidine + guanosine conditions from [<sup>3</sup>H]cytidine alone and hCNT3 related activity from the subtraction of [<sup>3</sup>H]cytidine + guanosine transport activity from the one determined when using [<sup>3</sup>H]cytidine alone. The equilibrative (Na<sup>+</sup>-independent) transport component inhibited by NBTI (1 μM) accounts for the hENT1-related nucleoside transport activity, whereas the NBTI-resistant transport includes residual hENT2-related uptake plus diffusion and binding components, which in general are negligible.

### Cell treatment and apoptosis detection by MTT assay

For routine cytotoxicity assays, 2 × 10<sup>4</sup> cells were cultured either in the presence or the absence of appropriate inhibitors. To unveil the role selected nucleoside transporters can play in cytarabine-induced cytotoxicity cells were incubated for 15 min either in the presence or in the absence of NBTI (1 μM for hENT1 inhibition) or phloridzin 250 μM (for hCNT1 inhibition). Afterwards Ara-C was added (3 μM and 1 μM for MV4-11 and SEM cells respectively) and cytotoxicity determined using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT; Sigma-Aldrich) after 48 h. Optical density (OD) was measured at 550 nm. For the analysis of combined drug effects cells were cultured with either 0.045 μM PKC412 or 0.5 nM AC220 and 10 μM Ara-C, following the experimental design described in the Results section, aimed at elucidating the probable role of the order of drug administration of chemotherapeutic efficacy. The Coefficient of Drug Interaction (CDI) was calculated as explained in [50].

### Statistical analysis

For the correlation of clinical and biological variables, we used the  $\chi^2$  and the Fisher's exact tests for

categorical variables and the Student's *t*-test or the Mann–Whitney *U*-test for non-parametric tests. The Spearman non-parametric test was used to determine correlations among mRNA expression values of the analyzed genes. In addition, a Kruskal–Wallis test was used to compare the gene expression levels of *FLT3* and *NT* among the different ALL subgroups. As we selected certain subtypes of leukemia according to their expected *FLT3* expression and also the total number of primary cases is low, we did not perform survival analysis in our study. All *p* values were considered significant when < 0.05. All the statistical analyses were performed using the SPSS 22.0 statistical software package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

### ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to patients and families for their help and to Obra Social from Hospital Sant Joan de Déu for their support. We are indebted to the “Biobanc de l’Hospital Infantil Sant Joan de Déu per a la Investigació” integrated in the Spanish Biobank Network of ISCIII for the sample and data procurement.

### CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no competing financial interest.

### GRANT SUPPORT

This study has been funded by projects PI12/2417 (AC, RM, SR, NVG, MC), integrated in Plan Nacional de I+D+I and cofunded by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) – Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación Sanitaria – and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (AC, RM, SR, NVG, MC, LCC, MPA, PFC) and SAF2011-23660 and SAF2014-52067-R (MPA) by grants from Asociación Española Contra el Cáncer AECC-Foundation (AC, SR, MC), Fundación Sandra Ibarra de Solidaridad Frente al Cáncer (RM, SR, MC), Fundación Cris contra el Cáncer (MC), “Força Miquel”, “Mua” & “Candela, polsera solidària” projects (AC, RM, SR, NVG, MC). CIBER is an initiative of ISCIII (Madrid, Spain). LCC is being funded by the Becas Chile Program (CONICYT, Gobierno de Chile).

### REFERENCES

1. Pieters R, den Boer ML, Durian M, Janka G, Schmiegelow K, Kaspers GJ, van Wering ER, Veerman AJ. Relation between age, immunophenotype and *in vitro* drug resistance in 395 children with acute lymphoblastic leukemia—implications for treatment of infants. *Leukemia*. 1998; 12:1344–8.
2. Hasle H. A critical review of which children with acute myeloid leukaemia need stem cell procedures. *Br J Haematol*. 2014; 166:23–33.

3. Stam RW, den Boer ML, Schneider P, Meier M, Beverloo HB, Pieters R.D-HPLC analysis of the entire FLT3 gene in MLL rearranged and hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2007; 921565–8.
4. Stam RW, Schneider P, de Lorenzo P, Valsecchi MG, den Boer ML, Pieters R. *Blood*. United States. 2007; 2774–5.
5. Kang H, Wilson CS, Harvey RC, Chen I-M, Murphy MH, Atlas SR, Bedrick EJ, Devidas M, Carroll AJ, Robinson BW, Stam RW, Valsecchi MG, Pieters R, et al. Gene expression profiles predictive of outcome and age in infant acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Blood*. 2012; 1191872–81.
6. Yeoh E-J, Ross ME, Shurtleff SA, Williams WK, Patel D, Mahfouz R, Behm FG, Raimondi SC, Relling MV, Patel A, Cheng C, Campana D, Wilkins D, et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell*. 2002; 1133–43.
7. Staffas A, Kanduri M, Hovland R, Rosenquist R, Ommen HB, Abrahamsson J, Forestier E, Jahnukainen K, Jónsson G, Zeller B, Palle J, Lönnerholm G, Hasle H, et al. Nordic Society of Pediatric Hematology and Oncology (NOPHO). Presence of FLT3-ITD and high BAALC expression are independent prognostic markers in childhood acute myeloid leukemia. *Blood*. 2011; 1185905–13.
8. Ozeki K, Kiyoi H, Hirose Y, Iwai M, Ninomiya M, Kodera Y, Miyawaki S, Kuriyama K, Shimazaki C, Akiyama H, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, et al. Biologic and clinical significance of the FLT3 transcript level in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2004; 1031901–8.
9. Stam RW, den Boer ML, Schneider P, Nollau P, Horstmann M, Beverloo HB, van der Voort E, Valsecchi MG, de Lorenzo P, Sallan SE, Armstrong SA, Pieters R. Targeting FLT3 in primary MLL-gene-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2005; 1062484–90.
10. Andersson A, Paulsson K, Lilljebjörn H, Lassen C, Strömbeck B, Heldrup J, Behrendtz M, Johansson B, Fioretos T. FLT3 mutations in a 10 year consecutive series of 177 childhood acute leukemias and their impact on global gene expression patterns. *Genes Chromosomes Cancer*. 2008; 4764–70.
11. Armstrong SA, Kung AL, Mabon ME, Silverman LB, Stam RW, Den Boer ML, Pieters R, Kersey JH, Sallan SE, Fletcher JA, Golub TR, Griffin JD, Korsmeyer SJ. Inhibition of FLT3 in MLL. Validation of a therapeutic target identified by gene expression based classification. *Cancer Cell*. 2003; 3173–83.
12. Brown P, Levis M, Shurtleff S, Campana D, Downing J, Small D. FLT3 inhibition selectively kills childhood acute lymphoblastic leukemia cells with high levels of FLT3 expression. *Blood*. 2005; 105812–20.
13. Pratcorona M, Brunet S, Nomdedéu J, Ribera JM, Tormo M, Duarte R, Escoda L, Guàrdia R, Queipo de Llano MP, Salamero O, Bargay J, Pedro C, Martí JM, et al. Grupo Cooperativo Para el Estudio y Tratamiento de las Leucemias Agudas Mieloblásticas. Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden FLT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutation: relevance to post-remission therapy. *Blood*. 2013; 1212734–8.
14. Pastor-Anglada M, Pérez-Torras S. Nucleoside transporter proteins as biomarkers of drug responsiveness and drug targets. *Front Pharmacol*. 2015; 613.
15. White JC, Rathmell JP, Capizzi RL. Membrane transport influences the rate of accumulation of cytosine arabinoside in human leukemia cells. *J Clin Invest*. 1987; 79380–7.
16. Errasti-Murugarren E, Pastor-Anglada M. Drug transporter pharmacogenetics in nucleoside-based therapies. *Pharmacogenomics*. 2010; 11809–41.
17. Stam RW, den Boer ML, Meijerink JPP, Ebus MEG, Peters GJ, Noordhuis P, Janka-Schaub GE, Armstrong SA, Korsmeyer SJ, Pieters R. Differential mRNA expression of Ara-C-metabolizing enzymes explains Ara-C sensitivity in MLL gene-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2003; 1011270–6.
18. Abraham A, Varatharajan S, Karathedath S, Philip C, Lakshmi KM, Jayavelu AK, Mohanan E, Janet NB, Srivastava VM, Shaji RV, Zhang W, Abraham A, Viswabandya A, et al. RNA expression of genes involved in cytarabine metabolism and transport predicts cytarabine response in acute myeloid leukemia. *Pharmacogenomics*. 2015; 16877–90.
19. Hubeek I, Stam RW, Peters GJ, Broekhuizen R, Meijerink JPP, van Wering ER, Gibson BES, Creutzig U, Zwaan CM, Cloos J, Kuik DJ, Pieters R, Kaspers GJL. The human equilibrative nucleoside transporter 1 mediates *in vitro* cytarabine sensitivity in childhood acute myeloid leukaemia. *Br J Cancer*. 2005; 931388–94.
20. Jin G, Matsushita H, Asai S, Tsukamoto H, Ono R, Nosaka T, Yahata T, Takahashi S, Miyachi H. FLT3-ITD induces ara-C resistance in myeloid leukemic cells through the repression of the ENT1 expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 3901001–6.
21. Meshinchi S, Alonzo TA, Stirewalt DL, Zwaan M, Zimmerman M, Reinhardt D, Kaspers GJL, Heerema NA, Gerbing R, Lange BJ, Radich JP. Clinical implications of FLT3 mutations in pediatric AML. *Blood*. 2006; 1083654–61.
22. Willemze R, Suciú S, Meloni G, Labar B, Marie JP, Halkes CJM, Muus P, Mistrik M, Amadori S, Specchia G, Fabbiano F, Nobile F, Sborgia M, et al. High-dose cytarabine in induction treatment improves the outcome of adult patients younger than age 46 years with acute myeloid leukemia: results of the EORTC-GIMEMA AML-12 trial. *J Clin Oncol*. 2014; 32219–28.
23. Braoudaki M, Karpusas M, Katsibardi K, Papatthanassiou CH, Karamolegou K, Tzortzatou-Stathopoulou F. Frequency of FLT3 mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Med Oncol*. 2009; 26460–2.

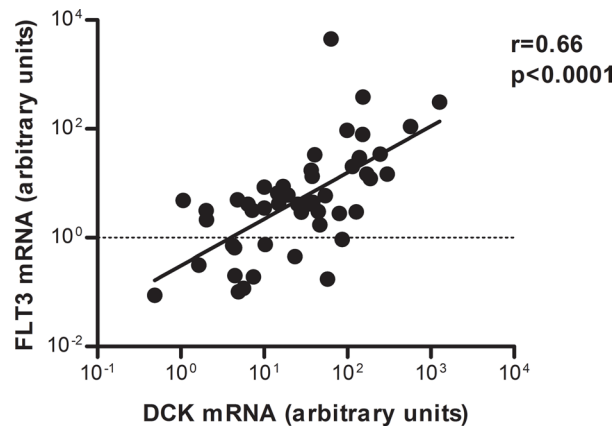
24. Brunet S, Labopin M, Esteve J, Cornelissen J, Socié G, Iori AP, Verdonck LF, Volin L, Gratwohl A, Sierra J, Mohty M, Rocha V. Impact of FLT3 internal tandem duplication on the outcome of related and unrelated hematopoietic transplantation for adult acute myeloid leukemia in first remission: a retrospective analysis. *J Clin Oncol*. 2012; 30735–41.
25. Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, Pieters R, den Boer ML, Minden MD, Sallan SE, Lander ES, Golub TR, Korsmeyer SJ. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet*. 2002; 3041–7.
26. Pieters R, Schrappe M, De Lorenzo P, Hann I, De Rossi G, Felice M, Hovi L, LeBlanc T, Szczepanski T, Ferster A, Janka G, Rubnitz J, Silverman L, et al. A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial. *Lancet*. 2007; 370240–50.
27. Armstrong SA, Mabon ME, Silverman LB, Li A, Gribben JG, Fox EA, Sallan SE, Korsmeyer SJ. FLT3 mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2004; 1033544–6.
28. Gloeckner-Hofmann K, Guillén-Gómez E, Schmidtgen C, Porstmann R, Ziegler R, Stoss O, Casado FJ, Rüschoff J, Pastor-Anglada M. Expression of the high-affinity fluoropyrimidine-preferring nucleoside transporter hCNT1 correlates with decreased disease-free survival in breast cancer. *Oncology*. 2006; 70238–44.
29. Fernández-Calotti PX, Colomer D, Pastor-Anglada M. Translocation of nucleoside analogs across the plasma membrane in hematologic malignancies. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2011; 301324–40.
30. Galmarini CM, Thomas X, Graham K, El Jafaari A, Cros E, Jordheim L, Mackey JR, Dumontet C. Deoxycytidine kinase and cN-II nucleotidase expression in blast cells predict survival in acute myeloid leukaemia patients treated with cytarabine. *Br J Haematol*. 2003; 12253–60.
31. Kakihara T, Fukuda T, Tanaka A, Emura I, Kishi K, Asami K, Uchiyama M. Expression of deoxycytidine kinase (dCK) gene in leukemic cells in childhood: decreased expression of dCK gene in relapsed leukemia. *Leuk Lymphoma*. 1998; 31405–9.
32. Locatelli F, Moretta F, Rutella S. Management of relapsed acute lymphoblastic leukemia in childhood with conventional and innovative approaches. *Curr Opin Oncol*. 2013; 25707–15.
33. Byrne JL, Dasgupta E, Pallis M, Turzanski J, Forman K, Mitchell D, Haynes AP, Russell NH. Early allogeneic transplantation for refractory or relapsed acute leukaemia following remission induction with FLAG. *Leukemia*. 1999; 13786–91.
34. McCarthy AJ, Pitcher LA, Hann IM, Oakhill A. FLAG (fludarabine, high-dose cytarabine, and G-CSF) for refractory and high-risk relapsed acute leukemia in children. *Med Pediatr Oncol*. 1999; 32411–5.
35. Hijiya N, Barry E, Arceci RJ. Clofarabine in pediatric acute leukemia: current findings and issues. *Pediatr Blood Cancer*. 2012; 59417–22.
36. Tavil B, Aytac S, Balci YI, Unal S, Kuskonmaz B, Yetgin S, Gurgey A, Tuncer M, Gumruk F, Uckan D, Cetin M. Fludarabine, cytarabine, granulocyte colony-stimulating factor, and idarubicin (FLAG-IDA) for the treatment of children with poor-prognosis acute leukemia: the Hacettepe experience. *Pediatr Hematol Oncol*. 2010; 27517–28.
37. Levis M, Allebach J, Tse KF, Zheng R, Baldwin BR, Smith BD, Jones-Bolin S, Ruggeri B, Dionne C, Small D. A FLT3-targeted tyrosine kinase inhibitor is cytotoxic to leukemia cells *in vitro* and *in vivo*. *Blood*. 2002; 993885–91.
38. Stubbs MC, Armstrong SA. FLT3 as a therapeutic target in childhood acute leukemia. *Curr Drug Targets*. 2007; 8703–14.
39. König H, Levis M. Targeting FLT3 to treat leukemia. *Expert Opin Ther Targets*. 2015; 1937–54.
40. Grunwald MR, Levis MJ. FLT3 inhibitors for acute myeloid leukemia: a review of their efficacy and mechanisms of resistance. *Int J Hematol*. 2013; 97683–94.
41. Stone RM, DeAngelo DJ, Klimek V, Galinsky I, Estey E, Nimer SD, Grandin W, Lebwohl D, Wang Y, Cohen P, Fox EA, Neuberg D, Clark J, et al. Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. *Blood*. 2005; 10554–60.
42. Smith BD, Levis M, Beran M, Giles F, Kantarjian H, Berg K, Murphy KM, Dausers T, Allebach J, Small D. Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*. 2004; 1033669–76.
43. Levis M, Pham R, Smith BD, Small D. *In vitro* studies of a FLT3 inhibitor combined with chemotherapy: sequence of administration is important to achieve synergistic cytotoxic effects. *Blood*. 2004; 1041145–50.
44. Brown P, Levis M, McIntyre E, Griesemer M, Small D. Combinations of the FLT3 inhibitor CEP-701 and chemotherapy synergistically kill infant and childhood MLL-rearranged ALL cells in a sequence-dependent manner. *Leukemia*. 2006; 201368–76.
45. Soler C, García-Manteiga J, Valdés R, Xaus J, Comalada M, Casado FJ, Pastor-Anglada M, Celada A, Felipe A. Macrophages require different nucleoside transport systems for proliferation and activation. *FASEB J*. 2001; 151979–88.
46. Valdés R, Casado FJ, Pastor-Anglada M. Cell-cycle-dependent regulation of CNT1, a concentrative nucleoside transporter involved in the uptake of cell-cycle-dependent nucleoside-derived anticancer drugs. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 296575–9.
47. Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schäkel U, Platzbecker U, Wermke M, Bornhäuser M, Ritter M, Neubauer A, Ehninger G, Illmer T. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*. 2002; 994326–35.

48. Kottaridis PD, Gale RE, Langabeer SE, Frew ME, Bowen DT, Linch DC. Studies of FLT3 mutations in paired presentation and relapse samples from patients with acute myeloid leukemia: implications for the role of FLT3 mutations in leukemogenesis, minimal residual disease detection, and possible therapy with FLT3 inhibitors. *Blood*. 2002; 100:2393–8.
49. Fernández-Calotti P, Pastor-Anglada M. All-trans-retinoic acid promotes trafficking of human concentrative nucleoside transporter-3 (hCNT3) to the plasma membrane by a TGF-beta1-mediated mechanism. *J Biol Chem*. 2010; 285:13589–98.
50. Urtaşun N, Vidal-Pla A, Pérez-Torras S, Mazo A. Human pancreatic cancer stem cells are sensitive to dual inhibition of IGF-IR and ErbB receptors. *BMC Cancer*. 2015; 15:223.

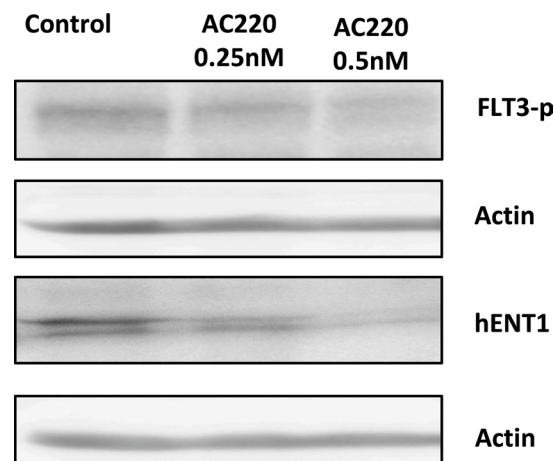


## FLT3 is implicated in cytarabine transport by Human Equilibrative Nucleoside Transporter 1 in pediatric acute leukemia

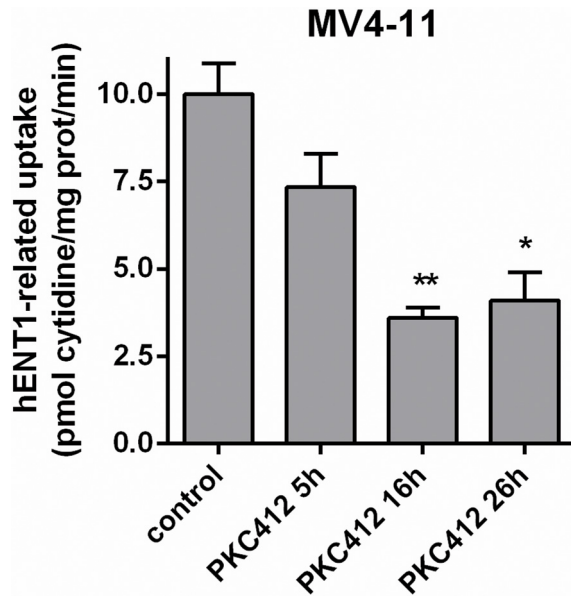
### Supplementary Materials



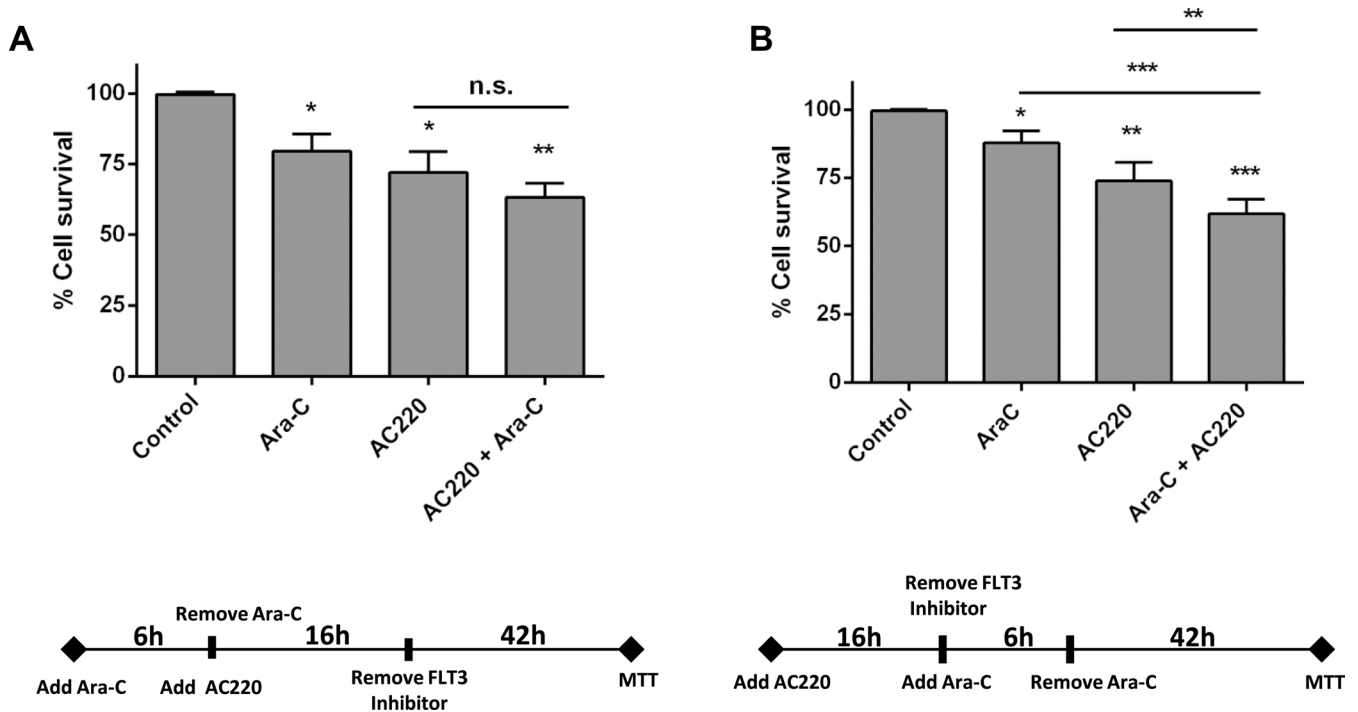
**Supplementary Figure S1: Correlation between *DCK* and *FLT3* mRNA expression in pediatric leukemia samples.** Relative *DCK* mRNA levels of cells from 50 pediatric patients with acute leukemia were plotted against the levels of *FLT3* mRNA in the same samples. Correlation coefficient and level of significance are shown in the figure.



**Supplementary Figure S2: Western blot analysis of hENT1 and phospho-FLT3 (Tyr591) were performed in cell extracts from MV4-11 cells.** Cells were incubated in the presence of AC220 (0.25 nM and 0.5 nM) for 16 h. A representative Western blot out of three independent experiments is shown in each panel.



**Supplementary Figure S3: Effect of FLT3 inhibition in hENT1-related activity.** hENT1-mediated [<sup>3</sup>H]cytidine uptake (1 μM, 1 min) was measured in MV4-11 cells in the presence of PKC412 for 5, 16 or 26 h. Mean ± SEM from 3 independent experiments, each conducted in quadruplicate, is shown. Statistical significance of the difference relative to control cells is as follows: \**p* < 0.1; \*\**p* < 0.01.



**Supplementary Figure S4: Effect of AC220 on the cytotoxicity induced by Ara-C.** Cell viability was determined by MTT assays when (A) MV4-11 cells were treated first with the FLT3 inhibitor AC220 for 16 h, then AC220 was removed from the medium and this was followed by a 6 h exposure to Ara-C (10 μM), and (B) MV4-11 cells were cultured first with Ara-C (10 μM) for 6 h, then Ara-C removed from the medium and followed by a 16 h exposure to AC220. Data are expressed as percentage of survival ± SEM of triplicate measurements from six independent experiments. Statistical significance of the differences relative to control cells is as follows: \**p* < 0.1; \*\**p* < 0.01; \*\*\**p* < 0.001. Interexperimental differences were similarly determined for Ara-C and PKC412 treated cells as indicated in the figures.

**Supplementary Table S1: Absolute expression of hNTs under experimental conditions**

| RNA expression (log copies/ $\mu$ g RNA) |                 |                 |                 |
|--|-----------------|-----------------|-----------------|
| <i>hNT</i>                               | MV4-11          | SEM             | K562            |
| <i>hCNT1 (SLC28A1)</i>                   | 3.04 $\pm$ 0.11 | 2.61 $\pm$ 0.05 | 2.82 $\pm$ 0.06 |
| <i>hCNT2 (SLC28A2)</i>                   | 2.88 $\pm$ 0.01 | 3.06 $\pm$ 0.04 | 2.69 $\pm$ 0.11 |
| <i>hCNT3 (SLC28A3)</i>                   | 5.06 $\pm$ 0.01 | 1.33 $\pm$ 0.01 | 1.69 $\pm$ 0.09 |
| <i>hENT1 (SLC29A1)</i>                   | 5.05 $\pm$ 0.10 | 5.30 $\pm$ 0.01 | 5.52 $\pm$ 0.17 |
| <i>hENT2 (SLC29A2)</i>                   | 2.55 $\pm$ 0.03 | 3.79 $\pm$ 0.06 | 4.17 $\pm$ 0.11 |

mRNA expression (log copies/ $\mu$ g RNA) quantified by absolute RQ-PCR.

**Supplementary Table S2: Oligonucleotides and probes used in RQ-PCR to measure different nucleoside transporters, metabolizing enzymes and *FLT3* expression levels**

| target gene    | encoded protein | sense 5-3'/antisense 5-3'                                    | probes 5'FAM-TAMRA3'            |
|----------------|-----------------|--|---------------------------------|
| <i>SLC28A1</i> | hCNT1           | TGATTTCTTGGAAGCCTGGA/<br>TGCTCCTGATCTCTGCGG                  | AAGGCCAGCTCCCTAGGAGTGACTTGAG    |
| <i>SLC28A2</i> | hCNT2           | AAGTAGAGCCTGAGGGAAGCAA/<br>GCCAGTCCATCCCC                    | AGGACTGACGCACAAGGAACACAGCC      |
| <i>SLC28A3</i> | hCNT3           | GAGCTGTGCAAAGCAGGGA/<br>TGGCGAATCCTGCTCAACTGTG               | CACACAAACACCAGGATGAAGAACAGG     |
| <i>SLC29A1</i> | hENT1           | GCAAAGGAGAGGAGCCAAGA/<br>TTCATTGGTGGGCTGAGAGT                | CAGGCAAAGAGGAATCTGGAGTTTCAGTCTC |
| <i>SLC29A2</i> | hENT2           | CCCTGGATCTTGACCTGGAG/<br>GGTTTTCCTGGCTTCTGGG                 | AGGAGCCGGAATCAGAGCCAGATGA       |
| <i>DCK</i>     | DCK             | <i>Hs01040726_m1 (Applied Biosystems, Life Technologies)</i> |                                 |
| <i>FLT3</i>    | FLT3            | <i>Hs00174690_m1 (Applied Biosystems, Life Technologies)</i> |                                 |