

II. OBJECTIUS

ANTECEDENTS.

Els transportadors de nucleòsids són determinants en la regulació de molts processos fisiològics, modulant els nivells extracel·lulars dels substrats que internalitzen però alhora representen el camí d'entrada de molts anàlegs citotòxics utilitzats en la teràpia antivírica i del càncer (Lostao et al., 2000; Mata et al., 2001; Cano-Soldado et al., 2004). Existeixen dues famílies de transportadors de nucleòsids: els transportadors concentratius o CNT (família SLC28), que permeten l'entrada del substrat a l'interior cel·lular a expenses d'una despesa energètica, i els transportadors equilibratius o ENT (família SLC29), que faciliten el pas del substrat gràcies al seu gradient de concentració (reviews recents Giacomini et al., 2004; Baldwin et al., 2004). La majoria de tipus cel·lulars coexpressen diferents isoformes de transportadors de nucleòsids i en concret, en epitelis absortius, s'ha posat de manifest que les dues famílies de transportadors presenten una distribució asimètrica, de manera que els CNT es localitzen principalment a la membrana apical de les cèl·lules epitelials intestinals i renals i en canvi els ENT se situen a la membrana basolateral (Patil and Unadkat, 1997; Mangravite et al., 2001; 2002; Williams and Jarvis, 2001). Tot i que encara són pocs els estudis sobre els mecanismes de regulació dels transportadors de nucleòsids, el nostre grup de recerca ha demostrat que la seva expressió depèn en certa mesura de l'estat de proliferació i diferenciació cel·lular (del Santo et al., 2001) i que respon a factors endocrins (Soler et al., 1998, 2000) i nutricionals (Valdés et al., 2000). En concret, el transportador d'alta afinitat d'adenosina CNT2, a més d'estar sotmès a regulació transcripcional per factors endocrins, veu també regulada la seva activitat per mecanismes post-traduccionals (Dufлот et al., 2004) i de canvis en el tràfic i localització subcel·lular del transportador (Fernández-Veledo et al., enviat).

OBJECTIU GENERAL.

En base als antecedents citats ens vam plantejar com objectiu principal estudiar els mecanismes implicats en la localització i regulació del transportador CNT2 i a la vegada analitzar el seu possible paper com a regulador metabòlic de la via de l'AMPK.

DISSENY EXPERIMENTAL.

L'objectiu general de d'aquesta tesi s'ha desglossat en els quatre punts concrets que es detallen a continuació:

1. Aprofundir en els mecanismes de regulació endocrina dels transportadors de nucleòsids i l'estudi del flux vectorial de nucleòsids.

En primer lloc es va caracteritzar l'expressió i l'activitat dels transportadors de nucleòsids en les línies cel·lulars IEC-6 (derivada d'epiteli intestinal de rata) i Caco-2 (derivada d'un adenocarcinoma de colon humà) a fi de trobar un bon model d'epiteli absortiu intestinal. A partir dels resultats obtinguts en la caracterització de les dues línies cel·lulars, es van utilitzar les cèl·lules IEC-6 per dur a terme estudis de regulació, tant des del punt de vista de l'expressió gènica com de l'activitat dels transportadors. En concret, es va analitzar l'efecte de diversos estímuls proliferatius com l'EGF, el TGF- α i el dany cel·lular i de factors que afavoreixen la diferenciació de l'epiteli intestinal *in vivo* i en particular d'aquesta línia cel·lular. En una segona part d'aquest primer bloc es va generar un clon estable, Caco-2-hCNT1, per tal d'analitzar el flux transepitelial de nucleòsids naturals i de fàrmacs derivats de nucleòsids, com la gemcitabina.

2. Estudiar la regulació dels sistemes de transport de nucleòsids per assequibilitat de substrat.

En base als antecedents obtinguts en models *in vivo*, es va decidir analitzar l'efecte de diferents nucleòsids sobre l'activitat del transportador concentratiu CNT2 en les cèl·lules epitelials intestinals IEC-6. Posteriorment, es va intentar determinar els mecanismes implicats en la regulació de CNT2 per assequibilitat de substrat mitjançant l'ús d'inhibidors i activadors específics de diferents proteïna quinases implicades en les principals vies la transducció de senyals.

3. Plantejar el possible efecte de l'adenosina extracel·lular sobre la proteïna quinasa dependent d'AMP i el paper dels transportadors de nucleòsids en la regulació de la via de l'AMPK.

Per tal de determinar l'efecte de l'adenosina sobre l'AMPK es va analitzar d'una banda l'estat de fosforilació de la proteïna quinasa mitjançant *Western blot* amb un anticòs específic anti-fosfo-AMPK i en segon lloc es va mesurar la seva activitat quinasa després d'immunoprecipitar de manera específica els complexos $\alpha 1$ i $\alpha 2$ AMPK. Tant el paper de l'adenosina sobre la regulació de l'AMPK com la contribució dels transportadors de nucleòsids en aquest efecte es van estudiar inicialment en la línia cel·lular IEC-6. Una vegada definit el mecanisme en aquest tipus cel·lular, es van reproduir els experiments en dos models cel·lulars hepàtics, les cèl·lules FAO (derivades d'hepatoma de rata) i els cultius primaris d'hepatòcits de rata, en els quals s'ha estudiat més extensament el paper de l'AMPK en el metabolisme energètic.

4. Estudiar la localització subcel·lular i analitzar els determinants moleculars implicats en el tràfic i la inserció del transportador concentratiu de nucleòsids CNT2 a la membrana plasmàtica de les cèl·lules.

Es van generar una sèrie de construccions del transportador CNT2 per tal d'analitzar més fàcilment la seva localització subcel·lular. Aquest estudi s'ha dut a terme d'una banda en cèl·lules CHO i HeLa, usades habitualment en l'estudi de l'expressió heteròloga de proteïnes, i en les línies cel·lulars hepàtiques FAO i HepG2, àmpliament utilitzades en el laboratori en l'estudi de la regulació del transportador CNT2. En un segon punt, es van generar dues construccions que codifiquen per una forma deletada del transportador per tal de determinar la possible implicació de l'extrem amino-terminal en seu tràfic i inserció a la membrana plasmàtica de les cèl·lules. Una primera aproximació es va dur a terme en els models cel·lulars anteriorment esmentats i, en segon terme, es va utilitzar la línia cel·lular MDCK, una línia cel·lular derivada d'epiteli renal que polaritza espontàniament quan es fa créixer sobre filtres permeables de policarbonat, per analitzar el paper de l'extrem amino-terminal en la localització de CNT2 en el domini apical de les cèl·lules epitelials absorbtives.