

IV. RESULTATS I DISCUSSIÓ

1. REGULACIÓ ENDOCRINA DELS TRANSPORTADORS DE NUCLEÒSIDS I ESTUDI DEL FLUX VECTORIAL DE NUCLEÒSIDS EN UN MODEL D'EPITELI ABSORTIU INTESTINAL.

Els transportadors de membrana plasmàtica juguen un paper crucial en la funció dels epitelis absortius, ja que faciliten la reabsorció i secreció de nombrosos compostos fisiològics i farmacològics. D'entre aquests sistemes de transport, els transportadors de nucleòsids són responsables de la captació de nucleòsids naturals i d'anàlegs de nucleòsids utilitzats en teràpies antitumorals i antivíriques.

Tal i com s'ha comentat a la Introducció, existeixen dues famílies de transportadors de nucleòsids: els transportadors concentratius (CNTs) i els transportadors equilibratius (ENTs). El transport de nucleòsids s'ha caracteritzat en nombrosos tipus cel·lulars, i concretament en cèl·lules d'epiteli intestinal de diferents espècies, s'han identificat tant activitats concentratives (Vijayalaskshmi and Belt, 1988; Iseki et al., 1996; Chandrasena et al., 1997; Patil and Unadkat, 1997; Scharrer et al., 2002) com equilibratives (Lee et al., 1988; Patil and Unadkat, 1997). Addicionalment s'ha posat de manifest que les activitats concentratives segueixen un gradient proximal-distal, amb taxes de transport màximes al jejúnum (Ngo et al., 2001). D'acord amb aquestes activitats, s'ha pogut detectar el missatger i la proteïna del transportador pirimidino-preferent CNT1 (Huang et al., 1994) i del transportador preferent per a purines CNT2 (Ritzel et al., 1998; Valdés et al., 2000) a l'intestí prim i s'ha demostrat que aquests transportadors es localitzen a la membrana apical de les cèl·lules epitelials intestinals (Patil and Unadkat, 1997; Valdés et al., 2000). D'altra banda, la presència dels transportadors equilibratius ENT1 i ENT2 a la membrana basolateral de les cèl·lules epitelials suggereix la possibilitat d'una transferència vectorial i transepitelial de nucleòsids (Williams et al., 1989; Mangravite et al., 2003a).

Una de les primeres evidències de la possible regulació dels transportadors de nucleòsids va venir a càrrec del nostre grup recerca quan es va observar que l'hepatectomia parcial produïa un increment del transport d'uridina dependent de sodi en vesícules de membrana plasmàtica de fetge (Ruiz-Montasell et al., 1992). Gràcies a la utilització de diferents eines moleculars, es va comprovar que l'increment de transport observat durant la regeneració hepàtica s'associava a un augment de l'expressió dels sistemes de transport concentratius rCNT1 i rCNT2 (Felipe et al., 1997; Pastor-Anglada et al., 1998). Resultats posteriors, duts a terme en línies

cel·lulars hepàtiques i en cèl·lules del sistema immunitari, van demostrar que l'expressió dels transportadors de nucleòsids depèn de l'estat de proliferació i diferenciació cel·lular (del Santo et al., 2001) i que aquests transportadors responen tant a factors endocrins (Soler et al., 1998; 2000) com nutricionals (Valdés et al., 2000). En aquest sentit, es va posar de manifest la modulació de l'expressió dels transportadors de nucleòsids concentratius en un model *in vivo* en funció de l'assequibilitat de substrat i de manera específica de teixit. Així, el dejuni i una dieta lliure de nucleòtids, indueix un increment dels nivells de proteïna de rCNT1 en jejúnum, associats a un increment de l'activitat de transport, i en canvi en fetge es produeix una lleugera disminució de la seva expressió.

A partir d'aquests antecedents com a primer objectiu ens vem plantejar la búsqueda i caracterització d'un model *in vitro* que mimetitzi els processos d'absorció intestinal per tal de poder fer estudis d'activitat i de regulació dels transportadors de nucleòsids, així com de flux transepitelial de nucleòsids i en última instància dels seus fàrmacs derivats.

1.1 CARACTERITZACIÓ DEL TRANSPORT DE NUCLEÒSIDS EN CÈL·LULES DERIVADES D'EPITELI INTESTINAL.

En base a la bibliografia existent es van escollir les línies cel·lulars IEC-6, derivada d'epiteli intestinal de rata, i Caco-2, provenint d'un adenocarcinoma de colon humà, com a possibles models d'epiteli absortiu intestinal. La línia cel·lular IEC-6, parcialment caracteritzada per Jakobs i col·laboradors (1990), a més d'un transport de nucleòsids equilibratiu, semblava presentar una component concentrativa i dependent de sodi, que fins al moment no havia estat detectada en cap altre línia cel·lular intestinal (Ward and Tse, 1999). D'altra banda les cèl·lules Caco-2, gràcies a la seva capacitat per diferenciar-se i polaritzar-se espontàniament en cultiu, semblaven un bon model per dur a terme estudis de transport i flux vectorial de nucleòsids i de fàrmacs derivats de nucleòsids.

La caracterització cinètica de les cèl·lules IEC-6 es va dur a terme mitjançant assaigs de transport amb diferents nucleòsids marcats radioactivament i mitjançant inhibicions del transport d'uridina per competència amb un excés d'altres nucleòsids naturals o anàlegs d'aquests compostos. De manera consistent amb el què s'havia descrit (Jakobs et al., 1990), la mesura del transport d'uridina 1 μ M al llarg del temps

va posar de manifest la presència d'una activitat de transport independent de sodi i d'una activitat concentrativa i dependent del gradient de sodi, essent aquesta majoritària i arribant pràcticament al 80% de la taxa total de transport (**figura 12.A**). En condicions de velocitat inicial (1 min), es van realitzar un seguit d'inhibicions a fi de determinar les diferents isoformes implicades en la captació de nucleòsids. Com es pot observar, en presència de guanosina 100 μM s'inhibeix quasi completament el transport concentratiu d'uridina, i en canvi quan s'afegeix citidina 100 μM la inhibició és molt menor, el que suggereix que l'activitat sodi-dependent majoritària es correspon amb l'activitat purino-preferent CNT2 (**figura 12.B**). Aquesta observació ha estat confirmada mitjançant assaigs de captació directe de guanosina (**figura 12.D**) i citidina (**figura 12.C**) tritades. Així, el transport sodi-dependent de guanosina és molt superior a l'equilibratiu, i en canvi el transport sodi-dependent de citidina és pràcticament nul. D'altre banda, els resultats obtinguts indiquen que principalment el sistema insensible a NBTI (*e*) i en segon terme el transportador sensible (*e*s) són els responsables del transport equilibratiu de nucleòsids en aquesta línia cel·lular (**figura 12.B**).

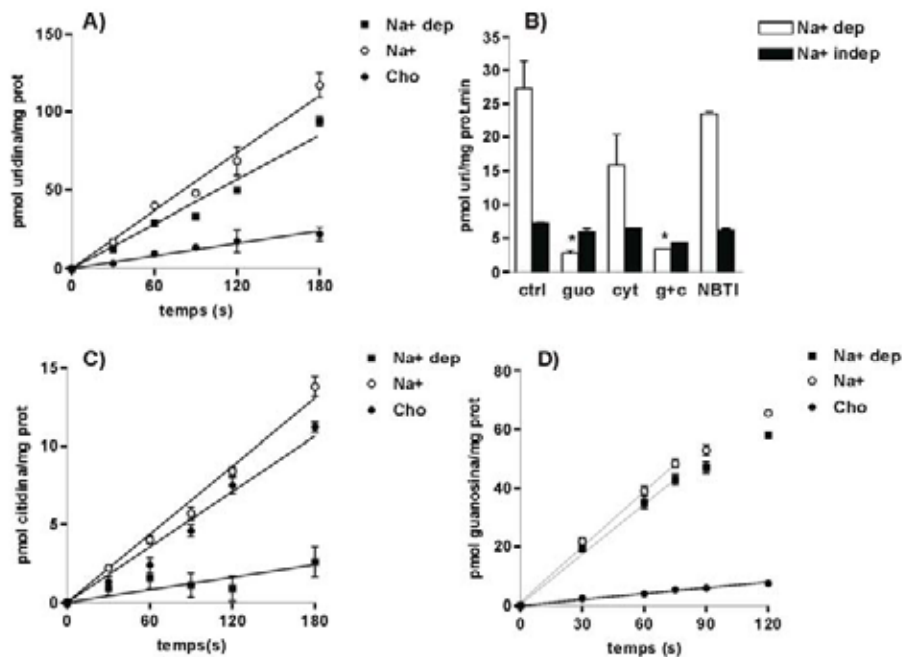


Figura 12 : Caracterització de l'activitat de transport de nucleòsids en les cèl·lules IEC-6. A) Transport d'uridina 1 μM al llarg del temps en presència o en absència de sodi. **B)** Inhibicions del transport d'uridina amb guanosina 100 μM (guo), citidina 100 μM (cyt), guanosina 100 μM i citidina 100 μM (g + c), o NBTI 1 μM . Captació de citidina 1 μM i guanosina 1 μM **C i D** respectivament al llarg del temps.

Aquestes primeres evidències funcionals van ser confirmades mitjançant l'anàlisi del patró d'expressió de les diferents isoformes. Per RT-PCR es van amplificar fàcilment rCNT2, rENT2 i rENT1 i més feblement també s'observa la presència del missatger de rCNT1 (**figura 13.A**). Tot i que no es tracta d'una anàlisi quantitativa, semblaria que rCNT2 és el transportador més expressat en aquesta línia cel·lular, fet que concorda amb els assaigs funcionals. L'expressió dels transportadors concentratius es va analitzar addicionalment per *Western Blot* mitjançant dos anticossos policlonals, generats en el marc de la tesi doctoral de la Dra. Raquel Valdés, que reconeixen de manera específica les proteïnes rCNT1 i rCNT2, les quals presenten un pes molecular d'aproximadament 55-60 kDa. Com s'observa a la **figura 13.B**, rCNT2 és el transportador concentratiu predominant, no obstant, també es detecta certa expressió de la proteïna rCNT1.

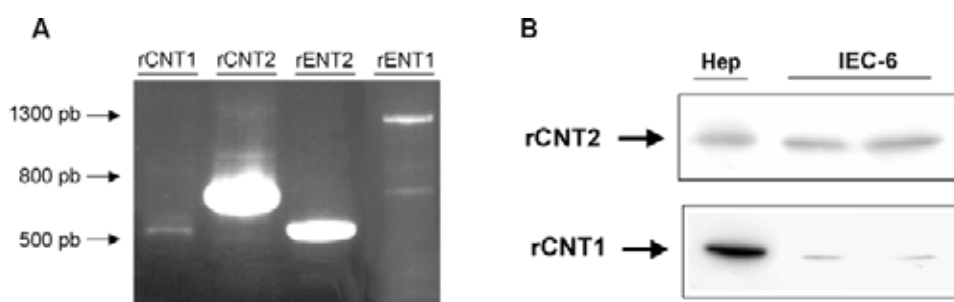


Figura 13. Caracterització de l'expressió dels transportadors de nucleòsids en cèl·lules IEC-6. (A) RT-PCR de rCNT1, rCNT2, rENT1 i rENT2 a partir de missatger de cèl·lules IEC-6. (B) Anàlisi dels nivells de proteïna de rCNT1 i rCNT2 mitjançant Western Blot a partir d'extractes de proteïna de monocapes confluents de cèl·lules IEC-6. Com a control es va utilitzar un extracte de proteïna d'hepatòcits de rata.

Paral·lelament, es van determinar quins transportadors s'expressaven a la línia cel·lular intestinal Caco-2. De la mateixa manera que per a les cèl·lules IEC-6, es va realitzar un experiment de captació d'uridina 1 μ M a diferents temps en presència o en absència de sodi. En consistència amb els resultats obtinguts per d'altres autors (Ward and Tse, 1999), es va observar que les cèl·lules Caco-2 només transporten els nucleòsids de manera independent de sodi (**figura 14.A**) i aquest transport està mitjançat tant pel sistema sensible a NBTI es com pel sistema insensible *ei* (**figura 14.B**)

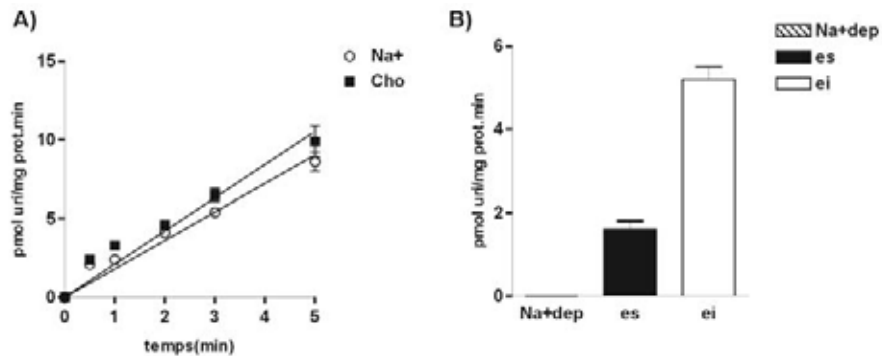


Figura 14: Caracterització de l'activitat de transport de nucleòsids en cèl·lules Caco-2. **A)** Captació de uridina 1 μM al llarg del temps en presència i absència de sodi. **B)** Transport d'uridina 1 μM a dos minuts. *es*, fracció del transport independent de sodi inhibida per NBTI 1 μM ; *ei*, fracció del transport independent de sodi insensible a NBTI 1 μM .

Tenint en compte que la diferenciació i polarització completa de les cèl·lules Caco-2 només s'aconsegueix quan es fan créixer sobre filtres permeables, es van repetir els assaigs de transport en aquestes condicions. Així, es van sembrar les cèl·lules en plaques de *transwell* i després de 20 o 21 dies en cultiu, una vegada haver comprovat mitjançant una mesura de resistència la correcta polarització de la monocapa de cèl·lules (valors de TEER entre 1500 i 2000 Ω/cm^2), es va realitzar una mesura de captació d'uridina 1 μM . Cal remarcar que l'ús de les plaques de *transwell* permet analitzar de manera independent les activitats de transport presents a la membrana apical i les activitats localitzades a la membrana basolateral de les cèl·lules, en funció del compartiment on s'afegeix el medi de transport. Com es pot apreciar a la **figura 15.A**, en aquestes condicions tampoc es va detectar la presència de cap activitat concentrativa ni a la membrana apical ni a la basolateral de les cèl·lules. D'altra banda, respecte el transport equilibratiu, els resultats indiquen que l'activitat sensible a NBTI (*es*) se situa exclusivament a la membrana basolateral i en canvi es detecta la component insensible (*ei*) a les dues membranes de les cèl·lules Caco-2 (**figura 15.B**).

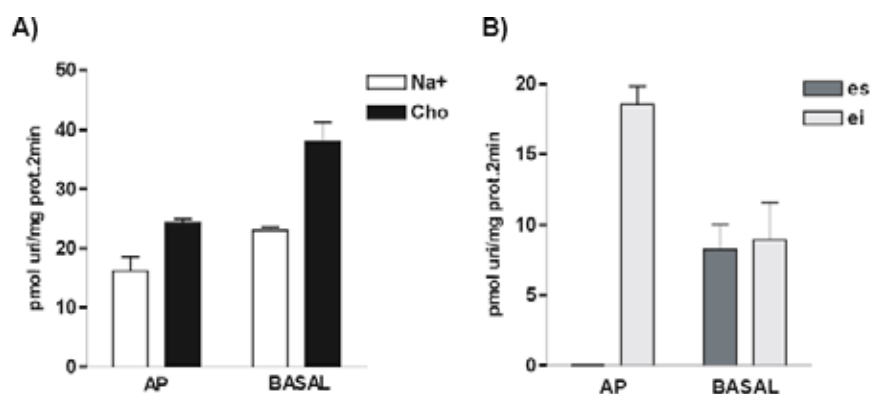


Figura 15: Caracterització de l'activitat de transport de nucleòsids en cèl·lules Caco-2 polaritzades. A) Es van sembrar les cèl·lules en plaques de transwell i 21 dies després de la sembra es va analitzar la captació d'uridina apical i basolateral en presència i absència de sodi. B) Transport equilibratiu d'uridina en presència o i absència de NBTI. es, fracció del transport equilibratiu sensible a NBTI 1 μ M; ei, fracció no inhibible per NBTI 1 μ M

Tanmateix, la caracterització molecular dels transportadors de nucleòsids va posar de manifest que les cèl·lules Caco-2 no només expressen els transportadors equilibratius hENT1 i hENT2, que serien responsables de les activitats detectades, sinó que a la vegada expressen les entitats concentratives hCNT1 i hCNT2 malgrat no arribin a ser funcionals (**figura 16**).

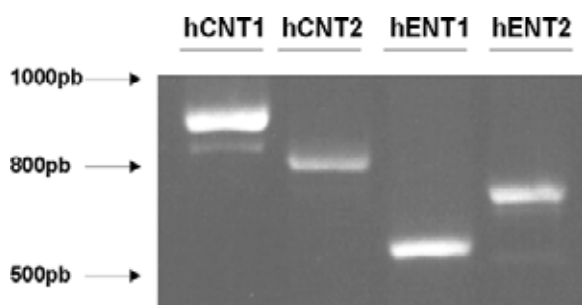


Figura 16: Caracterització de l'expressió del transportadors de nucleòsids en la línia cel·lular Caco-2. Es van analitzar els nivells de missatger de hCNT1, hCNT2, hENT1 i hENT2 en extractes de mRNA de cèl·lules Caco-2 crescudes durant 14 dies.

D'acord amb la caracterització cinètica i molecular dels dos models intestinals, es pot concloure que les cèl·lules IEC-6 presenten un sistema de transport concentratiu majoritari corresponent al transportador rCNT2 i dos sistemes de transport equilibratius que es corresponen a les entitats moleculars rENT1 i rENT2. En canvi les cèl·lules Caco-2, tot i expressar a nivell de missatger els transportadors concentratius hCNT1 i hCNT2, només presenten un transport de nucleòsids independent de sodi que es correspon a la funcions hENT1 i hENT2.

1.2 REGULACIÓ ENDOCRINA DELS TRANSPORTADORS DE NUCLEÒSIDS EN LA LÍNIA CEL·LULAR IEC-6.

Com ja s'ha comentat a la Introducció d'aquesta memòria, l'expressió dels transportadors de nucleòsids està determinada per l'estat de proliferació o diferenciació cel·lular (del Santo et al., 1998). Addicionalment, en el moment de la meua incorporació al grup es començaven a tenir evidències sobre la influència d'alguns factors mitogènics i factors antiproliferatius sobre l'expressió de les isoformes concentratives en cultius primaris d'hepatòcits i cèl·lules derivades d'hepatoma de rata. En aquest context, es va decidir ampliar aquest estudi a les cèl·lules epitelials intestinals IEC-6, de manera que es va fer una cerca d'efectors susceptibles de modular la proliferació i diferenciació de la mucosa intestinal.

L'elecció dels diferents efectors es va realitzar en base a la bibliografia existent, així es va analitzar l'efecte de l'EGF i el TGF- α com a factors mitogènics (Carpenter and Cohen, 1979; Koyama and Podolsky, 1989; Rokutan et al., 1994), de la dexametasona (Blake and Hennin, 1983; Quaroni et al., 1999) i del TGF- β (Kurokoma et al., 1987) com estímuls antiproliferatius i que indueixen la diferenciació cel·lular. Tal i com es descriu detalladament a l'apartat de Materials i Mètodes, l'acció dels diferents elements reguladors sobre l'expressió i l'activitat dels transportadors de nucleòsids s'ha monitoritzat mitjançant assaigs de transport i anàlisis d'expressió per PCR a temps real. Donat que no existien dades preliminars, inicialment es van realitzar incubacions a diferents temps (des de les 3 fins a les 24 hores) amb l'objectiu de definir els possibles efectes. Les concentracions usades per a cada efector es van escullir en base a la bibliografia consultada i a experiments previs realitzats en d'altres models cel·lulars en el nostre laboratori. La primera aproximació duta a terme va posar de manifest l'existència d'una regulació diferencial dels transportadors de nucleòsids segons el tipus d'estímul que reben les cèl·lules (**figura 17**). Així, els transportadors equilibratius estarien principalment modulats per agents mitogènics (**figura 17.B**), i en canvi els concentratius estarien sota control d'agents diferenciadors com els glucocorticoids (**figura 17.A**). D'altre banda, tot i que resultats obtinguts en el marc de la tesi doctoral de la Dra. Fernández-Veledo van posar de manifest que l'expressió i activitat de CNT2 està regulada per TGF- β en cèl·lules hepàtiques, en el cas de la línia cel·lular intestinal IEC-6 no sembla que aquest factor produeixi cap efecte sobre les activitats transportadores de nucleòsids (**figura 17**).

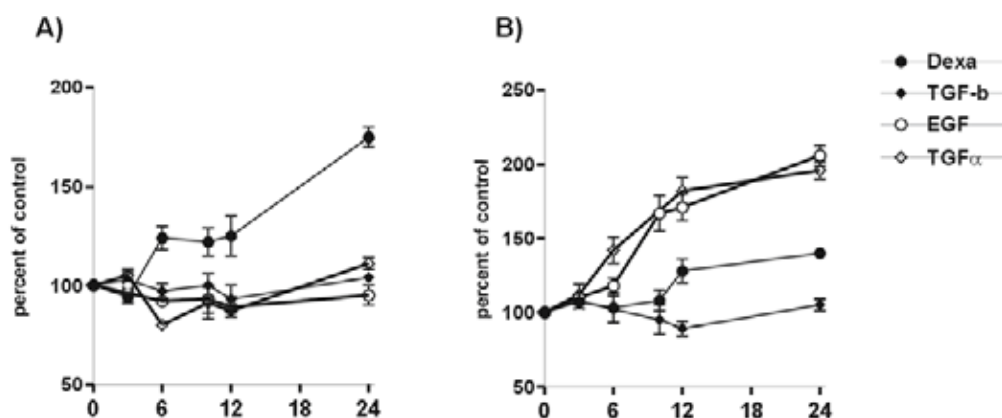


Figura 17: Regulació endocrina dels transportadors de nucleòsids concentratius i equilibratius en cèl·lules IEC-6. Es van tractar les cèl·lules IEC-6 amb diferents efectors: dexametasona (Dexa) 100 nM, TGF-β 1 ng/ml, EGF 20 ng/ml o TGF-α 10 ng/ml i als temps indicats es va analitzar la captació d'uridina en presència i absència de sodi. **A)** Transport concentratiu. **B)** Transport equilibratiu.

(a) Efecte de la inducció a la proliferació sobre el transport de nucleòsids.

En primer lloc, per tal de comprovar que l'EGF i el TGF-α induïen el creixement de les cèl·lules IEC-6, es va analitzar la incorporació de timidina tritiada després de 24 hores de l'addició dels dos factors. Com es pot observar a la **figura 18**, ambdós factors, efectivament promouen un increment de la proliferació cel·lular d'aproximadament dues vegades.

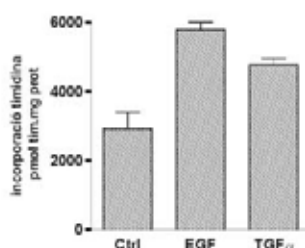


Figura 18: Efecte de l'EGF i el TGF-α sobre la proliferació i síntesi de DNA en cèl·lules IEC-6. Mesura de la incorporació de timidina tritiada en cèl·lules IEC-6 tractades durant 24 hores amb EGF 20 ng/ml o TGF-α 10 ng/ml.

En base als resultats preliminars que indicaven un efecte específic de l'EGF i el TGF-α sobre el transport independent de sodi (sense produir canvis significatius sobre el transport concentratiu), es va voler determinar quina o quines isoformes de transportadors equilibratius eren les responsables d'aquesta resposta. Així, es va realitzar un assaig de transport en absència o presència de NBTI (inhibidor específic d'ENT1) després d'un tractament de 10 hores amb els dos efectors. Paral·lelament, es

va analitzar l'efecte de la dosi d'EGF a fi de determinar la concentració de factor de creixement que produeix una resposta màxima. Els resultats obtinguts demostren que només ENT1 és responsable de l'increment del transport independent de sodi, mentre ENT2 es manté sense canvis (**figura 19.A**). Es tracta d'un efecte dependent de dosi, i sembla que concentracions elevades d'EGF, per sobre de les usades tot al llarg de l'estudi (10 ng/ml), provocarien alhora una lleugera inducció de la component insensible a NBTI (**figura 19.B**).

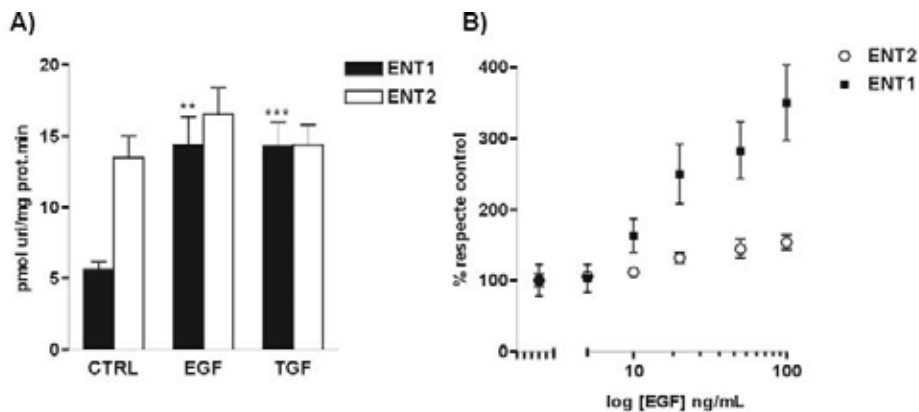


Figura 19: L'EGF i el TGF- α indueixen l'activitat del transportador equilibratiu ENT1 en cèl·lules IEC-6. (A) Es van tractar les cèl·lules IEC-6 amb EGF 20 ng/ml i TGF- α 10 ng/ml durant 10 hores i a continuació es va analitzar la captació independent de sodi d'uridina en presència i absència de NBTI. (B) Dosi-Resposta de l'efecte d'EGF sobre els transportadors equilibratius ENT1 i ENT2. Les anàlisis estadístiques es van realitzar mitjançant el test de la *t* de Student, essent ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ respecte el control.

L'anàlisi d'expressió d'aquests dos transportadors permet confirmar aquests resultats. Així, l'EGF i el TGF- α indueixen un increment dels nivells de missatger d'ENT1 (aproximadament 5 vegades per sobre l'expressió basal) sense produir alteracions significatives sobre l'expressió d'ENT2 (**figura 20**). Aquestes observacions semblarien indicar que l'augment de l'activitat d'ENT1 és conseqüència d'un increment de la síntesi de *nov*o del transportador.

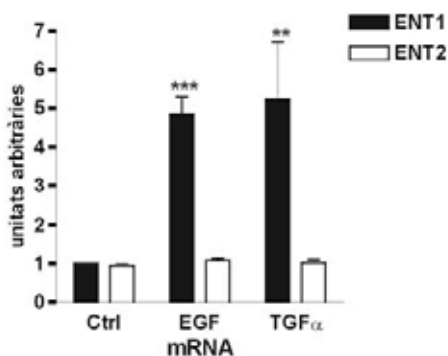


Figura 20: Efecte de l'EGF i el TGF- α sobre l'expressió dels transportador ENT1 i ENT2 en cèl·lules IEC-6. Es van analitzar els nivells de missatger d'ENT1 i d'ENT2 a partir de missatger de cèl·lules IEC-6 tractades amb EGF 20 ng/ml o TGF- α 10 ng/ml durant 6 h. Els resultats s'expressen en unitats arbitràries normalitzades als valors obtinguts en cèl·lules control. Significativitat estadística dels resultats mitjançant el mètode de la *t* de Student, essent ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ respecte el control.

En base a la bibliografia consultada, i tenint en compte que diversos autors han descrit que l'EGF i el TGF- α produeixen una activació de la via de les MAPK en epitelial intestinal i en concret en aquesta línia cel·lular (Dionne et al., 1998; Oliver et al., 1994; Göke et al., 1998), es va decidir caracteritzar la via de senyalització implicada en la regulació d'ENT1. D'una banda es van utilitzar inhibidors específics de la via de les MAPK com els compostos PD98059 (inhibidor selectiu de la fosforilació i activació de les proteïna quinases ERK) i SP600125 (inhibidor específic de JNK1/2/3) i en segon lloc es va analitzar l'estat de fosforilació de les proteïnes ERK1 i ERK2 després del tractament amb els dos factors proliferatius.

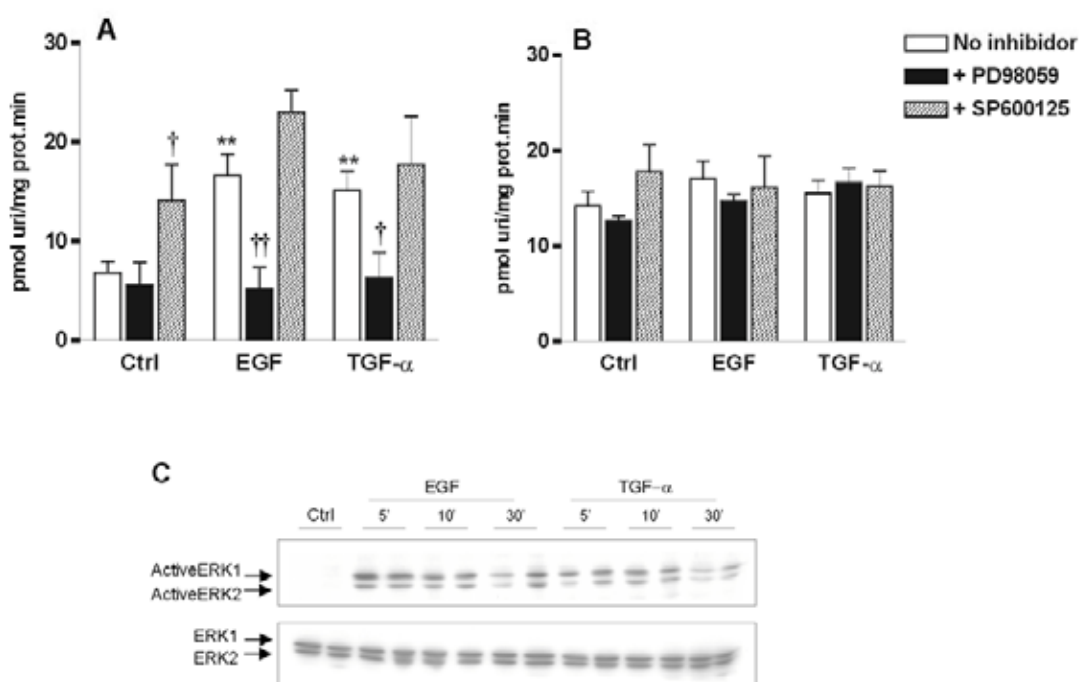


Figura 21: Efecte de la inhibició de les proteïna quinases ERK i JNK sobre la regulació d'ENT1 per EGF i TGF- α . Les cèl·lules es van incubar amb PD98059 10 μ M, inhibidor específic de ERK1/2 o SP600125 20 μ M, inhibidor específic de JNK1/2/3, durant 30 minuts i a continuació es van tractar amb EGF i TGF- α . 10 hores després de l'inici del tractament es va analitzar l'activitat dels transportadors de nucleòsids ENT1 (A) i ENT2 (B). Les anàlisis estadístiques es van realitzar mitjançant el test de la *t* de Student, essent ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ factor de creixement respecte el control; † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ inhibidor respecte no inhibidor. (C) En paral·lel es va analitzar l'efecte dels factors de creixement sobre la fosforilació de les proteïna quinases ERK1 ERK2.

Com es pot apreciar en el *Western Blot* (figura 21.C), la incubació amb EGF i TGF- α indueix un increment de les formes fosforilades i actives d'ERK1 i ERK2 de 5 a 10 min després del començament de l'estímul. Addicionalment, el pretractament amb l'inhibidor PD98059, que actua bloquejant l'activitat d'ERK1/2, resulta en la pèrdua de

la inducció de l'activitat d'ENT1 (**figura 21.A**). Aquests resultats suggereixen que les proteïna quinases ERK estan implicades en la regulació d'ENT1 en resposta a aquests factors de creixement. D'altra banda, la inhibició de les proteïna quinasa JNK, mitjançant l'inhibidor SP600125, produeix un increment significatiu de l'activitat basal d'aquest transportador, tot i que sembla mantenir-se l'estimulació en presència d'EGF i TGF- α (**figura 21.A**). Cal destacar que en cap cas s'observen canvis significatius de l'activitat mitjançada per ENT2 (**figura 21.B**).

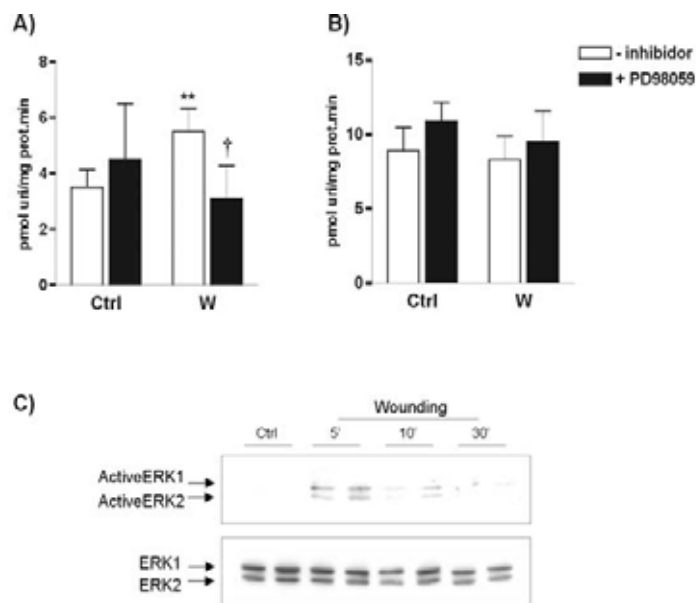


Figura 22: Efecte del dany cel·lular sobre el transport de nucleòsids en cèl·lules IEC-6.

Es van sembrar cèl·lules IEC-6 i es va realitzar una lesió de la monocapa confluent en cèl·lules control i cèl·lules pretractades amb l'inhibidor PD98059. 10 hores després d'haver produït el dany cel·lular es va analitzar la captació d'uridina mitjançada per ENT1 (**A**) i per ENT2 (**B**). En paral·lel es va analitzar l'efecte de la lesió de la monocapa sobre l'estat de fosforilació de les proteïna quinasa ERK1 i ERK2 entre 5 i 30 minuts després del començament de l'estímul (**C**). Les anàlisis estadístiques s'han dut a terme mitjançant el test de la *t* de Student, essent * $p < 0.05$ respecte control; † $p < 0.05$ inhibidor respecte no inhibidor.

Els efectes produïts pels factors mitogènics sobre ENT1 es van reproduir en un model *in vitro* de dany epitelial. Així, quan es produeix una lesió de la monocapa de cèl·lules IEC-6 incrementa l'expressió i activitat d'ENT1 (**figura 22.A**), sense que es produeixin canvis de la funció ENT2 (**figura 22.B**). De la mateixa manera que en el cas dels factors de creixement, aquests efectes semblen estar mitjançats per les proteïnes quinasa ERK1/2, produint-se un ràpid increment de l'estat de fosforilació d'aquestes proteïnes (**figura 22.C**) i un bloqueig de la inducció de l'activitat d'ENT1 en presència de l'inhibidor específic PD98059 (**figura 22.A**).

	sense inhibidor	PD98059	SP600125
Control	0.97 ± 0.02	0.56 ± 0.06 ^{††}	4.21 ± 0.26 ^{†††}
EGF	5.01 ± 0.31 ^{***}	1.72 ± 0.14 ^{**,††}	8.40 ± 0.96 [*]
TGF- α	4.46 ± 0.63 ^{**}	1.59 ± 0.19 ^{**,†}	9.29 ± 0.88 ^{**,††}
Wounding	1.52 ± 0.1 [*]	0.44 ± 0.03 ^{††}	

Taula 5: Efecte de la inhibició de les proteïna quinases ERK1/2 i JNK1/2/3 sobre l'increment dels nivells de missatger d'ENT1 en resposta als factors de creixement EGF i TGF- α i al dany cel·lular en cèl·lules IEC-6. Els resultats s'expressen en unitats arbitràries, normalitzades als valors obtinguts en cèl·lules no tractades (control) en absència d'inhibidor. La significativitat estadística s'ha realitzat per el mètode de la t de Student, essent * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ respecte control; † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, ††† $p < 0.001$ inhibidor respecte no inhibidor.

L'anàlisi de l'acció dels inhibidors de les proteïnes quinasa ERK i JNK sobre els nivells de missatger d'ENT1 en cèl·lules control i en cèl·lules tractades amb factors de creixement va posar de manifest, que contràriament al que s'esperava, l'efecte de l'EGF i del TGF- α sobre l'activitat transcripcional d'aquest transportador no està mitjançat per la via de senyalització d'ERK. Així, com es mostra a la **taula 5**, el tractament amb PD98059 produeix una disminució significativa dels nivells basals de mRNA d'ENT1, però el percentatge d'increment produït pels dos factors es manté. Tanmateix, la resposta del missatger d'ENT1 és diferent en el model de dany epitelial. Així, quan es produeix una lesió sobre la monocapa de cèl·lules, la inhibició d'ERK bloqueja completament l'increment d'expressió d'ENT1 associat. Addicionalment, es va analitzar la possible implicació de les proteïna quinases JNK com una via alternativa per la qual l'EGF i el TGF- α modularien l'expressió d'ENT1. Com es pot apreciar, en presència de l'inhibidor específic de JNK1/2/3, es continua produint l'increment d'expressió d'ENT1 en resposta als dos factors i addicionalment s'indueix l'expressió del transportador en condicions basals, fet que concorda amb els assaigs funcionals. Aquests resultats podrien suggerir un paper de les proteïna quinases JNK en el control de l'expressió basal d'ENT1. A fi d'intentar explicar l'augment dels nivells de missatger d'aquest transportador, es va provar tota una

bateria d'inhibidors específics de possibles vies de senyalització com la via de la PI3K, la PKC, la PKA, la Tor quinasa i p38, tanmateix no es va aconseguir identificar el mitjancer de l'efecte de l'EGF i el TGF- α sobre l'expressió d'ENT1.

(b) Efecte del tractament amb dexametasona sobre el transport de nucleòsids en cèl·lules IEC-6.

Tenint en compte que segons resultats preliminars, la dexametasona promou canvis sobre el transport de nucleòsids concentratiu, es va determinar el seu efecte sobre l'expressió dels transportadors concentratius presents en la línia cel·lular IEC-6. Així, es van monitoritzar els nivells de missatger CNT1 i CNT2 al llarg del temps després del tractament de les cèl·lules amb dexametasona mitjançant PCR a temps real. Com es pot apreciar a la **figura 23**, 6 hores després d'afegir dexametasona al medi de cultiu de les cèl·lules incrementen els nivells de mRNA dels dos transportadors concentratius i progressivament va disminuint aquesta inducció, tot i mantenir-se a nivells força superiors als basals al cap de 72 h, principalment en el cas de CNT2. D'acord amb aquests resultats, també s'observa un increment de l'expressió de CNT2 quan s'analitzen els nivells de proteïna per *Western Blot* després de 24 hores de tractament (**figura 23.C**).

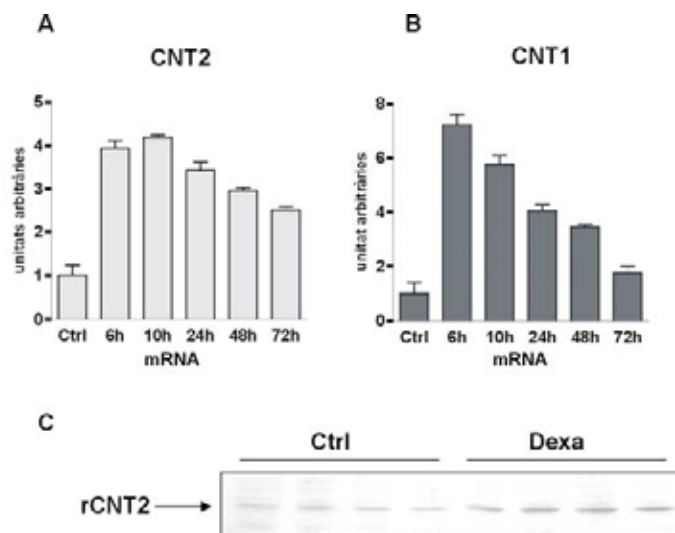


Figura 23: La dexametasona produeix un increment de l'expressió dels transportadors concentratius CNT1 i CNT2 en la línia cel·lular IEC-6. Es van tractar cèl·lules IEC-6 amb dexametasona 100 nM i es va analitzar els nivells de missatger de rCNT2 (**A**) i rCNT1 (**B**) a diferents temps mitjançant PCR a temps real. (**C**) Es van determinar els nivells de proteïna de CNT2 mitjançant anàlisi de *Western Blot* a partir d'extractes totals de proteïna de cèl·lules IEC-6 tractades amb dexametasona 100 nM durant 24 hores.

En base a aquests resultats, es va mesurar d'una banda el transport de guanosina (**figura 24.A**), per tal determinar la funció CNT2, i d'altre banda el transport de citidina (**figura 24.B**), que permet valorar la taxa de transport mitjançat per CNT1. Com es pot observar, la dexametasona indueix tant el transport de guanosina com de citidina. Tanmateix, el transport mitjançat per CNT2 en valors absoluts representa més del 80% de la capacitat de transport total en aquestes cèl·lules i, malgrat la inducció de CNT1, la seva activitat es manté en nivells pràcticament indetectables (essent inferior al 2% de l'activitat observada per CNT2). Addicionalment, la dexametasona produeix un augment significatiu del transport equilibratiu, aproximadament en la mateixa proporció que en cas de CNT2, tot i que els valors absoluts de transport són molt inferiors (**figura 24.B**).

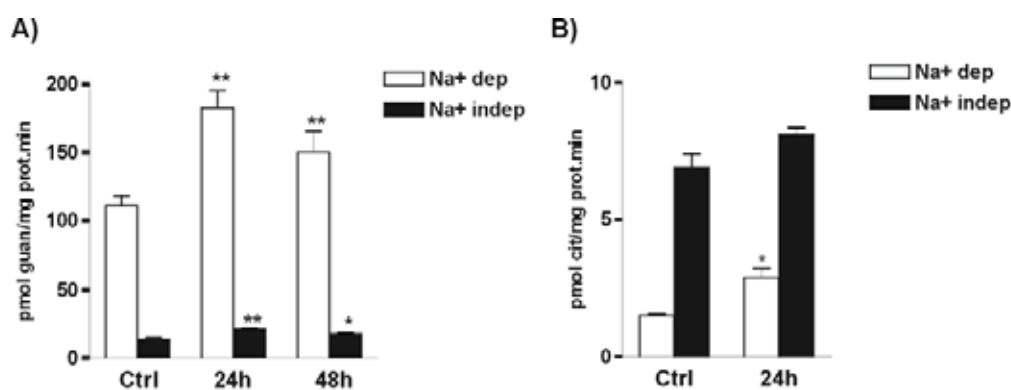


Figura 24: Efecte del tractament amb dexametasona sobre el transport de nucleòsids en cèl·lules IEC-6. Es va mesura la captació de guanosina (**A**) i citidina (**B**) en presència i absència de sodi en cèl·lules tractades amb dexametasona 100 nM durant 24 h i 48 h. Les anàlisis estadístiques es van realitzar mitjançant el mètode de la *t* de Student, essent * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ respecte el control.

Aquest conjunt de resultats posen de manifest la presència d'una regulació diferencial de les diferents isoformes de transportadors. De manera que estímuls proliferatius actuen de manera específica sobre el transportador equilibratiu ENT1, i en canvi les activitats concentratives responen a la presència de factors que afavoreixen la diferenciació cel·lular com és el cas dels glucocorticoids.

1.3 ESTUDI DEL FLUX TRANSEPITELIAL DE NUCLEÒSIDS EN UN MODEL D'EXPRESSIONI ESTABLE DEL TRANSPORTADOR CONCENTRATIU CNT1.

Com s'ha demostrat en el primer punt d'aquest apartat, les cèl·lules Caco-2 expressen els transportadors equilibratius ENT1 i ENT2 i els concentratius CNT1 i CNT2, tanmateix, no s'arriba a detectar activitat de transport concentrativa en aquesta línia cel·lular. Amb l'objectiu de dur a terme estudis de captació i flux vectorial de nucleòsids naturals, així com de fàrmacs derivats de nucleòsids es va generar un clon que expressa de manera estable el transportador concentratiu humà hCNT1. Cal comentar, que no es va poder utilitzar la línia cel·lular IEC-6 per dur a terme aquests estudis ja que no es va aconseguir obtenir una monocapa de cèl·lules correctament polaritzada en plaques de *transwell*.

Mitjançant diferents tècniques es va realitzar la caracterització del clon Caco-2-hCNT1 a fi de comprovar la correcta expressió i activitat del transportador. Així, per PCR a temps real es van comparar els nivells de missatger de CNT1 del clon estable respecte als de les cèl·lules no transfectades (WT) i a un clon control que expressa de manera estable el vector emprat per tal d'introduir el transportador, en aquest cas el vector d'expressió en cèl·lules de mamífer pcDNA₃ (PC) (**figura 25.A**). L'anàlisi es va dur a terme a dos fases diferents dels cultius cel·lulars: 7 dies després de la sembra, moment en el qual el cultiu està subconfluent i 14 dies després de la sembra, és a dir quan les cèl·lules ja fa dies que han arribat a confluència i han començat el procés de diferenciació. Com es pot observar, el clon estable Caco-2-hCNT1 presenta uns nivells de missatger de CNT1 molt superiors (aproximadament 35 vegades més) als de les cèl·lules control (WT i PC). Tanmateix, quan s'analitzen els nivells de proteïna els resultats no són tant clars; s'observa un cert increment de la proteïna CNT1 però només d'un 50-100% respecte les cèl·lules WT (**figura 25.C**). Addicionalment, els resultats obtinguts indiquen que l'expressió de CNT1 incrementa amb l'estat de diferenciació cel·lular. Així, es pot apreciar que els nivells de missatger de CNT1 de les cèl·lules crescudes durant 14 dies són aproximadament 5 vegades superiors als dels cultius subconfluents (7 dies), tant en cèl·lules control (WT i PC) com en el clon hCNT1 (**figura 25.A**). Aquestes observacions són consistents amb els resultats obtinguts en la majoria de tipus cel·lulars caracteritzats en el nostre laboratori. Finalment, els assaigs funcionals realitzats en paral·lel (14 dies després de la sembra) posen de manifest que aquest increment de l'expressió de CNT1 resulta en l'aparició de la seva activitat. D'aquesta manera, es pot observar la presència de transport sodi-

dependent d'uridina i citidina però no de guanosina, que en aquest cas serviria de control de l'especificitat de la funció CNT1 (**figura 25.B**).

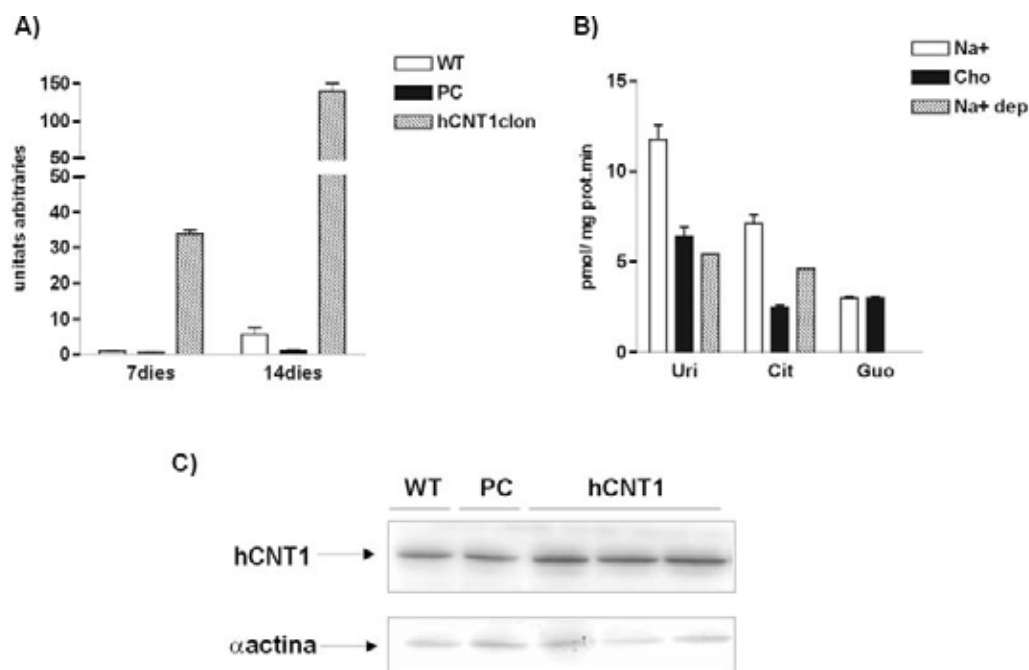


Figura 25: Caracterització de l'expressió i activitat dels transportadors de nucleòsids en cèl·lules Caco-2 i en els clon estables Caco-2-pcDNA3 i Caco-2-hCNT1. (A) Anàlisi dels nivells de missatger de CNT1 a dues fases de creixement diferents dels cultius cel·lulars: 7 i 14 dies després de la sembra. (B) Anàlisi dels nivells de proteïna de CNT1 per Western Blot en extractes cel·lulars obtinguts 14 dies després de la sembra de cèl·lules. S'ha utilitzat la α -actina com a control de càrrega. (C) Mesura de la captació d'uridina 1 μ M, de citidina 1 μ M i de guanosina 1 μ M en absència i presència de Na⁺ 14 dies després de la sembra.

A continuació, una vegada posat a punt el model cel·lular de treball, es van començar els estudis en plaques de *transwell* a fi d'obtenir una monocapa ben polaritzada i poder dur a terme mesures de flux transepitelial de nucleòsids naturals i de derivats de nucleòsids. La captació apical i basolateral d'uridina (**figura 26**) posa de manifest que l'activitat CNT1 es detecta exclusivament a la membrana apical de les cèl·lules, on representa aproximadament el 25-30% de la captació total.

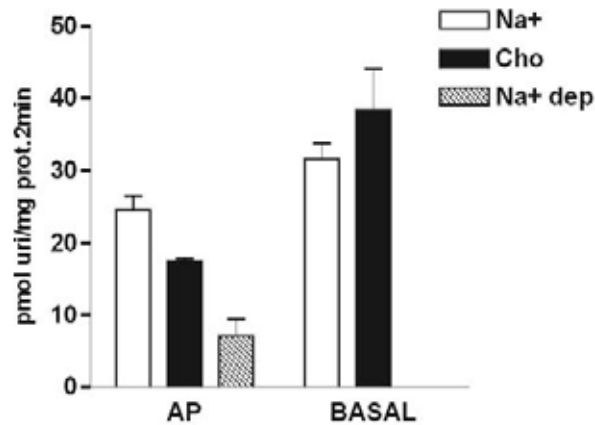


Figura 26: Localització del transportador CNT1 en el clon estable Caco-2-hCNT1.

Les cèl·lules Caco-2-hCNT1 es van fer créixer sobre filtres permeables $0.4\mu\text{m}$ i a dia 21 després de la sembra es va mesurar el transport d'uridina apical (AP) i basolateral (BASAL) en presència i absència de sodi.

Així, després d'haver comprovat la correcta inserció del transportador a la membrana apical de les cèl·lules es van realitzar els assaigs de flux vectorial. Per tal de determinar el flux a través de la monocapa de cèl·lules i a la vegada l'acumulació intracel·lular dels nucleòsids, com s'ha explicat en l'apartat de Materials i Mètodes, es van recollir alíquotes del compartiment contrari al qual s'havia afegit el medi amb el substrat radioactiu ($[^3\text{H}]$ -uridina) a diferents temps (1, 2, 3.5, 5, i 20 minuts) i una vegada finalitzat l'assaig es van lisar les cèl·lules per tal de determinar la radioactivitat intracel·lular. Com es mostra a la **figura 27**, en els tres models cel·lulars les taxes de flux vectorial des del compartiment apical al basolateral (Fa-b) i el contrari, és a dir des del compartiment basolateral a l'apical (Fb-a), són similars. Tanmateix, mentre el Fa-b es manté linial durant els 20 minuts d'assaig (**figura 27.A**), el Fb-a comença a saturar-se a partir dels 10 minuts (**figura 27.B**). En el cas del clon estable, es pot apreciar la presència d'una component de transport dependent de sodi corresponent a l'activitat CNT1. Aquesta fracció concentrativa bàsicament es detecta quan es mesura el flux apical, i representa aproximadament un 20% del flux total (**figura 27.A**). La petita fracció de flux basolateral (Fb-a) sodi-dependent present no es considera significativa ja que a partir dels 5 minuts de captació esdevé pràcticament nul·la (**figura 27.B**).

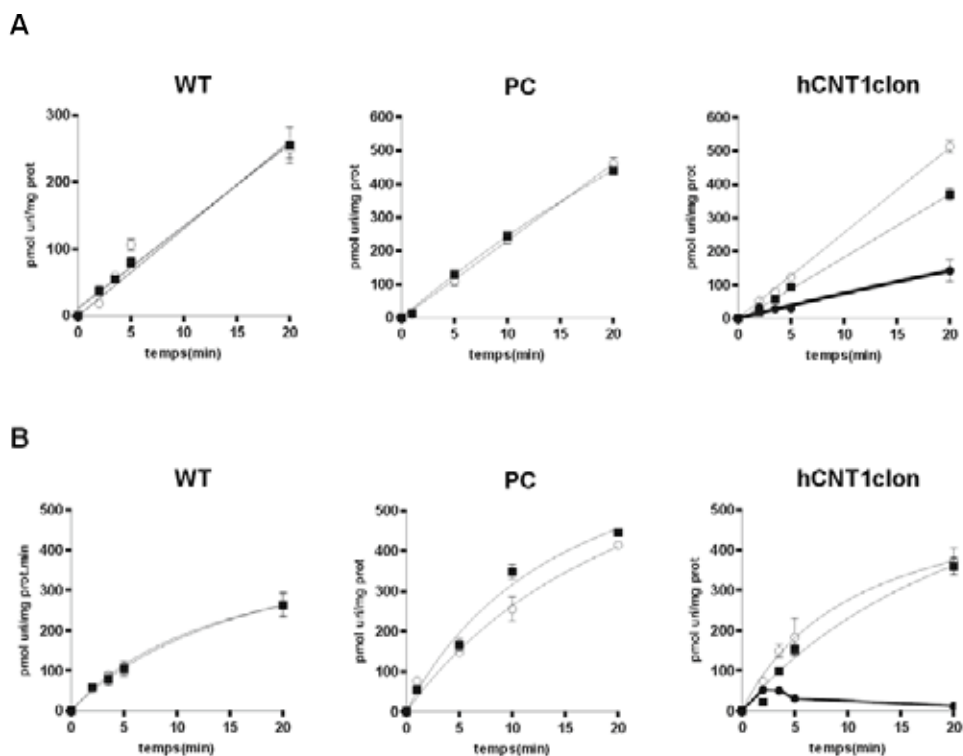


Figura 27: Flux vectorial d'uridina en cèl·lules Caco-2 i en els clons estables Caco-2-pcDNA3 i Caco-2-hCNT1. Es van fer créixer les cèl·lules en plaques de transwell durant 21 dies i es va determinar el flux d'uridina al llarg del temps des de la cambra apical a la basolateral (A) i des del compartiment basolateral a l'apical (B) en presència (■) i absència de sodi (○). Mitjançant la substracció d'ambdós fluxes es va obtenir la component dependent de sodi (●).

D'altra banda, el recompte d'uridina-[H³] present a l'interior cel·lular una vegada finalitzat el transport (20 min) indica que l'acumulació intracel·lular és superior quan s'afegeix el substrat al compartiment basolateral tant en les cèl·lules control (WT i PC) com en el clon hCNT1 (**figura 28**). Addicionalment, el clon Caco-2-hCNT1 presenta una acumulació apical superior degut a la presència del transportador concentratiu que és responsable aproximadament del 40% de l'acumulació apical (**figura 28.A**). El conjunt d'observacions indiquen que a les cèl·lules Caco-2-hCNT1 el 25-30% del transport d'uridina a la membrana apical està mitjançat per CNT1, una vegada a l'interior cel·lular el 25% de la uridina s'acumula i la resta surt de la cèl·lula via ENTs o altres transportadors.

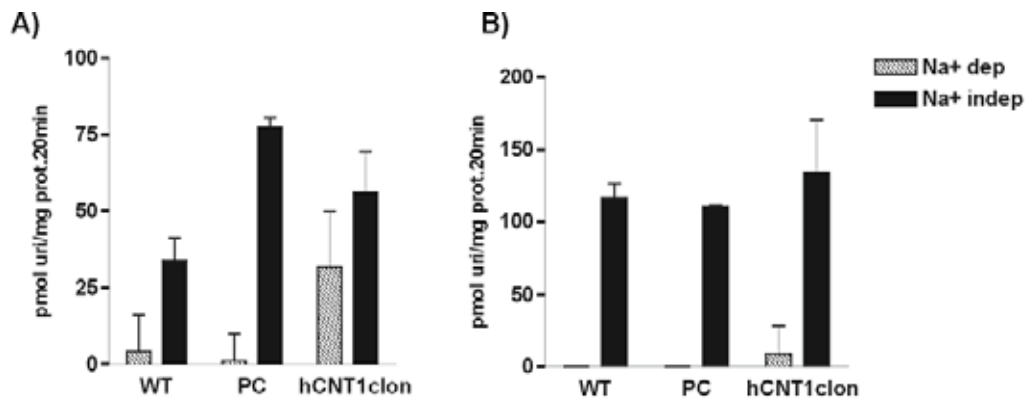


Figura 28: Acumulació intracel·lular d'uridina en cèl·lules Caco-2 i en els clons estables Caco-2-pcDNA3 i Caco-2-hCNT1. Els diferents models cel·lulars es van fer créixer sobre filtres permeables i una vegada comprovat el correcte estat de polarització es va afegir uridina tritiada a la cambra apical (A) o basolateral (B) en absència i presència de sodi. Després de 20 minuts d'incubació es van lisar les cèl·lules i es va determinar l'acumulació intracel·lular del substrat.

Finalment, es va decidir analitzar el flux transepitelial de gemcitabina, un fàrmac derivat de nucleòsids habitualment usat en el tractament de tumors sòlids. Aquesta fluoropirimidina és substrat dels transportadors concentratius CNT1, CNT3 i dels equilibratius ENT1 i ENT2. (Pastor-Anglada et al., 2004). Com en el cas del transport d'uridina, el flux transepitelial apical de gemcitabina mitjançat per CNT1 representa un 25% del flux total (**figura 29.A**). Addicionalment, les mesures d'acumulació indiquen que, en aquest cas, tota la gemcitabina que entra via CNT1 surt a través de la membrana basolateral, de manera que l'acumulació intracel·lular sodi-dependent és nul·la (**figura 29.B**).

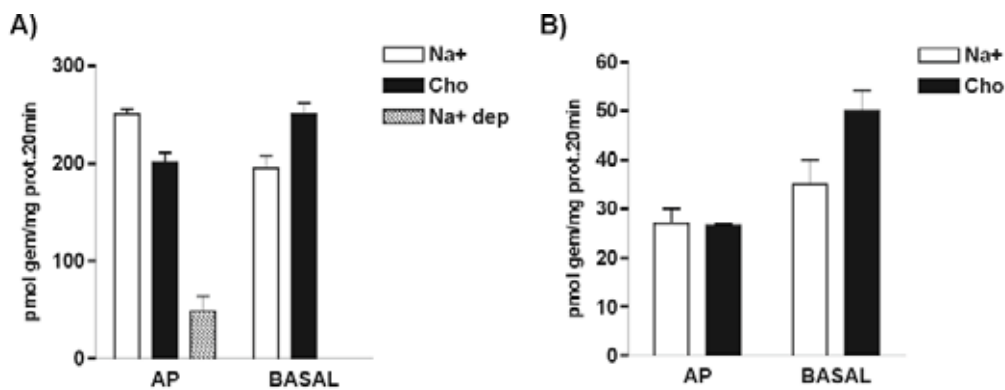


Figura 29: Flux transepitelial i acumulació intracel·lular de gemcitabina en cèl·lules Caco-2-hCNT1. Es va incubar les cèl·lules polaritzades Caco-2-hCNT1 amb gemcitabina durant 20 minuts i es va analitzar el flux vectorial apical i basolateral (A) i l'acumulació intracel·lular del fàrmac (B).

En aquest estudi s'ha dut a terme la caracterització de l'expressió dels transportadors de nucleòsids en dues línies cel·lulars intestinals, la línia cel·lular IEC-6, derivada de cèl·lules epitelials d'intestí prim de rata, i les cèl·lules Caco-2, que deriven d'un adenocarcinoma de colon humà. L'anàlisi del patró d'expressió dels transportadors de nucleòsids en la línia cel·lular IEC-6 que havia estat parcialment caracteritzada per Jakobs i col·laboradors (1990), ha permès confirmar l'existència d'una activitat concentrativa preferent per a purines que es correspon a la proteïna transportadora CNT2 i dues activitats equilibratives consistents amb l'expressió d'ENT1 i d'ENT2. Tot i que es detecta certa expressió del missatger i de la proteïna del transportador CNT1, la seva activitat és difícil de mesurar i no és significativa si es compara amb la funció CNT2. Així, les cèl·lules IEC-6 coexpressen diferents isoformes de transportadors concentratius i equilibratius com ha estat descrit en diferents models *in vivo* (Vijayalaskhmi and Belt, 1988; Chandrasena et al., 1997; Patil and Unadkat, 1997; Scharrer et al., 2002) i de la mateixa manera que la majoria de tipus cel·lulars tant cèl·lules d'origen epitelial com els hepatòcits (Mercader et al., 1996) o d'origen diferent com els limfòcits B (Soler et al., 1998) i els macròfags (Soler et al., 2001).

Adicionalment, aquests transportadors no són exclusius de cèl·lules normals sinó que també s'expressen en cèl·lules tumorals, com és el cas de les línies cel·lulars derivades d'hepatoma de rata HepG2 i FAO (del Santo et al., 1998) i de les cèl·lules Caco-2 que, com s'ha demostrat, expressen els transportadors equilibratius ENT1 i ENT2 i els concentratius CNT1 i CNT2. No obstant, pel que respecte l'activitat de transport existeixen diferències clares entre la línia cel·lular IEC-6, derivada d'un epíteli intestinal normal, i la línia cel·lular Caco-2, derivada d'un adenocarcinoma de colon. Així, les cèl·lules IEC-6 presenten una elevada activitat concentrativa, representant més del 80% de l'activitat total de transport de nucleòsids, i en canvi les cèl·lules Caco-2 internalitzen els nucleòsids exclusivament via els transportadors equilibratius. Fins i tot quan es creixen sobre filtres permeables de policarbonat, condicions en les que es diferencien i polaritzen espontàniament, les úniques activitats de transport detectables són ENT1, situat exclusivament a la membrana basolateral, i ENT2 que es localitza a les dues membranes de les cèl·lules .

Aquesta pèrdua del transport dependent de sodi en cèl·lules Caco-2 és consistent amb resultats obtinguts a partir d'estudis comparatius entre cèl·lules parenquimals hepàtiques i cèl·lules derivades d'hepatoma, en els que s'ha posat de manifest una relació entre l'expressió de les isoformes concentratives i el nivell de

diferenciació i transformació cel·lular. Així, tot i que tant els hepatòcits com les cèl·lules FAO presenten els mateixos transportadors, si es relativitza la contribució de cadascun d'ells en la captació de nucleòsids, els resultats són molt diferents. Malgrat que la línia derivada d'hepatoma presenta una taxa total de transport d'uridina molt més elevada que els hepatòcits, la contribució de l'activitat sodi-dependent és molt superior en aquests darrers, representant aproximadament el 70% del transport total. En canvi, a la línia cel·lular FAO, la captació d'uridina dependent de sodi tant sols correspon al 15-20%, valors molt semblants als obtinguts amb hepatòcits fetals (del Santo et al., 1998). Per tant, les cèl·lules tumorals tenen tendència a perdre l'expressió de les isoformes concentratives i a enriquir-se amb les isoformes equilibratives, i el transportador CNT1 sembla ser el més susceptible a aquesta regulació (Dragan et al., 2000). Recentment, mitjançant una anàlisi de l'expressió dels transportadors de nucleòsids en càncers ginecològics, s'ha establert una pèrdua de l'expressió de la proteïna CNT1 en aquests tumors, de manera que no es detecta l'expressió d'aquest transportador en aproximadament un 40% dels tumors d'ovari i de cèrvix uterí analitzats, mentre l'expressió dels ENT és manté més generalitzada. Addicionalment, la pèrdua de CNT1 està significativament associada a histotips concrets relacionats amb una pitjor prognosi, que en el cas dels tumors d'úter són majoritàriament adenocarcinomes. (Farré et al., 2004).

En efecte, com s'ha comentat a la Introducció d'aquesta memòria, l'expressió dels CNT i dels ENT, no només està determinada per l'estat de transformació, sinó també en certa mesura per la diferenciació cel·lular. Aquest fet podria permetre explicar la baixa expressió i pràcticament indetectable activitat de CNT1 en les cèl·lules IEC-6. Aquesta línia cel·lular, tot i no ser transformada i presentar determinades característiques morfològiques i funcionals de l'epiteli absortiu intestinal, no és del tot diferenciada. De la mateixa manera que ha perdut l'expressió de la majoria dels enzims digestius típics d'un enteròcit diferenciat com la lactasa, la maltasa i la fosfatasa alcalina (Quaroni et al., 1999), pot haver perdut en gran part l'expressió del transportador rCNT1.

Tanmateix, s'ha de tenir en compte una altra diferència entre les dues línies cel·lulars que podria explicar les diferències existents entre les taxes totals de transport. Les cèl·lules IEC-6, com que provenen del teixit no transformat, de la mateixa manera que els enteròcits nadius no expressa determinats enzims necessaris per a dur a terme la síntesi de *novò* de nucleòsids. Al contrari, les cèl·lules Caco-2,

com la majoria de línies cel·lulars provinents de tumors, presenten una sobreexpressió de molts dels enzims de la via de *novo*, així com de la via de *salvage* (Weber, 1983). Aquestes evidències suggereixen que les cèl·lules IEC-6 possiblement són molt més dependents de l'aport extern de nucleòsids, presentant d'aquesta manera una capacitat de transport molt més elevada. També cal comentar que estudis realitzats per He i col·laboradors l'any 1994 no mostraven diferències significatives entre les taxes totals de transport dels dos models cel·lulars. No obstant, cal tenir en compte que les condicions de transport que van usar eren molt diferents de les nostres, ja que utilitzaven una concentració de substrat de 30 μ M i realitzaven mesures de captació entre 20 minuts i una hora després de la seva addició (Sanderson et al., 1994).

L'adquisició de les propietats digestives i absortives intestinals està íntimament lligada al grau de diferenciació de manera que les cèl·lules immadures de la cripta expressen poques característiques enterocítiques, com per exemple l'activitat sacarasa-isomaltasa o fins i tot no presenten una membrana de vora en raspall ben organitzada a nivell de la superfície luminal (Quaroni et al., 1979; Isselbacher, 1974). Totes aquestes funcions es van adquirint durant la migració de les cèl·lules al llarg de l'axis cripta-vil·lus. Les cèl·lules IEC-6 deriven de cèl·lules de la cripta i en conseqüència presenten moltes de les característiques típiques dels enteròcits immadurs (Quaroni et al., 1979). Uns dels agents més ben caracteritzats que afavoreixen la diferenciació de la mucosa intestinal són els glucocorticoids, que actuen tant directament com mitjançant l'estimulació de les interaccions cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-matriu (Blake and Henning, 1983). Aquests agents exerceixen efectes crucials durant el desenvolupament de la mucosa gastrointestinal, influenciant una varietat de teixits i modulant activitats cel·lulars que inclouen l'aparició d'enzims digestius, l'absorció d'immunoglobulines, l'expressió de receptors de gastrina així com l'activat de diferents transportadors de membrana (Doell et al., 1965; Iannoli et al., 1998a; Shepherd et al., 2003). Les cèl·lules IEC-6 també responen als glucocorticoids produint-se una aturada del cicle cel·lular i a la vegada promovent-se canvis ultraestructurals (Quaroni et al., 1999). Tanmateix, no s'indueixen les activitats enzimàtiques típiques de la membrana de vora en raspall, fet possiblement degut a la impossibilitat d'establir contactes amb la làmina basal o amb cèl·lules mesenquimals. En efecte, només s'ha pogut observar una lleugera expressió de les activitats enzimàtiques sacarasa i fosfatasa alcalina quan es fan créixer les cèl·lules sobre una matriu extracel·lular (Matrigel) (He et al., 1993). Malgrat que els glucocorticoids no produeixen l'aparició d'un transport de glucosa dependent de sodi en les cèl·lules IEC-

6 (Inui et al., 1980), sí que modulen els transportadors presents induint la seva expressió (Iannoli et al., 1998a). En acord amb aquest darrer treball, el nostre estudi ha posat de manifest l'efecte inductor de la dexametasona sobre els transportadors de nucleòsids. En aquest sentit, s'ha demostrat que el tractament amb dexametasona produeix un increment de l'expressió i activitat dels transportadors concentratius CNT2 i CNT1, tot i que en el cas de CNT1 l'activitat es manté en nivells pràcticament indetectables. Aquesta resposta de CNT2 és consistent amb resultats obtinguts en el nostre grup de recerca usant com a model d'estudi els hepatòcits fetals. En efecte, la combinació de la dexametasona i de l'hormona tiroidea T_3 , dos agents crítics per a la diferenciació hepatocitària, promou una inducció de la captació d'uridina que es correlaciona amb un augment de l'expressió de CNT2, tant del mRNA com de la proteïna (del Santo et al., 2001). Tanmateix, la baixa activitat de CNT1 tot i l'increment que s'observa de la seva expressió després del tractament amb dexametasona podria explicar-se per una dificultat alhora de la inserció correcta de les molècules de transportador a nivell de la membrana plasmàtica. Precisament, es tenen evidències de la complexitat del tràfic intracel·lular d'aquest transportador que s'ha localitzat majoritàriament en estructures intracel·lulars en models hepàtics (Duflot et al., 2002). També cal destacar que la dexametasona produeix a la vegada un increment del transport equilibratiu. Aquests resultats estan en concordança amb el paper dels glucocorticoides en la regulació de determinades característiques pròpies dels enteròcits madurs i de la seva funció absorbiva. En aquest cas, la inducció de les activitats concentratives permetria un increment de la captació de nucleòsids de la dieta i possiblement el fet que a la vegada s'indueixi el transport equilibratiu és consistent amb l'existència d'un flux transepitelial dels nucleòsids absorbits, permetent la seva sortida cap a la circulació.

Una resposta molt diferent s'observa després del tractament amb EGF (*epidermal growth factor*) i TGF- α (*transforming growth factor*), dos dels agents proliferatius més potents per a les cèl·lules intestinals *in vivo* (Koyama and Podolsky, 1989; Hirano et al., 1995; Dignass et al., 1996) i *in vitro* (Rokutan et al., 1994; Dionne et al., 1998). L'addició d'EGF o TGF- α al medi de cultiu de les cèl·lules IEC-6 produeix un increment dels nivells de missatger i de l'activitat del transportador equilibratiu ENT1 d'aproximadament dues vegades, sense produir-se canvis dels transportadors concentratius. Aquest estudi corrobora resultats obtinguts en el nostre grup de recerca en macròfags on es va demostrar el paper d'aquest transportador com a principal proveïdor de nucleòsids a fi de mantenir la proliferació cel·lular. Així, es va demostrar

que la inhibició d'ENT1 mitjançant l'anàleg d'adenosina NBTI produïa una aturada del creixement de la cèl·lules (Soler et al., 2001).

La proliferació de les cèl·lules epitelials intestinals pot ésser induïda mitjançant un dany de la mucosa (Feil et al., 1987; Lacy et al., 1988). Molts factors de creixement i citoquines són responsables de mitjançar aquesta resposta proliferativa davant d'una lesió de la mucosa, com el TGF- α , el TGF- β , l'EGF, l'HGF (*hepatocyte growth factor*), el FGF (*fibroblast growth factor*) i la IL-1 β (Dignass and Podolsky, 1993; Dignass et al., 1996). D'entre aquests factors, el TGF- α i el TGF- β s'expressen a les cèl·lules epitelials intestinals. La proliferació induïda per TGF- α sembla estar regulada de manera autocrina, és a dir que, inicialment s'automanté però la seva producció s'inhibeix en presència de TGF- β , que produeix la senyal de detenció del creixement (Suemori et al., 1991). En el model de cèl·lules IEC-6, la lesió de la monocapa resulta en un increment específic de l'activitat ENT1 sense alterar el transport concentratiu. Així, ambdós estímuls proliferatius, és a dir el dany cel·lular i els factors de creixement, indueixen el transportador equilibratiu ENT1 situat a la membrana basolateral de les cèl·lules intestinals polaritzades, com s'ha vist en el cas de les cèl·lules Caco-2 i s'ha descrit en les cèl·lules renals (Lai et al., 2002; Mangravite et al., 2003b), suposadament per assegurar el suministrament de nucleòsids des de la sang. En aquest context, s'ha demostrat que el suplement de la nutrició parental amb nucleòsids i nucleòtids afavoreix l'atrofia de la mucosa induïda (Isawa et al., 2000).

Tant els factors de creixement com una lesió de la monocapa cel·lular estimulen la cascada de les MAPK (*Mitogènic-Activated Protein Kinase*) en la línia cel·lular IEC-6 (Dionne et al., 1998; Oliver et al., 1994; Göke et al., 1998). En el nostre model, els dos tipus d'estímuls indueixen la fosforilació de les proteïna quinases ERK1 i ERK2 i, com s'esperaria, el bloqueig de l'activitat d'aquestes proteïna quinases resulta en la pèrdua de l'efecte sobre el missatger i l'activitat d'ENT1 induït per una lesió a la monocapa de cèl·lules. Tanmateix, no succeeix el mateix amb el tractament d'EGF i TGF- α . En aquest cas, la inhibició de l'activitat de les proteïna quinases ERK només produeix una disminució de l'activitat ENT1 sense que es bloquegi l'efecte que produeixen els dos factors sobre l'expressió del transportador. Així, mentre l'increment de l'activitat d'ENT1 induïda per dany cel·lular pot explicar-se per un augment de la taxa de transcripció del seu gen mitjançada per la via de senyalització d'ERK, els efectes produïts per EGF i TGF- α no poden explicar-se exclusivament per aquesta via de senyalització sinó que hi hauria implicada una via de transducció de senyals

diferent. Addicionalment els resultats obtinguts han demostrat que aquesta via de senyalització alternativa tampoc implicaria les proteïna quinases JNK, ja que la seva inhibició no té cap efecte sobre la inducció de l'expressió d'ENT1 en resposta als dos factors. Malauradament, tot i haver provat inhibidors d'altres possibles vies de transducció de senyals com PI3K, PKC, PKA, Tor quinasa i p38, no s'ha aconseguit identificar el mitjancer del senyal produït per aquests dos factors.

L'estudi realitzat sobre la regulació endocrina dels transportadors de nucleòsids ha posat de manifest l'existència d'una regulació diferencial de les diferents isoformes de transportadors de nucleòsids presents a les cèl·lules intestinals epitelials IEC-6, de manera que la inducció de la diferenciació resulta en un increment de l'expressió i activitat tant dels transportadors concentratius, localitzats a la membrana apical dels enteròcits, com dels equilibratius situats a la membrana basolateral, suggerint una millora de l'absorció dels nucleòsids de la dieta així com la presència d'un possible flux transepitelial. Contràriament, estímuls proliferatius com l'exposició a factors de creixement o a un dany de l'epiteli indueixen un increment específic de l'expressió i de l'activitat d'ENT1, probablement involucrat en la sortida dels nucleòsids absorbits o, en aquest cas, en la captació dels nucleòsids presents a la circulació per tal de mantenir l'increment de la taxa de proliferació de les cèl·lules.

Com s'ha comentat, aquesta distribució asimètrica de les dues famílies de transportadors de nucleòsids ha suggerit l'existència d'un flux transepitelial de nucleòsids des dels lúmens intestinal i tubular fins a la circulació. Tanmateix, la ràpida metabolització d'aquests compostos a l'interior de la cèl·lula jugaria en contra d'aquesta hipòtesi. L'únic estudi sobre el paper dels transportadors de nucleòsids en el flux vectorial ha estat realitzat en un model de cèl·lules renals cotransfectades establement amb els transportadors concentratius CNT1 i ENT1 (Lai et al., 2002). Els autors confirmen l'expressió apical de CNT1 i basolateral d'ENT1 i demostren l'existència d'un flux transepitelial de nucleòsids la direcció del qual varia en funció del substrat utilitzat. Així, el flux net d'adenosina té lloc majoritàriament des del domini apical al basolateral, i en canvi el de desoxiadenosina és superior en sentit contrari.

En base a aquests antecedents, ens vam plantejar posar a punt un model intestinal que permetés dur a terme mesures de flux vectorial. Tenint en compte, que tot i que es va provar no es va aconseguir una monocapa de cèl·lules IEC-6 correctament polaritzada, es van triar les cèl·lules Caco-2, utilitzades àmpliament en

l'estudi de la captació de diferents nutrients com aminoàcids i pèptids (Thwaites et al., 1993; Nicklin et al., 1995; Ferruzza et al., 1995) com a model d'estudi. Tanmateix, com que la caracterització de les activitats de transport nucleòsids presents en aquestes cèl·lules va posar de manifest la manca de transport concentratiu, es va haver de generar un clon que expressés establement el transportador CNT1. Cal comentar que es va triar el transportador CNT1 en comptes de CNT2 d'una banda perquè és el transportador més sensible a l'estat de proliferació i diferenciació cel·lular i no disposem de cap model que presenti aquesta activitat de manera endògena i en segon lloc perquè és el principal transportador concentratiu de fàrmacs derivats de nucleòsids (Pastor-Anglada et al., 2004).

La caracterització del clon estable Caco-2-hCNT1 generat ha posat de manifest la presència de l'activitat concentrativa pirimidino-preferent corresponent al transportador CNT1 i, en consistència amb els resultats obtinguts en d'altres models polaritzats (Mangravite et al., 2001; Lai et al., 2002), aquesta activitat concentrativa es situa exclusivament a la membrana apical de les cèl·lules. Addicionalment, els estudis de flux vectorial han demostrat la presència d'un pas net transepitelial de nucleòsids en els dos sentits, és a dir des del compartiment apical al basolateral i des del compartiment basolateral a l'apical i la presència de CNT1 resulta en un increment del flux apical. D'altre banda s'ha pogut observar que les quantitats d'uridina acumulada i alliberada són sensiblement diferents segons el compartiment al qual s'afegeixen els nucleòsids. Així, la uridina captada a la membrana apical és majoritàriament alliberada al compartiment contrari, i només el 15-20% s'acumula a l'interior de la cèl·lula. En canvi quan la uridina s'afegeix a la cambra basolateral el percentatge d'acumulació augmenta de manera que aproximadament el 40% de la uridina que entra s'acumula a l'interior cel·lular. Aquestes diferències estarien en concordança amb el fet que els nucleòsids que entren per la membrana basolateral via els ENTs estarien principalment destinats a mantenir la proliferació cel·lular i en canvi els que ho fan des de la membrana apical serien principalment alliberats a la sang.

Malauradament, no s'observen diferències clares entre les cèl·lules Caco-2 normals i les que expressen de manera estable hCNT1. En efecte, malgrat que s'observa una elevada expressió del missatger del transportador CNT1 en el clon generat respecte les cèl·lules *wild type*, aquest increment d'aproximadament 35 vegades no es correlaciona directament amb els nivells de proteïna i activitat detectats, de manera que el transport d'uridina mitjançat per CNT1 representa tant sols

el 25% de la taxa total de transport. Tot i que no es coneixen els mecanismes concrets de la regulació de CNT1, tenim evidències que suggereixen que es tracta d'un transportador altament regulat no només transcripcionalment sinó també traduccionalment i sobretot durant el tràfic i localització subcel·lular. En aquest sentit, s'ha descrit que en el fetge, a diferència de CNT2, CNT1 segueix una via de tràfic endocítica indirecta fins arribar al seu destí final, que en aquest cas seria la membrana canalicular (Dufлот et al., 2002), i en la majoria de tipus cel·lulars analitzats s'ha detectat una localització intracel·lular del transportador (Farré et al., 2004; Dufлот et al., 2002). Addicionalment, les anàlisis de l'expressió de CNT1 a dues fases del cultiu cel·lular ha permès corroborar resultats anteriors obtinguts en el nostre grup de recerca que indicaven que els nivells d'expressió i activitat d'aquest transportador es troben íntimament associats a l'estat de diferenciació cel·lular. Així, els resultats obtinguts confirmen estudis similars realitzats en el marc de la tesi doctoral de la Dra. Fernández-Veledo, en els que es va posar de manifest que a mesura que les cèl·lules BC2, derivades d'hepatoma humà, es diferenciaven en cultiu adquirint característiques pròpies dels hepatòcits en cultiu s'indueix un increment significatiu de l'expressió i activitat de CNT1.

Malgrat que el clon estable Caco-2-hCNT1 no ha resultat ser un model prou adient per analitzar el paper de CNT1 en el flux transepitelial de nucleòsids, resultats obtinguts en el nostre grup de recerca dins el marc de la tesi doctoral de l'Ekaitz Errasti han posat de manifest que la presència d'un transportador concentratiu, en aquest cas CNT3, és essencial per garantir el flux transepitelial eficient de nucleòsids i derivats d'aquests compostos des del domini apical al basolateral. Així aquest estudi, dut a terme utilitzant un model renal que expressa endògenament el transportador CNT3, les cèl·lules PCT, i mitjançant l'expressió transitòria d'aquest transportador en cèl·lules MDCK, ha demostrat que l'expressió del transportador es tradueix en un increment del flux apical de nucleòsids d'aproximadament 10 vegades sense produir canvis significatius del flux basolateral. Addicionalment, l'anàlisi per HPLC de les formes moleculars associades al flux transepitelial de citidina han demostrat que el flux mitjançat per CNT3 està relacionat amb una elevada metabolització del substrat i, al contrari, el flux a través dels transportadors equilibratius resulta en el pas del nucleòsid pràcticament pur. Tanmateix, si en comptes d'un substrat natural s'afegeix un fàrmac derivat de nucleòsids, en aquest cas la gemcitabina, el pas del nucleòsid a través de la monocapa de cèl·lules es correspon al fàrmac pur, existint per tant una molt baixa metabolització del substrat. I, en aquest cas, també s'ha de tenir en compte com s'ha

demostrat amb el model de cèl·lules Caco-2-hCNT1, que pràcticament la totalitat del fàrmac és alliberat al compartiment contrari de manera que la seva acumulació intracel·lular és pràcticament nul·la. Cal destacar que les diferències observades entre els dos models de cèl·lules polaritzades Caco-2 i MDCK poden ser degudes en primer lloc al tipus de transportador que expressen, és a dir, que probablement els transportadors CNT1 i CNT3 presenten mecanismes de regulació post-traduccionals i de tràfic a membrana diferents i en segon lloc s'ha de tenir en compte que en el cas de les cèl·lules MDCK els estudis s'han dut a terme mitjançant una transfecció transitòria del transportador i potser en aquestes condicions els mecanismes que regulen la traducció i el direccionament a la membrana plasmàtica no tenen una resposta fisiològica normal.

2. REGULACIÓ DEL TRANSPORTADOR CONCENTRATIU DE NUCLEÒSIDS CNT2 PER ASSEQUIBILITAT DE SUBSTRAT.

L'activitat de la majoria de transportadors intestinals de nutrients és altament sensible a la ingesta i a la seva composició. En aquest sentit, s'ha descrit que una dieta rica en sacarosa i fructosa modula l'expressió dels transportadors d'hexoses dependent de sodi (SGLT-1) i independents de sodi (GLUT-2 i GLUT-5) en jejúnum de rata (Kishi i col. 1999). Anàlogament, els transportadors peptídics presents a l'intestí prim de rata són sensibles, *in vivo*, a l'assequibilitat de substrat, de manera que una dieta rica en proteïnes indueix l'expressió d'aquests transportadors (Erickson i col. 1995). Aquest fet també s'ha observat en cèl·lules *in vitro* on la presència de dipèptids i de determinats aminoàcids en el medi de cultiu produeixen un increment de l'expressió i activitat del transportador de pèptids PEPT1 (Shiraga et al., 1999).

Recentment, el nostre grup de recerca ha posat de manifest que els transportadors de nucleòsids, *in vivo*, també estan regulats per l'assequibilitat dels seus substrats. Així, en rates dejunades durant 24 hores es produeix un increment dels nivells de proteïna de CNT1 en jejúnum i en canvi s'observa una lleugera disminució de l'expressió hepàtica d'aquest transportador. L'augment d'expressió de CNT1 en intestí prim es tradueix en un increment del transport de timidina i de gemcitabina en vesícules de vora en raspall d'intestí prim. Aquesta regulació de l'expressió i activitat de CNT1 es mimetitzava per una dieta lliure en nucleòsids (Valdés et al. 2000). Tot i que aquest estudi es va centrar bàsicament en la regulació de CNT1, dades no publicades apunten cap a un comportament similar de CNT2 en jejúnum de rata. Es tracta de la primera evidència de l'existència d'una modulació de l'expressió dels transportadors concentratius en funció de l'assequibilitat de substrat i de manera específica de teixit.

La relació observada entre l'expressió dels transportadors concentratius de nucleòsids i la bioassequibilitat dels seus substrats s'ha intentat reproduir *in vitro* en aquesta tesi mitjançant el tractament de les cèl·lules IEC-6 amb diferents barreges de nucleòsids. En primer lloc es van analitzar els possibles canvis de l'activitat de transport al llarg del temps (d'1 hora a 8 hores) després d'haver afegit una barreja de nucleòsids formada per adenosina, guanosina, citidina i timidina a una

concentració final de 25 μ M (N) al medi de cultiu de les cèl·lules. En paral·lel, es van monitoritzar els possibles canvis dels nivells d'expressió de CNT2 per *Western Blot*.

Malauradament, a diferència dels resultats obtinguts *in vivo* sobre la regulació dels transportadors concentratius a intestí prim, no es van observar canvis significatius i reproduïbles a llarg termini sobre l'expressió i/o activitat de CNT2. Cal destacar que la ràpida metabolització dels nucleòsids podria estar impedit el manteniment de l'estímul i això podria estar dificultant la detecció dels canvis en l'expressió a llarg termini. Tanmateix, es va observar que a temps curts (1 hora), el tractament amb nucleòsids produïa una disminució de la captació de guanosina tant de la component concentrativa corresponent a CNT2 com de l'equilibrativa mitjançada per ENT1 i ENT2 (**figura 30.A**). Addicionalment, es va posar de manifest que només les purines, substrats preferents del sistema concentratiu CNT2, són les responsables de la inhibició del transport (**figura 30.B**). Tot i que l'efecte dels nucleòsids es produeix tant sobre el transport concentratiu com l'equilibratiu, l'estudi es va centrar principalment en la regulació de CNT2, d'una banda perquè representa aproximadament el 90% de la taxa total de transport de les cèl·lules IEC-6 però a més, com que es situa a la membrana apical dels enteròcits, és el transportador més susceptible d'estar en contacte amb concentracions elevades de nucleòsids presents a la llum intestinal.

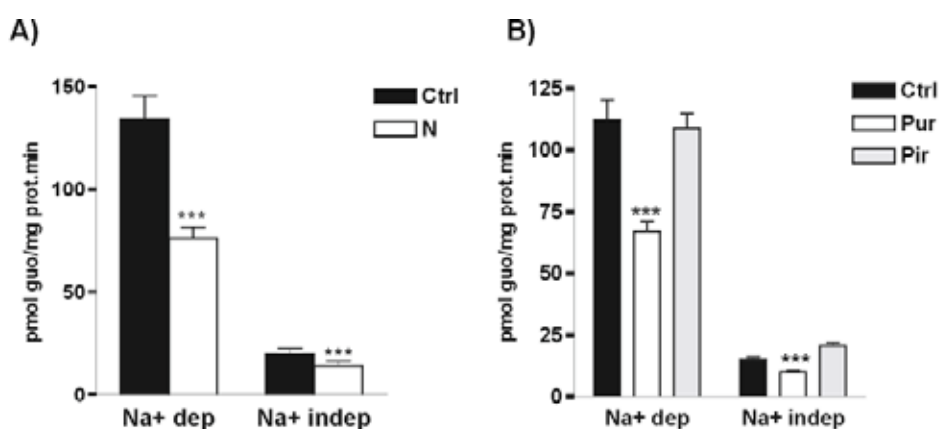


Figura 30: Efecte del tractament amb nucleòsids sobre l'activitat de transport de nucleòsids en cèl·lules IEC-6. A) Les cèl·lules es van tractar amb una barreja de nucleòsids (adenosina, guanosina, citidina i timidina) 25 μ M durant 1 hora i a continuació es va mesurar el transport de guanosina 1 μ M en presència i absència de sodi. B) Es va analitzar el transport de guanosina dependent i independent de sodi de cèl·lules IEC-6 tractades amb una barreja de purines (adenosina 10 μ M i guanosina 10 μ M) o pirimidines (citidina 10 μ M i timidina 10 μ M) durant 1 hora. Les anàlisis estadístiques es van realitzar segons el test de la *t* de Student, essent *** p <0.001.

Per tal de caracteritzar l'efecte dels nucleòsids púrics sobre l'activitat de CNT2 es va realitzar una cinètica a diferents concentracions de guanosina (0.5 a 50 μM) en cèl·lules control i en cèl·lules tractades amb una barreja de nucleòsids (N) durant 1 hora. Tal i com es pot observar, el tractament produeix una disminució d'aproximadament un 40% de la K_m aparent del transportador sense produir canvis de la seva V_{max} (figura 32). Aquests resultats indiquen que la disminució d'activitat que produeixen els nucleòsids no és deguda a una disminució del nombre de transportadors CNT2 a la membrana plasmàtica sinó a una pèrdua d'afinitat dels transportadors preexistents.

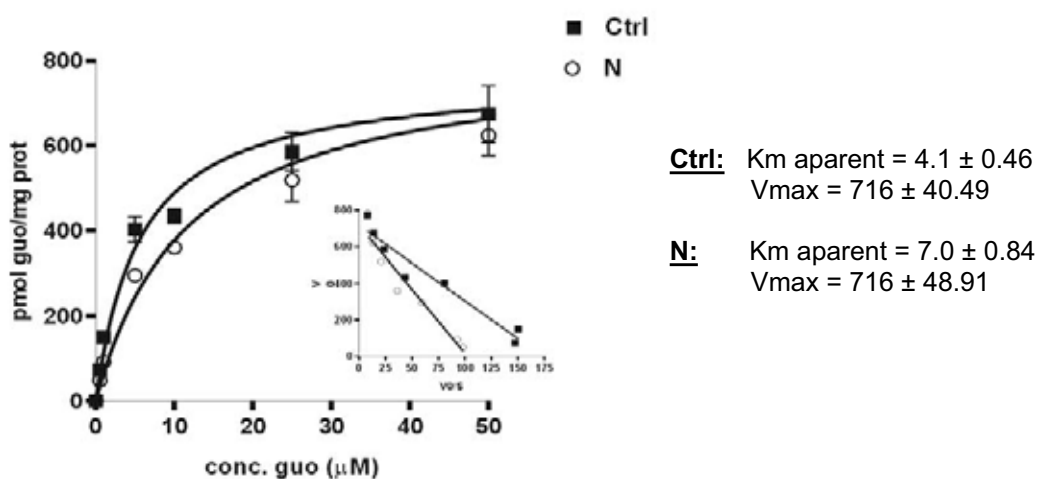


Figura 31: Caracterització cinètica de l'efecte dels nucleòsids sobre l'activitat de CNT2. Es van incubar les cèl·lules amb una barreja de nucleòsids 25 μM durant 1 hora i es va analitzar la captació de guanosina en presència i absència de sodi en les cèl·lules tractades i en cèl·lules control. Els resultats (mitja \pm SEM) provenen de la substracció d'ambdues taxes respectivament. També es mostra la representació linial (Eadie-Hofstee) dels resultats i a partir de la qual s'han obtingut els paràmetres cinètics.

A partir d'aquest punt, mitjançant l'ús d'inhibidors específics de determinades proteïna quinases, es va intentar estudiar la possible implicació de diferents vies de senyalització en la regulació de CNT2 per assequibilitat de substrat. Com s'explica en detall a l'apartat de Materials i Mètodes es van provar inhibidors o activadors de les proteïna quinases PKC, PKA, ERK, PI3K, p38, Tor quinasa i un inhibidor general de les Tyr proteïna quinases. Tanmateix es pot observar que cap dels inhibidors va produir canvis significatius sobre la inhibició de l'activitat de CNT2 en resposta als nucleòsids, indicant que cap de les proteïnes quinasa analitzades està involucrada en la regulació d'aquest transportador per assequibilitat de substrat (figura 32).

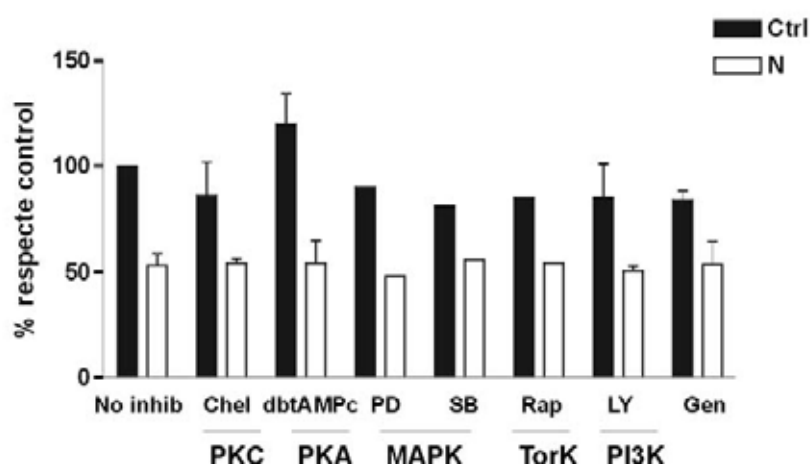


Figura 32: Efecte de la inhibició o activació de diferents vies de transducció de senyal sobre la regulació de l'activitat de CNT2 per nucleòsids en cèl·lules IEC-6. Es van pretractar les cèl·lules amb els inhibidors o activadors específics indicats i posteriorment es van tractar amb una barreja de nucleòsids durant 1 hora. Els inhibidors o activadors utilitzats van ser chelerytrin (Chel) 1 μ M, dbtAMPc 100 nM, PD 98059 10 μ M (PD), SB 202190 1 μ M (SB), Rapamycin 100 nM (Rap), LY249002 10 μ M, Genisteïna 60 μ M (Gen). Després de les corresponents incubacions es va analitzar el transport concentratiu de guanosina. Els resultats (mitja \pm SEM) estan expressats en % respecte a l'activitat basal del control.

D'altra banda, en el moment de dur a terme aquest estudi, resultats obtinguts en el nostre grup de recerca evidenciaven l'existència d'una regulació purinèrgica de CNT2, de manera que, en cèl·lules hepàtiques, l'activació dels receptors d'adenosina A1 produïa una inducció de l'activitat CNT2 (Dufлот et al., 2004). En aquest sentit, es va voler descartar la possibilitat de que la regulació per assequibilitat de substrat depengués de l'estimulació dels receptors purinèrgics. Amb aquest objectiu, es van incubar les cèl·lules amb diferents purines individuals, metabolitzables i no metabolitzables (adenosina, guanosina, inosina i Formicina B), a una concentració de 10 μ M durant 1 hora (**figura 33.A**). A més, es va realitzar un control amb PIA (agonista dels receptors d'adenosina principalment d'A1), a una concentració de 50 nM durant 5 min (**figura 33.A**), condicions utilitzades en l'estudi que s'estava duent a terme en cèl·lules hepàtiques. Com es pot apreciar a la **figura 33.A**, només les purines metabolitzables, adenosina, guanosina i inosina, produeixen una disminució de la taxa de transport. En canvi, ni la Formicina B ni l'activació purinèrgica induïda per PIA reproduïen aquest efecte, indicant que en aquest cas la modulació de CNT2 no depèn de la funció dels receptors purinèrgics. Addicionalment, el *time course* de l'efecte de l'adenosina posa de manifest que es tracta d'un efecte molt ràpid ja visible als 5 minuts de tractament i que es manté fins aproximadament 1 o 2 hores després (**figura 33.B**). A partir d'aquest punt es van

triar temps d'incubació més curts, entre 5 i 10 minuts per dur a terme la resta d'assaigs.

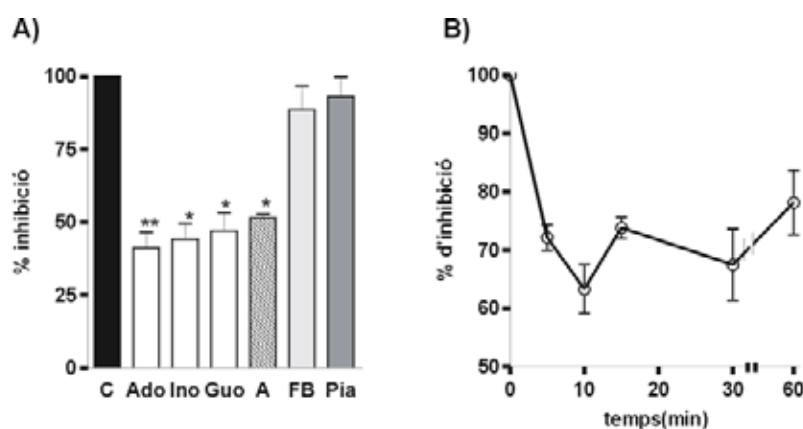


Figura 33: Regulació de l'activitat CNT2 per purines metabolitzables. A) Es van incubar les cèl·lules amb adenosina 10 µM (Ado), guanosina 10 µM (Guo), Inosina 10 µM (Ino), Aicar 500 µM (A) durant 1 hora o amb PIA 50 nM durant 5min. Una vegada finalitzat el temps de les incubacions es va mesurar el transport concentratiu i dependent de sodi. **B)** *Time course* de l'efecte de l'adenosina 10 µM sobre l'activitat CNT2. Significativitat estadística per el test de la *t* de Student, essent * $p < 0.05$, ** < 0.01 respecte el control.

Els resultats obtinguts també posen de manifest que l'aicar, un precursor de la síntesi de l'adenosina que pot ser metabolitzat a l'interior cel·lular donant lloc a ZMP, mimetitza els efectes dels nucleòsids naturals. Tenint en compte que l'aicar és un conegut activador de la proteïna quinasa dependent d'AMP (AMPK), ens vam plantejar la possible implicació d'aquesta proteïna quinasa en la regulació de CNT2 per nucleòsids. Com que no existeixen inhibidors específics de l'AMPK, per tal de comprovar la hipòtesi postulada es va utilitzar un vector adenoviral que codifica per una forma mutada de la isoforma catalítica $\alpha 1$ del complex AMPK (Ad. $\alpha 1$ DN). La sobreexpressió d'aquesta proteïna mutada produeix un efecte dominant negatiu sobre l'activitat AMPK endògena de les cèl·lules. Així, es van infectar les cèl·lules amb l'adenovirus Ad. $\alpha 1$ DN o amb un adenovirus control (que conté el mateix promotor però en el què no s'ha afegit cap gen exogen) i 24 hores després de la infecció es van tractar amb adenosina 10 µM i aicar 500 µM. Contràriament al que s'esperava, la sobreexpressió de la forma mutada de l'AMPK no bloqueja l'efecte de l'adenosina i l'aicar sobre l'activitat CNT2, indicant que l'AMPK no juga cap paper en la regulació de CNT2 per assequibilitat de substrat (**figura 34**).

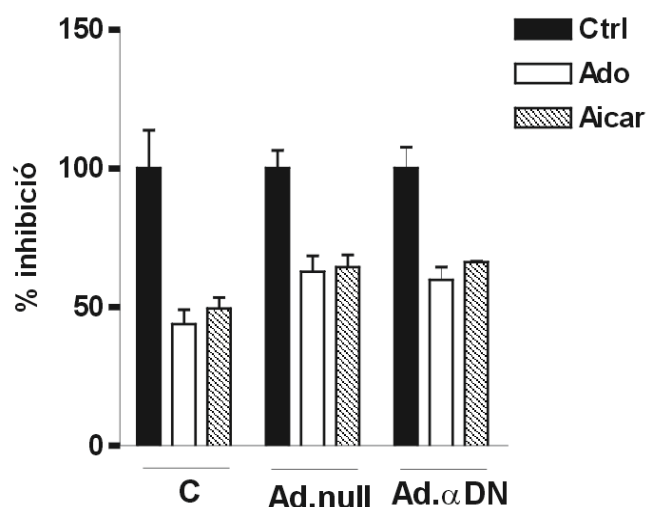


Figura 34: Efecte de la inhibició de l'AMPK sobre la regulació de CNT2 per nucleòsids. Es van infectar cèl·lules IEC-6 amb un adenovirus control i un adenovirus dominant negatiu de l'activitat AMPK. 24 hores després de la infecció, es van tractar amb adenosina 10 μ M (Ado) durant 5 minuts o Aicar 500 μ M durant 1 hora i finalment es va mesurar el transport concentratiu de guanosina. Els resultats mostrats estan expressats en % respecte els respectius control.

El fet que es tracti d'un efecte immediat que produeix un canvi de l'afinitat del transportador i que només els substrats metabolitzables de CNT2 són responsables de produir la modulació de la seva activitat, va suggerir la possibilitat que els propis substrats o formes derivades d'aquests substrats fossin directament els causants de la inhibició. En aquest sentit, es va intentar una doble aproximació. Per tal de comprovar si les formes fosforilades dels nucleòsids eren les responsables de l'efecte, es va bloquejar la seva formació mitjançant l'ús de la 5'-iodotubercidina (ITU), inhibidor de l'adenosina quinasa i en conseqüència del pas d'adenosina a AMP (**figura 35.B**). D'altra banda, en comptes de tractar les cèl·lules amb nucleòsids, es van addicionar les nucleobases corresponents, adenina i guanina, a les mateixes condicions usades en el tractament amb nucleòsids (10 μ M durant 10 minuts); cal recordar que les nucleobases poden entrar a l'interior cel·lular a través del transportador equilibratiu ENT2 (**figura 35.A**).

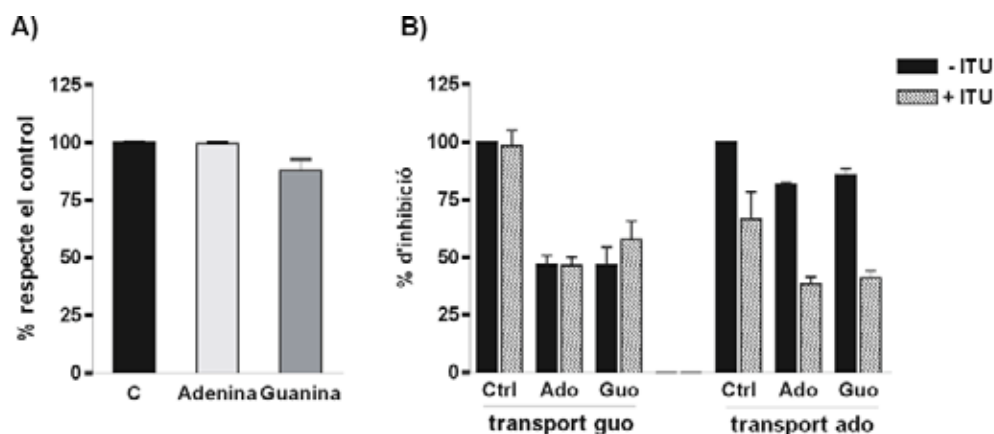


Figura 35: Implicació del metabolisme dels nucleòsids en la regulació de CNT2 en cèl·lules IEC-6. **A)** Mesura de la captació dependent de sodi de guanosina en cèl·lules tractades amb adenina 10 μ M o guanina 10 μ M durant 10 minuts. **B)** Mesura del transport concentratiu de guanosina o adenosina en cèl·lules tractades amb adenosina 10 μ M o guanosina 10 μ M durant 10 minuts en absència o presència de 5'-iodotubercidina 0.2 μ M (ITU). Els resultats (mitja \pm SEM) estan expressats en % respecte l'activitat basal del control en cada cas.

Tot i que els resultats obtinguts són una mica complexos i no se'n pot extreure una conclusió definitiva, es pot observar que el tractament de les cèl·lules amb adenina o guanina no produeix cap canvi del transport de guanosina dependent de sodi, indicant que les nucleobases no són responsables de la inhibició de la funció de CNT2 (**figura 35.A**). D'altre banda, es pot apreciar que el pretractament amb 5'-iodotubercidina produeix una disminució del transport basal d'adenosina sense afectar el transport de guanosina. Aquests resultats indiquen que el bloqueig de la metabolització dels nucleòsids mimetitza l'efecte d'aquests compostos sobre CNT2 (**figura 35.B**). Així, en el cas del transport d'adenosina, la 5'-iodotubercidina actua inhibint la seva fosforilació i conseqüent formació d'AMP, de manera que presumiblement podria produir-se una acumulació intracel·lular de la pròpia adenosina. En canvi, en el cas de la captació de guanosina, com que la seva metabolització no es veu afectada per la presència de la 5'-ITU, no es produiria la seva acumulació a l'interior cel·lular. Aquest conjunt d'observacions suggeririen que el propi substrat podria induir la inhibició de l'activitat CNT2. Tanmateix, no es pot descartar que un altre producte de metabolització comú entre els diferents nucleòsids estigui implicat en la regulació del transportador. Cal tenir en compte que els nucleòsids just després de la seva entrada a la cèl·lula, són metabolitzats per l'acció de diferents enzims com per exemple l'adenosina quinasa, guanosina-hipoxantina quinasa, adenosina desaminasa i les purina nucleòsid fosforil·lases, entre d'altres, el que dificulta enormement la valoració de les concentracions dels

diferents nucleòsids a l'interior cel·lular i en conseqüència la detecció de possibles canvis en els seus *pools* intracel·lulars.

Per tal de determinar si aquesta ràpida regulació de CNT2 per assequibilitat de substrat és específica d'aquest model o és més generalitzada es va expressar de manera heteròloga el transportador en dues línies cel·lulars, CHO i HeLa, i es va analitzar l'efecte del tractament amb nucleòsids. Com es pot observar, la transfecció resulta en l'aparició d'un transport de guanosina dependent de sodi en les dues línies cel·lulars i en ambdós casos es produeix una disminució d'aproximadament el 30% d'aquesta activitat concentrativa després d'un tractament amb adenosina 10 μM o guanosina 10 μM durant 5 minuts (**figura 36.A**). Alternativament es va analitzar l'efecte de la 5'-iodotubercidina sobre el transport d'adenosina i de guanosina en cèl·lules FAO, cèl·lules derivades d'hepatoma de rata que expressen de manera endògena el transportador CNT2 (**figura 36.B**). En aquesta línia cel·lular, de la mateixa manera que per a les cèl·lules IEC-6, es pot observar que el transport d'adenosina però no el de guanosina és inhibit quan es bloqueja l'activitat adenosina quinasa. Aquests resultats indiquen que no es tracta d'un mecanisme de regulació aïllat sinó que està present en diferents tipus cel·lulars i semblaria que els propis substrats participen directament en aquest efecte.

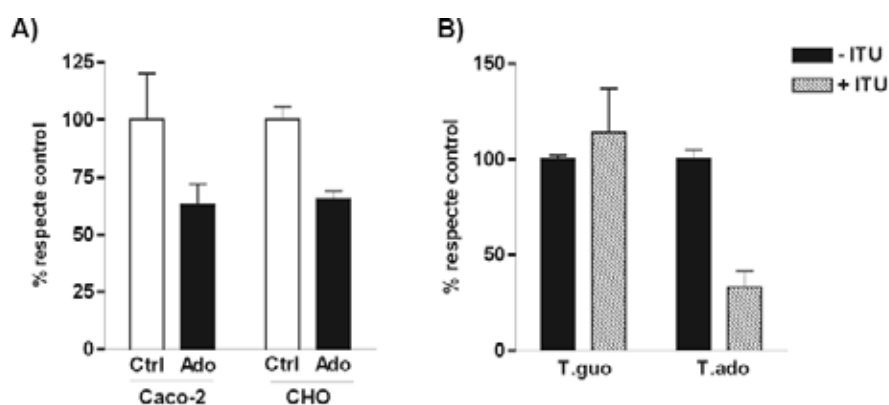


Figura 36: Efecte dels nucleòsids sobre CNT2 en cèl·lules FAO i en dos models d'expressió heteròloga. **A)** Les cèl·lules Caco-2 i CHO es van transfectar amb CNT2pcDNA₃ i posteriorment es va mesurar la captació de guanosina després d'un tractament de 5 minuts amb adenosina 10 μM . **B)** Les cèl·lules FAO es van incubar amb 5'-iodotubercidina (ITU) 0.5 μM durant 30 minuts i a continuació es van determinar les taxes de transport d'adenosina i guanosina. Els resultats s'expressen en % respecte l'activitat basal del control en cada cas.

Els transportadors concentratius de nucleòsids, de la mateixa manera que molts transportadors de nutrients, estan regulats per l'assequibilitat dels seus substrats, que molt sovint i sobretot en el cas de l'epiteli intestinal ve determinada pel contingut de la dieta. En aquest sentit, el nostre grup de recerca ha posat de manifest que l'expressió i activitat dels transportadors concentratius de nucleòsids, *in vivo*, també estan regulats per l'assequibilitat dels seus substrats de manera que una dieta lliure de nucleòtids, precursors directes dels nucleòsids, produeix un increment de dues vegades dels nivells de proteïna de la isoforma intestinal de CNT1 (Valdés i col. 2000).

Com ja s'ha comentat a l'inici d'aquest apartat, l'objectiu plantejat en aquest estudi era intentar reproduir *in vitro* els resultats obtinguts en el model *in vivo* anteriorment descrit. Tanmateix, utilitzant com a model intestinal la línia cel·lular IEC-6 i mitjançant l'addició de diferents barreges de nucleòsids, no es van observar canvis significatius en l'expressió dels transportadors concentratius de nucleòsids. Cal destacar que la ràpida captació i metabolització dels nucleòsids podria estar implicant el manteniment de l'estímul a llarg termini. En efecte, resultats obtinguts en un estudi dut a terme en el marc de la tesi doctoral de la Dra. Fernández-Veledo, en el que es va analitzar l'efecte de la depleció d'adenosina *in vitro* sobre l'activitat CNT2, són consistents amb aquesta possible explicació. En aquest cas, mitjançant el tractament amb l'enzim adenosina desaminasa es va aconseguir eliminar l'adenosina del medi de cultiu de les cèl·lules durant temps llargs. Sota aquestes condicions es va observar un increment de l'activitat CNT2, que es va relacionar d'una banda amb un increment del nombre de transportadors a la membrana plasmàtica i, d'altra banda i a més llarg termini, amb un augment de la síntesi del transportador, observant-se una inducció de l'activitat transcripcional del promotor de CNT2 després de 6 hores de privació d'adenosina.

Tanmateix, els resultats obtinguts en aquesta tesi han permès demostrar l'existència d'una ràpida regulació de l'activitat de CNT2, de manera que el tractament de les cèl·lules IEC-6 amb purines produeix una disminució d'aproximadament el 50% del transport de guanosina pràcticament immediata i que es manté durant 1 o 2 hores. La disminució del transport es produeix tant en la component equilibrativa com en la component concentrativa, i en aquest darrer cas és conseqüència d'un augment de la K_m aparent del transportador concentratiu

CNT2. Per tant, no es produeix un canvi en el nombre de transportadors a la membrana plasmàtica, sinó que els transportadors preexistents presenten una menor afinitat per als seus substrats. Aquesta disminució en l'afinitat del transportador podria atribuir-se a una modificació post-transcripcional directa, a una interacció proteïna-proteïna o podria tractar-se d'un efecte alostèric. Tot i que les anàlisis de seqüència de CNT2 suggereixen la presència de motius consens de fosforilació per diverses quinases intracel·lulars i que en el cas concret d'ENT1 s'ha descrit que la seva activitat sembla estar regulada post-traduccionament per la PKC (Coe et al., 2002), cap de les proteïna quinases analitzades (MAPK, PKC, PKA, PI3K, Tor quinasa, AMPK) sembla estar implicada en la regulació de CNT2 per assequibilitat de substrat. Encara que no es pot descartar el fet que una altra proteïna quinasa no identificada sigui la mitjancera de la regulació de CNT2, cal destacar que la majoria d'efectes que comporten un canvi en l'estat de fosforilació d'una proteïna transportadora estan relacionats amb canvis en la seva V_{max} , generalment com a conseqüència de canvis de la seva expressió a membrana (Golin-Bisello et al., 2005) o de la seva estabilitat (Wang and Oram, 2005), i no en modulacions de la seva afinitat.

En base als resultats obtinguts, semblaria que els propis substrats i no formes derivades com les nucleobases o els nucleòtids són els responsables de la inhibició de l'activitat del transportador. En aquest sentit, hem posat de manifest que la inhibició d'una via de metabolització del nucleòsid, en concret la inhibició de la seva fosforilació, mimetitzava l'efecte de la incubació amb els diferents nucleòtids possiblement com a conseqüència d'un increment de la seva concentració a l'interior de la cèl·lula. Així, tant en cèl·lules IEC-6 com en cèl·lules FAO, el tractament amb 5'-iodotubercidina produeix una disminució del transport d'adenosina però no produeix canvis sobre el transport de guanosina. Addicionalment, les diferències existents entre les dues línies cel·lulars podrien ser degudes a diferències en l'expressió i l'activitat dels enzims implicats en la metabolització de l'adenosina en cada cas. En efecte, s'ha descrit que en fetge l'activitat adenosina quinasa és molt majoritària (Sakowicz et al., 2001) i en canvi en epiteli intestinal les activitats adenosina quinasa i adenosina desaminasa contribueixen a la metabolització de l'adenosina de manera similar (Mohamedali et al., 1993; Snyder et al., 1982); en aquest context seria lògic que el bloqueig de l'activitat quinasa produeixi un efecte superior en una línia cel·lular hepàtica respecte a una línia cel·lular intestinal.

Es tracta d'un estudi molt preliminar però que posa de manifest l'existència d'un mecanisme de regulació nou per la família de transportadors de nucleòsids i que tampoc ha estat descrit per a altres famílies de transportadors. En base a l'estudi realitzat semblaria que els mateixos substrats són els iniciadors de l'efecte, tanmateix no podem determinar si es tracta d'un efecte alostèric directe o que implica algun tipus de modificació covalent del transportador o una interacció proteïna-proteïna. Encara caldria realitzar diferents assaigs per poder determinar quin és el realment mecanisme mitjançant el qual es regula CNT2. En aquest sentit, en una primera aproximació es podrien reproduir els experiments en vesícules de membrana de vora en raspall d'intestí prim o de membrana basolateral de fetge, dos models que expressen endògenament el transportador però no possibles quinases intracel·lulars. Pel què fa al significat fisiològic de regulació de CNT2 per assequibilitat de substrat, tenint en compte que és el transportador més afí per adenosina, aquest mecanisme que permet una ràpida inhibició de l'activitat del transportador pot estar contribuint a modular les funcions mitjançades per aquest nucleòsid, regulant tant la seva concentració extracel·lular i en conseqüència la seva assequibilitat als receptors específics de membrana com la seva concentració a l'interior cel·lular que, com es demostra en el següent apartat, està implicada en la regulació de la via de l'AMPK.

3. PAPER DELS TRANSPORTADORS DE NUCLEÒSIDS EN LA VIA DE SENYALITZACIÓ DE L'AMPK.

L'absorció dels nucleòsids de la dieta sembla a primera vista la principal funció dels transportadors de nucleòsids en epitelis absortius i especialment dels CNTs ja que es localitzen a la membrana apical de les cèl·lules. Tanmateix, aquests transportadors s'expressen a la majoria de models cel·lulars tant epitelials com no epitelials i estan sotmesos a un alt nivell de regulació transcripcional (del Santo et al., 2001) i post-traducciona (Dufлот et al., 2004; Fernández-Veledo et al., submitted) fets que suggereixen la possible participació dels transportadors en altres funcions de la fisiologia de la cèl·lula. Tenint en compte que aquestes proteïnes transportadores són les responsables de regular les concentracions de nucleòsids intra i extracel·lulars, i en conseqüència contribueixen a la regulació del *pool* de nucleòtids intracel·lulars, es va decidir determinar el seu possible paper en la senyalització cel·lular i en concret en la via de la quinasa dependent d'AMP (AMPK). En aquest sentit, se sap que l'adenosina entra a dins les cèl·lules a través dels transportadors de nucleòsids i una vegada a l'interior cel·lular pot patir diferents processos de metabolització: pot generar inosina per l'acció de l'adenosina desaminasa, adenina per l'acció de la 5'-nucleotidasa o AMP mitjançant l'activitat adenosina quinasa.

La proteïna quinasa dependent d'AMP és un complex heterotrimèric directament implicat en el control del metabolisme energètic tant a nivell cel·lular com de tot l'organisme (Carling, 2004; Hardie, 2003; Hardie and Carling, 1997; Rutter et al., 2003). L'AMPK actua activant vies catabòliques a la vegada que inhibeix processos biosintètics, mantenint d'aquesta manera els *pools* energètics cel·lulars (Hardie and Carling, 1997). Els mecanismes bioquímics responsables de l'increment de l'activitat AMPK i conseqüent modulació de les seves dianes *downstream* impliquen essencialment dos processos que interactuen: una activació alostèrica i canvis en l'estat de fosforilació de l'enzim. L'AMP s'uneix i activa alostèricament la quinasa (Hardie et al., 1999) alhora que afavoreix la seva fosforilació per la seva quinasa *upstream* (Hawley et al., 1995), recentment identificada com la LKB1 (Hawley et al., 2003; Woods et al., 2003). Addicionalment, la interacció amb l'AMP fa que esdevingui pitjor substrat per a les fosfatases, tot evitant així la seva inactivació (Davies et al., 1995). Totes aquestes evidències

suggereixen que canvis molt petits en la concentració intracel·lular d'AMP poden modular l'activitat de l'AMPK d'una manera sinèrgica.

Tot i que tradicionalment s'ha assumit que les alteracions en el *pool* intracel·lular de nucleòtids d'adenina són conseqüència de canvis en el metabolisme energètic, com per exemple aquells derivats de l'estrès oxidatiu, es va analitzar l'efecte de l'adenosina extracel·lular sobre l'activitat de l'AMPK.

L'adenosina és captada en cèl·lules de mamífer pels ENTs i els CNTs, bàsicament ENT1 i CNT2 serien els principals responsables d'aquest procés. Tanmateix, com que CNT2 és un transportador concentratiu i presenta una *K_m* aparent d'un ordre de magnitud inferior a la d'ENT1, sembla ser el millor candidat per mitjançar el transport d'adenosina i en conseqüència contribuir al *pool* intracel·lular d'AMP. Recentment, el nostre grup d'investigació ha demostrat que la funció CNT2 pot estar estimulada de manera transitòria mitjançant un mecanisme que implica l'obertura dels canals de potassi dependents d'ATP (Duflot et al., 2004). Aquest tipus particular de canals de potassi són a la vegada sensors dels canvis en el *pool* de nucleòtids, com l'AMPK, aquest fet reforçaria la hipòtesi postulada. Així, l'adenosina extracel·lular, i de manera particular la seva captació via CNT2, podrien contribuir en la regulació de l'AMPK.

Per tal de determinar el possible efecte de l'adenosina sobre l'activitat de l'AMPK, es va afegir el nucleòsid al medi de cultiu de les cèl·lules IEC-6 a una concentració de 10 μ M. Al cap de 10 min de tractament es van immunoprecipitar de manera específica les isoformes catalítiques α 1 i α 2 i es va mesurar la seva activitat. Cal destacar que s'han de lisar les cèl·lules ràpidament, ja que el simple fet d'extreure el medi de cultiu pot produir certa activació d'aquesta proteïna quinasa (**figura 37.A**). Com es pot observar, les cèl·lules IEC-6 expressen de manera majoritària la isoforma α 1 i l'adenosina produeix un increment significatiu (aproximadament 2 vegades) de la seva activitat. Com a control de l'experiment, es van incubar les cèl·lules amb aicar, un activador farmacològic de l'AMPK, usant les condicions adients per produir un efecte màxim (500 μ M durant a 1 hora). Com en el cas de l'adenosina, l'aicar activa de manera específica la isoforma α 1, predominant en aquesta línia cel·lular. Aquest increment d'activitat en presència d'adenosina i aicar es correlaciona amb un augment de la fosforilació de la Thr172 de la proteïna (**figura 37.B**).

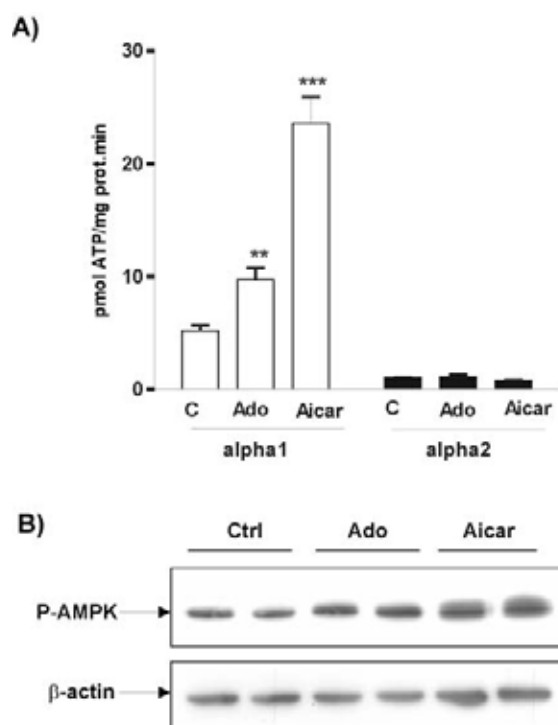


Figura 37: L'adenosina activa l'AMPK en cèl·lules IEC-6. (A) Les cèl·lules IEC-6 es van incubar en presència o absència d'adenosina 10 μ M o Aicar 500 μ M durant 10 minuts o 1 hora respectivament. Es van aïllar els complexos AMPK d'extractes cel·lulars mitjançant la immunoprecipitació amb un anticòs anti- α_1 AMPK o anti- α_2 AMPK. Les activitats dels complexos α_1 i α_2 AMPK es van mesurar mitjançant la fosforilació del pèptid AMARA. La significativitat estadística es va determinar mitjançant el test de la *t* de Student, essent ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. (B) Les cèl·lules es van tractar amb adenosina i aicar com s'ha detallat anteriorment i es va analitzar l'estat de fosforilació de la Thr172 de l'AMPK a partir d'extractes de proteïna. Com a control de càrrega es va utilitzar un anticòs anti- β -actina.

Amb l'objectiu de determinar les condicions en les quals l'adenosina exerceix un efecte màxim, es va realitzar un assaig de *time course* (figura 37.A) i una dosi-resposta (figura 37.B/C) a diferents concentracions d'adenosina. Així, a diferents temps després de l'addició d'adenosina 10 μ M es va mesurar el nivell de fosforilació de l'AMPK. Es tracta d'un efecte molt ràpid, de manera que l'increment de la forma fosforilada de la quinasa comença pràcticament d'immediat i es manté aproximadament uns 30 minuts (figura 37.A). Addicionalment, es pot apreciar que l'efecte depèn de la dosi, produint-se una resposta màxima al voltant d'una concentració de 10 μ M tot i que la concentració mínima provada (1 μ M) també produeix un increment de la fosforilació de la quinasa (figura 38.B). Paral·lelament es va monitoritzar l'activitat α_1 AMPK després d'incubar les cèl·lules IEC-6 amb concentracions creixents d'adenosina (figura 38.C). El perfil d'activació obtingut és

el mateix, amb un màxim d'activitat α_1 AMPK al voltant d'una concentració 10 μ M i amb una $K_{0.5}$ aparent d'activació de 0.47 μ M. Aquestes observacions indiquen que l'efecte produït per aquest nucleòsid és fisiològicament rellevant ja que té lloc en rangs propers als que es troba l'adenosina en els fluids corporals. Diversos autors han descrit que la concentració d'adenosina en sang és d'entre 0.3-1 μ M (Lasley et al., 1998; Pasini et al., 1996; Saadjian et al., 2002), tanmateix, en el lumen intestinal i a la vena porta pot arribar a concentracions superiors. Addicionalment, l'acció de les ectonucleotidases poden produir un increment local de la concentració d'aquest nucleòsids (Che et al., 1997; Roman and Fitz, 1999).

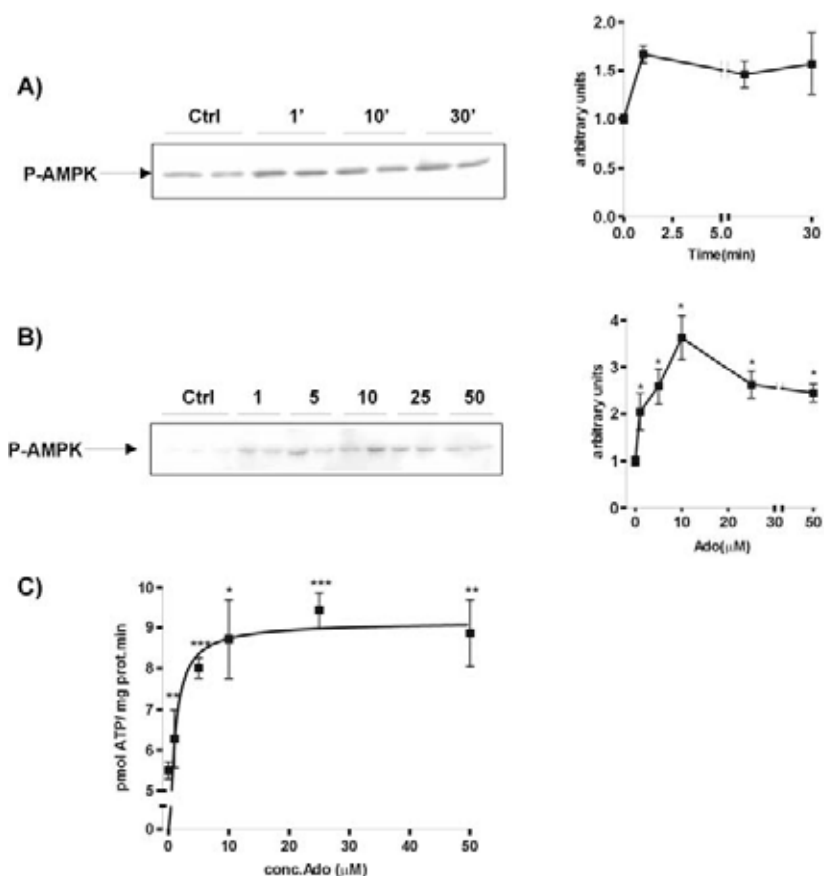


Figura 38: Time course i dosi-resposta de l'efecte de l'adenosina sobre la fosforilació i l'activitat AMPK. Els nivells de fosfo-AMPK es van monitoritzar per Western Blot a diferents temps després del tractament de les cèl·lules IEC-6 amb adenosina 10 μ M (A) o a 10 minuts després del tractament amb adenosina a diferents concentracions (B). La magnitud de la inducció es va quantificar densitomètricament. Els resultats (mitja \pm SEM) es presenten com unitats arbitràries normalitzades als valors obtinguts en cèl·lules control (no tractades). C) L'activitat α_1 AMPK endògena es va mesurar 10 min després de l'addició d'adenosina a les concentracions indicades. La significativitat estadística pel mètode de la *t* de Student: * <0.05 , ** $p<0.01$, *** <0.001 .

Per tal de confirmar l'increment del *pool* intracel·lular d'AMP en presència d'adenosina extracel·lular, es van determinar les concentracions intracel·lulars d'AMP, ADP i ATP mitjançant HPLC a diferents temps després de l'addició d'adenosina 10 μM al medi de les cèl·lules. Com es pot observar a la **Taula 6** el tractament amb adenosina resulta en un augment immediat i transitori de les concentracions d'AMP intracel·lular que sembla coincidir amb l'inici de l'activació de l'AMPK. En canvi, no es produeixen canvis significatius en les concentracions d'ADP i ATP. Per tant podem afirmar que canvis en les concentracions extracel·lulars d'adenosina són susceptibles de modular el pool intracel·lular de nucleòtids d'adenina.

		pmol AMP /10 ⁶ cel	pmol ADP/10 ⁶ cel	pmol ATP/10 ⁶ cel
No inhibidor	Ctrl	6.11 \pm 0.57	9.01 \pm 0.49	26.86 \pm 0.74
	Ado 30 s	15.29 \pm 2.18*	9.14 \pm 1.87	25.05 \pm 3.08
	Ado 1 min	12.17 \pm 1.47*	7.68 \pm 1.35	21.70 \pm 1.63
	Ado 10 min	9.65 \pm 1.72	5.92 \pm 1.22	23.59 \pm 1.63
	Ado 60 min	8.43 \pm 0.62	5.68 \pm 1.59	31.85 \pm 2.66
5'-ITU	Ctrl	9.08 \pm 0.14	4.76 \pm 0.61*	20.07 \pm 1.34*
	Ado 30 s	9.32 \pm 1.03	6.35 \pm 0.27	22.41 \pm 2.88
	Ado 1 min	6.46 \pm 1.25 [†]	5.94 \pm 0.96	25.54 \pm 3.27

Taula 6: Efecte de l'adenosina i de la 5'iodotubercidina sobre les concentracions de nucleòtids d'adenina. Es va addicionar adenosina 10 μM en cèl·lules IEC-6 control i cèl·lules prèviament tractades amb 5'-iodotubercidina 0.2 μM (5'-ITU) i a diferents temps es va mesurar mitjançant HPLC les concentracions intracel·lulars d'AMP, d'ADP i d'ATP. Els resultats (mitja \pm SEM) estan expressats en nmol/10⁷ cèl·lules. Significativitat estadística per el mètode de la *t* de Student: * $p < 0.05$ ado versus control, [†] $p < 0.05$ inhibidor versus no inhibidor.

El pas següent va ser determinar si l'efecte de l'adenosina sobre l'AMPK s'acabava traduint en la modulació d'alguna de les seves dianes *downstream*. Així, es van incubar les cèl·lules amb adenosina i es va analitzar l'estat de fosforilació de l'acetilCoA carboxilasa, una de les dianes més ben caracteritzada de l'AMPK. Com es mostra a la **figura 39**, el tractament amb adenosina produeix un increment de la forma fosforilada de l'ACC, que en aquest cas és indicatiu d'una inhibició de la seva activitat. L'aicar, utilitzat com a control de l'assaig, també indueix l'estat de fosforilació de l'ACC (**figura 39.A**).

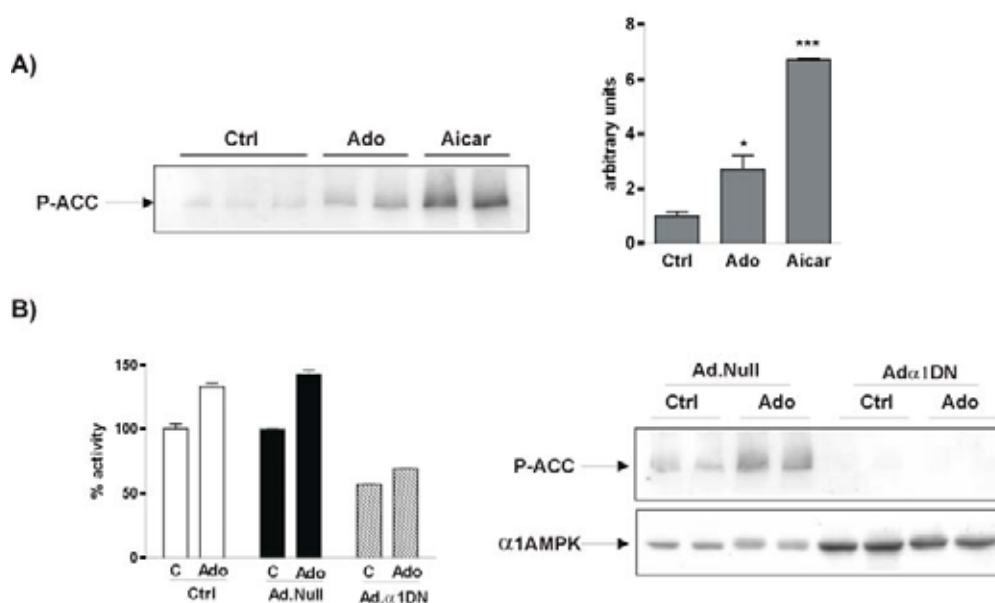


Figura 39: L'adenosina promou la fosforilació de l'AcetilCoA carboxilasa, diana de l'AMPK. A) L'anàlisi de la fosforilació de l'ACC mitjançant Western blot es va realitzar en extracte de cèl·lules tractades amb adenosina 10 μ M (Ado) o aicar 500 μ M durant 10 minuts o 1 hora respectivament. Les anàlisis estadístiques es van realitzar per el test de la *t* de Student: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. **B)** Les cèl·lules IEC-6 es van infectar amb un adenovirus control (Ad.Null) o un adenovirus que codifica per una forma mutada de l'AMPK (Ad. α 1DN) (30 pfu/cèl.). 24 hores post-infecció es van incubar les cèl·lules amb adenosina 10 μ M durant 10 minuts. L'activitat AMPK total es va mesurar en lisats cel·lulars sense immunoprecipitació prèvia realitzant un assaig quinasa amb el pèptid AMARA i la regulació de l'ACC es va determinar mitjançant Western blot sota les mateixes condicions. Com a control de l'eficiència d'infecció, es va mesurar la proteïna total de α 1AMPK per Western blot en cèl·lules control i cèl·lules infectades amb els adenovirus Ad.Null i Ad. α 1DN

Per tal de comprovar que aquest efecte sobre l'ACC està mitjançat per l'AMPK, es va utilitzar un vector adenoviral que expressa una forma mutada de l' α 1AMPK (Ad α 1DN). La sobreexpressió d'aquesta proteïna mutada resulta en un efecte inhibitori dominant negatiu sobre l'activitat endògena de les cèl·lules, observant-se tant una disminució de l'activitat basal de l'AMPK com una disminució de la forma fosforilada de l'ACC (**figura 39.B**). Les cèl·lules no infectades i les

cèl·lules infectades amb un adenovirus control mantenen l'increment d'activitat AMPK en resposta al tractament amb adenosina, no obstant, les cèl·lules infectades amb l'adenovirus Ad α 1DN a més de presentar una disminució de l'activitat basal de la proteïna quinasa han perdut la capacitat de respondre al nucleòsid. Així, no s'observa cap increment, ni de l'activitat de l'AMPK ni de la fosforilació de l'ACC, després de l'addició d'adenosina, la qual cosa demostra que l'efecte produït sobre l'ACC requereix l'activació de l'AMPK. L'anàlisi per *Western blot* dels nivells de proteïna totals de la subunitat α 1 revela que la transducció adenovírica amb la forma mutant resulta en un nivell de proteïna més elevat al dels que s'obté quan s'utilitza el corresponent vector control (Ad.null).

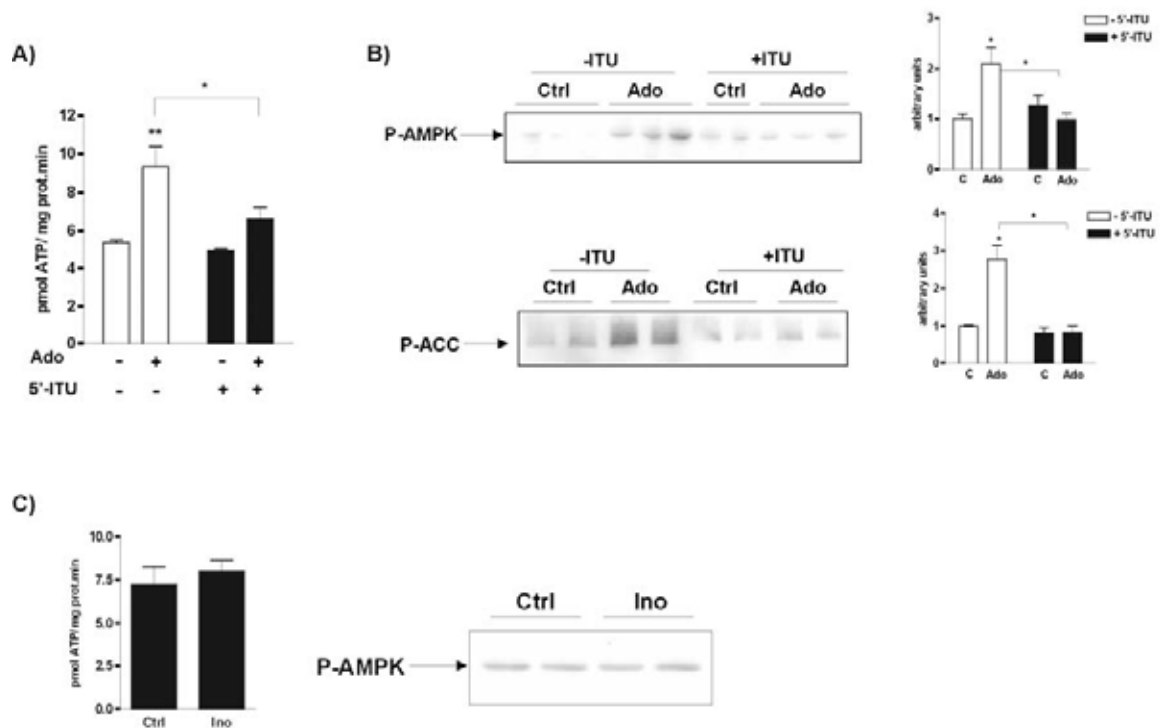


Figura 40: La fosforilació de l'adenosina és necessària per l'activació de l'AMPK en cèl·lules IEC-6. L'efecte de la inhibició de l'adenosina quinasa sobre la inducció de l'activitat de l'AMPK per adenosina es va dur a terme pre-incubant les cèl·lules IEC-6 amb 5'-iodotubercidina (5'-ITU) 0.2 μ M durant 30 minuts. (A) Activitat α 1AMPK endògena. (B) Westerns blot representatius dels nivells de fosfo-AMPK i fosfo-ACC i corresponents anàlisis densitomètriques. Significativitat estadística pel test de la *t* de Student: * p <0.05, ** p <0.01. (C) Les cèl·lules IEC-6 es van tractar amb inosina 10 μ M durant 10 minuts i es va determinar l'activitat i els nivells de fosforilació de l'AMPK.

L'adenosina és un autocoid que exerceix una varietat de funcions a través de diferents tipus de receptors de membrana (receptors d'adenosina, AR). En aquest sentit, per tal de descartar la possibilitat que l'activació de l'AMPK per adenosina es tractés d'un efecte purinèrgic, es va bloquejar la fosforilació de l'adenosina i conseqüent formació d'AMP, mitjançant la 5'-iodotubercidina, un inhibidor de l'adenosina quinasa, l'enzim que catalitza aquesta reacció (**figura 40**). Com es pot observar, el pretractament de les cèl·lules IEC-6 amb iodotubercina 0.2 μM durant 30min produeix un bloqueig de l'increment d'activitat AMPK en resposta a l'adenosina (**figura 40.A**). La inhibició de l'adenosina quinasa bloqueja de la mateixa manera l'increment dels nivells de les formes fosforilades de l'AMPK i l'ACC (**figura 40.B**). En efecte, el tractament amb 5'-iodotubercidina prevé l'augment de les concentracions intracel·lulars d'AMP en resposta al nucleòsids (**Taula 6**). En aquestes condicions també es produeix una disminució clara de les concentracions d'ADP i en menor mesura de les concentracions d'ATP, fet que podria ser degut a mecanismes compensatoris associats a la inhibició de la fosforilació de l'adenosina. Addicionalment, la inosina, un metabolit generat a partir de la desaminació de l'adenosina via l'adenosina deaminasa, no produeix cap canvi significatiu de la fosforilació ni de l'activitat AMPK (**figura 40.C**). Aquests resultats permeten afirmar que la metabolització de l'adenosina, i més precisament la seva fosforilació, és necessària perquè tingui lloc l'activació de l'AMPK.

Arribats a aquest punt, ens vam plantejar establir la contribució del transport d'adenosina en l'activació de l'AMPK, i en particular determinar el possible paper de transportadors específics en aquest efecte. Així, es va analitzar de manera independent la possible implicació del transportador concentratiu d'alta afinitat d'adenosina CNT2 i d'altra banda el paper dels transportadors equilibratius ENT1 i ENT2 en aquest efecte. Com que no existeixen inhibidors específics de l'activitat CNT2, aquest estudi es va dur a terme mitjançant una inhibició *en cis* amb un excés de Formicina B, un substrat d'alta afinitat per CNT2 no metabolitzable (**figura 41**). Per tal de poder determinar més clarament el paper de CNT2, aquests experiments es van monitoritzar a una concentració d'adenosina d'1 μM . En presència de Formicina B a una concentració de 100 μM s'aconsegueix un 65% d'inhibició de la component de transport d'adenosina dependent de sodi (**figura 41.A**). En aquestes condicions, el transport independent de sodi via ENT1 i ENT2 es manté insensible a la inhibició per formicina B. Cal destacar que no es va poder augmentar la

concentració d'aquest nucleòsid perquè tot i inhibir-se completament la component concentrativa també es produïa una lleugera disminució del transport equilibratiu. Com s'ha demostrat, l'adenosina 1 μM produeix un increment de l'activitat de l'AMPK que es tradueix en un augment de la fosforilació de l'ACC. Tanmateix, en presència de formicina B, és a dir quan la funció CNT2 està parcialment inhibida, es bloqueja la inducció de l'activitat de l'AMPK (**figura 41.B**) i de la mateixa manera tampoc incrementen els nivells de la forma fosforilada de l'ACC (**figura 41.C**).

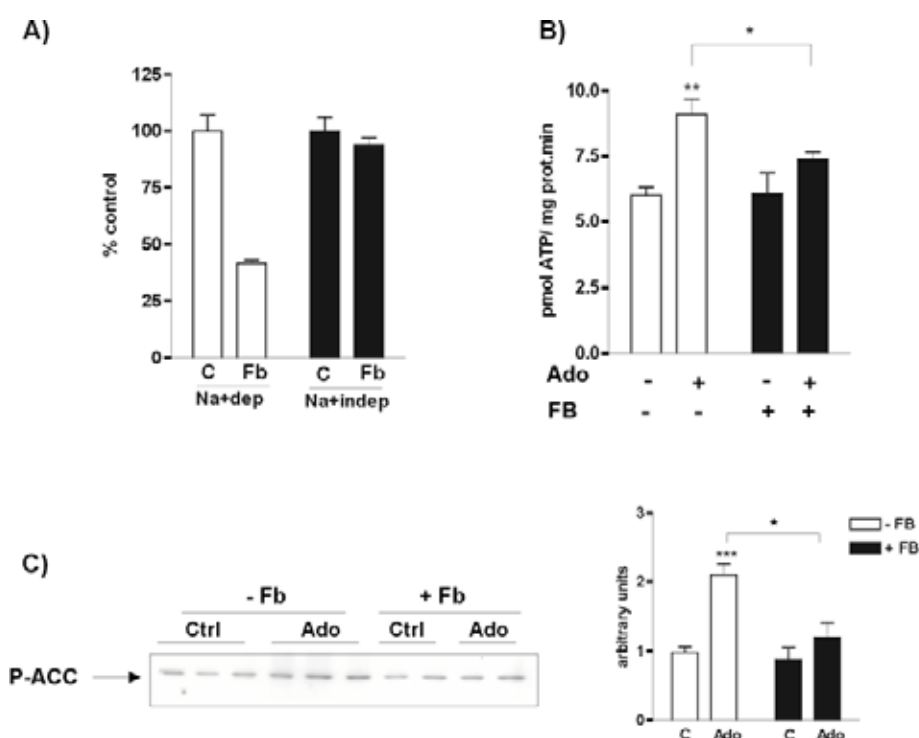


Figura 41: Efecte de la inhibició de l'activitat del transportador CNT2 sobre la regulació de l'AMPK per adenosina en cèl·lules IEC-6. **A)** Inhibició del transport dependent i independent de sodi per Formicina B 100 μM (Fb). **B/C)** Les cèl·lules van tractar-se amb adenosina 1 μM en presència i absència de Formicina B 100 μM durant 10 minuts i a continuació es va determinar l'activitat α_1 AMPK (**B**) i els nivells de fosfo-ACC (**C**). La significativitat estadística es va dur a terme per el test de la *t* de Student, essent: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

D'altra banda, el possible paper dels transportadors equilibratius es va determinar mitjançant la inhibició de la seva funció amb una barreja de NBTI, inhibidor específic d'ENT1, i dipiridamol, inhibidor d'ENT1 i d'ENT2 (**figura 42**). Les concentracions usades van ser d'1 μM de cadascun dels inhibidors; sota aquestes condicions el transport equilibratiu és inhibit al voltant d'un 80%, sense produir-se canvis significatius de l'activitat CNT2 (**figura 42.A**). S'ha de tenir en compte que, com s'ha comentat a la Introducció les isoformes de rata rENT1 i rENT2 són molt

més resistents a la inhibició per dipiridamol, per això no s'aconsegueix una inhibició total del transport equilibratiu en cèl·lules IEC-6. En aquest cas, a diferència de l'anterior, la inhibició de la funció dels ENTs no bloqueja l'activació de l'AMPK en presència d'adenosina. Així, es pot apreciar que l'increment tant d'activitat de l'AMPK com de la fosforilació de l'ACC es manté quan es tracten les cèl·lules amb adenosina 1 μ M tot i afegir alhora NBTI i dipiridamol (**figura 42.B**). Els resultats obtinguts suggereixen que el transport de l'adenosina extracel·lular és imprescindible perquè es produeixi l'activació de l'AMPK, i el transportador concentratiu d'alta afinitat d'adenosina CNT2 sembla ser el principal responsable d'aquest efecte.

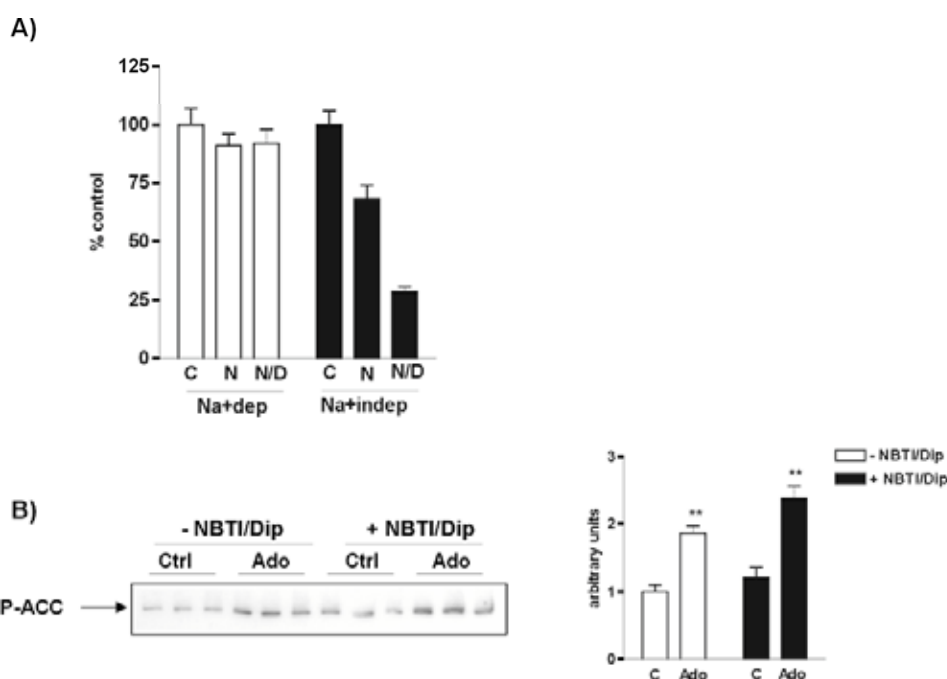


Figura 42: Efecte de la inhibició dels transportadors equilibratius sobre la regulació de l'AMPK per adenosina en cèl·lules IEC-6. A) Inhibició del transport d'adenosina per NBTI 1 μ M (N) i per una barreja de NBTI 1 μ M i dipiridamol 1 μ M (N/D). **B)** Anàlisi dels nivells de fosfo-ACC en cèl·lules incubades amb adenosina 1 μ M en presència o absència de NBTI 1 μ M i dipiridamol 1 μ M durant 10 minuts. Significativitat estadística mitjançant el test de la *t* de Student essent $**p < 0.01$.

Una vegada establert el paper de l'adenosina extracel·lular en l'activació de l'AMPK en la línia cel·lular intestinal de rata IEC-6, es va comprovar si aquest efecte es reproduïa en cèl·lules hepàtiques (cèl·lules FAO i cultiu primari d'hepatòcits), models on s'ha estudiat més extensament el seu paper en la regulació del metabolisme energètic (Carling 2005, Hardie 2004; Ferré et al., 2003). La caracterització de l'expressió dels transportadors de nucleòsids en els models

hepàtics duta a terme en el nostre laboratori (del Santo et al., 1998) ha demostrat que tant les cèl·lules FAO com els hepatòcits expressen els transportadors equilibratius ENT1 i ENT2 i com a principal transportador concentratiu presenten el transportador CNT2.

El tractament de les cèl·lules FAO amb adenosina 10 μM i aicar 500 μM , produeix un increment significatiu de l'activitat $\alpha_1\text{AMPK}$ (**figura 43.A**) i aquest efecte es tradueix en un augment de la forma fosforilada de la seva diana, l'ACC (**figura 43.B**). Addicionalment, de la mateixa manera que en el cas de les cèl·lules IEC-6, l'activació desapareix quan es bloqueja la fosforilació de l'adenosina i en conseqüència la formació d'AMP mitjançant un pretractament amb 5'-iodotubercidina 0.5 μM durant 30min (**figura 43.B**)

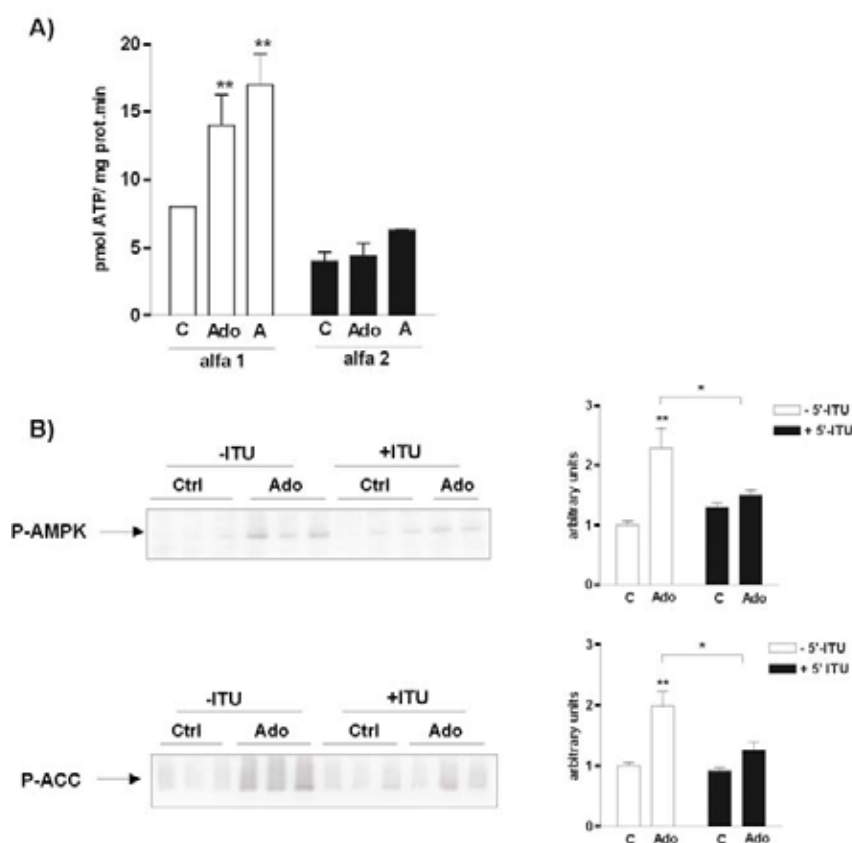


Figura 43: L'adenosina extracel·lular activa l'activitat $\alpha_1\text{AMPK}$ en la línia cel·lular FAO derivada d'hepatoma de rata. A) Es van mesurar les activitats endògenes α_1 i $\alpha_2\text{AMPK}$ en cèl·lules FAO tractades amb adenosina 10 μM i aicar 500 μM durant 30 minuts i 1 hora respectivament. **B)** Es van pre-tractar les cèl·lules amb 5'-iodotubercidina 0.5 μM (ITU) i a continuació es va afegir adenosina 10 μM . Trenta minuts després es van extreure extractes de proteïna per determinar l'estat de fosforilació de l'AMPK i l'ACC. Es mostren dos *Westerns blot* amb les anàlisis densitomètriques corresponents. La significativitat estadística pel test de la *t* de Student, essent * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

A fi de valorar la rellevància fisiològica d'aquest fenomen, es van realitzar els mateixos experiments en cultius primaris d'hepatòcits, i en aquest model d'estudi, els resultats anteriors es van reproduir. Així, es va observar una activació de l'AMPK en presència d'adenosina que resulta en un increment de la fosforilació de l'ACC (figura 44).

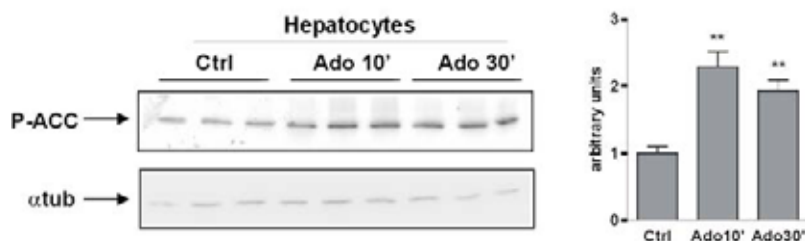


Figura 44: L'adenosina activa l'AMPK i fosforila la seva diana downstream en cultiu primari d'hepatòcits de rata. Es van tractar els hepatòcits amb adenosina 10 μ M i es van extreure extractes de proteïna als temps indicats per tal de mesura els nivells de fosfo-ACC. Es mostra un Western blot representatiu i l'anàlisi densitomètrica corresponent. Els resultats s'expressen en unitats arbitràries normalitzades als valors obtinguts en cèl.lules no tractades i relativitzades al control de càrrega (β -actina). Significativitat estadística per el mètode de la *t* de Student, essent ** $p < 0.01$.

El conjunt de resultats d'aquest bloc posen de manifest, com es mostra en l'esquema següent (figura 45), que l'adenosina extracel·lular, entra dins la cèl·lula via els ENTs i majoritàriament via CNT2 i una vegada a l'interior cel·lular mitjançant l'acció de l'adenosina quinasa dona lloc a AMP. L'AMP actua tant de manera alostèrica com afavorint la fosforilació de l'AMPK per la la LKB1, la seva quinasa *upstream*, produint un increment de l'activitat AMPK que acaba resultant en la modulació de les seves dianes, en aquest cas l'ACC.

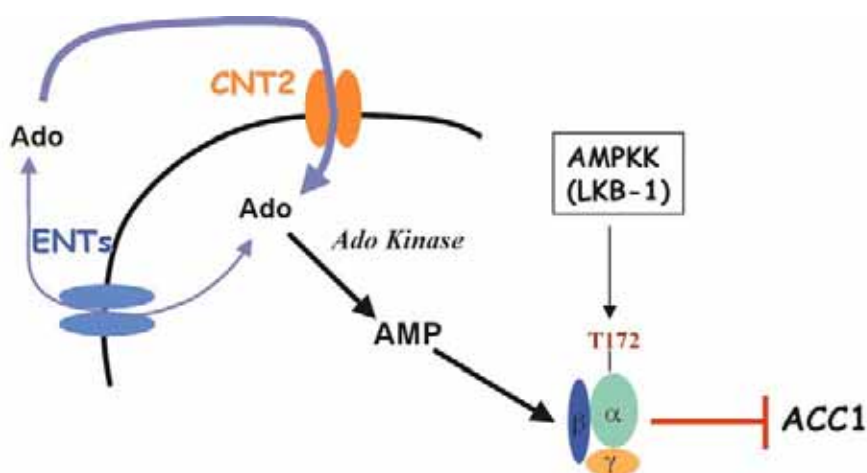


Figura 45: Esquema de la regulació de l'AMPK per adenosina extracel·lular.

La línia cel·lular IEC-6, a més de presentar un transport equilibratiu corresponent als transportadors de tipus ENT, reté un elevat nivell de proteïna i missatger del transportador concentratiu CNT2, que resulta en una elevada captació sodi-dependent d'adenosina. Com s'ha comentat al llarg d'aquesta memòria, els transportadors concentratius de nucleòsids es localitzen a la membrana apical de les cèl·lules intestinals i renals (Patil and Unadkat, 1997; Lai et al., 2002, Mangravite et al., 2001; Valdés et al., 2000). Addicionalment, en el primer apartat de resultats d'aquesta tesi s'ha posat de manifest que l'expressió de CNT2 en cèl·lules IEC-6 no respon a senyals mitogènics però en canvi està regulat transcripcionalment per glucocorticoids, agents implicats en el desenvolupament del fenotip diferenciat dels enteròcits. A partir d'aquestes observacions, tot i que sembla que el principal paper d'aquest transportador en epitelí intestinal és l'absorció dels nucleòsids de la dieta, es va decidir estudiar la possible implicació d'aquest transportador en la senyalització cel·lular, en concret en la via de senyalització de l'AMPK.

L'AMPK és un enzim que respon a un increment dels nivells d'AMP, tradicionalment relacionats amb un canvi en el metabolisme energètic, activant processos que produeixen ATP i inhibint les vies que en consumeixen. Donat que l'adenosina és captada a través dels transportadors de nucleòsids i una vegada a l'interior cel·lular és fosforilada generant AMP, es va voler establir el possible paper de l'adenosina extracel·lular en l'activació de l'AMPK. Els resultats obtinguts en la línia cel·lular IEC-6 han demostrat que aquest nucleòsid activa l'AMPK actuant de manera específica sobre els complexos formats per la isoforma catalítica $\alpha 1$, els quals són predominants en aquestes cèl·lules. Es tracta d'un efecte ràpid i dependent de dosi, amb una $K_{0.5}$ aparent aproximada de 0.47. Així, l'efecte sembla fisiològicament rellevant: en primer lloc, les concentracions d'adenosina utilitzades no són farmacològiques com les que s'han usat en d'altres estudis (Saitoh et al., 2004); en segon lloc, l'activació de l'AMPK es tradueix en una modulació de l'ACC, una de les seves principals dianes; i finalment l'efecte és bloquejat quan es sobreexpressa una isoforma mutada que actua dominant negatiu de la subunitat $\alpha 1$ AMPK endògena. Addicionalment, la magnitud de l'efecte induït per l'adenosina està en el rang del què s'ha prèviament descrit per l'activació fisiològica de l'AMPK com per exemple en el cas de la seva activació per l'adiponectina en adipòcits (Wu et al., 2003).

L'adenosina juga un paper determinant en la peristalsis i els processos de secreció intestinals. En l'epiteli intestinal, així com en l'epiteli colònic i línies derivades s'ha detectat la presència dels quatre receptors d'adenosina (A1, A2a, A2b i A3) i s'ha demostrat la seva implicació en la regulació del transport d'ions i aigua en aquest teixits a través de l'estimulació d'una varietat de vies de transducció de senyals (Bucheimer and Linden, 2004; Christofi et al., 2001; Hancock and Coupar, 1995a;b). En aquest sentit, l'activació de l'activació de la secreció de Cl⁻ a través dels receptors d'adenosina A2b és un dels efectes més ben caracteritzats. En aquest cas i segons la via clàssica, l'activació purinèrgica dels receptors A2b acoblats a proteïnes G, produeixen l'activació de l'adenilat ciclase i en conseqüència un increment dels nivells d'AMPc que actuen directament sobre el canal de Cl⁻ (CFTR) en el colon (Clancy et al., 1999). Tanmateix, s'ha demostrat que això no és el que té lloc en el nostre sistema. En efecte, si es tractés d'una activació purinèrgica, la inhibició del transport d'adenosina i la seva fosforilació haurien produït un increment de les concentracions extracel·lulars d'adenosina afavorint així la seva assequibilitat pels receptors P1 i l'activació de l'AMPK. Però en el nostre model, l'estimulació de la AMPK, i en conseqüència la modulació de l'ACC, és deguda a un increment en el *pool* intracel·lular d'AMP produït per l'entrada de l'adenosina extracel·lular i a la seva conversió a AMP.

La possible contribució de les diferents isoformes de transportadors de nucleòsids en l'activació de l'AMPK en resposta al tractament amb adenosina es va dur a terme de manera independent mitjançant d'una banda la inhibició del transportador concentratiu CNT2 i d'altra banda la inhibició dels transportadors equilibratius ENT1 i ENT2. En el cas de CNT2, com que no existeixen inhibidors específics de la seva funció, només es va poder aconseguir una inhibició parcial sense que es produís una alteració del transport equilibratiu. Utilitzant una concentració d'1 μM d'adenosina, s'observa un augment significatiu d'aproximadament el 50% per sobre l'activitat i l'estat de fosforilació basals de l'AMPK. Cal destacar que l'activació que es produeix *in situ*, és difícil de determinar, ja que com que l'assaig quinasa es realitza sota condicions saturants d'AMP, no es tenen en compte els efectes alostèrics de les concentracions variables d'AMP que estan en contacte amb l'enzim *in vivo*. Tanmateix, una concentració d'1 μM d'adenosina resulta en un increment de la fosforilació de l'ACC i aquest efecte és completament bloquejat quan la funció CNT2 és inhibida només un 65%. Aquest

seguit de dades suggereixen que, a banda del seu paper en l'absorció, CNT2 també contribueix a la via de senyalització de l'AMPK. S'ha descrit que en els enteròcits la síntesi de lípids de *novo* presenta una regulació nutricional (Haidari et al., 2002), en aquest context és temptador especular que l'increment de l'assequibilitat d'adenosina en el lumen, associat a la ingesta, podria modular els processos metabòlics en l'epiteli intestinal mitjançant l'activació de l'AMPK i les seves dianes *downstream*.

D'altra banda, es va analitzar el possible paper dels transportadors equilibratius en aquest efecte mitjançant la inhibició de la seva funció amb NBTI i dipiridamol. Com per CNT2, no es va poder aconseguir una inhibició completa sense produir una modulació de l'activitat concentrativa. Tanmateix, a diferència del què s'observa en el cas de CNT2, un 80% d'inhibició del transport mitjançat pels ENTs no és suficient per bloquejar la fosforilació de l'AMPK i l'ACC en resposta a adenosina. Aquests resultats semblarien indicar la possibilitat que CNT2 sigui un mitjancer clau de l'activació de l'AMPK induïda per adenosina extracel·lular. Tanmateix, aquesta observació no descarta la possibilitat que altres tipus cel·lulars que no expressen cap activitat de transport de nucleòsids concentrativa puguin contar amb els transportadors equilibratius per mitjançar els efectes de l'adenosina extracel·lular.

Tot i que inicialment es pensava que l'expressió dels transportadors concentratius estava restringida als epitelis absortius (principalment intestinal i renal), les anàlisis de la distribució de CNT2 han permès la seva detecció en la majoria de teixits (Valdés et al., 2000). Així, el transportador concentratiu d'alta afinitat d'adenosina, CNT2, s'expressa de manera abundant en fetge, pulmó, pàncreas, cervell, teixit adipòs, així com en cor i múscul esquelètic tot i que a nivells més baixos (Valdés et al., 2000). Recentment, en el nostre grup de recerca s'ha posat de manifest que la seva funció en el fetge està regulada per l'activació purinèrgica del receptor A1 a través d'un mecanisme que implica la obertura dels canals de potassi dependents d'ATP (K_{ATP}) (Duflot et al., 2004). Addicionalment s'ha demostrat que la regulació purinèrgica de CNT2 és dependent dels nivells de glucosa extracel·lulars (Duflot et al., 2004). Aquest treball va ser la primera evidència indirecta que suggeria la possible interacció entre el transport d'adenosina i l'estat energètic de la cèl·lula. Per aquesta raó es va decidir determinar si l'activació de l'AMPK induïda per l'adenosina extracel·lular es produïa

en cèl·lules hepàtiques, on el paper de l'AMPK en el metabolisme energètic està més ben documentat (Ferré et al., 2003; Ruderman et al., 2003; Rutter et al., 2003). Tant en el cas de la línia cel·lular derivada d'hepatoma de rata (FAO) com en cultius d'hepatòcits primaris de rata, es va observar un efecte similar al de la línia cel·lular intestinal IEC-6. Addicionalment, tant en cèl·lules FAO com en hepatòcits, la inducció de l'activitat AMPK en resposta a l'addició d'adenosina és bloquejada en presència de l'inhibidor de l'adenosina quinasa 5'-ITU, suggerint que el transport i la fosforilació de l'adenosina també són essencials perquè l'adenosina extracel·lular activi l'AMPK en cèl·lules hepàtiques. Un dels principals efectes de l'activació de l'AMPK en hepatòcits és la inhibició de la gluconeogènesi, la lipogènesi i la síntesi de colesterol (Hardie and Carling, 1997; Carling, 2004); en aquest sentit aquest estudi ha demostrat que l'entrada de l'adenosina extracel·lular comporta la fosforilació de l'ACC via l'activació de l'AMPK. Cal destacar que diversos autors han estudiat el paper de l'adenosina en determinades funcions metabòliques hepàtiques (Lund et al., 1975; Carabaza et al., 1990). En alguns casos les concentracions d'adenosina usades són molt superiors al que s'espera en el rang fisiològic i a més s'ha de tenir en compte la possible presència de respostes purinèrgiques, tanmateix, potser seria interessant poder re-evaluar els efectes de l'adenosina sobre el metabolisme energètic. En aquest context, tenir en consideració el paper dels processos de transport a concentracions fisiològiques d'adenosina podria ajudar a discriminar entre els processos que tenen lloc via receptors dels mitjançats pel transport i subseqüent metabolització.

En conclusió, aquest estudi demostra que les concentracions fisiològiques d'adenosina poden activar l'AMPK mitjançant un mecanisme que depèn del seu transport i subseqüent fosforilació a l'interior cel·lular, resultant en la modulació d'una de les dianes de l'AMPK, l'acetilCoA carboxilasa. Aquest efecte sembla dependre en certa mesura del transportador concentratiu d'alta afinitat d'adenosina, CNT2. Així, la funció CNT2 no només respondria als requeriments cel·lulars per a la síntesi de nucleòtids sinó que podria jugar un paper en la senyalització. Per tant, aquest transportador de membrana podria considerar-se un nou jugador de la complexa regulació de l'AMPK i del metabolisme energètic cel·lular.

4. ESTUDI DELS DETERMINANTS ESTRUCTURALS IMPLICATS EN LA INSERCIÓ DEL TRANSPORTADOR CNT2 A LA MEMBRANA PLASMÀTICA.

La majoria de tipus cel·lulars coexpressen diferents isoformes de transportadors de nucleòsids tant concentratius com equilibratius. Addicionalment, en cèl·lules absortives intestinals i renals, s'ha suggerit que aquests transportadors mitjançarien un flux vectorial de nucleòsids en una direcció (re)absortiva, és a dir des de la llum intestinal o tubular fins a la circulació. Tanmateix, la capacitat de les cèl·lules epitelials per a dur a terme aquesta funció depèn de la distribució asimètrica dels transportadors de nucleòsids entre les seves membranes apical i basolateral, com s'ha descrit per altres famílies de transportadors (Kanai et al., 2000; Wright et al., 2003). Els primers estudis funcionals realitzats en vesícules de membrana apical i basolateral d'epitelis renals i intestinals van indicar una presència majoritària de les activitats concentratives N1 i N2 (corresponents a les entitats moleculars CNT2 i CNT1 respectivament) a la membrana apical mentre el transport basolateral semblava mitjançat principalment per activitats equilibratives. Aquests resultats van ser corroborats per estudis de *Western blot* i immunocitoquímica realitzats gràcies a la generació d'anticossos específics contra aquestes proteïnes (Valdés et al., 2000; Hamilton et al., 2001). No obstant, alguns estudis també indicaven la presència d'una activitat equilibrativa a la membrana apical de les cèl·lules renals (Trimble and Coulson, 1984; Williams et al., 1989; Doherty and Jarvis, 1993). Recentment, la generació de models d'expressió estable dels diferents transportadors marcats amb proteïnes fluorescents han proporcionat les primeres evidències directes de la localització asimètrica dels transportadors concentratius i equilibratius en una línia cel·lular renal (Lai et al., 2001; Mangravite et al., 2001; 2003a, 2003b)

En cèl·lules epitelials polaritzades, les proteïnes de membrana són classificades a nivell de l'aparell de golgi i enviades cap a la seva localització final, tant sigui a la membrana apical com a la basolateral. Recentment, han començat a dur-se a terme estudis per tal d'identificar els residus aminoacídics implicats en els senyals moleculars que determinen la localització concreta dels diferents transportadors de membrana. En aquest sentit, s'ha descrit que els senyals de direccionament (*sorting*) a la membrana estan desencadenats per diferents seqüències d'aminoàcids situades principalment en dominis citoplasmàtics i que

interactuen amb la maquinària cel·lular de *sorting*. Moltes d'aquestes seqüències consens, com per exemple el motiu de tirosines (NPXY) o les repeticions de dileucina, estan relacionades amb senyals de localització en cavitats de clatrina. Aquests senyals semblen estar implicats tant en el repartiment correcte de la proteïna a la membrana basolateral com en el seu reciclatge per vies d'endocitosi. D'altra banda, el direccionament de les proteïnes a la membrana apical sembla més confós o ha estat menys estudiat. Aquest procés sembla basar-se en la segregació de les proteïnes apicals en vesícules o *rafts* enriquits en lípids que es distribueixen preferentment a la membrana apical de les cèl·lules. En certs casos, sembla que la incorporació en aquestes vesícules depengui de la presència de motius de glicosilació o d'ancoratges de glicosilfosfatidilinositol.

En el cas concret dels transportadors de nucleòsids, no es coneixen els residus implicats en la distribució dual a les dues membranes de les cèl·lules polaritzades. Els pocs estudis realitzats no han permès determinar les seqüències crítiques responsables de la localització de les diferents isoformes. En aquest sentit, Mangravite i col·laboradors han descrit que la mutació o delecció de residus concrets situats a l'extrem carboxi-terminal d'ENT1 (R453A i Δ RAIV) i d'ENT2 (L455R) no produeix canvis de la localització basolateral d'aquests transportadors. Tanmateix, els mateixos autors han demostrat que la delecció del motiu de dileucina situat a l'extrem COOH-terminal d'ENT2 produeix certa acumulació de la proteïna en vesícules intracel·lulars i la seva expressió en oòcits de *Xenopus* resulta en una funció reduïda si es compara amb la seqüència sencera, fet que demostraria la implicació d'aquest motiu en l'expressió del transportador a la superfície cel·lular. D'altra banda l'únic estudi sobre els determinants moleculars implicats en la localització subcel·lular dels transportadors concentratius ha posat de manifest que en el cas concret del transportador CNT2 els residus de N-glicosilació no són essencials per al seu direccionament a la membrana apical de les cèl·lules polaritzades (Mangravite and Giacomini, 2003). Cal destacar que tot i que els transportadors concentratius se situen de manera predominant a la membrana apical de les cèl·lules epitelials absortives, el patró d'expressió entre les diferents isoformes és lleugerament diferent. Així, en cèl·lules derivades d'epiteli renal s'ha descrit que l'expressió de CNT1 es restringeix a la membrana apical i en canvi CNT2 també es localitza a la membrana basolateral tot i que en menor quantitat que a la membrana apical. Aquestes observacions indicarien l'existència de mecanismes de tràfic i *sorting* diferents pels dos transportadors, fet que s'ha posat

de manifest en cèl·lules hepàtiques, on CNT2 s'expressa a la membrana basolateral i en canvi CNT1, mitjançant la via transcitòtica, s'acaba insertant a la membrana canalicular dels hepatòcits (Duflot et al., 2002).

En base a aquests antecedents i a resultats recents obtinguts en el nostre laboratori que indicaven per primera vegada l'existència d'una regulació de la inserció del transportador concentratiu CNT2 a la membrana plasmàtica (Fernández-Veledo, enviat), es va decidir generar una sèrie d'eines a fi de poder observar la localització i tràfic d'aquest transportador en resposta a factors fisiològics. Addicionalment, ens vam plantejar estudiar la possible implicació de l'extrem amino-terminal de CNT2 en la seva expressió a la superfície cel·lular i en concret en la seva localització apical en cèl·lules polaritzades.

4.1 Generació i caracterització de construccions per determinar la localització subcel·lular de CNT2.

Com s'ha detallat en l'apartat de Materials i Mètodes, es van generar diferents construccions del transportador concentratiu CNT2 de rata. En primer lloc es va subclonar la seqüència sencera rCNT2 en el vector d'expressió en cèl·lules de mamífer (pcDNA3), i a continuació es van generar dues construccions (CNT2-myc i YFPCNT2) que permeten detectar la proteïna amb més facilitat, tant per immunofluorescència com per altres finalitats com pot ser la immunoprecipitació.

Per tal de comprovar la funció i localització de les proteïnes transportadores CNT2, CNT2-myc i YFPCNT2 es van transfectar les diferents construccions en cèl·lules CHO. Com es pot observar a la **figura 46.A**, les taxes de transport dependent de sodi són similars per a les tres proteïnes transportadores i no existeixen diferències entre la seva especificitat, de manera que accepten guanosina però no citidina com a substrat. Tanmateix, la caracterització cinètica mostra certes variacions dels paràmetres cinètics. Així, mentre CNT2 i CNT2-myc presenten K_m aparents i V_{max} idèntiques, la construcció YFPCNT2 presenta una lleugera disminució de la K_m aparent (tot i mantenir-se en el rang μM baix) i també es pot observar una clara disminució de la V_{max} del transportador (**figura 46.C**). És lògic pensar que la unió de CNT2 amb una proteïna de 30 KDA pot dificultar en part el seu tràfic i inserció a la membrana plasmàtica. Tanmateix, tots els assaigs funcionals s'han dut a terme sota condicions de velocitat inicial, és a dir a una

concentració de guanosina d'1 μM durant 1 min d'incubació, i en aquestes condicions les taxes de transport entre les diferents construccions són similars (**figura 46.A**). Quan s'analitza la localització subcel·lular de la proteïna mitjançant immunofluorescència directa (en el cas de YFPCNT2) o immunocitoquímica amb un anticòs anti-myc (en el cas de CNT2-myc), s'observa un clar marcatge a la membrana plasmàtica de les cèl·lules i un cert marcatge intracel·lular en el cas de la construcció YFPCNT2, que seria consistent amb els resultats obtinguts en la caracterització cinètica (**figura 46.B**).

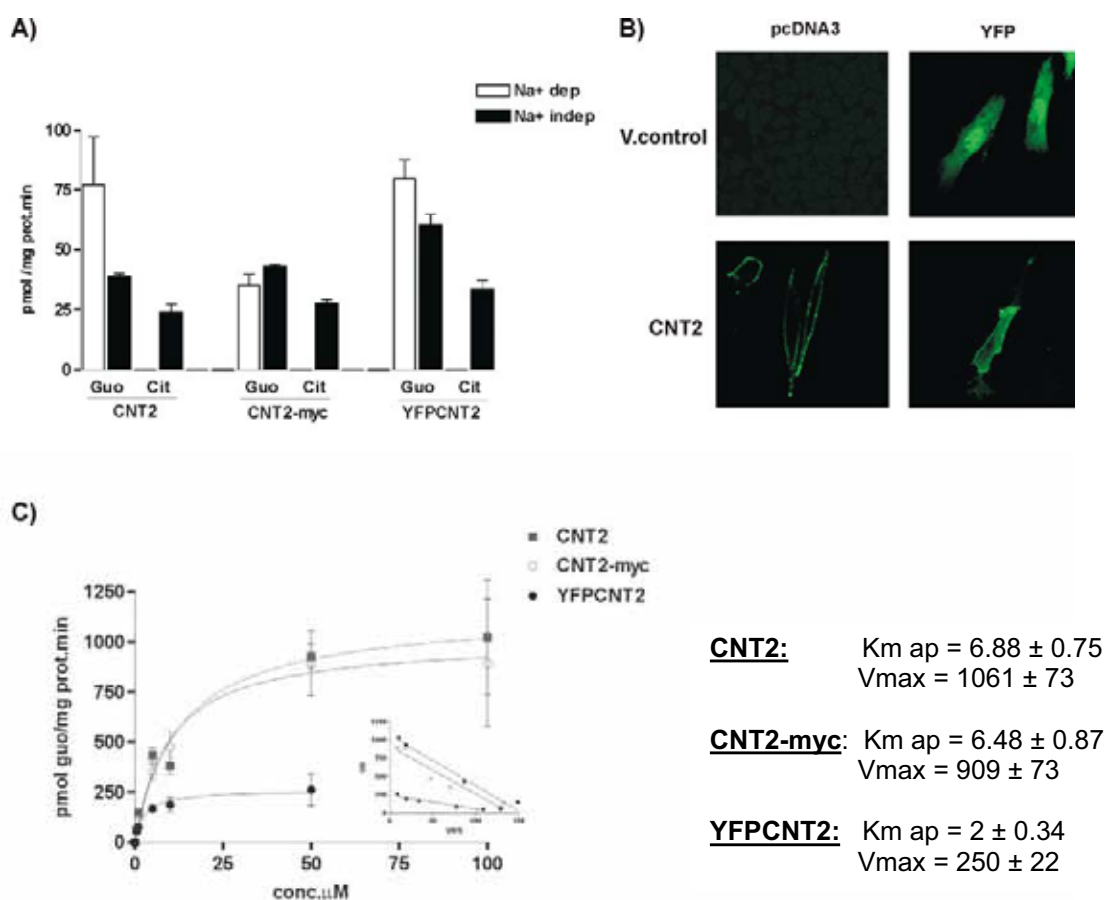


Figura 46: Determinació de l'activitat i localització subcel·lular de CNT2, CNT2-myc i YFPCNT2 en cèl·lules CHO. Les cèl·lules CHO es van transfectar amb els plàsmids CNT2pcDNA₃, CNT2-mycpcDNA₃, i YFPCNT2. **A)** Mesura del transport de guanosina 1 μM i citidina 1 μM 24 hores després de la transfecció. **B)** Anàlisi de la localització subcel·lular de les proteïnes mitjançant immunofluorescència directa en el cas de YFPCNT2 i mitjançant un anticòs anti-myc marcat amb FITC per CNT2-myc. **C)** Es van transfectar les cèl·lules CHO amb CNT2pcDNA₃, CNT2-myc-pcDNA₃ i YFPCNT2 i es va analitzar el transport de guanosina a diferents concentracions en presència i absència de sodi. Els resultats (mitja \pm SEM) provenen de la substracció d'ambdues taxes respectivament. També es mostra la representació lineal (Eadie-Hofstee) dels resultats i a partir de la qual s'han obtingut els paràmetres cinètics.

En paral·lel, es va determinar l'activitat i la localització de la proteïna YFPCNT2 en dos models àmpliament usats en el laboratori i que expressen de manera endògena el transportador CNT2: les cèl·lules FAO i les cèl·lules HepG2, derivades d'hepatoma de rata i humana respectivament. Tot i que els dos models expressen CNT2, només les cèl·lules FAO presenten activitat, fet probablement degut al diferent grau de diferenciació de les dues línies cel·lulars. Quan es transfecten de manera transitòria amb YFPCNT2 s'observa la presència de transport sodi-dependent en els dos models cel·lulars i en el cas de les cèl·lules FAO la taxa de transport incrementa respecte al de les cèl·lules transfectades amb el vector control (YFP-C1) (**figura 47.A**). També cal destacar que la taxa de transport és molt inferior a la de les cèl·lules CHO ja que es tracta de cèl·lules molt més difícils de transfectar i en conseqüència les eficiències de transfecció són molt menors. Addicionalment, es pot apreciar que en cèl·lules FAO el transportador es localitza principalment a la superfície cel·lular i en canvi en les cèl·lules HepG2 el marcatge és molt més intracel·lular (**figura 47.B**). Estudis realitzats en el nostre grup de recerca, dins del marc de les tesis doctorals de la Dra. Fernández- Veledo i Isabel Huber-Ruano, han posat de manifest que en models hepàtics, tant cèl·lules derivades d'hepatoma de rata (HepG2 i FAO) com en cultiu primaris d'hepatòcits, els àcids bil·liars són susceptibles de regular la inserció del transportador CNT2 a la membrana plasmàtica. D'aquesta manera, en presència d'àcid taurocòlic es produeix un increment de l'activitat del transportador que es correlaciona amb un augment de l'expressió del transportador a la superfície cel·lular (Fernández-Veledo et al., enviat). La generació d'aquestes construccions ha permès complementar els resultats obtinguts per mesures d'activitat, fraccionament subcel·lular i biotinització. Així, com es pot observar en la **figura 47.C**, el tractament de les cèl·lules HepG2 amb àcid taurocòlic 500 μ M (TC) durant 1 hora produeix un increment del marcatge de YFPCNT2 a la membrana plasmàtica.

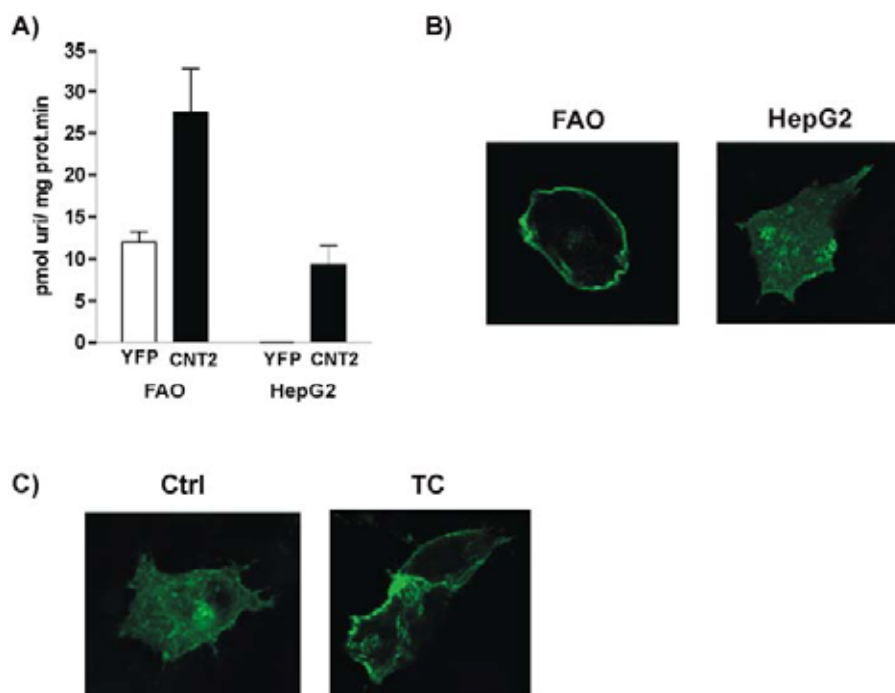


Figura 47: Anàlisi de la localització de YFPCNT2 en les línies cel·lulars FAO i HepG2. Es van transfectar les cèl·lules FAO i HepG2 amb la construcció YFPCNT2 o amb el vector control (YFP-C1) i 24 hores després es va mesurar la captació de guanosina (A) o es van fixar i es va determinar l'expressió de la proteïna directament per immunofluorescència (B). Es van transfectar les cèl·lules HepG2 i es va analitzar la localització subcel·lular de CNT2 després d'un tractament amb àcid taurocòlic 500 μ M durant 1 hora (C).

4.2 Determinants moleculars implicats en la localització del transportador.

En base al model topològic predit per a la família de transportadors concentratius (13 dominis transmembrana units per seqüències curtes i uns extrems amino i carboxi-terminal llargs) i l'anàlisi de la seqüència primària de CNT2, mitjançant el programa *Motif Scan in a Protein Sequence* (PROSITE), ens vam plantejar analitzar la possible implicació de l'extrem N-terminal, situat en el citoplasma cel·lular, en la localització subcel·lular de CNT2 i en la seva inserció a la membrana plasmàtica. Amb aquest objectiu, es van generar dues construccions, $N\Delta$ CNT2pcDNA3 i YFPN Δ CNT2, que donen lloc a una forma delectada de CNT2. En concret, s'han eliminat els primers 66 aminoàcids de l'extrem amino-terminal que segons l'anàlisi de seqüència contindrien un possible lloc de fosforilació per la PKC, dos llocs susceptibles de fosforilació per la caseïna quinasa II (CK II) i possible motiu de N-miristil·lació. La transfecció transitòria de les cèl·lules CHO i FAO amb aquestes dues construccions va posar de manifest en primer lloc

que les proteïnes delecionades són actives, el què indica que l'extrem N-terminal no és imprescindible per a la funcionalitat del transportador, com ja s'ha descrit per CNT1 i CNT3 (Hamilton et al., 2001). A més, cal destacar que el transportador de nucleòsids d'*Escherichia Coli*, NupC, és molt més petit que els homòlegs d'eucariotes de manera que no presenta ni l'extrem N-terminal ni els tres primers dominis transmembrana (Craig et al., 1994). Tanmateix, l'activitat de les formes delecionades és aproximadament un 50% inferior al de les proteïnes completes (**figura 48.A**). Addicionalment, quan s'analitza la localització subcel·lular de les dues proteïnes (YFPCNT2 i YFPN Δ CNT2) s'observa que gran part de la proteïna delecionada s'acumula a l'interior cel·lular en unes estructures en forma de grans grànuls o vesícules (**figura 48.B**). Aquesta retenció intracel·lular podria ser deguda a una alteració de l'estabilitat de la proteïna, del seu lliurament a la membrana plasmàtica o del seu reciclatge. En general, els assaigs funcionals s'han dut a terme 24 hores després de la transfecció de les cèl·lules, però es va comprovar que els resultats es reproduïen quan es realitzaven 48 o 72 hores després de la transfecció. Aquesta observació indicaria que l'efecte no és degut a un enlentiment del tràfic cap a la membrana com s'ha demostrat per d'altres proteïnes de membrana (Manganas et al., 1998). Mitjançant l'anàlisi dels paràmetres cinètics es va comprovar que la delecció de l'extrem N-terminal no afecta a la *K_m* aparent, és a dir a l'afinitat del transportador, sinó que es produeix una disminució de la velocitat màxima (**figura 48.C**). Aquests resultats indicarien que, de manera consistent amb el què s'ha observat per immunofluorescència, la diferència entre l'activitat de les dues proteïnes (YFPCNT2 i YFPN Δ CNT2) són conseqüència d'una disminució de l'expressió a la superfície cel·lular en el cas de la proteïna delecionada.

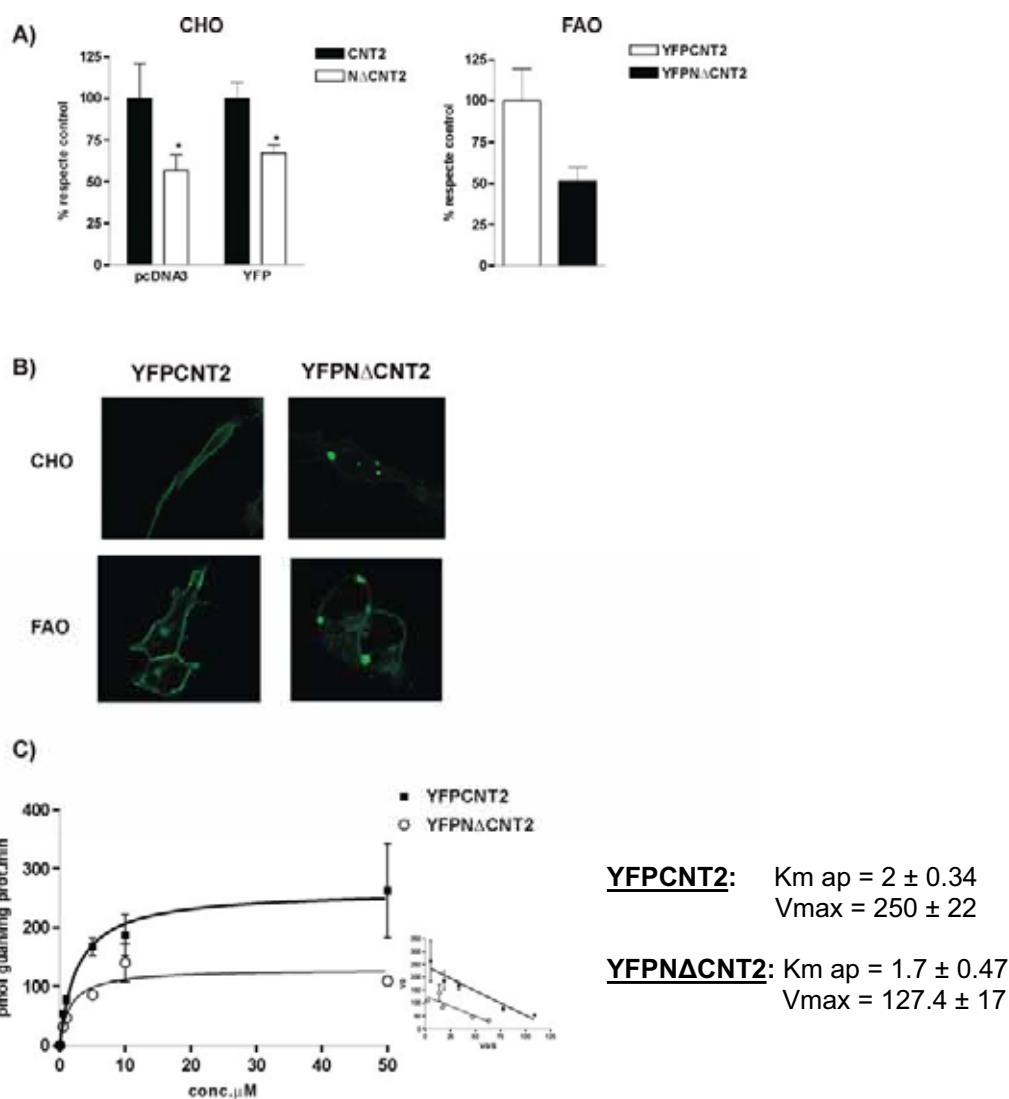


Figura 48: Efecte de la deleció de l'extrem N-terminal de CNT2 en l'activitat i localització cel·lular del transportador. Es van transfectar les cèl·lules CHO i FAO amb diferents construccions (CNT2pcDNA₃, NΔCNT2pcDNA₃, YFPCNT2 o YFPNΔCNT2) i 24 hores després es va analitzar el transport concentratiu de guanosina (A) o es van fixar les cèl·lules per tal de determinar la localització de la proteïna directament per immunofluorescència (B). Els resultats (mitja ± SEM) s'expressen en % respecte les cèl·lules transfectades amb les construccions que codifiquen per la proteïna sencera. La significativitat estadística mitjançant el mètode de la *t* de Student, essent **p*<0.05. (C) Es va realitzar una assaig de transport a diferents concentracions de guanosina en cèl·lules CHO transfectades amb YFPCNT2 o YFPNΔCNT2. Els resultats (mitja ± SEM) provenen de la substracció d'ambdues taxes respectivament. També es mostra la representació lineal (Eadie-Hofstee) dels resultats i a partir de la qual s'han obtingut els paràmetres cinètics.

A continuació, es van intentar identificar en quines estructures cel·lulars es produeix l'acumulació del transportador deletionat. Per a dur a terme aquest estudi, es van realitzar una sèrie de immunocitoquímiques amb diferents marcadors d'òrgans o vesícules intracel·lulars relacionats amb el processament i tràfic de moltes proteïnes a la membrana plasmàtica com el reticle endoplàsmic (RE), l'aparell de Golgi, les caveoles i els endosomes. Com que alguns dels anticossos de què disposem en el laboratori estan dissenyats contra proteïnes humanes, es van haver de realitzar aquests experiments utilitzant un model cel·lular humà, així, es van triar les cèl·lules HELA ja que són fàcilment transfectables i és una de les línies cel·lulars més usades en l'estudi de l'expressió heteròloga de proteïnes.

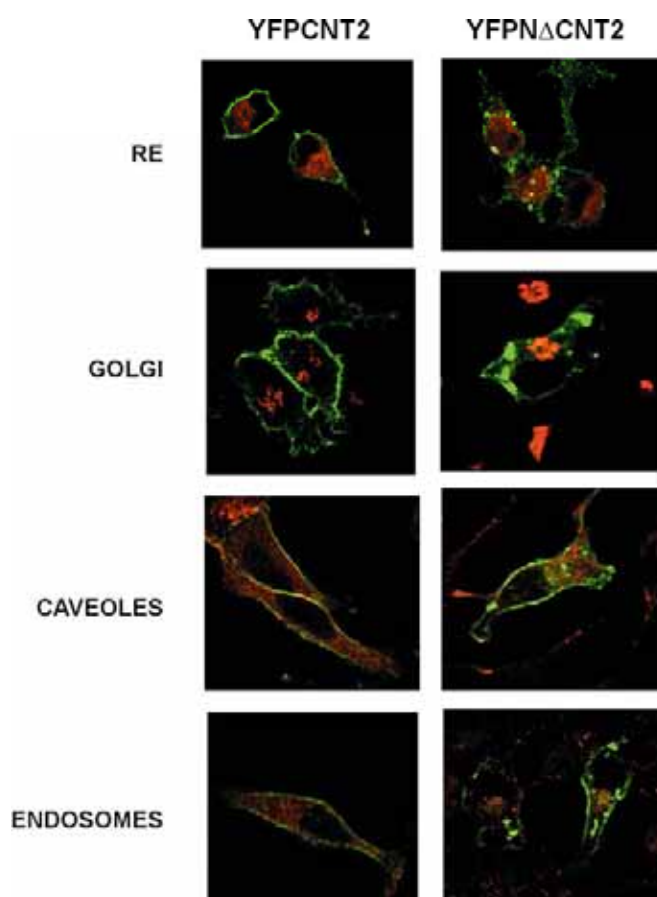


Figura 49: Estudi de la localització subcel·lular de la proteïna YFP Δ CNT2 en cèl·lules HeLa. Es van realitzar immunocitoquímiques amb els anticossos primaris anti-GM130, anti-caveolina I o anti EEA1 per tal de detectar golgi, caveoles i endosomes respectivament en cèl·lules HeLa transfectades amb YFPCNT2 o YFP Δ CNT2. Com a anticòs secundari es va usar l'anticòs Alexa Fluor 546 Goat anti-mouse IgG (fluorescència vermella) En el cas del marcatge de reticle endoplàsmic es van cotransfectar les cèl·lules amb les construccions de CNT2 indicades i el plàsmid pDsRed2-E que conté una seqüència de retenció a reticle. Les imatges que es mostren s'han obtingut mitjançant la superposició de les imatges obtingudes a les longituds d'ona d'excitació 495 (en verd) i 556 (en vermell).

Com es mostra en les imatges de la **figura 49**, cap dels diferents marcadors utilitzats col·localitza amb les estructures amb forma de grans vesícules o grànuls intracel·lulars on s'acumula el transportador CNT2 delecionat. Aquestes observacions indiquen que la proteïna delecionada no s'acumula o queda retinguda en cap de les estructures cel·lulars analitzades (RE, golgi, caveoles, endosomes). Segons el tipus d'estructures, semblaria que una part de la proteïna YFPNΔCNT2 que es sintetitza podria dirigir-se i acumular-se en autofagosomes. Tanmateix, estem a l'espera de poder realitzar les comprovacions pertinents, com per exemple una immunocitoquímica amb l'anticòs anti-rab7, per validar aquesta hipòtesi.

Tenint en compte que en cèl·lules polaritzades CNT2 es localitza de manera majoritària a la membrana apical, es va decidir expressar les construccions YFPCNT2 i YFPCNT2Δ en cèl·lules MDCK, cèl·lules que polaritzen fàcilment *in vitro* quan es sembren sobre filtres permeables. Així, utilitzant aquest model i sota les condicions descrites en l'apartat de Materials i Mètodes, es va determinar el paper de l'extrem amino-terminal en la localització apical del transportador mitjançant immunofluorescència directa i funcionalment mitjançant assaigs de transport apical i basal de [H³]-guanósina. Com es pot observar a la **figura 50**, les cèl·lules MDCK (WT) presenten un transport independent de sodi majoritari a la membrana basolateral i una petita fracció de transport dependent sodi, que contràriament al que s'esperaria també es detecta a la membrana basolateral. La sobreexpressió del transportador CNT2 (YFPCNT2) en aquest model cel·lular resulta en l'aparició de transport dependent de sodi a la membrana apical de les cèl·lules i en un increment del transport concentratiu a la membrana basolateral (**figura 50.A**). Així, d'acord amb el què han descrit altres autors aproximadament el 75% de l'activitat total de CNT2 se situa a la membrana apical i el 25% restant es localitza a la membrana basolateral (**figura 50.C**) (Mangravite et al., 2001). Però en canvi, quan s'expressa la proteïna delecionada (YFPNΔCNT2), la localització subcel·lular del transportador canvia de manera que el 80% del transport mitjançat per CNT2 es detecta a la membrana basolateral mentre només el 20% restant és manté a la membrana apical (**figura 60. A/C**). Les imatges obtingudes per microscopia confocal permeten confirmar la diferent localització de la proteïna sencera i de la proteïna delecionada a les dues membranes de les cèl·lules (**figura 50.B**). Addicionalment cal destacar que la taxa total de transport entre les dues construccions varia (**figura 50.A**). Així, anàlogament als resultats obtinguts en models no polaritzats, la delecio de l'extrem N-terminal produeix una disminució de l'activitat basal d'aproximadament el 40%. I

de la mateixa manera aquesta disminució d'activitat es correlaciona amb l'acumulació de la proteïna en grànuls o vesícules intracel·lulars (**figura 50.B**). Aquests seguit d'observacions suggereixen que l'extrem N-terminal és necessari per al correcte tràfic i inserció del transportador CNT2 a la membrana apical de les cèl·lules absortives.

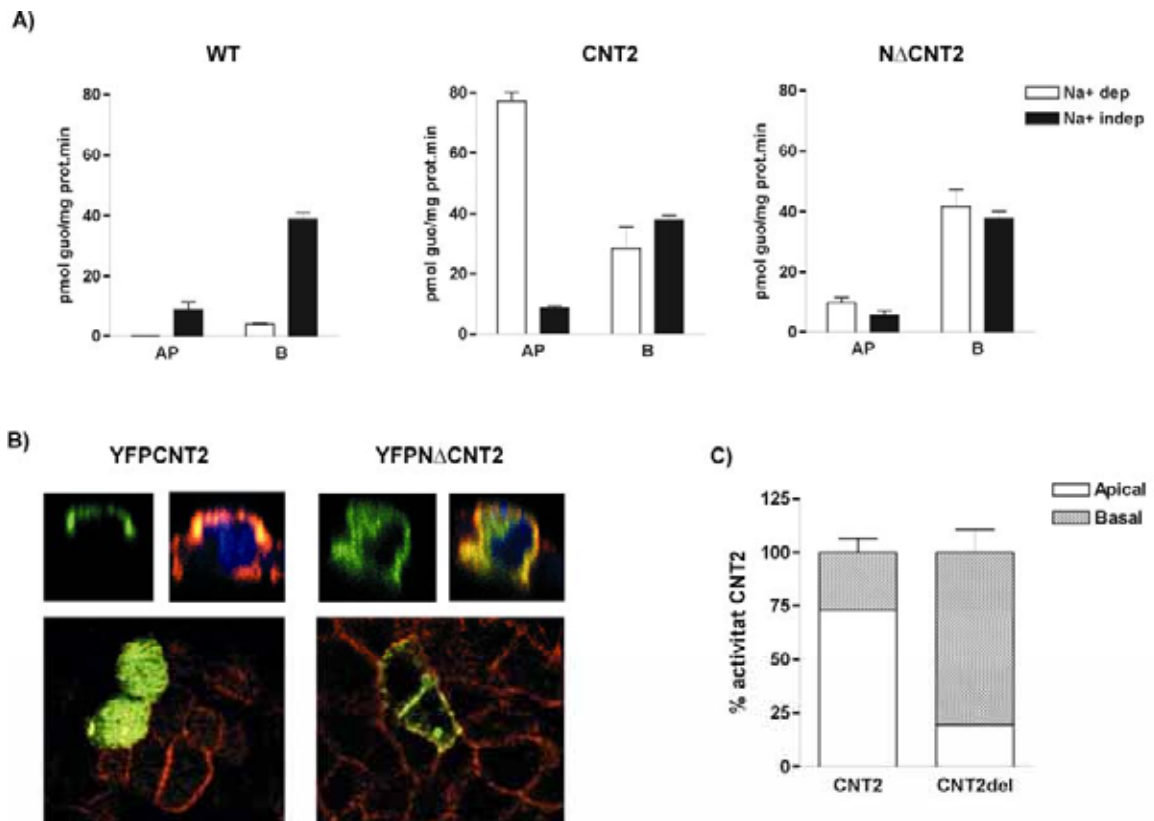


Figura 50: Localització subcel·lular de CNT2 i Δ CNT2 en cèl·lules MDCK polaritzades. Es van sembrar les cèl·lules en plaques de transwell i 24 hores després es van transfectar amb les construccions YFPCNT2 i YFP Δ CNT2. Posteriorment, una vegada haver comprovat que la monocapa estava correctament polaritzada (48-72 hores post-transfecció) es va determinar la captació apical i basolateral de guanosina (**A**). El blanc representa el transport concentratiu mitjançat per CNT2 i en negre el transport equilibratiu. Alternativament, les cèl·lules es van fixar i marcar amb Faloidina-TRITC que permet marcar els filaments d'actina (en vermell) i Toto-3-iodide que marca nuclis (blau) (**B**). Es mostren seccions verticals (a dalt) i horitzontals (a baix) de cèl·lules transfectades amb la superposició de les imatges obtingudes amb les tres longituds d'ona d'excitació. (**C**) Representació del percentatge d'activitat apical i basolateral de YFPCNT2 i YFP Δ CNT2 relativitzat a la taxa total de transport en cadascun dels casos.

En aquest sentit, es pot dir que en els primers 66 aminoàcids del transportador se situa un senyal de *sorting* o direccionament al domini apical, tot i que no es descarta la possibilitat que una altre seqüència situada en una altre part de la proteïna també sigui necessària ja que no es perd completament la localització apical del transportador. En base als motius de seqüència presents i a la bibliografia existent respecte la implicació de la seqüència de N-miristil·lació en la localització a membrana de moltes proteïnes (Sugiura et al., 2002; Yasuda et al., 2000; Vaandrager et al., 1996), es va decidir estudiar el possible paper d'aquesta seqüència en l'expressió apical del transportador CNT2. Així, es va introduir una mutació puntual en el nucleòtid 391 de la seqüència de CNT2 a fi de que el triplet codificant de la Gly⁵⁰, on tindria lloc l'addició de miristat mitjançant un enllaç amida, passés a codificar una Ala.

La primera aproximació duta a terme per determinar la funcionalitat i localització de la proteïna mutada es va realitzar en un model no polaritzat, en cèl·lules CHO. Com es pot apreciar, la mutació de la Gly⁵⁰, amb la conseqüent pèrdua del possible lloc de N-miristil·lació no produeix cap efecte sobre l'activitat CNT2 (**figura 51.A**), ni tampoc sobre la seva localització a la superfície cel·lular (**figura 51.B**). És a dir, que la proteïna mutada sembla seguir el mateix patró de tràfic i localització que la forma *wild type*.

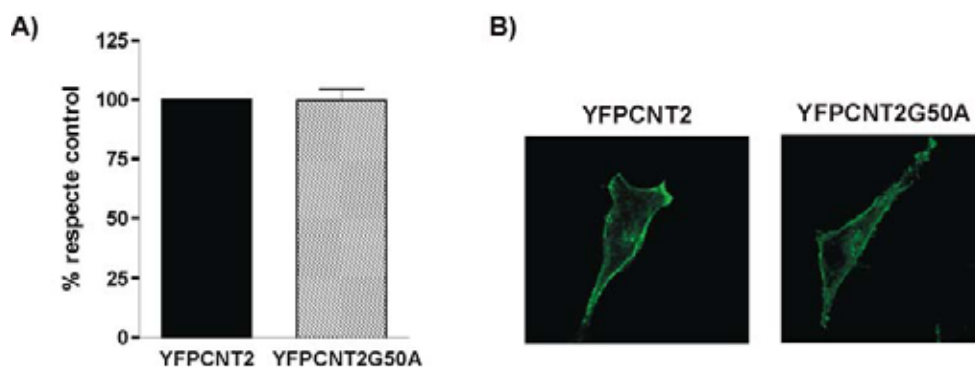


Figura 51: Estudi del paper del motiu de N-miristil·lació en l'activitat i localització subcel·lular de la de CNT2. Es va determinar el transport concentratiu de guanosina (**A**) i la localització subcel·lular de la proteïna mutada per immunofluorescència en cèl·lules CHO transfectades amb el plàsmid YFPCNT2G50A (**B**).

Tanmateix, per acabar de comprovar la implicació d'aquest residu en la localització apical de CNT2, es va expressar YFPCNT2G50A en el model polaritzat de cèl·lules MDCK. De la mateixa manera que en la línia cel·lular anterior, en aquest tipus cel·lular tampoc s'observen canvis significatius respecte l'activitat del transportador normal. Així, anàlogament a la proteïna YFPCNT2, la proteïna mutada es localitza principalment a la membrana apical de les cèl·lules, mitjançant més del 75% del transport concentratiu total (**figura 52**). Aquests resultats permeten concloure que el residu de N-miristil·lació no és essencial per a la inserció del transportador CNT2 a la membrana apical de les cèl·lules epitelials absortives.

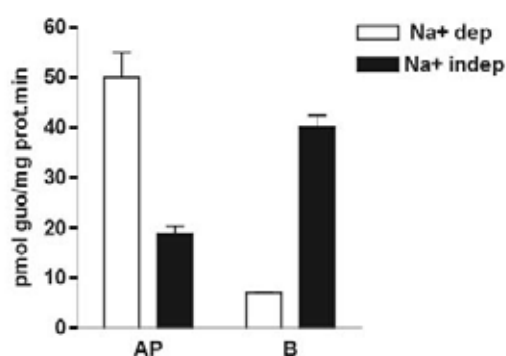


Figura 52: Localització funcional de la proteïna mutada YFPCNT2G50A en cèl·lules MDCK polaritzades. Captació de guanosina apical i basolateral en cèl·lules MDCK transfectades amb la construcció YFPCNT2G50A.

En aquest estudi s'ha considerat el possible paper de l'extrem N-terminal citoplasmàtic del transportador CNT2 en el seu *sorting* o direccionament a la membrana plasmàtica de les cèl·lules i en concret a la membrana apical de les cèl·lules polaritzades. En un primer pas, mitjançant la generació de diferents construccions (YFPCNT2 i CNT2-myc) que faciliten la detecció de la proteïna s'ha determinat la seva localització subcel·lular en diferents tipus cel·lulars. Així, en models cel·lulars no polaritzats CNT2 s'expressa majoritàriament a la membrana plasmàtica, on desenvolupa la seva funció, tot i que en algunes línies cel·lulars també s'observa un cert marcatge intracel·lular com és el cas de les cèl·lules CHO i HepG2. Addicionalment, la generació d'aquestes proteïnes de fusió és d'utilitat no només en la visualització de la localització constitutiva del transportador CNT2 sinó que permet detectar la seva mobilitat en resposta a factors fisiològics. En aquest sentit, recentment en el nostre grup de recerca s'ha posat de manifest per primera vegada que la via de tràfic i la inserció a membrana de CNT2 està sotmesa a mecanismes de regulació. Així, en el marc de les tesis doctorals de la Dra. Fernández Veleo i de la Isabel Huber-Ruano, s'ha demostrat que els àcids bil·liars modulen el tràfic i localització de CNT2 a la superfície cel·lular en model hepàtics

mitjançant una via que depèn de la PI3K, de la cascada Ras/Raf/MEK/ERK i de la xarxa de microtúbuls. L'expressió de YFPCNT2 en cèl·lules FAO i HepG2 ha permès corroborar els resultats obtinguts per altres tècniques (activitat i fraccionament subcel·lular) i visualitzar l'increment de l'expressió de CNT2 a la membrana plasmàtica de les cèl·lules en resposta a l'àcid taurocòlic.

D'altra banda, s'han confirmat resultats obtinguts per altres autors (Patil and Unadkat, 1997; Hamilton et al., 2001; Mangravite et al., 2001) que afirmaven una localització de CNT2 predominantment apical en les cèl·lules epitelials absortives. Mitjançant assaigs funcionals en cèl·lules MDCK sembrades en filtres permeables i transfectades amb la proteïna de fusió YFPCNT2 s'ha demostrat que el 75% de l'activitat CNT2 se situa a la membrana apical de les cèl·lules i el 25% restant es localitza a la membrana basolateral. Aquest fet podria ser degut a una saturació de la via de tràfic a la membrana apical, com ha estat descrit per a altres transportadors (Marmorstein et al., 2000). Però també podria reflectir un paper dual del transportador CNT2 a les dues membranes de les cèl·lules epitelials renals. En efecte, CNT2 és el transportador més afí per adenosina, és a dir que regula la seva concentració tant extracel·lular contribuint a la bioassequibilitat del nucleòsid als receptors purinèrgics i intracel·lular que com hem vist en l'apartat anterior sembla jugar un paper en la regulació de la via de l'AMPK.

La polaritat de les cèl·lules epitelials depèn del repartiment i inserció selectius de proteïnes i lípids en els diferents dominis de la membrana plasmàtica. Així, el tràfic d'una proteïna al domini apical o basolateral de la membrana plasmàtica no segueix una via a l'atzar, sinó que depèn de senyals específics o interaccions amb altres proteïnes que determinen en el transgolgi (TGN) la seva incorporació a vesícules de transport apicals o basolaterals. S'han descrit una àmplia varietat de mecanismes implicats en el direccionament a la membrana apical de les cèl·lules polaritzades, i aquests senyals s'han localitzat tant en dominis extracel·lulars, citoplasmàtics com transmembrana de les proteïnes. Per exemple la incorporació de N-glicans és essencial per a l'expressió apical d'alguns transportadors (Hendriks et al., 2004; Pang et al., 2004); tanmateix la mutació dels tres únics llocs de glicosilació del transportador CNT2 situats a l'extrem C-terminal, va posar de manifest que no eren imprescindibles per a la seva localització (Mangravite and Giacomini, 2003). Els resultats presentats en aquest apartat demostren que el senyal que determina el direccionament de CNT2 a la membrana

apical es troba a l'extrem N-terminal intracel·lular. Així, la delecció dels primers 66 aminoàcids de la proteïna resulta en la pèrdua de la localització apical associada a un lleuger increment de la localització basolateral. Addicionalment, en absència de l'extrem N-terminal, s'observa certa retenció del transportador a l'interior cel·lular que es tradueix en una disminució de l'activitat total de transport d'aproximadament el 40% tant en cèl·lules MDCK polaritzades com en models no polaritzats (cèl·lules CHO, HeLa i FAO). El fet que es produeixi una baixada de la taxa inicial de transport en cèl·lules no polaritzades però en canvi que l'activitat basolateral en cèl·lules MDCK no es vegi afectada, sinó que fins i tot incrementi, podria suggerir que a més de bloquejar el tràfic a la membrana apical de les cèl·lules, la delecció dels primers 66 residus podria comportar un mal plegament de la proteïna. En aquest sentit, si només s'ha perdut el senyal que determina on ha de distribuir-se la proteïna, el més probable és que es produeixi una acumulació o retenció a nivell del reticle endoplasmàtic o de l'aparell de golgi, com s'ha descrit per a altres proteïnes de membrana (Sun et al., 1998; Hendriks et al., 2004; Miranda et al., 2004). No obstant, les immunocitoquímiques realitzades amb diferents marcadors d'estructures cel·lulars posen de manifest que la proteïna truncada no queda retinguda en aquests orgànuls. Tot i que no s'ha pogut acabar de comprovar, pel tipus de marcatge que s'observa podria tractar-se d'agregosomes o autofagosomes, que en els dos casos indicarien que una part de la proteïna sintetitzada no és capaç de plegar-se correctament i s'acabaria acumulant en aquestes estructures per poder ser eliminada.

En concret, el conjunt de dades presentades demostren que una forma mutada del transportador CNT2 a la que li manca la cua amino-terminal perd la seva localització polaritzada a la membrana apical, és a dir, que existeix una seqüència en els primers 66 aminoàcids de la proteïna determinants per al seu direccionament apical. Segons les anàlisis de seqüència, en aquest extrem es localitzen 3 dominis conservats: dos llocs susceptibles de fosforilació per la CK II (aminoàcids 37-40; 46-49), un per la PKC que es solaparia a un dels anteriors (aminoàcids 46-48) i un possible motiu de N-miristil·lació (aminoàcids 50-54). Com que algunes proteïnes de membrana requereixen la presència de motius de N-miristil·lació per poder ser expressades a la superfície cel·lular (Sugiura et al., 2002 Yasuda et al., 2000; Vaandrager et al., 1996; Sessa et al., 1993) i a més s'ha descrit que alguns motius de N-miristil·lació són suficients per dirigir la proteïna GFP a la membrana plasmàtica (McCabe and Berthiaume, 1999), es va decidir analitzar la

possible implicació d'aquesta seqüència en el tràfic de CNT2 a la membrana i en concret a la membrana apical de les cèl·lules MDCK. Sorprenentment, el canvi de la Gly⁵⁰, que és on tindria lloc la incorporació de miristat, a Ala, va posar de manifest que aquest residu no és essencial per a la localització subcel·lular de CNT2, de manera que no s'observen diferències significatives ni de l'activitat ni de la localització subcel·lular entre la proteïna mutant YFPCNT2G50A i la proteïna *wild type*.

Actualment dins del projecte de tesi de la doctoranda Itziar Pinilla, s'està duent a terme un mapatge exhaustiu de l'extrem N-terminal mitjançant la generació de diferents proteïnes de fusió YFPCNT2 que contenen deleccions seqüencials de la proteïna i mitjançant mutagènesi dirigida dels dos possibles llocs de fosforilació de la caseïna quinasa II (CK II). El fet que no s'hagin observat canvis de l'activitat basal de CNT2 quan s'ha analitzat, mitjançant inhibidors específics, la possible implicació de la PKC en resposta a diferents efectors, suggereix que aquesta proteïna quinasa no juga cap paper en l'activitat o en la localització del transportador. En canvi, existeixen evidències de la possible implicació de les proteïnes CK II en l'activitat dels transportadors de nucleòsids. En aquest sentit, s'ha descrit que l'expressió d'una forma mutada i inactiva de la CK II, produeix un increment de l'activitat es i un increment del nombre de transportadors ENT1 a la membrana plasmàtica. Els autors postulen que la vida mitja dels transportadors ENT1 a la membrana plasmàtica i/o el seu tràfic a través compartiments de membrana subcel·lulars estaria regulat en part mitjançant la fosforilació del transportador per la caseïna quinasa (Stolk et al., 2005). No obstant, cal tenir en compte, que a diferència de CNT2 i els altres transportadors concentratius, els transportadors equilibratius se situen a la membrana basolateral de les cèl·lules epitelials absortives, és a dir que els senyals de *sorting* han de ser diferents entre les dues famílies; a més cal destacar que en el treball que es cita no hi ha cap evidència directa de la implicació del motiu de fosforilació per CK II en l'expressió a membrana d'ENT1.

D'altre banda, s'ha descrit que l'expressió apical del transportador d'àcids bil·liars que s'expressa a intestí prim, Asbt, requereix la presència d'una seqüència de 14 aminoàcids a l'extrem citoplasmàtic de la proteïna, l'extrem C-terminal, molt semblant a la de l'extrem amino-terminal de CNT2 i que conté dos llocs de fosforilació seguits un per a la CK II i un per a la PKC (Sun et al., 1998; Sun et al.,

2003). En aquest cas, s'ha demostrat que malgrat que es produeix una disminució del transport apical quan es muten els dos llocs susceptibles de fosforilació per la CK II i la PKC, és necessària la delecció de la seqüència de 14 aminoàcids sencera perquè es perdi completament la localització apical i es produeixi una inserció a les dues membranes de les cèl·lules MDCK a l'atzar. Addicionalment, els autors, mitjançant anàlisis estructurals d'espectrometria de masses, han posat de manifest que els 14 aminoàcids adopten una conformació determinada en forma de gir β , que és essencial per dirigir el transportador a la membrana apical de les cèl·lules (Sun et al., 2003). Posteriorment, s'ha demostrat que el transportador Asbt, interacciona amb la subunitat c de la bomba de protons de vacuoles (VPP-c) i que aquesta interacció, malgrat no ser suficient, sí que és resonsable en certa mesura la localització apical del transportador (Sun et al., 2004).

En aquest estudi s'han definit les primeres bases per tal d'identificar els determinants moleculars implicats en la localització del transportador CNT2, tanmateix queda un llarg camí a recórrer. Les dades obtingudes demostren que a l'extrem amino-terminal se situa un senyal de *sorting* a la membrana apical de les cèl·lules epitelials renals MDCK i possiblement la part de seqüència que conté els llocs consens de fosforilació de la CK II i PKC és determinant en aquesta localització. Actualment, en el nostre grup de recerca s'està duent a terme una doble aproximació per tal de poder finalitzar aquest estudi. D'una banda, com s'ha comentat, s'està acabant de definir la seqüència mínima responsable de la expressió polaritzada del transportador i d'altre banda s'està intentant identificar possibles proteïnes d'interacció implicades tant en la localització com en la funció o regulació del transportador CNT2. Cal tenir en compte que CNT2 presenta una localització determinada segons el tipus cel·lular, de manera que a diferència del que s'ha vist en epitelis absortius intestinals i renals, en cèl·lules epitelials hepàtiques la seva expressió es restringeix a la membrana basolateral. Aquest fet suggereix la presència i participació de proteïnes d'interacció específiques de teixit. Aquesta búsqueda l'està realitzant la doctoranda Isabel Huber-Ruano mitjançant la tècnica del doble híbrid en llevat, experiments de GST pull-down i electroforesi bidimensional.