

V. DISCUSSIÓ GENERAL

Les cèl·lules epitelials absortives depenen dels transportadors de membrana per a dur a terme la seva principal funció. Per a determinats metabolits, com per exemple la glucosa, la presència de transportadors concentratius dependents de sodi a la membrana apical dels enteròcits assegura la completa absorció dels nutrients, i els transportadors equilibratius situats a la membrana basolateral permeten la sortida d'aquests nutrients cap a la circulació (Wright et al., 2001). Els epitelis intestinals i renals expressen transportadors de nucleòsids concentratius i equilibratius i tant els estudis funcionals com la detecció de les diferents isoformes semblen indicar que els transportadors concentratius s'expressen a la membrana apical de les cèl·lules absortives i en canvi els equilibratius estarien principalment localitzats a la membrana basolateral (Lee et al., 1988; Patil and Unadkat, 1997; Valdés et al., 2000; Scharrer and Grenacher, 2001; Hamilton et al., 2001). Aquesta distribució dual de les dues famílies de transportadors ha estat corroborada en models d'expressió heteròloga de les diferents isoformes de transportadors de nucleòsids marcades amb proteïnes fluorescents. En efecte, en aquests models, els transportadors equilibratius es troben majoritàriament situats a la membrana basolateral (Lai et al 2002; Mangravite et al 2003), i l'expressió dels transportadors concentratius CNT1 i CNT2 es troba restringida o és predominant a la membrana apical, respectivament (Mangravite et al 2001, Lai et al 2002).

La localització diferencial dels transportadors de nucleòsids a les dues membranes de les cèl·lules epitelials intestinals i renals és consistent amb l'existència d'un flux transepitelial de nucleòsids, fet que s'ha evidenciat en un model renal d'expressió heteròloga (Lai et al., 2002). En aquest context, es va fer evident la necessitat d'un bon model d'epiteli absortiu intestinal per tal de realitzar tant estudis de captació i flux de nucleòsids com de regulació dels transportadors responsables de l'entrada d'aquests compostos. La caracterització de les línies cel·lulars IEC-6, derivada d'epiteli intestinal de rata, i Caco-2, derivada d'un adenocarcinoma de colon humà, va posar de manifest que tot i que les dues línies cel·lulars, de la mateixa manera que l'epiteli intestinal nadiu, expressen els transportadors concentratius CNT1 i CNT2 i els transportadors equilibratius ENT1 i ENT2, només la línia cel·lular IEC-6 manté activitats de transport concentratives. Així, en la línia cel·lular IEC-6 el transport concentratiu representa més del 80% de l'activitat total de transport i correspon quasi totalment al transportador CNT2. Les diferències existents entre les dues línies cel·lulars, i en concret la pèrdua del transport dependent de sodi en les cèl·lules Caco-2, són consistents amb resultats obtinguts en el nostre grup de recerca 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 i activitat de les isoformes concentratives i el nivell de transformació cel·lular. Addicionalment, estudis realitzats en dos models d'hepatocarcinogènesi induïda han demostrat que les cèl·lules tumorals tenen tendència a perdre l'expressió de les isoformes concentratives i a enriquir-se amb les isoformes equilibratives (Dragan et al., 2000).

En base a aquests resultats, i tenint en compte que la línia cel·lular IEC-6 no és capaç de formar una monocapa correctament polaritzada, per tal de dur a terme estudis de flux vectorial de nucleòsids i de fàrmacs derivats es va generar un clon de cèl·lules Caco-2 que expressa de manera estable el transportador hCNT1, principal transportador concentratiu de fàrmacs derivats de nucleòsids (Pastor-Anglada et al., 2004). El clon estable Caco-2-hCNT1 generat ha permès posar de manifest que l'activitat concentrativa pirimidino-preferent, corresponent al transportador CNT1, se situa exclusivament a la membrana apical de les cèl·lules intestinals i que resulta en un increment del flux vectorial apical tant d'uridina com de gemcitabina. Addicionalment, s'han observat diferències en el flux vectorial dels nucleòsids i en la quantitat de substrat que s'acumula a l'interior cel·lular, tant en funció del tipus de substrat com del compartiment al qual s'afegeix aquest substrat. Així, l'acumulació intracel·lular basolateral d'uridina és superior a l'apical tant en les cèl·lules *wild type* com en el clon estable Caco-2-hCNT1. D'altra banda, si el substrat és gemcitabina l'acumulació intracel·lular dependent de sodi és nul·la, és a dir que tota la gemcitabina que és internalitzada via CNT1 és alliberada al compartiment contrari a través dels ENT o altres transportadors. Resultats similars s'han obtingut en un model d'epiteli renal que presenta l'activitat CNT3 endògena. Tanmateix, el clon estable Caco-2-hCNT1 no ha resultat ser un model prou adient per analitzar el flux transepitelial de nucleòsids ja que encara que els nivells de missatger del transportador introduït són 35 vegades superiors als de les cèl·lules *wild type*, l'impacte que aquest increment de missatger produeix sobre l'activitat apical total de transport és tant sols d'un 20-30%. En aquest sentit, tenim evidències que suggereixen que CNT1 és un transportador altament regulat tant transcripcionalment com de manera traduccional i sobretot durant el seu tràfic a la membrana de les cèl·lules (Duflot et al., 2002; Fernández-Veledo, et al., 2004).

Diversos estudis duts a terme en el nostre grup de recerca han demostrat que l'expressió de les diferents isoformes de transportadors de nucleòsids depèn en certa

mesura de l'estat de proliferació i diferenciació cel·lular (del Santo et al., 2001). En base a aquests antecedents i utilitzant com a model d'estudi la línia cel·lular intestinal IEC-6, que presenta activitats concentratives i equilibratives endògenes, s'ha posat de manifest l'existència d'una regulació diferencial dels diferents transportadors de nucleòsids en funció del tipus d'estímul que reben les cèl·lules. En aquest sentit, els glucocorticoids, agents que afavoreixen la maduració de la mucosa intestinal (Isselbacher, 1974; Quaroni et al., 1979) i en concret produeixen una aturada en el cicle cel·lular, canvis estructurals (Quaroni et al., 1999) i modulen l'expressió de diversos transportadors de nutrients en cèl·lules IEC-6 (Iannoli et al., 1998), també regulen els transportadors de nucleòsids presents en aquesta línia cel·lular. Així, el tractament amb dexametasona produeix un increment de l'expressió i activitat dels transportadors concentratius CNT2 i CNT1, suggerint una millora de l'absorció dels nucleòsids de la dieta, fet consistent amb un fenotip més diferenciat de les cèl·lules epitelials intestinals. Addicionalment, la dexametasona també induïx les activitats equilibratives, presents a la membrana basolateral d'aquestes cèl·lules i això podria suggerir un increment del flux transepitelial dels nucleòsids absorbits. D'altra banda, estímuls proliferatius, com l'exposició a factors de creixement o una lesió a la monocapa de cèl·lules, produeixen un increment específic de l'expressió i activitat del transportador equilibratiu ENT1, que en aquest cas semblaria estar implicat en la captació de nucleòsids des de la circulació per tal de mantenir la proliferació cel·lular. Tant els factors de creixement com una lesió de la monocapa cel·lular estimulen la cascada de les MAPK en la línia cel·lular IEC-6 (Oliver et al., 1994; Dionne et al., 1998; Göke et al., 1998), i en el nostre model els dos tipus d'estímuls produeixen un increment de les formes fosforilades i actives d'ERK1 i ERK2. Tanmateix, mentre l'increment de l'expressió i activitat d'ENT1 en resposta al dany cel·lular pot explicar-se per un augment de la taxa de transcripció del seu gen mitjançant per la via de senyalització d'ERK, els efectes produïts pels dos factors de creixement no poden explicar-se exclusivament per aquesta via. En aquest sentit s'ha observat que tot i que quan s'inhibeixen les proteïnes ERK1/2 es bloqueja l'increment de l'activitat del transportador ENT1 en resposta a EGF i TGF- α , l'efecte dels factors de creixement sobre l'expressió del transportador no s'inhibeix. Malgrat haver provat inhibidors específics de proteïna quinases implicades en les principals vies de transducció de senyals no hem pogut acabar d'elucidar els mecanismes mitjançant els quals els dos factors de creixement modulen l'expressió i activitat del transportador equilibratiu ENT1.

D'altre banda, els transportadors de nucleòsids, de la mateixa manera que altres transportadors de nutrients són sensibles a l'assequibilitat dels seus substrats, que en el cas de l'epiteli intestinal vindria determinada pel contingut de la dieta. En aquest sentit, el nostre grup de recerca ha demostrat mitjançant la utilització de models *in vivo* que el transportador CNT1 està regulat a llarg termini per l'assequibilitat de substrat i de manera específica de teixit (Valdés et al., 2000). Amb l'objectiu de reproduir *in vitro* la possible relació entre l'estat nutricional de l'individu i la bioassequibilitat de nucleòsids observada *in vivo*, es va avaluar l'efecte del tractament amb diferents nucleòsids individuals sobre l'expressió i activitat dels transportadors de nucleòsids en la línia cel·lular intestinal IEC-6. Tot i no observar-se canvis en l'expressió dels transportadors de nucleòsids a llarg termini, aquest estudi ha posat de manifest l'existència d'una ràpida regulació de la seva activitat en presència dels seus substrats. Així, el tractament amb purines produeix un increment de la *K_m* aparent del transportador que resulta en una ràpida disminució de la seva activitat. Aquest canvi en l'afinitat del transportador podria ser conseqüència d'una modificació covalent de la proteïna o podria tractar-se d'un efecte alostèric. Encara que els resultats no són concloents, la nostre hipòtesi recolzaria la possible existència d'un efecte alostèric mitjançat pels propis substrats. En aquest sentit, s'ha observat que quan es bloqueja parcialment la metabolització de l'adenosina mitjançant un inhibidor específic de la seva fosforilació, s'inhibeix la captació d'adenosina però en canvi no es veu afectada la captació de guanosina. Semblaria doncs, que l'acumulació dels nucleòsids a l'interior cel·lular és necessària perquè es produeixi la inhibició de l'activitat de CNT2. Tanmateix, degut a les dificultats a l'hora de valorar les concentracions de nucleòsids no s'ha pogut comprovar el suposat canvi en el *pool* intracel·lular d'aquests compostos. Cal comentar però, que en cap moment s'ha demostrat que sigui un efecte directe dels nucleòsids, sinó que aquests podrien actuar mitjançant una proteïna quinasa i com a conseqüència produir un canvi en l'estat de fosforilació del transportador. No obstant, els exemples existents a la bibliografia sobre l'efecte de modificacions covalents de diferents proteïnes transportadores generalment comporten un canvi en la seva localització (Golin-Bisello et al., 2005) o en la taxa de recanvi (Wang et Oram, 2005) però en cap cas no s'ha descrit un canvi de la *K_m* o afinitat del transportador. Addicionalment, en aquest estudi s'ha analitzat la possible implicació en aquest efecte de diverses proteïnes quinases (PKA, PKC, PI3K, MAPK, Tor quinasa, AMPK) i cap d'elles sembla estar implicada en la regulació de CNT2 per assequibilitat de substrat, encara que no es pot descartar que una altra proteïna quinasa no

analitzada o identificada sigui la responsable de mitjançar l'efecte dels nucleòsids sobre CNT2.

Finalment, vam voler analitzar els determinants moleculars implicats en la localització subcel·lular del transportador concentratiu CNT2. La distribució asimètrica de les dues famílies de transportadors de nucleòsids suggereix l'existència de mecanismes de tràfic i direccionament específics ja no només entre les dues famílies de transportadors sinó possiblement entre les diferents isoformes de cadascuna de les famílies. En efecte, mentre CNT1 s'ha detectat exclusivament a la membrana apical de les cèl·lules absortives, CNT2 també es localitza, tot i que en menor grau, a la membrana basolateral. Tenint en compte que aquests estudis s'han dit a terme en un sistema d'expressió heteròloga, aquest fet podria ser degut a una saturació de la via de tràfic a la membrana apical, però també podria suggerir un paper dual de CNT2 a les dues membranes de les cèl·lules epitelials renals. Cal destacar que en cèl·lules hepàtiques els dos transportadors presenten una localització específica i vies de tràfic diferents (Duflot et al., 2002). Són pocs els estudis sobre les seqüències responsables de la localització de les diferents isoformes de transportadors de nucleòsids realitzats fins al moment. En aquest sentit, s'ha descrit la possible implicació d'un motiu dileucina localitzat a l'extrem carboxi-terminal de la seqüència d'ENT2 en l'expressió d'aquest transportador a la superfície cel·lular (Mangravite et al., 2003). Pel que fa als transportadors concentratius, l'únic estudi dut a terme fins al moment ha posat de manifest que els residus susceptibles de N- glicosilació del transportador CNT2 no són essencials pel seu direccionament a la membrana apical de les cèl·lules epitelials absortives (Mangravite et al., 2002).

Dins d'aquest context, els resultats presentats en aquesta memòria indiquen que la seqüència responsable de la localització apical de CNT2 es trobaria a l'extrem amino-terminal de la proteïna. Concretament, s'ha demostrat que la delecció dels primers 66 aminoàcids del transportador produeix canvis de la seva localització subcel·lular, de manera que es bloqueja quasi completament la seva expressió apical però en canvi es manté o incrementa la seva localització i activitat a la membrana basolateral de les cèl·lules MDCK polaritzades. Addicionalment, en absència de l'extrem N-terminal es produeix una acumulació del transportador a l'interior cel·lular, en unes estructures en forma de grans grànuls o vesícules, que tot i que encara no hem aconseguit indentificar podrien tractar-se d'autofagosomes. Aquesta retenció intracel·lular de la proteïna CNT2 deleccionada té lloc tant en models cel·lulars

polaritzats com no polaritzats i resulta en una disminució significativa de l'activitat total de transport en les diferents línies cel·lulars analitzades. Aquests resultats suggereixen que la manca de l'extrem amino-terminal podria comportar un mal plegament de la proteïna de manera que gran part de les proteïnes sintetitzades es dirigirien directament a estructures que faciliten la seva degradació. No obstant, el fet que només es veu afectada l'expressió i subseqüent activitat apical en les cèl·lules MDCK polaritzades indica que a l'extrem N-terminal de CNT2 existeix una senyal crítica per la seva localització a la membrana apical. Segons les anàlisis de seqüència primària, l'extrem amino-terminal contindria un possible lloc de fosforilació de la PKC, dos motius susceptibles de fosforilació de la caseïna quinasa II i un possible lloc de N-miristil·lació. Malgrat que els motius de N-miristil·lació estan implicats en l'expressió de diverses proteïnes a la membrana plasmàtica (Sessa et al., 1993; Vaandrager et al., 1996; Yasuka et al., 2000; Konno et al., 2002), aquesta seqüència no sembla jugar cap paper en l'expressió a membrana de CNT2.

Arribats a aquest punt, i havent estudiat tant mecanismes implicats tant en la localització subcel·lular i tràfic del transportador CNT2 com en la seva regulació, ens vam plantejar determinar les possibles funcions de CNT2 en la fisiologia de la cèl·lula. Tot apunta que el principal paper dels transportador de nucleòsids, i concretament dels transportadors concentratius, és l'absorció o captació de nucleòsids per finalitats biosintètiques. Tanmateix, s'ha de tenir en compte que aquests transportadors s'expressen a la majoria de tipus cel·lulars, epitelials i no epitelials, i com s'ha demostrat i comentat al llarg d'aquesta memòria la seva activitat està regulada a molts nivells: transcripcional, post-traducciona i durant el seu tràfic i inserció a la membrana plasmàtica. D'altra banda cal destacar que aquestes proteïnes transportadores regulen les concentracions de nucleòsids extracel·lulars, susceptibles de modular receptors purinèrgics (Szkotak et al., 2001; Ackley et al., 2003; Hack and Christie, 2003), i intracel·lulars, contribuint per tant al *pool* intracel·lular de nucleòtids. Addicionalment, un estudi recent dut a terme en el nostre grup de recerca ha demostrat que l'activitat CNT2 està regulada purinèrgicament mitjançant un mecanisme que depèn de la funció dels canals K_{ATP} , canals sensibles a l'estat energètic de la cèl·lula (Dufrot et al., 2004).

El nostre estudi ha posat de manifest que l'adenosina extracel·lular, que entra a l'interior cel·lular a través dels transportadors equilibratius i el concentratiu CNT2 i una vegada a l'interior cel·lular pot ser ràpidament fosforilada generant AMP, sembla contribuir a la regulació de l'AMPK, enzim que juga un paper clau en l'homeòstasi

energètica. En efecte, en presència de concentracions d'adenosina pròximes al rang fisiològic es produeix un increment específic de la fosforilació i activitat de la isoforma α 1AMPK que resulta en la modulació d'una de les seves dianes més ben caracteritzades, l'acetilCoA carboxilasa (ACC). Aquest mecanisme de regulació, en el qual els transportadors de nucleòsids i especialment CNT2 semblen jugar un paper clau, té lloc tant en cèl·lules derivades d'epiteli intestinal com en models hepàtics. 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; en aquest sentit els resultats obtinguts han demostrat que l'entrada d'adenosina extracel·lular comporta, via l'activació de l'AMPK, un increment de la fosforilació de l'ACC que en aquest cas és indicatiu d'una inhibició de la seva activitat. Existeixen diversos treballs que apunten que l'adenosina modula determinades funcions hepàtiques (Carabaza et al., 1990; Lund et al., 1975), el nostre estudi suggereix que l'adenosina a més de mitjançar les seves funcions a través de receptors específics de membrana podria participar en la fisiologia de la cèl·lula a través del seu transport a l'interior cel·lular i subseqüent metabolització.

En conclusió, els resultats obtinguts en aquesta tesi han contribuït a determinar alguns mecanismes responsables tant de la localització subcel·lular com de la regulació dels transportadors de nucleòsids, en concret del transportador d'alta afinitat d'adenosina CNT2, i a la vegada ha posat de manifest que aquests transportadors, a més de ser necessaris per mantenir les vies de recuperació o *salvage*, podrien jugar un paper en la senyalització cel·lular. Així, el transportador concentratiu d'alta afinitat d'adenosina CNT2 a través d'un lligam entre el transport d'adenosina i l'activació de l'AMPK podria participar en la complexa regulació del metabolisme energètic.